

RESISTENZA AGLI ANTIBIOTICI DI CEPPI DI *ESCHERICHIA COLI* F4+ ISOLATI DAL SUINO NEL PERIODO 2002-2011.

ANTIMICROBIAL RESISTANCE OF *ESCHERICHIA COLI* F4+ STRAINS ISOLATED FROM SWINE IN THE YEARS FROM 2002 TO 2011

LUPPI A., BONILAURI P., GHERPELLI Y., MAIOLI G., BIASI G.,
DOTTORI M., MERIALDI G.

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER)

Parole chiave: *Escherichia coli* F4+, antibiotico-resistenza, antibiogramma, Kirby Bauer

Key words: *Escherichia coli* F4+, antimicrobial-resistance, disk diffusion method, Kirby Bauer

Riassunto

Nel periodo 2002-2011 442 ceppi di *Escherichia coli* F4+ isolati da suini con diarrea, allevati in aziende ubicate nel Nord Italia, sono stati testati per la sensibilità a 13 antibiotici tramite antibiogramma. Attraverso un'analisi di regressione lineare, test ANOVA, è stato valutato il trend di sensibilità dei ceppi di *E.coli* agli antibatterici impiegati, considerando i risultati ottenuti da ogni antibiotico per ogni anno a confronto con quelli dell'anno precedente. I ceppi batterici hanno evidenziato, nell'intero periodo dello studio, un trend in diminuzione della sensibilità statisticamente significativo ($P < 0.05$) nei confronti di enrofloxacin (da 85,5% a 10,7%), marbofloxacin (da 94,6% a 39,3%), flumequina (da 50,9% a 7,1%), danofloxacin (da 78,4% a 20%), aminosidina (da 54,6% a 28,6%), florfenicolo (da 90,2% a 35,7%) e cefquinome (da 96,2% a 56%). Una riduzione della sensibilità, statisticamente non significativa, è stata comunque osservata anche per gentamicina (da 36% a 14,3%), apramicina (da 38,2% a 17,9%), trimethoprim-sufametossazolo (da 25% a 10,7%), eritromicina (da 7,6% a 0%) e tetraciclina (da 2,6% a 0%). La colistina non ha fatto registrare variazioni significative (da 41,8% a 46,4%). I ceppi di *E.coli* F4+ sono stati suddivisi in tre classi sulla base della valutazione della multi-resistenza: I. ceppi resistenti a 2-5 antibiotici; II. ceppi resistenti a 6-10 antibiotici; III. ceppi resistenti a più di 10 antibiotici. Considerando l'intero periodo dello studio i ceppi appartenenti alla prima classe di multi-resistenza hanno evidenziato un decremento statisticamente significativo ($P < 0.05$; R^2 0.96; r -0.97). Al contrario, i ceppi appartenenti alla seconda e terza classe di multi-resistenza hanno mostrato un incremento statisticamente significativo ($P < 0.05$; R^2 0.86; r 0.92 e $P < 0.05$; R^2 0.75; r 0.86 rispettivamente). I risultati del presente lavoro hanno evidenziato, nel periodo 2002-2011, un decremento statisticamente significativo della sensibilità antibiotica degli isolati di *E.coli* F4+ ed un incremento dei ceppi multi-resistenti appartenenti alle classi II e III.

Summary

Four-hundred forty-two F4+ pathogenic *Escherichia coli* were isolated, from 2002 to 2011, from pigs with diarrhea from Northern Italy swine herds. The strains were analyzed for their susceptibility to 13 antimicrobials by disk diffusion method. The trend of susceptibility of *E.coli* strains was determined using the linear regression analysis, test ANOVA. During the study observation period a statistically significant decreasing trend ($P < 0.05$) in susceptibility was recorded for enrofloxacin (from 85,5% to 10,7%), marbofloxacin (from 94,6% to 39,3%), flumequine (from 50,9% to 7,1%), danofloxacin (from 78,4% to 20%), aminosidine (from

54,6% to 28,6%), florfenicol (from 90,2% to 35,7%), cefquinome (from 96,2% to 56%). A decrease in susceptibility (not statistically significant) was also observed for gentamicin (from 36% to 14,3%), apramycin (from 38,2% to 17,9%), trimethoprim-sulphamethoxazole (from 25% to 10,7%), tetracycline (from 2,6% to 0%) and erythromycin (from 7,6% to 0%). Susceptibility rate to colistin (from 41,8% to 46,4) did not change significantly over the study period. Based on antimicrobial multi-resistance, the strains were collected into three groups: I. resistant to 2-5 antimicrobials; II. resistant to 6-10 antimicrobials; III. resistant to > 10 antimicrobials. The number of isolates belonging to the first group showed a statistically significant decrease ($P < 0.05$; R^2 0.96; r -0.97). Isolates belonging to the third and second groups showed a statistically significant increase ($P < 0.05$; R^2 0.86; r 0.92 and $P < 0.05$; R^2 0.75; r 0.86 respectively). A significant decrease in susceptibility to antimicrobials and an increasing of *E.coli* F4+ multi-resistant strains was observed from 2002 to 2011. This indicates the need for continued surveillance studies so that appropriate strategies can be developed to contrast the development of resistance in these and other pathogens.

INTRODUZIONE

L'incremento dell'antibiotico-resistenza in ceppi batterici patogeni e commensali di origine animale rappresenta uno dei temi di attualità sia in medicina veterinaria sia umana. Questo argomento è pertanto al centro delle preoccupazioni sanitarie sia nazionali sia sovranazionali e spesso, in modo più o meno opportuno, gran parte dell'attenzione è rivolta alla medicina veterinaria ed al ruolo della terapia antimicrobica nelle popolazioni animali nell'insorgenza di fenomeni di antibiotico-resistenza. In questo contesto l'Unione Europea decise nel 1999 di vietare alcuni antibiotici promotori della crescita negli animali da reddito, contenenti principi attivi impiegati anche in medicina umana. A partire dal 1 gennaio 2006, infine, l'UE ha vietato l'utilizzo dei restanti antimicrobici utilizzati come promotori della crescita (reg. 1831/2003).

L'impiego degli antibiotici nell'allevamento suino, così come per altre specie allevate intensivamente, è uno strumento necessario per raggiungere standards produttivi ottimali ma ha come punto critico la possibilità che vengano selezionati ceppi batterici resistenti (Fairbrother et al., 2005). Inoltre, l'impiego irrazionale di farmaci antibatterici, sia in termini di frequenza sia di modalità d'impiego (ad esempio uso profilattico di certe molecole) ha costituito e costituisce tutt'ora un punto critico per l'insorgenza di fenomeni di antibiotico-resistenza. Per la valutazione di questi ultimi *E.coli* può essere considerato un batterio marker, in quanto è in grado di acquisire resistenza nei confronti di numerosi antibatterici e pertanto può essere utilizzato come microrganismo indicatore sull'uso degli antimicrobici. Oltre a questo *E.coli* può comportarsi come reservoir di geni di antibiotico-resistenza, con la possibilità che questi possano essere trasferiti ad altri batteri patogeni per gli animali e per l'uomo e rappresentare quindi un punto chiave nella trasmissione orizzontale della resistenza (Burch, 2005).

Da un punto di vista pratico, infine, *E.coli* rappresenta uno dei patogeni più importanti nell'ambito della patologia suina, essendo responsabile di forme enteriche (diarrea neonatale e post-svezzamento), di gastroenteriti emorragiche, della malattia degli edemi e di fenomeni setticemici che sono alla base di gravi perdite economiche ed è quindi importante poter disporre di farmaci in grado di contrastare le infezioni e le forme cliniche precedentemente descritte.

In studi eseguiti in passato in Italia, riguardanti la sensibilità agli antibiotici di ceppi di *E.coli* isolati dal suino, emerge una certa variabilità nel tempo delle prevalenze di

sensibilità ai singoli principi attivi dei microrganismi testati (Barigazzi et al, 2001; Barigazzi et al., 2007). Questa tendenza è stata confermata da altri autori, con differenze talvolta significative tra paesi diversi (Yashpal et al., 2011).

Con il presente lavoro si è voluto indagare, attraverso uno studio retrospettivo, il tasso di sensibilità agli antibatterici, il trend di sensibilità ed il fenomeno della multi-resistenza dei ceppi di *E.coli* F4+ isolati dal suino nel periodo 2002-2011.

MATERIALI E METODI

Ceppi batterici

Nel presente studio sono stati impiegati 442 ceppi di *E.coli* F4+ provenienti dall'attività diagnostica di routine della sezione di Reggio Emilia (IZSLER) nel periodo gennaio 2002 – dicembre 2011. I ceppi batterici sono stati ottenuti dalla semina di materiale patologico prelevato da suini con patologia enterica ed appartenenti ad allevamenti ubicati nel Nord Italia. L'isolamento dei ceppi è stato eseguito su terreno colturale agar sangue, con incubazione in termostato a 37°C, ed identificazione tramite metodi biochimici e sierologici standard.

Sensibilità agli antibiotici

I ceppi di *E.coli* F4+ isolati sono stati testati per valutare la loro sensibilità nei confronti di un pannello di 13 antibiotici: aminosidina (60 µg), apramicina (15 µg), cefquinome (10 µg), colistina (10 µg), danofloxacina (5 µg), enrofloxacina (5 µg), eritromicina (15 µg), florfenicolo (30 µg), flumequina (30 µg), gentamicina (10 µg), marbofloxacina (5 µg), tetraciclina (30 µg) e trimetoprim-sulfametossazolo (1,25/23,75 µg). L'antibiogramma secondo Kirby Bauer è stato eseguito seguendo un metodo di prova interno basato su standards noti (NCCLS, 2003 e 2004) e l'interpretazione ha utilizzato le chiavi interpretative internazionalmente riconosciute (NCCLS, 2003 e 2004). Gli antibiogrammi hanno fornito pertanto, per ogni antibiotico impiegato, un risultato qualitativo espresso come "S, R o I" a seconda che il ceppo batterico in esame abbia mostrato rispettivamente sensibilità, resistenza o una condizione intermedia tra le prime due, ad una determinata molecola antibiotica.

Analisi statistica

Il tasso di sensibilità nei confronti di ciascun antibatterico è stato calcolato per ogni anno eseguendo il rapporto tra il numero di ceppi di *E.coli* F4+ sensibili e il numero totale di ceppi testati nei confronti di un determinato antibiotico. Attraverso un'analisi di regressione lineare, test ANOVA, è stato valutato il trend di sensibilità agli antibiotici dei ceppi di *E.coli* impiegati nello studio, considerando come variabile dipendente la percentuale di ceppi sensibili e come variabile indipendente l'anno di isolamento. Le differenze sono state considerate significative con $P < 0.05$.

I ceppi in esame sono stati inoltre suddivisi in tre classi di multi-resistenza antibiotica secondo lo schema riportato di seguito: classe I (ceppi resistenti a 2-5 antibiotici), classe II (ceppi resistenti a 6-10 antibiotici), classe III (ceppi resistenti a più di 10 antibiotici). Anche in questo caso attraverso un'analisi di regressione lineare, in cui è stata considerata come variabile dipendente la percentuale di ceppi multi-resistenti per ogni classe e come variabile indipendente l'anno di isolamento, è stata valutata la significatività del risultato ottenuto. Le differenze sono state considerate significative con $P < 0.05$.

RISULTATI

Il tasso di sensibilità agli antibiotici testati ed il relativo trend dei ceppi di *E.coli* F4+ isolati tra il 2002 ed il 2011 nei confronti di ogni antimicrobico impiegato sono riportati in tabella 1. Per completezza d'informazione, nelle tabelle 2 e 3 vengono riportati i dati relativi alle percentuali di ceppi intermedi e resistenti ai diversi antibiotici impiegati.

Tabella 1: Sensibilità antibiotica di 442 ceppi di *E.coli* F4+ isolati nel periodo 2002-2011 e valutazione statistica del trend (R^2 ed r = coefficienti della regressione).

Table 1: Susceptibility to selected antimicrobials of 442 *E.coli* F4+ isolated from swine during 2002-2011 and statistical analysis of observed variations (R^2 and r = regression coefficients).

	Anno d'isolamento – N° ceppi testati - % ceppi sensibili										Statistica		
	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011			
N° di ceppi testati	55	53	63	45	68	39	44	18	29	28			
Antibiotico											P	R²	r
Fluorochinoloni													
Enrofloxacin	85,5	74,6	88,9	57,8	60,3	53,9	34,1	50,0	27,6	10,7	<0.05	0.87	0.93
Marbofloxacin	94,6	83,3	92,1	68,9	61,8	61,5	50,0	61,1	37,9	39,3	<0.05	0.88	0.94
Flumequina	50,9	40,7	57,1	35,6	44,1	30,8	18,2	22,2	20,7	7,1	<0.05	0.81	0.90
Danofloxacin	78,4	77,8	87,3	55,6	60,3	64,9	33,3	50,0	20,7	20	<0.05	0.81	0.90
Aminoglicosidi													
Gentamicina	36,4	34,6	25,4	33,3	16,4	48,7	40,9	22,2	24,1	14,3	>0.05	0.15	0.39
Apramicina	38,2	25,5	22,2	42,2	19,1	35,9	31,8	16,7	10,3	17,9	>0.05	0.33	0.57
Aminosidina	54,6	60,4	50,8	42,2	38,2	51,3	43,2	42,9	37	28,6	<0.05	0.67	0.82
Amfenicoli													
Florfenicolo	90,2	83,3	93,7	66,7	80,9	76,9	56,8	44,4	20,7	35,7	<0.05	0.80	0.89
Macrolidi													
Eritromicina	7,6	0	7,9	0	0	5,1	6,8	0	0	0	-	-	-
Cefalosporine													
Cefquinome	96,2	98,2	90,5	95,6	89,7	84,6	78,1	77,8	51,7	56	<0.05	0.82	0.90
Altri													
Trimethoprim-Sulfametossazolo	25,0	37,0	15,9	4,4	16,2	18,0	29,6	5,6	41,4	10,7	>0.05	0.01	0.1
Tetraciclina	2,6	7,4	4,8	4,4	0	2,6	4,6	0	3,5	0	>0.05	0.28	0.53
Colistina	41,8	41,8	50,8	40,2	38,8	42,1	41,8	38,9	58,6	46,4	>0.05	0.10	0.32

Tabella 2: Percentuale di ceppi di *E.coli* F4+ risultati intermedi ai diversi antibiotici impiegati nello studio nel periodo 2002-2011.

Table 2: Percentage of *E.coli* F4+ strains resulted intermediate to selected antimicrobials from 2002 to 2011.

Antibiotico	% Isolati intermedi / Anno									
	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
Fluorochinoloni										
Enrofloxacin	9,1	10,9	4,8	13,3	4,4	10,3	20,5	11,1	20,7	28,6
Marbofloxacin	0	0	1,6	2,2	4,4	0	11,4	11,1	13,8	10,7
Flumequina	28,3	42,6	25,4	28,9	22,1	30,8	29,6	27,8	10,3	42,9
Danofloxacin	7,8	5,6	4,8	13,3	5,9	0	33,3	5,6	13,8	0
Aminoglicosidi										
Gentamicina	16,4	9,1	15,9	11,1	17,9	2,6	20,5	22,2	20,7	32,1
Apramicina	7,3	9,1	4,8	0	1,5	2,6	0,0	0,0	10,3	0,0
Aminosidina	1,8	1,9	6,4	0	2,9	0	0,0	0,0	7,4	0,0
Amfenicoli										
Florfenicolo	7,8	13,0	4,8	26,7	7,4	12,8	9,1	22,2	17,2	14,3
Macrolidi										
Eritromicina	5,7	7,7	6,4	4,4	7,4	2,6	6,8	0	0	0
Cefalosporine										
Cefquinome	1,9	1,9	1,6	0	0	0	0	0	3,5	0
Altri										
Trimethoprim-Sulfametossazolo	0	3,7	0	2,2	0	2,6	0	0	0	0
Tetraciclina	2,6	0	0	0	0	0	0	0	3,5	3,6
Colistina	36,4	27,3	30,2	32,2	30,9	29,4	31,2	33,3	20,7	35,7

Tabella 3: Percentuale di ceppi di *E.coli* F4+ risultati resistenti ai diversi antibiotici impiegati nello studio nel periodo 2002-2011.

Table 3: Percentage of resistant *E.coli* F4+ strains to selected antimicrobials from 2002 to 2011.

Antibiotico	% Isolati resistenti / Anno									
	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010	2011
Fluorochinoloni										
Enrofloxacin	5,5	14,6	6,4	28,9	35,3	35,9	45,5	38,9	51,7	60,7
Marbofloxacin	5,5	16,7	6,4	28,9	33,8	38,5	38,6	27,8	48,3	50
Flumequina	20,8	16,7	17,5	35,6	33,8	38,5	52,3	50,0	69,0	50
Danofloxacin	13,7	16,7	7,9	31,1	33,8	35,1	33,3	44,4	65,5	80
Aminoglicosidi										
Gentamicina	47,3	56,4	58,7	55,6	65,7	48,7	38,6	55,6	55,2	53,6
Apramicina	54,6	65,5	73,0	57,8	79,4	61,5	68,2	83,3	79,3	82,1
Aminosidina	43,6	37,7	42,9	57,8	58,8	48,7	56,8	57,1	55,6	71,4
Amfenicoli										
Florfenicolo	2	3,7	1,6	6,7	11,8	10,3	34,1	33,3	62,1	50
Macrolidi										
Eritromicina	86,8	92,3	85,7	95,6	92,7	92,3	86,4	100	100	100
Cefalosporine										
Cefquinome	1,9	0	7,9	4,4	10,3	15,4	21,9	22,2	44,8	44
Altri										
Trimethoprim-Sulfametossazolo	75,0	59,3	84,1	93,3	83,8	79,5	70,5	94,4	58,6	89,3
Tetraciclina	94,7	92,6	95,2	95,6	100	97,4	95,5	100	93,1	96,4
Colistina	21,8	30,9	19,1	27,6	30,3	28,5	27	27,8	20,7	17,9

I ceppi batterici hanno evidenziato un trend di diminuzione della sensibilità statisticamente significativo nell'intero periodo dello studio, nei confronti di enrofloxacin (da 85,5% a 10,7%), marbofloxacin (da 94,6% a 39,3%), flumequina (da 50,9% a 7,1%), danofloxacin (da 78,4% a 20%), aminosidina (da 54,6% a 28,6%), florfenicolo (da 90,2% a 35,7%), cefquinome (da 96,2% a 56%). Un decremento della sensibilità, statisticamente non significativo, è stato osservato anche per la gentamicina (da 36% a 14,3%), l'apramicina (da 38,2% a 17,9%), il trimethoprim-sulfametossazolo (da 25% a 10,7%), l'eritromicina (da 7,5% a 0%) e la tetraciclina (da 2,5% a 0%). La colistina (da 41,8% a 46,4%) non ha fatto rilevare cambiamenti significativi nel periodo di 10 anni considerato.

I risultati ottenuti dalla suddivisione dei ceppi in tre classi di multi-resistenza sono riportati in tabella 4 e nel grafico 1.

Tutti i ceppi di *E.coli* F4+ inclusi nello studio sono risultati multi-resistenti, mostrando resistenza ad almeno due antibiotici. In particolare analizzando le percentuali dei ceppi appartenenti alle tre classi sopraccitate, in relazione all'anno d'isolamento, appaiono evidenti due scenari:

a) i ceppi appartenenti alla prima classe di multi-resistenza hanno evidenziato un decremento statisticamente significativo passando dal 70,9% nel 2002 al 6,5% nel 2011 (tabella 4).

b) i ceppi appartenenti alla seconda e terza classe di multi-resistenza hanno mostrato un incremento statisticamente significativo passando rispettivamente dal 29,1% nel 2002 al 67,7% nel 2011 e dallo 0% nel 2002 al 25,8% nel 2011 (tabella 4).

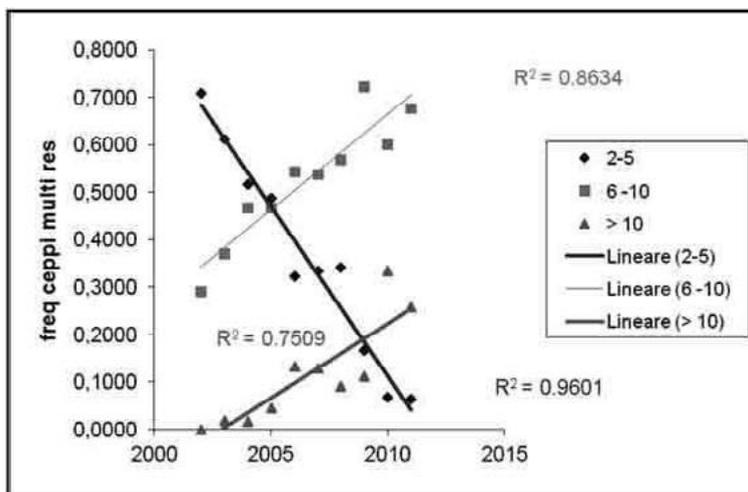
Tabella 4: Numero di ceppi espresso come percentuale sul totale di quelli testati per ogni anno, considerando l'appartenenza ad una delle tre classi di multi-resistenza (R^2 ed r = coefficienti della regressione).

Table 4: Percentage of resistant strains collected into three classes of multi-resistance (R^2 and r = regression coefficients).

Anno		Classi di multi-resistenza		
		2 - 5	6 -10	>10
2002		70,9%	29,1%	0%
2003		61,1%	37%	1,9%
2004		51,6%	46,8%	1,6%
2005		48,9%	46,7%	4,4%
2006		32,4%	54,4%	13,2%
2007		33,3%	53,9%	12,8%
2008		34,1%	56,8%	9,1%
2009		16,7%	72,2%	11,1%
2010		6,7%	60%	33,3%
2011		6,5%	67,7%	25,8%
Statistica	P	$p < 0.05$	$p < 0.05$	$p < 0.05$
	R^2	0,9601	0,8634	0,7509
	r	-0,979847	0,929193	0,866545

Grafico 1: Espressione grafica della frequenza dei ceppi appartenenti alle tre classi di multi-resistenza e significatività statistica.

Figure 1: Frequency of strains belonging to the three classes of multi-resistance and statistical significance.



DISCUSSIONE E CONCLUSIONE

L'impiego degli agenti antimicrobici, con conseguente pressione selettiva sulle popolazioni batteriche presenti nelle specie trattate, costituisce da una parte uno strumento irrinunciabile per la gestione sanitaria di animali allevati intensivamente e dall'altra un fattore di rischio per l'insorgenza di fenomeni di antibiotico-resistenza. Analizzando i risultati ottenuti nel presente lavoro si osserva una diminuzione dell'attività della maggior parte degli antibatterici durante tutto il periodo dello studio (2002-2011).

Considerando i risultati delle singole classi anticorpali si evidenzia per i fluorochinoloni impiegati, un calo dell'attività durante tutto il periodo dello studio, dato che appare in accordo con i risultati ottenuti da Taylor et al. nel 2009. Nello studio di Taylor il 79% delle aziende che facevano uso di fluorochinoloni, su 108 arruolate, presentavano isolati di *E.coli* resistenti a queste molecole, contro il 19% di quelle che non ne facevano uso, sottolineando come l'impiego diffuso degli antimicrobici, rappresenti il principale fattore di rischio per l'insorgenza di fenomeni di resistenza.

Il trend di diminuzione di sensibilità dei ceppi di *E.coli* nei confronti di enrofloxacin (da 85,5% a 10,7%), osservato nel presente studio, appare in accordo con i risultati riportati da Mayrhofer et al. nel 2004 in Austria e discordanti con quelli presentati da Smith et al. nel 2009 in Australia e da Yashpal et al. nel 2011 in Canada. Fra i fluorochinoloni impiegati, la sensibilità nei confronti del marbofloxacin è risultata essere maggiore rispetto a quella osservata per enrofloxacin, flumequina e danofloxacin. Questo potrebbe riflettere una minor incidenza di fenomeni di cross-resistenza tra questi ultimi ed il marbofloxacin, così come descritto per altri patogeni batterici di origine animale ed umana (Vanni et al., 2011).

Per quanto riguarda gli aminoglicosidi, tutte le molecole utilizzate nello studio hanno evidenziato un trend di diminuzione dell'attività, che tuttavia è risultata essere statisticamente significativo solo per l'aminosidina. Inoltre, eccezion fatta per la gentamicina, dove nel 2011 i ceppi appartenenti alle categorie intermedio e resistente sono stati rispettivamente il 32,1% e il 53,6%, per l'apramicina e l'aminosidina non sono stati riscontrati ceppi appartenenti alla prima categoria, mentre gli isolati resistenti sono risultati essere rispettivamente l'82,1% e il 71,4%. Fenomeni di cross-resistenza all'interno del gruppo degli aminoglicosidi sono stati ampiamente descritti, soprattutto per quel che riguarda la gentamicina e la neomicina (Mathew et al., 1999).

Il florfenicolo ha evidenziato nel periodo dello studio un trend di diminuzione dell'efficacia, ed i ceppi testati hanno presentato una riduzione della sensibilità, passando dal 90,2% nel 2002 al 35,7% nel 2011.

Il cefquinome ha manifestato un calo significativo dell'attività dal 2002 al 2011 passando rispettivamente da valori di sensibilità del 96,2% al 56%. Nonostante una riduzione dell'attività nel corso degli anni di entrambe le molecole, i ceppi di *E.coli* hanno mantenuto, nei confronti di queste, un livello di sensibilità tra i più alti se confrontati con i risultati degli altri antimicrobici impiegati nello studio.

Il thrimethoprim-sulfametossazolo ha manifestato una diminuzione percentuale dell'attività statisticamente non significativa ed un andamento altalenante durante tutto il periodo dello studio, passando da percentuali di sensibilità del 25% nel 2002, del 4,4% nel 2005, del 41,4% nel 2010 e del 10,7% nel 2011.

La tetraciclina e l'eritromicina hanno invece presentato bassi livelli di attività durante tutto il periodo considerato. I risultati ottenuti per il thrimethoprim-sulfametossazolo, la tetraciclina e l'eritromicina sono in accordo con i risultati presentati in studi condotti in altri paesi come Regno Unito, Canada e Spagna (Burch, 2005; Kozak et al., 2009 e Stannarius et al., 2000).

Nei confronti della colistina, i ceppi testati hanno manifestato una sensibilità costante in tutto

il periodo dello studio, senza evidenziare significative variazioni anche per quanto riguarda le percentuali di ceppi risultati intermedi e resistenti (Tab.1,2,3). Anche per la colistina, per la quale la percentuale di sensibilità registrata nel 2011 è stata del 46,4%, si conferma il ruolo primario nel trattamento per via orale delle infezioni gastroenteriche da *E.coli* nel suino.

Un risultato che merita una valutazione approfondita è l'aumento significativo, nel corso degli anni, dei ceppi caratterizzati da multi-resistenza nei confronti di un numero sempre maggiore di antimicrobici. Come descritto in tabella 4 il numero di ceppi appartenenti alla prima classe di multi-resistenza (2-5 antibiotici) ha evidenziato un marcato decremento durante l'intera durata dello studio. Questo ha visto parallelamente un progressivo incremento dei ceppi appartenenti alle classi II e III, che nel 2011 hanno raggiunto rispettivamente il 67,7% ed il 25,8%. Il fenomeno della multi-resistenza, secondo uno studio basato sull'analisi dei profili genetici di resistenza e virulenza di ceppi Australiani di *E.coli* ETEC, sarebbe da attribuire alla pressione selettiva perpetuata a livello di singolo allevamento piuttosto che alla selezione, prevalenza e diffusione laterale di particolari cloni multi-resistenti di *E.coli* (Smith et al., 2010). Tuttavia, se da una parte esiste una notevole variabilità genetica e del profilo di antibiotico-resistenza tra ceppi con origine diversa, è altrettanto vero che cloni batterici multi-resistenti possono facilmente essere veicolati attraverso lo spostamento di animali. A questo si aggiunga la possibilità che geni responsabili dell'antibiotico-resistenza possano essere trasferiti ad altri batteri patogeni, della stessa specie o anche di specie differenti, con trasmissione orizzontale della resistenza.

La diminuzione della sensibilità agli antibatterici dei ceppi di *E.coli* testati, osservata nel corso degli anni, costituisce senza dubbio un dato allarmante ma che deve essere valutato attentamente considerando la natura del campionamento praticato nel presente lavoro. E' necessario infatti sottolineare come la maggior parte del materiale patologico conferito presso il laboratorio provenga frequentemente da casi problematici e di difficile soluzione dal punto di vista terapeutico. Quanto appena esposto può essere alla base di una sovrastima del problema, che tuttavia non deve essere sottovalutato.

I risultati di questo lavoro hanno evidenziato un trend di diminuzione della sensibilità verso numerosi antibiotici dei ceppi di *E.coli* F4+ isolati dal suino in un periodo di 10 anni ed un aumento della frequenza del fenomeno della multi-resistenza. Quanto esposto sottolinea la necessità di un continuo monitoraggio, in modo tale che appropriate strategie siano messe in atto per contrastare la tendenza precedentemente descritta. In particolare lo studio dei geni che regolano ed influenzano il fenomeno dell'antibiotico-resistenza, già oggetto di approfondimento da parte di numerosi ricercatori, rappresenteranno la chiave per una maggior comprensione di questo fenomeno.

BIBLIOGRAFIA

Barigazzi G., Foni E., Garbarino C. (2001) "Sensibilità agli antibatterici di microrganismi isolati dal suino nel periodo 1994-2000". Atti XXV Meeting Sipas, Parma 23-24 Marzo 2001, 295-303.

Barigazzi G., Foni E., Merialdi G., Dottori M. (2007) "Sensibilità agli antibatterici di microrganismi isolati dal suino nel periodo 2002-2006". Atti XXV Meeting Sipas, Modena 29-30 Marzo 2007, 289-301.

Burch D. (2005) "Problems of antibiotic resistance in pigs in the UK". In Practice. 27:37-43.

Enne V.I., Cassar C., Springs K., Woodward M.J., Bennett P.M. (2008) “A high prevalence of antimicrobial resistant *Escherichia coli* isolated from pigs and a low prevalence of antimicrobial resistant *E.coli* from cattle and sheep in Great Britain at slaughter”. *FEMS Microbiol Lett.* 278, 193-9.

Fairbrother J.M., Nadeau E., Gyles C.L. (2005) “*Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types pathogenesis and prevention strategies”. *Animal Health Research Reviews.* 6, 17–39.

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.

Mathew A.G., Upchurch W.G., Chattin S.E. (1998) “Incidence of antibiotic resistance in fecal *Escherichia coli* isolated from commercial swine farms”. *J Ani Sci.* 76:429–434.

Mayrhofer S., Paulsen P., Smulders F.J.M., Hilbert F. (2004) “Antimicrobial resistance profile of five major food-borne pathogens isolated from beef, pork and poultry”. *Int J Food Microbiol.* 97:23–29.

NCCLS (2003) Performances Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard – English Edition. NCCLS document M2-A8 (ISBN 1-56238-485-6).

NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.

NCCLS (2004) Performances Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Fourteenth Informational Supplement. NCCLS document M100-S14 (ISBN 1-56238-516-X). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.

Smith M.G., Jordan D., Chapman T.A., Chin J.J., Barton M.D., Do T.N., Fahy V.A., Fairbrother J.M., Trott D.J. (2010) “Antimicrobial resistance and virulence gene profiles in multi-drug resistant enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs with post-weaning diarrhoea”. *Vet Microbiol.* 145:299-307.

Stannarius C., Bürgi E., Regula G., Zychowska M.A., Zweifel C., Stephan R., Teshager T., Herrero I.A., Porrero M.C., Garde J., Moreno M.A, Dominguez L. (2000) “Surveillance of antimicrobial resistance in *Escherichia coli* strains isolated from pigs at Spanish slaughterhouses”. *Int J Antimicrob Agents.* 15:137–142.

Taylor N.M., Clifton-Hadley F.A. Wales A.D., Ridley A., Davies R.H. (2009) “Farm-level risk factors for fluoroquinolone resistance in *E. coli* and thermophilic *Campylobacter* spp. on finisher pig farms”. *Epidemiol Infect.* 137:1121-34.

Vanni M., Merenda M., Barigazzi G., Garbarino C., Luppi A., Tognetti R., Intorre L. (2011). “Antimicrobial resistance of *Actinobacillus pleuropneumoniae* isolated from swine”. *Veterinary Microbiology*; doi: 10.1016/j.vetmic.2011.10.022.

Yashpal S.M., Yogesh C., Karen O., Sagar M.G. (2011) “Antimicrobial resistance in enteric pathogens from Minnesota pigs from 1995 to 2004”. *The Canadian Journal of veterinary research.* 75:117-121.