

Suscettibilità agli antimicrobici e ricerca di geni di resistenza in ceppi di *E. coli* enteropatogeni (EPEC) isolati da conigli diarroici in Campania

A. Cerrone, A.G. Perugini, M. Bartoli, F. Capuano

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno
Via Salute 2, 80055 Portici (NA), Italy

Corresponding Author: Dr. Anna Cerrone, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno Via Salute 2, 80055 Portici (NA), Italy - Tel. +39 081 7865229 - Fax: +39 081 7766495 - Email: annacerr@tin.it

ABSTRACT: Antimicrobial susceptibility and detection of resistance genes in enteropathogenic *E. coli* (EPEC) isolated from diarrhoeic rabbit in Campania Region. *Ninety-five rabbit enteropathogenic E. coli (EPEC) isolates recovered from diagnosed cases of colibacillosis, already examined for typical virulence-factors (intimin and fimbriae), were analyzed for susceptibility to antimicrobials of veterinary significance in rabbit meat production and genetic relatedness. Antimicrobial resistant phenotypes were observed in 100% of E. coli isolates, with the majority of isolates showing resistance to oxytetracycline (91.6%), doxycycline (88.4%), neomicin (85.2%), cephalothin (77.9%), trimethoprim-sulfamethoxazole (49.5%), amoxycillin (37.9%), gentamicin (37.9%), colistin sulphate (24.2%), flumequine (21%) apramycin (20%), amminosidine (16.8%), enrofloxacin (6.3%) and norfloxacin (1%). PCR was used to characterize genetic elements of resistance for sulfametoxazolo-trimethoprim, gentamicin, neomicin and apramycin. The results have shown the presence of genotypes in 89.3% of strains resistant to trimethoprim-sulfamethoxazole, in 36.8% of strains resistant to apramycin, in 27.8% to gentamicin and only in 1.2% to neomicin.*

Keywords: EPEC, PCR, rabbit, antibiotic-resistance.

INTRODUZIONE – Lo sviluppo e l'uso degli antibiotici è stato uno dei più importanti eventi del XX secolo nel controllo delle malattie infettive. Per contro la successiva comparsa e diffusione della resistenza agli antibiotici nei microrganismi patogeni ha reso inefficaci una serie di molecole attualmente disponibili. Molti geni per la farmacoresistenza sono localizzati a livello di elementi "genetici" mobili - ovvero *plasmidi* e/o *trasposoni*, in grado di garantire il trasferimento di tali geni in specie diverse - e *integroni*, elemento che media l'integrazione dei geni di resistenza ai farmaci attraverso un meccanismo di ricombinazione sito-specifica.

Lo scopo del lavoro è stato quello di valutare inizialmente la frequenza della resistenza agli antimicrobici a livello fenotipico in ceppi di EPEC isolati da casi clinici di malattia in allevamenti cunicoli campani. Successivamente sono stati ricercati alcuni determinanti genetici di resistenza per i quattro fenotipi maggiormente resistenti osservati in questi isolati selezionati tra le molecole più impiegate in coniglicoltura per il controllo delle infezioni ad *E. coli*.

MATERIALI E METODI – Novantacinque ceppi di *Rabbit EPEC* isolati da conigli diarroici in allevamenti campani, già esaminati per la presenza di tipici fattori di

virulenza (intimina e fimbrie), sono stati sottoposti al test di sensibilità nei confronti di alcune molecole, e alla ricerca di alcuni geni che conferiscono resistenza alle stesse. Per gli antibiogrammi e la loro interpretazione è stato utilizzato il metodo della diffusione dei dischi su piastra (Bauer *et al.*, 1966) seguendo il NCCLS standards (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1999, 2001) per le seguenti molecole: trimethoprim/sulfametoxazolo (SXT), enrofloxacin (ENx), flumequina (UB), norfloxacin (NOR), colistina solfato (CT), amoxicillina (AMX), doxiciclina (DO), oxytetraciclina (OT), gentamicina (CN), neomicina (N), amminosidina (AN), apramicina (APR), cefalotina (KF).

La PCR è stata utilizzata per caratterizzare alcuni degli elementi genetici di resistenza per trimethoprim/sulfametoxazolo, gentamicina, neomicina e apramicina (Grape *et al.*, 2003; Maynard *et al.*, 2004). Dopo l'amplificazione del DNA, eseguita con 5 µL di surnatante ottenuto da una sospensione batterica bollita per 10', gli ampliconi sono stati sottoposti ad elettroforesi in gel (agarosio 2%, TBE 1X, EtBr 0,5 µg/mL), esposti agli UV e fotografati.

RISULTATI E CONCLUSIONI – Dei 95 ceppi di *E. coli* isolati sono stati osservati fenotipi di resistenza ad uno o più antimicrobici nel 100% dei ceppi testati. In particolare sono stati riscontrate le seguenti percentuali di resistenza: ossitetraciclina (91,6%), doxiciclina (88,4%), neomicina (85,2%), cefalotina (77,9%), trimethoprim-sulfamethoxazolo (49,5%), amoxicillina (37,9%), gentamicina (37,9%), colistina solfato (24,2%), flumequina (21%) apramicina (20%), amminosidina (16,8%), enrofloxacin (6,3%) e norfloxacin (1%). Questi dati sono in accordo con quanto riportato in altri studi nei quali l'uso in particolare di penicilline, sulfonamidi, tetracicline e aminoglicosidi viene indicato come l'elemento chiave nella emergenza del fenomeno dell'antibiotico-resistenza da parte di ceppi di *E. coli* (Schroeder *et al.*, 2002). I risultati delle PCR sono sintetizzati nella Tabella 1. Tutti gli isolati sono stati analizzati per la presenza di geni che conferiscono resistenza a più molecole appartenenti alla stessa famiglia (Mathew *et al.*, 2003, Maynard *et al.*, 2003). In particolare per gli aminoglicosidi gli isolati sono stati sottoposti alla ricerca di 5 geni sebbene due markers, *aph(3')*-Ia e *aph(3')*-IIa, non siano stati trovati in alcun ceppo. Dall'analisi è emersa la presenza di *markers* genetici nell'89,3% dei ceppi resistenti al trimethoprim-sulfamethoxazolo, nel 36,8% di quelli resistenti all'apramicina, nel 27,8% dei resistenti alla gentamicina e solo nell'1,2% di quelli resistenti alla neomicina.

I risultati ottenuti, che evidenziano la presenza di geni di resistenza anche in ceppi con un soddisfacente livello di sensibilità *in vitro* a determinate molecole, sottolineano come con l'aiuto di tecniche molecolari di amplificazione sia possibile identificare fenotipi emergenti di antibiotico resistenza ed acquisire importanti conoscenze sulla distribuzione e diffusione di *markers* di resistenza nell'ambito delle diverse specie. Tale aspetto diviene rilevante per comprendere i molteplici insuccessi terapeutici sovente registrati in campo, dove l'effetto dell'ambiente (stress), soprattutto se associato a somministrazioni di dosi subterapeutiche di farmaco e/o interventi contemporanei con un secondo antibiotico, può incrementare la persistenza o favorire la comparsa dei fenomeni di resistenza. Analogamente la fase dello svezzamento (modificazioni del pH e del contenuto in acidi dell'intestino) può innalzare la capacità dei batteri ad acquisire geni di resistenza o permettere ai sub-tipi resistenti che sono in genere presenti in numero piuttosto contenuto, di trarre vantaggio da tale condizione fino ad aumentare e costituire la maggior parte della microflora intestinale (Mathew *et al.*, 2003).

Tabella 1 - Distribuzione dei *markers* di resistenza nelle diverse categorie commerciali e correlazione con il fenotipo (Sensibile, Intermedio, Resistente) e distribuzione dei geni eae AF/R1 e AF/R2, rispettivamente codificanti per l'intimina, l'attaching factor/rabbit 1 e attaching factor/rabbit 2

MOLECOLA		MARKER GENETICO	CATEGORIA COMMERCIALE												EAE (36 ceppi positivi)	AF/R1 (15 ceppi positivi)	AF/R2 (21 ceppi positivi)
			N° ceppi positivi per ciascun markers genetico/ totale ceppi suddivisi per fenotipo e classe di appartenenza della molecola testata														
			Fattrici (ceppi totali:13)			Lattanti 0- 28 gg di età (ceppi totali: 19)			Svezzati 29- 40 gg di età (ceppi totali: 31)			Ingrasso 41 - 80 gg di età (ceppi totali: 32)					
S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R			
BENZYL - PIRIMIDINE	Trimethoprim (dhfr)	I	1/7	0/0	5/6	2/14	0/0	4/5	0/15	0/0	7/16	0/12	0/0	19/20	7	4	3
		V	0/7	0/0	0/6	0/14	0/0	1/5	0/15	0/0	0/16	0/12	0/0	0/20	0	0	0
		VII	0/7	0/0	2/6	3/14	0/0	2/5	4/15	0/0	3/16	3/12	0/0	9/20	6	2	4
		IX	0/7	0/0	0/6	0/14	0/0	0/5	0/15	0/0	2/16	2/12	0/0	2/20	2	1	1
		XIII	0/7	0/0	0/6	0/14	0/0	1/5	2/15	0/0	1/16	0/12	0/0	0/20	3	1	2
	Sulfonamidi	SulII	4/7	0/0	5/6	3/14	0/0	3/5	5/15	0/0	11/16	1/12	0/0	15/20	12	8	4
		SulIII	1/7	0/0	5/6	6/14	0/0	3/5	4/15	0/0	9/16	2/12	0/0	15/20	8	3	5
AMINOGLICOSIDI	Gentamicina	Aac(3) -IV	1/6	0/4	0/3	0/9	0/0	5/10	2/17	1/3	4/11	1/15	0/5	4/12	6	2	4
		aadB	0/6	0/4	0/3	0/9	0/0	0/10	1/17	0/3	0/11	0/15	0/5	1/12	2	1	0
		aaaC2	0/6	0/4	0/3	0/9	0/0	0/10	1/17	0/3	1/11	0/15	0/5	0/12	1	0	1
	Neomicina & Kanamicina	aphA1	0/0	0/0	0/13	0/0	0/6	0/13	0/0	0/2	0/29	0/0	0/6	0/26	0	0	0
		aphA2	0/0	0/0	0/13	0/0	0/6	0/13	0/0	0/2	0/29	0/0	0/6	0/26	0	0	0
		aadB	0/7	0/0	0/13	0/0	0/6	0/13	0/0	0/2	0/29	0/0	1/6	0/26	0	1	0
	Apramicina	Aac(3) - IV	1/8	0/3	0/2	0/11	0/1	5/7	2/24	1/3	4/4	1/23	0/3	4/6	6	2	4

BIBLIOGRAFIA – **Bauer, A.W.**, Kirby, W.M., Sherris, J.C., Turck M., 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45, 493-496. **Fontana, R.**, Cornaglia, G., 2000. L'antibiogramma. Ed. Piccin. **Grape, M.**, Sundström, L., and Kronvall, G. 2003. Sulphonamide resistance gene sul 3 found in *Escherichia coli* isolates from human sources. *J Antimicrob Chemother.* 52: 1022-1024. **Mathew, A.G.**, Arnett, D.B., Cullen, P., Ebner, P.D., 2003. Characterization of resistance patterns and detection of apramycin resistance genes in *Escherichia coli* isolated from swine exposed to various environmental conditions. *Int J Food Microbiol.* 89: 11-20. **Maynard, C.**, Fairbrother, J.M., Bekal, S., Sanschagrín, F., Levesque, R. C., Brousseau, R., Masson, L., Larivière, S., and Harel, J. 2003. Antimicrobial resistance genes in enterotoxigenic *Escherichia coli* O149:K91 isolates obtained over a 23-year period from pigs. *Antimicrob Agents Chemother.* 47(10): 3214-3221. **Maynard, C.**, Bekal, S., Sanschagrín, F., Levesque, R. C., Brousseau, R., Masson, L., Larivière, S., and Harel, J., 2004. Heterogeneity among virulence and antimicrobial resistance gene profiles of extraintestinal *Escherichia coli* isolates of animal and human origin. *J. Clin. Microbiol.*, 42 (12): 5444-5452. **National Committee for Clinical Laboratory Standards**, 1999. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria isolated from Animals Approved Standard M31A, vol. 19, No.11. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA. **National Committee for Clinical Laboratory Standards**, 2001. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing M100-S11, vol. 21, No.1. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA. **Schroeder, C.M.**, Meng, J., Zhao, S., DebRoy, C., Torcolini, J., Zhao, C., McDermott, P.F., Wagner, D.D., Walker, R.D., White D.G., 2002. Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* O26, O103, O111, O128, and O145 from Animals and humans. *Emerging Infectious Diseases.* Vol. 8, No. 12, 1409-1414.