

Profili di resistenza agli antibiotici ed individuazione di integroni di classe 1 e 2 in *Escherichia coli* isolati da lagomorfi. Osservazioni preliminari

**Grilli G.¹, Piccirillo A.², Leoni L.¹, Castellani A.²,
Ferrazzi V.¹, Gallazzi D.¹, Mondin A.²**

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

²Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria,
Università di Padova, Italy.

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

ABSTRACT: Antimicrobial resistance profiles and detection of class 1 and 2 integrons in *Escherichia coli* isolates from lagomorphs. Preliminary results. In 118 *E. coli* isolates from commercial meat rabbits affected by enteropathy (25 isolates), wild rabbits (40 isolates), and hares (53 isolates), antibiotic resistance profiles and class 1 and 2 integrons have been investigated. 64% of isolates from meat rabbits, 40% from wild rabbits and 7,5% from hares showed multidrug resistance to more than 9 antibiotics. In 23% isolates, only class 1 integrons have been detected with a prevalence higher in meat rabbits (52% positive isolates), followed by wild rabbits (25%) and hares (7.5%). The presence of integrons in isolates from commercial meat rabbits could be due to the selective pressure produced by the large use of antibiotics during their husbandry, favouring the emergence of resistant microbial populations. In wild rabbits, antibiotic resistant isolates could be resulted from contacts with zootechnical manure dispersed on crops, whereas those from hares could have an environmental origin. Class 1 integrons have not ever been described in wild lagomorphs.

Key words: Antibiotic resistance, *Escherichia coli*, Integrons, Lagomorphs.

INTRODUZIONE – L'antibiotico-resistenza di batteri patogeni e commensali di origine animale è uno dei maggiori problemi di sanità pubblica in tutto il mondo. Negli allevamenti commerciali vengono usate notevoli quantità di farmaci antinfettivi per la terapia e la profilassi delle infezioni, specialmente enteriche. Scopo di questo lavoro è stato indagare sulla sensibilità agli antimicrobici di ceppi di campo di *Escherichia coli* isolati in corso di patologia. I fenotipi di resistenza ottenuti sono stati successivamente confrontati con quelli di *E. coli* isolati da lagomorfi selvatici (conigli e lepri), non esposti ai farmaci. In tutti i ceppi batterici isolati sono stati ricercati gli integroni di classe 1 e 2, che rappresentano i più recenti elementi genetici coinvolti nella diffusione delle resistenze ai farmaci, solo recentemente osservati in isolati da conigli (Tonelli *et al.*, 2008) e mai ricercati nei lagomorfi.

MATERIALI E METODI – I ceppi batterici analizzati sono stati isolati, nel corso del 2008, da conigli da carne, conigli selvatici e lepri. I conigli da carne, naturalmente deceduti per patologia enterica, provenivano da allevamenti commerciali ed erano stati recapitati, a fini diagnostici, al laboratorio di patologia avicunicola della Sezione di

Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviare della Facoltà di Medicina Veterinaria di Milano ai fini diagnostici nell'anno 2008. I conigli selvatici sono stati esaminati nel corso di indagini riguardanti la diffusione di patologie nei lagomorfi selvatici nel Parco Regionale del Fiume Serio (Bg), mentre i campioni di lepre selvatica sono reperiti grazie alla collaborazione dei cacciatori e di alcuni Ambiti Territoriali Caccia (ATC) della Lombardia. Per l'isolamento di *Escherichia coli* sono stati eseguiti prelievi dal cieco di 40 conigli provenienti da 20 allevamenti intensivi ed è stato analizzato il contenuto ciecale di 120 lepri e 100 conigli selvatici. I campioni sono stati seminati su MacConkey Agar (MC) ed incubati a 37°C per 24 ore in aerobiosi. L'identificazione di specie è stata eseguita sia con il micrometodo "Rapid one" (Remel). Sono stati isolati in tutto 118 ceppi di *E. coli* di cui 25 da conigli da carne, 40 da conigli selvatici e 53 da lepri. Su tutti i campioni sono stati eseguiti gli antibiogrammi secondo la tecnica di Kirby-Bauer (Chengappa, 1990). I principi attivi testati sono riportati in Tabella 1. Una volta eseguito l'antibiogramma, tutti i 118 ceppi batterici, sono stati controllati con lo scopo di rilevare la presenza di integroni di classe 1 e 2 nel DNA batterico. In particolare il protocollo applicato per l'identificazione degli integroni di classe 1 segue quello descritto da Lévesque *et al.* (1995) mentre per gli integroni di classe 2 il protocollo applicato segue, quello descritto da Gu *et al.* (2008).

RISULTATI E CONCLUSIONI – I fenotipi di antibiotico-resistenza riscontrati nei 118 ceppi di *E. coli* sono riportati in Tabella 1. I ceppi isolati da conigli da carne hanno manifestato multiresistenza con il 64% dei ceppi resistenti a più di 9 dei 18 principi attivi testati. Le resistenze maggiori sono state riscontrate nei confronti degli aminoglicosidi e delle tetracicline, alcuni dei quali impiegati nei piani di metafilassi. I ceppi isolati dai conigli da carne hanno mostrato una sensibilità agli antibiotici inferiore rispetto ai ceppi isolati dalle altre specie, in particolare nei confronti delle tetracicline, dei sulfamidici, della neomicina e dei fluorochinoloni, che sono poco attivi. Nessun principio attivo è apparso efficace nei confronti di tutti i ceppi isolati, in accordo con quanto riportato da Grilli *et al.* (2005). Per quanto riguarda i ceppi isolati dalle lepri, solo neomicina e streptomina risultano scarsamente efficaci *in vitro*, anche se altri principi attivi della medesima classe, quali l'apramicina, dimostrano maggiore attività, evidenziando che la resistenza non è crociata. L'efficacia dei principi attivi testati è probabilmente legata al fatto che questi animali sono meno sociali dei conigli e che stati prelevati in zone collinari a zootecnia estensiva. Solo gli Integroni di classe 1 sono stati ritrovati nel 23% dei ceppi con prevalenza maggiore nei conigli da carne (13 ceppi positivi) seguiti dai conigli selvatici (10 ceppi positivi) e dalle lepri (4 ceppi positivi). Il ritrovamento di integroni in ceppi isolati da conigli da carne può essere legato alla pressione selettiva esercitata dall'ampio utilizzo di antibiotici negli allevamenti che ha favorito la nascita di popolazioni microbiche resistenti. Nei conigli selvatici può essere invece ricondotto al contatto con reflui zootecnici sparsi su terreni agricoli, mentre nelle lepri ad una possibile contaminazione ambientale. La presenza degli integroni è associata a resistenza, da parte del ceppo batterico, verso diversi degli antibiotici testati (Figura 1), confermando la possibilità che inseriti in questi, possano esserci cassette geniche codificanti resistenza verso specifici antibiotici. Sono quindi necessari ulteriori approfondimenti per individuare tali geni impiegando magari tecniche innovative come i DNA Microarray.

BIBLIOGRAFIA – Chengappa, M., 1990. Antimicrobial Agents and Susceptibility Testing. in Diagnostic Procedures in Veterinary Bacteriology and Mycology, G. R. Carter and Cole J. R. Jr. Editors, 5th Edition, Academic Press, Inc., 479-492. Grilli, G., Ferrazzi, V., Lavazza, A., 2005. Biotipizzazione e antibioticoresistenza di ceppi di *Escherichia coli* isolati da conigli selvatici (*Oryctolagus cuniculus*) asintomatici. Atti convegno nazionale ASIC, Forlì, Italy, 93-94. Gu, B., Pan, S., Wang, T., Zhao, W., Mei, Y., Huang, P., Tong, M., 2008. Novel cassette arrays of integrons in clinical strains of *Enterobacteriaceae* in China. Int. J. Antimicrob. Ag. 32: 529-533. Lévesque, C., Piché, L., Larose, C., Roy, P.H., 1995. PCR Mapping of Integrons Reveals Several Novel Combinations of Resistance Genes. Antimicrob. Agents Ch. 1: 185-191. Tonelli, A., Badagliacca, P., Bruant, G., Letizia, A., Di Provvido, A., Harel, J., Scacchia, M., 2008. Genetic characterization of rabbit *Escherichia coli* strains with the use of Microarray Technology. 9th World Rabbit Congress, June 10-13, Verona, Italia, 1097-1102.

Tabella 1 – Percentuale dei ceppi di *Escherichia coli* resistenti ai diversi principi attivi.

Antibiotici testati	% resistenza Conigli da carne	% resistenza Conigli selvatici	% resistenza Lepri
Acido Nalidixico (Na)	36%	55%	11%
Apramicina (Apr)	24%	50%	4%
Aminosidina (AM)	100%	57%	38%
Ciprofloxacina (Cip)	24%	22.5%	n.t.
Cloramfenicolo (C)	68%	32.5%	20%
Colistina (Ct)	4%	3%	19%
Co-Trimossazolo (Sxt)	84%	58%	11%
Doxyciclina (Do)	96%	n.t.	58%
Enrofloxacin (Enr)	44%	45%	4%
Flumequina (Ub)	44%	55%	10%
Gentamicina (Cn)	84%	57%	11%
Lincomicina-Spec (LS)	96%	41%	41%
Neomicina (N)	100%	85%	92%
Norfloxacin (Nx)	8%	15%	0
Polimixina B (Pb)	12%	12%	25%
Sulfamidici (S3)	96%	78%	47%
Streptomicina (S)	100%	81%	76%
Oxitetraciclina (OT)	96%	40%	50%

Figura 1 – Fenotipo di resistenza in ceppi positivi agli integroni di classe 1.

