



Studio della prevalenza di ceppi di *Escherichia coli* enteropatogeni isolati da conigli provenienti da allevamenti della Provincia di Macerata - Study of the prevalence of strains of enteric *Escherichia coli* isolated from rabbits from farms in the Province of Macerata

Perugini G.¹, Staffolani M.¹, Tagliabue S.², Biagetti M.¹, Fraticelli R.¹, Gianfelici P.¹, Giustozzi C.³

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche. Sezione Diagnostica di Macerata.

² Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lombardia e dell'Emilia Romagna.

³ Veterinario di azienda Coop. CLAM di Ancona

Abstract. *Escherichia coli* is a major enteric pathogen of the rabbit. In this case study the strains responsible for disease belong to pathotype defined REPEC (Rabbit enteropathogenic *E. coli*). The *eae* gene together with the adhesion factors *af/r1* and *af/r2* pathogenicity factors are essential for the expression of pathotype REPEC. The biotype of 32 isolates was determined, as well as O serogroup, of 15 strains (out of 33 tested). In 10 determinations only in one case the adhesion factor *af/r1* was demonstrated; in all other cases, the factor of adhesion *af/r2* was revealed. The *eae* gene and / or adhesion factors have been demonstrated to be in association with biotypes B4, B12, B16, B18, B20, B27, B28, B30. Have identified the serogroup O103 and O86 associated with factors of pathogenicity. A resistance of these strains of *Escherichia coli* in relation to some antibiotics used in livestock (tetracycline, sulfonamides, penicillins, and aminoglycosides) was also revealed.

Riassunto. *Escherichia coli* rappresenta uno dei principali patogeni enterici del coniglio. In questa specie i ceppi responsabili di malattia appartengono al patotipo definito REPEC (Rabbit enteropathogenic *E. coli*), il cui gene *eae* costituisce il principale requisito per l'attribuzione di proprietà enteropatogene agli isolati del coniglio. Il gene *eae* unitamente ai fattori di adesività *af/r1* e *af/r2* sono i fattori di patogenicità indispensabili per l'espressione del patotipo REPEC. È stato determinato il biotipo di 32 ceppi isolati, come pure il sierogruppo O di 15 ceppi su 33 esaminati. Su 10 determinazioni è stato dimostrato in un solo caso il fattore di adesività *af/r1*, mentre in tutti gli altri casi è stato evidenziato il fattore di adesività *af/r2*. Il gene *eae* e/o i fattori di adesività sono stati dimostrati in associazione ai biotipi B4, B12, B16, B18, B20, B27, B28, B30. Sono stati identificati i sierogruppi O103 ed O86 associati a fattori di patogenicità. È stata evidenziata inoltre una resistenza di questi ceppi di *Escherichia coli* nei confronti di alcuni antibiotici in uso presso gli allevamenti (tetracicline, sulfonamidi, penicilline e aminoglicosidi).

Introduzione

Escherichia coli rappresenta uno dei principali patogeni enterici del coniglio ed in questa specie i ceppi responsabili di malattia appartengono al patotipo definito REPEC (Rabbit enteropathogenic *E. coli*) la cui patogenicità è basata prevalentemente sulla presenza di un complesso intimina-TIR (Translocated Intimin Receptor) che permette al microrganismo di aderire alla mucosa intestinale e distruggere i microvilli degli enterociti. Il gene responsabile della produzione del complesso intimina-TIR è omologo al gene *eae* dei ceppi enteropatogeni umani di *E. coli* e costituisce il principale requisito per l'attribuzione di proprietà enteropatogene agli isolati del coniglio (Blanco et al. 1996).

Inoltre in E.coli isolati da coniglio sono stati descritti i fattori di adesività legati alle fimbrie af/r1 e af/r2. L'adesina codificata dal gene af/r2 permette la colonizzazione da parte di E.coli del tratto distale dell'intestino dei conigli e rappresenta il primo passo verso il processo infiammatorio. A controprova di ciò è stato dimostrato che ceppi di E.coli privati del gene af/r2 presentano difficoltà nella colonizzazione dell'intestino ed un'importante riduzione della patogenicità (Pillien et al. 1996). I ceppi eae+ e af/r2+ appartenenti al sierogruppo O103:H3 ramnosio negativo sono caratterizzati da elevata patogenicità e generalmente legati a gravi focolai di enterocolite nei conigli in svezzamento (Camguilhem e Milon 1989; Blanco et al. 1996).

Il presente lavoro descrive l'indagine per la tipizzazione sierotipica e biotipica, per l'identificazione di presenza dei geni eae, af/r1 e af/r2 e la definizione del pattern di farmacoresistenza di ceppi di E.coli isolati da conigli affetti da enteropatia, provenienti da aziende intensive di conigli da carne della provincia di Macerata.

Materiali e metodi

Sono stati coinvolti 10 allevamenti della Provincia di Macerata situati prevalentemente in località collinare, in un periodo che va da aprile a settembre in due annate consecutive (2007 e 2008). Il campione da analizzare, dopo il prelievo venivano mantenuti a T° di refrigerazione e consegnati nel più breve tempo possibile al laboratorio dove erano immediatamente processati ed analizzati. La tipologia del campione da esaminare era rappresentata da animale intero morto il giorno stesso e con sintomatologia clinica enterica. Solo in un caso si è proceduto alla raccolta di feci emesse da animali diarroici prelevate direttamente dal posto gabbia stendendo un rettangolo di carta oleata sul fondo della gabbia.

L'isolamento di E.coli è stato eseguito mediante semina su terreno selettivo McConkey Agar n. 3 (Oxoid LTD, Basingstoke England) del contenuto ciecale di 34 conigli e da n°3 campioni di feci. Sono stati quindi identificati, con il sistema miniaturizzato API Rapid ID 32E (Biomerieux, Marcy l'Etoile, France), 33 ceppi di Escherichia coli, sottoposti successivamente a tipizzazione sierologica, per la determinazione degli antigeni somatici O (sierogruppo) (Blanco e Blanco, 1993). Dei 33 ceppi in esame, 32 sono anche stati sottoposti alla determinazione del biotipo (B), basata sulla fermentazione di 5 zuccheri (saccarosio, l-ramnosio, sorbosio, dulcitol, d-raffinosio), noto che una reazione ramnosio negativa è indice di patogenicità del ceppo (0<B<15) (Camguilhem e Milon 1989).

In accordo con le linee guida stabilite dal CSLI ex NCCLS ("Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for bacteria isolated from animals", Approved Standards. 2nd edition, 2002) è stato eseguito l'antibiogramma, con il metodo Kirby-Bauer, su 16 antibiotici: acido nalidixico (NAL), ampicillina (A), cefotaxime (CTX), ciprofloxacina (CIP), cloramfenicolo (C), gentamicina (GM), kanamicina (K), streptomina (S), sulfonamide (Su), tetraciclina (T), enrofloxacin (ENR), amoxicillina+acido clavulanico (AMC), cefalotina (KF), ceftazimide (CAZ), colistina (CL), trimetoprim+sulfametossazolo (SXT). Questo pannello di antimicrobici è attualmente in uso presso il Laboratorio Centro Regionale per gli Enteropatogeni Regione Marche di Macerata come previsto dal CRAB (Centro Nazionale di Referenza per l'Antibioticoresistenza) ed è rappresentativo sia delle molecole impiegate comunemente in medicina veterinaria sia di quelle attualmente bandite dall'uso zootecnico (Cloramfenicolo).

I geni eae, af/r1, af/r2 sono stati amplificati con una multiplex PCR utilizzando i seguenti primers: gene eae, primer eae-f (ACGTTGCAGCATGGGTAAGTC) e eae-r (GATCGGCAACAGTTTCACCTG) che producono un amplificato di 816-bp, gene af/r1, primers af/r1-f (CGGGATCAGCAATTGCTGCTC) e af/r1-r (ATCGCCACTAAGTTCACATGG) che producono un amplificato di 463 bp, gene af/r2, primers af/r2-f

(GTTTCGTTACCGATGAGGCACC) e af//r2-r (GACAGACGGCTAACCACCTCC) che producono un amplificato di 312 bp.

Il DNA, estratto da colonie, è stato analizzato in un volume finale di reazione di 25µl contenente: buffer 1x (promega), MgCl₂ 1,5 mM (promega), dNTPs 100µM (Amersham), primers eae 0.2µM, primers af/r1 0.4µM, primers af/r2 0.5µM, Go Taq flexi Promega 4U, DNA 5 µl di ad una concentrazione di circa 60ng/ul. La reazione di PCR è stata effettuata alle seguenti condizioni: denaturazione iniziale 95°C per 5 minuti, 35 cicli di denaturazione a 94°C per 1 minuto, annealing a 62°C per 1 minuto, estensione a 72°C per 2 minuti ed una fase di estensione finale a 72°C per 5 minuti. Gli amplificati sono stati rilevati su gel di agarosio al 2% contenente bromuro di etidio (0.5µg/ml) (Crotti S. et. al. 2006).

Risultati e discussione

Nella Tabella 1, distinti per biotipo, sono indicati i risultati della ricerca del gene eae, af/r1 e af/r2 in 33 ceppi di E.coli isolati da conigli; inoltre viene indicato il sierogruppo O e gli antibiotici risultati non attivi.

Dai dati riportati in tabella si evidenzia che il gene af/r1 è stato individuato in un solo ceppo, appartenente al sierogruppo O86, positivo anche per il gene eae e di biotipo B18. Il gene af/r2, associato ad eae, è stato dimostrato in otto ceppi, di cui due di biotipo B4, tre di biotipo rispettivamente B12, B16 e B2 e tre di biotipo B20. Un solo ceppo batterico è risultato eae+ senza fattori di adesività fimbriali e precisamente di biotipo B28. In 3 ceppi batterici, di cui 2 tipizzati come sierogruppo O103, è stato possibile mettere in evidenza i fattori di patogenicità eae e af/r2 associati al biotipo B4 o B12, ramnosio negativi e pertanto altamente patogeni. A parte altri 2 ceppi ramnosio negativi (B14), i rimanenti ceppi batterici, di vario sierogruppo O, si sono dimostrati ramnosio positivi.

L'antibiogramma ha evidenziato lo sviluppo di resistenza da parte di tutti i 33 ceppi isolati, nei confronti delle molecole antibiotiche testate, ampiamente utilizzate in medicina veterinaria ed, alcune di queste, anche nell'allevamento intensivo del coniglio. Tra le molecole di antibiotico verso cui è stata sviluppata resistenza spiccano le Tetracicline 94% (31 ceppi su 33), Sulfonamide 97% (32 ceppi su 33), Trimetoprim + Sulfametossazolo 88% (29 ceppi su 33), Streptomicina 70% (23 ceppi su 33), Gentamicina 51% (17 ceppi su 33), Ac.Nalidixico 45% (15 ceppi su 33), Cloramfenicolo 45% (15 ceppi su 33), Ampicillina 42% (14 ceppi su 33), Kanamicina 33% (11 ceppi su 33). Si può osservare che tutti i ceppi hanno mostrato resistenza multipla, ad eccezione di un ceppo (B22/O6), risultato resistente solo alle tetracicline. E' interessante osservare che la resistenza multipla si è espressa anche nei ceppi privi di fattori di patogenicità, isolati da soggetti con patologia enterica.

Tabella 1- Risultati della ricerca del gene eae, af/r1 e af/r2 in 33 ceppi di E.coli isolati da conigli				
Biotipo	Sierotipo	Fattore di patogenicità "eae"	Fattore di adesività	Antibiogramma* antibiotici risultati non attivi
4	O103	pos	af/r2	S-Su-T-NAL-GM-ENR
4	O103	pos	af/r2	S- Su -T - NAL- GM
12	NT	pos	af/r2	A-C-S-Su-T-NAL-GM- SXT
14	NT	neg	neg	A-C-S-Su-T-NAL-CIP-GM-K-SXT-ENR
14	NT	neg	neg	A-C-S-Su-T-GM-K-SXT
16	O86	neg	neg	Su-T-SXT
16	O8	neg	neg	Su-T-SXT
16	O8	neg	neg	Su-T-SXT
16	NT	pos	af/r2	S-Su-T-KF-SXT
18	O86	pos	af/r1	S-Su-T-GM-K-SXT
19	NT	neg	neg	A-S-Su-NAL-SXT
20	NT	pos	af/r2	S-Su-T- NAL-GM- SXT
20	NT	pos	af/r2	S-Su-T-NAL-GM- SXT
20	NT	pos	af/r2	C-S-Su-T-SXT
20	NT	neg	neg	Su-T-GM-K-SXT
22	O86	neg	neg	S-Su-T-K-SXT
22	O86	neg	neg	A-S-Su-T-NAL-SXT
22	O6	neg	neg	T
22	O86	neg	neg	S-Su-T-NAL-SXT
23	O2	neg	neg	A-C-S-Su-T-NAL-GM-SXT
25	O139	neg	neg	S-Su-T-NAL-KF-SXT
27	NT	pos	af/r2	A-C-S-Su-T-NAL-CIP-GM-SXT-ENR

(--- segue ---)

28	O139	neg	neg	C-Su-T-NAL-K-SXT
28	NT	neg	neg	C-Su-T-GM-K
28	NT	pos	neg	C-Su-T-Nal-SXT-CAZ
29	O139	neg	neg	Su-T-KF-SXT
29	NT	neg	neg	A-C-S-Su-T-GM-K-SXT
30	NT	neg	af/r2	A-Su-T-AMC-SXT
31	NT	neg	neg	A-C-S-Su-GM-K-SXT
31	O18	neg	neg	A-C-S-Su-T-GM-SXT
31	NT	neg	neg	A-C-S-Su-T-GM-K-SXT
31	NT	neg	neg	A-C-S-Su-T-GM-K-SXT
n.e.	NT	neg	neg	A-C-S-Su-T-NAL-GM-K-SXT
Legenda: NT=non tipizzabile; n.e.=non eseguito				

Conclusioni

Il ceppo batterico che ha evidenziato il gene *af/r1*, originariamente individuato nel ceppo RDEC-1 (Cantey e O'Hanley, 1977), sembra essere presente anche nei nostri allevamenti, anche se questo risultato avrebbe bisogno di maggiori approfondimenti diagnostici. Dai risultati ottenuti risulta che il gene *af/r2* è frequentemente associato al gene *eae*, questi due fattori di virulenza, associati a biotipi ramnosio negativi, anche esso valido indice di virulenza, si dimostrano ancora una volta quali responsabili di gravi colibacillosi negli allevamenti intensivi del coniglio. Rimane da approfondire il ruolo che alcuni biotipi ramnosio positivi (B20, B28 e B30) che pur esprimendo un solo fattore di virulenza (*eae* o *af/r2*) sono capaci di creare gravi problemi enterici. (Agnoletti et al. 2004"a"; Camarda et al. 2004"b").

I dati relativi al pattern di antibiotico-resistenza confermato le difficoltà che si incontrano negli allevamenti intensivi nel contenimento degli episodi clinici di colibacillosi con la terapia antibiotica e sono in accordo con quanto riportato in altri studi, nei quali l'eccessivo impiego di antibiotici, in particolare penicilline, sulfonamidi, tetracicline ed aminoglicosidi, viene indicato come l'elemento chiave nello sviluppo del fenomeno dell'antibiotico-resistenza (Schroeder et al., 2002).

In aggiunta a ciò, in condizioni di campo, l'effetto stressogeno dell'ambiente associato alla fase di svezzamento può facilitare l'acquisizione da parte dei ceppi di *E. coli* di geni codificanti per la resistenza agli antimicrobici, permettendo ai ceppi più resistenti, in genere presenti in numero ridotto, di prevalere sulla normale microflora intestinale (Mathew et al., 2003). Il fenomeno dell'antibiotico-resistenza nell'allevamento intensivo del coniglio è quindi principalmente correlato all'uso del farmaco come metafilassi, ovvero all'uso a dosaggi medio-bassi delle stesse molecole usate in terapia, al fine di cercare di ridurre o quantomeno per tenere sotto controllo le problematiche enteriche, assai diffuse e pressoché sempre presenti nell'allevamento intensivo del coniglio. E' pertanto pienamente giustificato un continuo monitoraggio diagnostico-epidemiologico

sull'antibiotico-resistenza di E.coli, in quanto di grande rilevanza per la salute non solo animale ma anche umana, visto che anche in conigli selvatici asintomatici, che mai sono stati sottoposti a terapia, sono stati registrati dei fenomeni di farmacoresistenza (Grilli et al., 2005).

Bibliografia

Agnoletti, F., Favretti, M., Deotto, S., Passera, A., Tisato, E., Bano, L., Mazzolini, E., 2004. Report of enteropathogenic Escherichia coli (EPEC) isolated from enteric outbreaks in Italian intensive rabbit herds. In: Proc. Sth World Rabbit Congress, sept. 2004, Puebla, Mexico, pp 416-421.

Blanco, J.E., Blanco, M., Blanco, I., Mora, A., Balanguer, L., Mourino, M., Iansen, W.H., 1996. O serogroups, biotypes and eae genes in Escherichia coli strains isolated from diarrheic and healthy rabbits. J. Clin. Microbiol., 34,3101-3107.

Camarda, A., Martella, V., Battista, P., Pennelli, D., Terio, V., Greco, L., Mangano, N., 2004. Geni di virulenza in ceppi di Escherichia coli isolati da conigli con sintomatologia enterica in allevamenti intensivi dell'Italia meridionale. Coniglicoltura, 41(5): 36-38.

Camguilhem, R., Milon, A., 1989. Biotypes and O serogroups of Escherichia coli involved in intestinal infections of weaned Cantey. J.R. Blake, R.K., 1977. Diarrhea due to Escherichia coli in the rabbit; a novel mechanism. J. Infect. Dis., 135, 454-462.

Crotti S., Girelloni V., Checcarelli S., Cucco L., Mangili P., Magistrali C. "Messa a punto di una multiplex PCR (m-PCR) per la ricerca dei geni di patogenicità di E.coli del coniglio" VIII Congresso Nazionale S.I.Di.L.V. Perugia 9-10/11/2006.

Grilli, G., Ferrazzi, D., Gallazzi, D., "Biotipizzazione ed antibioticoresistenza di ceppi di Escherichia coli isolati da conigli selvatici (Oryctolagus cuniculus) asintomatici - Atti delle giornate di coniglicoltura ASIC 2005.

Mathew, A.G., Arnett, D.B., Cullen, P., Ebner, P.D. 2003. Characterization of resistance patterns and detection of apramycin resistance genes in Escherichia coli isolated from swine exposed to various environmental conditions. Int J Food Microbiol. 89:11-20.

Pillien, F., Chalareng, C., Boury, M., Tasca, C., De Rycke, J., Milon, A., 1996. Role of Adhesive Factor/Rabbit 2 in experimental enteropathogenic Escherichia coli O103 diarrhea of weaned rabbit. Vet. Mic., 50, 105-115.

Schroeder, C.M., Meng, J., Zhao, S., DebRoy, C., Torcolini, J., Zhao, C., McDermott, P.F., Wagne D.D., Walker, R.D., White, D.G. 2002. Antimicrobial Resistance of Escherichia coli O26, O103, O111, O128, and O145 from Animals and humans. Emerging Infectious Diseases. Vol. 8, N° 12, 1409-1414.



Identification of Irradiated Food: preliminary experiences with DNA Comet Assay, a biological method of screening - Identificazione di Alimenti Irradiati: prime esperienze con il DNA Comet Assay, metodo biologico di screening by Rondini C. et al. is licensed under a [Creative Commons Attribuzione 2.5 Italia License](http://creativecommons.org/licenses/by/2.5/it/). Based on a work at spvet.it. Permissions beyond the scope of this license may be available at <http://indice.spvet.it/adv.html>.

	Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Via G. Salvemini 1. 06126, Perugia - Italy
Centralino Istituto	Tel. +39 075 3431 - Fax. +39 075 35047
Biblioteca	Tel. / Fax +39 075 343217 e-mail: bie@izsum.it
Rivista SPVet.it ISSN 1592-1581	Tel. +39 075 343207 e-mail: editoria@izsum.it http://spvet.it / http://indice.spvet.it
U. R. P.	Tel. +39 075 343223; Fax: +39 075 343289 e-mail: URP@izsum.it