

**PATTERN DI RESISTENZA AGLI ANTIMICROBICI DI CEPPI DI
E. COLI ENTEROTOSSIGENI (ETEC) E CEPPI DI
E. COLI COMMENSALI ISOLATI IN SUINETTI CON DIARREA
NEONATALE**

***ANTIMICROBIAL RESISTANCE PATTERNS OF
ENTEROTOXIGENIC E. COLI (ETEC) AND COMMENSAL
E. COLI STRAINS ISOLATED IN PIGLETS WITH NEONATAL
DIARRHOEA***

DE LORENZI G., ALBORALI G.L., BALDO V., TONNI M., GIOVANNINI S.,
SCABURRI A., CERIOLI M.P., BELLINI S.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER),
Brescia, Italy*

Parole chiave: Antimicrobico resistenza, Diarrea neonatale, ETEC

Key words: Antimicrobial resistance, Neonatal diarrhoea, ETEC

RIASSUNTO

In questo studio sono stati inclusi 272 ceppi di *E. coli* isolati da carcasse, feci e tamponi rettali di suinetti con diarrea neonatale conferiti presso l'IZSLER di Brescia tra gennaio 2017 e dicembre 2018. I ceppi sono stati genotipizzati utilizzando una metodica multiplex PCR per i geni codificanti le fimbrie (F4, F5, F6, F18, F41) e le tossine (STa, STb, LT e Stx2e). I ceppi con fimbrie e tossine (n. 50) sono stati classificati come ETEC, mentre i ceppi non genotipizzabili (n. 222) sono stati classificati come ceppi commensali. La suscettibilità ad un pannello di antibiotici è stata testata per i ceppi ETEC e i ceppi commensali mediante antibiogramma con metodo Kirby – Bauer seguendo le procedure del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). I ceppi sono stati classificati suscettibili, intermedi o resistenti interpretando le zone di inibizione di crescita. Gli ETEC hanno mostrato un maggior tasso di resistenza ad ampicillina (94%), tetraciclina (92%), kanamicina (66%), trimetoprim + sulfametossazolo (63%) ed enrofloxacin (56%), mentre i commensali hanno evidenziato elevati livelli di resistenza ad ampicillina (94%), tetraciclina (88%), trimetoprim + sulfametossazolo (73%), enrofloxacin (65%), cefazolina (57%) e kanamicina (51%). Il 78% dei ceppi ETEC e l'80% dei ceppi commensali sono risultati multi-resistenti. I risultati di questo studio mostrano un elevato tasso di resistenze agli antimicrobici testati, suggerendo l'importanza del monitoraggio della resistenza agli antimicrobici, in particolare a quelli di importanza critica per l'uomo.

ABSTRACT

In the period between January 2017 and December 2018, 272 *E. coli* strains were isolated from intestines and faecal swabs of piglets with neonatal diarrhoea belonging to Italian pig herds in Northern Italy. Among these isolates, 50 were identified as ETEC by multiplex PCR for virulence factors (F4, F5, F6, F18, F41, STa STb, LT and Stx2e), while 222, negative for virulence factors were considered commensal strains. Pathogenic and commensals *E. coli* were analysed for their susceptibility to a standard panel of antimicrobials using the disc diffusion method, following the procedures of Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). All strains were classified as sensitive, resistant or intermediate to the antimicrobials by interpreting the zones of growth inhibition. The highest resistance

rates in ETEC were found for ampicillin (94%), tetracyclin (92%), kanamycin (66%), trimethoprim + sulphamethoxazole (63%), enrofloxacin (56%), and, while in commensal *E. coli* the highest resistance rates were found for ampicillin (94%), tetracyclin (88%), trimethoprim + sulphamethoxazole (73%), enrofloxacin (65%), cephazolin (57%), and kanamycin (51%). Multi-drug resistance was observed in ETEC (78%) and commensal isolates (80%). The results of this study show a high rate of resistance to the tested antimicrobials, suggesting the importance of monitoring resistance to antimicrobials, in particular to those of critical importance for humans.

INTRODUZIONE

E. coli costituisce parte della flora batterica autoctona dell'intestino del suino e comprende ceppi commensali e ceppi patogeni. Questi ultimi, in presenza di fattori predisponenti legati all'ospite e all'ambiente, possono causare la comparsa di malattia. Tra i ceppi di *E. coli* patogeni, i ceppi enterotossigeni (ETEC) rappresentano una delle principali cause di diarrea neonatale e un'importante causa di perdite economiche nell'allevamento suino. Questa malattia colpisce generalmente gli animali nella prima settimana di vita, momento in cui i suinetti sono esposti ad un ambiente contaminato dalla flora batterica della madre. La morbilità è generalmente variabile (dal 30% all'80%) e la mortalità può interessare fino al 70% della nidiata (Merialdi, 2013). I suinetti presentano diarrea secretoria e conseguente disidratazione, mentre in alcuni la malattia ha un decorso iperacuto e può causare morte improvvisa. In presenza di fattori di rischio predisponenti, tra i quali i più importanti riguardano il livello di immunità passiva trasferito dalla madre ai suinetti attraverso il colostro e soprattutto il latte (basso titolo di anticorpi specifici nel colostro e nel latte che inibiscano l'adesione di *E. coli* patogeni all'intestino) e temperatura ambientale inferiore a 25°C, i ceppi ETEC agenti di diarrea neonatale possono prendere il sopravvento sulle altre popolazioni batteriche presenti a livello intestinale divenendo preponderanti. In queste condizioni i ceppi ETEC sono in grado di aderire e colonizzare la mucosa del piccolo intestino e di produrre le tossine che alterano il flusso acqua-elettroliti nel piccolo intestino, determinando la comparsa di diarrea. L'adesione a recettori specifici localizzati sulle cellule epiteliali è mediata da fimbrie o fattori di adesione localizzati sulla superficie del batterio. Gli antigeni fimbriali che si rinvencono più frequentemente nei ceppi ETEC agenti di diarrea neonatale nel suino sono F4 (K88), F5 (K99), F6 (K987P) e F41 (Fairbrother e Nadeau, 2019) e producono generalmente la tossina termostabile STa. La terapia della colibacillosi si basa sulla somministrazione di antibiotici in grado di raggiungere concentrazioni terapeutiche nel lume intestinale. Tuttavia il successo della terapia antibiotica è reso incerto dalla diffusa presenza di antibiotico-resistenze nei confronti degli antimicrobici comunemente impiegati nella terapia della colibacillosi del suino, come dimostrato da uno studio recentemente condotto in Italia (Luppi et al., 2013). I ceppi di *E. coli* commensali e patogeni possono acquisire resistenza agli antimicrobici utilizzati nel trattamento delle patologie nel suino e i ceppi commensali possono fungere da serbatoio di geni di resistenza per i ceppi patogeni (Blake et al., 2003a; Blake et al., 2003b; Kim et al., 2005). Per queste ragioni *E. coli* rappresenta un valido modello di studio sulla diffusione dell'antibiotico resistenza sia in medicina umana che in medicina veterinaria (Schierack et al., 2009).

L'obiettivo di questo studio è quello di valutare e comparare la resistenza agli antimicrobici di ceppi di *E. coli* enterotossigeni (ETEC) e ceppi di *E. coli* commensali isolati in suinetti con diarrea neonatale provenienti da aziende di riproduzione (siti 1) nel nord Italia.

MATERIALI E METODI

Nel presente studio sono stati inclusi 272 ceppi di *E. coli* isolati da feci, tamponi rettali e intestini di suinetti con diarrea neonatale conferiti alla sezione diagnostica di Brescia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER) nel periodo compreso tra gennaio 2017 e dicembre 2018. I focolai di diarrea neonatale si erano verificati in aziende da riproduzione (siti 1) nel Nord Italia.

Le feci, i tamponi rettali e il contenuto intestinale sono stati seminati su terreno Agar sangue al 5% ed incubati a 37°C per 24 ore in ambiente aerobio. Dopo il periodo di incubazione è stata eseguita una valutazione morfologica delle colonie cresciute su Agar sangue e la conferma biochimica. I ceppi di *E. coli* isolati sono stati sottoposti a genotipizzazione impiegando una metodica multiplex PCR per i geni codificanti le fimbrie (F4, F5, F6, F18 e F41) e le tossine (STa, STb, LT e Stx2e) (Casey e Bosworth, 2009). La suscettibilità agli antibiotici dei ceppi di *E. coli* isolati è stata testata mediante antibiogramma con metodo Kirby – Bauer seguendo le procedure del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) utilizzando un pannello di 9 antimicrobici che comprende: ampicillina, amoxicillina + acido clavulanico, cefazolina, enrofloxacin, florfenicolo, gentamicina, kanamicina, tetraciclina e trimetoprim + sulfametossazolo. I ceppi sono stati classificati suscettibili, intermedi o resistenti dopo misurazione delle zone di inibizione di crescita in accordo con il CLSI.

RISULTATI

Sul totale di 272 ceppi di *E. coli* isolati, la genotipizzazione mediante multiplex PCR ha permesso di individuare 50 ceppi ETEC, positivi per i fattori di virulenza, mentre i restanti 222 ceppi, negativi per i fattori di virulenza, sono stati considerati ceppi commensali. La tabella 1 mostra i virotipi e la prevalenza dei ceppi ETEC inclusi in questo studio. I risultati della suscettibilità agli antimicrobici dei ceppi ETEC sono riportati in Tabella 2. I risultati della suscettibilità agli antimicrobici dei ceppi di *E. coli* commensali sono riportati in Tabella 3.

Tabella 1. Virotipi prevalenti tra i 50 ceppi ETEC isolati in focolai di diarrea neonatale in Nord Italia tra gennaio 2017 e dicembre 2018.

Table 1. Prevalent virotypes among the 50 ETEC strains isolated from neonatal diarrhoea outbreaks in Northern Italy from January 2017 to December 2018.

Virotipi	Prevalenza
F4, STa, STb	4%
F4, F41, STb, LT	6%
F4, STb, LT	6%
F4, F18, STa, STb	8%
F5, STa	14%
F5, F41	28%
STa, STb (fattori di adesione non determinati)	34%

Tabella 2. Suscettibilità agli antimicrobici dei ceppi ETEC. I tassi di resistenza più elevati sono evidenziati in grigio.

Table 2. ETEC antimicrobial susceptibility. The highests resistance rates are highlighted in gray.

Antibiotico	N. tot campioni	N. ceppi sensibili	N. ceppi intermedi	N. ceppi resistenti	% Ceppi sensibili	% Ceppi intermedi	% Ceppi resistenti
Amoxicillina + AcClavulanico	48	37	5	6	77%	10%	13%
Ampicillina	18	1	0	17	6%	0%	94%
Cefazolina	20	8	1	11	40%	5%	55%
Enrofloxacin	50	20	2	28	40%	4%	56%
Florfenicolo	50	29	5	16	58%	10%	32%
Gentamicina	50	29	0	21	58%	0%	42%
Kanamicina	41	13	1	27	32%	2%	66%
Tetraciclina	50	3	1	46	6%	2%	92%
Trimetoprim + Sulfonamidi	43	16	0	27	37%	0%	63%

Tabella 3. Suscettibilità agli antimicrobici dei ceppi di *E. coli* commensali, negativi per i fattori di virulenza. I tassi di resistenza più elevati sono evidenziati in grigio.

Table 3. *E. coli* commensal strains antimicrobial susceptibility. The highests resistance rates are highlighted in gray.

Antibiotico	N. tot campioni	N. ceppi sensibili	N. ceppi intermedi	N. ceppi resistenti	% Ceppi sensibili	% Ceppi intermedi	% Ceppi resistenti
Amoxicillina + AcClavulanico	211	132	34	45	63%	16%	21%
Ampicillina	104	5	1	98	5%	1%	94%
Cefazolina	104	30	15	59	29%	14%	57%
Enrofloxacin	222	66	10	146	30%	5%	65%
Florfenicolo	222	128	26	68	58%	12%	31%
Gentamicina	222	141	1	80	64%	0%	36%
Kanamicina	176	78	9	89	44%	5%	51%
Tetraciclina	222	19	6	197	9%	3%	88%
Trimetoprim + Sulfonamidi	222	58	3	161	26%	1%	73%

I tassi di resistenza più elevati dei ceppi ETEC sono stati osservati per ampicillina (94%), tetraciclina (92%), kanamicina (66%), trimetoprim + sulfametossazolo (63%) ed enrofloxacin (56%) mentre i ceppi di *E. coli* commensali hanno mostrato maggiori tassi di resistenza per ampicillina (94%), tetraciclina (88%), trimetoprim + sulfametossazolo (73%), enrofloxacin (65%), cefazolina (57%) e kanamicina (51%).

In questo studio sono stati inoltre osservati alti tassi di multi-resistenza. Il 78% dei ceppi ETEC e l'80% dei ceppi commensali sono risultati infatti resistenti a 3 o più antimicrobici.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

In questo studio è stata valutata la suscettibilità agli antimicrobici principalmente utilizzati nel trattamento della colibacillosi neonatale di ceppi di *E. coli* ETEC e di ceppi di *E. coli* commensali. In accordo con i dati bibliografici più recenti, i risultati mostrano elevati tassi di resistenza dei ceppi ETEC e commensali ad: ampicillina, cefazolina, enrofloxacin, kanamicina, tetraciclina e all'associazione sulfamidico + trimetoprim. In uno studio condotto in Italia con l'obiettivo di valutare l'andamento della resistenza di ceppi ETEC isolati in un periodo di 10 anni (2002–2011), i ceppi isolati avevano mostrato un andamento statisticamente significativo all'incremento della resistenza ad enrofloxacin, flumequina e cefquinome. Una resistenza crescente (non statisticamente significativa) era stata osservata anche nei confronti di gentamicina, apramicina e all'associazione sulfamidico + trimetoprim (Luppi et al., 2015). La resistenza all'enrofloxacin è stata descritta in ceppi di *E. coli* isolati in Brasile, in cui il 30% dei ceppi isolati da casi di colibacillosi neonatale sono risultati resistenti (Costa et al., 2010). La resistenza ai fluorochinoloni in particolare è fortemente correlata alla quantità di farmaco utilizzato e al trasferimento da parte di plasmidi di geni di resistenza (Barton, 2014). La resistenza alle beta-lattamine e all'associazione sulfamidico + trimetoprim è stata largamente riportata nella colibacillosi nel suino, così come nei ceppi di *E. coli* commensali isolati sia da suini che da campioni ambientali (Costa et al., 2006; Lu et al. 2010). I risultati di questo studio hanno messo in evidenza un elevato tasso di multi-resistenza tra i ceppi isolati. Il 78% dei ceppi ETEC è risultato resistente a 3 o più antibiotici testati, mentre un tasso di multi-resistenza pari all'80% è stato osservato nei ceppi commensali.

Gli antimicrobici sono stati ampiamente utilizzati nell'allevamento intensivo del suino a scopo terapeutico, metafilattico e profilattico e la conseguente pressione selettiva ha intensificato il rischio di comparsa di batteri resistenti (Jensen et al., 2006; Kozak et al., 2009).

Considerando la relazione esistente tra l'uso degli antimicrobici negli animali da reddito e l'antimicrobico-resistenza nell'uomo, tale problematica richiede un approccio integrato in un'ottica "One Health" volto alla riduzione del consumo di antimicrobico sia in campo umano che in medicina veterinaria.

I risultati ottenuti in questo studio costituiscono un motivo di preoccupazione sia in ambito di salute umana, per il possibile trasferimento di geni di resistenza da ceppi suini a ceppi umani, sia in ambito di sanità animale. I ceppi multi-resistenti, infatti, creano non poche problematiche in termini di approccio terapeutico, rendendo difficoltoso il controllo della colibacillosi a livello aziendale. La diffusione dell'antimicrobico-resistenza nei ceppi di *E. coli* patogeni e nei ceppi commensali è collegata alla presenza di un elevato numero di geni di resistenza (Boerlin et al., 2005). Lo sviluppo di resistenze da parte di ceppi di *E. coli* patogeni e commensali ad un ampio range di antibiotici utilizzati nell'allevamento suinicolo e la presenza di resistenze nei ceppi commensali agli antibiotici di importanza critica per l'uomo, rappresentano una fonte di preoccupazione a livello globale (Brisola et al., 2019). In particolare, l'elevato tasso di resistenza all'enrofloxacin evidenziato in questo studio costituisce motivo di preoccupazione, considerando il ruolo essenziale dei fluorochinoloni nel trattamento delle infezioni nell'uomo. Nelle enterobatteriacee uno dei principali meccanismi di resistenza ai fluorochinoloni, agli antibiotici betalattamici e alle cefalosporine è mediato da plasmidi che possono conferire resistenza a ceppi patogeni, sia negli animali, che nell'uomo. I risultati di questo studio suggeriscono l'importanza di continuare a monitorare la resistenza agli antimicrobici di ceppi patogeni e ceppi commensali, in particolare a quelli di importanza critica per l'uomo.

BIBLIOGRAFIA

1. Barton M.D. (2014) "Impact of antibiotic use in the swine industry". *Curr Opin Microbiol.* 19, 9–15.
2. Blake D.P., Hillman K., Fenlon D.R., Low J.C. (2003) "Transfer of antibiotic resistance

- between commensal and pathogenic members of the Enterobacteriaceae under ileal conditions". *J Appl Microbiol.* 95, 428-436. A
3. Blake D.P., Humphry R.W., Scott K.P., Hillman K., Fenlon D.R., Low J.C. (2003) "Influence of tetracycline exposure on tetracycline resistance and the carriage of tetracycline resistance genes within commensal *Escherichia coli* populations". *J Appl Microbiol.* 94, 1087-97. B
 4. Boerlin P., Travis R., Gyles C.L., Reid-Smith R., Janecko N., Lim H., Nicholson V., McEwen S.A., Friendship R., Archambault M. (2005) "Antimicrobial resistance and virulence genes of *Escherichia coli* isolates from swine in Ontario". *Appl Environ Microbiol.* 71, 6753-6761.
 5. Burch, D. G. S. (2013) "Antimicrobial Drug use in swine" in Giguère S, Prescott JF, Dowling PM, editors. "Antimicrobial Therapy in Veterinary Medicine", 5th ed., Iowa: Wiley Blackwell. Iowa State University Press.
 6. Casey T.A., Bosworth B.T. (2009) "Design and evaluation of a multiplex polymerase chain reaction assay for the simultaneous identification of genes for nine different virulence factors associated with *Escherichia coli* that cause diarrhea and edema disease in swine". *J Vet Diagn Invest.* 21, 25-30.
 7. CLSI M31-A3: Performance standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility tests for Bacteria Isolated From Animals; Approved Standards – Third Edition, vol. 28 n. 8, 2008.
 8. Costa M.M., Silva M.S., Spricigo D.A., Witt N.M., Marchioro S.B., Kolling L., Vargas A.P.C. (2006) "Epidemiology, molecular characterization and resistance to antimicrobials of *Escherichia coli* isolated from South-Brazilian pig herds". *Pesquisa Veterinária Brasileira.* 26, 5-8.
 9. Costa M.M., Drescher G., Maboni F., Weber S.S., Schrank A., Vainstein M.H., et al. (2010) "Virulence factors, antimicrobial resistance, and plasmid content of *Escherichia coli* isolated in swine commercial farms". *Arg Bras Med Vet Zootec.* 62, 30-36.
 10. Fairbrother J.M. and Nadeau E. (2019) "Colibacillosis" in: Zimmerman J.J., Karriker L.A., Ramirez A., Schwartz K.J., Stevenson G.W., Zhang J. "Diseases of swine", 11a ed., UK: Wiley-Blackwell, 807-817.
 11. Jensen V.F., Jakobsen L., Emborg H.D., Seyfarth A.M., Hammerum A.M. (2006) "Correlation between apramycin and gentamicin use in pigs and an increasing reservoir of gentamicin-resistant *Escherichia coli*". *J Antimicrob Chemother.* 58, 101-107.
 12. Kim L.M., Gray J.T., Harmon B.G., Jones R.D., Fedorka-Cray P.J. (2005) "Susceptibility of *Escherichia coli* from growing piglets receiving antimicrobial feed additives". *Foodborne Pathog Dis.* Winter. 2, 304-316.
 13. Kozak G.K., Boerlin P., Janecko N., Reid-Smith R.J., Jardine C. (2009) "Antimicrobial resistance in *Escherichia coli* isolates from swine and wild small mammals in the proximity of swine farms and in natural environments in Ontario, Canada". *Appl Environ Microbiol.* 75, 559-566.
 14. Lu L., Dai L., Wang Y., Wu C., Chen X., Li L., Qi Y., Xia L., Shen J. (2010) "Characterization of antimicrobial resistance and integrons among *Escherichia coli* isolated from animal farms in Eastern China". *Acta Trop.* 113, 20-25.
 15. Luppi A., Bonilauri P., Dottori M., GherPELLI Y., Biasi G., Merialdi G., et al. (2015) "Antimicrobial resistance of F4+ *Escherichia coli* isolated from Swine in Italy". *Transbound Emerg Dis.* 62, 67-71.
 16. Merialdi G. (2013) "Colibacillosi" in: Martelli P. "Le patologie del maiale", Point Veterinaire Italie, Milano, 453-464.
 17. Schierack P., Kadlec K., Guenther S., Filter M., Schwarz S., Ewers C., Wieler L.H. (2009) "Antimicrobial resistances do not affect colonization parameters of intestinal *E. coli* in a small piglet group". *Gut Pathog.* 1, 18.