

RESISTENZA AGLI ANTIBIOTICI E FATTORI DI VIRULENZA IN CEPPI DI *ESCHERICHIA COLI* ISOLATI DA SUINI SOTTOSCROFA E SVEZZAMENTO

ANTIMICROBIAL RESISTANCE AND VIRULENCE FACTORS IN E. COLI STRAINS ISOLATED FROM PIGLETS

FACCINI S., ROSIGNOLI C., FRANZINI G., NIGRELLI A.D.

IZSLER Sezione diagnostica di Mantova

Antibiotico-resistenza, *E.coli*, fattori di patogenicità

Antimicrobial resistance, *E.coli*, virulence factors

Riassunto

366 ceppi di *E.coli* sono stati isolati da campioni di suini, in lattazione e svezzamento, con patologie enteriche, conferiti presso sezione IZSLER di Mantova dal 2010 al 2013. I ceppi sono stati analizzati per la presenza di geni per alcuni fattori di patogenicità (PFs): F4, F5, F6, F41, e F18, LT, STa e STb, mediante PCR multiplex. Inoltre, è stato eseguito un test di sensibilità agli antibiotici, mediante agar-diffusione, per un pannello di 19 agenti antimicrobici, appartenenti a 9 classi differenti. Il numero medio di resistenze è stato di 10.2 ± 3.5 riferito a singoli farmaci e 6.9 ± 1.6 per le classi di appartenenza. I fenotipi di resistenza più comuni sono stati: Tetraciclina (95.24%), Tiamfenicolo (94.16%), e Amoxicillina (93.14%). Gli isolati multi-resistenti (resistenti a più di 3 classi di antibiotici) rappresentavano il 96%. In particolare: il 32% era resistente a 4-6 classi di agenti antimicrobici, il 49 % a 7-8 classi e il 15% a 9-10 classi. Il 51.4% dei ceppi possedeva almeno un gene per PFs. I più frequenti sono stati: STb (38.25%), LT (28.14%), STa (26.23%). La resistenza ad Apramicia è risultata più frequente nei ceppi con almeno un gene per PF. Al contrario, nei ceppi senza PFs, i resistenti ai chinoloni erano significativamente maggiori. Questi risultati mostrano la necessità d'indagini più approfondite sulle relazioni tra fattori di virulenza e antibiotico-resistenza, per far luce sui meccanismi di diffusione e indirizzare gli approcci terapeutici.

Abstract

A total of 366 *E.coli* strains were isolated from samples from diseased piglets submitted to the IZSLER diagnostic section of Mantova between 2010 and 2013. A multiplex PCR was performed for detection of some pathogenic factors: F4, F5, F6, F41, F18, LT, STa, and STb. A panel of 19 antimicrobial agents, belonging to 10 different classes, was considered for testing antibiotic sensitivity by Kirby-Bauer disk diffusion method. The mean number of resistances was 10.2 ± 3.5 in reference to single drugs, and 6.9 ± 1.6 for antimicrobial classes. Most common resistance phenotypes were against Tetracycline (95.24%), Thiamphenicol (94.16%), and Amoxicillin (93.14%). Multi-drug resistant isolates (resistant against more than 3 antimicrobial classes) were 96%. In particular 32% had resistances against 4-6 classes of antimicrobial agents, 49% against 7-8 antimicrobial classes and 15% against 9-10 classes. At least one gene for pathogenic factor was detected in 188 strains (51.4%). Most frequent were: STb (38.25%), LT (28.14%), STa (26.23%). Interestingly resistance against Apramycin was more frequent among *E.coli* strains with at least one gene for PFs. On the contrary, in nPFs strains, the proportion of those resistant

to quinolones was significantly higher. These results highlight the importance of deeper investigations on relations between antimicrobial resistance and virulence factors to better understand their mechanism of diffusion and therapeutic approaches.

INTRODUZIONE

Escherichia coli fa parte della flora microbica commensale dell'intestino dell'uomo e degli animali. D'altra parte, ceppi patogeni di questa specie rappresentano una delle principali cause di morbilità e mortalità nel mondo (Mainil, 2013).

Diarrea neonatale, diarrea pre-svezzamento, diarrea post-svezzamento, gastroenterite emorragica, malattia degli edemi, colibacillosi sistemica sono le patologie più importanti legate a infezioni da *Escherichia coli* nei suini. Nei decenni passati, alcuni antimicrobici sono stati utilizzati come promotori della crescita dei suinetti allo svezzamento, attraverso la prevenzione delle forme cliniche e subcliniche. Le crescenti preoccupazioni per la diffusione di ceppi batterici resistenti hanno portato l'Unione Europea (UE) a vietare dal 1 gennaio 2006 l'uso di antibiotici come promotori della crescita nella produzione di suini e bestiame.

E' noto che geni per la resistenza agli antibiotici e per fattori di virulenza possono essere trasferiti orizzontalmente tra ceppi di *E.coli* e di altre specie batteriche, attraverso elementi genetici trasmissibili (Szmolka and Nagy, 2013).

Questo studio è una valutazione della resistenza antimicrobica di ceppi di *E.coli*, con e senza i geni per alcuni fattori di patogenicità, isolati da suinetti in lattazione e svezzamento, con patologie enteriche, conferiti tra il 2010 ed il 2013 presso la sezione diagnostica IZSLER di Mantova.

MATERIALI E METODI

366 ceppi di *E coli* sono stati isolati da suini in lattazione e svezzamento, conferiti alla sezione diagnostica IZSLER di Mantova tra il 2010 e il 2013. I ceppi sono stati testati per la sensibilità ad un gruppo di 19 diversi agenti antimicrobici, appartenenti a 10 classi differenti, secondo le linee guida del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Al fine dell'elaborazione dei dati, i ceppi con sensibilità intermedia sono stati calcolati insieme ai sensibili, considerandoli "non resistenti". Ceppi di *E.coli* resistenti a più di 3 diverse classi di antibiotici sono stati considerati come multi-resistenti (MDR). Una PCR multiplex (Casey and Bosworth, 2009) è stata eseguita per la rilevazione di alcuni fattori di patogenicità (PFs): 5 diverse adesine (F4, F5, F6, F41, e F18), 3 enterotossine (LT, STa, e STb). Per valutare la significatività della differenza tra le proporzioni di isolati resistenti nei ceppi con geni per PFs e in quelli senza è stato utilizzato il test chi-quadrato. Un p-value <0.05 è stato considerato come significativo.

RISULTATI

Tutti i 366 ceppi analizzati hanno mostrato resistenza ad almeno 2 antimicrobici. I fenotipi di resistenza più comuni sono stati rilevati contro Tetraciclina (95,24%), Tiamfenicolo (93,05%) e Amoxicillina (92,46%) (Tabella 1).

| Classe antibiotica | Antibiotico | Ceppi | %R |
|--------------------|-------------------------------|-------|-------|
| Aminociclitoli | Spectinomicina | 365 | 57,53 |
| Aminoglicosidi | Aminosidina | 327 | 56,57 |
| | Apramicina | 366 | 47,54 |
| | Neomicina | 357 | 70,59 |
| | Gentamicina | 366 | 51,64 |
| Cefalosporine | Cefalexina | 275 | 38,55 |
| | Ceftiofur | 361 | 25,14 |
| Macrolidi | Tilmicosina | 344 | 88,66 |
| Penicilline | Amoxicillina | 358 | 92,46 |
| | Amoxicillina + Ac.Clavulanico | 295 | 15,59 |
| Fenicoli | Florfenicolo | 274 | 52,92 |
| | Tiamfenicolo | 331 | 93,05 |
| Polipeptidi | Colistina (polimixin E) | 366 | 7,10 |
| Chinoloni | Danofloxacin | 275 | 46,18 |
| | Enrofloxacin | 366 | 51,37 |
| | Flumequina | 366 | 60,66 |
| | Marbofloxacin | 355 | 41,13 |
| Sulfamidici | Trimetoprim + Sulfamidici | 359 | 84,68 |
| Tetraciclina | Tetraciclina | 357 | 95,24 |

Tabella 1. Antibiotici utilizzati e relativa percentuale di ceppi resistenti.

Table 1. Antimicrobial agents and percentages of resistant strains

Il numero medio di resistenze è risultato $10,2 \pm 3,5$ riferito a singoli farmaci e $6,9 \pm 1,6$ considerando le classi di antimicrobici. Almeno un gene per un fattore di virulenza è stato rilevato in 188 ceppi (51.4%). I più frequenti sono stati: STb (38.25%), LT (28.14%), STa (26.23%). Il 96% degli isolati si è dimostrato MDR. In particolare, il 32% apparteneva al gruppo con resistenze contro 4-6 classi di agenti antimicrobici, il 49% aveva resistenze a 7-8 classi di antimicrobici e il 15% a 9-10 classi (figura1).

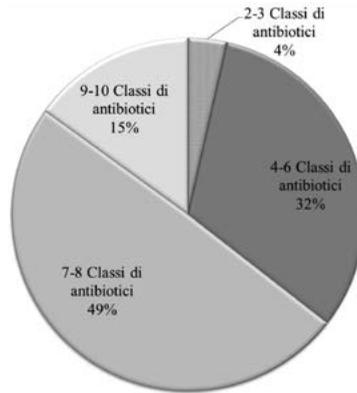


Figura 1. Suddivisione dei ceppi in base al numero di resistenze alle varie classi di antimicrobici

Figure 1. Distribution of *E. coli* strains in different groups according to the number of resistances to the antimicrobial classes

La resistenza ad Apramicina è risultata significativamente più frequente nei ceppi di *E. coli* con PFs. Al contrario, la proporzione di quelli resistenti a chinoloni era significativamente superiore in ceppi che non presentavano i FP ricercati (Tabella 2 e 3).

| Antibiotico | nPFs | %R nPFs | PFs | %R PFs |
|-------------------------------|------|---------|-----|--------|
| Aminosidina | 158 | 53.16 | 169 | 59.76 |
| Amoxicillina | 176 | 92.61 | 182 | 92.31 |
| Amoxicillina + Ac.Clavulanico | 138 | 11.59 | 157 | 19.11 |
| Apramicina | 178 | 37.64 | 188 | 56.91 |
| Cefalexina | 134 | 40.30 | 141 | 36.88 |
| Ceftiofur | 175 | 27.84 | 186 | 22.58 |
| Colistina | 178 | 5.62 | 188 | 8.51 |
| Danofloxacina | 136 | 52.94 | 139 | 39.57 |
| Enrofloxacin | 178 | 59.55 | 188 | 43.62 |
| Florfenicolo | 136 | 48.53 | 138 | 57.25 |
| Flumequina | 178 | 69.10 | 188 | 52.66 |
| Gentamicina | 178 | 46.63 | 188 | 56.38 |
| Marbofloxacina | 173 | 47.40 | 182 | 35.16 |
| Neomicina | 174 | 68.97 | 183 | 72.13 |
| Spectinomina | 177 | 54.24 | 188 | 60.64 |
| Tetraciclina | 174 | 92.53 | 183 | 97.81 |
| Tiamfenicolo | 163 | 95.09 | 168 | 91.07 |
| Tilmicosina | 162 | 90.12 | 182 | 87.36 |
| Trimetoprim + Sulfamidici | 173 | 84.97 | 186 | 84.41 |

Tabella 2. Antibiotici utilizzati e relativa percentuale di ceppi resistenti (%R) nel gruppo senza i fattori di patogenicità ricercati (nPFs) e in quello con almeno un fattore rilevato.

Table 2. Antimicrobial agents and percentages of resistant strains among those without the searched pathogenic factors (nPFs) and those with at least one.

| Antibiotico | R nPF | R PF | p-value |
|--------------------|--------------|-------------|----------------|
| Apramicina | 67/178 | 107/188 | p <0.01 |
| Enrofloxacin | 106/178 | 82/188 | p <0.01 |
| Danofloxacin | 72/136 | 55/139 | p <0.05 |
| Flumequina | 123/178 | 99/188 | p <0.01 |
| Marbofloxacin | 82/173 | 64/182 | p <0.05 |

Table 3. Proporzione di ceppi resistenti (e relativa percentuale) nel gruppo senza ed in quello con PFs (R nPF and R PF) e relativo p-value.

Table 3. Proportions of resistant strains among those without and with PFs (R nPF and R PF).

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Lo studio conferma l'alta prevalenza di *E.coli* MDR nella popolazione suina (Ramos et al. 2013). Ad eccezione dell'Apramicina non sono però state riscontrate, nei ceppi con almeno un gene per PFs, resistenze più frequenti rispetto a quelli che ne erano privi. Questo dato contrasta con alcuni studi che riportano una generalizzata maggior resistenza agli antibiotici nei ceppi patogeni (Boerlin et al. 2005), ma i dati in letteratura a riguardo sono contrastanti (Da Silva and Mendonca, 2012). Al contrario, nei ceppi nPFs, la proporzione di quelli resistenti ai chinoloni è risultata significativamente più alta. Pur essendo da molti condiviso il legame tra resistenza ai chinoloni e riduzione della virulenza, i dati in letteratura, anche a questo riguardo, presentano contraddizioni e il meccanismo alla base del fenomeno è lontano dall'essere compreso (Da Silva and Mendonca, 2012).

I risultati ottenuti mostrano l'importanza d'indagini più approfondite sulle relazioni tra fattori di virulenza e antibiotico-resistenza, per far luce sui meccanismi di diffusione e supportare un utilizzo ragionato delle molecole antimicrobiche in campo.

BIBLIOGRAFIA

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.

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.

Da Silva, G.J., Mendonca, N. (2012) *Association between antimicrobial resistance and virulence in Escherichia coli. Virulence* 3, 18-28.

Mainil, J. (2013) *Escherichia coli virulence factors. Vet. Immunol. Immunopathol.* 152, 2-12.

Ramos, S., Silva, N., Canica, M., Capelo-Martinez, J.L., Brito, F., Igrejas, G., Poeta, P. (2013) *High prevalence of antimicrobial-resistant Escherichia coli from animals at slaughter: a food safety risk. J. Sci. Food Agric.* 93, 517-526.

Szmolka, A., Nagy, B. (2013) *Multidrug resistant commensal Escherichia coli in animals and its impact for public health. Front. Microbiol.* 4, 258.