

CARATTERIZZAZIONE BIOMOLECOLARE, TIPIZZAZIONE SIEROLOGICA E RESISTENZA AGLI ANTIMICROBICI IN CEPPI DI ESCHERICHIA COLI PRODUTTORI DI SHIGA TOSSINA (STEC) ISOLATI DA SUINI

BALDO V.^[1], D'INCAU M.^[1], SALOGNI C.^[1], GIOVANNINI S.^[1], ROSSI L.^[2],
ACQUARONE F.^[3], BONIOTTI M.B.^[1], PASQUALI P.^[4], ALBORALI G.L.^[1]

^[1]Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia ~ Brescia ~ Italy, ^[2]Dipartimento VESPA, Università degli Studi di Milano ~ Milano ~ Italy, ^[3]Dipartimento di Scienze Medico Veterinarie, Parma ~ Parma ~ Italy, ^[4]Istituto Superiore Sanità ~ Roma ~ Italy

Keywords: STEC, antimicrobial-resistance, biomolecular characterization

Riassunto

L'obiettivo del lavoro è di valutare i profili di antibiotico-resistenza, le caratteristiche biomolecolari e sierologiche dei ceppi di Escherichia coli produttori di Shigatossina (STEC) isolati da suini in accrescimento con diarrea e sintomatologia riconducibile a malattia degli edemi. Sono stati isolati 50 ceppi di E. coli risultati essere produttori di Shigatossina STX2e provenienti da suini in svezzamento (72%) ed in magronaggio (26%). Le lesioni anatomo-patologiche riscontrate erano caratterizzate da edema (32%), enterite catarrale-emorragica (26%) ed enterite catarrale (24%) e linfadenite (6%). Il 92% dei ceppi di STEC hanno presentato il fattore fimbriale F18 e il 34% appartenevano al sierogruppo O139. Una elevata percentuale di ceppi è risultata essere resistente a Tetraciclina (92%), Amoxicillina (92%), Neomicina (90%), Doxicilina (90%), Sulfamidico/Trimethoprim (86%), Cefaloridina (82%), Sulfadiazina (82%). Il 74% dei ceppi STEC si sono dimostrati resistenti contemporaneamente ad un numero superiore a 9 antimicrobici e il 64% appartenenti alle classi di multiresistenza comprese tra 10 e 14.

Abstract

The aim of this study is to determine the antimicrobial susceptibility profiles of Shiga-toxin producing Escherichia coli (STEC) isolated in growing pigs clinically affected by edema disease and diarrhea. 50 STEC strains have been isolated in weaning (72%) and growing-finishing pigs (26%) with anatomo-pathological lesions related to edema (32%), catarrhal-hemorrhagic enteritis (26%), catarrhal enteritis (24%) and lymphadenitis (6%). The STEC often have the F18 fimbrial factor (92%) and sometimes belong to serogroup O139 (34%). A high percentage of strains was resistant to Tetracycline (92%), Amoxicillin (92%), Neomycin (90%), Doxycilina (90%), Sulfonamide / Trimethoprim (86%), Cephaloridine (82%), Sulfadiazine (82%). 74% of STEC were simultaneously resistant to antimicrobials number greater than 9 and 64% is included in multidrug resistance patterns between 10 and 14.

INTRODUZIONE:

I ceppi di Escherichia coli con potenziale patogeno sono distinti in patotipi intestinali ed extra intestinali. Nel primo patotipo sono inclusi i ceppi enterotossici (ETEC), enteropatogeni (EPEC), produttori di Shigatossina (STEC) che possono essere indicati come verocitotossici (VTEC) o enteroemorragici (EHEC), enteroaggregativi (EAEC),

enteroinvasivi (EIEC) e diffusamente aderenti (DAEC). Al patotipo extra intestinale appartengono i ceppi uropatogeni (UPEC), necrotossigeni (NTEC) e setticemici (SEPEC) (15). La patogenicità dei ceppi di E.coli è legata a diversi fattori quali la capacità adesiva, la produzione di tossine e l'antibiotico resistenza (3, 5). Nei ceppi di E. coli riconosciuti patogeni negli animali prevalgono gli antigeni fimbriali F4, F5, F6, F41, F18 (8, 19). Gli STEC sono oggi considerati importanti sia per la salute umana che per la sanità animale. Nell'uomo possono causare colite emorragica e sindrome emolitica generalizzata con uremia (SEU) e possono essere trasmessi per assunzione di cibo e acqua contaminati o per contatto diretto con soggetti infetti (6, 17). Negli animali sono responsabili di forme cliniche gravi enteriche e enterotossiemiche. I suini ed i ruminanti sono considerati rispettivamente potenziali "carrier" ad alta prevalenza (10%) e "reservoir" per i ceppi STEC trasmissibili all'uomo (16). L'abilità dei ceppi STEC a determinare malattia sia nell'uomo che negli animali è legata alla produzione di una o più tossine (16). Le tossine prodotte possono essere associate alla cellula batterica definite VT1 (STX1) ed esterne alla cellula batterica identificate come VT2 (STX2). Le tossine VT2 presentano numerose varianti fra le quali la STX2e, è considerata la più importante nel suino e responsabile della malattia degli edemi e della diarrea post-svezzamento. Scopo del presente lavoro è di valutare i profili di antibiotico-resistenza, le caratteristiche biomolecolari, sierologiche ed antigeniche dei ceppi STEC isolati da suini in accrescimento con diarrea e sintomatologia riferita a malattia degli edemi.

MATERIALI E METODI:

Durante l'attività diagnostica svolta presso la Sezione Diagnostica di Brescia (IZSLER) nel periodo 2013-2015 sono stati prelevati campioni di feci, di intestino e di linfonodi meseraici provenienti da suini in accrescimento che presentavano sintomatologia clinica enterica e enterotossiemica. Per ogni soggetto è stata individuata la fase di allevamento da cui provenivano. I suini sono stati sottoposti ad esame necroscopico riportando il quadro anatomopatologico macroscopico osservato: enterite catarrale, catarrale-emorragica, linfoadenite, presenza di edema del mesentere/ sottocutaneo della regione frontale/ della parete dello stomaco. I campioni sono stati analizzati mediante esame batteriologico ed i ceppi di E.coli isolati sono stati sottoposti a conferma di identificazione, caratterizzazione biomolecolare, sierotipizzazione e test di valutazione della sensibilità agli antimicrobici. L'esame batteriologico è stato effettuato secondo le tecniche standardizzate presso il Laboratorio. Il campione è stato direttamente seminato su terreno selettivo differenziale agar Mac Conkey e terreno agar globuli, incubati in aerobiosi a $37\pm 2^{\circ}\text{C}$ per 18-24 ore. Le colonie tipiche isolate su Mac Conkey sono state esaminate microscopicamente mediante colorazione di Gram, sottoposte a prove biochimico-enzimatiche ed identificate mediante gallerie di identificazione Api 20E, (bioMérieux). Il ceppo puro ottenuto su terreno BHI (Brain Heart Infusion) è stato sottoposto a caratterizzazione biomolecolare per la ricerca di antigeni codificanti le verocitotossine.

Caratterizzazione biomolecolare e tipizzazione sierologica

Tutti i ceppi batterici isolati sono stati identificati e caratterizzati a livello biomolecolare tramite tecnica PCR (Polymerase Chain Reaction) per la ricerca di antigeni codificanti verocitotossine VT1, VT2, VTe. Dopo una prima amplificazione di screening (VT universale) per la valutazione della presenza di geni codificanti per una o più varianti e a seguito di positività si è proceduto all'amplificazione specifica delle varianti VT1, VT2, VTe a partire dal DNA del microrganismo (9, 11, 18). Tutti i ceppi risultati positivi in PCR per la ricerca VTe sono stati testati per la ricerca di antigeni fimbriali F4, F5, F6, F18, F41.

La sierotipizzazione è stata effettuata con tecnica di agglutinazione lenta a caldo mediante l'uso di un pannello di trenta antisieri O gruppo-specifici (4, 7, 14, 20).

Test di sensibilità agli antimicrobici

Il test di sensibilità agli antimicrobici è stato effettuato utilizzando il terreno Mueller-Hinton secondo il metodo Kirby-Bauer, con i criteri descritti dal Clinical and Laboratory Standards Institute (1, 2). È stato utilizzato un pannello di 22 antimicrobici che comprendeva i principali antibatterici impiegati nell'allevamento suino e quelli previsti per il trattamento delle infezioni sostenute da Enterobacteriaceae. Sono stati testati i seguenti antimicrobici: Amminosidina(60µg), Amoxicillina(25µg), Amoxicillina/Ac. Clavulanico(30µg), Apramicina(15µg), Cefaloridina (30µg), Cefquinome (30µg), Ceftiofur (30µg), Colistina (10µg), Danofloxacin (5µg), Doxiciclina (30µg), Enrofloxacin (5µg), Florfenicolo (30µg), Flumequina (30µg), Gentamicina (10µg), Kanamicina (30µg), Marbocyl (5µg), Neomicina (10µg), Penicillina (10µg), Sulfadiazina (0,25µg), Tetraciclina (30µg), Tiamulina (30µg), Sulfamidico/Trimethoprim (25µg). La lettura è stata effettuata mediante misurazione manuale degli aloni di inibizione. Gli isolati sono stati classificati in sensibili, intermedi e resistenti.

RISULTATI E DISCUSSIONE:

Sono stati identificati e tipizzati 50 ceppi di E. coli risultati essere produttori di Shiga-tossina STX2e. Tali ceppi sono stati isolati da suini in sala parto (n=1), in svezzamento (n=36) e in magronaggio (n=13).

Il quadro anatomopatologico macroscopico osservato è stato riconducibile ad enterite catarrale in 12 soggetti, ad enterite catarrale-emorragica in 13, 6 soggetti presentavano linfadenite e 16 edema.

Caratterizzazione biomolecolare e tipizzazione sierologica

In tabella 1 sono riportati i risultati della tipizzazione sierologica e delle indagini biomolecolari effettuate sui ceppi STEC per la ricerca dei fattori di virulenza fimbriali.

ND	SIEROGRUPPO											CARATTERIZZAZIONE BIOMOLECOLARE							
	O1	O2	O6	O8	O9	O128	O139	O141	O147	O149	O157	VT1	VT2	Vte	F4	F5	F6	F41	F18
10		1			1		4					0	0	16	0	0	0	0	14
9							6					0	0	15	0	0	0	0	14
11				1			7					0	0	19	0	0	0	0	18
TOT.	30	0	1	0	1	1	0	17	0	0	0	0	0	50	0	0	0	0	46

Tabella 1 - Tipizzazione sierologica e indagini biomolecolari in ceppi STEC Table 1 – Serotyping and biomolecular characterization in STEC

46 ceppi STEC presentavano fattore fimbriale F18 e tutti negativi per F4, F5, F6, F41. Il sierogruppo risultato più frequentemente associato a STEC è stato O139 (n=17) mentre altri sierogruppi quali O2, O8 e O9 sono risultati associati rispettivamente ad un singolo ceppo STEC. Va considerato che 30 ceppi sono risultati non appartenere ai sierogruppi ricercati. Test di sensibilità agli antimicrobici I risultati al test di sensibilità agli antimicrobici sono riportati nella tabella 2 e sono espressi come percentuale di ceppi risultati sensibili, intermedi e resistenti ai 22 antimicrobici selezionati.

	S	I	R
Amminosidina	40%	2%	58%
Amoxicillina	8%	0%	92%
Amoxicillina + A. clavulanico	52%	30%	14%
Apramicina	30%	2%	56%
Cefalotina	8%	10%	82%
Cefquinome	84%	0%	10%
Ceftiofur	88%	4%	6%
Colistina	44%	40%	16%
Danofloxacin	54%	32%	12%
Doxiciclina	6%	0%	90%
Enrofloxacin	70%	14%	14%
Florfenicolo	36%	6%	18%
Flumequine	60%	12%	28%
Gentamicina	32%	2%	66%
Kanamicina	22%	20%	58%
Marbofloxacin	88%	0%	12%
Neomincina	4%	6%	90%
Penicillina	0%	0%	100%
Sulfadiazina	10%	0%	82%
Tetraciclina	4%	2%	92%
Tiamulina	4%	4%	76%
Sulfonamidi + Trimethoprim	2%	0%	86%

Tabella 2 – Sensibilità agli antimicrobici di STEC Table 2 – Antimicrobial sensitivity in STEC

Tutti i ceppi testati per la sensibilità agli antibatterici hanno presentato resistenza nei confronti della Penicillina. Una elevata percentuale di ceppi superiore al 90% è risultata essere resistente a Tetraciclina (92%), Amoxicillina (92%), Neomicina (90%), Doxiciclina (90%) mentre oltre l'80% sono risultati resistenti a Sulfamidi + Trimethoprim (86%), Cefaloridina (82%), Sulfadiazina (82%). Altre molecole in cui è stata riscontrata una percentuale di resistenza compresa tra il 50 e l'80% dei ceppi sono Tiamulina (76%), Gentamicina (66%), Kanamicina e Amminosidina (58%), Apramicina (56%). Una percentuale percentuali di ceppi resistenti inferiori al 20% sono Florfenicolo (18%), Colistina (16%), Amoxicillina + Ac. Clavulanico ed Enrofloxacin (14%), Danofloxacin e Marbofloxacin (12%), Cefquinome (10%), Ceftiofur (6%)

Nella tabella 3 sono indicati i conteggi dei ceppi di STEC resistenti contemporaneamente ad un determinato numero di antimicrobici (multiresistenza).

N. resistenze	Conteggio ceppi
5	2
6	2
7	1
8	3
9	5
10	5
11	8
12	5
13	6
14	8
15	1
16	2
17	2

Tabella 3 – Pattern di multiresistenza dei ceppi STEC Table 3 – Multidrug-resistant patterns of STEC strains

37 ceppi STEC sono risultati resistenti contemporaneamente ad numero superiore a 9 antimicrobici. Le classi di multiresistenza maggiormente rappresentate sono quelle rispettivamente con 11, 13, 14 antimicrobici.

Discussione

I 50 STEC sono stati isolati in suini provenienti dallo svezzamento (72%), magronaggio (26%) e solo in un caso da suinetti in sala parto (2%)

Il quadro anatomopatologico macroscopico osservato nei soggetti da cui sono stati isolati STEC era caratterizzato da edema (32%), enterite catarrale-emorragica (26%), enterite catarrale (24%), e linfadenite (6%).

I 92% dei ceppi STEC presentavano il fattore fimbriale F18 e appartevano al sierogruppo O139 (34%).

I risultati delle indagini di sensibilità agli antimicrobici hanno evidenziato che il 74% dei ceppi STEC si sono dimostrati resistenti contemporaneamente ad numero superiore a 9 antimicrobici. Il 64% dei ceppi isolati apparteneva alle classi di multiresistenza comprese tra 10 e 14. In particolare elevate percentuali di resistenza sono state registrate a carico di Penicillina, Tetraciclina, Neomicina, Amoxicillina, Doxiciclina, Sulfamidico potenziato a Trimethoprim, Cefaloridina, Sulfadiazina e Tiamulina.

Il pattern di multiresistenza risultato più frequente comprendeva Neomicina, Penicillina, Tetraciclina, Sulfadiazina, Amoxicillina e Sulfamidico potenziato a Trimethoprim. In aggiunta a questo la presenza di ulteriori resistenze quali Doxiciclina, Gentamicina, Kanamicina, Apramicina, Cefalotina e Tiamulina conferiva al ceppo caratteristiche di estesa resistenza.

I risultati ottenuti trovavano riscontro in recenti studi di antibiotico resistenza suina nei quali prevale resistenza nei confronti di Tetraciclina, Sulfamidico + Trimethoprim, Penicillina, Sulfadiazina, Gentamicina, Kanamicina (5, 16).

L'isolamento di ceppi STEC con fattore fimbriale F18 e multiresistenti in suini con sintomatologia tipica conferma l'importanza della diagnosi eziologica in episodi di enterite ed enterotossimia. La disponibilità di indagini di laboratorio specifiche consente di procedere

alla scelta dell'impiego di antimicrobici e di prevedere l'impostazione di programmi vaccinali specifici. Lo studio è da considerare preliminare e necessita di ulteriori approfondimenti diagnostici e clinici al fine di ampliare il numero dei ceppi STEC isolati e consentire una valutazione anche statistica delle loro caratteristiche antigeniche, dei fattori di virulenza e del profilo di resistenza agli antimicrobici. Lo studio è stato svolto nell'ambito del Progetto di Ricerca "Vaccini orali nel suino" finanziato da MIUR- Regione Lombardia.

BIBLIOGRAFIA:

1. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2008) "Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals"; Approved Standard, 3rd ed. CLSI Document M31-A3. Wayne, PA.
2. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) (2013) "Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing"; 19th ed. CLSI Document M100-S23. Wayne, PA.
3. Bischoff K. M., White D. G., McDermott P. F., Zhao S., Gaines S., Maurer J. J., Nisbet D. J. "Characterization of Chloramphenicol Resistance in Beta-Hemolytic *Escherichia coli* Associated With Diarrhea in Neonatal Swine" *Journal of Clinical Microbiology* Feb. 2002: 389-394.
4. Blanco J., Blanco M. (1993) "Escherichia coli enterotoxigenicos, necrotoxicos y verotoxigenicos de origen humano y bovino. Patogénesis, epidemiología y diagnóstico mmicrobiológico". Servicio publicaciones diputacion provincial, Lugo, 1993.
5. Costa M. M., Drescher G., Maboni F., Weber S. S., Schrank A., Vainstein M. H., Schrank I. S., Vargas A. C. (2010) "Virulence factors, antimicrobial resistance, and plasmid content of *Escherichia coli* isolated in swine commercial farms" *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.62, n.1, p. 30-36 .
6. European Food Safety Authority (EFSA) (2011) "Shiga toxin/verotoxin-producing *Escherichia coli* in humans, food and animals in the EU/EEA, with special reference to the German outbreak strain STEC0104". http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/scientific_output/files/main_documents/166e.pdf
7. Ewing W. H., Edwards and Ewing's (1986) "Identification of Enterobacteriaceae, 4th ed. The genus *Escherichia*". Elsevier, New York; 1986: 93-134.
8. Francis D. H., (2002) "Enterotoxigenic *Escherichia coli* infection in pigs and its diagnosis" *Journal of Swine Health and Production*; 10(4):171-175.
9. Franke S., Gunzer F., Wieler L. H., Baljer G., Karch H. (1995). "Construction of recombinant Shiga-like toxin-liv (SLT-liv) and its use in monitoring the SLTIIv antibody status in pigs". *Vet Microbiol.*, 43: 41-52.
10. Kai Frydendahl (2002) "Prevalence of serogroups and virulence genes in *Escherichia coli* associated with postweaning diarrhea and edema disease in pigs and a comparison of diagnostic approaches" *Veterinary Microbiology* 85:169-182.
11. Lin Z., Kurazono H., Yamasaki S., Takeda Y. (1993). "Detection of various variant verotoxin genes in *Escherichia coli* by polymerase chain reaction". *Microbiol. Immunol.*, 37(7): 543-548.
12. Moredo F. A., Pineyro P. E., Marquez G. C., Sanz M., Colello R., Etcheverria 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 Profile" *Foodborne Pathogens and Disease*; 12 (8):704-711.
13. Nguyen Ut V., Coddens A., Melkebeek V., Devriendt B., Goetsouwiers T., Van Poucke M., Peelman L., Cox E. (2015) "High susceptibility prevalence for F4+ and F18+ *Escherichia coli* in Flemish pigs" *Veterinary Microbiology* in press, corrected proof (note to users) available online 21/01/2016.

14. Ørskov F., Ørskov I. (1984) "Serotyping of *Escherichia coli*". In : Bergan, T. (eds.) *Methods in microbiology* 14: 43-112. Academic Press, London 1984.
15. Poli G., Cocilovo A., Dall'Ara P., Martino P. A., Ponti W. (2005) "Microbiologia e immunologia veterinaria" seconda edizione: 164, 220-221.
16. Rajkhowa S., Sarma D. K. (2014) "Prevalence and antimicrobial resistance of porcine O157 and non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from India" *Trop Anim Health Prod* 46:931-937.
17. Rajkumari M., Tapan K. D., Santhalembi C., Parimal R., Indranil S., Sidhartha N. J., Abigail R.P., Rajesh C. (2015) "ESBL-producing Shiga-toxigenic *E. coli* (STEC) associated with piglet diarrhoea in India" *Trop Anim Health Prod* 47: 377-381.
18. Rüssmann H., Kothe E., Schmidt S., Franke D., Harmsen A., Caprioli A., Karch H. (1995). "Genotyping of Shiga-like toxin genes in non-O157 *Escherichia coli* strains associated with haemolytic uraemic syndrome". *J. Med. Microbiol.*, 42:404-410.
19. Smith M. G., Jordan D., Chapman T. A., Chin J. J.-C., 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 resistance enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs with post-weaning diarrhea" *Veterinary Microbiology* 145 (3-4): 299-307.
20. Sojka W. J. (1965) "*Escherichia coli* in domestic animals and poultry". Review series no. 7 of the Commonwealth Bureau of Animal Health. Commonwealth Agricultural Bureau, Farnham Royal, Bucks: 184-214.
21. Xiang Chen, Song Gao, Xinan Jiao, Xiu Fan Liu (2004) "Prevalence of serogroups and virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from pigs with postweaning diarrhoeas in eastern China" *Veterinary Microbiology* 103: 13-20.