

Biotipizzazione ed antibioticoresistenza di ceppi di *Escherichia coli* isolati da lepri (*Lepus europaeus*) di importazione

Grilli G.¹, Giro V.¹, Ferrazzi V.¹, Bianchi A.¹, Citterio C.¹, Rattegni G.², Gallazzi D.¹

¹Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria. Università di Milano, Italy

²Ministero della Salute, Posto Ispezione Frontaliera, Aeroporto di Malpensa, Italy

Corresponding Author: Guido Grilli, Sezione di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviare, Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Via Celoria, 10 – 20133 Milano Italy - Tel +39 02-50318121 - Fax +39 02-50318106 - Email: guido.grilli@unimi.it

ABSTRACT: Biotyping and antibiotic resistance of *Escherichia coli* strains isolated from asymptomatic imported wild hares (*Lepus europaeus*). A total of 44 *E. coli*, isolated from faeces of asymptomatic wild hares imported from Argentina (240 animals), Uruguay (120 animals) and Czech Republic (140 animal) are biotyped and checked for antibiotic sensitivity (nalidixic acid, ampicillin, apramycin, chloramphenicol, ciprofloxacin, colistin, sulph+trimethoprim, enrofloxacin, flumequine, gentamicin, neomycin, norfloxacin, streptomycin and the three sulphanilamide). Six different biotypes were identified: B18 (n. 7), B23 (n. 1), B28 (n. 5), B29 (n. 1), B30 (n.15) and B31 (n.15). Most of tested antibiotics resulted active (except for neomycin, active only on 3 strains). These preliminary findings need to be complete with serotype studies and identification of the gene coding for intimin and adhesine, to give a fuller picture of the situation in these wild animals.

Key words: Wild hares, *Escherichia coli*, Biotyping, Antibiotic resistance.

INTRODUZIONE – Nel nostro Paese vengono annualmente importate lepri provenienti da Paesi dell’Est Europa (Ungheria, Polonia, Repubblica Ceca) e da nazioni sud americane (Argentina, Uruguay) per interventi di ripopolamento. Generalmente, a parte le indagini diagnostiche obbligatorie per legge (EBHS, Brucellosi e Tularemia), non vengono eseguiti ulteriori controlli sanitari. Scopo del lavoro è stato quello di indagare su alcuni caratteri degli *Escherichia coli* isolati da lepri di importazione, attraverso la biotipizzazione degli stipiti e lo studio del pattern di resistenza agli antibiotici, parimenti a quanto recentemente eseguito in analoghe ricerche nel coniglio selvatico (Grilli *et al.*, 2005).

MATERIALI E METODI – L’isolamento di *Escherichia coli* è stato eseguito a partire dalle feci raccolte singolarmente nelle gabbie di trasporto di tre partite differenti di lepri di importazione: 240 soggetti provenienti dall’Argentina e 120 soggetti provenienti dall’Uruguay e 140 soggetti provenienti dalla Repubblica Ceca. Le feci raccolte sono state diluite in BHI Broth, incubate per 12 ore a 37°C e successivamente seminate su Mc Conkey Agar per 24 ore a 37°C. Ogni colonia sospetta veniva identificata con il micrometodo Api 20 E. Da tutti i campioni sono stati isolati 44 ceppi di *E. coli* che sono stati biotipizzati secondo la tecnica di Canguilhem e Milon (1989) e sottoposti ad

antibiogramma secondo gli standard NCCLS (2001). Gli antibiotici testati sono stati i seguenti: a. nalidixico, aminosidina, apramicina, cloramfenicolo, ciprofloxacina, colistina, co-trimossazolo, enrofloxacin, flumequina, gentamicina, neomicina, norfloxacina, ossitetraciclina, spectinomycin, polimixina B, streptomycin e trisulfamidico.

RISULTATI E CONCLUSIONI – Tutte le lepri controllate erano di cattura e si presentavano clinicamente in buono stato sanitario e di nutrizione; il controllo dei documenti di importazione era conforme a quanto stabilito per legge. Dalle analisi eseguite sono stati isolati 44 ceppi di *E. coli* di cui 4 in lepri argentine, 7 in lepri dell'Uruguay e 33 in lepri provenienti dalla repubblica Ceca. La biotipizzazione ha portato al riscontro di 6 biotipi: B18 (7 ceppi), B23 (1 ceppo), B28 (5 ceppi), B29 (1 ceppo), B30 (15 ceppi) e B31 (15 ceppi) (Tabella I). Da queste osservazioni preliminari sembrerebbe che alcuni biotipi siano più presenti in alcuni Paesi che in altri, ma la scarsità di campioni non permette ulteriori considerazioni. Le osservazioni sui biotipi di *E. coli* presenti in lepri selvatiche importate sono da considerarsi inedite per quanto riguarda questo animale, solo alcune caratterizzazioni di ceppi di *E. coli* erano state condotte da Grilli (osservazioni personali) in casi di enterite in lepri di allevamento in cui erano stati ritrovati i biotipi B3, B7 e B19. Quanto da noi ritrovato però, si discosta da quello segnalato nel coniglio selvatico (Grilli *et al.* 2005) e in quello di allevamento commerciale (Agnoletti *et al.*, 2003; Camarda *et al.*, 2004, Pisoni *et al.*, 2004) dove prevalgono generalmente biotipi ramnosio negativi considerati generalmente più patogeni e notoriamente coinvolti nella patologia enterica grazie all'elevata correlazione con la presenza del gene dell'adesività denominato *eae*. I risultati dei test di sensibilità agli antibiotici si discostano molto da quelli ottenuti da *E. coli* isolati da conigli selvatici a vita libera (Livermore *et al.*, 2001; Grilli *et al.*, 2005) o di allevamento, dimostrando una notevole sensibilità alla maggior parte dei principi attivi testati ad eccezione della neomicina (Tabella II). Questa situazione, in cui risultano sensibili anche antimicrobici di vecchia generazione quali l'ossitetraciclina, ormai non più utilizzata da anni per la terapia delle patologie da enterobatteriacee quali *E. coli*, è probabilmente imputabile alla scarsa pressione antibiotica esercitata nell'ambiente in cui questi animali vivono e sono stati catturati. In questi ambienti non esistono allevamenti intensivi di altri lagomorfi e gli allevamenti di altri mammiferi (bovini ad esempio) sono condotti in maniera estensiva (al pascolo) e difficilmente sottoposti a terapia antibiotica, quindi con scarsa possibilità di passaggio di resistenza agli antibiotici attraverso scambio plasmidico o altri meccanismi. Il comportamento di questi batteri nei confronti delle molecole testate è simile a quanto registrato in ceppi di *E. coli* utilizzati come indicatori di antibiotico resistenza ed isolati da varie specie animali (bovini, ovini e cani) senza patologia conclamata (ITAVARM, 2003). Occorre comunque monitorare questo fenomeno poiché va ricordato che *E. coli* è in grado di acquisire e trasmettere orizzontalmente e verticalmente numerosi fattori di virulenza che ne caratterizzano il potere patogeno. Analogamente, sono in grado di trasferire fattori di resistenza ad altre specie commensali, patogene e zoonosiche come ricordato da che ne consiglia l'inclusione nel monitoraggio integrato dell'antibioticoresistenza. Per questo che l'antibioticoresistenza viene considerata alla stregua di una zoonosi trasversale ed è contemplata dalla Direttiva 2003/99/CE che obbliga i Paesi membri dell'Unione Europea a dotarsi di un sistema in grado di monitorarne l'andamento nel settore delle produzioni animali

BIBLIOGRAFIA – 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. **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, Riv. 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.*, 27:743-747. **Grilli G.**, Ferrazzi V., Gallazzi D., 2005. Biotipizzazione ed antibioticoresistenza di ceppi di *Escherichia coli* isolati da conigli selvatici (*Oryctolagus cuniculus*) asintomatici. Atti giornate di coniglicoltura, 30 settembre-1 ottobre, 69-72. **ITAVARM** (Italian Veterinary Antimicrobial Resistance Monitoring), 2004. First report, IZS delle Regioni Lazio e Toscana, 44 pp. **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 rabbit (*Oryctolagus cuniculus*) from west Wales. *Envir. Microbiol.* 3:658-661. **National Committee for Clinical Laboratory Standards**, 2001. Performance Standard for antimicrobial susceptibility testing M100-S11, vol 21 n°1-NCCLS, Wayne, PA. **Pisoni A.M.**, Piccirillo A. Gallazzi D., Agnoletti F., Grilli G., 2004. Biotype and susceptibility to antimicrobial agents of rabbit *Escherichia coli*. Proc. 8th World Rabbit Congress, Sept. 7-10, Puebla, Mexico.

Tabella I: Biotipi e provenienza dei ceppi isolati

Biotipo	Totale ceppi	Repubblica Ceca	Argentina	Uruguay
B18	7	7	0	0
B23	1	1	0	0
B28	5	2	2	1
B29	1	1	0	0
B30	15	11	1	3
B31	15	11	4	0

Tabella II: Risultati dei test di sensibilità agli antibiotici

ANTIBIOTICO	Ceppi testati	N° ceppi sensibili	Sensibilità %
Acido nalidixico	44	40	91
Aminosidina	22	8	36,4
Apramicina	44	43	97,8
Cloramfenicolo	44	36	81,8
Ciprofloxacina	44	40	91
Colistina	44	34	77,3
Co-Trimossazolo	41	40	97,6
Enrofloxacin	44	41	93,2
Flumequina	44	41	93,2
Gentamicina	44	36	81,8
Neomicina	44	3	6,8
Norfloxacin	44	44	100
Ossitetraciclina	44	17	38,6
Spectinomomicina	44	26	59
Polimixina B	44	28	63,6
Streptomomicina	44	16	36,4
Triple Sulfa	44	26	59,1