



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TORINO

DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERINARIE

Settore Malattie Infettive degli Animali Domestici

Corso di Laurea magistrale a ciclo unico in

MEDICINA VETERINARIA

TESI DI LAUREA

Indagine su antimicrobico-resistenza in polli da carne in allevamento
intensivo e in lavoratori esposti

RELATORE

Alessandro Mannelli

CANDIDATA

Lucrezia Dellepiane

CORRELATORE

Franco Piovano

Anno Accademico 2018-2019

Ringraziamenti

Desidero ringraziare il Professor Alessandro Mannelli per avermi dato la possibilità di sviluppare questo appassionante progetto di tesi e per i consigli elargiti in questi anni, sempre con la massima disponibilità e pazienza.

Ringrazio il Dottor Franco Piovano, un faro in questo percorso, per avermi dimostrato quanto qualità rare come la passione e la determinazione contino realmente nella Professione.

Vorrei ringraziare il personale del Dipartimento di Scienze Veterinarie dell'Università di Torino che mi ha aiutata e consigliata, in particolare la Dottoressa Miryam Bonvegna e la Dottoressa Maria Cristina Stella, per avermi guidata nel complesso mondo della microbiologia; ringrazio inoltre i Dottori Marta Bottino, Giorgio Franceschini, Monica Marchino e Ilary Millet, il lavoro dei quali è stato fondamentale per la realizzazione di questa tesi.

Un ringraziamento particolare va agli allevatori che, con grande disponibilità, mi hanno consentito in innumerevoli occasioni l'accesso al loro allevamento e spiegato con pazienza molti aspetti di questo lavoro.

Ringrazio inoltre l'A.S.L. di Alessandria, in particolare il Dottor Angelo Salerno, Responsabile della S. S. di Microbiologia dell'Ospedale "SS Antonio e Margherita" di Tortona.

Ringrazio il Servizio di riferimento regionale di Epidemiologia per la sorveglianza, la prevenzione e il controllo delle malattie infettive (SEREMI).

Ringrazio inoltre l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta.

Ringrazio tutti gli amici che mi hanno accompagnata in questo percorso e, infine, un ringraziamento speciale va alla mia famiglia, per avermi da sempre sostenuta nelle mie scelte.

Sommario

1. INTRODUZIONE	1
2. REVISIONE DELLA LETTERATURA	2
2.1 L'ANTIMICROBICO-RESISTENZA	2
2.1.1 Definizione e cause	2
2.1.2 Meccanismi di resistenza	4
2.1.3 Trasmissione della resistenza antimicrobica	6
2.1.4 Batteri e antibiotici maggiormente implicati	7
2.1.5 Agenti antimicrobici di importanza critica	9
2.1.6 L'Antimicrobico-resistenza in sanità pubblica	10
2.1.7 Soluzioni proposte	11
2.1.8 Azioni a livello globale	13
2.1.9 Situazione e azioni in Europa	14
2.1.10 Situazione e azioni in Italia	15
2.1.11 Situazione e azioni in Piemonte	19
2.1.12 Antibiotico-resistenza ed <i>Escherichia coli</i>	20
2.1.13 Antibiotico-resistenza e <i>Staphylococcus aureus</i> resistente alla meticillina	23
2.2 L'ANTIMICROBICO-RESISTENZA IN AMBITO AVICOLO	25
2.2.1 La biosicurezza nel comparto avicolo	25
2.2.2 L'uso degli agenti antimicrobici in allevamento avicolo	26
2.2.3 Analisi della problematica in Italia	29
2.2.4 Broiler ed <i>E. coli</i> produttori di ESBL	30
2.2.5 Broiler e <i>Staphylococcus aureus</i> resistente alla meticillina	34
2.3 L'ALLEVAMENTO DEL BROILER	37
2.3.1 L'avicoltura in Italia	37
2.3.2 Caratteristiche generali dell'allevamento del broiler	38
2.3.3 Fasi dell'allevamento del broiler	40
3. OBIETTIVI DELLA TESI	44
3.1 IL PROGETTO	44
3.1.1 Analisi del rischio	45
3.2 ANALISI DEL RISCHIO: APPLICAZIONI NELLA TESI	46
3.2.1 Il metodo FMEA	46
4. MATERIALI E METODI	51

4.1 L'ALLEVAMENTO	51
4.1.1 Caratteristiche strutturali e organizzative	51
4.1.2 Registro dei farmaci e vaccinazioni	53
4.2 INTERVISTA SEMI-STRUTTURATA	53
4.3 CAMPIONAMENTO	53
4.3.1 Campioni animali	54
4.3.2 Campioni ambientali	55
4.3.3 Studio sugli allevatori	56
4.3.4 Schema di campionamento in allevamento	56
4.4 ANALISI DI LABORATORIO	58
4.4.1 Analisi su campioni ambientali e animali	58
4.4.2 Analisi su campioni umani	61
4.5 Criteri di ricerca bibliografica	62
5. RISULTATI E DISCUSSIONE	63
5.1 Risultati	63
5.1.1 Registro dei farmaci	63
5.1.2 Utilizzo di additivi nei mangimi	66
5.1.3 Vaccinazioni	66
5.1.4 Analisi di laboratorio	67
5.1.5 Attività e comportamento del personale	73
5.2 Discussione	81
5.2.1 Pratiche lavorative	81
5.2.2 <i>E. coli</i> produttori di ESBL	82
5.2.3 Stafilococchi meticillino-resistenti	84
6. CONCLUSIONI	88
7. BIBLIOGRAFIA	90

1. INTRODUZIONE

Dopo quasi un secolo dalla scoperta della penicillina, la scienza medica è nuovamente costretta a far fronte ad un rischio che ha accompagnato per lungo tratto la storia dell'uomo: l'eventualità che infezioni comuni o ferite minori siano in grado di determinare la morte del paziente (Miragaia, 2018).

Fin dall'entrata in scena degli antibiotici le fonti attestano un quadro davvero poco in linea con le esortazioni all'"uso prudente" sulle quali si insiste oggi. Durante la II Guerra Mondiale, se da un lato la penicillina ha rappresentato una vera rivoluzione nell'approccio alle infezioni, dall'altro è stata introdotta alla popolazione in termini propagandistici e nell'immaginario comune ha assunto il ruolo di "cura miracolosa" contro qualsiasi infezione. Addirittura è stata nebulizzata nei reparti ospedalieri, alla stregua di una misura preventiva contro la diffusione dei patogeni (Herst, 2013).

Al giorno d'oggi è ancora diffusa l'accezione che, seppur mitigata rispetto al passato, porta a considerare l'antibiotico un presidio indispensabile nel trattamento di molte condizioni in realtà poco attinenti con la cura o la prevenzione di infezioni batteriche. Questo si accompagna alla convinzione che, se anche non se ne dovessero trarre benefici, di certo non conseguirebbe alcun esito nefasto.

È ormai riconosciuto dalla comunità scientifica che la resistenza agli agenti antimicrobici rappresenti, a livello mondiale, una delle problematiche sanitarie più pressanti, che richiede azioni urgenti sia in ambito umano che veterinario.

Le Linee Guida della Comunità Europea per un uso corretto degli agenti antimicrobici in medicina veterinaria (Murphy *et al.*, 2017) sottolineano il ruolo fondamentale che le Università dovrebbero svolgere in questa direzione, in modo da attribuire il giusto rilievo e fornire le conoscenze necessarie a fronteggiare tale problematica.

Questa tesi è stata assegnata nell'ambito del progetto sull'uso corretto del farmaco, con particolare attenzione all'antimicrobico-resistenza (in seguito definita in acronimo "AMR"), per il quale il Dipartimento di Scienze Veterinarie è Dipartimento di Eccellenza dell'Università degli Studi di Torino.

Obiettivo primario della tesi è indagare, all'interno di un allevamento di broiler, l'esposizione al rischio di AMR nei lavoratori. In particolare, l'intento è la ricerca di *E. coli* produttori di ESBL e *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA) negli animali, nell'ambiente di allevamento e nei lavoratori esposti a questi fattori di rischio.

2. REVISIONE DELLA LETTERATURA

2.1 L'ANTIMICROBICO-RESISTENZA

2.1.1 Definizione e cause

Gli antibiotici sono composti chimici in grado di uccidere o inibire la crescita dei microrganismi. Secondo la definizione del Codice sanitario degli animali terrestri dell'OIE (OIE, 2019), un agente antimicrobico è una sostanza naturale, semi-sintetica o sintetica che mostra attività antimicrobica in concentrazioni ottenibili *in vivo*.

La scoperta del primo antibiotico risale al 1928, quando Alexander Fleming si accorse dell'attività antibatterica di una muffa (*Penicillium notatum*) nei confronti di colonie di *Staphylococcus aureus*. Dall'introduzione dei primi farmaci ad attività antibiotica negli anni '40 e con la loro successiva diffusione in tutto il mondo gli antibiotici hanno salvato centinaia di milioni di vite (World Bank, 2016).

Il fenomeno dell'antibiotico-resistenza probabilmente ha avuto origine milioni di anni fa (Guardabassi Luca, Lars B. Jensen, 2008), ma negli anni si è assistito alla progressiva perdita di efficacia di molti principi attivi nei confronti di batteri in precedenza sensibili alla loro azione (Guardabassi Luca, Lars B. Jensen, 2008). Tali presidi infatti combattono efficacemente i batteri sensibili, ma contemporaneamente favoriscono secondo un principio di selezione darwiniana quelli resistenti, che sono così in grado di sopravvivere malgrado la presenza di antibiotici. Il meccanismo di pressione selettiva è insito nel funzionamento stesso degli antibiotici e ne rappresenta un'inevitabile conseguenza, anche se il loro utilizzo smodato sta ampiamente aggravando il problema (Bryan-Wilson, 2016). Se a tale aspetto si associano i dati relativi allo sviluppo di nuovi farmaci ad azione antibiotica, che indicano un calo nell'isolamento di nuove molecole negli ultimi anni, è facile intuire la portata del problema.

L'antimicrobico-resistenza può riguardare tutti i tipi di farmaci ad azione antimicrobica: antibiotici, antifungini, antivirali, antiparassitari (Sezione per la Farmacosorveglianza sui medicinali veterinari del Ministero della Salute, 2017). Essa può insorgere anche nei confronti di altre sostanze chimiche, quali ad esempio i disinfettanti (sali quaternari di ammonio) e i composti metallici utilizzati in alimentazione zootecnica come promotori

di crescita e condizionatori della flora microbica (solfato di rame, ossido di zinco) (Ministero della Salute, 2014a). La resistenza minaccia una delle più grandi scoperte della medicina moderna, gli antibiotici, compromettendone l'efficacia nella lotta contro i microrganismi patogeni. In mancanza di un'azione a livello globale si rischia di entrare in una nuova era post-antibiotica nella quale infezioni banali possono, come in passato, uccidere (WHO, 2015).

Considerate le numerose ed inscindibili ripercussioni in ambito umano e veterinario, nell'affrontare il tema si rende necessario un approccio "one health", sia nell'analisi delle cause che nella ricerca di soluzioni.

Per quanto concerne la ricerca delle cause, si possono distinguere tre ambiti principali nei quali l'intervento antropico è stato determinante per l'esplosione di quella che oggi viene considerata un'emergenza mondiale: medicina umana, medicina veterinaria e agricoltura.

- 1) In medicina umana l'uso intensivo di antibiotici, per scopi terapeutici o profilattici, è una delle maggiori cause dell'insorgenza e della diffusione di infezioni nosocomiali altamente resistenti (Prestinaci, Pezzotti and Pantosti, 2015). Non solo però l'impiego di quantità eccessive di antibiotico determina l'insorgenza del fenomeno, ma anche l'uso inappropriato dello stesso. Se un protocollo terapeutico corretto tiene conto di una moltitudine di variabili, l'inappropriatezza dello stesso si fonda su una scelta non ponderata del principio attivo, del dosaggio o del tempo di somministrazione (Prestinaci, Pezzotti and Pantosti, 2015).
- 2) Per quanto concerne gli animali e le loro produzioni, oltre all'utilizzo di antibiotici a scopo terapeutico e profilattico (che ha sicuramente contribuito allo sviluppo della problematica), quantità sub-terapeutiche di antibiotici sono state sistematicamente impiegate come promotori di crescita a partire dagli anni 50'. Inoltre, mentre dal 2006 l'utilizzo di antibiotici come promotori di crescita è stato vietato in Europa e, dal 2017, negli Stati Uniti, è tuttora ammesso in altri Paesi, tra i quali il Brasile e la Cina (Roth *et al.*, 2019).
- 3) In ambito agricolo, la maggior parte degli antibiotici (streptomina) viene utilizzata per prevenire malattie che colpiscono alberi quali peri e meli. La disseminazione della resistenza può inoltre essere favorita dall'impiego sui terreni di concimi e fertilizzanti organici derivati dall'allevamento animale e acque similmente contaminate da microrganismi fecali. Geni responsabili di antimicrobico-resistenza infatti si riscontrano nel suolo, ritenuto un importante

reservoir, e nelle acque, che rappresentano una rilevante via di disseminazione (Prestinaci, Pezzotti and Pantosti, 2015).

Tale problematica è in grado di determinare conseguenze potenzialmente di estrema gravità sulla salute umana, che implicano incremento delle ospedalizzazioni, dei fallimenti terapeutici in seguito ad infezioni non più risolvibili con i comuni antibiotici e delle morti per l'inefficacia di ogni trattamento. Questo si traduce inoltre in un aumento dei costi per la sanità pubblica, anche se di difficile quantificazione, insito nella necessità di ricorrere ad antibiotici di seconda o terza scelta, più costosi, ad apparecchiature specializzate, degenze prolungate e procedure di isolamento dei pazienti (Prestinaci, Pezzotti and Pantosti, 2015).

2.1.2 Meccanismi di resistenza

Si definiscono resistenti i batteri portatori di geni di resistenza. La resistenza agli agenti antimicrobici può essere **intrinseca** o **acquisita** (Carli *et al.*, 2009).

La resistenza intrinseca o naturale è insita nelle caratteristiche biologiche del batterio stesso. Un classico esempio è rappresentato dai micoplasmi che, essendo privi di parete cellulare, sono insensibili all'azione delle β -lattamine.

La resistenza acquisita è dovuta alla pressione selettiva esercitata da un chemioterapico sulla popolazione batterica ed è a sua volta suddivisa in **cromosomica** (legata a mutazioni cromosomiali) ed **extracromosomica** (trasmessa da altri batteri attraverso elementi genetici mobili).

La resistenza extracromosomica può essere codificata da:

1. Plasmidi: elementi mobili costituiti da DNA circolare, che possono replicarsi indipendentemente dal DNA della cellula batterica;
2. Transposoni: elementi genetici presenti nel DNA di Procarioti ed Eucarioti che devono servirsi del DNA batterico o plasmidico per potersi replicare;
3. cassette di resistenza: singoli geni di resistenza che possono associarsi ad integroni, sequenze di DNA che a loro volta si localizzano su transposoni, sfruttandone il meccanismo di replicazione (Carli *et al.*, 2009).

Il trasferimento della resistenza si verifica tramite il passaggio di geni portatori di informazioni di resistenza. Sono possibili vari meccanismi di trasferimento: **verticale** (o

clonale), quando un gene mutato viene tramandato da cellula madre a cellula figlia; o **orizzontale**, secondo tre modalità: 1) trasformazione, 2) trasduzione e 3) coniugazione.

- 1) Attraverso la trasformazione un frammento di DNA libero, proveniente da una cellula batterica andata incontro a lisi, penetra all'interno di una nuova cellula e viene incluso nel DNA di quest'ultima. Mentre tale processo si verifica in numerosi batteri Gram positivi, viceversa *E.coli* e molti altri Gram negativi vanno raramente incontro alla trasformazione, possibile infatti solo in determinate condizioni.
- 2) La trasduzione consiste nell'acquisizione di materiale genetico batterico da parte di un batteriofago e nel suo trasferimento in un'altra cellula. Si definisce generalizzata una trasduzione nella quale il DNA batterico sostituisce completamente quello virale, mentre si dice specializzata se un frammento di DNA viene integrato nel genoma virale. La trasduzione è possibile in molte specie batteriche, inclusi *E. coli* e *S. aureus*.
- 3) Nella coniugazione il trasferimento genico presuppone un contatto diretto tra due cellule, una donatrice e una ricevente, attraverso la formazione di un pilo. L'elemento trasferito è rappresentato da un plasmide e può avvenire tra cellule di generi diversi, molto differenti tra loro (Madigan, Martinko and Parker, 2015).

Il DNA introdotto secondo tali modalità nella cellula batterica può: subire una degradazione enzimatica, replicarsi autonomamente (se si tratta di un plasmide, per esempio) oppure ricombinarsi con la cellula ospite (Madigan, Martinko and Parker, 2015).

I batteri possono esprimere la resistenza attraverso l'inattivazione enzimatica del chemioterapico, la riduzione del suo accumulo intracellulare e l'alterazione del sito di attività dello stesso (Carli *et al.*, 2009).

La resistenza ad un agente antimicrobico appartenente ad una determinata classe può essere accompagnata dalla resistenza ad altri presidi della stessa classe, o persino di classi diverse.

Per **resistenza crociata** si intende la resistenza codificata dallo stesso gene a due o più agenti antimicrobici, ed implica quindi la presenza di un meccanismo d'azione comune ai due antimicrobici (Baker-Austin *et al.*, 2006).

Si definisce **co-resistenza** la presenza di diversi geni di resistenza all'interno dello stesso elemento genetico (plasmide, transposone o integrone), che si traduce in una resistenza ad antibiotici di classi diverse (Carli *et al.*, 2009) (Baker-Austin *et al.*, 2006).

Il Ministero della Salute definisce inoltre la **resistenza multipla** come resistenza a quattro o più antimicrobici appartenenti a classi diverse (Ministero della Salute, 2014a).

2.1.3 Trasmissione della resistenza antimicrobica

Punto focale è la possibilità di trasmissione della resistenza agli agenti antimicrobici dagli animali all'uomo. Determinare se gli animali rappresentino un'importante minaccia per la salute umana implica alcune difficoltà. La prima si riscontra nel tracciare con precisione tutte le vie che potenzialmente portano dalla malattia nell'animale a quella nell'uomo. In aggiunta a questo, gli animali e l'uomo vivono in un unico ambiente, possono essere colonizzati dalle stesse specie batteriche e sono esposti alle medesime classi di antimicrobici. Partendo dal presupposto che non si conoscono ancora con esattezza tutti i meccanismi implicati nel processo di trasmissione della resistenza, l'importanza del ruolo degli animali è dimostrata da numerosi studi (Guardabassi Luca, Lars B. Jensen, 2008).

Le trasmissioni dell'AMR all'uomo può verificarsi attraverso gli alimenti, l'acqua, l'ambiente o per contatto diretto con animali portatori (EFSA, 2018).

Per quanto concerne la trasmissione per via alimentare, essa è possibile attraverso elementi di resistenza apportati direttamente da prodotti di origine animale, oppure da alimenti di altra origine, come frutta o verdura, contaminati da batteri resistenti durante le fasi di produzione e trasformazione attraverso il suolo, il letame o l'acqua d'irrigazione (Ministero della Salute, 2014a).

È possibile il passaggio della resistenza da animale a uomo anche per mezzo di vettori diversi dagli animali d'allevamento: roditori, insetti, oppure animali da compagnia (Argudín *et al.*, 2017) potrebbero essere colonizzati, ad esempio, da Stafilococchi resistenti (Couto *et al.*, 2016), agire da *reservoir* e determinare la diffusione di cloni molto efficaci nel passaggio all'uomo. Pur essendo un fenomeno difficile da quantificare, anche la fauna selvatica, ed in particolare gli uccelli, possono rappresentare un'importante via di diffusione di geni di AMR (Dorado-García *et al.*, 2017) (Graham *et al.*, 2019).

Interessante è il ruolo delle mosche quali animali sinantropici e allo stesso tempo potenziali vettori di geni di AMR, che può essere sfruttato per attività di sorveglianza. In uno studio condotto su mosche catturate nel centro di Berlino, ad esempio, il 12,9% era portatrice di geni di ESBL (soprattutto *bla*CTX-M-1) e la metà di queste presentava co-resistenza alla ciprofloxacina (Wetzker *et al.*, 2019).

Si stima che più della metà degli antibiotici prodotti in tutto il mondo sia utilizzata negli animali (Guardabassi Luca, Lars B. Jensen, 2008).

È stato dimostrato che allevatori, macellatori, veterinari (in generale, tutti coloro che svolgono una professione che implica uno stretto contatto con gli animali o il loro ambiente di vita) sono maggiormente esposti al rischio di essere portatori di elementi di resistenza agli antibiotici, e questo si può estendere anche ai famigliari di coloro che svolgono queste professioni (Marshall and Levy, 2011). Alcuni studi metagenomici hanno provato che i microbiomi umani e animali siano diversi, ma sia condiviso parte del resistoma (Pal *et al.*, 2016), il che implica la presenza di un'origine comune.

La presenza di geni di resistenza si rileva anche in assenza di pressione selettiva, ma la loro abbondanza è influenzata dall'uso di antibiotici (Argudín *et al.*, 2017).

2.1.4 Batteri e antibiotici maggiormente implicati

Gli agenti antimicrobici presentano un proprio spettro d'azione, indicante la capacità di agire contro un numero più o meno limitato di specie batteriche. Tra i farmaci antimicrobici ad ampio spettro si situano le tetracicline, i fluorochinoloni, i sulfamidici e i fenicoli, mentre sono ritenuti a medio spettro le β -lattamine, i macrolidi e gli aminoglicosidi, e a stretto spettro i polipeptidici e la benzilpenicillina (Carli *et al.*, 2009).

Secondo dati riferiti al 2016, a livello mondiale le affezioni resistenti agli antibiotici causano almeno 700 000 morti all'anno, con il primato detenuto dalla tubercolosi (230 000 morti) (Bryan-Wilson, 2016). E' ormai divenuta emblematica (seppur quantomeno pessimistica) la prospettiva illustrata da O'Neill, secondo la quale le morti dovute ad antibiotico-resistenza potrebbero salire a 10 milioni ogni anno a partire dal 2050, se non verrà rapidamente adottato alcun provvedimento (O'Neill, 2016).

L'Organizzazione per la cooperazione e lo sviluppo economico (OCSE) ha previsto che in Europa, Nord America e Australia circa 2,4 milioni di persone potrebbero morire tra il

2015 e il 2050 se non verranno messe in atto strategie per affrontare concretamente la problematica della resistenza agli agenti antimicrobici (EFSA, 2018).

Secondo una categorizzazione realizzata dal WHO (WHO, 2017), i batteri sono stati suddivisi in tre gruppi in base alla priorità ad essi attribuita per quanto riguarda l'antibiotico-resistenza:

- **Priority 1 (Critical):** *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* (resistenti ai carbapenemi) e le *Enterobacteriaceae* (resistenti ai carbapenemi e alle cefalosporine di III generazione);
- **Priority 2 (High):** *Enterococcus faecium* (resistente alla vancomicina), *Staphylococcus aureus* (resistente alla meticillina, intermedio e resistente alla vancomicina), *Helicobacter pylori* (resistente alla claritromicina), *Campylobacter* (resistente ai fluorochinoloni), *Salmonella* spp. (resistente ai fluorochinoloni), *Neisseria gonorrhoeae* (resistente alle cefalosporine di III generazione e ai fluorochinoloni);
- **Priority 3 (Medium):** *Streptococcus pneumoniae* (non suscettibile alla penicillina), *Haemophilus influenzae* (resistente all'ampicillina), *Shigella* spp. (resistente ai fluorochinoloni).

Secondo il Report WHO del 2014, i batteri resistenti di maggiore importanza in sanità pubblica sono:

- *Escherichia coli*, per quanto riguarda la resistenza alle cefalosporine di III generazione e ai fluorochinoloni;
- *Klebsiella pneumoniae*, per quanto riguarda la resistenza alle cefalosporine di III generazione e ai carbapenemi;
- *Staphylococcus aureus*, resistente alla meticillina (WHO, 2014).

Nei pazienti nei quali è stata rilevata un'infezione da *E. coli* resistente alle cefalosporine di III generazione (inclusi i produttori di ESBL) si sono verificati: un aumento pari al doppio della mortalità in generale, un incremento della mortalità attribuibile a cause batteriche e della mortalità nei 30 giorni post-infezione (WHO, 2014).

Nei pazienti con infezioni da MRSA si è rilevato un aumento significativo della mortalità in generale, della mortalità attribuibile a cause batteriche, della mortalità nei reparti di terapia intensiva, di shock settico, del periodo di recupero post-infezione e di permanenza nei reparti di terapia intensiva (WHO, 2014).

In alcuni Paesi membri dell'OCSE, circa il 35% delle infezioni che possono colpire l'uomo sono resistenti ai farmaci attualmente disponibili, mentre in alcuni Paesi in via di sviluppo le prevalenze di resistenza si aggirano tra l'80 e il 90 % per alcune associazioni tra batterio ed antibiotico (EFSA, 2018).

2.1.5 Agenti antimicrobici di importanza critica

Il WHO, a partire dal 2005 e con ultimo aggiornamento nel 2016, ha stilato una lista (W H O Advisory Group on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance, 2018) di agenti antimicrobici di particolare importanza per la salvaguardia della salute umana o *Critically Important Antimicrobials (CIA)*, suddivisi secondo due criteri in tre categorie.

I criteri sono:

- Criterio 1: una data classe di antimicrobici è l'unica, o una delle limitate disponibili, in grado di trattare gravi infezioni batteriche nell'uomo.
- Criterio 2: una data classe di antimicrobici è utilizzata per trattare infezioni nell'uomo provocate da batteri che possono essere trasmessi all'uomo da fonti non umane, oppure batteri che possono acquisire geni di resistenza da fonti non umane.

Le tre categorie sono: *Critically important*, *Highly important* e *Important Antimicrobials*.

Secondo tre fattori di assegnazione della priorità, i *Critically important antimicrobials* sono ulteriormente suddivisi in *High Priority Critically Important Antimicrobials* e *Highest Priority Critically Important Antimicrobials*.

I fattori di assegnazione della priorità sono:

- Fattore 1: è presente un elevato numero di persone nella comunità o in certe popolazioni ad alto rischio (quali i pazienti con gravi infezioni ricoverati in strutture ospedaliere) affette da patologie per le quali è disponibile una limitata scelta di agenti antimicrobici;
- Fattore 2: è presente un'elevata frequenza di utilizzo della classe antibiotica per svariate infezioni in medicina umana o in popolazioni ad alto rischio, e l'uso può favorirne la selezione;
- Fattore 3: la classe di antibiotici è utilizzata per il trattamento di infezioni in

medicina umana per le quali è presente evidenza della trasmissione di batteri o geni resistenti provenienti da fonti non umane.

Di maggiore criticità sono considerati chinoloni, cefalosporine di III, IV e V generazione, macrolidi e chetolidi, glicopeptidi e polimixine (W H O Advisory Group on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance, 2018).

L'obiettivo è quello di preservare l'efficacia di tali agenti antimicrobici quali ultima barriera nella lotta contro le infezioni in medicina umana. È di prioritaria importanza assicurare che il loro utilizzo sia limitato ai casi di effettiva necessità.

I CIA in medicina veterinaria sono stati raccolti in una classificazione dell'OIE la cui ultima modifica risale a maggio 2015.(OIE, 2013) Anch'essi sono suddivisi in *Veterinary Critically Important Antimicrobial Agents* (VCIA), *Veterinary Highly Important Antimicrobial Agents* (VHIA) e *Veterinary Important Antimicrobial Agents* (VIA).

Sono stati suddivisi in base alla rispondenza a due criteri, stabilita da un gruppo di esperti:

- Criterio 1: la maggior parte degli esperti ha convenuto sull'importanza di tale classe di agenti antimicrobici;
- Criterio 2: i composti appartenenti alla stessa classe di agenti antimicrobici sono stati ritenuti essenziali nel trattamento di specifiche infezioni e non sono presenti sufficienti terapie alternative.

Sia nella lista stilata nell'ambito della medicina umana sia in quella veterinaria, sostanze appartenenti a determinati gruppi (aminoglicosidi, cefalosporine di III generazione, macrolidi, penicilline e chinoloni) sono stati considerati CIA.

2.1.6 L'Antimicrobico-resistenza in sanità pubblica

Alcuni gruppi della popolazione risultano essere maggiormente esposti al rischio di AMR. Lo sono in prima analisi le fasce più deboli, gli individui immunodepressi e i pazienti ospedalizzati, ma è presente anche un rischio collegato all'attività lavorativa nel contesto delle produzioni animali: allevatori, addetti al trasporto e alla macellazione, veterinari. Questo dato è tenuto in grande considerazione da alcuni Paesi europei, tra i quali l'Olanda, che hanno adottato una politica "Search and Destroy" per combattere in

particolare MRSA: i pazienti ritenuti a rischio occupazionale per AMR, appena ammessi in una struttura ospedaliera, vengono sottoposti a screening per ricerca di MRSA e preventivamente messi in isolamento in attesa dei risultati di tali test (Lekkerkerk et al., 2017).

I lavoratori possono essere esposti a batteri antimicrobico-resistenti attraverso il contatto diretto, l'inalazione o l'ingestione. I patogeni possono anche diffondersi ai membri della famiglia e alla comunità (Castillo Neyra *et al.*, 2012). L'approccio corrente per valutare i *reservoir* di geni di AMR negli animali di allevamento è quello di studiare i livelli di AMR di batteri commensali e zoonotici in animali sani e al macello (Argudín *et al.*, 2017).

Per quanto riguarda la percezione degli allevatori riguardo al problema dell'AMR, da uno studio recentemente condotto su allevatori di conigli e tacchini in Italia si evince che la maggior parte degli allevatori considera causa preponderante del problema l'utilizzo di antibiotici in medicina umana piuttosto che in ambito veterinario (Di Martino *et al.*, 2019).

In alcuni studi condotti non è stata dimostrata l'associazione tra vivere in prossimità di zone con alta densità di allevamenti e una maggiore colonizzazione da MRSA rispetto al resto della popolazione (O'Connor *et al.*, 2017), così come non è stato dimostrato per la colonizzazione di *Enterobacteriaceae* produttrici di ESBL e AmpC (Wielders *et al.*, 2017). All'opposto, studi in Olanda hanno individuato casi di LA-MRSA in residenti in zone con alta densità di allevamenti, ma senza rapporti diretti con questi ambienti: le modalità di trasmissione rimangono sconosciute. È stato ipotizzato il passaggio interumano attraverso i lavoratori esposti, il che implicherebbe una trasmissione da uomo a uomo senza un contatto diretto con gli animali o l'ambiente di allevamento (Larsen *et al.*, 2015).

2.1.7 Soluzioni proposte

Il Ministero della Salute raccomanda un "uso prudente" degli agenti antimicrobici in medicina veterinaria. Tale definizione è da interpretarsi in senso lato, sia come prescrizione in seguito ad attente valutazioni clinico-diagnostiche, sia come risultato di buone pratiche veterinarie e zootecniche. Tale approccio integrato si basa sulla partecipazione di diversi attori: medici veterinari, operatori del settore alimentare, Associazioni di categoria e Ordini professionali.

Data l'estrema complessità della problematica, approcci e soluzioni semplici non sono realizzabili, ma i principi fondamentali da rispettare per raggiungere l'obiettivo sono: approntare un sistema di monitoraggio del consumo degli antibiotici (per identificare le realtà problematiche e verificare i risultati delle misure messe in atto), il rispetto dei principi di biosicurezza per evitare l'introduzione e la diffusione di agenti patogeni in allevamento, l'attenzione per il benessere animale in modo da ridurre lo stress, con particolare riguardo alla densità animale, alla ventilazione, alla temperatura, alla manipolazione dei soggetti (Murphy *et al.*, 2017). Rilevanti sono anche una corretta gestione dell'azienda in generale, dell'alimentazione e dell'acqua di bevanda (Sezione per la Farmacosorveglianza sui medicinali veterinari del Ministero della Salute, 2017).

Dal momento che è stata dimostrata l'insorgenza di resistenza poco dopo l'introduzione di nuovi antibiotici, il solo sviluppo di altre sostanze ad azione antimicrobica (peraltro molto ridotto negli ultimi anni) non può essere visto come una soluzione (Magouras *et al.*, 2017).

Per ridurre l'utilizzo di antibiotici in allevamento le azioni da intraprendere sono molteplici: è necessario innanzitutto partire dalla prevenzione delle patologie infettive che richiedono l'impiego dell'antibiotico. Questo è possibile attraverso il rispetto delle norme di biosicurezza, intese sia come biosicurezza interna all'allevamento che come tutte le misure messe in atto per evitare l'introduzione di elementi di resistenza dall'esterno: il lavaggio dei veicoli di trasporto, la limitazione dell'accesso al personale esterno, la dotazione dei visitatori di idoneo abbigliamento monouso, il contrasto all'ingresso di animali selvatici o infestanti. Sarebbe auspicabile che gli animali introdotti per essere allevati provenissero dallo stesso stabilimento. È necessario inoltre isolare gli animali malati e allontanare tempestivamente quelli morti. Particolare riguardo necessita l'attuazione di piani vaccinali, utili sia nell'evitare il ricorso all'antibiotico per trattare patologie batteriche prevenibili attraverso il vaccino stesso, sia per impedire l'immunodepressione potenzialmente determinata da una patologia virale, con conseguente infezione batterica secondaria (Murphy *et al.*, 2017).

Quali ulteriori possibili alternative all'utilizzo degli antibiotici in allevamento sono stati proposti, negli anni, metodi per rendere gli animali più resistenti ai patogeni: tra questi, la somministrazione nel mangime di probiotici e prebiotici, anche formulati in una commistione tra i due (simbiotici), la "*phage therapy*" (utilizzo terapeutico dei batteriofagi per combattere batteri patogeni) o, in una prospettiva decisamente a lungo termine, la selezione di individui geneticamente resistenti alle infezioni mediante

l'utilizzo di tecniche di manipolazione genetica (Woolhouse *et al.*, 2015).

2.1.8 Azioni a livello globale

Per combattere efficacemente tale problematica è fondamentale un approccio “one health” che preveda la compartecipazione di molteplici sfere: medicina umana e veterinaria, agricoltura, fondi economici, ambiente e consumatori.

Il primo documento riguardante l'utilizzo di antimicrobici in ambito veterinario redatto con il fine di salvaguardare la salute pubblica è lo Swann Report (Inghilterra, 1968) che raccomandava l'esclusione dai mangimi di agenti antimicrobici se essi fossero utilizzati in medicina umana o veterinaria o se associati allo sviluppo di cross-resistenza con agenti terapeutici utilizzati in medicina umana. Questo report ha rappresentato la base per lo sviluppo di politiche volte al corretto uso degli antibiotici in molti Paesi (Guardabassi Luca, Lars B. Jensen, 2008).

La prima Risoluzione dell'Assemblea Mondiale della Sanità (*World Health Assembly-WHA*) sulla resistenza agli antimicrobici risale al 1998.

Attualmente a livello internazionale vi è collaborazione tra WHO, FAO ed OIE, che si impegnano nella ricerca congiunta di soluzioni. Il Piano d'Azione Globale del 2015 redatto dal WHO elenca le azioni chiave che i vari Stati dovrebbero adottare negli anni per combattere l'AMR, tra le quali: aumentare la consapevolezza sul fenomeno attraverso la comunicazione e l'educazione, aumentare le conoscenze attraverso la ricerca e la sorveglianza, attuare misure preventive per le infezioni, ottimizzare l'utilizzo di agenti antimicrobici e aumentare gli investimenti per la ricerca di nuovi farmaci (WHO, 2015).

Nelle linee guida del *Codex Alimentarius* sono presenti due documenti redatti con l'intento di contrastare l'AMR: il “Codice di Comportamento per minimizzare e contenere la resistenza antimicrobica”(Codex Alimentarius Commission, 2005) e le “Linee guida per l'analisi dei rischi da AMR in prodotti di origine alimentare” (Codex Alimentarius Commission, 2011).

La problematica dell'AMR nel 2015 è entrata nell'Agenda dei leader del G7 (Dichiarazione di Berlino sulla resistenza antimicrobica) e nel 2016 del G20 (*Piano Nazionale di Contrasto de ll ' Antimicrobico -Resistenza (PNCAR)*, 2020).

2.1.9 Situazione e azioni in Europa

Nell'ambito dell'UE, il monitoraggio e la sorveglianza sull'antimicrobico-resistenza e sul consumo degli agenti antimicrobici sono coordinati da ECDC (*European Centre for Disease Prevention and Control*), EFSA (*European Food Safety Authority*) ed EMA (*European Medicines Agency*). ('ECDC, EFSA and EMA Joint Scientific Opinion on a list of outcome indicators as regards surveillance of antimicrobial resistance and antimicrobial consumption in humans and food-producing animals', 2017).

La Commissione Europea ha intrapreso numerose iniziative nell'ambito del controllo dell'antimicrobico-resistenza in Medicina Veterinaria:

- Direttiva 2003/99/CE (Parlamento Europeo and Consiglio dell'Unione Europea, 2003) (recepita con il DL 191/2006): sancisce l'obbligo per gli Stati Membri di attivare un sistema di sorveglianza per l'antibiotico-resistenza su agenti zoonotici quali *Salmonella* e *Campylobacter* di origine animale e umana. Ogni anno tali dati sono oggetto di pubblicazione dell'EFSA all'interno di un Report.

- Decisione 2013/652/UE (Commissione europea, 2013b): stabilisce il monitoraggio di *Salmonella* spp, *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*, *E. coli* indicatore commensale, *Enterococcus faecalis* ed *Enterococcus faecium* indicatore commensale;

- Piano d'azione di lotta ai crescenti rischi di resistenza antimicrobica (AMR) del 2011 (Commissione europea, 2011): propone l'elaborazione di un piano di azione quinquennale di lotta alla resistenza antimicrobica, ripartito in 12 azioni chiave.

L'ECDC è un'Agenzia Europea istituita nel 2005 che ha il compito di identificare, valutare e comunicare i pericoli per la salute pubblica connessi a tutte le malattie infettive, conosciute ed emergenti, incluse quelle provocate da agenti zoonotici. Ad essa fanno capo la Rete Europea di Sorveglianza delle Malattie Infettive Gastrointestinali dell'uomo provocate da *Salmonella* spp, *Campylobacter* spp. ed *E. coli* enterocitotossici (Enter-Net), e il Sistema Europeo di Sorveglianza dell'Antibiotico-resistenza (EARSS-Net) che monitora annualmente i livelli di antibiotico-resistenza in sette microrganismi indicatori responsabili di infezioni umane (*Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*).

Il Progetto ESVAC (*European Surveillance on Veterinary Antimicrobial Consumptions*),

attivato nell'aprile 2010, presenta il compito di raccogliere informazioni sulla vendita e sull'utilizzo dei farmaci antimicrobici negli animali da tutta l'Unione Europea (Ministero della Salute, 2014a).

Il 30 giugno 2017 la Commissione Europea ha adottato lo “*European One Health Action Plan against Antimicrobial Resistance (AMR)*”, il cui obiettivo è di ridurre i divari tra i Paesi membri riguardo l'utilizzo di antimicrobici e stimolare ricerca, sviluppo e innovazione. (*Piano Nazionale di Contrasto de ll ' Antimicrobico -Resistenza (PNCAR)*, 2020) Secondo i dati ESVAC (European Medicines Agency, 2018), riferiti all'anno 2016, per quanto concerne l'ambito veterinario, in 30 nazioni europee sono stati venduti 7860,4 tonnellate di principi attivi contenenti agenti antimicrobici, lo 0,9% dei quali rappresentato da compresse (riferibili ai soli animali da compagnia), mentre il restante 99,1% costituito da altre forme farmaceutiche (usate soprattutto in ambito zootecnico).

2.1.10 Situazione e azioni in Italia

Circa un terzo delle morti dovute ad infezioni da batteri resistenti agli antibiotici in UE ed EEA (*European Economic Area*) avviene in Italia (Cassini *et al.*, 2019). L'Italia è inoltre risultata in terza posizione in UE per la vendita di antibiotici negli allevamenti, dopo Spagna e Cipro (come mostrato nella *Figura 1*) (European Medicines Agency, 2018).



Figura 1. La figura mostra i dati di vendita totale di agenti antimicrobici per animali destinati alla produzione di alimenti, espressi in mg/PCU, in 30 nazioni, relativi al 2016. (European Medicines Agency, 2018)

Le Raccomandazioni del Consiglio dell'UE sull'uso prudente degli agenti antimicrobici

in medicina umana (Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee, 2002) promuovono l'assunzione da parte degli Stati Membri di strategie specifiche per il contrasto dell'AMR. Nell'ambito del monitoraggio sugli Stati Membri, l'ECDC ha condotto una visita (9-13 gennaio 2017) per verificare la situazione del nostro Paese, dalla quale è emerso che le prevalenze di *Enterobacteriaceae* e *Acinetobacter baumannii* resistenti ai carbapenemi hanno raggiunto una situazione di iper-endemicità e rappresentano, assieme ad MRSA, alcuni tra i livelli più alti in UE. La presenza di MRSA rimane alta, ma è passata dal 44,3 % nel 2000 al 34,1 % nel 2015 degli isolati provenienti da infezioni del sangue. Secondo l'ECDC, se i livelli di resistenza ai carbapenemi e alla colistina in batteri Gram negativi (quali *Klebsiella pneumoniae* e *Acinetobacter baumannii*) non dovessero scendere, procedure mediche di vitale importanza potrebbero essere compromesse in un prossimo futuro (ECDC, 2017).

Dal 2000 il consumo di antibiotici è riportato su base annuale attraverso il Report nazionale sull'utilizzo dei farmaci. Ne risulta che il consumo di antibiotici in Italia sia molto alto: sono prescritti in particolare antibiotici ad ampio spettro quali amoxicillina-acido clavulanico, chinoloni e cefalosporine.

Il Ministero della Salute garantisce il rispetto delle disposizioni stabilite dalla Legislazione europea per quanto concerne lo sviluppo, la produzione e l'utilizzo degli antibiotici. Il Centro di Referenza Nazionale (CNR) per l'antibiotico-resistenza, presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Lazio e Toscana, rappresenta il centro di afferenza da tutto il territorio nazionale di isolati e informazioni per il monitoraggio dell'antimicrobico-resistenza.

Il controllo a livello locale sull'utilizzo del farmaco è svolto da ASL, Regioni e Province autonome, Carabinieri e Guardia di Finanza (Ministero della Salute, 2014a).

Nel 1999 il Ministero della Salute ha deciso di vietare alcuni antibiotici promotori di crescita nelle produzioni animali (Ministero della Salute, 2014a). L'Unione Europea ha vietato dal 2006 l'utilizzo di qualsiasi tipologia di antibiotico a tale scopo (CE., 2003).

Secondo i dati di vendita di formulazioni farmaceutiche contenenti principi attivi antimicrobici pubblicati dal Ministero della Salute relativi all'anno 2016, sono state vendute 1 223,3 tonnellate di tali principi attivi. Attuando un confronto con i dati del 2015, risulta un lieve incremento della vendita di tali medicinali per gli animali da compagnia (0,8% del totale) e una riduzione del 6,7 % dei prodotti destinati alla zootecnia (in totale 1.213,2 tonnellate). Di particolare rilievo è la riduzione della vendita delle

polimixine del 42% rispetto all'anno precedente. Le principali classi vendute continuano ad essere le tetraciline (32,1%), le penicilline (24,3%) e i sulfamidici (12,3%) che, insieme, rappresentano il 68,7% delle vendite totali nel 2016 (Ministero della Salute - Direzione generale della sanità animale e dei farmaci veterinari, 2017).

Con l'Intesa del 2 novembre 2017 tra il Governo, le Regioni e le Province autonome di Trento e Bolzano l'Italia ha avviato il primo Piano Nazionale di contrasto dell'antimicrobico-resistenza (PNCAR) 2017-2020 (*Piano Nazionale di Contrasto de ll ' Antimicrobico -Resistenza (PNCAR), 2020*). Gli obiettivi del Ministero della Salute sono la valutazione delle cause e degli sviluppi dell'AMR sul territorio nazionale, la sorveglianza attraverso metodiche standardizzate, l'elaborazione di alternative all'utilizzo di farmaci contenenti antibiotici, il controllo sul medicinale veterinario, e la formazione. Tra gli obiettivi (*Piano Nazionale di Contrasto de ll ' Antimicrobico - Resistenza (PNCAR), 2020*) rientrano, entro il 2020:

- Riduzione superiore o uguale al 30% del consumo di antibiotici totali;
- Riduzione superiore o uguale al 30% del consumo di antibiotici in formulazioni farmaceutiche somministrate per via orale;
- Riduzione superiore o uguale al 10% del consumo di antimicrobici di importanza critica (CIA)
- consumo di colistina ad un livello di 5 mg/PCU.

Annualmente, la Direzione Generale della Sanità Animale e dei Farmaci Veterinari, in collaborazione con la Direzione Generale per l'Igiene e la Sicurezza degli Alimenti e la Nutrizione e il Centro di Referenza Nazionale dell'Antibiotico-resistenza, predispone un Piano per la sorveglianza della resistenza antimicrobica e del consumo di antimicrobici in medicina veterinaria, come stabilito dalla Decisione 2013/652/UE. Si valutano *Salmonella* spp, *Campylobacter jejuni* e *coli*, *Escherichia coli* indicatore commensale, *Enterococcus faecalis* e *faecium* indicatori commensali. Con l'entrata in vigore del Regolamento UE 2016/429 relativo alle malattie animali trasmissibili, prevista per il 2021, sarà ulteriormente rafforzata la base legale per la sorveglianza e il monitoraggio armonizzato di patogeni zoonotici e non negli animali, includendo il monitoraggio della loro resistenza agli antibiotici.

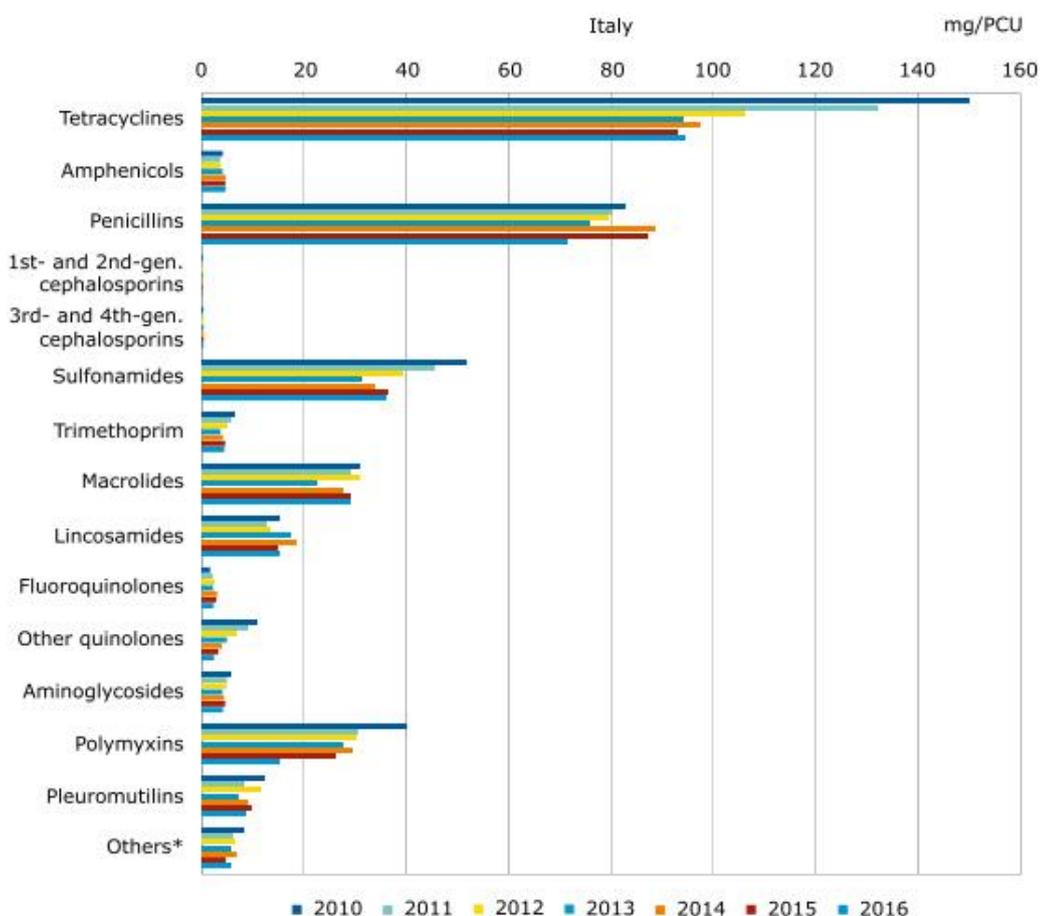
Il controllo e la prevenzione dell'AMR e la salvaguardia dell'efficacia dei CIA sono riconosciuti come priorità di Sanità Pubblica e sono stati inseriti tra gli obiettivi del Piano Nazionale della Prevenzione 2014-2018 (PNP) (Conferenza permanente per i rapporti tra

lo Stato le Regioni e le Province autonome di Trento e Bolzano, 2014). Sui tavoli internazionali (G7, G20, WHO, GHSA, ONU) l'Italia sta sostenendo le iniziative comuni che abbiano come obiettivo la riduzione dell'AMR.

L'AIFA cura la redazione, con cadenza annuale e periodica, di Rapporti OsMed sull'Uso dei Farmaci in Italia per quanto riguarda l'ambito umano (*Piano Nazionale di Contrasto de ll ' Antimicrobico -Resistenza (PNCAR), 2020*).

I dati rilevati dal CISS (*Ceesa International Sales Survey*) evidenziano come in Italia, da dicembre 2013 a giugno 2018, le vendite di vaccini e sieri siano aumentate del 25%.

Si è verificata una riduzione del 30% nella vendita degli agenti antimicrobici in zootecnia nel periodo considerato, soprattutto per quanto riguarda tetracicline, sulfonamidi e polimixine. I più venduti rimangono comunque le tetracicline (32%) e le penicilline (24%) (come illustrato nella *Figura 2*).



*Other antibacterials (classified as such in the ATCvet system).

Figura 2. La figura mostra i cambiamenti nella vendita di agenti antimicrobici in Italia destinati agli animali produttori di alimenti, espressi in mg/PCU, tra il 2010 e il 2016. (European Medicines Agency, 2018)

Per spiegare il calo delle vendite di agenti antimicrobici si può pensare a molte cause, tra le quali il risultato delle campagne per l'uso responsabile dei farmaci, le restrizioni adottate nel loro impiego e un aumento nella consapevolezza della minaccia rappresentata dall'AMR. La riduzione della vendita ottenuta in alcuni Paesi è incoraggiante, in quanto sostiene la possibilità di ottenere risultati simili in altre regioni (European Medicines Agency, 2018).

Le incongruenze che emergono dal confronto tra i dati di vendita di farmaci ad azione antibiotica tra le varie nazioni possono in parte essere spiegate con la differenza nelle proporzioni relative delle specie animali allevate, la disponibilità sul mercato di prodotti farmaceutici, i prezzi, le diverse infezioni presenti, i piani vaccinali adottati, le campagne sull'uso corretto del farmaco. Ma nessuna di queste è in grado di spiegare completamente la situazione (European Medicines Agency, 2018).

2.1.11 Situazione e azioni in Piemonte

Secondo il Rapporto del Servizio di Riferimento Regionale di Epidemiologia per la sorveglianza, la prevenzione e il controllo delle malattie infettive (SeREMI) 2013/2016, i consumi di antibiotici della Regione Piemonte in ambito umano risultano essere inferiori alla media italiana (ma comunque superiori a quella europea) e con trend in calo nel periodo 2013/2016 (Di Pietrantonj, 2017).

La Regione Piemonte nel 2016 ha prodotto uno specifico opuscolo di informazione rivolto agli allevatori per promuovere un uso responsabile degli antibiotici in ambito zootecnico.

La Regione Piemonte ha redatto un Piano Regionale di contrasto all'antimicrobico-resistenza per il 2019/2020, sia in ambito umano che veterinario (Regione Piemonte, 2019). Gli obiettivi previsti dal Piano di azione nazionale (*Piano Nazionale di Contrasto de ll ' Antimicrobico -Resistenza (PNCAR)*, 2020) in ambito veterinario sono perseguiti a livello regionale attraverso l'individuazione di un referente regionale, la costituzione di gruppi di lavoro, la redazione di relazioni, la partecipazione a riunioni presso il Ministero della Salute, l'organizzazione di eventi formativi per i veterinari, lo sviluppo di nuove tecnologie e la collaborazione con l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta (IZSPLV).

2.1.12 Antibiotico-resistenza ed *Escherichia coli*

Escherichia coli è un batterio Gram negativo appartenente alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* naturalmente presente nell'intestino crasso e tenue dei Mammiferi, (Poli *et al.*, 2017) ossidasi-negativo e catalasi-positivo (Madigan, Martinko and Parker, 2015). Viene eliminato attraverso le feci ed in tal modo disseminato a livello ambientale. È anche utilizzato quale indicatore per determinare la contaminazione fecale delle acque (Poli *et al.*, 2017).

I diversi ceppi di *E. coli* possono comportarsi da agenti zoonotici provocando infezioni opportuniste, trasmesse soprattutto per via alimentare. Vengono classificati in:

- patogeni extraintestinali: ceppi uropatogeni (UPEC), ceppi aviari (APEC), patogeni mammari (MPEC) e patogeni uterini (EnPEC);
- patogeni enterici: ceppi enterotossigeni (ETEC), ceppi “*attaching and effacing*” (AEEC) e ceppi produttori di Vero-tossine o Shiga-tossine (VTEC o STEC). (Poli *et al.*, 2017)

Gli Enterobatteri possono divenire resistenti agli antibiotici β -lattamici a spettro esteso attraverso molti meccanismi, il più comune dei quali è la produzione di β -lattamasi. Le ESBL (*extended-spectrum β -lactamase*) e le Amp-C β -lattamasi (cefalosporinasi) sono enzimi che idrolizzano tali antibiotici. I batteri che presentano i geni responsabili della sintesi di questi enzimi sono solitamente resistenti alle cefalosporine di III generazione, che sono tra gli antibiotici di importanza critica a più alta priorità (W H O Advisory Group

on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance, 2016) per il trattamento di infezioni date da batteri Gram negativi. I geni codificanti per tale resistenza possono essere localizzati su plasmidi o all'interno del cromosoma batterico. L'acquisizione di tali elementi di resistenza avviene solitamente attraverso il passaggio da altre *Enterobacteriaceae* per coniugazione o, meno frequentemente, per trasduzione. *E. coli* possiede intrinsecamente geni codificanti per AmpC, che possono essere attivati con una mutazione. I batteri commensali possono contribuire alla diffusione di tali enzimi. Nella maggior parte delle nazioni è stata rilevata una quantità maggiore di *E. coli* produttori di ESBL rispetto a quelli produttori di AmpC.

Gli ESBL idrolizzano le penicilline, le cefalosporine a spettro esteso (quali cefotaxime, ceftriaxone, ceftazidime e cefepime) e i monobattami (aztreonam). Non essendoci correlazione tra la tipologia di ESBL e il batterio produttore di tali enzimi (Saliu, Vahjen and Zentek, 2017), non si utilizza una classificazione in base alla specie batterica, ma la suddivisione è essenzialmente di tipo funzionale (classificazione di Ambler): vi sono ESBL di classe A (TEM, SHV, CTX-M, PER, VEB, GES, TLA, BES) e D (OXA) (Ambler *et al.*, 1991). Le tipologie più frequentemente rilevate includono TEM, SHV e CTX-M (Cantón, González-Alba and Galán, 2012) (Saliu, Vahjen and Zentek, 2017). I geni che codificano per questi enzimi sono chiamati *bla*TEM, *bla*SHV e *bla*CTX-M e sono localizzati su elementi genetici mobili (plasmidi, integroni o transposoni) oppure nel cromosoma batterico (Saliu, Vahjen and Zentek, 2017).

Per quanto concerne le AmpC β -lattamasi, *bla*CMY è il gene di resistenza più frequentemente rilevato in Europa negli allevamenti (Laube *et al.*, 2013).

E. coli commensale è ritenuto un buon indicatore per quanto concerne l'AMR in batteri Gram negativi e può essere considerato rappresentativo delle *Enterobacteriaceae* per monitorare l'emergenza e i cambiamenti nelle proporzioni di batteri produttori di ESBL. I plasmidi possono essere facilmente trasferiti ad altri batteri normali costituenti della flora enterica (EFSA, 2018), che in ultima analisi contribuiscono alla diffusione della resistenza.

La resistenza in *E. coli* è potenzialmente determinata da numerosi fattori, tra i quali: la pressione selettiva dovuta all'impiego di antibiotici in varie categorie di animali produttori di alimenti, la selezione e la successiva diffusione di batteri o elementi genetici resistenti e la co-selezione di batteri presentanti resistenza multipla (Madigan, Martinko and Parker, 2015).

Sebbene *E. coli* sia un normale colonizzatore dell'intestino di animali e uomini, è considerato anche la più frequente causa di infezioni del tratto urinario acquisite in comunità e in ambiente ospedaliero, di infezioni del torrente circolatorio e di meningite neonatale. È associato inoltre ad infezioni a livello addominale, cutaneo e dei tessuti molli imputabili a più microrganismi (WHO, 2014).

Gli ESBL possono potenzialmente essere trasmessi all'uomo attraverso gli alimenti, per contatto diretto con gli animali o indirettamente, attraverso l'ambiente (Wielders *et al.*, 2017). Rilevare gli stessi *E. coli* produttori di ESBL sia nei lavoratori che negli animali allevati non permette tuttavia di dimostrarne il trasferimento zoonotico diretto, come riportato da uno studio condotto in Germania in cui, a fronte del riscontro di identici genotipi tra allevatori e animali, si ritiene possibile la presenza di una fonte comune di trasmissione rappresentata dall'ambiente di allevamento, con conseguente passaggio attraverso il suolo, l'aria, l'acqua o gli animali infestanti (Dahms *et al.*, 2015). Al contrario, dal confronto tra diversi studi condotti in Olanda, non è emersa una significativa correlazione tra i profili genetici di ESBL e AmpC rilevati nella popolazione e quelli di origine animale, presenti in allevamento o negli alimenti di derivazione animale, mentre si è riscontrata una rilevante somiglianza tra i *reservoir* umani e ambientali (in particolare con le acque reflue) (Dorado-García *et al.*, 2017).

Secondo il Report EFSA EARS-net, riguardante l'antimicrobico-resistenza in UE, più della metà degli isolati di *E. coli* nel 2016 è risultata resistente ad almeno uno degli antibiotici testati (aminopenicilline, fluorochinoloni, cefalosporine di III generazione, aminoglicosidi e carbapenemi). Tra il 2013 e il 2016 si è registrato inoltre un aumento della resistenza alle cefalosporine di III generazione e cross-resistenza alle cefalosporine di III generazione, ai fluorochinoloni e agli aminoglicosidi (European Centre for Disease Prevention and Control, 2017).

La colistina è classificata come antibiotico di importanza critica (CIA); essa rappresenta una delle ultime possibilità terapeutiche in caso di batteri Gram negativi multi-resistenti. Nel 2015 è stata dimostrata per la prima volta in *E. coli* la possibilità di trasferire la resistenza alla colistina mediata dal gene *mcr-1* (Liu *et al.*, 2016).

La Decisione della Commissione Europea 2013/652/EU del 12 novembre 2013 redige un programma per il monitoraggio di AMR con l'obiettivo di salvaguardare la sanità pubblica. Con questa direttiva è sancito il monitoraggio obbligatorio di *E. coli* in broilers, galline ovaiole, tacchini, suini e vitelli e nelle carni derivate. Per *E. coli* in particolare è

obbligatorio il controllo di ESBL, AmpC e carbapenemasi. (Commissione europea, 2013b).

2.1.13 Antibiotico-resistenza e *Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina

Gli **stafilococchi** sono cocchi Gram positivi con la tendenza a disporsi in formazioni simili a grappoli. Molti sono anaerobi facoltativi; sono immobili, asporigeni, catalasi-positivi e la maggior parte sono ossidasi-negativi. Sono ubiquitari come commensali della cute dell'uomo e degli animali, ma sono anche presenti a livello delle mucose delle vie aeree superiori e del tratto urogenitale, e come flora transiente del tratto digerente (Poli *et al.*, 2017).

Nell'uomo, lo *Staphylococcus aureus* colonizza frequentemente la mucosa nasofaringea (Argudín *et al.*, 2017) (Köck *et al.*, 2017) e la pelle (Argudín *et al.*, 2017) in modo asintomatico, ma può anche causare varie problematiche, con una casistica vasta: da relativamente lievi infezioni cutanee e dei tessuti molli ad infezioni di protesi, ascessi, fasciti necrotizzanti, infezioni del tratto urinario, osteomielite, batteriemia, sepsi, endocardite, polmonite ed empiema toracico (Köck *et al.*, 2017). Inizialmente le infezioni sostenute da questo patogeno erano trattate con meticillina, oxacillina ed altri antibiotici β -lattamici. Dopo soli due anni dall'introduzione della meticillina (nel 1959) è stato rilevato lo *Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina (**MRSA**) (Guardabassi *et al.*, 2013) (Dahms *et al.*, 2014). La diffusione di MRSA ha portato rapidamente al fallimento di queste terapie, con aumento di morbilità e morte.

S. aureus può evolvere rapidamente tramite l'acquisizione di mutazioni genetiche ed elementi genetici mobili (Castillo Neyra *et al.*, 2012): sono presenti almeno 44 geni di resistenza comuni tra animali e uomo. MRSA si presenta quando uno *S. aureus* suscettibile alla meticillina (MSSA) acquisisce resistenza attraverso SCC-mec (*Staphylococcal Cassette Chromosome-mec*), contenente il gene *mecA* che codifica per la *Penicillin Binding Protein* (PBP) 2a, che riduce l'affinità per gli antibiotici β -lattamici (Argudín *et al.*, 2017).

Mentre inizialmente le infezioni dovute ad MRSA erano confinate all'ambito ospedaliero, alla fine degli anni '90 sono comparsi cloni di MRSA diffusi in contesti diversi, causa di infezioni in individui che non erano entrati in contatto con tale ambiente (Guardabassi *et*

al., 2013).

MRSA può essere suddiviso in tre tipologie, diverse dal punto di vista molecolare ed epidemiologico: *Community-Associated* (CA-MRSA), *Healthcare-Associated* (HA-MRSA) e *Livestock-Associated* (LA-MRSA) (Köck *et al.*, 2017).

Le prime due tipologie sono state frequentemente isolate nell'uomo e in minor misura negli animali, mentre LA-MRSA risulta presente sia nell'uomo che in molteplici altre specie. Secondo Köck *et al.* (2017) LA-MRSA colonizza persistentemente tra il 24% e l'86% degli allevatori di suini, il 37% degli allevatori di bovini e il 9–37% degli allevatori di polli, così come una certa percentuale di macellatori (3–6%) e veterinari (3–45%) (Köck *et al.*, 2017).

La prima sequenza isolata di LA-MRSA è stata ST398. Pur essendo tali batteri frequentemente rilevati nelle carni in tutto il mondo, il rischio di trasmissione attraverso gli alimenti è trascurabile, mentre sono ampiamente riconosciuti come pericolo legato all'occupazione (Guardabassi *et al.*, 2013). Gli studi condotti in Europa e in Canada indicano che i veterinari e gli allevatori hanno più probabilità di risultare positivi a MRSA ST398 rispetto al resto della popolazione (Castillo Neyra *et al.*, 2012).

Sebbene MRSA sia molto diffuso tra gli allevatori, le misure per prevenirne l'acquisizione (quali indossare indumenti protettivi, maschere o attuare terapie di decolonizzazione) sono state studiate raramente (Köck *et al.*, 2017). Alcuni articoli scientifici dimostrano che un'esposizione per un tempo limitato ad ambienti contaminati con MRSA porta ad una contaminazione nasale piuttosto che ad una colonizzazione persistente, mentre un contatto prolungato o ripetuto più frequentemente determina la persistenza di tale patogeno (Goerge *et al.*, 2017). Anche una colonizzazione a breve termine può però esporre al trasferimento di geni di resistenza, quali i geni di resistenza *mec* di MRSA, ai ceppi di *S. aureus* che normalmente colonizzano l'uomo (Graham *et al.*, 2019).

Essendo il controllo su MRSA volontario, solamente un numero limitato di nazioni ha riportato dati a riguardo (EFSA, 2018). Secondo il Report EARS-net dell'EFSA, tra il 2013 e il 2016 si è verificata in media una riduzione significativa della percentuale di MRSA nei Paesi Membri. Nonostante ciò, in 10 Paesi su 30 la percentuale di MRSA è superiore al 25 % e tale batterio rimane comunque una priorità in Europa (European Centre for Disease Prevention and Control, 2017).

2.2 L'ANTIMICROBICO-RESISTENZA IN AMBITO AVICOLO

2.2.1 La biosicurezza nel comparto avicolo

Le principali “buone pratiche di allevamento” in campo avicolo sono sintetizzate in un manuale, rivolto agli allevatori, redatto della Regione Piemonte nel 2010, che descrive anche i principi generali per salvaguardare la biosicurezza e garantire l’uso corretto del farmaco, con riferimento anche alle procedure da adottare per evitare l’insorgenza di AMR (Regione Piemonte, 2010a).

Rilevanti novità sono state recentemente introdotte nell’allevamento avicolo con il Decreto Ministeriale del 13 dicembre 2018, con l’intento principale di contrastare l’influenza aviaria, ma con risvolti interessanti dal punto di vista del contrasto di tutte le patologie infettive. In particolare è stato inserito l’obbligo di dotare ogni punto d’accesso ai capannoni di una “dogana danese”, struttura che non consenta l’ingresso ai locali senza aver prima indossato calzature dedicate al singolo locale di allevamento (Ministero della Salute, 2018). Già con le modifiche ed integrazioni all’Ordinanza Ministeriale del 26 agosto 2005 era prevista una zona filtro per l’accesso all’allevamento, dotata di lavandino, detergenti, spogliatoio, calzature e tute dedicate (Ministero della Salute, 2005). Tali prescrizioni presentano notevole rilevanza anche sotto il profilo del controllo di agenti patogeni di altra natura e possono contribuire al limitare l’introduzione e la diffusione di agenti di antimicrobico-resistenza.

Alcuni studi dimostrano che gli allevatori, e in modo particolare i lavoratori operanti nel comparto avicolo, presentano una prevalenza più alta rispetto al resto dei lavoratori del settore agricolo di malattie polmonari acute e croniche (O’Brien *et al.*, 2016). Per quanto riguarda gli avicoli allevati, l’esposizione alla polvere che si produce in allevamento predispone a lesioni polmonari e alterazioni cardiache. Tale polvere contiene inoltre alte quantità di lipopolisaccaridi e peptidoglicani, costituenti della parete cellulare batterica e, da analisi effettuate proprio sulla polvere, il DNA batterico risulta essere il più diffuso (O’Brien *et al.*, 2016).

2.2.2 L'uso degli agenti antimicrobici in allevamento avicolo

I Report annuali ESVAC non differenziano i dati di vendita secondo le varie linee di allevamento e nella maggior parte dei Paesi non sono monitorati i quantitativi di antibiotici venduti in campo avicolo. Tali dati sono ad esempio raccolti in Francia dal 1999 per mezzo dell'Agenzia per i Prodotti Medicinali Veterinari. Secondo l'Agenzia, nel 2016 sono state vendute 106 tonnellate di principi attivi di sostanze antibiotiche in avicoltura (il 20 % degli antibiotici utilizzati in ambito veterinario) (Roth *et al.*, 2019).

Gli agenti ad azione antimicrobica in avicoltura possono avere principalmente tre scopi.

1. Gli antibiotici sono stati utilizzati in campo avicolo come **promotori di crescita** dal 1940. All'inizio erano utilizzati tetracicline, tilosina e bacitracina aggiunti a basse concentrazioni nel mangime come additivi alimentari per favorire una rapida crescita dei polli. Nel 1997 è stato bandito l'uso dell'avoparcina dell'Unione Europea, seguita nel 1999 da virginiamicina, bacitracina, spiramicina e tilosina. A decorrere dal 1° gennaio 2006 in UE sono stati banditi tutti gli antibiotici addizionati ai mangimi come promotori di crescita (Regolamento CE 1831/2003)(Ministero della Salute, 2014a). Lo stesso è avvenuto nel 2017 per quanto riguarda gli USA, mentre questa pratica è ancora ammessa in Brasile e in Cina (Roth *et al.*, 2019).
2. **Coccidiostatici.** L'impiego dei coccidiostatici è consentito per la profilassi delle infezioni protozoarie negli animali, non essendo tali principi attivi utilizzati in medicina umana. Sono registrati come additivi e presenti nella maggior parte delle formulazioni di mangimi destinati agli avicoli, per cui utilizzati in modo sistematico ad ogni ciclo di allevamento. Ultimamente sono stati sviluppati vaccini vivi per combattere la perdita di efficacia dei coccidiostatici contro ceppi di *Eimeria* resistenti (Guardabassi Luca, Lars B. Jensen, 2008).
3. Gli agenti **antimicrobici a scopo terapeutico** sono somministrati in campo avicolo soprattutto per via orale attraverso il mangime o, più frequentemente, l'acqua. Nonostante nei primi anni dopo il bando dei promotori di crescita nei mangimi si fosse registrato un lieve aumento nell'utilizzo degli antimicrobici, ultimamente si sta assistendo ad un calo nel loro utilizzo in Europa e USA (Guardabassi Luca, Lars B. Jensen, 2008).

Gli **antimicrobici maggiormente utilizzati** (Guardabassi Luca, Lars B. Jensen, 2008) a scopo terapeutico sono:

- sulfamidici: prodotti di prima scelta, essendo quelli di più vecchia sintesi con minor applicazione in medicina umana. Sono utilizzati in quantità limitate e soprattutto in associazione con trimetoprim;
- penicilline: ampicillina e amoxicillina sono di prima scelta in avicoltura contro i clostridi, nonostante siano importanti in medicina umana;
- polipeptidi: sono prodotti di prima o seconda scelta contro le infezioni sistemiche sostenute da *E. coli*;
- lincosamidi: sono utilizzati solo in alcune nazioni nei pulcini;
- cefalosporine: dovrebbero essere utilizzate come antibiotici di terza scelta, considerando la loro importanza in medicina umana;
- chinoloni: dovrebbero essere utilizzati come prodotti di terza scelta.

Una grande importanza nella scelta dell'antibiotico è attribuita al tempo di sospensione, considerato il breve ciclo di allevamento degli avicoli.

Di prima scelta dovrebbero essere i principi attivi che non vengono utilizzati o sono di importanza minima in medicina umana, di seconda scelta quelli utilizzati anche in medicina umana, mentre di terza scelta i prodotti di notevole importanza in medicina umana, dei quali è sconsigliato l'utilizzo in ambito veterinario (Guardabassi Luca, Lars B. Jensen, 2008).

Le affezioni dei broiler che più frequentemente comportano il ricorso a farmaci antimicrobici sono: patologie gastrointestinali (coccidiosi, enterite necrotica, disbatteriosi), patologie respiratorie (bronchite infettiva, malattia di Newcastle, laringotracheite infettiva), patologie dell'apparato locomotore (artrite infettiva sostenuta da *E. coli*, *S. aureus* o *Enterococcus* spp. e infezioni batteriche secondarie connesse a tenosinovite e necrosi della testa del femore), setticemia e onfaliti (Murphy *et al.*, 2017).

I CIA in avicoltura sono, secondo la classificazione redatta dall'OIE (OIE, 2007) contenente gli agenti antimicrobici importanti in medicina veterinaria:

- *Veterinary Critically Important Antimicrobial Agents* (VCIA): aminoglicosidi (tra i quali streptomina, kanamicina, neomicina, gentamicina), amfenicoli

- (florfenicolo, tiamfenicolo), cefalosporine di III generazione (ceftiofur, ceftriaxone), macrolidi (eritromicina, spiramicina, tilmicosina), penicilline (benzilpenicillina, amoxicillina, ampicillina, associazioni di amoxicillina con acido clavulanico e sulbactam), fluorochinoloni (ciprofloxacina, enrofloxacina...), sulfonamidi (sulfadiazina, sulfametossazolo...), tetracicline (doxiciclina, ossitetraciclina...), ionofori (tra i quali monensina, narasin, salinomina);
- *Veterinary Highly Important Antimicrobial Agents* (VHIA): lincosamidi, acidi fosfonici (fosfomicina), pleuromutiline (tiamulina), polipeptidi (bacitracina, colistina), chinoloni di I generazione (flumequin);
 - *Veterinary Important Antimicrobial Agents* (VIA): arsenicali (roxarsone, nitarsone), biciclomicine, ortosomicine, streptogramine (virginiamicina), thioestrepton.

Nel corso degli anni alcuni principi attivi sono stati progressivamente banditi come promotori di crescita, in quanto ritenuti responsabili della selezione di resistenze ad antibiotici importanti nella salvaguardia della salute umana. Tale è il caso dell'**avoparcina**.

L'utilizzo del glicopeptide avoparcina è stato associato con la comparsa di Enterococchi resistenti al glicopeptide (GRE) di tipo van-A negli animali allevati. Il suo utilizzo come promotore di crescita è stato bandito nel 1995 in Norvegia e Danimarca, nel 1996 in Germania, mentre nel 1997 in tutta l'Unione Europea (Sørum *et al.*, 2005). Tale bando ha creato una situazione interessante, che ha dato la possibilità di osservare il destino degli elementi di resistenza in assenza di pressione selettiva (Sørum *et al.*, 2005). Negli anni seguenti si sono registrate riduzioni nei livelli di prevalenza di Enterococchi resistenti alla vancomicina negli alimenti e nella popolazione (Woolhouse *et al.*, 2015). In uno studio condotto in Norvegia su allevamenti in cui era stata utilizzata avoparcina prima del bando si è registrato un progressivo declino nella prevalenza di GRE, pur rimanendo relativamente alta, in un periodo compreso tra il 1998 e il 2003, mentre la presenza di *Enterococcus faecium* resistente ai glicopeptidi (GREF) riscontrata negli allevatori non ha subito significative variazioni (Sørum *et al.*, 2005). Con la rimozione della pressione selettiva si pensava di eliminare la presenza di elementi di resistenza ai glicopeptidi, ma questo non sembra possibile (almeno nel breve periodo).

Uno studio condotto in Norvegia tra il 1998 e il 1999 illustra l'ipotesi di un *reservoir* persistente di GREF all'interno dell'ambiente di allevamento oppure veicolato dai polli

introdotti ad ogni ciclo, che costituisce una continua fonte per la resistenza nell'uomo (Johnsen *et al.*, 2005).

Un altro studio norvegese condotto nel 1998 evidenzia la presenza di Enterococchi resistenti alla vancomicina (VRE) nel 99% dei campioni fecali di avicoli provenienti da allevamenti in cui era stata precedentemente usata l'avoparcina, mentre nell'11% di quelli non esposti in passato; dalle analisi sui campioni fecali degli allevatori la percentuale si riduce al 18% per il personale di allevamenti esposti e all'1% dei non esposti. Lo studio suggerisce la persistenza di VRE nell'ambiente durante ogni ciclo di allevamento, e la successiva colonizzazione dei pulcini introdotti (Borgen K., Simonsen G. S., Sundsfjord A., Wasteson Y., 2000).

In Italia, 18 mesi dopo il bando dell'avoparcina, le positività per enterococchi resistenti alla vancomicina riportanti il gene *vanA* hanno subito un calo dal 14,6% all'8% (Prestinaci, Pezzotti and Pantosti, 2015).

2.2.3 Analisi della problematica in Italia

In seguito alla Decisione 2013/652/UE (Commissione europea, 2013a) della Commissione Europea, il Ministro della Salute ha individuato le specie batteriche da inserire nel monitoraggio per il pericolo dell'AMR in campo avicolo. Tra esse risulta anche *E.coli*, sia come indicatore commensale che come produttore di ESBL, AmpC e carbapenemasi (Ministero della Salute, 2014b). Dalle analisi condotte nel 2014, il 95,4 % dei polli da carne esaminati è risultato positivo per la presenza di *E. coli*, mentre l'81,33 % per la presenza di *E.coli* produttori di ESBL, AmpC o carbapenemasi. Tra questi ultimi, il 95,08 % risultava resistente e il 64,34 % presentava una co-resistenza a 5 o più classi di antimicrobici; il 75,41% era co-resistente ai fluorochinoloni, il 5,33% era co-resistente alla colistina, l'80,74% era co-resistente alle tetracicline ed il 91,80% ai sulfonamidi. Nessuno degli isolati presentava invece resistenza ai carbapenemi (Ministero della Salute, 2014b).

Da un confronto della resistenza avicola con quella dei suini e dei vitelli di età inferiore ad un anno sempre nell'ambito di *E. coli*, risulta che la resistenza sia simile per la maggior parte di agenti antimicrobici. Si riscontrano difformità per quanto concerne la resistenza verso i fluorochinoloni (acido nalidixico e ciprofloxacina): nei polli da carne risulta essere

in media del 60%, mentre per suini e vitelli del 10 %. Per quanto riguarda invece l'ampicillina, nei broiler la resistenza è attorno al 50-70 %, mentre per suini e vitelli tra il 20 e il 50 %. Questi dati sono in parte imputabili al diverso utilizzo di tali antibiotici e alla loro gestione; in particolare, in suini e bovini sono possibili trattamenti sia di mandria che individuali, mentre in avicoltura sono attuati esclusivamente trattamenti di gruppo, e l'uso massivo potrebbe influire notevolmente sulla selezione delle resistenze (Ministero della Salute, 2014b).

2.2.4 Broiler ed *E. coli* produttori di ESBL

Negli articoli analizzati, le tipologie di campioni più utilizzate, per quanto riguarda gli avicoli, sono i tamponi cloacali; per quanto concerne l'ambiente, invece, sono stati campionati aria, polvere e pollina (BRIC1. Responsabile Scientifico: Professor Alessandro Mannelli, 2018).

Da quanto emerge dal report EFSA 2018 sull'antimicrobico-resistenza, basato sui dati raccolti nel 2016 (EFSA, 2018), i livelli di resistenza di *E. coli* isolati dal contenuto cecale di broiler è risultata molto variabile tra i Paesi UE, significativamente inferiore nelle nazioni nordeuropee (Finlandia, Svezia, Norvegia, Islanda). In Europa, i livelli più alti sono riscontrati nella resistenza ai chinoloni (acido nalidixico al 59,8 % e ciprofloxacina al 64 %), mentre sono riportate resistenze del 58 % per ampicillina, 49,9 % per sulfametossazolo, 47.1% per tetracicline e 40.7% per trimetoprim. Più in basso nella classifica si posizionano cloramfenicolo 16,6 %, gentamicina 8,9 %, cefotaxime 4,0 %, ceftazidime 3,6 %, azitromicina 4 % e colistina 1,9 %; ma in Francia, Germania, Italia, Polonia, Portogallo, Romania e Spagna l'incidenza è risultata essere del 2.7–5.6% e per Cipro del 9,4%. Un parametro significativo è la resistenza ad antibiotici di importanza critica, in particolare la resistenza combinata a ciprofloxacina e cefotaxime è stata rilevata nel 3,1 % degli isolati, con maggiore frequenza nelle nazioni del Sud e dell'Est Europa (EFSA, 2018). La prevalenza di *E. coli* produttori di ESBL, AmpC e carbapenemasi rilevata nei broiler è del 47,4 % (EFSA, 2018). Tutte le nazioni (eccetto Finlandia, Islanda, Norvegia e Svezia) hanno riportato resistenze multiple a 5 o più sostanze. Da Francia, Polonia e Cipro sono state rilevate resistenze a 9 o più sostanze.

Secondo il Report EFSA 2019, i cui dati sono aggiornati all'anno 2017 (EFSA, 2019), i livelli di resistenza di suini e vitelli di età inferiore ad un anno sono risultati minori

rispetto a quelli rilevati nei broiler per quanto riguarda ciprofloxacina (la resistenza è stata rilevata nel 10,6% dei casi, mentre nel 64% per i broiler).

Da uno studio condotto su allevamenti di bovini, suini, galline ovaiole e broiler nel 2011 in Giappone (Hiroi *et al.*, 2011) la prevalenza di batteri produttori di ESBL è risultata significativamente superiore nei broiler (60%) rispetto a quella presente negli altri animali.

Per quanto riguarda le carni, il pollame presenta le più alte contaminazioni da batteri produttori di ESBL se comparate con gli altri animali produttori di alimenti (Saliu, Vahjen and Zentek, 2017).

Uno studio dimostra come, anche in un allevamento biologico e quindi in assenza di antibiotici, *E. coli* produttori di ESBL e AmpC da un lato siano introdotti attraverso i pulcini di un giorno di vita, dall'altro persistano all'interno dell'allevamento. L'utilizzo di altri antimicrobici può determinare la selezione di resistenze nei confronti di ceftiofur, che infatti è risultata associata a resistenza ad amoxicillina-acido clavulanico e trimetoprim-sulfamidici (Huijbers *et al.*, 2016).

La pressione selettiva attuata dall'impiego di antibiotici non è l'unico fattore a determinare alte prevalenze in allevamento, come dimostrano rilievi simili in situazioni gestite con o senza l'utilizzo di antibiotici (C. Dierikx *et al.*, 2013).

Il ceftiofur (cefalosporina di III generazione) è utilizzato solo in medicina veterinaria e dal 2000 non è più autorizzato il suo impiego nel pollame. Nonostante ciò, negli anni la resistenza di *E.coli* a tale antibiotico in allevamento avicolo ha subito un incremento secondo studi condotti in Belgio (Persoons *et al.*, 2011).

Molti lavori scientifici dimostrano che gli allevatori sono maggiormente a rischio rispetto alla media della popolazione di essere portatori di elementi di resistenza. In uno studio olandese, il 33% degli allevatori di broiler è risultato portatore di ESBL o AmpC, mentre la media dei pazienti ospedalizzati nella stessa nazione è del 5% (C. Dierikx *et al.*, 2013).

In un altro studio olandese è stata riportata una forte correlazione tra le prevalenze rilevate in broiler, allevatori e macellatori avicoli per quanto concerne la presenza di enterococchi resistenti ai medesimi antibiotici (Van Den Bogaard, Willems and London N., 2002). Questo fenomeno può essere indicativo di un trasferimento di enterococchi resistenti dagli animali all'uomo. Per i lavoratori esposti sono stati individuati alcuni fattori di rischio che presentano una significativa correlazione con alti livelli di prevalenza di *E.*

coli produttori di ESBL e AmpC: trascorrere un numero considerevole di ore in allevamento, avere un contatto diretto con i broiler, essere affetti da diabete o malattie cutanee (Huijbers *et al.*, 2014).

Uno studio olandese condotto su numerosi allevamenti avicoli dimostra che la percentuale e il grado di resistenza più alti sono presenti nei campioni fecali prelevati da tacchini, seguiti da vicino da quelli di broiler, mentre nettamente inferiori risultano quelli di galline ovaiole. Le stesse tendenze sono state riscontrate negli allevatori, con risultati più alti per gli allevatori di tacchini, seguiti da quelli di broiler e nettamente distaccati da quelli di galline ovaiole. L'ipotesi più probabile per tale fenomeno è il passaggio di batteri resistenti o di geni di resistenza dagli animali agli allevatori (van den Bogaard, 2001).

In uno studio è stata osservata un'elevata resistenza ai fluorochinoloni nei broiler rispetto ad altre specie, e ciò può essere dovuto alla selezione determinata dall'utilizzo di enrofloxacin e flumequine. Negli allevatori di broiler invece è stata trovata una resistenza alla ciprofloxacina comparabile a quella di altri allevatori. Questo può essere spiegato dal fatto che la resistenza è causata da una mutazione cromosomica non trasferibile (Van Den Bogaard, Willems and London N., 2002).

In uno studio tedesco condotto su 7 allevamenti di broiler (Laube *et al.*, 2013), in ognuno di essi sono stati rilevati *E. coli* produttori di AmpC ed ESBL, con aumento significativo dal primo (tra le 3 e le 36 ore dopo l'accasamento) e il secondo campionamento (tra i 14 e i 18 giorni di vita). I campioni ambientali risultavano anch'essi positivi, ma con prevalenze di contaminazione sovrapponibili nei due periodi esaminati. Livelli simili sono stati riscontrati anche in un allevamento in cui non erano utilizzati antibiotici, quindi non sottoposti ad una selezione delle resistenze diretta. Questi rilievi suggeriscono la presenza di due fonti di AMR complementari: da un lato, la permanenza di un certo grado di contaminazione all'interno dell'ambiente di allevamento, dall'altro la reintroduzione di elementi di resistenza attraverso i pulcini accasati ad ogni ciclo successivo.

In uno studio svedese, confrontando i geni di resistenza di *E. coli* produttori di ESBL e AmpC rilevati, da un lato, in broilers e carni avicole e, dall'altro, in infezioni del torrente circolatorio umane, si è riscontrata una sovrapposizione del 3% (Börjesson *et al.*, 2016). Risultati differenti da quelli di uno studio olandese, in cui il 35 % degli isolati ottenuti da sangue conteneva geni di ESBL, dei quali il 19 % geni di ESBL localizzati su plasmidi geneticamente indistinguibili da quelli ottenuti nel pollame (Leverstein-van Hall *et al.*, 2011).

In uno studio olandese condotto su 3 allevamenti di broiler e 5 di galline ovaiole (Blaak *et al.*, 2015), sono stati rilevati *E. coli* produttori di ESBL da campioni fecali nel 65% delle galline ovaiole e nell'81% de broiler. Le percentuali risultavano superiori negli allevamenti di broiler anche per quanto concerne l'ambiente (in particolare, da campionamenti eseguiti su aria e polvere). L'impiego totale di antibiotici in questa tipologia di allevamento è circa 20 volte superiore a quello delle ovaiole. Alla luce di questa considerazione, una possibile spiegazione può risiedere nella bassa pressione selettiva dovuta ad un impiego di quantitativi inferiori di agenti antimicrobici nell'allevamento delle galline ovaiole, che nel tempo può favorire una sensibile diminuzione di batteri produttori di ESBL in allevamento. La contaminazione ambientale può essere anche facilitata attraverso acque di superficie e mosche.

La presenza di *E. coli* produttori di ESBL e AmpC è rilevabile in tutti i passaggi della catena produttiva del broiler (C. M. Dierikx *et al.*, 2013), a partire dal punto di origine degli animali, ovvero gli allevamenti dei riproduttori, passando dagli incubatoi e dagli allevamenti da ingrasso, fino ad arrivare ai macelli avicoli. Nei broiler in allevamento è stato rilevato un incremento dei livelli di prevalenza da 0-24% fino a 96-100% nel corso della prima settimana di ciclo produttivo, che permanevano fino alla data di macellazione. La fonte della contaminazione può essere individuata nei riproduttori o nell'ambiente di allevamento degli stessi, in cui la trasmissione avviene sia per via verticale che orizzontale, ma anche nella permanenza e nella moltiplicazione di questi elementi a livello di allevamento da ingrasso.

È dibattuta la possibilità di trasmissione per via verticale di tali patogeni resistenti. Batteri produttori di ESBL sono stati isolati anche sulla superficie delle uova, in particolare in uno studio tedesco (Projahn *et al.*, 2017) sono stati rilevati gli stessi CTX-M1 sulle uova e nell'ambiente di allevamento dei riproduttori. Non si può escludere la possibilità di una trasmissione verticale diretta. È possibile che le uova siano contaminate precocemente con la penetrazione di *E. coli* attraverso il guscio e la successiva moltiplicazione batterica, come nel caso di *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, sebbene non sia ancora stato dimostrato in modo specifico per *E. coli*. L'ipotesi più probabile è che i pulcini di un giorno di vita, la maggior parte dei quali non presenta ESBL, siano colonizzati a partire dall'ambiente dell'incubatoio e successivamente agiscano come diffusori in allevamento.

Un recente studio condotto in Nord Italia (Apostolakos *et al.*, 2019) (il primo a ripercorrere l'intera filiera produttiva del broiler nel nostro Paese per quanto riguarda le dinamiche di trasmissione e disseminazione di *E. coli* produttori di ESBL e pAmpC) ha

rilevato una prevalenza media molto alta (60,3%). Valori elevati sono stati riscontrati anche nei pulcini di un giorno; la spiegazione più probabile è data dalla concomitanza tra una trasmissione verticale dai riproduttori e la contaminazione dell'ambiente di allevamento, che determinano un rapido incremento nel numero di batteri resistenti e nella loro prevalenza negli animali.

Sotto il profilo genetico è stata inoltre riscontrata una significativa riduzione di *bla*CMY-2, progressivamente sostituito da *bla*CTX-M-55 e *bla*CTX-M-1 nel corso del tempo. L'utilizzo di amoxicillina può aver selezionato *E. coli* produttori di ESBL e AmpC (Apostolakos *et al.*, 2019).

Altre vie di trasmissione da considerare, meno convenzionali ma documentate, sono la presenza di animali selvatici e di insetti. In uno studio condotto in un allevamento di broiler in Olanda (Blaak *et al.*, 2014), i genotipi di *E. coli* produttori di ESBL identificati dall'analisi di mosche catturate in allevamento collimavano con quelli presenti nella lettiera e nelle acque superficiali. Generici *E. coli* sono stati trovati nella maggior parte dei campioni di mosche, ma solamente il 2-3% era produttore di ESBL.

2.2.5 Broiler e *Staphylococcus aureus* resistente alla meticillina

Le matrici prevalentemente adottate per il campionamento negli studi analizzati sono state, per quanto riguarda gli animali: tamponi faringei (Geenen *et al.*, 2013), cloacali, tracheali, da cavità nasali (Nemeghaire *et al.*, 2013), pelle al di sotto dell'ala (Pletinckx *et al.*, 2011). Per quanto concerne i campioni ambientali: polvere (Geenen *et al.*, 2013), pareti, aria, acqua di abbeverata, mangime, lettiera (Pletinckx *et al.*, 2011), stivali (Friese *et al.*, 2013). Nei broiler MRSA è stato isolato in egual numero da narici e cloaca (Persoons *et al.*, 2008). Le matrici umane utilizzate sono state tamponi nasali.

Negli avicoli *S. aureus* può essere rilevato anche in soggetti sani come normale colonizzatore della pelle e delle vie respiratorie superiori, oppure può indurre una serie di manifestazioni patologiche, quali infezioni del sacco vitellino, infiammazioni articolari, tendinee e ossee, pododermatite, osteomielite e sepsi (tho Seeth, Hoedemaker and Krömker, 2015).

Da uno studio condotto in Belgio (Persoons *et al.*, 2008), MRSA è stato isolato in allevamenti di broiler ma non di galline ovaiole. Questo può indicare che MRSA sia

assente o rilevabile in un numero limitato di soggetti, forse a causa del minor utilizzo di antibiotici in questa tipologia di allevamento.

In un secondo studio condotto in Belgio (Nemeghaire *et al.*, 2013) su 372 allevamenti, le percentuali di MRSA sono risultate significativamente superiori in allevamenti di broiler rispetto a quelli di galline ovaiole. Tutti i ceppi sono risultati resistenti ad almeno 7 diversi agenti antimicrobici, tra i quali penicillina, cefoxitina, tetraciclina ed eritromicina.

Utile per avere una prospettiva globale della problematica è una meta-analisi condotta su 51 studi provenienti da tutto il mondo (Ribeiro *et al.*, 2018). La prevalenza complessiva di MRSA nei broiler è risultata del 5%, mentre nei tacchini del 36%. Tale spiccata differenza potrebbe essere imputabile alla diversa tipologia di allevamento: il tacchino presenta un ciclo di durata maggiore, e questo può rendere più probabile la progressiva colonizzazione da MRSA. Questi dati sono anche coerenti con i diversi livelli di contaminazione ambientale, maggiore in allevamenti di tacchini.

In Germania sono stati selezionati per partecipare ad uno studio (Friese *et al.*, 2013) allevamenti di tacchini e di broiler in base alla positività a campioni sia ambientali che animali. I campioni di aria all'interno dell'allevamento sono risultati positivi in 7 allevamenti di tacchini su 9 (3 su 4 di broiler), correlati positivamente con il numero di animali positivi (in 8 allevamenti su 9) e con i campioni di polvere (5 su 9). LA-MRSA è stato riscontrato anche nell'ambiente attorno all'allevamento fino ad una distanza di 500 m, probabilmente dovuto al trasporto dei batteri da parte del vento. I pulcini di un giorno e l'ambiente di allevamento nello stesso momento risultavano tutti negativi, per poi divenire positivi ed aumentare progressivamente nel tempo. Questo potrebbe indicare che i pulcini non rappresentano una via di introduzione preferenziale di MRSA in allevamento.

In uno studio condotto in Olanda (Geenen *et al.*, 2013) su 50 allevamenti di broiler, l'8% è risultato positivo per LA-MRSA, mentre nei lavoratori la percentuale positiva è risultata del 5,5%. Questo dato è significativamente superiore rispetto alla media della popolazione olandese (<0,1%), mentre non è stata trovata alcuna positività nei membri della famiglia degli allevatori diversi da coniugi o compagni. L'ambiente è risultato positivo nel 30% degli allevamenti in cui gli animali erano positivi e in nessuno di quelli in cui gli animali erano negativi.

Pur essendo la prevalenza nei broiler più bassa rispetto agli allevamenti suini e di vitelli (Geenen *et al.*, 2013), lavorare in un allevamento di broiler positivo a MRSA si configura come un importante fattore di rischio per la contaminazione umana da tale batterio.

In uno studio condotto in Belgio (Pletinckx *et al.*, 2011) in allevamenti misti, a fronte di una prevalenza di MRSA del 7,2% isolato da broiler, nei suini la percentuale è stata dell'86,3%. MRSA non è stato isolato dall'ambiente di allevamento dei broiler, al contrario di quanto riscontrato per i suini. La spiegazione può risiedere in numerosi fattori: il periodo trascorso in allevamento, che si limita a 6 settimane per i broiler, mentre è di 6 mesi in media per i suini; la disinfezione, non sempre attuata quando i singoli box sono vuoti all'interno dello stabulario, e la conseguente possibilità di contaminazione a partire dai box confinanti. MRSA ST398 con lo stesso *spa-type* (t011) sono stati individuati negli animali e negli allevatori. È possibile che i suini rappresentino una fonte di contaminazione per i broiler non direttamente, ma attraverso l'allevatore, che svolge così il ruolo di vettore.

2.3 L'ALLEVAMENTO DEL BROILER

2.3.1 L'avicoltura in Italia

Secondo fonti FAO, i polli esistenti nel mondo sarebbero 6 500 milioni (Cerolini *et al.*, 2008). In Italia sono presenti 2.668 allevamenti di polli da carne registrati in Anagrafe Nazionale ('Banca Dati Nazionale dell'Anagrafe Zootecnica istituita dal Ministero della Salute presso il CSN dell'Istituto "G. Caporale" di Teramo"', 2019), per una produzione di oltre 81 milioni di capi. Nel Report ISMEA sul mercato avicolo pubblicato a giugno 2019 (ISMEA, 2019) si riporta che nel 2018 la carne di pollo è stata la tipologia più consumata in Italia. Il valore dell'avicoltura ha sfiorato gli 8 miliardi di euro nel 2018. Il comparto avicolo è inoltre l'unica filiera zootecnica autosufficiente, per cui l'intero fabbisogno nazionale è coperto dalla produzione interna (ISMEA, 2019).

L'avicoltura in Italia ha preso avvio durante gli anni '30 con l'Istituzione dei Centri e Osservatori Avicoli (Cerolini *et al.*, 2008). Da una tipologia di allevamento caratterizzata da una molteplicità di razze e ceppi locali e a conduzione familiare, è avvenuta una rapida evoluzione durante gli anni cinquanta, che ha condotto ad una produzione industriale, di tipo intensivo, caratterizzato da un numero sempre minore di impianti in parallelo all'esponenziale aumento dei capi allevati. In questo processo l'eterogeneità delle varie razze autoctone ha ceduto il posto all'uniforme bianca di un esiguo numero di ibridi commerciali. Dal 1958 al 2007 la produzione annua di carni avicole ha subito un aumento di 10 volte (da 100 000 a 1 123000 tonnellate) e l'occupazione nel settore è passata da 2500 a 179000 unità (Cerolini *et al.*, 2008). Con l'evoluzione degli allevamenti sono sorti anche incubatoi di stampo industriale.

In Piemonte sono presenti 307 allevamenti di polli da carne, con oltre 6 milioni di capi. Nel territorio di competenza dell'ASL di Alessandria sono presenti 4 allevamenti di broiler, con una produzione di 150 000 capi ('Banca Dati Nazionale dell'Anagrafe Zootecnica istituita dal Ministero della Salute presso il CSN dell'Istituto "G. Caporale" di Teramo"', 2019).

2.3.2 Caratteristiche generali dell'allevamento del broiler

La specie avicola più diffusa in Italia è il pollo (*Gallus gallus*); l'allevamento del pollo si divide principalmente in due categorie: quella del pollo da carne (o broiler) e quella della gallina ovaioia (Regione Piemonte, 2010b).

L'allevamento del broiler è finalizzato all'ottenimento di un individuo di peso idoneo alla macellazione, parametro che può variare secondo l'appartenenza a diverse categorie: 1680 – 1800 grammi per il pollo piccolo, 2350 – 2700 grammi per quello medio e 3000 – 3600 grammi per quello grande (INAIL, 2003). Per effetto della pressante selezione genetica la curva di crescita dei broiler risulta sempre più rapida col passare degli anni, di conseguenza questo determina una riduzione dei tempi di allevamento (Cerolini *et al.*, 2008).

Oltre il 90% degli allevamenti è organizzato secondo un sistema ad integrazione verticale, che consiste nell'accordo tra parti rappresentanti due stadi successivi nella filiera produttiva del pollo da carne, sotto il controllo di una sola impresa. È in questo ambito che si stipulano contratti di soccida tra aziende agricole, mangimifici, macelli, produttori di pulcini e riproduttori in cui gli animali rimangono sempre di proprietà dell'impresa e l'allevatore, dopo il macello, riceve un ammontare fisso in base all'ICA ottenuto. L'allevatore (il soccidario) fornisce ricoveri e attrezzature (facendosi carico delle spese di funzionamento e manutenzione) e presta la manodopera, mentre l'impresa (il soccidante) apporta i pulcini, il mangime, l'assistenza tecnica e veterinaria (Cerolini *et al.*, 2008).

La gestione è organizzata secondo il principio del “tutto pieno - tutto vuoto”: i locali di stabulazione ospitano gli animali per l'intero ciclo produttivo (tutto pieno), mentre in seguito al carico per il trasferimento al macello si rispetta un periodo di vuoto biologico e sanitario (tutto vuoto). Il vuoto biologico (periodo compreso tra il carico degli ultimi animali per il macello e l'accasamento dei pulcini del ciclo successivo) deve presentare una durata minima di 7 giorni per i polli da carne, mentre non deve essere inferiore a 3 giorni il vuoto sanitario (tempo intercorso tra le operazioni di pulizia e disinfezione e il nuovo accasamento) (Ministero della Salute, 2018).

Ogni capannone ospita in genere da 10 000 a 20 000 polli. L'allevamento del broiler si svolge esclusivamente a terra su lettiera permanente, dello spessore di 5-15 cm, solitamente costituita da truciolo, paglia o lolla di riso. Essa deve rimanere friabile per

tutta la durata del ciclo di allevamento, non deve essere bagnata e non si devono formare croste. Viene completamente rimossa al termine di ogni ciclo.

I broiler possono essere allevati a sessi misti o a sessi separati per capannone. Per quanto riguarda la tecnica a sessi misti, nel medesimo capannone sono presenti maschi e femmine separati da un divisore, una rete metallica posta a metà dello spazio; a 35-40 giorni avviene lo sfoltoimento (le femmine sono portate al macello) ed è rimossa la rete, per cui i maschi hanno a disposizione l'intero capannone. Il ciclo di allevamento presenta una durata massima di 10 settimane.

Le strutture di allevamento presentano solitamente pianta rettangolare. I capannoni possono essere aperti (con ampie fenestrate lungo il perimetro che forniscono illuminazione e ventilazione) o chiusi (illuminazione artificiale e ventilazione forzata). Il tetto è costituito da due falde (Cerolini *et al.*, 2008).

La ventilazione può essere naturale, forzata o mista. La tipologia forzata risulta più funzionale soprattutto in presenza di un numero ingente di animali ricoverati. I ventilatori sono posizionati lungo il perimetro del capannone e, in alcune realtà, anche fissati al soffitto in vari punti dell'area interna. Sono presenti delle fenestrate perimetrali solitamente controllate attraverso sistemi automatizzati che ne consentono la regolazione a seconda dei parametri rilevati tramite sonde all'interno dell'ambiente. Si possono installare anche dei nebulizzatori d'acqua o dei sistemi di raffrescamento dei tetti.

Per quanto concerne la gestione dell'alimentazione, il mangime può essere prodotto direttamente dall'azienda oppure acquistato da una ditta esterna. In entrambi i casi esso viene conservato in sili verticali adiacenti agli stabulari (come mostrato nella *Figura 3*). Il mangime viene inserito all'interno dei sili attraverso l'apertura posta sulla loro sommità ed è poi estratto attraverso un meccanismo automatizzato, una coclea collegata con il sistema di distribuzione e le mangiatoie interne al capannone. Le mangiatoie sono installate su impianti mobili in senso verticale che coprono l'intera lunghezza del capannone. Esse sono solitamente vassoi circolari che presentano dispositivi a ghiera per dosare l'alimento messo a disposizione. La densità raccomandata è di un dispositivo di alimentazione ogni 60-70 capi. La tendenza odierna è quella di moderare l'incremento ponderale nel primo periodo di allevamento, così da consentire il corretto sviluppo di apparato cardiovascolare, scheletrico e immunitario (Cerolini *et al.*, 2008).



Figura 3. La figura mostra due sili contenenti il mangime, collegati alla linea di distribuzione dell'alimento.

Gli abbeveratoi solitamente presentano un sistema “a goccia”, il cui azionamento è provocato dalla pressione esercitata dal becco dell'animale. Una tazza al di sotto dell'erogatore raccoglie l'acqua in eccesso per evitarne lo spreco e per limitare l'inumidimento della lettiera. La disponibilità di acqua deve essere sempre garantita.

Per quanto concerne la gestione dei reflui, i broiler producono una pollina palabile, costituita da reflui miscelati alla lettiera. Essa a fine ciclo viene stoccata in apposite platee impermeabilizzate, poi trasformata in biogas o utilizzata per la fabbricazione di fertilizzanti organici.

2.3.3 Fasi dell'allevamento del broiler

Il ciclo di allevamento si può suddividere in diverse fasi:

- 1) **Preparazione dei box.** È possibile dividere ulteriormente questa fase in:
 - allestimento della lettiera: deve essere primariamente stesa con l'ausilio di bob-cat e poi si procede alla stesura definitiva manualmente, con rastrelli o forcali;

- abbassamento dei telai e delle mangiatoie; il mangime viene fornito a terra, disposto su guide in materiale decomponibile;
- acclimatamento: prima dell'arrivo dei pulcini è necessario approntare un ambiente idoneo e successivamente mantenere una temperatura di 32-33°C attraverso cappe a gas o lampade a infrarossi (le cosiddette “madri artificiali”).

2) **Accasamento** (*Figura 4*). I pulcini di un giorno di vita vengono trasferiti dall'incubatorio di provenienza all'allevamento in cui compiranno l'intero ciclo di ingrasso. Sono trasportati su autocarri, all'interno di contenitori di plastica impilati tra loro. Vengono sempre trasferiti pulcini della medesima età.

Gli operatori trasferiscono manualmente i pulcini dalle cassette all'ambiente di allevamento nei capannoni, semplicemente inclinando le cassette stesse (INAIL, 2003). La temperatura iniziale è mantenuta per le prime 24-48 ore; successivamente si attua una diminuzione progressiva di 1°C ogni 3 giorni, fino ad arrivare a 21° C al 27° giorno di età (Cerolini *et al.*, 2008).



Figura 4. La figura mostra pulcini di un giorno appena accasati.

3) **Ingrasso.** Può avere durata variabile, a seconda della categoria di broiler allevati: 38 – 42 giorni per il pollo piccolo, 49 – 54 giorni per il pollo medio e 54 – 63 giorni per quello grande. Durante tale fase le operazioni di pesatura vengono svolte con cadenza settimanale su un numero rappresentativo di capi (circa l'1%),

con frequenza maggiore all'approssimarsi del momento della macellazione (Cerolini *et al.*, 2008).

- 4) **Carico** (*Figura 5*). Consiste nel caricamento dei broiler a fine ciclo in gabbie per il successivo trasporto al macello. Solitamente gli operatori si servono di transenne per circoscrivere e caricare gruppi di animali. Si può svolgere secondo due modalità:
- a carico singolo: si lavora riempiendo di volta in volta moduli di carico che vengono prelevati singolarmente da un carrello elevatore;
 - a carico multiplo: sono caricati più moduli contemporaneamente all'interno dei locali di stabulazione, vengono impiegati bob-cat per il trasporto delle gabbie piene all'esterno del box e per il rifornimento con gabbie vuote (INAIL, 2003).



Figura 5. La figura mostra un macchinario utilizzato per il carico dei broiler a fine ciclo.

- 5) **Rimozione della pollina.** Consiste nella rimozione della lettiera residua a fine ciclo commista a feci e cataboliti animali. Tale operazione deve essere eseguita al termine di ogni ciclo di allevamento. Solitamente la rimozione della pollina è data in appalto a ditte esterne. Si utilizza un bob-cat per convogliare il materiale all'esterno dei locali di allevamento.
- 6) **Lavaggio.** Avviene attraverso macchine idropultrici, con insufflazione di acqua ad alta pressione e/o nebulizzata. Tale operazione riguarda sia gli ambienti di allevamento che le attrezzature e i macchinari (INAIL, 2003). La Regione Piemonte inserisce nelle Linee guida per l'allevamento del pollo da carne (Regione Piemonte, 2010a) tre operazioni precedenti alla pulizia:

- disinfestazione: con nebulizzazione di prodotti autorizzati, prima che gli insetti migrino nelle fessure;
 - pulizia a secco: con aspiratori e attrezzature mobili;
 - detersione: lasciando agire i prodotti per almeno 2-3 ore.
- 7) **Disinfezione.** Essa viene svolta attraverso macchine idropulitrici contenenti disinfettanti in soluzione acquosa (INAIL, 2003).
Per quanto riguarda le linee di abbeveraggio, è necessario svuotare e pulire l'apparato, colmare l'impianto interamente con acqua e soluzione disinfettante per 60 minuti, per poi rimuovere completamente tutto e riempire con acqua potabile (Regione Piemonte, 2010a).
- 8) **Manutenzione.** La manutenzione di strutture, impianti e attrezzature non è riconducibile ad una specifica fase, ma può essere messa in atto durante i vari momenti a seconda delle necessità, oppure può essere programmata al termine del ciclo stesso (INAIL, 2003).

La maggior parte delle mansioni è solitamente svolta da uno o due operatori. Limitatamente ad alcune pratiche si può rendere necessario l'intervento di più lavoratori: ad esempio, per il carico degli animali o per la pulizia e disinfezione dei locali e delle attrezzature.

3. OBIETTIVI DELLA TESI

Obiettivo primario della tesi è valutare, all'interno di un allevamento avicolo campione, l'esposizione al rischio di antibiotico-resistenza nei lavoratori. L'oggetto di questo elaborato è un'indagine mirata alla ricerca di *E. coli* produttore di ESBL e *Staphylococcus aureus* meticillino-resistente (MRSA) durante varie fasi di allevamento su diverse matrici e la valutazione del rischio derivante per chi opera in tale contesto.

3.1 II PROGETTO

La tesi si situa nell'ambito del progetto INAIL "Realizzazione di un network finalizzato alla comunicazione e riduzione del rischio di diffusione dell'antimicrobico-resistenza nei lavoratori esposti", del quale il Professor Alessandro Mannelli è Responsabile Scientifico. Tale Progetto, attraverso l'integrazione di più competenze e discipline, coinvolge il Dipartimento di Scienze Veterinarie dell'Università degli Studi di Torino, il Dipartimento di Giurisprudenza, Scienze politiche, economiche e sociali dell'Università del Piemonte Orientale e l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie. L'obiettivo è studiare i meccanismi di insorgenza e di diffusione di AMR, in modo specifico nella relazione tra ambito umano e animale, e realizzare una piattaforma web utile per la comunicazione del rischio ai lavoratori esposti, principalmente allevatori avicoli e suinicoli, ideando linee guida rivolte alla corretta informazione e formazione degli operatori. Altro obiettivo, curato in particolare dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, è un progetto pilota per la valutazione del corretto uso del farmaco in allevamento avicolo e suinicolo.

L'indagine sociologica rivolta all'individuazione delle pratiche lavorative maggiormente esposte al rischio di AMR è stata elaborata dal Dipartimento dell'Università del Piemonte Orientale sopraccitato. Per perseguire tale obiettivo sono state eseguite interviste semi-strutturate agli allevatori riguardanti le pratiche svolte in allevamento al fine di ricavare informazioni utili all'analisi e alla valutazione della percezione del rischio, con la conseguente predisposizione di "arene strutturate" per il confronto tra i lavoratori del settore al fine di individuare le "buone pratiche" e i miglioramenti apportabili nella realtà della pratica lavorativa.

Il ruolo dell'Università degli Studi di Torino si basa sull'analisi del rischio di AMR. L'obiettivo è perseguito in primo luogo attraverso l'identificazione delle *risk pathways*, ottenuta per mezzo della revisione della letteratura, della raccolta di informazioni ed

expert opinions per individuare le pratiche che maggiormente costituiscono un rischio di AMR per i lavoratori esposti.

3.1.1 Analisi del rischio

Il problema dell'AMR è stato affrontato secondo i principi dell'analisi del rischio.

L'analisi del rischio costituisce una “metodologia sistematica per definire provvedimenti, o altri interventi a tutela della salute, efficaci, proporzionati e mirati”. Tale processo deve svolgersi in maniera indipendente, obiettiva e trasparente e deve essere necessariamente supportato da informazioni e dati scientifici consolidati. Tali concetti sono presenti nei “*consideranda*” del Reg. CE 178/2002.

L'analisi del rischio può essere suddivisa in alcuni punti fondamentali: la valutazione del rischio (*risk assessment*, a sua volta suddiviso in *hazard identification*, *release assessment* ed *exposure assessment*), cui conseguono la comunicazione (*risk communication*) e la gestione (*risk management*) del rischio stesso.

Il primo passo per un corretto processo di valutazione del rischio consiste nell'identificazione del pericolo (*hazard identification*), ovvero un agente biologico, chimico o fisico che può essere considerato un potenziale portatore di effetti nocivi per la salute. Il rischio è definito come la “funzione della probabilità e della gravità di un effetto nocivo per la salute, conseguente alla presenza di un pericolo” (Reg. CE 178/2002).

Nel caso specifico dello studio condotto il pericolo è rappresentato dagli elementi in grado di determinare resistenza agli agenti antimicrobici, intesi come specifici geni che codificano la resistenza e i batteri portatori di tali geni. Il rischio, determinato dalla loro presenza in un ambiente e in una popolazione animale, è la diffusione di tali elementi tra gli animali, nonché la successiva trasmissione della resistenza dagli animali all'uomo, che in ultima analisi comportano la perdita di efficacia di trattamenti antibiotici precedentemente risolutivi nei confronti di specifiche infezioni batteriche.

Una volta identificato l'*hazard*, il processo prosegue logicamente con l'individuazione delle modalità con cui tale pericolo può essere rilasciato e mantenersi in una popolazione (*release assessment*). In questo caso si intende secondo quali meccanismi avviene il rilascio degli elementi di resistenza a partire dagli animali e dall'ambiente.

L'*exposure assessment* si prefigge l'intento di valutare l'esposizione dell'uomo e degli animali all'*hazard*. Partendo dal presupposto che all'interno dell'allevamento siano presenti *hazard*, di cruciale importanza risulta la comprensione delle modalità, che si

traducono in momenti, operazioni e comportamenti definiti, con le quali gli allevatori possono concretamente essere esposti a tale rischio.

Si situano nell'ambito della *risk communication* le iniziative volte alla realizzazione di un sito promosso dall'INAIL in cui siano indicati, sulla base dei risultati ottenuti, gli accorgimenti che gli allevatori possono assumere per limitare il rischio di entrare in contatto con elementi di antimicrobico-resistenza.

3.2 ANALISI DEL RISCHIO: APPLICAZIONI NELLA TESI

3.2.1 Il metodo FMEA

Per l'analisi e il confronto delle informazioni raccolte è stato utilizzato il metodo FMEA.

Il metodo FMEA (*Failure Modes and Effect Analysis*) è un modello matematico studiato per l'analisi semi-quantitativa del rischio, utilizzato in origine in campo militare ed aerospaziale per studiare i meccanismi determinanti l'evenienza di guasti e difetti e analizzarne le conseguenze. È stato modificato, sulla base della letteratura scientifica e di *expert opinions*, dai borsisti del Dipartimento di Scienze Veterinarie dell'Università degli Studi di Torino per consentirne l'applicazione in ambito zootecnico (BRIC1. Responsabile Scientifico: Professor Alessandro Mannelli, 2018).

L'obiettivo è organizzare secondo un ordine di priorità le varie pratiche lavorative tipiche dell'allevamento del broiler, in modo da concentrare l'attenzione verso le modalità di rischio più "pericolose".

La prima attività svolta nell'ambito di questa tesi è stata l'osservazione, nel corso di vari cicli produttivi, di 12 pratiche lavorative, prendendovi parte in determinate circostanze nelle quali gli allevatori ne hanno dato la possibilità (quali, per esempio, l'esecuzione delle manualità di scarico dei pulcini e di raccolta degli animali morti).

Elenco delle **pratiche**:

- Preparazione dei box
- Scarico dei pulcini
- Raccolta degli animali morti
- Manutenzione degli impianti
- Pesa degli animali

- Carico sugli automezzi delle femmine per la macellazione
- Carico sugli automezzi dei maschi per la macellazione
- Rimozione della pollina a fine ciclo
- Lavaggio del capannone
- Disinfezione del capannone
- Fresatura della pollina
- Pulizia dei contenitori del cibo

Per ognuna di queste pratiche sono stati scelti quattro **indicatori**:

- contatto;
- ore di lavoro;
- utilizzo di DPI;
- quantità di animali per operatore.

Analisi degli indicatori (BRIC1. Responsabile Scientifico: Professor Alessandro Mannelli, 2018).

Tali indicatori sono stati individuati sulla base delle informazioni presenti in bibliografia e attraverso *expert opinions* di veterinari pubblici, veterinari privati, docenti del Dipartimento di Scienze Veterinarie e allevatori.

Per ognuno di questi indicatori è stata progettata una scala di 4 livelli per l'attribuzione dello score, ideata in modo specifico per l'allevamento del broiler, come riportato nella *Tabella 1*. I criteri di attribuzione dello score sono stati ideati dai borsisti del Dipartimento di Scienze Veterinarie basandosi sulle informazioni ottenute mediante *expert opinions* di veterinari pubblici, veterinari privati, docenti del Dipartimento di Scienze Veterinarie dell'Università degli Studi di Torino e allevatori avicoli.

Il contatto indica se le operazioni vengono svolte in assenza di animali, a distanza da essi, se è presente un contatto solo con le feci o direttamente con i broiler. Le ore di lavoro sono state classificate in meno di 2, tra 2 e 4, tra 4 e 6 e superiori a 6. L'utilizzo di DPI si riferisce a mascherina, occhiali protettivi e guanti. Il numero di animali attribuiti ad ogni operatore è classificato da meno di 20.000, tra 20 e 40.000, tra 40 e 60.000 o superiori a 60.000.

Score	Contatto	Ore di lavoro	DPI (mascherina, guanti e occhiali)	Quantità di animali per operatore
1	Operazioni svolte in assenza di animali	<2	3 su 3	<20.000
2	Operazioni svolte a distanza dagli animali	2-4	2 su 3	20-40.000
3	Contatto con deiezioni	4-6	1 su 3	40-60.000
4	Contatto diretto con gli animali	>6	Nessun DPI	>60.000

Tabella 1. La tabella mostra le modalità di attribuzione dello score (da 1 a 4) ai 4 indicatori (contatto, ore di lavoro, DPI, quantità di animali per operatore).

In base a quanto riportato in letteratura e dalle *expert opinions* di veterinari pubblici, veterinari privati e docenti del Dipartimento di Scienze Veterinarie è stato inoltre attribuito un livello di importanza, in una scala di 4 valori, ai singoli criteri in base all'esposizione ad MRSA o a batteri produttori di ESBL. Il conferimento di una diversa importanza ad ogni pratica è guidato dall'intento di attribuire ad alcune un maggior "peso" nella determinazione del risultato complessivo, così che i criteri ritenuti fondamentali dal punto di vista dell'esposizione abbiano una maggiore valenza se raffrontati a quelli considerati di secondario interesse.

I valori riportati nelle *Tabelle 2 e 3* indicano l'importanza attribuita ai singoli indicatori, che varia in base alle differenti caratteristiche di trasmissione del patogeno considerato:

MRSA:

Indicatore	Importanza
Contatto	3
Ore di lavoro	4
DPI	4
Quantità di animali per operatore	1

Tabella 2 La tabella mostra l'importanza (su una scala da 1 a 4) attribuita a ciascun indicatore (contatto, ore di lavoro, DPI, quantità di animali per operatore) per quanto concerne MRSA.

Considerando che la trasmissione di MRSA può avvenire per via aerogena o per contatto diretto con gli individui portatori, si è deciso di attribuire un'importanza elevata all'utilizzo dei DPI, così come al tempo trascorso all'interno dell'allevamento e leggermente meno alla tipologia di contatto. Il numero di animali influisce in misura minore, in quanto il *reservoir* principale è costituito dall'ambiente (Richter *et al.*, 2012) (van Duijkeren *et al.*, 2016).

***E. coli* produttori di ESBL:**

Indicatore	Importanza
Contatto	4
Ore di lavoro	2
DPI	4
Quantità di animali per operatore	2

Tabella 3 La tabella mostra l'importanza (su una scala da 1 a 4) attribuita a ciascun indicatore (contatto, ore di lavoro, DPI, quantità di animali per operatore) per quanto concerne gli *E. coli* produttori di ESBL.

Anche per quanto concerne i batteri produttori di ESBL, essendo la via di trasmissione prevalente quella oro-fecale, i DPI e la tipologia di contatto costituiscono i fattori di maggiore importanza per esporsi alla loro colonizzazione (Huijbers *et al.*, 2014), mentre di secondario interesse sono il numero complessivo di animali e le ore trascorse in allevamento.

Il primo passaggio per l'applicazione del metodo FMEA consiste nel calcolo dell'RPC (*Risk Priority Code*), indicante il **livello di intensità di esposizione**. La formula utilizzata permette di considerare contemporaneamente sia il punteggio attribuito al singolo indicatore, sia la relativa importanza. L'obiettivo è dare un rilievo maggiore ai criteri ritenuti più importanti.

Viene di seguito indicata la formula per il calcolo del livello di intensità di esposizione:

$$RPC(a_i) = \text{Min}_j \left[\text{Max} \{ \text{Neg}(I(g_j)), g_j(a_i) \} \right]$$

dove:

$RPC(a_i)$ è il *Risk Priority Code* per la modalità di rischio potenziale a_i .

$I(g_j)$ è l'importanza associata a ciascun criterio g_j

$Neg(I(g_j))$ è la negazione dell'importanza associata a ciascun criterio di valutazione.

Con un'ulteriore analisi condotta sempre attraverso l'applicazione del metodo FMEA è possibile incrociare le informazioni ottenute attraverso il livello di intensità di esposizione con le prevalenze riscontrate nei broiler e nell'ambiente di allevamento. A tal fine vengono indicati gli **intervalli di prevalenza**, suddivisi in 4 livelli stabiliti basandosi sulle informazioni presenti in letteratura (Friese *et al.*, 2013) (Huijbers *et al.*, 2014). Questi livelli, riportati nella *Tabella 4*, sono stati applicati sia ad MRSA che ad *E. coli* produttori di ESBL, per i campioni ottenuti da matrici sia animali che ambientali.

Livelli	Intervalli di prevalenza
1	<20%
2	20-40%
3	40-60%
4	>60%

Tabella 4. La tabella mostra i livelli (su una scala da 1 a 4) assegnati per valutare l'esposizione sulla base delle prevalenze ottenute dai campioni prelevati da animali e ambiente.

Integrando le informazioni fornite dal livello di intensità di esposizione, dai livelli di prevalenza negli animali e nell'ambiente, si ottiene il **codice di priorità del rischio (RPC)**. Tale valore permette il confronto tra le diverse pratiche relativamente al rischio per il lavoratore di essere esposto, rispettivamente, ad MRSA e ad *E. coli* produttori di ESBL. È così possibile esprimere la "pericolosità" di un'operazione non in senso assoluto, ma relativa al confronto tra le varie operazioni svolte in allevamento al fine di stilare una graduatoria.

Una prevedibile evenienza è che due pratiche presentino il medesimo RPC. Per permettere un'ulteriore classificazione in base al rischio si applica un indicatore di "**Tie break**". Valutando sia il punteggio che l'importanza attribuiti è possibile discriminare in modo ancora più dettagliato il codice di priorità di rischio degli operatori.

4. MATERIALI E METODI

4.1 L'ALLEVAMENTO

L'allevamento oggetto di studio è stato scelto in base alle caratteristiche dell'impianto e alla collaborativa disponibilità dell'allevatore. Si tratta di un allevamento intensivo di broiler rilevato dagli attuali proprietari nel 2003, situato nel territorio di competenza dell'A.S.L. di Alessandria.

4.1.1 Caratteristiche strutturali e organizzative

L'allevamento è di proprietà di due titolari, che si avvalgono di un contratto di soccida.

Sono allevati polli da carne (specie *Gallus gallus*) Ross 308. L'allevamento può ospitare circa 87000 capi, ma solitamente nel periodo estivo il ciclo è meno fitto. Prima dello sfoltimento sono presenti 19 unità/m². Mediamente ogni ciclo ha una durata di 69 giorni e se ne completano 5 all'anno. Le femmine vengono inviate al macello a circa 31 giorni, mentre i maschi a 42-45 giorni.

L'impianto (come illustrato nella planimetria, *Figura 6*) è costituito da tre locali in cui sono allevati i broiler, numerate secondo l'ordine di costruzione: capannone 1 (lunghezza 90 m, larghezza 12 m e altezza 3,5 m), capannone 2 (120x10x3,5) e capannone 3 (150x15x3,5), la cui costruzione è stata ultimata nel 2016. Sono inoltre presenti un ufficio annesso al capannone 3 ed un edificio diviso in due distinti locali, uno adibito a ricovero di mezzi ed attrezzi, l'altro a spogliatoio. Ai lati di ciascun capannone sono presenti due silos in cui vengono stoccati i mangimi.

Ogni capannone presenta porte d'ingresso situate su entrambi i lati corti del perimetro; queste danno accesso ad un'area adibita a deposito oppure vuota, dalla quale si entra nei locali di allevamento attraverso una seconda porta. L'interno delle strutture è costituito da un'area rettangolare con fenestrature disposte a distanza regolare sui due lati lunghi. Sono presenti linee per l'alimentazione e l'abbeveraggio disposte su 3 file parallele che possono essere sollevate all'occorrenza (durante le operazioni di carico, pulizia e disinfezione, o nel caso in cui i pulcini siano alloggiati solo in una parte dello spazio disponibile). L'intero perimetro dell'allevamento è delimitato da una recinzione di circa 2 m di altezza.

L'illuminazione è artificiale ed in parte garantita anche dalla presenza di finestre sui lati perimetrali lunghi.

La ventilazione è forzata: nel capannone 3 sono presenti 4 ventilatori posti in prossimità degli angoli della struttura che attuano un'estrazione forzata dell'aria, mentre negli altri due sono presenti delle ventole alloggiare in vari settori, fissate al soffitto e inclinate verso il basso, che possono lavorare a 4 valori di velocità. L'apertura delle finestre e l'azionamento dei ventilatori sono regolati automaticamente in base ai parametri registrati all'interno del locale da specifiche sonde. Nei capannoni 1 e 2 i ventilatori possono spostare dai 9000 ai 36000 m³ di aria all'ora. Nel terzo capannone i ventilatori sono regolati su 24-26 Pa.

Il riscaldamento è apportato da lampade a gas, che vengono messe in funzione nei primi giorni di vita dei pulcini. Durante le altre fasi del ciclo di allevamento possono inoltre essere azionati dei generatori d'aria calda.

La lettiera è costituita da lolla di riso, sterilizzata a vapore dal fornitore.

Per quanto riguarda l'alimentazione, il mangime viene interamente acquistato da una ditta esterna. Si somministra il mangime "Polli prestarter veg sbriciolato" per i primi 10 giorni di allevamento, contenente gli additivi nicarbazina (50 mg) e narasin (50 mg), coccidiostatici con tempo di sospensione di 1 giorno. Per il periodo compreso tra l'11° e il 28° giorno si utilizza il mangime "Polli starter veg sbriciolato" che presenta identiche concentrazioni di nicarbazina e narasin. L'ultimo alimento utilizzato è "Polli crescita veg pellet", dal 29° giorno fino al termine del ciclo, contenente salinomicina sodica (70 mg), anch'esso coccidiostatico ma con tempi di sospensione prima della macellazione di 0 giorni (Commissione Europea, 2017).

Per la disinfezione, come stabilito dal Regolamento aziendale, viene utilizzato uno tra i seguenti prodotti: Delegol, Glutarsan, Neopresidan, Quatersan, Sanajod e Virkon S.

La densità di animali in allevamento, come stabilito dal D.L. n. 181 del 27/09/2010, è di 33 kg/m², con deroga a 42 kg/m² limitatamente al capannone 3.

Per quanto concerne la lotta contro gli infestanti, sono presenti barriere costituite da reti anti-passero in corrispondenza delle fenestrate. Una ditta esterna si occupa della derattizzazione. Non sono presenti dispositivi per la lotta biologica contro gli insetti.

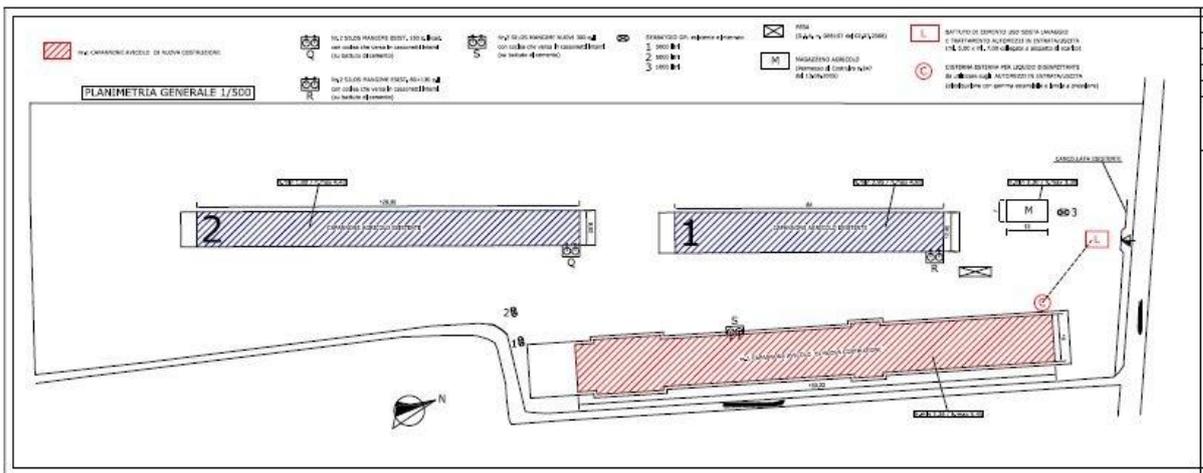


Figura 6. Planimetria dell’impianto.

4.1.2 Registro dei farmaci e vaccinazioni

Si è consultato il Registro dei farmaci per ricostruire quali principi attivi siano stati utilizzati nella storia dell’allevamento e, in particolare, durante i cicli produttivi considerati per il campionamento. Si è analizzata la Denuncia dei trattamenti immunizzanti eseguiti in incubatoio per verificare le vaccinazioni eseguite prima dell’ingresso in allevamento.

4.2 INTERVISTA SEMI-STRUTTURATA

In data 11/10/2018 è stata registrata e trascritta, assieme alla Dott.ssa Marta Bottino, borsista del Dipartimento di Scienze Veterinarie, un’intervista semi-strutturata agli allevatori. Nel corso di questo colloquio sono state poste domande riguardanti le caratteristiche e la gestione generale dell’allevamento, l’organizzazione del lavoro al suo interno, la frequenza e le modalità di utilizzo dei farmaci e il grado di consapevolezza riguardo al problema dell’antibiotico-resistenza.

4.3 CAMPIONAMENTO

Sono stati prelevati campioni da animali e ambiente durante le diverse fasi di allevamento, successivamente sottoposti ad analisi di laboratorio per ricercare la presenza di MRSA e batteri produttori di ESBL.

Tutti i campioni raccolti sono stati trasportati ai laboratori entro 24 ore dal prelievo degli stessi, mantenuti a temperatura di circa 4° C all'interno di un contenitore frigorifero trasportabile.¹

I diversi campioni sono stati identificati mediante un codice univoco trascritto al momento del prelievo sull'apposita etichetta presente su ciascun tampone o contenitore sterile utilizzato.

4.3.1 Campioni animali

Per quanto riguarda i campioni effettuati sugli animali, l'intento prefissato è stato quello di rilevare la presenza dei patogeni considerati. La numerosità campionaria è stata scelta utilizzando il programma WinEpi.net (<http://www.winepi.net/>) e impostando come ricerca: Sample size → *Detection of disease*. Considerando una popolazione di circa 87000 broiler, con un livello di confidenza del 95%, con una prevalenza attesa del 10% e con un errore ammesso (α) del 5%, sono risultati necessari 29 campioni (come illustrato nella *Tabella 5*), arrotondati a 30.

Confidence level % :	95%
Population size :	87000
Expected minimum prevalence (%) :	10.00%

N. of infected animals to detect :	8700
Needed sample size :	29
Sampling fraction :	0.03%

Tabella 5. La tabella mostra i parametri impostati sul programma WinEpi.net per la determinazione della numerosità campionaria.

Sono stati eseguiti 10 prelievi per ogni capannone. All'interno dei locali, gli animali sono stati testati in egual numero tra maschi e femmine e scelti in modo casuale all'inizio, al centro e al termine del capannone, con l'intento di fornire un risultato rappresentativo della situazione reale.

Questa operazione è stata svolta sia per MRSA che per batteri produttori di ESBL, per un totale di 60 campioni animali per ogni fase. Per i batteri produttori di ESBL si è scelto di eseguire un tampone cloacale, mentre per MRSA uno cutaneo, in corrispondenza della

¹ Frigorifero passivo portatile Bravo 32, Gio'Style.

piega dell'ala. Inizialmente si era ipotizzato di eseguire un tampone da sacco vitellino, fegato e intestino sui pulcini di un giorno per il rilevamento di ESBL, con una tecnica appresa presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta. Successivamente, non avendo riscontrato in letteratura sufficienti dati a sostegno di tale ricerca, si è preferito procedere con un tampone cloacale anche in tali soggetti.

4.3.2 Campioni ambientali

I campioni ambientali si possono suddividere in tamponi superficiali e campioni di lettiera.

- I **tamponi superficiali** sono stati ottenuti attraverso il medesimo tampone sterile con terreno di trasporto², campionando 5 superfici selezionate in ogni capannone. Le aree prescelte, mantenute costanti in ogni giornata di campionamento, sono state individuate sul perimetro della struttura, subito al di sotto delle finestre, in prossimità dei due estremi dell'allevamento e al centro dello stesso (come indicato nella *Figura 7*). Mantenendo in posizione sulla superficie da campionare una cornice in cartoncino di 20x25 cm, si è proceduto al passaggio del tampone con movimenti ondulatori per 10 volte, in modo da includere l'intera superficie a disposizione. Di volta in volta ruotando leggermente il tampone, si è ripetuta tale operazione per le 5 superfici selezionate. Per ogni fase di campionamento sono stati raccolti 6 tamponi (3 per MRSA e 3 per batteri produttori di ESBL), 2 in ogni capannone.
- I **campioni di lettiera** sono stati raccolti in provette sterili³ solamente per la ricerca di *E. coli* produttori di ESBL da lettiera pulita (T0) e da lettiera sporca a fine ciclo, prima del carico degli animali per il macello (T5). Questi campioni sono costituiti da 5 g di lettiera, pool a sua volta composto dalla somma di 5 prelievi eseguiti in diversi punti della struttura (come mostrato nella *Figura 7*), localizzati alle estremità e al centro del capannone stesso. I campioni di lettiera raccolti sono stati 3 per ogni fase ove fosse previsto, uno per ciascun capannone.

² Sterile transport swabs, MicroBiotech SRL, Via A. Tamborino, 73024 Maglie (LE)- Italy

³ Centrifuge tubes, 50 ml conical, Jet biofil®, CFT-011-500

I punti in cui sono stati prelevati i campioni all'interno di ogni capannone sono illustrati nella *Figura 7*, realizzata attraverso il software "Sweet Home 3D" (www.sweethome3d.com).

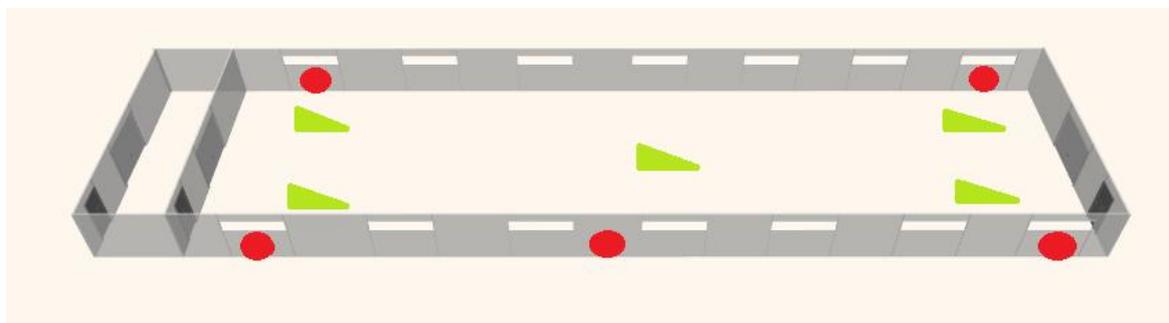


Figura 7. La figura rappresenta i punti prescelti per l'esecuzione dei campionamenti ambientali, costituiti da tamponi superficiali (cerchi rossi) e campioni di lettiera (triangoli verdi).

Legenda:

- : tamponi di superfici ambientali
- ▲ : campioni di lettiera

4.3.3 Studio sugli allevatori

Ai due allevatori sono stati recapitati tamponi e provette sterili da parte del Laboratorio analisi chimico-cliniche e microbiologiche del Presidio ospedaliero di Tortona (Azienda Sanitaria Locale di Alessandria). Gli operatori hanno fornito i propri tamponi nasali e campioni fecali in due occasioni: in data 05/06/2019 e 30/08/2019. I campioni sono successivamente stati trasportati, all'interno del contenitore frigorifero, al Laboratorio succitato e processati, con rilascio di regolare referto, per la ricerca rispettivamente di MRSA (tamponi nasali) e batteri produttori di ESBL (campioni fecali).

4.3.4 Schema di campionamento in allevamento

È stato predisposto uno schema generale di campionamento, illustrato nella *Tabella 6*.

Fase	Momento produttivo	Campioni ambientali		Campioni animali	
		MRSA	ESBL	MRSA	ESBL
T0	Dopo la preparazione dei box		3 (lettiera)		
T1	Pulcini di 1 giorno di età	3 (superfici)	3 (superfici)	30	30
T2	Broiler di età inferiore a 20 giorni	3 (superfici)	3 (superfici)	30	30
T3	Broiler di età superiore a 20 giorni	3 (superfici)	3 (superfici)	30	30
T4	Dopo il carico degli animali		3 (lettiera)		

Tabella 6. Schema esplicativo del campionamento eseguito in allevamento.

Tale schema è stato applicato nelle seguenti occasioni:

- **Fase T2: 15/01/2019.** Gli individui presentavano 6 giorni di età.
- **Fase T3: 11/02/2019.** I soggetti presentavano 33 giorni di età ed erano appartenenti allo stesso ciclo di allevamento dei broiler selezionati in fase T2.
- **Fase T4: 04/03/2019.** Il carico degli animali era avvenuto il giorno stesso del campionamento.
- **Fasi T0 e T1: 25/03/2019.** I campionamenti sono stati eseguiti rispettivamente prima dell'arrivo dei pulcini e immediatamente dopo. L'unica eccezione è rappresentata dal capannone 2, nel quale è stato eseguito un campione di lettiera nonostante fossero già presenti alcuni animali accasati il giorno 21/3/2019. Il campionamento sui pulcini è stato eseguito prelevando gli individui direttamente dalle cassette utilizzate per il trasporto, prima del contatto con l'ambiente di allevamento.

Tali operazioni hanno richiesto circa 3 ore ciascuna (9:00-12:00) e i campioni sono stati trasportati nella stessa giornata presso il Laboratorio di microbiologia dell'Università degli Studi di Torino.

4.4 ANALISI DI LABORATORIO

4.4.1 Analisi su campioni ambientali e animali

I protocolli utilizzati per l'isolamento e l'identificazione di MRSA e batteri produttori di ESBL sono protocolli sperimentali messi a punto dal personale del Laboratorio Diagnostico di Microbiologia del Dipartimento di Scienze Veterinarie dell'Università degli Studi di Torino (in particolare, dalla Dott.ssa Maria Cristina Stella e dalla Dott.ssa Miryam Bonvegna) basandosi su metodi validati presenti in letteratura.

Le analisi, alle quali ho partecipato, sono state eseguite dalla Dott.ssa Miryam Bonvegna, Dottoranda del Dipartimento di Scienze Veterinarie.

Analisi per la ricerca di MRSA

Per quanto riguarda la ricerca di MRSA, il protocollo si basa sul Report EFSA per la ricerca armonizzata di MRSA negli alimenti e in animali produttori di alimenti (EFSA, 2012) e un articolo (Böcher *et al.*, 2008).

Sono stati eseguiti i seguenti passaggi:

- Arricchimento: il tampone è stato sottoposto ad arricchimento in 4 ml di *Tryptone soy broth* (TSB) addizionato con cefoxitina (3,5 mg/l), aztreonam (20 mg/l) (Sigma-Aldrich s.r.l., Milano) e NaCl al 2,5%. L'aztreonam è stato diluito in 1 ml di PBS (*Phosphate buffered saline*) e filtrato attraverso una pipetta dotata di filtro con pori da 22 µm. Questo passaggio seleziona per MRSA ed altri batteri resistenti, tra i quali Stafilococchi coagulasi-negativi (CONS) ed Enterococchi (EFSA, 2012).
- Incubazione in oscillatore: dopo 10 minuti il tampone è stato rimosso e la provetta è stata incubata in oscillatore (Infors AG, Bottmingen) a 37±1 °C per 18-24 ore.

- Semina: sono stati prelevati 50 µl di surnatante con un tampone sterile e sono stati seminati con un'ansa sterile da 10 µl ognuno in mezza piastra di MSAm-FOX.⁴
- Semina aggiuntiva: è stato utilizzato come indagine supplementare, limitatamente alle colonie cresciute su MSAm-FOX relative alla prima giornata di campionamento (T2), un terreno Brilliance MRSA 2 agar (*Oxoid Microbiology Products*), selettivo per MRSA (*mecA* e *mecC*) e un'ulteriore semina su terreno agar sangue per osservare la morfologia e l'emolisi.
- Incubazione in termostato: le piastre sono state incubate in termostato (PID System) a 37±1°C per 24-48 ore.
- Sono stati eseguiti il test della catalasi e la colorazione di Gram sulle colonie compatibili con *S. aureus*.

Analisi per la ricerca di *E. coli* produttori di ESBL

Per il rilevamento di *E. coli* produttori di ESBL è stato seguito il protocollo DTU (Bortolaia and Hendriksen, 2018), con eccezione della modifica della temperatura di incubazione (da 44° C ± 0.5°C a 37° C ±1° C).

Sono stati eseguiti i seguenti passaggi:

- Arricchimento: il tampone è stato posto in una provetta contenente 225 ml di *Peptone water* (*Oxoid Microbiology Products*).
- Incubazione in oscillatore: la provetta è stata incubata in oscillatore (Infors AG, Bottmingen) a 37±1° C per 18-22 ore.
- Semina: successivamente sono stati prelevati con un tampone sterile (tampone in legno con punta in cotone, Enrico Bruno s.r.l., Torino) 10 µl di materiale e poi seminati con ansa sterile su una piastra MacConkey 3 agar (*Oxoid Microbiology Products*) addizionata con 1mg/l di cefotaxime (Sigma-Aldrich s.r.l., Milano). La resistenza a cefotaxime è indicativa della presenza di batteri produttori di ESBL e/o AmpC β-lattamasi (C. Dierikx *et al.*, 2013).
- Semina aggiuntiva: in parallelo con la metodica che prevede il solo utilizzo di cefotaxime e limitatamente ai campioni ottenuti al momento T2, è stato utilizzato

⁴ MSAm-FOX: Mannitol Salt Agar modificato, contenente 6% di NaCl e cefoxitina (3,5 mg/l) (*Oxoid Microbiology Products*). L'MSA è stato prodotto utilizzando d-mannitolo (Sigma-Aldrich s.r.l., Milano), NaCl, rosso fenolo (Sigma-Aldrich s.r.l., Milano), estratto di carne e peptone.

un misto di cefalosporine di III generazione e aztreonam⁵, al fine di confrontare le due tecniche. Non sono state evidenziate differenze nell'analisi dei risultati ottenuti con questa variante.

- Incubazione in termostato: le piastre sono state incubate per 18-22 ore ad una temperatura di 37° C.
- Seconda semina: le colonie cresciute nella prima semina compatibili con *E. coli* sono state riseminate su McConkey 3 agar (Oxoid Microbiology Products) addizionato con 1mg/l di cefotaxime (Sigma-Aldrich s.r.l., Milano) per mantenere la pressione selettiva.
- Per la conferma fenotipica della presenza di ESBL è stato eseguito il Combination Disc Test con cefpodoxime (Oxoid Microbiology Products).

Campioni di lettiera

Dai campioni di lettiera sono stati ricercati solamente *E. coli* produttori di ESBL. È stato prelevato 1 g di materiale e addizionato a 9 ml di Peptone water. Il composto è stato mixato e centrifugato nell'oscillatore (Infors AG, Bottmingen) per almeno 18 ore a 220 rpm e 37° C. dopo aver vortexato, il surnatante è stato prelevato con un'ansa da 10 µl e una da 1 µl per la semina rispettivamente nei diversi terreni sopra descritti.

Ricerche molecolari

Sia per gli *E. coli* che per gli Stafilococchi sono state selezionate 1-2 colonie, a partire dalle colture risultate fenotipicamente compatibili, per l'estrazione del DNA. Le colonie sono state trasferite con un'ansa in 1 ml di PBS, poi centrifugato 10 minuti a 13500 rpm. È stato eliminato il surnatante e sono stati aggiunti 100 µl di acqua sterile deionizzata. Dopo essere stati miscelati con il vortex, sono stati inseriti nel Thermoblock® (EuroClone) a 95°C per 8 minuti e successivamente congelati a -20°C.

Successivamente sono state condotte le seguenti indagini molecolari:

- per quanto concerne MRSA, sono stati ricercati i geni *mecA*, *nuc* e *16s*, utilizzando il gene 16S come controllo di estrazione.

⁵ Il misto di cefalosporine di III generazione e aztreonam (ESBL ChromoSelect Agar supplement, Sigma-Aldrich s.r.l.) contiene ceftazidime (1,5 mg), cefotaxime (1,5 mg), ceftriaxone (1 mg), aztreonam (1 mg) e fluconazolo (5 mg).

- per quanto riguarda gli Enterobatteri produttori di ESBL, sono stati ricercati i geni *blaSHV* e *blaCTX-M*.

Sono stati impostati i seguenti parametri (Nebbia *et al.*, 2014) per le analisi con termociclatore (Bio-Rad):

Gene		x 35			
		Denaturazione	Annealing	Estensione	
16s (500 pb)	95°C x 1'	95°C x 20"	59°C x 20"	72°C x 15"	72°C x 5'
<i>mecA</i> (527 pb)	95°C x 1'	95°C x 20"	50°C x 20"	72°C x 15"	72°C x 10'
<i>blaCTX-M</i> (593 pb)	95°C x 1'	95°C x 20"	60°C x 20"	72°C x 15"	72°C x 5'
<i>blaSHV</i> (867 pb)	95°C x 1'	95°C x 20"	48°C x 20"	72°C x 15"	72°C x 5'

Successivamente è stata eseguita l'elettroforesi su gel d'agarosio, che è stato preparato partendo da 3 g di agarosio (Sigma-Aldrich s.r.l.) miscelato a 150 ml di TAE.

Dopo l'elettroforesi, il gel è stato trasferito in bromuro di etidio e dopo circa mezz'ora è stato esposto a luce ultravioletta in un transilluminatore UV (Bio-Rad) per la lettura dei risultati.

4.4.2 Analisi su campioni umani

Le analisi sono state eseguite presso il Laboratorio analisi chimico-cliniche e microbiologiche dell'Ospedale "SS Antonio e Margherita" di Tortona (Azienda Sanitaria Locale di Alessandria). I procedimenti seguiti, gentilmente forniti dal Dott. Angelo Salerno, sono stati:

- Per la semina dei **tamponi nasali** è stato utilizzato un terreno agar sangue CNA (agar Columbia arricchito con sangue di montone al 5%, acido nalidixico e colistina) selettivo per Gram positivi, in particolare Stafilococchi, Streptococchi emolitici ed Enterococchi. È stata eseguita una semina su MSA e incubazione per 24-48 ore a 37° C.

- Per il trattamento dei **campioni fecali** è stato eseguito un arricchimento in MacConkey broth per la selezione degli Enterobatteri, seguito da un'incubazione di 24 ore a 37° C. È stata poi eseguita una semina di 50 µl di sospensione su una piastra cromogena (agar miscelato con antibiotici) selettiva per Enterobatteri produttori di ESBL, seguita da una seconda semina di 50 µl di sospensione su un'altra piastra cromogena (agar addizionato con ertapenem 0,5 mg) selettivo per la crescita di enterobatteri produttori di carbapenemasi.

Identificazione ed antibiogramma sono stati ottenuti attraverso il sistema automatizzato VITEK® della BioMerieux.

Nel referto sono stati indicati gli antibiotici testati nell'antibiogramma con l'indicazione di "resistente" (R) o "sensibile" (S) e delle relative MIC del microrganismo. La MIC (*minimal inhibitory concentration*) rappresenta la maggiore diluizione di farmaco in grado di inibire la crescita di un microrganismo (Carli *et al.*, 2009).

4.5 Criteri di ricerca bibliografica

Il lavoro di ricerca è stato condotto attraverso articoli scientifici, libri di testo, documenti, report e pubblicazioni di organizzazioni internazionali (EFSA, EMA, OIE, WHO) e nazionali (Ministero della Salute, Regione Piemonte).

Le pubblicazioni scientifiche sono state ricercate su PubMed impostando come criteri di ricerca "MRSA AND poultry AND farmers" ed "ESBL AND poultry AND farmers", con ultimo aggiornamento ad agosto 2019. Sono stati scelti articoli riportanti data di pubblicazione compresa negli ultimi 10 anni, con particolare attenzione per quelli condotti all'interno dell'Unione Europea. Alcune pubblicazioni sono state consultate in quanto oggetto di citazione o riferimento bibliografico all'interno di un articolo.

Sulla base dei risultati ottenuti dall'analisi dei campioni, sono successivamente stati impostati come ulteriori criteri di ricerca su PubMed "S. lentus AND poultry", "S. sciuri AND poultry", "S. lentus AND mecA", "S. sciuri AND mecA".

5. RISULTATI E DISCUSSIONE

5.1 Risultati

5.1.1 Registro dei farmaci

È stato consultato il Registro dei farmaci. Durante il primo ciclo oggetto di campionamento sono stati eseguiti i seguenti trattamenti, come illustrato nella *Tabella 7*:

Data	Principio attivo	Denominazione commerciale	Posologia	Diagnosi	Capannoni	Numero animali
15/01/2019- 20/01/2019	doxiciclina	Doxipan	18g/100L	patologie setticemiche	Cap. 3	43000
28/01/2019- 02/02/2019	doxiciclina	Doxipan	18g/100L	patologie setticemiche	Cap. 1-2	39000
05/02/2019- 10/02/2019	amoxicillina	Amoxifarma	50 g/100L	patologie setticemiche	Cap. 3	42900

Tabella 7. La tabella illustra i trattamenti somministrati durante il primo ciclo di allevamento considerato.

Durante il secondo ciclo considerato sono stati impiegati i seguenti farmaci, come illustrato nella *Tabella 8*:

Data	Principio attivo	Denominazione commerciale	Posologia	Diagnosi	Capannoni	Numero animali
22/03/2019- 27/03/2019	doxiciclina	Doxipan	18g/100L	patologie setticemiche	Cap.2	22000
04/04/2019- 09/03/2019	doxiciclina	Doxipan	18g/100L	patologie setticemiche	Cap.3	44000
10/04/2019- 15/04/2019	doxiciclina	Doxipan	18g/100L	patologie setticemiche	Cap.1	18000

Tabella 8. La tabella illustra i trattamenti somministrati durante il secondo ciclo di allevamento considerato.

Durante il ciclo successivo è stato eseguito un solo trattamento: nel periodo compreso tra 30/05/2019 e 03/06/2019 è stato somministrato Doxipan, posologia 18 g x 100 l, in

seguito a diagnosi di patologie enteriche. Il trattamento è stato eseguito sui polli allevati all'interno del capannone 2 (22000 capi).

Consultando il registro per quanto riguarda i periodi precedenti risultano, a partire dal 2014 (*Tabella 9*):

Anno	Mese	Principio attivo	Denominazione commerciale	Capannoni
2014	agosto	ossitetraciclina		tutti
	novembre	amoxicillina	Amoxi-One	tutti
2015	febbraio	“terapia antibiotica”		Cap. 1-2
	settembre	“terapia antibiotica”		Cap. 1
	dicembre	enrofloxacina	Baytril	tutti
2016	marzo	amoxicillina	Amoxi-one	tutti
	luglio	amoxicillina	Amoxi-one	tutti
	ottobre	amoxicillina	Amoxi-one	tutti
	dicembre	amoxicillina	Amoxi-one	tutti
2017	marzo	tiamfenicolo		Cap. 3
	aprile	enrofloxacina	Baytril	tutti
	agosto (inizio)	amoxicillina	Spramox	Cap. 2-3
	agosto (fine)			Cap. 3
	ottobre	amoxicillina		
2018	febbraio (inizio)	levofloxacina		tutti
	febbraio (metà)	sulfadiazina-trimetoprim	Trimethosulfa	tutti
	aprile	“terapia antibiotica”		Cap. 2
	settembre	sulfametazina-sulfadimetossina-trimetoprim	Doxatrim	tutti

Tabella 9. La tabella illustra i trattamenti eseguiti in allevamento a partire dal 2014.

Secondo quanto riportato dagli allevatori, in passato sono stati ampiamente utilizzati in allevamento tetracicline e cloramfenicolo.

Caratteristiche e indicazioni terapeutiche dei farmaci utilizzati in allevamento.

Si riportano alcune indicazioni estratte dal foglietto illustrativo dei farmaci utilizzati durante i primi due cicli di allevamento, durante i quali sono stati raccolti i campioni da animali e ambiente.

- **Doxipan** 800 mg/g, busta da 1 kg, polvere solubile per uso in acqua da bere. Principio attivo: **doxiciclina** cloridrato. Indicazioni terapeutiche per polli da carne: trattamento della malattia cronica respiratoria causata da germi sensibili alla doxiciclina quali *E. coli*, *Ornithobacterium rhinotracheale*, *Pasteurella multocida*, *Mycoplasma gallisepticum*, *Mycoplasma synoviae*. Indicazioni terapeutiche per vitelli e suini: Infezioni da Gram positivi e Gram negativi sensibili alla doxiciclina, localizzate e/o setticemiche: bronchiti, broncopolmoniti, complicanze batteriche delle virosi respiratorie, pasteurellosi, gastroenteriti, enteriti, colibacillosi, poliartriti settiche, infezioni podali, metriti, mastiti acute e subacute, ferite settiche sostenute da *Bacillus anthracis*, *Corynebacterium* spp., *Erysipelothrix rhusiopathiae*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp., *Actinobacillus* spp., *Bordetella* spp., *Brachispira* spp., *Brucella* spp., *Haemophilus* spp., *Leptospira* spp., *Pasteurella multocida*, *Treponema* spp. e Micoplasmi.
- **Amoxifarma** 800 mg/g, polvere solubile per uso in acqua da bere. Principio attivo: **amoxicillina** triidrato. Indicazioni terapeutiche per polli da carne, tacchini e suini: batteri Gram positivi e Gram negativi sensibili all'amoxicillina, in particolare infezioni sostenute da *Pasteurella multocida*, *Ornithobacterium rhinotracheale*, *Bordetella avium*, *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, *Erysipelothrix rhusiopathiae*: colibacillosi, salmonellosi, stafilococcosi e streptococcosi, mal rossino e sindrome MMA del suino, infezioni dell'apparato respiratorio, infezioni dell'apparato gastro-enterico, infezioni urinarie, infezioni genitali, infezioni cutanee, infezioni articolari, terapia della clostridiosi da *Clostridium perfringens*.

5.1.2 Utilizzo di additivi nei mangimi

Sono sistematicamente somministrati mangimi contenenti **coccidiostatici ionofori**, in particolare narasin (fino al 28° giorno di allevamento) e successivamente, fino al termine del ciclo, salinomicina. Tali prodotti sono classificati come additivi per mangimi. Secondo l'OIE, rientrano anche tra i *Veterinary Highly Important Antimicrobials* (VHIA) negli animali; rientrano in un livello ancora superiore, ossia quello di *Veterinary Critically Important Antimicrobials* (VCIA), specificatamente in avicoltura per il loro ruolo cruciale nel controllo della coccidiosi (OIE, 2013). Tali principi attivi vengono utilizzati esclusivamente in medicina veterinaria, in particolare lo ionoforo narasin è autorizzato per l'impiego su avicoli e bovini e la salinomicina su avicoli, bovini, conigli e suini. I coccidiostatici ionofori sono ampiamente utilizzati nei mangimi per la produzione di broiler e tacchini.

In merito alla salinomicina, in una *scientific opinion* dell'EFSA si legge che tale coccidiostatico presenta un'attività antimicrobica selettiva nei confronti di alcuni Gram positivi, mentre le *Enterobacteriaceae* sono resistenti. Gli Enterococchi potrebbero sviluppare resistenza alla salinomicina, la quale non è però associata a cross-resistenza ad antibiotici impiegati in medicina umana o veterinaria. È quindi improbabile che la salinomicina causi resistenza e cross-resistenza ad antibiotici (Rychen *et al.*, 2017).

In ogni caso alcuni Stati membri, quali la Svezia, hanno approntato programmi di sorveglianza per individuare eventuali incrementi di resistenza agli antimicrobici legati all'uso di coccidiostatici, ma finora non si è osservata alcuna conseguenza imputabile all'utilizzo di questi additivi (Commissione delle Comunità Europee, 2003).

Nel Manuale di buone pratiche veterinarie redatto dalla Regione Piemonte (Regione Piemonte, 2010a) si consiglia comunque di privilegiare la vaccinazione contro i coccidi all'utilizzo di coccidiostatici nel mangime.

5.1.3 Vaccinazioni

Consultando la Denuncia dei trattamenti immunizzanti eseguiti in incubatoio, sono risultati sistematici gli interventi vaccinali per l'immunizzazione nei confronti di: Bronchite infettiva aviare, Malattia di Gumboro, Pseudopeste aviare e Malattia di Marek.

I prodotti utilizzati sono stati, durante il periodo oggetto di campionamento: Vaxxitek HVT+IBD, Nobilis IB Primo QX, Hatchpak IB H120 e Hatchpak Avinew. Con il variare dell'incubatoio di provenienza, nei cicli di allevamento successivi sono stati utilizzati: Nobilis IB 4-91, Nobilis IB MA5, Innovax-ND-IBD. Durante i cicli oggetto di campionamento non sono stati eseguiti richiami all'interno dell'allevamento per la Malattia di Gumboro (pratica eseguita in alcune occasioni durante i cicli precedenti) né per altre patologie.

5.1.4 Analisi di laboratorio

Ricerca di MRSA

Come primo passaggio è stata osservata la crescita di colonie dall'aspetto compatibile con *S. aureus* su terreno MSA (addizionato con sale e cefoxitina). Le colonie si presentavano gialle, tondeggianti e circondate da un alone di fermentazione giallo (come mostrato nella *Figura 8*).

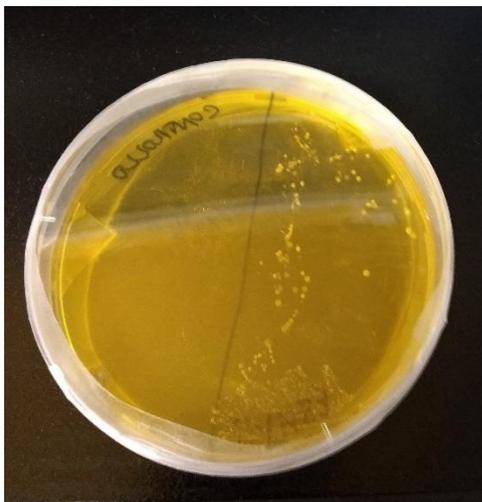


Figura 8. La figura mostra la crescita di colonie di Stafilococchi su un terreno MSA addizionato con cefoxitina seminato a partire da campioni di origine animale.

Per quanto riguarda la prima giornata di campionamento (15/01/2019), eseguita in fase T2 su pulcini di 6 giorni di età, le piastre che hanno presentato crescita di colonie compatibili con MRSA sono state: 7 nel capannone 1, 7 nel capannone 2 e 3 nel capannone 3, per un totale di 17 positività su 30 campioni. La prevalenza, con un intervallo di confidenza del 95%, è del **56,67 %** (95% CI [37,42%, 74,53%])⁶. I 3

⁶ Gli intervalli di confidenza per le prevalenze sono stati calcolati attraverso il software R.

campioni ambientali, rappresentativi dei relativi capannoni, sono risultati anch'essi positivi (positività: 3/3).

Al momento T3 (11/02/2019) il campionamento è stato eseguito su individui di 33 giorni di età. Le positività rilevate alla prima indagine sono le seguenti: 6 nel capannone 1, 8 nel capannone 2 e 8 nel capannone 3. Da ciò risulta che in totale 22 campioni su 30 sono risultati positivi e la prevalenza è del **73,33 %** (95% CI [54,11%, 87,72%]). Anche in questo caso i 3 campioni ambientali sono risultati positivi (positività: 3/3).

Nella fase T1 (25/03/2019) i campioni sono stati eseguiti su pulcini di 1 giorno appena prima di essere accasati in allevamento. Non è stata rilevata alcuna positività sugli animali (**0%** di prevalenza, con 95% CI, [0,00%, 11,57%]), mentre nei tamponi ambientali collezionati si sono riscontrate positività solamente nei capannoni 1 e 3 (positività: 1/3). L'unico tampone ambientale risultato negativo è il capannone 2, nel quale erano stati accasati alcuni pulcini 4 giorni prima.

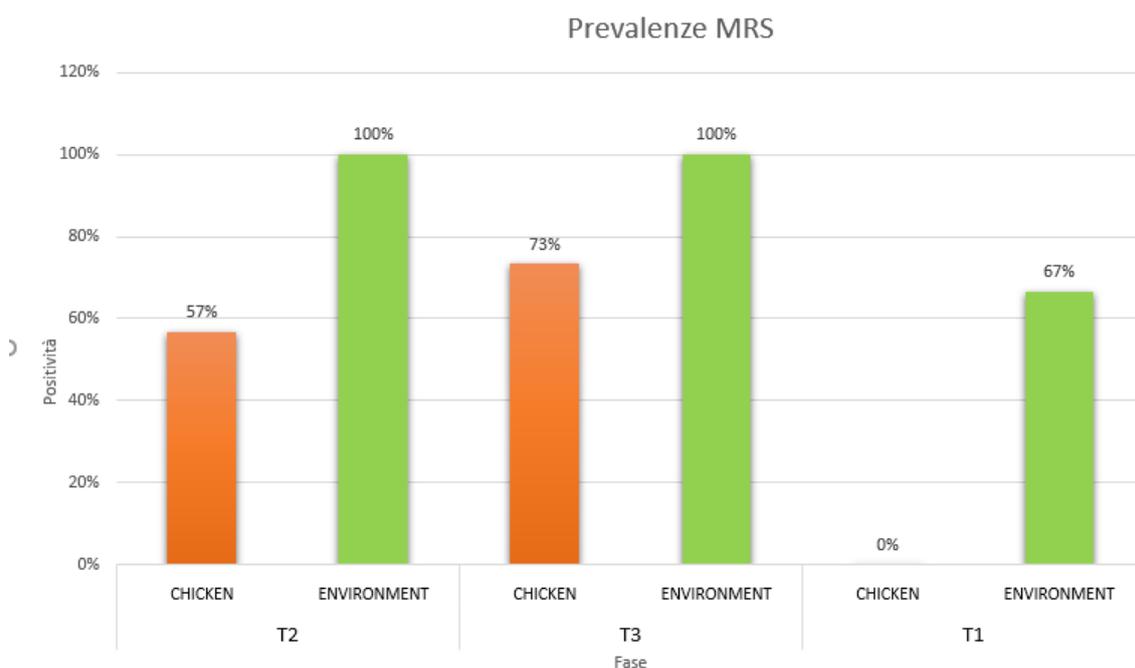


Figura 9. Il grafico mostra le prevalenze di MRS, divise per fasi, nei broiler (*chicken*) e nell'ambiente (*environment*).

Procedendo con le analisi, le colonie cresciute su terreno MSA modificato che apparivano fenotipicamente compatibili con *S. aureus* si sono rivelate negative al test della coagulasi. Tra le colonie individuate sono stati scelti alcuni campioni sui quali procedere con analisi più approfondite, in particolar modo il sequenziamento e la PCR.

Al sequenziamento, eseguito su 7 campioni appartenenti alla fase T3, è emersa la presenza di 6 *Staphylococcus lentus* e di 1 *Staphylococcus sciuri*. Analogamente, un campione ambientale della fase T1 è risultato essere *Staphylococcus lentus*. Si tratta di Stafilococchi coagulasi-negativi (CoNS).

Sono stati inoltre ricercati tramite PCR la presenza dei geni *nuc*, *16S* e *mecA* sui 7 campioni animali precedentemente sequenziati, su altri 6 campioni animali e su 1 campione ambientale provenienti dalla fase T2 e su 1 campione ambientale ottenuto in fase T3. Tali campioni (15 in tutto) sono risultati positivi al gene *16S* (indica che si tratta effettivamente di un batterio), negativi al gene *nuc* (specifico per *S. aureus*) e positivi al gene di resistenza *mecA* (come mostrato nella *Figura 10*).

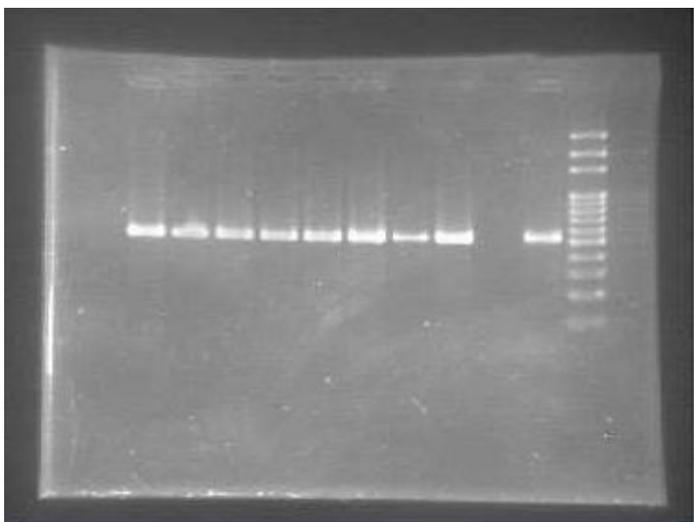


Figura 10. L'immagine mostra i risultati della PCR per la ricerca del gene *mecA* (527 pb): gli 8 campioni testati (le prime colonne, partendo da sinistra) sono positivi; nelle colonne successive sono presenti, in ordine, il controllo negativo, il controllo positivo e il marker.

Ricerca di *E. coli* produttori di ESBL.

Gli *E. coli* produttori di ESBL sono stati ricercati attraverso la semina sul terreno MacConkey 3 agar addizionato con cefotaxime, selettivo per la crescita di batteri produttori di ESBL o AmpC β -lattamasi (come mostrato nella *Figura 11*).

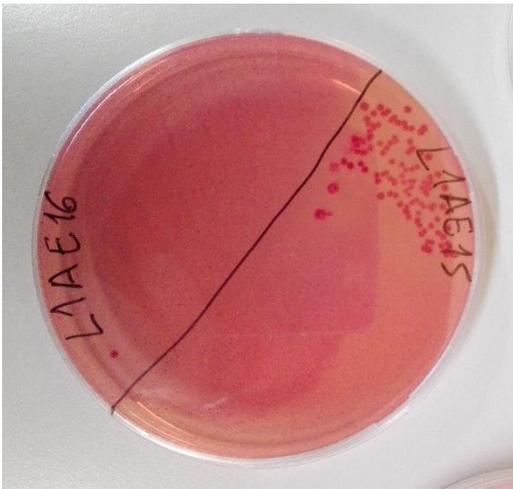


Figura 11. La figura mostra la crescita di colonie di *E. coli* produttori di ESBL in uno dei campioni animali, seminato nella parte destra della piastra.

In fase T2, su pulcini di 6 giorni, è stata rilevata la crescita di colonie in una piastra seminate con materiale proveniente dal capannone 1, in nessuna piastra ottenuta dal campionamento nel capannone 2 e in 6 piastre riconducibili al capannone 3. La prevalenza in fase T2 è quindi del **23,3%** (95% CI [9,93%, 42,28%]). Un tampone ambientale prelevato dal capannone 3 è inoltre risultato positivo (positività: **1/3**).

Per quanto riguarda la fase T3 (broiler di 33 giorni), è stata evidenziata solo la presenza di una positività animale nel capannone 1, con una prevalenza quindi del **3,3%** (95% CI [0,08%, 17,22%]), e nessuna positività sui campioni ambientali (positività:**0/3**).

In fase T1 (pulcini di 1 giorno) non è stata rilevata alcuna crescita, con una prevalenza quindi dello **0%** negli animali (95% CI [0,00%, 11,57%]) e non è stata riscontrata alcuna positività nell'ambiente (positività: **0/3**).

Non è stato inoltre evidenziato alcun risultato sulle piastre approntate a partire dai campioni di lettiera, né prima dell'accasamento dei pulcini in fase T0 (positività: **0/3**), né al termine del ciclo in fase T4 (positività:**0/3**), immediatamente dopo il carico dei broiler per il macello.

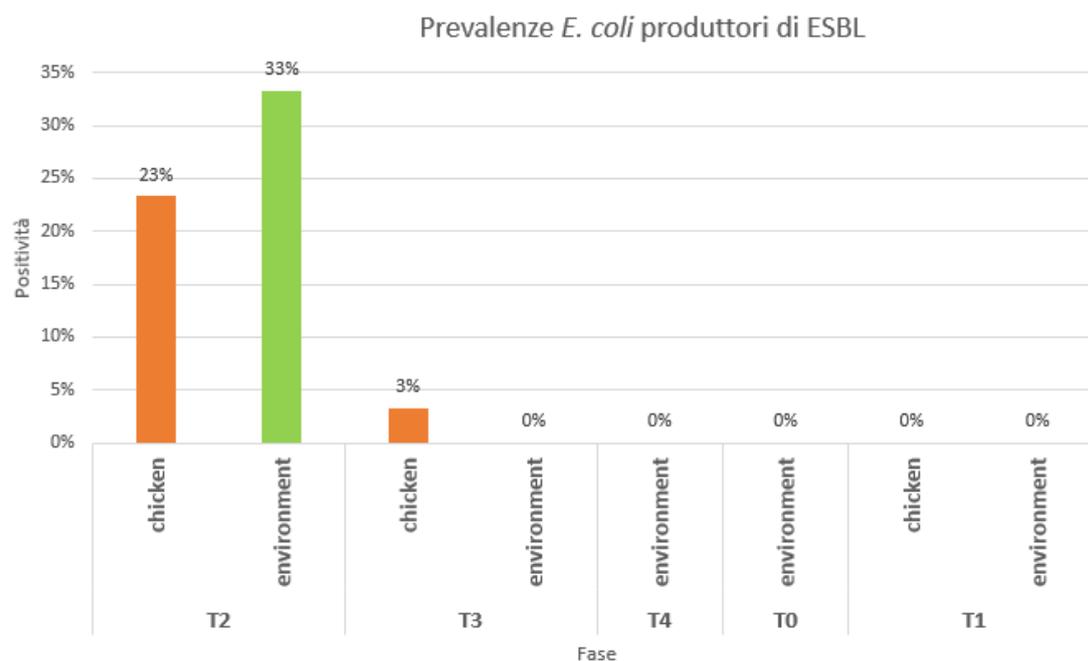


Figura 12. Il grafico mostra le prevalenze di *E. coli* produttori di ESBL, divise per fasi, nei broiler (*chicken*) e nell'ambiente (*environment*).

I campioni sono successivamente risultati positivi al Combination Disc Test con cefpodoxime (Oxoid Microbiology Products) per la conferma fenotipica della presenza di batteri produttori di ESBL (come illustrato nella Figura 13).



Figura 13. La figura mostra la conferma fenotipica della presenza di batteri produttori di ESBL al Combination Disc Test per due campioni prelevati da broiler.

Sono stati in seguito testati alcuni campioni tra quelli risultati positivi per la crescita su MacConkey 3 agar (fenotipicamente positivi per la presenza di ESBL) per la ricerca dei geni *bla*CTX-M e *bla*SHV.

Per quanto riguarda *bla*CTX-M, sono stati testati 3 campioni della fase T2 (tra i quali l'unico campione ambientale risultato positivo), e l'unico campione positivo proveniente dalla fase T3. Tutti e 4 sono risultati portatori del gene *bla*CTX-M.

Per *bla*SHV sono stati testati gli stessi campioni, e solo uno è risultato positivo: il campione ambientale della fase T2.

Questo è risultato positivo sia per *bla*CTX-M che per *bla*SHV ed è inoltre l'unico campione ambientale risultato positivo nell'intera ricerca di ESBL; proviene dal capannone 3.

Ricerca di MRSA ed *E. coli* produttori di ESBL sui lavoratori

I due allevatori sono stati testati per la ricerca di MRSA attraverso un tampone nasale ed Enterobatteri produttori di ESBL all'interno di un campione fecale. Il primo prelievo è stato eseguito in data 05/06/2019 e in tale occasione gli allevatori sono risultati negativi per entrambe le ricerche.

Le analisi effettuate sul secondo prelievo invece, eseguito in data 30/08/2019, hanno riportato esito negativo per la ricerca di Enterobatteri, ma è risultata una positività in un lavoratore per la ricerca di *Staphylococcus aureus*. È stato successivamente eseguito l'antibiogramma su tale matrice, dal quale sono emerse la sensibilità all'oxacillina (MIC=2) e, di conseguenza, alla meticillina; è risultato sensibile ad acido fusidico, ceftarolina, daptomicina, gentamicina, resistenza inducibile alla clindamicina, mupirocine, rifampicina, tigeciclina, trimetoprim/sulfametossazolo e vancomicina. **Il batterio è invece risultato resistente alla clindamicina (MIC >2), all'eritromicina (MIC <4), alla levofloxacina (MIC =4), alla penicillina G (MIC=0,25), alla tetraciclina (MIC >8) e al linezolid (MIC >4).** L'antibiogramma è stato valutato in base al nuovo sistema di Breakpoint stabilito da EUCAST a gennaio 2019.

La positività riscontrata solamente alla seconda analisi può far supporre almeno tre ipotesi. Una possibilità è che si sia verificato un difetto nella raccolta stessa del primo campione, ragione per cui agli operatori sono successivamente state illustrate le corrette modalità per l'esecuzione del successivo tampone nasale. Un'altra ipotesi nasce dalla considerazione che durante la prima raccolta dei campioni l'allevamento fosse vuoto dal 23/05/2019 (quindi da 13 giorni) e l'ultima disinfezione fosse stata eseguita il giorno 27/05/2019 (9 giorni prima), mentre nella seconda occasione fossero presenti animali in

allevamento. In letteratura (Goerge *et al.*, 2017) è riportata la possibilità di una contaminazione da *S. aureus* resistente a livello nasale, intesa come colonizzazione transitoria, strettamente associata alla continua esposizione alla fonte del patogeno stesso e probabilmente contratta ad ogni ciclo successivo. Questo presupporrebbe che il tempo intercorso tra l'ultimo contatto con la fonte dell'infezione e il prelievo sia stato sufficiente a determinare una negativizzazione nell'operatore. Tale spiegazione, se applicata al caso specifico, risulta poco probabile in quanto si tratta senza dubbio di un contatto prolungato e ripetuto, non occasionale, ed in questi casi una "decolonizzazione" spontanea risulta molto difficile. La terza ipotesi consiste nel fatto che il lavoratore effettivamente non presentasse alcuno *S. aureus* meticillino-sensibile in occasione delle prime analisi, e quindi la colonizzazione sia avvenuta nel periodo intercorso tra l'esecuzione dei due tamponi.

5.1.5 Attività e comportamento del personale

Il personale, dopo essersi cambiato con abiti da lavoro all'interno dello spogliatoio dedicato, come prima operazione della giornata lavorativa controlla se siano necessari interventi manutentivi e verifica il corretto funzionamento degli impianti.

L'abbigliamento da lavoro consiste in pantaloni lunghi, scarpe antinfortunistiche o stivali, guanti da lavoro multiuso. Le calzature non vengono cambiate per ogni capannone, ma sono presenti vasche contenenti disinfettanti all'ingresso di ogni diversa struttura.

Analisi delle pratiche osservate

L'analisi di tali pratiche costituisce la base per comprendere l'esposizione dei lavoratori al pericolo. I dati raccolti attraverso l'osservazione di tali pratiche (e, in alcune occasioni, la partecipazione ad esse) sono poi stati analizzati secondo il metodo FMEA.

- 1) Preparazione dei box. La lolla di riso è sterilizzata dalla ditta produttrice. Viene scaricata da un camion direttamente all'interno del capannone. Viene stesa attraverso un trattore dotato di pala e successivamente livellata attraverso un rastrello. Tale pratica, quando è stata osservata, ha coinvolto due operatori.
- 2) Scarico dei pulcini. Per lo scarico dei pulcini di 1 giorno gli allevatori possono gestirsi autonomamente o richiedere la collaborazione di altri operatori; nel

momento in cui è stata osservata, tre operatori hanno partecipato, due dei quali erano collaboratori esterni. I pulcini provengono dal medesimo incubatoio e arrivano in contenitori da 110 individui in inverno e da 90-100 in estate, già divisi per sesso e di un peso minimo garantito di 30 g. Le casse in materiale plastico vengono scaricate dal camion con un muletto e il contenuto è manualmente riversato nella zona predisposta all'accasamento. Tale area corrisponde ad una porzione, circa 1/3 dello spazio disponibile nella struttura, delimitata da reti di circa 60 cm di altezza. L'ambiente viene precedentemente preparato all'introduzione dei pulcini: si accendono i dispositivi di riscaldamento a gas e l'alimento è distribuito su strisce di carta disposte longitudinalmente, mantenute per i primi 3-4 giorni di allevamento, prima dell'entrata in funzione della linea di alimentazione automatica.

- 3) Pesatura. La prima pesatura è automatica, avviene per mezzo di una bilancia per camion e si ottiene facendo la tara con l'automezzo stesso. Successivamente tali operazioni vengono svolte manualmente in modo regolare ogni settimana, per poi susseguirsi con maggiore frequenza all'avvicinarsi della data di carico. Durante tale pratica 5 broiler vengono caricati in una cassetta collegata ad una pesa a orologio. All'interno di ogni capannone si effettuano 6 pesate: 2 all'inizio, 2 al centro e 2 in fondo alla struttura.
- 4) Rimozione degli animali morti. Tale pratica viene ripetuta in ognuno dei capannoni dalle due alle tre volte al giorno, a seconda del momento del ciclo produttivo. Durante tale operazione si percorre più volte l'area di allevamento e le carcasse vengono raccolte manualmente, caricate su una carriola all'interno del capannone e portate nel congelatore adibito a questo utilizzo (la cui temperatura è di -20° C) per poi essere smaltite come materiale di categoria 2 da una ditta incaricata.
- 5) Fresatura della pollina. Le operazioni di fresatura della pollina vengono eseguite una volta ogni settimana (due volte verso la fine del ciclo) attraverso uno specifico macchinario in grado di smuovere, girare e spianare contemporaneamente la lolla. Durante tale fase è necessario un solo operatore, alla guida del mezzo.
- 6) Manutenzione. Solitamente consiste in piccole operazioni di riparazione delle linee di alimentazione e abbeveraggio svolte all'interno dei locali in cui sono alloggiati gli animali, oppure in operazioni svolte all'esterno, prevalentemente sui silos. È stata osservata in occasione della riparazione di una componente della linea di alimentazione.

7) Carico dei broiler. Il carico degli animali a fine ciclo richiede solitamente l'ausilio di altri operatori. Per eseguire questa pratica è utilizzato uno specifico macchinario cingolato (Super Apollo 2500) che convoglia i broiler su un nastro trasportatore fino all'interno di gabbie composte da 5 moduli in materiale metallico, poste sul retro del macchinario stesso. Sul mezzo cingolato trovano posto due gabbie, mentre un operatore sul muletto si occupa per tutta la durata delle operazioni di prelevare le gabbie cariche di animali, portarle all'esterno del locale e sostituirle con quelle vuote. Al termine di questa fase tutte le gabbie vengono caricate tramite un muletto sul camion diretto al macello. Le operazioni si svolgono in ambiente quasi del tutto privo di illuminazione (è presente una lampada solo sul macchinario cingolato), preferibilmente di sera.

Il carico delle femmine è stato osservato a 33 giorni di allevamento; erano presenti 5 operatori per il carico di 5 000 animali. Prima dell'inizio della fase di carico vera e propria, uno dei lavoratori si è occupato dello scarico delle gabbie vuote dal camion. Per l'intera durata della procedura due lavoratori sono rimasti a bordo del macchinario cingolato, uno alla guida del muletto per il trasporto delle gabbie, mentre gli altri due hanno svolto operazioni di convogliamento dei broiler sul nastro trasportatore. Per quanto concerne l'utilizzo dei DPI, i guanti sono stati indossati solamente dai lavoratori a bordo dell'Apollo 2500, con il compito di guidare il macchinario stesso e convogliare i polli all'interno delle gabbie.

Il carico dei maschi, svolto a 50 giorni di allevamento, ha coinvolto 20 000 individui e tre operatori, con modalità sovrapponibili a quanto osservato per il carico delle femmine.

8) Rimozione della pollina. Questa pratica è svolta al termine di ogni ciclo e si esegue inizialmente attraverso un trattore dotato di pala; il materiale residuo è poi allontanato tramite scope. Solitamente coinvolge due operatori, come osservato in questa specifica occasione.

9) Pulizia dei contenitori del cibo. Tale operazione viene svolta manualmente, ad ogni variazione del mangime somministrato e al termine del ciclo di allevamento, scollegando i silos dal resto della linea di alimentazione e facendo cadere per gravità i residui di mangime ancora contenuti all'interno dei silos stessi. È stato osservato al termine del ciclo di allevamento.

10) Lavaggio. Strutture, attrezzature e superfici sono lavati con acqua ad alta pressione. Tale operazione è stata svolta da un singolo lavoratore. Le strutture

sono lavate partendo dal soffitto, procedendo lungo le superfici declivi, le linee di abbeveraggio e di alimentazione, per terminare con il pavimento.

- 11) Disinfezione. Le stesse azioni eseguite nella fase di lavaggio vengono ripetute durante la disinfezione. Il prodotto utilizzato in soluzione acquosa durante l'operazione osservata è Virkon S. La pratica è stata svolta da due operatori che indossavano mascherine protettive. La fase successiva è la fumigazione con formaldeide, su superfici ancora umide.

I dati ottenuti dall'osservazione di ogni pratica sono stati utilizzati per valutare il **livello di intensità di esposizione** dei lavoratori (vedi cap. 3.2.1). I risultati ottenuti sono esposti nella *Tabella 10*.

Pratica	Contatto	Ore di lavoro	DPI	Quantità di animali per operatore	Livello di esposizione	
					MRS	<i>E. coli</i> ESBL
Preparazione box	1	2	4	1	2	1
Scarico pulcini	4	1	4	2	1	3
Raccolta animali morti	4	1	3	2	1	3
Manutenzione	2	1	3	2	1	2
Fresatura pollina	3	1	4	2	1	3
Pesa	4	1	4	2	1	3
Carico femmine (A)	2	1	4	1	1	2
Carico femmine (B)	2	1	3	1	1	2
Carico maschi	2	2	4	1	2	2
Rimozione pollina	3	2	4	1	2	3
Lavaggio capannone	1	3	4	1	2	1
Disinfezione capannone	1	1	3	1	1	1
Pulizia contenitori cibo	1	1	4	1	1	1

Tabella 10. Calcolo del livello di intensità di esposizione relativo ad ogni pratica, relativi ad MRS ed *E. coli* produttori di ESBL.

Nonostante l'intento iniziale fosse di rilevare MRSA (e conseguentemente le prevalenze siano state pensate per questo patogeno, secondo quanto disponibile in letteratura), le analisi hanno rivelato invece la presenza di altri Stafilococchi, in particolare Stafilococchi coagulasi-negativi (CoNS). Sulla base delle informazioni reperite in letteratura, considerando che il gruppo dei CoNS è frequentemente riscontrato nell'ambito dell'allevamento avicolo, in alcuni casi in percentuali superiori rispetto a *S. aureus* stesso, si è deciso di considerare sostanzialmente sovrapponibili le dinamiche di trasmissione e di conseguenza le prevalenze, mantenendo quindi tali *range* per l'applicazione a quanto rilevato. Si è pensato di riferire i risultati ottenuti in un'accezione più ampia agli "Stafilococchi meticillino-resistenti (MRS)".

I risultati ottenuti attraverso la metodica FMEA per *E. coli* produttori di ESBL ed MRS non sono direttamente raffrontabili tra loro, ma il confronto è possibile solamente tra le varie pratiche valutate per l'esposizione al medesimo patogeno.

La pratica "Raccolta degli animali morti" è stata osservata in due occasioni differenti del ciclo produttivo, senza alcuna rilevante differenza nell'esecuzione della stessa e di conseguenza nella valutazione dei vari parametri.

Durante l'operazione "Carico delle femmine" alcuni operatori non indossavano DPI (A), altri solamente i guanti protettivi (B).

Questi risultati sono stati successivamente raffrontati con le prevalenze ottenute in allevamento per ottenere l'RPC (*Risk Priority Code*), come illustrato nella *Tabella 11*.

Per quanto riguarda le prevalenze ambientali e sui broiler che non sono state ricercate in questo studio, si è scelto di non inserire alcun dato e di considerare per il calcolo dell'RPC finale solamente il livello di esposizione. Non si è infatti ritenuto opportuno basarsi in modo arbitrario sui valori rilevati in fasi precedenti o successive, oppure sulle prevalenze riportate in letteratura.

Pratica	Livello di esposizione	Prevalenza nei broiler	Prevalenza ambientale	RPC (MRS)
Preparazione box	2			2
Scarico pulcini	1	1	4	1
Raccolta animali morti (<20 giorni)	1	3	4	1
Manutenzione (<20 giorni)	1	3	4	1
Fresatura pollina (<20 giorni)	1	3	4	1
Raccolta animali morti (>20 giorni)	1	4	4	1
Pesa (>20 giorni)	1	4	4	1
Carico femmine (A)	1	4	4	1
Carico femmine (B)	1	4	4	1
Carico maschi	2	4	4	2
Rimozione pollina	2	4	4	2
Lavaggio capannone	2			2
Disinfezione capannone	1			1
Pulizia contenitori cibo	1			1

Tabella 11. La tabella mostra il *Risk priority code* (RPC) per MRS.

Pratica	Livello di esposizione	Prevalenza nei broiler	Prevalenza ambientale	RPC (E. coli ESBL)
Preparazione box	1	1	1	1
Scarico pulcini	3	1	1	1
Raccolta animali morti (<20 giorni)	3	2	2	2
Manutenzione (<20 giorni)	2	2	2	2
Fresatura pollina (<20 giorni)	3	2	2	2
Raccolta animali morti (>20 giorni)	3	1	1	1
Pesa manuale animali (>20 giorni)	3	1	1	1
Carico femmine (A)	2	1	1	1
Carico femmine (B)	2	1	1	1
Carico maschi	2	1	1	1
Rimozione pollina	3	1	1	1
Lavaggio capannone	1			1
Disinfezione capannone	1			1
Pulizia contenitori cibo	1			1

Tabella 12. La tabella mostra il Risk Priority Code (RPC) per *E. coli* produttori di ESBL.

L'ultimo passaggio per poter ulteriormente discriminare il codice di priorità del rischio durante le diverse pratiche e rendere più dettagliata questa suddivisione è l'applicazione del “**Tie-break**”, indicato dalle lettere maiuscole poste a fianco dell'RPC.

Viene di seguito riportata la “classifica” delle pratiche ordinate a partire da quella a rischio maggiore per il lavoratore di entrare in contatto con gli elementi di resistenza a quella che presenta un rischio minore (Tabella 13 e Tabella 14).

Pratica	MRS
Rimozione pollina	2 _A
Carico maschi	2 _B
Lavaggio capannone	2 _C
Preparazione box	2 _D
Scarico pulcini	1 _A
Pesa	1 _A
Raccolta animali morti	1 _B
Fresatura pollina	1 _B
Manutenzione	1 _C
Carico femmine (A)	1 _D
Carico femmine (B)	1 _E
Pulizia contenitori cibo	1 _E
Disinfezione capannone	1 _F

Tabella 13. La tabella illustra le pratiche lavorative ordinate secondo la “pericolosità” per quanto riguarda gli Stafilococchi meticillino-resistenti.

Pratica	E. coli ESBL
Raccolta animali morti (<20 giorni)	2 _A
Fresatura pollina	2 _A
Manutenzione	2 _B
Scarico pulcini	1 _A
Pesa	1 _A
Raccolta animali morti (>20 giorni)	1 _B
Rimozione pollina	1 _B
Carico maschi	1 _C
Lavaggio capannone	1 _D
Carico femmine (A)	1 _E
Preparazione box	1 _E
Carico femmine (B)	1 _F
Pulizia contenitori cibo	1 _G
Disinfezione capannone	1 _H

Tabella 14. La tabella illustra le pratiche lavorative ordinate secondo la “pericolosità” per quanto riguarda gli *E. coli* produttori di ESBL.

Queste liste indicano la “pericolosità” relativa delle pratiche in base sia al livello di esposizione che alle prevalenze riscontrate su ambiente e animali. Per quanto concerne gli Stafilococchi meticillino-resistenti, maggiormente a rischio sono risultate, nell’ordine: la rimozione della pollina, il carico dei maschi, il lavaggio del capannone e la preparazione del box. Quelle meno “rischiose” sono invece la pulizia dei contenitori del cibo e la disinfezione del capannone.

Per quanto riguarda invece gli *E. coli* produttori di ESBL, le pratiche risultate maggiormente importanti per l’esposizione occupazionale sono la raccolta degli animali

morti, la fresatura della pollina e la manutenzione; mentre sono state classificate come relativamente trascurabili la pulizia dei contenitori del cibo e la disinfezione del capannone.

Dal confronto emerge che, per entrambi i rischi individuati, ricoprono un ruolo secondario le operazioni di disinfezione del capannone, la pulizia dei contenitori del cibo e anche il carico delle femmine. Per quanto riguarda invece le pratiche risultate al vertice delle scale, si sono riscontrate incongruenze imputabili in particolar modo alle diverse prevalenze.

5.2 Discussione

5.2.1 Pratiche lavorative

Per quanto riguarda le pratiche lavorative osservate, l'utilizzo di Dispositivi di Protezione Individuale è l'unico indicatore al quale è stato attribuito il massimo livello di importanza (livello 4) in entrambe le scale di valutazione, essendo emerso dagli studi presenti in letteratura il loro ruolo nella protezione dell'operatore dalla contaminazione sia da MRS che da batteri produttori di ESBL.

È l'unico indicatore inoltre sul quale gli operatori possono efficacemente agire nella quotidianità, determinando allo stesso tempo una diminuzione del rischio di entrare a contatto con elementi di resistenza. Provando ad analizzare pratiche risultate più "a rischio" nelle quali non erano stati indossati DPI, quali per esempio lo scarico dei pulcini e la fresatura della pollina per batteri produttori di ESBL, si nota come vi sia un notevole calo nel livello di intensità di esposizione (da 3 a 1) solamente ipotizzando che gli operatori utilizzassero tutti i Dispositivi di Protezione Individuale raccomandati. Questo risultato è dovuto proprio alla grande importanza attribuita al loro utilizzo per contrastare le dinamiche di trasmissione del patogeno.

In quest'ambito l'INAIL ha proposto alcuni suggerimenti (<https://lavoratoriamr.it>) basati sul progetto "Realizzazione di un network finalizzato alla comunicazione e riduzione del rischio di diffusione dell'antimicrobico-resistenza nei lavoratori esposti" (BRIC1. Responsabile Scientifico: Professor Alessandro Mannelli, 2018). Tali informazioni sono rivolte in particolare ai lavoratori del comparto avicolo e suinicolo con l'intento di contrastare il rischio di entrare in contatto con batteri antibiotico-resistenti. Attraverso

alcuni video esplicativi vengono illustrate le procedure che maggiormente espongono gli allevatori a questo rischio e gli accorgimenti che è possibile adottare per evitare il contatto e la successiva colonizzazione con questi elementi di resistenza. È ribadito il ruolo imprescindibile di una corretta procedura per il lavaggio delle mani, preferibilmente utilizzando asciugamani monouso di carta e allestendo punti di lavaggio nei vari settori dell'allevamento.

Il set di DPI consigliato nello specifico agli allevatori di broiler per lo svolgimento della maggior parte delle attività lavorative comprende:

- Guanti da lavoro multiuso;
- Mascherina antipolvere ad elevata capacità di filtraggio;
- Cuffia o berretto;
- Tuta da lavoro che copra completamente le braccia;
- Stivali o scarpe antinfortunistiche;
- Occhiali protettivi.

Indicazioni aggiuntive sono riservate ad alcune specifiche fasi. Per quanto riguarda la raccolta degli animali morti, risultata tra l'altro di notevole importanza nel corrente studio per il rischio di trasmissione di *E. coli* produttori di ESBL, si consiglia di ricorrere a guanti dedicati specificatamente a questa mansione e di dotare ogni capannone di un relativo contenitore per la raccolta dei cadaveri. Per il lavaggio e la disinfezione dei capannoni sono indicate inoltre una tuta impermeabile e una maschera che protegga completamente il viso.

Il fine è fornire agli allevatori informazioni corrette sul rischio di AMR e allo stesso tempo indicare strategie applicabili nella pratica lavorativa quotidiana. L'obiettivo è contrastare tale rischio non solo in ambito zootecnico ma, in un'accezione più ampia, in funzione della salvaguardia della salute pubblica.

5.2.2 *E. coli* produttori di ESBL

In alcuni campioni è stato rilevato il gene *blaCTX-M*. Nei primi anni 2000 si è assistito ad una rapida diffusione in tutto il mondo, tra gli ESBL, degli enzimi CTX-M in quella che viene denominata "pandemia di CTX-M". I batteri produttori di CTX-M risultano spesso co-resistenti agli aminoglicosidi e ai fluorochinoloni. Inizialmente era in grado di

conferire resistenza a cefotaxime, mentre aveva una bassa capacità di idrolizzare il ceftazidime. Oggi invece più del 60 % delle varianti di CTX-M conferiscono resistenza ad entrambi (Cantón, González-Alba and Galán, 2012).

È stato rilevato anche il gene *blaSHV*. Nonostante *blaCTX-M* costituisca la tipologia di ESBL più diffusa, i geni SHV (in particolare SHV-12) sono considerati importanti agenti di infezioni nosocomiali soprattutto in molti Paesi asiatici e dell'Europa meridionale (Alonso *et al.*, 2017). In uno studio il gene *blaSHV-12* è stato rilevato prevalentemente in associazione con plasmidi IncII, facilmente trasferibili attraverso coniugazione. In aggiunta, questa associazione è stata trovata solamente nei polli o nelle carni derivate (Alonso *et al.*, 2017), il che suggerisce una possibile correlazione tra questo elemento di resistenza e gli avicoli.

In uno studio tedesco è stata rilevata un'alta prevalenza (il 43,9 % dei campioni analizzati) di *E. coli* produttori di ESBL in carne di pollo proveniente da punti di vendita al dettaglio, molti dei quali presentavano i geni *blaCTX-M* e *blaSHV-12* (Kola *et al.*, 2012).

I risultati indicano la probabile introduzione di elementi di resistenza attraverso gli animali. Per quanto concerne la **diminuzione nella prevalenza di *E. coli*** produttori di ESBL dalla fase T2 alla fase T3, con successivo mancato rilevamento nella fase T4, è possibile una spiegazione. Tra le due date di campionamento i broiler avevano subito tre trattamenti antibiotici, ciascuno della durata di 5 giorni: un primo trattamento a base di doxiciclina e un secondo di amoxicillina sul capannone 3, un solo trattamento a base di doxiciclina sui restanti capannoni. Tutti i capannoni risultano quindi trattati con doxiciclina. L'amoxicillina è attiva contro *E. coli*, ma non contro i produttori di ESBL, per cui non dovrebbe aver influito sulla loro prevalenza.

La doxiciclina è una tetraciclina teoricamente attiva contro *E. coli* produttori di ESBL, anche se numerosi studi attestano la presenza di resistenze nei confronti di questo antibiotico (Wu *et al.*, 2018). È stata utilizzata in tutti i capannoni e il suo impiego può aver agito contro i batteri resistenti rilevati durante il primo campionamento. Nella seconda giornata di campionamento è stata riscontrata solamente una positività alla ricerca di *E. coli* resistenti, che potrebbe rappresentare un segnale della presenza di un numero limitato di *E. coli* resistenti alla doxiciclina.

5.2.3 Stafilococchi meticillino-resistenti

Sulla base dei dati raccolti, è possibile ipotizzare che i pulcini, al momento del loro arrivo dall'incubatoio, presentino una bassa prevalenza di Stafilococchi meticillino-resistenti. Il riscontro della presenza nell'ambiente dei patogeni, nonostante il periodo di vuoto biologico e sanitario siano stati rispettati, fa supporre che la trasmissione agli animali sia inizialmente determinata dall'esposizione all'ambiente. La presenza di Stafilococchi è infatti stata riscontrata, al momento dell'accasamento, nei due capannoni che si presentavano vuoti, mentre non è stata rilevata nell'unico locale in cui i pulcini erano già accasati da 4 giorni. Sono diversi i fattori che possono aver determinato una contaminazione dell'ambiente dopo le operazioni di pulizia e disinfezione ed in assenza di animali: è possibile che i patogeni siano rimasti, nonostante le operazioni stesse, oppure che si sia verificata una ri-contaminazione attraverso l'aria, la nuova pollina introdotta o il personale che ha avuto accesso ai locali. È possibile che successivamente questi batteri si diffondano tra gli animali, fino a raggiungere livelli sempre maggiori.

Alcuni campioni provenienti dai broiler e dall'ambiente di allevamento sono risultati portatori di **Stafilococchi coagulasi-negativi (CoNS)**. I CoNS, tradizionalmente considerati non o poco patogeni, rappresentano oggi una delle più importanti cause di infezioni nosocomiali, soprattutto sostenute da *S. epidermidis* e *S. haemolyticus*. Questi patogeni opportunisti colonizzano cute e mucose di animali e uomo, preferibilmente le zone più umide, incluse le narici, *habitat* preferenziale di *S. aureus* (Becker, Heilmann and Peters, 2014). Sono particolarmente implicati in infezioni conseguenti ad introduzione o impianto di protesi.

L'isolamento dei CoNS, come per gli altri Stafilococchi, avviene in coltura con agar sangue contenente al 5% sangue defibrinato di pecora o cavallo. La maggior parte dei CoNS cresce in 18-24 ore. Solitamente i CoNS sono Gram positivi, catalasi-positivi, coagulasi-negativi e anaerobi facoltativi. La maggior parte è anche ossidasi-negativa, ma un'eccezione è rappresentata dal gruppo "Sciuri", in cui rientrano *S. sciuri* e *S. lentus*, che sono invece ossidasi-positivi. Sono solitamente associati in paia o tetradi, ma possono anche essere presenti singolarmente, disposti in grappoli o a formare corte catene di 3 o 4 cellule. In coltura le colonie appaiono non pigmentate, intere, opache, lisce e lucenti. Colonie grigiastre, giallo-grigie o giallo arancioni sono caratteristiche, tra gli altri, anche

di *S. sciuri*. (Becker, Heilmann and Peters, 2014) *S. sciuri* e *S. xylosus* sono i CoNS più frequentemente isolati negli animali (Poli *et al.*, 2017).

I CoNS sembrano avere una tendenza alla resistenza a diversi antibiotici superiore se paragonati a *S. aureus*, e ceppi multi-resistenti sono isolati con frequenza sempre maggiore. In uno studio condotto in Polonia nel 2015 su cuore, fegato, articolazioni tarsali e midollo osseo di avicoli con segni di patologia, il 44,4 % dei campioni risultati positivi a *S. lentus* presentava resistenza ad almeno 5 agenti antimicrobici, soprattutto a enrofloxacin, doxiciclina, trimetoprim/sulfametossazolo, lincomicina, spectinomicina e tilosina. (tho Seeth, Hoedemaker and Krömker, 2015)

L'importanza dei CoNS risiede anche nella possibilità di trasmettere il gene di resistenza *mecA* ad uno *S. aureus* meticillino-sensibile, determinando quindi l'acquisizione di resistenza. *S. sciuri* può presentare una cassetta cromosomica SCC*mec* ospitante il gene *mecA* tipico di MRSA. Si pensa che i CoNS siano i maggiori reservoir di SCC*mec*, dal momento che più del 70% dei CoNS isolati da pazienti negli USA sono meticillino-resistenti, mentre solo il 32 % degli *S. aureus* lo sono (Zhang, Agidi and Lejeune, 2009).

Il gene *mecA* codifica per la PBP2a, in grado di ridurre l'affinità con gli antibiotici β -lattamici (Becker, Heilmann and Peters, 2014). È probabile che la trasmissione del gene avvenga per via orizzontale, ma il meccanismo esatto non è ancora stato scoperto (Zhang, Agidi and Lejeune, 2009).

Il gene *mecA* è ormai indifferentemente distribuito sia tra gli Stafilococchi coagulasi-positivi che tra quelli coagulasi-negativi. Si pensa che *S. sciuri* sia un *reservoir* naturale di *mecA* ed è probabile che questo gene abbia avuto origine proprio in *S. sciuri* (Nemeghaire *et al.*, 2014) e sia successivamente stato acquisito da *S. aureus* (Becker, Heilmann and Peters, 2014) (Rolo *et al.*, 2017). In uno studio su Stafilococchi coagulasi negativi meticillino-resistenti (MR-CNS) condotto su campioni provenienti da varie matrici (suini, bovini, vitelli in allevamento, polli al macello, latte, veterinari, allevatori, macellatori), 30 dei 38 isolati di *S. lentus* erano di origine avicola (polli al macello), mentre i restanti 8 sono stati identificati su personale dei macelli. 6 *S. sciuri* su 135 totali appartenevano a carni avicole (Huber *et al.*, 2011).

In uno studio condotto in Belgio, le prevalenze di *S. sciuri* resistente alla meticillina (31,3%, in percentuali simili tra allevamenti di broiler e ovaiole) sono risultate molto superiori a quelle riscontrate per MRSA (1,8%) (Nemeghaire *et al.*, 2014). Questo dato

può significare due fatti: o c'è una minor presenza di MRSA in allevamento avicolo, o *S. sciuri* presenta resistenza più facilmente.

Il risultato dell'antibiogramma condotto sul tampone nasale di un allevatore ha rilevato la resistenza a 4 antibiotici considerati di importanza critica in medicina umana: eritromicina, levofloxacina, penicillina G e linezolid (W H O Advisory Group on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance, 2016).

La resistenza al **linezolid** in particolare è riportata a livello mondiale con una prevalenza minore dell'1% in *S. aureus* (EFSA, 2018). Il linezolid è un antibiotico appartenente alla famiglia degli Ossazolidinoni che rappresenta oggi uno dei farmaci ai quali si ricorre come ultima risorsa in medicina umana per il trattamento di infezioni causate da batteri resistenti Gram positivi, in particolare VRE ed MRSA (Wang *et al.*, 2013). La prima resistenza al linezolid è stata rilevata in un paziente statunitense nel 2002, un anno dopo la sua autorizzazione all'uso clinico (Gu *et al.*, 2013).

La resistenza trasferibile al linezolid è fornita dal gene *cfr*, che determina resistenza a 5 diverse classi di antibiotici: fenicoli, lincosamidi (clindamicina), pleuromutiline, ossazolidinoni (linezolid) e streptogramina A. Il gene *cfr* nella maggior parte dei casi presenta un'origine plasmidica, ma può avere anche una localizzazione cromosomica (He *et al.*, 2014). *Cfr* è stato rilevato nei polli per la prima volta in Stafilococchi isolati in Cina nel 2013 (Wang *et al.*, 2013). Tra i batteri che presentano *cfr*, i CoNS sono considerati gli ospiti più comuni. I CoNS, agendo da *reservoir* per *cfr*, possono contribuire alla diffusione della resistenza ad altri Stafilococchi o addirittura ad altri generi batterici. È stata dimostrata la possibilità di trasmissione orizzontale di geni tra *S. aureus* e CoNS, a maggior ragione se essi si trovano in regioni mobili del DNA (Pyzik *et al.*, 2019), situazione in cui si trova il gene *cfr*.

In base al sequenziamento condotto sui campioni provenienti dall'allevamento, sono stati rilevati *S. lentus* e *S. sciuri* resistenti alla meticillina, ma nessuno *S. aureus*. Tali analisi sono state eseguite a campione, e quindi su un numero limitato di elementi: non è quindi possibile escludere la presenza di *S. aureus*.

Considerando invece il comune riscontro di *cfr* negli Stafilococchi coagulasi-negativi e la possibilità di trasmettere elementi genetici mobili da CoNS a *S. aureus*, è ipotizzabile che la contemporanea presenza di resistenza a linezolid e clindamicina riscontrata nell'allevatore possa essere determinata dal gene *cfr*. Si può quindi supporre che l'origine della contaminazione dell'allevatore risieda nella presenza dello stesso gene di resistenza

negli animali o nell'ambiente, ma per sostenere questa ipotesi sarebbero necessari ulteriori studi per la ricerca di *cfr* in tali matrici.

Per quanto riguarda invece gli effetti degli antibiotici utilizzati in allevamento, in alcuni studi è stata rilevata la resistenza alla doxiciclina sia in *S. aureus* che nei CoNS (tho Seeth, Hoedemaker and Krömker, 2015). La resistenza alle tetracicline è apportata da geni *tet*. Alcuni studi riportano che in numerosi ceppi di CoNS in cui è stato riscontrato il gene *mecA* sono stati trovati contemporaneamente anche geni *tet* e geni di resistenza agli aminoglicosidi. Questi geni potrebbero essere quindi localizzati sullo stesso elemento genetico o su uno associato (Pyzik *et al.*, 2019). È quindi possibile la presenza di fattori di resistenza per le tetracicline all'interno dell'allevamento, anche in associazione con i geni di resistenza alla meticillina, ma ulteriori studi dovrebbero essere condotti a sostegno di questa ipotesi.

6. CONCLUSIONI

Lo scopo di questa tesi di laurea è stato l'approfondire lo studio di alcuni meccanismi che determinano l'esposizione dei lavoratori al rischio di antibiotico-resistenza nell'ambiente zootecnico, nello specifico in un allevamento di broiler, nonché di individuare quali batteri e geni resistenti agli antibiotici fossero coinvolti.

I risultati dello studio sono indicativi di dinamiche di trasmissione che implicano la compartecipazione di numerosi fattori: l'introduzione di animali portatori di geni e batteri antibiotico-resistenti; la selezione dell'antibiotico-resistenza determinata dall'utilizzo improprio di antibatterici; la persistenza nell'ambiente di batteri resistenti, nonostante l'applicazione di procedure di pulizia, disinfezione ed il rispetto del periodo di "tutto vuoto". La colonizzazione da *S. aureus* resistente a numerosi antibiotici riscontrata in un allevatore, inoltre, rende ipotizzabile la trasmissione di tali resistenze dai broiler all'uomo.

Uno dei fattori che può aver favorito la selezione di geni e batteri resistenti all'interno dell'allevamento è il ricorso ripetuto alle terapie antibiotiche.

Tra gli obiettivi dei piani per il contrasto all'antibiotico-resistenza fondamentale è la riduzione del ricorso al farmaco in ambito zootecnico, soprattutto se utilizzato in modo improprio, come alternativa al rispetto delle buone pratiche di allevamento e alla biosicurezza aziendale.

Tale riduzione si realizza attraverso la sensibilizzazione dei Veterinari Aziendali, anche mediante l'innovazione tutta italiana della ClassyFarm, nonché con la corretta ed approfondita informazione agli allevatori, attraverso specifici corsi di formazione, previsti peraltro dalla Normativa Comunitaria sulla condizionalità degli allevamenti (Reg. UE 1306/2013).

Altro mezzo per ottenere la diminuzione del fenomeno dell'antibiotico-resistenza è l'intensificazione dell'attività di farmacosorveglianza da parte dei Veterinari Ufficiali, anche mediante lo strumento da poco introdotto della Ricetta Elettronica per la prescrizione dei medicinali veterinari, che consente un preciso controllo dei quantitativi di antibiotici prescritti e somministrati in allevamento attraverso la consultazione dei sistemi informatici.

Le analisi condotte inoltre con il fine di ottenere una stima del rischio delle varie attività lavorative specifiche dell'allevamento avicolo dimostrano che un ruolo rilevante è

assunto dal comportamento dell'operatore, in particolare nella scelta e nell'adozione dei Dispositivi di Protezione Individuali (DPI). Si prospetta fondamentale infatti, parallelamente all'attuazione di strategie per contrastare l'abuso di farmaci, anche una corretta informazione agli allevatori sull'utilizzo dei DPI, accompagnata da un più efficace controllo operato dalle Autorità Competenti.

Indicazioni importanti in questo contesto sono proposte dall'INAIL attraverso un sito web rivolto agli operatori del settore, nel quale sono consigliati i DPI adatti a prevenire il contatto con batteri antibiotico-resistenti nell'ambito delle diverse operazioni svolte in allevamento. Il fine di questi suggerimenti è informare gli allevatori sulla presenza di un rischio occupazionale legato all'AMR e sui corretti metodi per contrastare tale evenienza.

La condivisione della necessità della riduzione dell'uso degli antibiotici nella pratica zootecnica da parte degli allevatori deve avere come primario scopo la ricerca di una sicura salute dell'allevamento e in generale la tutela della sanità umana.

In ultima analisi, i risultati ottenuti in questo studio si mostrano in linea con quanto riportato in letteratura. In particolare, le resistenze riscontrate negli allevatori esposti sono probabilmente correlate, se non addirittura imputabili, a quanto rilevato negli animali e nell'allevamento.

Solamente la sinergia di più interventi mirati a ridurre la selezione di batteri resistenti, come sopra esposto, può permettere di raggiungere l'obiettivo primario di invertire il fenomeno che, a livello mondiale, sta conducendo alla perdita di efficacia di numerosi antibiotici, aggravando una situazione sanitaria che assume ogni giorno un carattere sempre più critico.

7. BIBLIOGRAFIA

- Alonso, C. A. *et al.* (2017) **'Analysis of bla SHV-12 -carrying Escherichia coli clones and plasmids from human, animal and food sources'**, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 72(6), pp. 1589–1596. doi: 10.1093/jac/dkx024.
- Ambler, R. *et al.* (1991) **'A standard numbering scheme for the Class A beta-lactamases'**, *Biochemical journal*, 276(December 1990), pp. 1990–1991.
- Apostolakos, I. *et al.* (2019) **'Assessing the occurrence and transfer dynamics of ESBL/pAmpC-producing Escherichia coli across the broiler production pyramid'**, *PLoS ONE*, 14(5), pp. 1–13. doi: 10.1371/journal.pone.0217174.
- Argudín, M. *et al.* (2017) **Bacteria from Animals as a Pool of Antimicrobial Resistance Genes**, *Antibiotics*. doi: 10.3390/antibiotics6020012.
- Baker-Austin, C. *et al.* (2006) **'Co-selection of antibiotic and metal resistance'**, *Trends in Microbiology*, 14(4), pp. 176–182. doi: 10.1016/j.tim.2006.02.006.
- 'Banca Dati Nazionale dell'Anagrafe Zootecnica istituita dal Ministero della Salute presso il CSN dell'Istituto "G. Caporale" di Teramo" (2019).
- Becker, K., Heilmann, C. and Peters, G. (2014) **'Coagulase-negative staphylococci in the Endophthalmitis Vitrectomy Study'**, *Clinical Microbiology Reviews*, 27(4), pp. 870–926. doi: 10.1128/CMR.00109-13.
- Blaak, H. *et al.* (2014) **'Detection of extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing escherichia coli on flies at poultry farms'**, *Applied and Environmental Microbiology*, 80(1), pp. 239–246. doi: 10.1128/AEM.02616-13.
- Blaak, H. *et al.* (2015) **'Distribution, numbers, and diversity of ESBL-producing E. coli in the poultry farm environment'**, *PLoS ONE*, 10(8), pp. 1–23. doi: 10.1371/journal.pone.0135402.
- Böcher, S. *et al.* (2008) **'Evaluation of four selective agars and two enrichment broths in screening for methicillin-resistant Staphylococcus aureus'**, *Journal of Clinical Microbiology*, 46(9), pp. 3136–3138. doi: 10.1128/JCM.00478-08.
- van den Bogaard, A. E. (2001) **'Antibiotic resistance of faecal Escherichia coli in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers'**, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 47(6), pp. 763–771. doi: 10.1093/jac/47.6.763.

- Van Den Bogaard, A. E., Willems, R. and London N. (2002) ‘Antibiotic resistance of faecal enterococci in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers’, *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 49, pp. 497–505. Available at: <http://jac.oxfordjournals.org/content/49/3/497.short>.**
- Borgen K., Simonsen G. S., Sundsfjord A., Wasteson Y., O. and K. H. (2000) ‘Continuing high prevalence of VanA-type vancomycin-resistant enterococci on Norwegian poultry farms three years after avoparcin was banned’, *Journal of Applied Microbiology*, 89(3), pp. 478–485. doi: 10.1046/j.1365-2672.2000.01137.x.**
- Börjesson, S. et al. (2016) ‘Limited Dissemination of Extended- Spectrum β -Lactamase- and Plasmid-Encoded AmpC- Producing Escherichia coli from Food and Farm Animals, Sweden’, 22(4).**
- Bortolaia, V. and Hendriksen, R. (2018) ‘Isolation of ESBL- , AmpC- and carbapenemase-producing E . coli from fresh meat’, (February).**
- BRIC1. Responsabile Scientifico: Professor Alessandro Mannelli (2018) ‘Realizzazione di un network finalizzato alla comunicazione e riduzione del rischio di diffusione dell’ antimicrobico-resistenza nei lavoratori esposti’.**
- Bryan-Wilson, J. (2016) ‘No time to wait’, *Artforum International*, 54(10), pp. 113–114.**
- Cantón, R., González-Alba, J. M. and Galán, J. C. (2012) ‘CTX-M enzymes: Origin and diffusion’, *Frontiers in Microbiology*, 3(APR). doi: 10.3389/fmicb.2012.00110.**
- Carli, S. et al. (2009) *Farmacologia veterinaria*, Casa editrice ‘Idelson-Gnocchi’.**
- Cassini, A. et al. (2019) ‘Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis’, *The Lancet Infectious Diseases*, 19(1), pp. 56–66. doi: 10.1016/S1473-3099(18)30605-4.**
- Castillo Neyra, R. et al. (2012) ‘Antimicrobial-resistant Bacteria: An Unrecognized Work-related Risk in Food Animal Production’, *Safety and Health at Work*. Elsevier Masson SAS, 3(2), pp. 85–91. doi: 10.5491/shaw.2012.3.2.85.**
- CE. (2003) ‘Regolamento 2003/1831/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio sugli Additivi Destinati all’Alimentazione Animale.’, 4, pp. 29–43.**
- Cerolini, S. et al. (2008) ‘Avicoltura e conigliicoltura’, *Point Vétérinaire Italie*.**

Ristampa aggiornata 2015.

Codex Alimentarius Commission (2005) ‘**Code of practice to minimize and contain antimicrobial resistance (CAC/RCP 61-2005)**’, pp. 1–15.

Codex Alimentarius Commission (2011) ‘**Guidelines for risk analysis of foodborne antimicrobial resistance (CAC/GL 77- 2011)**’, pp. 1–29.

Commissione delle Comunità Europee (2003) ‘**Relazione della Commissione al Consiglio e al Parlamento Europeo sull’utilizzo di coccidiostatici e istomonostatici quali additivi per mangimi**’.

Commissione europea (2011) ‘**Piano d’azione di lotta ai crescenti rischi di resistenza antimicrobica (AMR)**’.

Commissione europea (2013a) ‘**Decisione di esecuzione della Commissione del 12 novembre 2013 relativa ad un contributo finanziario dell’Unione a favore di un piano coordinato di controllo per la sorveglianza della resistenza agli antimicrobici negli agenti zoonotici nel 2014**’, *Gazzetta ufficiale dell’Unione europea*, pp. 40–47.

Commissione europea (2013b) ‘**Decisione di esecuzione della commissione del 12 novemvre 2013 relativa al monitoraggio e alle relazioni riguardanti la resistenza agli antimicrobici dei batteri zoonotici e commensali**’, (2011), pp. 26–39.

Commissione Europea (2017) ‘**Regolamento di Esecuzione (UE) 2017/1914 della Commissione del 19 ottobre 2017 relativo all’autorizzazione della salinomicina sodica come additivo per mangimi destinati a polli da ingrasso e pollastre destinate alla produzione di uova.**’, *Gazetta Ufficiale dell’Unione Europea*, pp. 2003–2005.

Conferenza permanente per i rapporti tra lo Stato le Regioni e le Province autonome di Trento e Bolzano (2014) ‘**Piano Nazionale della Prevenzione 2014-2018**’, *Ministero della Salute*, pp. 1–7. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.

Couto, N. et al. (2016) ‘**Trends and molecular mechanisms of antimicrobial resistance in clinical staphylococci isolated from companion animals over a 16 year period**’, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(6), pp. 1479–1487. doi: 10.1093/jac/dkw029.

Dahms, C. et al. (2014) ‘**Occurrence of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in farm workers and the livestock environment in Mecklenburg-Western Pomerania, Germany**’, *Acta veterinaria Scandinavica*, 56, p. 53. doi: 10.1186/s13028-

014-0053-3.

Dahms, C. et al. (2015) ‘Occurrence of ESBL-producing Escherichia coli in livestock and farm workers in Mecklenburg-Western Pomerania, Germany’, *PLoS ONE*, 10(11), pp. 1–13. doi: 10.1371/journal.pone.0143326.

Dierikx, C. et al. (2013) ‘Extended-spectrum- β -lactamase- and AmpC- β -lactamase-producing Escherichia coli in Dutch broilers and broiler farmers’, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(1), pp. 60–67. doi: 10.1093/jac/dks349.

Dierikx, C. M. et al. (2013) ‘Presence of ESBL/AmpC -producing Escherichia coli in the broiler production pyramid: A descriptive study’, *PLoS ONE*, 8(11). doi: 10.1371/journal.pone.0079005.

Di Martino, G. et al. (2019) ‘Farmers’ attitudes towards antimicrobial use and awareness of antimicrobial resistance: a comparative study among turkey and rabbit farmers’, *Italian Journal of Animal Science*. Taylor & Francis, 18(1), pp. 194–201. doi: 10.1080/1828051X.2018.1504236.

Di Pietrantonj, C. (2017) ‘L'utilizzo di antibiotici in ambito territoriale in Piemonte. Rapporto 2013-2016’.

Dorado-García, A. et al. (2017) ‘Molecular relatedness of ESBL/AmpC-producing Escherichia coli from humans, animals, food and the environment: a pooled analysis’, *The Journal of antimicrobial chemotherapy*, 73(2), pp. 339–347. doi: 10.1093/jac/dkx397.

van Duijkeren, E. et al. (2016) ‘Transmission of MRSA between humans and animals on duck and turkey farms’, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(1), pp. 58–62. doi: 10.1093/jac/dkv313.

ECDC, EFSA and EMA ‘ECDC, EFSA and EMA Joint Scientific Opinion on a list of outcome indicators as regards surveillance of antimicrobial resistance and antimicrobial consumption in humans and food-producing animals’ (2017) *EFSA Journal*, 15(10). doi: 10.2903/j.efsa.2017.5017.

ECDC (2017) ‘MISSION REPORT ECDC country visit to Italy to discuss antimicrobial resistance issues’.

EFSA (2012) ‘Technical specifications on the harmonised monitoring and reporting of antimicrobial resistance in methicillin-resistant Staphylococcus

aureus in food-producing animals and food, *EFSA Journal*, 10(10), p. 2897. doi: 10.2903/j.efsa.2012.2897.

EFSA (2018) ‘The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2016’, *EFSA Journal*, 16(2). doi: 10.2903/j.efsa.2018.5182.

EFSA (2019) ‘The European union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017’, *EFSA Journal*, 17(2). doi: 10.2903/j.efsa.2019.5598.

European Centre for Disease Prevention and Control (2017) ‘Antibiotic resistance in the European Union’, *EARS-Net Surveillance Data*, (November), pp. 1–5. Available at: <https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/documents/EAAD EARS-Net summary.pdf>.

European Medicines Agency (2018) ‘Sales of veterinary antimicrobial agents in 30 European countries in 2016- Trends from 2010 to 2016- Eight ESVAC report’, p. 176. doi: 10.1016/j.phpro.2011.05.019.

Friese, A. et al. (2013) ‘Occurrence of livestock-associated methicillin-resistant Staphylococcus aureus in turkey and broiler barns and contamination of air and soil surfaces in their vicinity’, *Applied and Environmental Microbiology*, 79(8), pp. 2759–2766. doi: 10.1128/AEM.03939-12.

Gazzetta Ufficiale delle Comunità Europee (2002) ‘Raccomandazione del Consiglio del 15 novembre 2001 sull’uso prudente degli agenti antimicrobici nella medicina umana’, pp. 13–16.

Geenen, P. L. et al. (2013) ‘Prevalence of livestock-associated MRSA on Dutch broiler farms and in people living and/or working on these farms’, *Epidemiology and Infection*, 141(5), pp. 1099–1108. doi: 10.1017/S0950268812001616.

Goerge, T. et al. (2017) ‘MRSA colonization and infection among persons with occupational livestock exposure in Europe: Prevalence, preventive options and evidence’, *Veterinary Microbiology*. Elsevier B.V., 200, pp. 6–12. doi: 10.1016/j.vetmic.2015.10.027.

Graham, D. W. et al. (2019) ‘Complexities in understanding antimicrobial resistance across domesticated animal, human, and environmental systems’, *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1441(1), pp. 17–30. doi: 10.1111/nyas.14036.

- Gu, B. et al. (2013) ‘The emerging problem of linezolid-resistant Staphylococcus’**, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 68(1), pp. 4–11. doi: 10.1093/jac/dks354.
- Guardabassi, L. et al. (2013) ‘Public health impact and antimicrobial selection of methicillin-resistant staphylococci in animals’**, *Journal of Global Antimicrobial Resistance*. Taibah University, 1(2), pp. 55–62. doi: 10.1016/j.jgar.2013.03.011.
- Guardabassi Luca, Lars B. Jensen, H. K. (2008) Guide to Antimicrobial Use in Animals**, *Annals of Internal Medicine*. doi: 10.7326/0003-4819-108-3-502_7.
- He, T. et al. (2014) ‘Genetic environment of the multi-resistance gene cfr in methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from chickens, ducks, and pigs in China’**, *International Journal of Medical Microbiology*. Elsevier GmbH., 304(3–4), pp. 257–261. doi: 10.1016/j.ijmm.2013.10.005.
- Herst, J. (2013) ‘An American-Made Miracle: The Politicization of Penicillin During World War II’**, *Journal of Chemical Information and Modeling*, 53(9), pp. 1689–1699. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.
- Hiroi, M. et al. (2011) ‘Prevalence of Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae in Food-Producing Animals’**, *Journal of Veterinary Medical Science*, 74(2), pp. 189–195. doi: 10.1292/jvms.11-0372.
- Huber, H. et al. (2011) ‘Prevalence and characteristics of methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from livestock, chicken carcasses, bulk tank milk, minced meat, and contact persons’**, *BMC Veterinary Research*. BioMed Central Ltd, 7(1), p. 6. doi: 10.1186/1746-6148-7-6.
- Huijbers, P. M. C. et al. (2014) ‘Extended-spectrum and AmpC β -lactamase-producing Escherichia coli in broilers and people living and/or working on broiler farms: Prevalence, risk factors and molecular characteristics’**, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 69(10), pp. 2669–2675. doi: 10.1093/jac/dku178.
- Huijbers, P. M. C. et al. (2016) ‘Transmission dynamics of extended-spectrum β -lactamase and AmpC β -lactamase-producing Escherichia coli in a broiler flock without antibiotic use’**, *Preventive Veterinary Medicine*. Elsevier B.V., 131, pp. 12–19. doi: 10.1016/j.prevetmed.2016.07.001.
- INAIL (2003) ‘Profili di Rischio di Comparto: allevamento avicolo’**, pp. 46–56.
- ISMEA (2019) ‘Il mercato delle carni avicole’**, pp. 1–7.

Johnsen, P. J. et al. (2005) ‘Persistence of animal and human glycopeptide-resistant enterococci on two Norwegian poultry farms formerly exposed to avoparcin is associated with a widespread plasmid-mediated vanA element within a polyclonal *Enterococcus faecium* population’, *Applied and Environmental Microbiology*, 71(1), pp. 159–168. doi: 10.1128/AEM.71.1.159-168.2005.

Köck, R. et al. (2017) ‘Antimicrobial resistance at the interface of human and veterinary medicine’, *Veterinary Microbiology*, 200, pp. 1–5. doi: 10.1016/j.vetmic.2016.11.013.

Kola, A. et al. (2012) ‘High prevalence of extended-spectrum- β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in organic and conventional retail chicken meat, Germany’, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(11), pp. 2631–2634. doi: 10.1093/jac/dks295.

Larsen, J. et al. (2015) ‘Meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 is an increasing cause of disease in people with no livestock contact in Denmark, 1999 to 2011 J’, 344(6188), pp. 1173–1178. doi: 10.1126/science.1249098.Sleep.

Laube, H. et al. (2013) ‘Longitudinal monitoring of extended-spectrum-beta-lactamase/ampC-producing *Escherichia coli* at german broiler chicken fattening farms’, *Applied and Environmental Microbiology*, 79(16), pp. 4815–4820. doi: 10.1128/AEM.00856-13.

Lekkerkerk, W. S. N. et al. (2017) ‘Newly identified risk factors for MRSA carriage in The Netherlands’, *PLoS ONE*, 12(11), pp. 1–12. doi: 10.1371/journal.pone.0188502.

Leverstein-van Hall, M. A. et al. (2011) ‘Dutch patients, retail chicken meat and poultry share the same ESBL genes, plasmids and strains’, *Clinical Microbiology and Infection*. European Society of Clinical Infectious Diseases, 17(6), pp. 873–880. doi: 10.1111/j.1469-0691.2011.03497.x.

Liu, Y. Y. et al. (2016) ‘Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: A microbiological and molecular biological study’, *The Lancet Infectious Diseases*. Elsevier Ltd, 16(2), pp. 161–168. doi: 10.1016/S1473-3099(15)00424-7.

Madigan, M. T., Martinko, J. M. and Parker, J. (2015) *Brock - Biologia dei Microrganismi*, Pearson education, quattordicesima edizione.

- Magouras, I. et al. (2017) ‘Antimicrobial Usage and -Resistance in Livestock: Where Should We Focus?’**, *Frontiers in Veterinary Science*, 4(September), pp. 1–4. doi: 10.3389/fvets.2017.00148.
- Marshall, B. M. and Levy, S. B. (2011) ‘Food animals and antimicrobials: Impacts on human health’**, *Clinical Microbiology Reviews*, 24(4), pp. 718–733. doi: 10.1128/CMR.00002-11.
- Ministero della Salute (2005) ‘Modifiche ed integrazioni all’Ordinanza del 26 agosto 2005 concernente misure di polizia veterinaria in materia di malattie infettive e diffuse dei volatili da cortile’**, pp. 1–6.
- Ministero della Salute (2014a) ‘Manuale “ Biosicurezza e uso corretto e razionale degli antibiotici in zootecnia “**’, (2), pp. 1–135. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.
- Ministero della Salute (2014b) ‘Relazione sulla resistenza agli antimicrobici dei batteri zoonotici e commensali - Settore avicolo’**.
- Ministero della Salute (2018) ‘Decreto 13 dicembre 2018’**, (2), pp. 1–135. doi: 10.1017/CBO9781107415324.004.
- Ministero della Salute - Direzione generale della sanità animale e dei farmaci veterinari (2017) ‘Dati di vendita dei medicinali veterinari contenenti agenti antimicrobici. Trend in Italia - Anno 2016’**, p. 18. Available at: http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_2780_allegato.pdf.
- Ministero della Salute, Piano Nazionale di Contrasto de Il ’ Antimicrobico - Resistenza (PNCAR) (2020).**
- Miragaia, M. (2018) ‘Factors contributing to the evolution of MecA-mediated β -lactam resistance in Staphylococci: Update and new insights from whole genome sequencing (WGS)’**, *Frontiers in Microbiology*, 9(NOV), pp. 1–16. doi: 10.3389/fmicb.2018.02723.
- Murphy, D. et al. (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)’**, *EFSA Journal*, 15(1). doi: 10.2903/j.efsa.2017.4666.
- Nebbia, P. et al. (2014) ‘Genetic and phenotypic characterisation of Escherichia**

- coli producing cefotaximase-type extended-spectrum β -lactamases: first evidence of the ST131 clone in cats with urinary infections in Italy**, *Journal of Feline Medicine and Surgery*, 16(12), pp. 966–971. doi: 10.1177/1098612X14527103.
- Nemeghaire, S. *et al.* (2013) **‘Characterization of methicillin-resistant Staphylococcus aureus from healthy carrier chickens’**, *Avian Pathology*, 42(4), pp. 342–346. doi: 10.1080/03079457.2013.805183.
- Nemeghaire, S. *et al.* (2014) **‘Molecular epidemiology of methicillin-resistant Staphylococcus sciuri in healthy chickens’**, *Veterinary Microbiology*, 171(3–4), pp. 357–363. doi: 10.1016/j.vetmic.2014.01.041.
- O’Brien, K. M. *et al.* (2016) **‘High throughput genomic sequencing of bioaerosols in broiler chicken production facilities’**, *Microbial Biotechnology*, 9(6), pp. 782–791. doi: 10.1111/1751-7915.12380.
- O’Connor, A. M. *et al.* (2017) **‘Updated systematic review: Associations between proximity to animal feeding operations and health of individuals in nearby communities’**, *Systematic Reviews*. Systematic Reviews, 6(1). doi: 10.1186/s13643-017-0465-z.
- O’Neill, J. (2016) **‘Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations’**, *Archives of Pharmacy Practice*, 7(3), p. 110. doi: 10.4103/2045-080x.186181.
- OIE (2007) **‘OIE List of antimicrobial agents of veterinary importance’**, *Journal of Mathematical Sciences*, 191(4), pp. 480–484.
- OIE (2013) **‘OIE List of antimicrobials of Veterinary importance. Criteria used for categorisation List of antimicrobials’**, *World Organization for Animal Health*, 75(Xxviii), p. 9. Available at: <https://www.oie.int/doc/ged/D9840.PDF>.
- OIE (2019) **‘Terrestrial Animal Health Code’**, pp. 1–12.
- Pal, C. *et al.* (2016) **‘The structure and diversity of human, animal and environmental resistomes’**, *Microbiome*. Microbiome, 4, pp. 1–15. doi: 10.1186/s40168-016-0199-5.
- Parlamento Europeo and Consiglio dell’Unione Europea (2003) **‘Direttiva 2003/99/CE’**, *Gazzetta ufficiale dell’Unione europea*, 7, pp. 31–40.
- Persoons, D. *et al.* (2008) **‘The effect of antibiotics on methicillin-resistant**

Staphylococcus aureus', *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 61(2), pp. 246–253. doi: 10.1093/jac/dkm465.

Persoons, D. et al. (2011) '**Risk factors for ceftiofur resistance in Escherichia coli from Belgian broilers**', *Epidemiology and Infection*, 139(5), pp. 765–771. doi: 10.1017/S0950268810001524.

Pletinckx, L. J. et al. (2011) '**Screening of poultry-pig farms for methicillin-resistant Staphylococcus aureus: Sampling methodology and within herd prevalence in broiler flocks and pigs**', *Infection, Genetics and Evolution*. Elsevier B.V., 11(8), pp. 2133–2137. doi: 10.1016/j.meegid.2011.07.008.

Poli, G. et al. (2017) '**Microbiologia e immunologia veterinaria**', *EDRA*, terza edizione.

Prestinaci, F., Pezzotti, P. and Pantosti, A. (2015) '**Antimicrobial resistance: a global multifaceted phenomenon**', *Pathogens and Global Health*. Taylor & Francis, 109(7), pp. 309–318. doi: 10.1179/2047773215y.0000000030.

Projahn, M. et al. (2017) '**Extended-Spectrum-Beta-Lactamase- and Plasmid-Encoded Cephamycinase- Producing Enterobacteria in the Broiler Hatchery as a Potential Mode of Pseudo- Vertical Transmission**', *Applied and Environmental Microbiology*, 83(1), pp. e02364-16.

Pyzik, E. et al. (2019) '**Detection of antibiotic resistance and classical enterotoxin genes in coagulase-negative staphylococci isolated from poultry in Poland**', *Journal of Veterinary Research (Poland)*, 63(2), pp. 183–190. doi: 10.2478/jvetres-2019-0023.

Regione Piemonte (2010a) '**Buone pratiche di veterinaria preventiva. Linee guida per l'allevamento del pollo da carne**'.

Regione Piemonte (2010b) '**Linee guida allevamenti suinicoli e avicoli**', p. 20.

Regione Piemonte (2019) '**Regione piemonte BU 25 - 20/06/2013**', 00.

Ribeiro, C. M. et al. (2018) '**Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus in Poultry and Poultry Meat: A Meta-Analysis**', *Journal of Food Protection*, 81(7), pp. 1055–1062. doi: 10.4315/0362-028x.jfp-17-445.

Richter, A. et al. (2012) '**Prevalence of types of methicillin-resistant Staphylococcus aureus in turkey flocks and personnel attending the animals**', *Epidemiology and Infection*, 140(12), pp. 2223–2232. doi: 10.1017/S095026881200009X.

- Rolo, J. et al. (2017) ‘Evidence for the evolutionary steps leading to mecA-mediated β -lactam resistance in staphylococci’, *PLoS Genetics*, 13(4), pp. 1–22. doi: 10.1371/journal.pgen.1006674.**
- Roth, N. et al. (2019) ‘The application of antibiotics in broiler production and the resulting antibiotic resistance in *Escherichia coli*: A global overview’, *Poultry Science*, 98(4), pp. 1791–1804. doi: 10.3382/ps/pey539.**
- Rychen, G. et al. (2017) ‘Safety and efficacy of Sacox® microGranulate (salinomycin sodium) for chickens for fattening and chickens reared for laying’, *EFSA Journal*, 15(1), pp. 1–40. doi: 10.2903/j.efsa.2017.4670.**
- Saliu, E. M., Vahjen, W. and Zentek, J. (2017) ‘Types and prevalence of extended-spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae in poultry’, *Animal Health Research Reviews*, 18(1), pp. 46–57. doi: 10.1017/S1466252317000020.**
- Sezione per la Farmacosorveglianza sui medicinali veterinari del Ministero della Salute (2017) ‘Linee Guida Per L’Uso Prudente Degli Antimicrobici Negli Allevamenti Zootecnici Per La Prevenzione Dell’Antimicrobico-Resistenza E Proposte Alternative’, p. 41. Available at: http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_2782_allegato.pdf.**
- Sørum, M. et al. (2005) ‘Prevalence , Persistence , and Molecular Characterization of Glycopeptide-Resistant Enterococci in Norwegian Poultry and Poultry Farmers 3 to 8 Years after the Ban on Avoparcin Prevalence , Persistence , and Molecular Characterization of Glycopeptide-Resi’, *Applied and environmental microbiology*, 72(1), p. 516. doi: 10.1128/AEM.72.1.516.**
- tho Seeth, M., Hoedemaker, M. and Krömker, V. (2015) ‘Occurrence and characterization of Staphylococcus bacteria isolated from poultry in Western Poland’, *Berliner und Münchener Tierärztliche Wochenschrift*, 2(March), pp. 10–17. doi: 10.2376/0005-9366-128-10.**
- Wang, Y. et al. (2013) ‘Multidrug resistance gene cfr in methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci from chickens, ducks, and pigs in China’, *International Journal of Medical Microbiology*. Elsevier GmbH., 303(2), pp. 84–87. doi: 10.1016/j.ijmm.2012.12.004.**
- Wetzker, W. et al. (2019) ‘Extended-spectrum beta-lactamase (ESBL)-producing *Escherichia coli* isolated from flies in the urban center of Berlin, Germany’,**

International Journal of Environmental Research and Public Health, 16(9). doi: 10.3390/ijerph16091530.

W H O Advisory Group on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance (2016) **Critically Important Antimicrobials for Human Medicine**.

W H O Advisory Group on Integrated Surveillance of Antimicrobial Resistance (2018) **WHO list of Critically Important Antimicrobials (CIA), 6th revision**. Available at: http://www.who.int/foodborne_disease/resistance/cia/en/#.UiMEZ7zmSDA.mendeley.

WHO (2014) **Antimicrobial resistance. Global Report and Surveillance**. doi: 10.1016/B978-012373960-5.00452-4.

WHO (2015) **'Global action plan on antimicrobial resistance'**, *Who*, pp. 1–28.

WHO (2017) **'Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery and development of new antibiotics'**, *Cadernos de Pesquisa*, 43(148), pp. 348–365. doi: 10.1590/S0100-15742013000100018.

Wielders, C. C. H. et al. (2017) **'Extended-spectrum β -lactamase- and pAmpC-producing Enterobacteriaceae among the general population in a livestock-dense area'**, *Clinical Microbiology and Infection*. Elsevier Ltd, 23(2), pp. 120.e1-120.e8. doi: 10.1016/j.cmi.2016.10.013.

Woolhouse, M. et al. (2015) **'Antimicrobial resistance in humans, livestock and the wider environment'**, *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 370(1670). doi: 10.1098/rstb.2014.0083.

World Bank (2016) **'Drug-Resistant Infections: A Threat to Our Economic Future (Discussion Draft).'**, *World Bank Report*, 2(September), pp. 1–132. doi: 10.1007/s11947-009-0181-3.

Wu, C. et al. (2018) **'Rapid rise of the ESBL and mcr-1 genes in Escherichia coli of chicken origin in China, 2008-2014'**, *Emerging Microbes and Infections*. Springer US, 7(1), pp. 1–10. doi: 10.1038/s41426-018-0033-1.

Zhang, Y., Agidi, S. and Lejeune, J. T. (2009) **'Diversity of staphylococcal cassette chromosome in coagulase-negative staphylococci from animal sources'**, *Journal of Applied Microbiology*, 107(4), pp. 1375–1383. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04322.x.