

ESCHERICHIA COLI ISOLATI DA MATRICI PATOLOGICHE DI SUINO IN EMILIA ROMAGNA TRA IL 2017 E IL 2021: VALUTAZIONE DELLE RESISTENZE AGLI ANTIBIOTICI E DEI FATTORI DI VIRULENZA

ANTIMICROBIAL RESISTANCE EVALUATION AND DETECTION OF VIRULENT FACTORS IN ESCHERICHIA COLI ISOLATED FROM SWINE IN EMILIA ROMAGNA FROM 2017 TO 2021

BOSCO C¹., BONILAURI P¹., RUGNA G¹., LUPPI A¹., FONTANA M.C¹.,
FIORENTINI L.¹, BASSI P¹.

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna
"Bruno Ubertini" (IZSLER)

Parole chiave: antibiotico-resistenza, *Escherichia coli*, ETEC
Key words: antimicrobial-resistance, *Escherichia coli*, ETEC

RIASSUNTO

Sono stati valutati, retrospettivamente, le resistenze agli antibiotici e la presenza di geni codificanti i fattori di patogenicità di 826 *Escherichia coli*, isolati da matrici patologiche di suini durante l'attività diagnostica delle Sedi Territoriali dell'Emilia Romagna dell'IZSLER tra il 2017 e il 2021. Complessivamente, le percentuali di resistenza più elevate erano rivolte verso ampicillina - AMP (95,9%), tetraciclina - TET (89,7%), cefazolina - CZ (79,3%) e trimetoprim + sulfametossazolo - SXT (74,8%). Inoltre, dal 2017 al 2021, le percentuali di resistenza degli 826 isolati nei confronti di AMP sono significativamente aumentate ($p < 0,05$) fino a raggiungere il 99,2% di ceppi resistenti. In funzione della presenza dei geni codificanti i fattori di patogenicità (n. 671), gli isolati ETEC F18+ erano significativamente più resistenti a florfenicolo - FFC, gentamicina - GEN, kanamicina - KAN e SXT rispetto ai ceppi ETEC F4+. Gli isolati privi di geni codificanti i fattori di patogenicità sono risultati maggiormente resistenti a amoxicillina con acido clavulanico - AMC e a CZ ($p < 0,01$) e significativamente meno resistenti a GEN ($p < 0,01$). Analizzando l'andamento negli anni 2017 - 2021 delle resistenze dei soli isolati ETEC, si è potuto osservare un aumento significativo ($p < 0,05$) dei ceppi F18+ resistenti a FFC (70% - 95,8%), GEN (70% - 91,7%) e KAN (50% - 91,7%). Infine, negli anni considerati, si è verificato un aumento statisticamente significativo ($p < 0,05$) degli ETEC F18+ contemporaneamente resistenti a tutte le molecole testate (10/10).

ABSTRACT

The antimicrobial resistance and the presence of fimbriae and toxic genes of 826 *Escherichia coli* were evaluated retrospectively. The *E. coli* were isolated from pathological samples of pigs collected during the diagnostic activity of public laboratories (IZSLER) in Emilia Romagna (Italy) between 2017 and 2021. The highest overall resistance rates were referred to ampicillin - AMP (95,9%), tetracycline - TET (89,7%), cefazolin - CZ (79,3%) e trimethoprim + sulfamethoxazole - SXT (74,8%). Moreover, from 2017 to 2021, resistance rates of the 826 isolates to AMP were significantly increased ($p < 0,05$) up to 99,2% of resistant strains. With regards to virulence factors genes (n. 671), ETEC F18+ (n. 230) were significantly more resistant to florfenicol - FFC, gentamicin - GEN, kanamycin - KAN

and SXT than ETEC F4+ (n 144) strains ($p < 0,01$). *E. coli* without virulence factors genes were more resistant to amoxicillin with clavulanic acid - AMC and CZ ($p < 0,01$) and less resistant to GEN ($p < 0,01$). During the study period, a statistically significant proportion of ETEC F18+ isolates increased the resistance to FFC (70% - 95,8%), GEN (70% - 91,7%) and KAN (50% - 91,7%) ($p < 0,05$). Finally, from 2017 to 2021, a statistically significant increase of the ETEC F18+ resistant to all the tested antibiotics was recorded ($p < 0,05$).

INTRODUZIONE

Le colibacillosi enteriche del suino sono sostenute principalmente da patotipi ETEC (*E. coli* enterotossigeni) e, in minor misura, da patotipi EPEC (*E. coli* enteropatogeni). I ceppi ETEC esprimono la loro patogenicità aderendo attraverso le fimbrie a specifici recettori presenti sull'orletto a spazzola dell'intestino, colonizzandone l'epitelio e producendo enterotossine. Le fimbrie coinvolte nelle colibacillosi enteriche del suino sono nella maggioranza dei casi F4 e F18; in minor misura F41, F5 e F6. Le tossine prodotte da ETEC si distinguono in termostabili (STa e STb) e termolabili (LT) (Luppi, 2017), ma si può riscontrare anche la Shiga tossina 2e (Stx2e), che può essere prodotta sia da ETEC sia da STEC (*E. coli* produttori di Shiga tossina), questi ultimi responsabili, nel suino, della malattia degli edemi. Luppi *et al.*, già nel 2015, evidenziavano un aumento di resistenza significativo ad alcune molecole ad attività antibiotica (fluorochinoloni, fenicoli, e cefalosporine di IV generazione) da parte di *E. coli* F4+ isolati da matrici suine dal 2002 al 2011 durante l'attività diagnostica della sede territoriale IZSLER di Reggio Emilia. Considerando che i consumi di antibiotici per uso veterinario determinano il grado di pressione selettiva esercitata sulle popolazioni batteriche negli allevamenti, l'Italia si è impegnata, nel 2017, ad attuare politiche di riduzione dei consumi di antibiotico nel settore veterinario (Piano Nazionale di Contrasto all'Antimicrobico-Resistenza -PNCAR), come risulta dall'ultimo report ESVAC (EMA, 2020) dove appare una riduzione delle vendite di antibiotico del 10,9% nel 2018 rispetto all'anno precedente. Nonostante questi risultati, il nostro Paese appare ancora al secondo posto in Europa nella classifica dei quantitativi di vendita degli antibiotici ad uso veterinario (EMA, 2020). Dati i risultati ottenuti da Luppi *et al.* nel 2015 relativamente ai soli *E. coli* F4+, in questo lavoro, abbiamo esteso l'analisi delle resistenze agli antibiotici espresse da *E. coli* isolati in Emilia Romagna da matrici suine dagli anni 2017 al 2021, indagando eventuali correlazioni con la presenza di fattori di patogenicità.

MATERIALI E METODI

I dati utilizzati derivano dall'attività dei laboratori diagnostici delle sedi territoriali dell'Emilia Romagna dell'IZSLER, considerando nei criteri di ricerca *E. coli* isolati da matrici provenienti da suini (carcasse, feci, visceri) dal 2017 al 2021 e sottoposti a ricerca dei geni codificanti i fattori di patogenicità degli ETEC e ad antibiogramma.

La ricerca dei geni codificanti i fattori di patogenicità è stata effettuata attraverso metodica multiplex PCR per geni codificanti le adesine F4 (k88), F5 (k99), F6 (987p) e F18 e le tossine LT I, STaP, STb e Stx2e, utilizzando i primers riportati da Casey & Bosworth (2009). Tra i ceppi risultati positivi ad almeno un gene codificante per fattore di patogenicità, sono stati considerati ETEC solo quegli isolati in cui erano associati un fattore di patogenicità fimbriale e almeno un gene codificante per un'enterotossina. Gli antibiogrammi sono stati effettuati con la metodica di disco-diffusione (Kirby-Bauer), la classificazione in sensibili, intermedi e resistenti è stata fatta utilizzando criteri interpretativi basati su standards noti (*Clinical and Laboratory Standards Institute - CLSI, 2015-2018*). Sulla base dei criteri considerati sono stati analizzati i dati di 826 isolati per Acido Nalidixico (NA 30 µg),

Amoxicillina e Acido Clavulanico (AMC 20 – 10 µg), Ampicillina (AMP 10 µg), Cefazolina (CZ 30 µg), Enrofloxacin (ENR 5 µg), Florfenicolo (FFC 30 µg), Gentamicina (GEN 10 µg), Kanamicina (KAN 30 µg), Tetraciclina (TET 30 µg), Trimetoprim e Sulfametossazolo (SXT 1,25 – 23,75 µg). Per la valutazione statistica, ai fini dell'espressione della resistenza agli antibiotici, i ceppi identificati come intermedi sono stati categorizzati con i resistenti. Per ciascuna molecola sono state esaminate le resistenze espresse da tutti gli *E. coli* isolati nel campione (n. 826) e confrontate tra diversi tipi fimbriali, attraverso test di chi quadro e test esatto di Fisher e le differenze sono state considerate statisticamente significative per $p < 0,01$. L'esistenza di correlazione tra l'anno di isolamento (2017 – 2021) e la frazione di ceppi resistenti nei vari raggruppamenti precedentemente illustrati (soppesate per la differente numerosità di ceppi isolati negli anni), è stato valutato, attraverso il Pearson's Correlation test (r di Pearson). Inoltre, sia per il campione complessivo che per i diversi tipi fimbriali, è stata valutata la correlazione tra resistenza a più molecole contemporaneamente e gli anni di isolamento. L'andamento in diminuzione o aumento nel tempo delle resistenze è stato considerato statisticamente significativo per $p < 0,05$.

RISULTATI

Degli 826 ceppi isolati, 671 sono risultati positivi per la presenza di almeno un fattore di patogenicità, di cui i maggiormente rappresentati erano F18+ (n. 272) e F4+ (n. 170). Relativamente al solo patotipo ETEC, i virotipi più rappresentati erano F18 STa, STb; F18 STa, STb LT; F4 STa, STb LT; F4 STb, LT e F4 STa, STb.

Considerando il totale dei ceppi isolati negli anni, la resistenza maggiore è stata espressa nei confronti dell'AMP con 791/826 (95,9%) isolati, seguita da TET (89,7%), CZ (79,3%) e SXT (74,8%) come evidenziato in Tabella 1. Per tutte le molecole testate le percentuali di resistenza degli 826 isolati erano superiori al 50%, e maggiori del 70% per 5/10 molecole. Al contrario, ENR e KAN si sono dimostrate le molecole con maggior attività antimicrobica conservata (rispettivamente 57,1% e 59,3% degli isolati resistenti).

Il 98,7% degli isolati privi di fattori di patogenicità è risultato resistente ad AMP. Inoltre, questa categoria ha mostrato resistenze significativamente superiori verso AMC (76,8%) e CZ (87,7%), rispetto agli isolati positivi per almeno un gene codificante i fattori di patogenicità (62%, 77,3%) (Tabella 1). Nei confronti di GEN, invece, gli isolati negativi per fattori di patogenicità hanno mostrato resistenze significativamente inferiori (49% - 64,2%).

Confrontando le sensibilità rivelate dagli isolati ETEC, rispetto ai ceppi F4+, i ceppi F18+ hanno mostrato resistenze significativamente superiori per SXT (84,8% - 61,1%), FFC (81,3% - 61,8%) GEN (80% - 56,9%) e KAN (67,8% - 54,2%) - (Tabella 1).

Tabella 1: Numero e percentuale di isolati resistenti a AN, AMC, AMP, CZ, ENR, FFC, GEN, KAN, TET, SXT. *percentuali con p<0,01; **percentuali con p<0,05

Table 1: Number and percentage of isolates resistant to AN, AMC, AMP, CZ, ENR, FFC, GEN, KAN, TET, SXT. *percentages with p<0,01; **percentages with p<0,05

ISOLATI RESISTENTI										
	Campione		Fattori patogenicità positivi		Fattori patogenicità negativi		ETEC F4+		ETEC F18+	
	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%	N°	%
AN	598	72,4	497	74,1**	101	65,2**	113	78,5	178	77,4
AMC	534	64,8	416	62*	119	76,8*	87	60,4	137	59,6
AMP	791	95,9	639	95,2	153	98,7	137	95,1	219	95,2
CZ	654	79,3	519	77,3*	136	87,7*	116	80,6	177	77
ENR	471	57,1	386	57,5	86	55,5	92	63,9**	120	52,2**
FFC	527	63,9	443	66**	85	54,8**	89	61,8*	187	81,3*
GEN	506	61,4	431	64,2*	76	49*	82	56,9*	184	80*
KAN	489	59,3	406	60,5	84	54,2	78	54,2*	156	67,8*
TET	740	89,7	601	89,6	140	90,3	123	85,4**	216	93,9**
SXT	617	74,8	506	75,4	112	72,3	88	61,1*	195	84,8*
totale ceppi testati	826		671		155		144		230	

Complessivamente, dal 2017 al 2021, si è osservato un aumento statisticamente significativo delle percentuali di resistenza ad AMP (da 93,5% a 99,2%) come riportato in Tabella 2. Relativamente agli ETEC, le resistenze dei ceppi F18+ sono aumentate significativamente per 3/10 molecole testate (FFC, GEN, KAN). Le percentuali di resistenza di *E. coli* ETEC F4+, invece, non hanno subito aumenti statisticamente significativi negli anni per nessuna molecola, ma nei confronti dell'AMP hanno mostrato resistenza nel 100% dei casi nel 2021. Il 18,3 % degli 826 isolati testati è risultato resistente a tutti i 10 antibiotici testati, il 76,5% è risultato resistente a 6 o più delle 10 molecole considerate (multiresistente) e solo 4/826 (0,5%) degli isolati sono risultati completamente sensibili alle molecole testate. Considerando l'andamento nel tempo, la percentuale di isolati multiresistenti a 6 o più molecole contemporaneamente nel periodo compreso tra il 2017 e il 2021 non mostra sostanziali variazioni, sia per il campione totale sia per gli ETEC. Valutando solamente i ceppi ETEC F18+ però, si può osservare un aumento delle percentuali di isolati multiresistenti a 10/10 molecole dal 2017 al 2021 (da 10% a 45,8%) Tabella 3.

Tabella 2: Percentuali di isolati resistenti/anno a AN, AMC, AMP, CZ, ENR, FFC, GEN, KAN, TET, SXT distinti per campione complessivo, ETEC F18+ e ETEC F4+. Le resistenze aumentate negli anni ($p < 0,05$) sono evidenziate.

Table 2: Percentage of resistant isolates/year to AN, AMC, AMP, CZ, ENR, FFC, GEN, KAN, TET, SXT for the totale in sample, ETEC F18+ and ETEC F4+. Resistances with significative growth during the years ($p < 0, 05$) are highlighted.

	Percentuali di isolati resistenti/anno					Analisi statistica	
	2017	2018	2019	2020	2021	r	p
Campione n° isolati	107	125	217	257	120		
AN	84,1	73,6	68,7	69,3	74,2	-0,6187	>0.05
AMC	61,7	52,8	63,1	68,9	74,2	0,871	>0.05
AMP	93,5	94,4	95,9	96,1	99,2	0,9554	<0.05
CZ	73,8	83,2	78,3	80,5	79,2	0,3689	>0.05
ENR	64,5	64,8	54,4	51	60,8	-0,5405	>0.05
FFC	61,7	65,6	63,1	62,3	69,2	0,5984	>0.05
GEN	58,9	55,2	64,5	61,9	63,3	0,6559	>0.05
KAN	48,6	54,4	63,1	63	59,2	0,759	>0.05
TET	92,5	96	92,6	85,2	85	-0,8303	>0.05
SXT	70,1	73,6	78,8	75,1	72,5	0,3082	>0.05
ETEC F18+ n° isolati	20	34	76	76	24		
AN	90	79,4	68,4	77,6	91,7	0,0257	>0.05
AMC	50	38,2	59,2	65,8	79,2	0,8749	>0.05
AMP	95	97,1	96,1	93,4	95,8	-0,2289	>0.05
CZ	65	91,2	73,7	75	83,3	0,3248	>0.05
ENR	55	79,4	42,1	48,7	54,2	-0,3624	>0.05
FFC	70	79,4	80,3	81,6	95,8	0,9185	<0.05
GEN	70	79,4	80,3	78,9	91,7	0,8794	<0.05
KAN	50	50	71,1	69,7	91,7	0,937	<0.05
TET	95	100	96,1	90,8	87,5	-0,791	>0.05
SXT	65	88,2	88,2	85,5	83,3	0,5509	>0.05
ETEC F4+ n° isolati	25	27	40	37	15		
AN	88	85,2	67,5	73	93,3	-0,0227	>0.05
AMC	60	55,6	60	59,5	73,3	0,7129	>0.05
AMP	96	92,6	95	94,6	100	0,5782	>0.05
CZ	88	81,5	77,5	83,8	66,7	-0,7868	>0.05
ENR	72	66,7	57,5	59,5	73,3	-0,1003	>0.05
FFC	60	66,7	55	62,2	73,3	0,5045	>0.05
GEN	60	51,9	47,5	64,9	66,7	0,5032	>0.05
KAN	48	55,6	50	59,5	60	0,8109	>0.05
TET	92	96,3	82,5	75,7	86,7	-0,6144	>0.05
SXT	68	51,9	60	59,5	73,3	0,3475	>0.05

Tabella 3: Percentuali di isolati resistenti contemporaneamente a n° molecole (da 1 a 10) e a ≥ 6 molecole negli anni dal 2017 al 2021, raggruppate per campione complessivo, ETEC F18+ e ETEC F4+. Le variazioni significative ($p < 0,05$) sono evidenziate.

Table 3: Percentages of isolates contemporaneously resistant to n° antibiotics (from 1 to 10) and to ≥ 6 antibiotics from 2017 to 2021, listed by all the isolates, ETEC F18+ and ETEC F4+. Significant variations ($p < 0,05$) are highlighted.

	Percentuali multiresistenze/anno					Analisi statistica	
	2017	2018	2019	2020	2021	r	p
Campione complessivo: n° ceppi testati							
n° molecole resistenti	107	125	217	257	120		
1	2,8	2,4	0,9	1,2	0,8	-0,8977	<0.05
2	2,8	3,2	2,8	3,9	0,8	-0,4521	>0.05
3	2,8	4,8	2,8	3,5	5,8	0,5616	>0.05
4	6,5	6,4	4,6	7,8	5,8	-0,0048	>0.05
5	8,4	6,4	7,8	8,9	11,7	0,7404	>0.05
6	13,1	8,8	12,4	8,2	9,2	-0,5925	>0.05
7	12,1	12,8	17,1	13,2	11,7	-0,039	>0.05
8	15	20,8	19,8	14,4	14,2	-0,3929	>0.05
9	14	20	15,7	20,2	15	0,1189	>0.05
10	21,5	14,4	15,7	17,9	25	0,3821	>0.05
≥ 6	75,7	76,8	80,6	73,9	75	0,3821	>0.05
ETEC F18+: n° ceppi testati							
n° molecole resistenti	20	34	76	76	24		
1	0	2,9	0	1,3	0	-0,1977	>0.05
2	0	0	1,3	3,9	0	0,3638	>0.05
3	0	0	1,3	0	0	0	>0.05
4	5	5,9	1,3	2,6	4,2	-0,4241	>0.05
5	10	0	10,5	3,9	8,3	0,0216	>0.05
6	20	5,9	11,8	10,5	0	-0,7538	>0.05
7	5	8,8	17,1	15,8	8,3	0,4147	>0.05
8	25	41,2	17,1	13,2	20,8	-0,5304	>0.05
9	20	23,5	18,4	25	12,5	-0,4363	>0.05
10	10	11,8	19,7	22,4	45,8	0,9074	<0.05
≥ 6	80	91,2	84,2	86,8	87,5	0,4062	>0.05
ETEC F4+: n° ceppi testati							
n° molecole resistenti	25	27	40	37	15		
1	0	3,7	2,5	2,7	0	-0,0937	>0.05
2	0	0	2,5	5,4	0	0,3567	>0.05
3	4	11,1	7,5	10,8	0	-0,278	>0.05
4	8	3,7	7,5	5,4	6,7	-0,0881	>0.05
5	12	3,7	7,5	2,7	6,7	-0,5044	>0.05
6	16	14,8	15	8,1	13,3	-0,6072	>0.05
7	8	11,1	20	10,8	26,7	0,7524	>0.05
8	8	14,8	22,5	21,6	6,7	0,0886	>0.05
9	28	22,2	5	10,8	13,3	-0,7012	>0.05
10	16	14,8	10	21,6	26,7	0,6902	>0.05
≥ 6	76	77,8	72,5	73	86,7	0,4561	>0.05

DISCUSSIONE

L'analisi dei risultati emersi dagli antibiogrammi eseguiti sugli 826 isolati, ha mostrato elevate percentuali di resistenza nei confronti di ampicillina, tetraciclina, cefazolina e per l'associazione di trimetoprim + sulfametossazolo. Risultati simili sono stati ottenuti in studi condotti su *E. coli* isolati da suini sintomatici in Paesi europei, asiatici e americani in periodi compresi tra il 2005 e il 2018, dove le maggiori percentuali di resistenza agli antibiotici erano rivolte verso ampicillina (Do *et al.*, 2020; García-Meniño *et al.*, 2021; Hayer *et al.*, 2020; Renzhammer *et al.*, 2020), tetracicline (Brand *et al.*, 2017; Do *et al.*, 2020; Hayer *et al.*, 2020; Renzhammer *et al.*, 2020) e trimetoprim con sulfamidici in associazione o esaminati separatamente (Brand *et al.*, 2017; Hayer *et al.*, 2020; Renzhammer *et al.*, 2020). In Spagna, inoltre, la molecola per cui gli isolati esprimevano la percentuale di resistenza maggiore era l'Acido Nalidixico (82,3%) (García-Meniño *et al.*, 2021), che in questo studio non era tra quelle con le percentuali di resistenza più elevate, ma si attestava comunque oltre al 70%. Il dato osservato, almeno per i Paesi europei, è coerente con quanto riportato da EMA (2020) nei rapporti di vendita dei prodotti antibiotici ad uso veterinario in Europa dal 2011 al 2018, dove appare evidente come i principi attivi maggiormente utilizzati in medicina veterinaria appartengano alle classi di tetracicline, penicilline e sulfamidici. Da quanto emerge da una review sul consumo di antibiotici nell'allevamento suino a livello globale, le classi di antibiotici più utilizzate in allevamento per questa specie risultano essere penicilline e tetracicline (Lekagul *et al.*, 2019). Valutando, nello specifico, l'andamento delle resistenze negli anni su tutti i ceppi di *E. coli* analizzati, abbiamo potuto osservare un incremento significativo della percentuale di isolati resistenti ad ampicillina (fino al 99,2% degli isolati nel 2021). In uno studio condotto in Germania sulle resistenze agli antimicrobici di *E. coli* isolati da suini sintomatici tra il 2006 e il 2017, le percentuali di resistenza degli isolati a tetraciclina, neomicina e spectinomocina sono risultate significativamente diminuite negli anni (Moennighoff *et al.*, 2020), pur attestandosi a 60,48% di isolati resistenti nel 2017 per la tetraciclina. Nello studio condotto da Hayer *et al.* in USA, invece, le resistenze di *E. coli* che hanno mostrato un andamento significativamente in aumento dal 2011 al 2016 erano rivolte verso ampicillina, neomicina, gentamicina e trimetoprim+sulfametossazolo (Hayer *et al.*, 2020). Queste differenze possono essere originate da difformità nelle classi di molecole maggiormente impiegate nei diversi Paesi, che dipendono da numerose variabili come le politiche di riduzione dei consumi di antibiotico adottate, la disponibilità di formulazioni per il trattamento e lo stato sanitario medio delle aziende, nonché la tipologia produttiva prevalente.

Resistenze, fattori di patogenicità e tipi fimbriali

Nei campioni analizzati, provenienti da matrici patologiche di suino, il 81,2% degli isolati è risultato positivo ad almeno uno dei geni codificanti per i fattori di patogenicità ricercati. Confrontando i ceppi in base alla presenza o assenza di geni codificanti i fattori di patogenicità, è interessante notare come negli isolati non patogeni vi sia una percentuale di resistenza ad amoxicillina con acido clavulanico (76,8%) e a cefazolina (87,7%) significativamente maggiore rispetto agli isolati patogeni (62%, 77,3%). Isolati di *E. coli* provenienti da suini asintomatici vengono usati come indicatori di antimicrobico-resistenza (AMR) all'interno del Piano di Monitoraggio Armonizzato sulla Resistenza agli Antimicrobici, in quanto le resistenze riscontrate in questi ceppi sono rappresentative della pressione selettiva esercitata dall'uso di antibiotici in azienda, della diffusione clonale di microrganismi resistenti, della propagazione di plasmidi veicolanti i geni di resistenza e degli effetti della co-selezione in batteri multiresistenti (EFSA, 2020). Le resistenze da noi osservate in *E. coli* non patogeni, quindi, potrebbero essere considerate indicative

della pressione selettiva esercitata dagli antibiotici nelle aziende suinicole in Emilia Romagna. Nei 155 isolati di *E. coli* negativi per la presenza di geni codificanti i fattori di patogenicità, le percentuali di resistenza più elevate erano espresse nei confronti di ampicillina, tetraciclina e cefazolina, dato parzialmente in accordo con quanto riportato dall'ultimo *Summary Report* dell'Unione Europea sull'antimicrobico-resistenza in batteri zoonotici e indicatori provenienti da uomo, animali e alimenti negli anni 2017/2018, per cui le maggiori resistenze espresse da *E. coli* indicatori isolati da suini in 31 Paesi (di cui 28 membri dell'UE) nel 2017 erano nei confronti di ampicillina, sulfametossazolo, trimetoprim e tetraciclina (EFSA, 2020).

Affinché un ceppo si possa definire ETEC è necessario che abbia almeno un gene codificante per un fattore di patogenicità fimbriale ed uno codificante per un'enterotossina (Baldo *et al.*, 2020). Considerando, però, la tossina Stx2e, generalmente caratteristica di ceppi STEC, vengono considerati ETEC solamente i ceppi in cui i geni codificanti per questa tossina sono presenti in ceppi F18+ con almeno un'enterotossina (Luppi *et al.*, 2016; Fairbrother *et al.*, 2012). In questo lavoro, il fattore fimbriale maggiormente frequente tra gli isolati considerati è stato F18 (50,3%) seguito da F4 (31,5%). Risultati simili sono stati ottenuti dalla ricerca dei geni codificanti i fattori di patogenicità in 186 *E. coli* isolati da suini con diarrea in Spagna tra il 2005 e il 2017, dove il 43,5% dei ceppi esaminati erano F18+ e il 38,2% erano F4+ (García-Meniño *et al.*, 2021) e in 118 *E. coli* isolati da suini con diarrea post-svezzamento in Korea tra il 2016 e il 2017, di cui il 40,7% era F18+ e il 16,9% era F4+ (Do *et al.*, 2020). In studi precedenti, ETEC F4+ risultavano essere nettamente prevalenti rispetto agli ETEC F18+ (Luppi *et al.*, 2014). Mentre nel 2016, in uno studio condotto in diversi Paesi europei (Belgio, Francia, Germania, Italia e Olanda) tra il 2012 e il 2014, si iniziava ad osservare un trend di aumento degli ETEC F18+ (33,9%) isolati in corso di diarrea post-svezzamento nonostante fossero ancora prevalenti gli ETEC F4+ (45,1%) (Luppi *et al.*, 2016). Questa inversione della prevalenza tra F4+ e F18+ potrebbe rappresentare l'evoluzione del tempo di questi due tipi fimbriali che può essere stata determinata da differenti concause. Per il controllo della forma clinica è da diversi anni disponibile un vaccino orale con ceppi non virulenti, che in prima formulazione prevedeva la sola presenza di ceppi F4+, mentre successivamente il vaccino è stato migliorato e proposto in forma bivalente (F4/F18) (García *et al.*, 2020). Inoltre, è noto da molti anni come la genetica degli animali svolga un ruolo rilevante nella suscettibilità ai ceppi F4+ (Bijlsma *et al.*, 1982; Hu *et al.*, 1993). Alcuni paesi europei, come la Danimarca hanno implementato da molti anni strategie di selezione degli animali per ridurre la frequenza di geni che codificano per la forma recettoriale sensibile all'adesione dei ceppi F4 nella popolazione suina. Per cui la ormai larga diffusione di genetiche danesi all'interno della suinicoltura italiana, potrebbe aver avuto un ruolo importante nell'inversione di prevalenza tra F4+ e F18+. In ogni caso, d'accordo con Torreggiani *et al.* (2021) è difficile stabilire se ed eventualmente quanto, l'impiego dei vaccini sopracitati o le altre componenti di natura genetica possano aver in effetti governato questa inversione della prevalenza tra i due vrotipi. Infine, nel nostro studio, di 671 isolati positivi per la presenza di geni codificanti i fattori di patogenicità, il 28,6% non è stato classificato come ETEC in quanto positivo solo per un gene codificante una fimbria o una tossina. Tale dato è in accordo con quanto osservato da Luppi *et al.* nel 2016 (28,3%) e potrebbe essere legato alla presenza di altri fattori di patogenicità non ricercati in questo studio. Un esempio è dato dall'adesina AIDA e dalla tossina EAST-1, che possono essere associate a ETEC isolati da suini sintomatici, ed il cui ruolo non è ancora definito (Luppi *et al.*, 2016). I ceppi ETEC F18+ sono risultati maggiormente resistenti a trimetoprim + sulfametossazolo, florfenicolo, gentamicina e kanamicina rispetto ai ceppi ETEC F4+ in modo statisticamente significativo. Luppi *et al.*

nel 2015 aveva osservato un significativo aumento delle percentuali di resistenza di *E. coli* F4+ isolati tra il 2002 e il 2011 a enrofloxacin, marbofloxacin, flumechina, danofloxacin, florfenicolo, tiamfenicolo e cefquinome. Nel nostro caso la resistenza dei ceppi ETEC F4+ al florfenicolo è aumentata in modo non statisticamente significativo dal 2017 (60%) al 2021 (73,3%) mentre, per quanto riguarda l'enrofloxacin, da quanto descritto da Luppi *et al.*, la percentuale di ETEC F4+ resistenti a enrofloxacin nel 2011 (89,3%) era maggiore rispetto alle percentuali di resistenza per questa molecola ottenute nel nostro studio per ognuno degli anni considerati (Luppi *et al.*, 2015). Anche questo dato potrebbe in effetti essere giustificato come un importante risvolto della vaccinazione o della selezione genetica degli animali, che riducendo la frequenza di ceppi F4+ in allevamento ne ha anche ridotto la capacità di accumulare geni di resistenza agli antibiotici.

Infine, vi sono antibiotici in cui il livello di resistenza osservato ha raggiunto il massimo possibile, come l'ampicillina, per cui abbiamo riscontrato la percentuale maggiore di resistenza espressa dagli isolati del campione complessivo, ed è risultata non efficace (R:100%) in tutti i ceppi F4+ testati nel 2021 (n. 15). Inoltre, considerando tutte le categorie analizzate in questo studio, l'ampicillina è sempre stata la molecola verso cui si registrava più elevata percentuale di resistenza attestandosi sempre su valori maggiori del 90%. La valutazione del consumo di antibiotico effettuata su aziende suinicole dell'Emilia Romagna tra il 2016 e il 2018 (Bassi *et al.*, 2020), ha evidenziato come le aminopenicilline siano la classe di molecole più utilizzate in scrofe, suinetti sottoscrofa e suinetti svezzati. Alla luce di queste considerazioni, è necessario porre l'attenzione sull'uso di queste molecole in allevamento, soprattutto attraverso la via di somministrazione orale, responsabile della maggior esposizione delle enterobatteriacee alle molecole somministrate.

Multiresistenze

Gli 826 *E. coli* esaminati sono risultati contemporaneamente resistenti a 6 o più delle 10 molecole testate (multiresistenti) in più del 70% dei casi. Inoltre, solo 4 isolati erano completamente suscettibili a tutti i 10 antibiotici (0,5%). Valutando l'andamento delle multiresistenze negli anni, questo è risultato aumentare in maniera significativa negli ETEC F18+ resistenti a tutte le molecole testate (10/10). Riguardo, invece, i soli ETEC F4+ non è stato osservato un aumento significativo negli anni dei multiresistenti, diversamente da quanto osservato da Luppi *et al.* nel 2015. Il trend delle multiresistenze espresse da ceppi ETEC F4+ tra il 2002 e il 2011, infatti, era risultato significativamente aumentato per gli isolati resistenti a 6-8 molecole e per quelli resistenti a 9-12 antibiotici contemporaneamente (Luppi *et al.*, 2015).

CONCLUSIONI

I risultati ottenuti da questo studio pongono l'attenzione sulla pressione selettiva esercitata dagli antibiotici nell'allevamento suino nelle aziende dell'Emilia Romagna. Le resistenze agli antibiotici degli 826 *E. coli* considerati sono risultate maggiori nei confronti delle classi di molecole maggiormente utilizzate nell'allevamento suinicolo, indipendentemente dalla patogenicità dei ceppi rilevati. Questo dato, oltre a rispecchiare l'elevato grado di diffusione delle resistenze all'interno della flora enterica commensale, sottolinea anche una minor capacità terapeutica nei confronti delle manifestazioni sostenute da *E. coli* ETEC. Quanto osservato conferma la necessità di intraprendere politiche di riduzione del consumo degli antibiotici attraverso l'uso razionale di questi ultimi. A questo scopo le terapie antibiotiche dovrebbero essere mirate e quindi successive alla diagnosi eziologica e al saggio della sensibilità agli antibiotici dell'agente patogeno circolante nell'allevamento, come indicato nelle Linee guida Regionali sull'uso prudente dell'antibiotico pubblicate

dalla Regione Emilia-Romagna (2018). Inoltre, la corretta gestione degli interventi vaccinali e delle misure di biosicurezza interna ed esterna assume particolare rilevanza ai fini della riduzione dell'uso di antibiotici in allevamento prevenendo l'instaurarsi ed il propagarsi di malattie infettive in azienda.

RINGRAZIAMENTI

Il presente lavoro è parzialmente finanziato dal Ministero della Salute PRC2019003

BIBLIOGRAFIA

1. Baldo V., Salogni C., Giovannini S., D'Incau M., Boniotti M.B., Birbes L., Pitozzi A., Formenti N., Grassi A., Pasquali P., Alborali G.L. (2020) "Pathogenicity of Shiga Toxin Type 2e *Escherichia coli* in Pig Colibacillosis". *Front Vet Sci.* 7:545818.
2. Bassi P., Salvarani C., Pangallo G., Scali F., Luppi A., Trevisi P., Rugna G., Motta V., Diegoli G., Meriardi G. (2020) "Ridurre il consumo di antibiotico: risultati di un progetto PSR in 30 aziende dell'Emilia Romagna nel triennio 2016-2018" SIPAS in stampa.
3. Brand P., Gobeli S., Perreten V. (2017) "Pathotyping and antibiotic resistance of porcine enterovirulent *Escherichia coli* strains from Switzerland (2014-2015)". *Schweiz Arch Tierheilkd.* 159(7):373-380.
4. Bijlsma I.G.W., De Nijs A., Van Der Meer C., Frik J.F. (1982) "Different pig phenotypes affect adherence of *Escherichia coli* to jejunal brush borders by K88ab, K88ac, or K88ad antigen." *Infect Immun* 37:891-894.
5. 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(1):25-30.
6. Do K.H., Byun J.W., Lee W.K. (2020) "Virulence genes and antimicrobial resistance of pathogenic *Escherichia coli* isolated from diarrheic weaned piglets in Korea". *J Anim Sci Technol.* 62(4):543-552.
7. European Food Safety Authority (EFSA) (2020) "The European Union Summary Report on Antimicrobial Resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017/2018". *EFSA Journal*; 18(3):6007.
8. European Medicine Agency (EMA) - European Surveillance of Veterinary Antimicrobial Consumption (ESVAC) Project (2020). Sales of Veterinary Antimicrobial Agents in 31 European Countries in 2018 (EMA/24309/2020).
9. Fairbrother J. M., Gyles C.L. (2012) "Colibacillosis" in Zimmerman J.J., Krieger L.A., Ramirez A., Schwartz K.J., Stevenson G.W. "Disease of Swine", 10a ed. UK, Wiley-Blackwell, 723-749.
10. García-Meniño I., García V., Alonso M.P., Blanco J.E., Blanco J., Mora A. (2021) "Clones of enterotoxigenic and Shiga toxin-producing *Escherichia coli* implicated in swine enteric colibacillosis in Spain and rates of antibiotic resistance". *Vet Microbiol.* 252:108924.
11. Garcia V. (2020) "Intestinal adhesion and subsequent colonization by ETEC depends on F4- or F18-specific receptors, the presence of which is essential for ETEC to cause disease" *American society for Microbiology*
12. Hayer S.S., Rovira A., Olsen K., Johnson T.J., Vannucci F., Rendahl A., Perez A., Alvarez J. (2020) "Prevalence and trend analysis of antimicrobial resistance in clinical *Escherichia coli* isolates collected from diseased pigs in the USA between 2006 and 2016". *Transbound Emerg Dis.* 1-12.

13. Hu Z.L., Hasler-Rapacz J., Huang S.C., Rapacz J. (1993) “Studies in swine on inheritance and variation in expression of small intestinal receptors mediating adhesion of the K88 enteropathogenic *Escherichia coli* variants.” *J Hered* 84:157–165.
14. Lekagul A., Tangcharoensathien V., Yeung S. (2019) “Patterns of antibiotic use in global pig production: A systematic review”. *Vet Anim Sci.* 7:100058.
15. Luppi A., Bonilauri P., Dottori M., Gherpelli Y., Biasi G., Merialdi G., Maioli G., Martelli P. (2015) “Antimicrobial resistance of F4+ *Escherichia coli* isolated from Swine in Italy”. *Transbound Emerg Dis.* 62(1):67-71.
16. Luppi A., Bonilauri P., Gherpelli Y., Rosamilia A., Biasi G., Maioli G., Dottori M. (2014) “Prevalence of F4 hemolytic *E. coli* isolated from pigs with post-weaning diarrhea” *Proceedings of the 23rd International Pig Veterinary Society (IPVS) Congress* June 8 – 11, Cancun, Quintana Roo, Mexico, vol. II, 469.
17. Luppi A., Gibellini M., Gin T., Vangroenweghe F., Vandenbroucke V., Bauerfeind R., Bonilauri P., Labarque G., Hidalgo Á. (2016) “Prevalence of virulence factors in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs with post-weaning diarrhoea in Europe”. *Porcine Health Manag.* 2:20.
18. Luppi A. (2017) “Swine enteric colibacillosis: diagnosis, therapy and antimicrobial resistance”. *Porcine Health Manag.* 3:16.
19. Moennighoff C., Thomas N., Nienhaus F., Hartmann M., Menrath A., Merkel J., Detlefsen H., Kreienbrock L., Hennig-Pauka I. (2020) “Phenotypic antimicrobial resistance in *Escherichia coli* strains isolated from swine husbandries in North Western Germany - temporal patterns in samples from laboratory practice from 2006 to 2017”. *BMC Vet Res.* 16(1):37.
20. Moredo F.A., Piñeyro P.E., Márquez G.C, Sanz M., Colello R., Etcheverría A., Padola N.L., Quiroga M.A., Perfumo C.J., Galli L., Leotta G.A. (2015). “Enterotoxigenic *Escherichia coli* Subclinical Infection in Pigs: Bacteriological and Genotypic Characterization and Antimicrobial Resistance Profiles”. *Foodborne Pathog Dis.* 12(8):704-11.
21. Piano Nazionale di Contrasto dell’Antimicrobico Resistenza (PNCAR). Ministero della Salute, Italia.
22. https://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_2660_allegato.pdf
23. Regione Emilia Romagna (2018) “Linee Guida Uso prudente degli antibiotici nell’allevamento suino”,
24. <https://www.alimenti-salute.it/content/linee-guida-uso-antibiotici-nellallevamento-suino>
25. Renzhammer R., Loncaric I., Roch F.F., Piniör B., Käsbohrer A., Spersger J., Ladinig A., Unterweger C. (2020) “Prevalence of Virulence Genes and Antimicrobial Resistances in *E. coli* Associated with Neonatal Diarrhea, Postweaning Diarrhea, and Edema Disease in Pigs from Austria”. *Antibiotics (Basel).* 9(4):208.
26. Torreggiani C., Prosperi A., Chiapponi C., Manfredi R., Baioni L., Baraldini E., Dottori M., Rugna G., Bassi P., Alborali G.L., Vezzoli F., Luppi A. (2021) “*Escherichia coli* Enterotossigeni isolati da focolai di Colibacillosi Enterica nel Post-Svezzamento.” *Atti SIPAS 2021 – in stampa.*