

**Biotipizzazione ed antibioticoresistenza di ceppi di *Escherichia coli* isolati da conigli selvatici (*Oryctolagus cuniculus*) asintomatici.**

**G. Grilli, V. Ferrazzi, D. Gallazzi**

Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria - Sez. di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviare, Università degli Studi di Milano, via Celoria 10 – 20133 Milano

*Corresponding Author:* Dr. Guido Grilli, Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria- Sez. di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviare, Università degli Studi di Milano, via Celoria 10 – 20133 Milano, +39 02 50318121, fax +39 50318106. E-mail: [guido.grilli@unimi.it](mailto:guido.grilli@unimi.it)

**ABSTRACT:** Biotyping and antibiotic resistance of *Escherichia coli* strains isolated from asymptomatic wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus*). One hundred wild rabbits hunted in Serio Regional Park (Bergamo, Italy) were examined. Post mortem examination revealed a good body condition, even in rabbits with ecto-endoparasites (*Spilopsyllus cuniculi* and *Cittotaenia* spp.). The caecum of each animal was tested bacteriologically for *Escherichia coli*. Sixty per cent of samples were positive. 25 strains were identified, biotyped and checked for antibiotic sensitivity (nalidixic acid, apramycin, chloramphenicol, chlortetracycline, ciprofloxacin, colistin, sulph.+trimethoprim, enrofloxacin, flumequine, gentamicin, neomycin, norfloxacin, streptomycin and the three sulphanilamides). Nine different biotypes were identified: B2 (n.1), B8 (4), B10 (3), B12 (4), B14 (5), B18 (1), B20 (2), B26 (1) and B30 (4). Antibiotic sensitivity varied widely: only norfloxacin was active against all the strains, chloramphenicol on 17, enrofloxacin only on 12, and chlortetracycline and the sulphanilamides were virtually inactive. The presence of different pathogenic biotypes of *E. coli* and their multi-resistance to antibiotics has never been reported in wild rabbits. These preliminary findings need to be completed with serotype studies and identification of the gene coding for intimin and adesines, to give a fuller picture of the situation in these wild animals.

*Keywords:* wild rabbits, *Escherichia coli*, antibiotic resistance.

**INTRODUZIONE** – Nel mese di agosto 2004 è stato effettuato un piano di abbattimento di conigli selvatici (*Oryctolagus cuniculus*) all'interno del Parco Serio (BG), nei comuni di Grassobbio (Zona A), Ghisalba e Martinengo (Zona B) e Cologno al Serio (Zona C). Queste zone sono densamente popolate dal coniglio selvatico e durante l'anno presentano fluttuazioni numeriche come conseguenza di epizootie devastanti che periodicamente insorgono. Dal punto di vista sanitario abbiamo ritenuto interessante isolare ceppi di *E. coli*, biotipizzarli e testarne la resistenza agli antibiotici e confrontare questi dati con quelli dei conigli allevati.

**MATERIALI E METODI** – Dai 100 soggetti abbattuti, dopo attento esame autoptico, dall'intestino cieco si è tentato l'isolamento su terreno Mc-Conkey Agar, e la successiva identificazione di *Escherichia coli*. Su tutti i ceppi di *E. coli* è stato eseguito l'antibiogramma mediante la tecnica di Kirby-Bauer (Chengappa, 1990); gli antibiotici

testati sono stati i seguenti: ac. nalidixico, apramicina, cloramfenicolo, clortetraciclina, ciprofloxacina, colistina, sulf.+trimeth., enrofloxacin, flumequina, gentamicina neomicina, norfloxacin, streptomycin e trisulfamidico. La biotipizzazione è stata eseguita mediante la tecnica consigliata da Camguilhem e Milon (1989).

**RISULTATI E CONCLUSIONI** – I conigli si presentavano in buono stato di nutrizione, nonostante la costante presenza parassitaria (*Spilopsyllus cuniculi* e *Cittotaenia* spp.). Quantunque esenti da lesioni flogistiche intestinali evidenti, l'isolamento di *Escherichia coli* è risultato positivo nel 60% dei casi. La biotipizzazione di 25 ceppi ha portato al riscontro di 9 biotipi e cioè: B2 (1 ceppo), B8 (4), B10 (3), B12 (4), B14 (5), B18 (1), B20 (2) B26 (1) e B 30 (4). Tra i vari biotipi individuati, almeno 5 (B8, B10, B12, B14, B20) risultano essere potenzialmente patogeni (Agnoletti *et al.*, 2004) Le osservazioni sui biotipi di *E. coli* presenti nei conigli selvatici sono da considerare assolutamente inedite per quanto riguarda questa tipologia di animale, in quanto non esistono in letteratura ricerche del genere condotte su conigli selvatici a vita libera. I biotipi ritrovati sono percentualmente abbastanza vicini a quanto riportato di recente da Pisoni *et al.* (2004) in allevamenti commerciali della Lombardia e del Piemonte; in Italia Agnoletti *et al.* (2003) e Camarda *et al.* (2004) avevano però segnalato anche altri biotipi. Tra quelli dei selvatici esaminati il biotipo 2 in particolare non era mai stato segnalato in Italia ma, a conferma della sua patogenicità, Okerman e Devriese (1985) in Belgio ed Olanda lo considerano come uno dei principali biotipi coinvolti nelle enteriti dei conigli svezzati (insieme ai biotipi 1, 3 e 4). Gli stessi biotipi da noi ritrovati, con l'aggiunta del biotipo 8, sono stati segnalati anche da Peeters *et al.* (1988) in Inghilterra e Francia, sempre però in conigli di allevamento con enterite. Agnoletti *et al.* (2004) considerano poco comuni, nei conigli commerciali, i biotipi 2, 8 e 10 con prevalenze inferiori allo 0,5%. Nella presente indagine invece il 25% dei ceppi isolati sono da ascrivere a tali biotipi. L'importanza di questi risultati nei conigli selvatici è data anche dalla presenza di numerosi biotipi ramnosio-negativi (B 2, 8, 10, 12, 14), notoriamente coinvolti nella patologia enterica grazie all'elevata correlazione di questi biotipi con la presenza del gene dell'adesività denominato *eae*. Questi ed altri biotipi ramnosio-negativi sono riconosciuti patogeni da tempo nel coniglio domestico, come già riportato da Camguilhem e Milon nel 1989 in Francia. Questi AA segnalano 14 biotipi differenti, di cui 4 ramnosio-negativi (B6, B12, B13 e B14) e Blanco *et al.* (1996) in Spagna hanno ritrovato 17 biotipi differenti, di cui 5 ramnosio-negativi. Secondo Agnoletti *et al.* (2004), alcuni di questi biotipi hanno una correlazione elevatissima con la presenza del gene dell'adesività: tali Autori stimano che tutti i ceppi appartenenti al biotipo 4, 5, 6, e 8, più i 2 ceppi ramnosio-positivi B20 e B24, siano più frequentemente portatori di questo gene. Anche i biotipi 10, 12 e 14 hanno una correlazione positiva con il gene *eae*, rispettivamente del 95% e 77%. Vista l'elevata prevalenza di biotipi considerati patogeni anche nella nostra casistica, sarebbero necessarie ulteriori ricerche per stabilire il ruolo di questi biotipi nei selvatici e l'eventuale azione di *reservoir* che questi animali possono svolgere nei confronti dei conigli allevati. Anche l'analisi dell'antibiotico-resistenza (Tabella I) dei ceppi isolati dai conigli selvatici può considerarsi sovrapponibile a quanto già riportato in conigli di allevamento commerciale (Pisoni *et al.*, 2004). Norfloxacin e ciprofloxacina sono attivi rispettivamente sul 100% e sull'80% dei ceppi isolati. Questi antibiotici, non di uso veterinario, sono stati inseriti per confronto con la resistenza di *E. coli* registrata in

medicina umana e per mettere in evidenza eventuale resistenza crociata all'interno della classe dei fluorchinoloni, tra i migliori principi attivi anti *E. coli* di questi ultimi anni. Dai nostri dati non sembrerebbe insorta alcuna resistenza crociata in quanto enrofloxacin, fluorochinolone di uso veterinario, presenta una sensibilità molto inferiore rispetto ai principi attivi di uso umano della stessa famiglia. Appare evidente come, a fronte di antibiotici molto efficaci come i fluorochinoloni, colistina e streptomycin, esistano classi farmacologiche a minore attività (aminoglicosidici, cloramfenicolo) ed altre ancora poco o punto efficaci (ciclina e sulfamidici). Risultati simili sono stati ottenuti da Livermore *et al.* (2001) in un'indagine eseguita su conigli selvatici del Galles. Anche questo aspetto merita ulteriori indagini, benché l'inattesa resistenza di alcuni ceppi di *E. coli* nei conigli selvatici che mai sono stati sottoposti a terapie abbia una possibile spiegazione nella naturale insensibilità di alcuni batteri nei confronti dei farmaci.

Tabella I: Risultati dei test di sensibilità agli antibiotici dei ceppi testati.

Antibiotico	Sensibili	Resistenti	Intermedi
Ac. Nalidixico	34,80%	52,20%	13,00%
Apramicina	30,40%	60,90%	8,70%
Cloramfenicolo	73,90%	13,00%	13,00%
Clortetraciclina	13,00%	87,00%	0,00%
Ciprofloxacina	82,60%	0,00%	17,40%
Colistina	91,30%	4,30%	4,30%
Co-Trimossazolo	21,70%	43,50%	34,80%
Enrofloxacin	52,20%	4,30%	43,50%
Flumequina	39,10%	17,40%	43,50%
Gentamicina	34,80%	52,20%	13,00%
Neomicina	52,20%	13,00%	34,80%
Norfloxacin	100,00%	0,00%	0,00%
Streptomycin	91,30%	0,00%	8,70%
Triple-Sulfa	0,00%	100,00%	0,00%

**Agnoletti F.**, Deotto, S., Passera, A., Tisato, E., Mazzolini, E., 2004. Diagnosi di colibacillosi nelle sindromi enteriche del coniglio. Riv. di Coniglicoltura, 41(5):40-41  
**Blanco, J.E.**, Blanco, M., Blanco, J., Mora, A., Balaguer, L., Cuervo, L., Balsalobre, C., Munoa, F., 1996. O serogroups, biotypes, and *eae* genes in *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy rabbits. J. Clin. Microbiol. 34(12): 3101-3107.  
**Camarda, A.**, Martella, V., Battista, P., Pennelli, D., Terio, V., Greco, L., Mangano, N., 2004. Geni di virulenza in ceppi di *Escherichia coli* isolati da conigli con sintomatologia enterica in allevamenti intensivi dell'Italia meridionale. Coniglicoltura, 41(5): 36-38.  
**Camguilhem, R.**, Milon, A, 1989. Biotypes and O serogroups of *Escherichia coli* involved in intestinal infections of weaned rabbits: clues to diagnosis of pathogenic strains. J. Clin. Microbiol. 27(4): 743-747.  
**Chengappa M.M.**, 1990. Antimicrobial Agents and Susceptibility testing in "Diagnostic procedures in veterinary bacteriology and mycology". Carter G.R., Cole J.R. eds., Academic Press, Inc.

**Livermore, D.M.**, Warner, M., Hall, M.N., Enne, V.I., Projan, S.J., Dunman, P.M., Wooster, S.L., Harrison, G. 2001. Antibiotic resistance in bacteria from magpies (*Pica pica*) and rabbits (*Oryctolagus cuniculus*) from west Wales. *Environ. Microbiol.* 3:658-61. **Okerman, L.**, Devriese, L.A., 1985. Biotypes of Enteropathogenic *Escherichia coli* Strains from Rabbits. *Journal of Clinical Microbiology*, 22 (6): 955-958. **Peeters, J.E.**, Geeroms, R., Ørskov, F., 1988. Biotype, serotype, and pathogenicity of attaching and effacing Enteropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic commercial rabbits. *Infection and Immunity*: 1442-1448. **Pisoni, A.M.**, Piccirillo, A., Gallazzi, D., Agnoletti, F., Grilli, G., 2004. Biotype and susceptibility to antimicrobial agents of Rabbit *Escherichia coli*. Proc 8<sup>th</sup> World Rabbit Congress, Sept 7-10, Puebla, Mexico, 608-613.