

PRIMA SEGNALEZIONE DELLA PRESENZA DI INTEGRONI DI CLASSE 1 E 2 IN *E. COLI* ISOLATI DA TACCHINI DA CARNE

Dotto G.¹, Giovanardi D.², Giacomelli M.¹, Grilli G.³, Piccirillo A.¹

¹Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene Veterinaria, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Padova, Viale dell'Università, 16 - 35020, Legnaro (Padova)

²Laboratorio Tre Valli, Corte Pellegrina, 3 - 37132, San Michele Extra, Verona

³Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria - Sezione di Anatomia Patologica Veterinaria e Patologia Aviaria, Università degli Studi di Milano, Via Celoria, 10 - 20133 Milano

Summary

The aim of this study was to determine the presence of class 1 and class 2 integrons in multi-drug resistant *Avian Pathogenic E. coli* (APEC) isolated from diseased turkeys. Notoriously, class 1 and class 2 integrons play an important role in the selection of multidrug-resistant bacteria by facilitating the diffusion of antimicrobial resistance genes. Forty-eight multidrug-resistant strains were collected from commercial turkeys affected by colibacillosis and screened for the presence of integrons and associated gene cassettes. Eight isolates harbored class 1 integrons and 9 strains class 2 integrons. The gene cassettes combination most commonly found was *dfrA1-aadA1* and *dfrA1-sat2-aadA1* in class 1 and class 2 integrons, coding for aminoglycoside and trimethoprim resistance. One class 1 integron positive isolate carried a rare type of gene cassette arrangement (*estX-aadA1*). This study reports for the first time the presence of class 1 and 2 integrons in *Avian Pathogenic E. coli* (APEC) isolates from commercial turkeys.

INTRODUZIONE

La colibacillosi aviaria è un'infezione localizzata o sistemica provocata da *Escherichia coli*, batterio comunemente presente nella flora intestinale di varie specie animali, avicoli compresi. Questo batterio è uno dei principali responsabili di danni economici per mortalità nell'allevamento del tacchino. Nonostante esistano numerosi ceppi dotati di notevole patogenicità (*Avian Pathogenic E. coli* - APEC), negli avicoli non risulta che essi siano, salvo rare eccezioni, agenti primari di malattia ma piuttosto di patologie secondarie ad infezioni virali o ad errate pratiche di allevamento (Barnes *et al.*, 2008).

Il controllo di tale patologia può essere affrontato eliminando o attenuando i fattori predisponenti, impedendo l'ingresso di *E. coli* patogeni negli allevamenti oppure controllando direttamente l'agente eziologico mediante appropriati trattamenti farmacologici. Data la difficoltà nel controllo dei fattori predisponenti e scatenanti tale patologia, la terapia con antibiotici e chemioterapici è certamente la via che più comunemente viene intrapresa negli allevamenti intensivi. Tuttavia, nonostante l'indubbia utilità nel controllo della colibacillosi e di altre forme batteriche, negli anni si è presa coscienza dei limiti che la terapia farmacologica può presentare a causa della progressiva selezione di batteri antibiotico-resistenti (Gyles, 2008). Infatti, oltre ad una resistenza naturale che i batteri possono presentare per una o

più classi di farmaci grazie alle loro caratteristiche intrinseche, nelle popolazioni batteriche stanno sempre più diffondendosi resistenze di tipo acquisito mediante trasferimento genetico orizzontale da parte di plasmidi, trasposoni e integroni oppure mediante mutazioni genetiche trasferibili solo verticalmente (Carattoli, 2001).

Negli ultimi anni sono stati condotti diversi studi volti alla comprensione dei meccanismi molecolari alla base di questo fenomeno, in particolare delle strutture geniche coinvolte nella trasmissione orizzontale tra specie batteriche di geni di resistenza agli antibiotici. Infatti, l'elevata diffusione di resistenza nei batteri Gram-negativi è dovuta principalmente al trasferimento orizzontale di determinanti di resistenza attraverso elementi mobili di DNA, quali plasmidi, trasposoni e integroni (Carattoli, 2001; Carattoli, 2003). In particolare, l'associazione tra geni cassetta e integroni è stata fondamentale nel determinare la comparsa e la diffusione della multifarmaco-resistenza, intesa come resistenza contemporanea a più antibiotici di diversa famiglia. Infatti, i batteri Gram-negativi che mostrano fenotipo di resistenza multiplo spesso presentano plasmidi che veicolano geni di resistenza mediante gli integroni.

Gli integroni sono elementi genetici capaci di acquisire geni di resistenza agli antibiotici sotto forma di cassette. Essi presentano un gene codificante un'integrasi (*intI*), seguito da uno o più promotori e da un sito di ricombinazione, *attI*, in cui i determinanti genici di resistenza, sotto forma di cassette, possono esser inseriti o escissi grazie ad un meccanismo di ricombinazione sito-specifico catalizzato dall'integrasi stessa (Lévesque, 1995). La classificazione degli integroni si basa sul grado di omologia della sequenza del gene codificante per l'integrasi *intI* e, delle cinque classi finora descritte, la classe 1 sembra essere la più diffusa nei batteri Gram-negativi.

Data l'importanza che tali strutture geniche svolgono nel trasferimento orizzontale tra batteri di geni responsabili della resistenza agli antibiotici, sono stati condotti diversi studi volti alla ricerca e all'analisi degli integroni e delle cassette geniche in essi contenute, sia in ceppi batterici commensali sia patogeni. Tuttavia, dalla letteratura emerge come la maggior parte degli studi si riferisca principalmente a studi condotti sia su batteri isolati da casi clinici umani che commensali e, in ambito veterinario, su batteri isolati da derrate di origine animale (Soufi *et al.*, 2009; Bailey *et al.*, 2010; Unno *et al.*, 2010). Scarse sono invece le informazioni in merito alla diffusione di tali strutture in ceppi di *E. coli* circolanti negli allevamenti intensivi, soprattutto avicoli (Smith *et al.*, 2007; Costa *et al.*, 2008; Costa *et al.*, 2009).

Lo studio e il monitoraggio dell'antibiotico-resistenza sia da un punto di vista fenotipico che genotipico negli animali è fondamentale non soltanto perché tale fenomeno può compromettere l'efficacia dei trattamenti terapeutici delle infezioni in atto negli allevamenti, ma soprattutto per la possibile diffusione orizzontale dei determinanti genici di resistenza in ceppi commensali normalmente residenti nell'intestino animale e, conseguentemente, nell'ambiente circostante (Ozaki *et al.*, 2011).

L'obiettivo del nostro studio è stato dunque rivolto alla ricerca degli integroni di classe 1 e 2 in ceppi di *E. coli* APEC multifarmaco-resistenti isolati da tacchini da carne affetti da colibacillosi allevati nel Nord-Italia.

MATERIALI E METODI

Campionamento

Lo studio ha coinvolto tre cicli produttivi consecutivi, dello stesso allevamento, di tacchini da carne maschi di età compresa tra la prima e la quattordicesima settimana di vita. Durante questo periodo, le carcasse degli animali deceduti sono state sottoposte a necropsia e qualora le lesioni fossero compatibili con colisetticemia, sono stati prelevati i visceri e/o gli essudati (liquido pericardico e articolare) per l'indagine batteriologica.

Prelievi per l'isolamento batteriologico di Escherichia coli

L'isolamento di *Escherichia coli* è stato eseguito solo qualora le condizioni della carcassa permettessero una corretta diagnosi (carcassa fresca o animale sottoposto a eutanasia in laboratorio).

La tecnica adottata prevedeva una sterilizzazione con flambatura della superficie del parenchima dell'organo (es. fegato, cervello) e il prelievo del campione da seminare con tampone sterile o con ansa di platino o monouso. Quando erano presenti lesioni fibrino-purulente, i campioni da seminare sono stati prelevati da pericardio, sacchi aerei e articolazioni.

Terreni di coltura e test biochimici di conferma per Escherichia coli

Per l'isolamento di *Escherichia coli* sono stati utilizzati sia terreni generici che selettivi e differenziali. Nello specifico, il terreno Eosin Methylene Blue (EMB - Levine) è stato utilizzato in abbinamento al terreno agar sangue (5 % di sangue di montone) che è in grado di differenziare ceppi di *E. coli* emolitici da altri batteri patogeni. *E. coli* sul terreno EMB cresce sottoforma di colonie verdi metalliche (ceppi lattosio positivi) o di colore rosa (ceppi lattosio negativi). Dopo la semina dei tamponi o dei visceri, i terreni sono stati incubati 24 ore in aerobiosi a 37 °C. Se le piastre di primo isolamento presentavano numerose colonie sospette di *E. coli*, si sono prelevate alcune di essere per l'inoculo in TSI agar. Dalle colonie cresciute su TSI sono state eseguite la colorazione di Gram e il test ossidasi. Su TSI agar questi batteri producono una reazione acida/acida (becco/fondo), compresi i ceppi lentamente lattosio fermentanti, con presenza di gas ma non di H₂S. Le colonie sospette sono state confermate in via definitiva con galleria biochimica miniaturizzata (RapID 32 E - Biomerieux, Montpellier, Francia).

Per la loro conservazione, tutti gli isolati di *E. coli* sono stati inoculati in provette dedicate e mantenuti in congelatore a -70 °C.

Tipizzazione sierologica

Gli *E. coli* isolati sono stati sottoposti a tipizzazione sierologica mediante tecnica di agglutinazione rapida su vetrino con antisieri O1:K1, O2:K, O78:K (VLA Laboratories, Weybridge, UK). Se non tipizzabili con questi antisieri, i ceppi sono stati inviati al Laboratorio di Batteriologia Specializzata dell'IZS della Lombardia e Emilia Romagna. La tecnica utilizzata presso questa struttura è quella proposta da Blanco e Blanco (1993) con l'identificazione di 37 antigeni somatici O (O1, O2, O4, O6, O8, O9, O10, O11, O15, O18, O20, O21, O22, O26, O45, O49, O64, O73, O75, O78, O83, O86, O88, O101, O103, O109, O111, O115, O128, O132, O138, O139, O141, O147, O149, O153, O157).

Valutazione dell'antibiotico-sensibilità mediante tecnica di Kirby-Bauer

Tutti i ceppi di *E. coli* isolati sono stati valutati per la resistenza ad antibiotici specifici (resistotipo). La tecnica utilizzata è quella proposta dalla norma CLSI M2-A9 (2006) con inoculo della sospensione batterica su Mueller-Hinton agar e incubazione a 37°C per 24 ore in condizioni di aerobiosi. I principi attivi degli antibiotici utilizzati sono: colistina (CT), apramicina (APR), gentamicina (CN), amoxicillina (AML), ampicillina (AMP), trimetoprim+sulfametossazolo (SXT), enrofloxacin (ENR) e ossitetraciclina (OT).

In un secondo momento è stata valutata anche la sensibilità a un secondo *panel* di antibiotici: streptomina (S), spectinomina (SH), triple-sulfa (SSS) e cloramfenicolo (CAT), per verificare la corrispondenza tra resistotipo e le cassette geniche di resistenza più frequentemente veicolate dagli integroni.

Estrazione del DNA genomico

I ceppi di *E. coli* isolati sono stati sottoposti ad estrazione del DNA genomico mediante shock termico (Maguire *et al.*, 2001). L'estrazione del DNA è stata eseguita sospendendo un'ansata di cultura batterica in 200 µl d'acqua ultrapura sterile e sottoponendola a due cicli di bollitura di 10 minuti ciascuno intervallati da una fase di congelamento di 5 minuti.

La sospensione è stata conservata a -20°C fino all'esecuzione delle successive indagini molecolari.

Ricerca degli integroni di classe 1 e 2

I ceppi di *E. coli*, isolati e caratterizzati fenotipicamente, sono stati sottoposti ad una prima fase di *screening* mediante *real-time* PCR per il rilievo della presenza di integroni di classe 1 e 2.

La ricerca degli integroni di classe 1 e 2 è stata eseguita mediante *real-time* PCR con *Sybr Green dye* come descritto, salvo lievi modifiche, da Ekkapobyotin *et al.* (2008). Per la standardizzazione della metodica sono stati utilizzati come controlli positivi ceppi di *E. coli* gentilmente forniti dal Dr. Schwarz del Friedrich-Loeffler-Institut, Neustadt-Mariensee, Germania.

Le prove sono state eseguite con LightCycler® 480 Real-Time PCR System (Roche Diagnostics), alle seguenti condizioni: QuantiTect Sybr Green PCR Master Mix 1X (Qiagen), 0,3 µM di ciascun *primer* e 100 ng di DNA in un volume totale di 10 µl. L'amplificazione prevede 1 ciclo di denaturazione iniziale a 95 °C per 15 minuti, denaturazione a 94°C per 10 secondi, *annealing* a 55°C per 30 secondi ed estensione a 72°C per 30 secondi per un totale di 40 cicli.

Amplificazione della regione variabile

I ceppi risultati positivi per gli integroni di classe 1 e/o 2 sono stati quindi sottoposti ad amplificazione della regione variabile in essi contenuta mediante *end-point* PCR.

Per quanto riguarda i ceppi positivi agli integroni di classe 1, il protocollo applicato segue, salvo lievi modifiche, quello descritto da Lévesque *et al.* (1995) che prevede l'amplificazione della regione variabile contenuta negli integroni di classe 1 a partire dalle regioni conservate (CS) in 3' e 5'.

Per quanto riguarda invece i ceppi positivi agli integroni di classe 2, il protocollo applicato prevede l'utilizzo di una coppia di *primer* consigliata da White (2001) per

l'amplificazione della regione variabile contenuta negli integroni di classe 2 a partire da *attI2* e *orfX*.

In genere, ogni reazione è stata allestita con la seguente composizione: 1X PCR buffer (Invitrogen), 2 mM di MgSO₄, 0.2 mM di ciascun nucleotide trifosfato, 25 pmol di ciascun *primer*, 1 unità di HF Platinum[®] Taq DNA *polymerase* e 100 ng di DNA in un volume totale di 50 µl. Le condizioni di amplificazione prevedono 40 ripetizioni del ciclo, caratterizzato da una fase di denaturazione a 94°C per 30 secondi, una di appaiamento dei *primer* a 55°C per 30 secondi ed una di allungamento a 68°C per 5 minuti, precedute da una denaturazione iniziale a 94°C per 2 minuti.

Per ogni reazione sono sempre stati inclusi un controllo positivo e uno negativo per il controllo della reazione.

Sequenziamento delle cassette geniche

I prodotti di amplificazione sono stati purificati utilizzando il kit Nucleospin[®] Extract II (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG) attenendosi alle istruzioni riportate dal produttore. I frammenti sono stati sequenziati in entrambe le direzioni presso il centro BMR Genomics di Padova con il sequenziatore automatico ABI 3730xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Le sequenze nucleotidiche sono state poi analizzate e assemblate utilizzando rispettivamente i software *FinchTV* versione 1.4.0 (<http://www.geospiza.com/Products/finchtv.shtml>) e *ChromasPro*, versione 1.42 (Technelysium Pty Ltd., Australia).

E' stata poi eseguita una ricerca per similarità delle sequenze ottenute con i dati disponibili in *Genbank* utilizzando il server BLAST del database NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), al fine di identificare le cassette geniche contenute nella regione variabile di ciascun integrone.

Analisi statistica

I risultati del test di sensibilità agli antimicrobici sono stati valutati statisticamente mediante il test del chi-quadrato (χ^2) e il test esatto di Fisher.

RISULTATI

Esame batteriologico

Le carcasse sottoposte a necropsia sono state 37. In totale sono stati isolati 48 ceppi di *E. coli* così suddivisi: 10 nel primo ciclo, 28 nel secondo e 10 nel terzo. Tutti risultavano non emolitici su agar sangue e 46 di essi con una chiara crescita verde metallica su EMB agar (ceppi lattosio positivi). Solamente due risultavano lattosio negativi e su questo terreno si presentavano con colonie rosa.

La maggior parte degli *E. coli* è stata isolata dal cervello (46%) seguita da liquido pericardico (15%) e polmone (15%). Di particolare interesse diagnostico l'isolamento del batterio dalle articolazioni coxofemorali e tibiotarsiche da soggetti con difficoltà di deambulazione.

Tipizzazione sierologica

La maggior parte dei ceppi risultava del sierotipo O78 (58%) e O2 (29%). Interessante è l'isolamento di un ceppo sierotipo O111 durante il primo ciclo. A conoscenza degli autori si tratta del primo isolamento in questa specie, mentre risulta già segnalato nel pollo (Zanella, 2000).

Valutazione dell'antibiotico-sensibilità mediante tecnica di Kirby-Bauer

I risultati degli antibiogrammi, riferiti agli antibiotici del primo *panel*, sono riportati nelle Tabelle 1 e 2. È stata riscontrata una notevole resistenza all'ossitetraciclina, con il 100% dei ceppi resistenti in tutti i cicli produttivi, e a enrofloxacin, amoxicillina e ampicillina (dall'80 al 100% dei ceppi resistenti a seconda del ciclo). Tutti i ceppi testati erano invece sensibili alla colistina, e la quasi totalità degli stessi era sensibile anche agli aminoglicosidi (100% di sensibilità ad aminosidina ed apramicina in tutti i cicli produttivi, dal 96% al 100% nei confronti della gentamicina a seconda del ciclo). Nei confronti dell'associazione trimethoprim e sulfametossazolo è prevalsa nettamente la sensibilità nel 1° ciclo (90% degli isolati), nel 2° la percentuale di ceppi sensibili era solo leggermente superiore (pari al 57%) a quella dei ceppi resistenti, mentre tutti i ceppi isolati dal 3° ciclo erano resistenti. Questa differenza nella sensibilità nei confronti dell'associazione di trimethoprim e sulfametossazolo tra i diversi cicli è risultata statisticamente significativa ($p < 0,05$).

Tutti i sierotipi hanno mostrato un profilo di sensibilità simile nei confronti della maggior parte degli antimicrobici testati, con la sola eccezione dell'associazione di trimethoprim e sulfametossazolo (con differenze tra tutti i sierotipi) e delle penicilline (con il profilo del sierotipo O111 diverso rispetto a quello degli altri sierotipi). In tutti i sierotipi prevaleva la sensibilità nei confronti degli aminoglicosidi (dal 96% al 100%) e della colistina, con tutti i ceppi sensibili nei confronti di questa molecola. Al contrario, tutti gli isolati erano resistenti all'ossitetraciclina e la maggior parte di essi anche all'enrofloxacin, con il 100% di resistenza nell'ambito dei sierotipi O78 e O111, l'80% tra i non tipizzabili e il 79% tra gli isolati del sierotipo O2. La resistenza è prevalsa anche nei confronti delle penicilline, con tutti i ceppi del sierotipo O78, tutti i non tipizzabili e il 93% degli isolati del sierotipo O2 resistenti nei confronti di amoxicillina ed ampicillina. L'unico ceppo del sierotipo O111, isolato durante il secondo ciclo produttivo, era invece sensibile a queste molecole. Le differenze tra sierotipi nella sensibilità ad amoxicillina, ampicillina e a trimethoprim+sulfametossazolo sono statisticamente significative ($p < 0,05$).

Ricerca degli integroni di classe 1 e 2 e identificazione delle cassette geniche

Su un totale di 48 ceppi di *E. coli* testati, 8 sono risultati positivi agli integroni di classe 1 (17%) e 9 agli integroni di classe 2 (19%). La maggior parte dei ceppi portatori di integroni di classe 1 sono stati isolati da tacchini appartenenti al secondo ciclo di allevamento (7 ceppi sugli 8 isolati, 87,5%), mentre 8 ceppi su 9 (89%) degli isolati di *E. coli* positivi agli integroni di classe 2 provenivano da animali del terzo ciclo produttivo. Nessun ceppo isolato da animali appartenenti al primo ciclo di allevamento è risultato positivo alle due classi di integroni. Inoltre, la maggioranza degli isolati di *E. coli* tipizzati sierologicamente e veicolanti le succitate strutture geniche, appartenevano al sierotipo O2 (11 su 16 isolati; 69%) e mostravano lo stesso profilo di resistenza agli antibiotici amoxicillina, ampicillina, trimethoprim-sulfametossazolo, enrofloxacin e ossitetraciclina, triple-sulfa e streptomycin e/o spectinomycin, ad eccezione di un unico ceppo resistente a gentamicina e sensibile a trimethoprim-sulfametossazolo (Tabella 3).

Per quanto riguarda gli integroni di classe 1, l'amplificazione ed il successivo sequenziamento della regione variabile hanno evidenziato la presenza di frammenti di dimensioni comprese tra 1000 bp e 1800 bp, ad eccezione di 2 ceppi per i quali non

è stato possibile amplificare la regione variabile. Le cassette geniche più frequenti sono state la combinazione dei geni *aadA1* e *dfrA1* codificanti rispettivamente per *aminoglycoside 3'-adenyltransferase* e *dihydrofolate-reductase* e responsabili della resistenza ad alcuni aminoglicosidi (streptomina e spectinomicina) e al trimethoprim. Tuttavia, oltre a questa combinazione genica, è stata evidenziata la presenza di una singola cassetta *aadA1* e la combinazione dei geni *aadA1- estX* (quest'ultimo codificante per un'ipotetica esterasi/idrolasi la cui funzione è ad oggi sconosciuta), rispettivamente nell'unico ceppo di *E. coli* positivo per entrambe le classi di integroni e nell'unico isolato veicolante tali strutture appartenente al sierotipo O78 e resistente alla gentamicina (Tabella 3).

L'amplificazione e il sequenziamento della regione variabile degli integroni di classe 2 hanno invece permesso di evidenziare la presenza di frammenti di dimensioni di circa 2000 bp, tutti contenenti la combinazione di cassette geniche *dfrA1-sat2-aadA1* responsabili rispettivamente della resistenza alla streptomina e spectinomicina (*aadA1*), streptotricina (*sat2*) e trimethoprim (*dfrA1*). Unica eccezione, l'integrone di classe 2 presente nel ceppo positivo ad entrambe le classi che presentava una regione variabile di poco superiore alle 1000 bp e contenente la stessa cassetta veicolata dall'integrone di classe 1 (*aadA1*) ed un frammento di circa 100 bp del gene *sat2* (Tabella 3).

DISCUSSIONE

Avian Pathogenic E. coli sono considerati i principali patogeni responsabili di infezioni extra-intestinali nelle specie avicole. Tali infezioni sono note con il termine di colibacillosi e rappresentano una delle principali cause di danni economici per mortalità negli allevamenti intensivi di tacchini da carne. Oltre alle problematiche legate a una zootecnia di tipo intensivo, la diffusione del fenomeno della resistenza ai più comuni antibiotici aggiunge un'ulteriore difficoltà al controllo di tale patologia. L'obiettivo del presente lavoro era quello di approfondire le conoscenze sull'argomento e determinare le resistenze maggiormente diffuse nei ceppi di *E. coli* patogeni isolati da allevamenti di tacchini da carne indagando nel contempo la presenza di particolari determinanti genici di resistenza agli antibiotici.

Tutti i ceppi di *E. coli* sono stati isolati da casi clinici con malattia conclamata e sono stati sottoposti ad antibiogramma per verificare la frequenza di antibiotico-resistenza in rapporto anche alla presenza di integroni. I profili fenotipici di resistenza di tutti i campioni sono stati definiti mediante l'allestimento di antibiogrammi con un *panel* di antibiotici scelti tra quelli più comunemente utilizzati nella terapia della colibacillosi nel tacchino. Inoltre, al fine di verificare la base molecolare di resistenza mediata dalla presenza di integroni, sono stati testati anche gli antibiotici i cui determinanti di resistenza sono frequentemente veicolati da tali strutture geniche. A tali antibiotici è stato aggiunto anche il cloramfenicolo, nonostante sia un antimicrobico vietato da molti anni nella terapia delle infezioni batteriche in campo veterinario.

Tra le resistenze riscontrate, le più frequenti erano quelle nei confronti di ossitetraciclina, penicilline, enrofloxacin e dell'associazione trimethoprim e sulfametossazolo. Anche se presente in un numero limitato di ceppi, non è trascurabile la resistenza al cloramfenicolo.

Per quanto riguarda le tetracicline, tra i principi attivi più vecchi, sono però notoriamente inefficaci nei confronti di *E. coli* la cui resistenza è nota anche in ceppi

provenienti da specie animali diverse dagli avicoli, anche grazie alla diffusa presenza di geni di resistenza per questi antibiotici (Wilkerson *et al.*, 2004).

Da questa indagine risulta che enrofloxacin, fluorochinolone utilizzato in zootecnia da diversi anni, ha perso progressivamente di efficacia. Questi dati concordano con quanto segnalato da van den Bogaard (2001) in polli, tacchini e galline ovaiole in Olanda e da Gyles (2008) in Canada. Anche i β -lattamici risultano particolarmente inefficaci e ciò è particolarmente importante in quanto va ricordato che questi antibiotici o altri appartenenti alla stessa classe, vengono utilizzati frequentemente anche in campo umano. A tale riguardo la possibilità della resistenza crociata tra antimicrobici appartenenti alla stessa famiglia chimica, l'AFSAA (2006) in Francia, pone particolare attenzione al consumo di antibiotici e mette in risalto soprattutto le molecole che vengono utilizzate sia in veterinaria che in medicina umana, sconsigliando vivamente questa sovrapposizione.

Un fenotipo multi-resistente, definito come resistenza verso almeno tre antibiotici di classi diverse, è stato riscontrato nella maggioranza dei ceppi considerati, compresi tutti i 16 isolati contenenti integroni. Di particolare rilievo è la resistenza dimostrata sia fenotipicamente sia genotipicamente dai ceppi portatori di integroni nei confronti di sulfamidici, trimethoprim ed aminoglicosidi. Infatti, l'analisi delle cassette geniche contenute in queste strutture, evidenzia la presenza di determinanti genici di resistenza a tali antibiotici. Tutti i ceppi positivi agli integroni di classe 1, infatti, presentano nella regione conservata 3'CS il gene *sul1* responsabile della resistenza ai sulfamidici. Inoltre, tutti i ceppi i cui integroni contenevano nella regione variabile le cassette geniche *aadA1* o la combinazione *aadA1-dfrA1*, responsabili rispettivamente della resistenza alla streptomicina/spectinomicina e al trimethoprim, risultavano fenotipicamente resistenti a tali molecole. È degna di nota la relazione tra il significativo aumento della resistenza a trimethoprim+sulfametossazolo e il progressivo riscontro della presenza di integroni con l'avanzare dei cicli produttivi. Altrettanto significativo è il rilievo della maggior percentuale di ceppi resistenti a trimethoprim+sulfametossazolo tra gli isolati del sierotipo O2, nei quali è stato riscontrato il maggior numero di integroni.

Particolarmente interessante è il campione 410-1, l'unico ceppo di *E. coli* O78 portatore di un integrone di classe 1. La regione variabile di tale struttura presentava la combinazione dei geni cassetta *estX - aadA1*. Mentre il gene *aadA1* è particolarmente frequente in tali strutture geniche ed è notoriamente responsabile della resistenza alla streptomicina/spectinomicina, il gene *estX* è spesso correlato agli integroni di classe 2, ma solo raramente è stato riscontrato negli integroni di classe 1 (Literak *et al.*, 2009). Questo gene codifica per un'ipotetica esterasi/idrolasi la cui funzione non è ancora nota. Sembra tuttavia simile a un frammento del gene *sat1* codificante per un'*acetyl-transferase* responsabile della resistenza a streptomicina (Partridge, 2005). Da notare inoltre che la presenza di questo particolare arrangiamento genico è presente nell'unico ceppo di *E. coli* risultato resistente alla gentamicina.

Come già accennato precedentemente, non è stato possibile amplificare la regione variabile degli integroni di classe 1 di due ceppi di *E. coli* risultati positivi alla prima fase di *screening* mediante *real-time* PCR. Questo risultato può essere espressione di una regione variabile vuota, priva di cassette geniche. Questi campioni saranno comunque oggetto di indagini future in quanto non si esclude la possibilità che tali integroni siano delle strutture atipiche con delezioni o mutazioni a carico delle regioni

conservate 3' e 5', tali da non permettere l'appaiamento dei *primer* utilizzati nella reazione di amplificazione (Dawes *et al.*, 2010).

Le correlazioni tra il profilo fenotipico e genotipico di antibiotico-resistenza evidenziate nei ceppi di *E. coli* positivi agli integroni di classe 1 sono state riscontrate anche negli isolati positivi agli integroni di classe 2. Particolarmente interessante è l'unico ceppo di *E. coli* positivo per entrambe le classi. Mentre l'integrone di classe 1 presentava nella propria regione variabile un unico gene (*aadA1*), l'integrone di classe 2 conteneva la stessa cassetta genica affiancata però ad una porzione di circa 100 bp del gene *sat2*. La presenza di un gene incompleto può essere interpretata come possibile conseguenza di un errato riarrangiamento durante l'acquisizione o la perdita di cassette geniche nel sito di ricombinazione.

CONCLUSIONI

E' noto che negli ultimi decenni si è assistito a un rapido incremento del fenomeno dell'antibiotico-resistenza sia in batteri commensali sia patogeni. La selezione e la diffusione di popolazioni batteriche antibiotico-resistenti negli animali, nell'ambiente e nell'uomo rappresentano un grave problema di sanità pubblica.

La Comunità Europea, infatti, considera l'antibiotico-resistenza alla stregua di una zoonosi e la Direttiva 2003/99/CE obbliga i Paesi membri dell'Unione Europea a dotarsi di un sistema per il suo monitoraggio nelle produzioni animali (Dir. 99/2003/CE e D.L. 191/2006). Questo studio vuole quindi essere un contributo all'approfondimento delle conoscenze sull'argomento, soprattutto in merito alla relazione tra la presenza di integroni e profili fenotipici di multifarmaco-resistenza in ceppi APEC isolati da allevamenti avicoli intensivi. Tali strutture geniche, infatti, soprattutto se localizzate in elementi mobili, quali plasmidi e trasposoni, possono essere responsabili dell'accumulo di resistenze mediante il loro trasferimento orizzontale tra specie batteriche. Pur non giustificando da un punto di vista genetico le resistenze rilevate fenotipicamente ad alcune classi di antibiotici (tetracicline, penicilline, fluorochinoloni e cloramfenicolo) il riscontro di integroni in una percentuale elevata di ceppi con profili di multi-resistenza agli antibiotici rende tali strutture dei marcatori utili per stimare la diffusione del fenomeno della resistenza agli antibiotici negli animali, nell'ambiente e nell'uomo.

BIBLIOGRAFIA

1. AFSAA, Agence Française de Sécurité Sanitaire des Aliments. Usages vétérinaires des antibiotiques, résistance bactérienne et conséquences pour la santé humaine. pp. 214. 2006.
2. AAVV. (2006). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard - Ninth Edition. M2-A9 Vol.26 No. 1 CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE.
3. Bailey, J.K., Pinyon, J.L., Anantham, S., Hall, R.M. Commensal *Escherichia coli* of healthy humans: a reservoir for antibiotic-resistance determinants. J Med Microbiol. 59, 1331-9. 2010.
4. Barnes, H.J., Nolan, L.K., Vaillancourt, J.P. Colibacillosis. In: Saif, Y.M., Fadly, A.M., Glisson, J.R., McDougald, L.R., Nolan, L.K., Swayne, D.E. (Eds.), Diseases of Poultry, Iowa State Press, Ames, pp.691-737. 2008.

5. Blanco, J., Blanco, M. *Escherichia coli* enterotoxigenicos, necrotoxigenicos y verotoxigenicos de origen humano y bovino. Servicio de Publicaciones Diputatio, Provincial San Marcos ed., Lugo, Spagna. 2009.
6. Carattoli, A. Importance of integrons in the diffusion of resistance. *Vet Res.* 32, 243-259. 2001.
7. Carattoli, A. Plasmid-mediated antimicrobial resistance in *Salmonella enterica*. *Curr. Issues Mol. Biol.* 5, 113-122. 2003.
8. da Costa, P.M., Bica, A., Vaz Pires, P., Bernardo, F. Effects of anti-microbial treatment on selection of resistant *Escherichia coli* in broiler fecal flora. *Microb. Drug Resist.* 14,299–306. 2008.
9. da Costa, P.M., Belo, A., Goncalves, J., Bernardo, F. Field trial evaluating changes in prevalence and patterns of antimicrobial resistance among *Escherichia coli* and *Enterococcus* spp. isolated from growing broilers medicated with enrofloxacin, apramycin and amoxicillin. *Vet. Microbiol.* 139,284–292. 2009.
10. Dawes, F.E., Kuzevski, A., Bettelheim, K.A., Hornitzky, M.A., Djordjevic, S.P. Distribution of Class 1 Integrons with IS26-mediated deletions in their 3'-Conserved Segments in *Escherichia coli* of human and animal origin. *PLoS ONE* 5(9):e12754. doi:10.1371/journal.pone.0012754. 2010.
11. Decreto Legge 4 aprile 2006, n. 191. Attuazione della direttiva 2003/99/CE sulle misure di sorveglianza delle zoonosi e degli agenti zoonotici. *Gazz. Uff. n. 119 del 24 maggio 2006.*
12. Direttiva 2003/99/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 17 novembre 2003. sulle misure di sorveglianza delle zoonosi e degli agenti zoonotici, recante modifica della decisione 90/424/CEE del Consiglio e che abroga la direttiva 92/117/CEE del Consiglio. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea*, 12.12.2003.
13. Ekkapobytin, C., Padungtod, P., Chuanchuen, R. Antimicrobial resistance of *Campylobacter coli* isolates from swine. *Int. J. Food Microbiol.* 128: 325-8. 2008.
14. Gyles, C.L. Antimicrobial resistance in selected bacteria from poultry. *Anim. Health Res. Rev.* 9, 149-158. 2008.
15. Lévesque, C., Piché, L., Larose, C., Roy, P.H. PCR mapping of integrons reveals several novel combinations of resistance genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39:185-191. 1995.
16. Literak, I., Dolejska, M., Rybarikova, J., Cizek, A., Strejckova, P., Vyskocilova, M., Friedman, M., Klimes, J. *Microbial Drug Resistance.* 15(3): 229-237. doi:10.1089/mdr.2009.0913. 2009.
17. Maguire, A.J., Brown, D.F.J., Gray, B.J., Desselberger, U. Rapid Screening Technique for class 1 integrons in *Enterobacteriaceae* and nonfermenting Gram-negative bacteria and its use in molecular biology. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:1022-1029. 2001.
18. Ozaki,H.,et al. Antimicrobial resistance in fecal *Escherichia coli* isolated from growing chickens on commercial broiler farms. *Vet. Microbiol.* doi:10.1016/j.vetmic.2010.12.020. 2010.
19. Partridge, S. Correctly identifying the streptothricin resistance gene cassette. *J. Clin. Microbiol.* 43(8): 4298–4300. 2005.

20. Soufi, L., Abbassi, M.S., Saenz, Y., Vinuè, L., Somalo, S., Zarazaga, M., Abbas, A., Dbaya, R., Khanfir, L., Ben Hassen, A., Hammami, S., Torres, C. Prevalence and diversity of integrons and associated resistance genes in *Escherichia coli* isolates from poultry meat in Tunisia. *Foodborne Pathog. Dis.* 6(9):1067-73. 2009.
21. Smith, J.L., Drum, D.J., Dai, Y., Kim, J.M., Sanchez, S., Maurer, J.J., Hofacre, C.L., Lee, M.D. Impact of antimicrobial usage on antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* strains colonizing broiler chickens. *Appl. Environ. Microbiol.* 73,1404–1414. 2007.
22. Unno, T., Han, D., Jang, J., Lee, S.N., Kim, J.H., Ko, G., Kim, B.G., Ahn, J.H., Kanaly, R.A., Sadowsky, M.J., Hur, H.G. High diversity and abundance of antibiotic-resistance *Escherichia coli* isolated from humans and farm animal hosts in Jeonnam Province, South Korea. *Sci Tot. Env.*, 408, 3499-3506. 2010.
23. Van den Bogaard, A.E., London, N., Driessen, C., Stobberingh EE. Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers and poultry slaughterers. *J. Antimicrob. Chemother.* 48(4):587-8. 2001
24. White, P. A., C. J. McIver, Rawlinson R.W. Integrons and gene cassettes in the *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45:2658–2661. 2001.
25. Wilkerson, C., Samadpour, M., van Kirk, N., Roberts, M.C. Antibiotic Resistance and Distribution of Tetracycline Resistance Genes in *Escherichia coli* O157:H7 Isolates from Humans and Bovines. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 3:1066–1067. 2004.
26. Zanella, A., Alborali, G.L., Bardotti, M., Candotti, P., Guadagnini, P.F., Moreno, A., Stonfer, M. Severe *Escherichia coli* O111 septicemia and polyserositis in hens at the start of lay. *Avian Pathology*, 29, 311-317. 2000.

Tabella 1. Esito della valutazione dell'antibiotico-sensibilità nei diversi cicli produttivi.

	Sensibile			Resistente		
	1° ciclo	2° ciclo	3° ciclo	1° ciclo	2° ciclo	3° ciclo
Aminosidina	100%	100%	100%	0%	0%	0%
Apramicina	100%	100%	100%	0%	0%	0%
Gentamicina	100%	96%	100%	0%	4%	0%
Enrofloxacin	20%	7%	0%	80%	93%	100%
Amoxicillina	20%	0%	0%	80%	100%	100%
Ampicillina	20%	0%	0%	80%	100%	100%
Trimethoprim+ Sulfametossazolo	90%	57%	0%	10%	43%	100%
Colistina	100%	100%	100%	0%	0%	0%
Ossitetraciclina	0%	0%	0%	100%	100%	100%

Tabella 2. Esito della valutazione dell'antibiotico-sensibilità nell'ambito dei diversi sierotipi.

	Sensibile				Resistente			
	O78	O2	O111*	NT	O78	O2	O111*	NT
Aminosidina	100%	100%	100%	100%	0%	0%	0%	0%
Apramicina	100%	100%	100%	100%	0%	0%	0%	0%
Gentamicina	96%	100%	100%	100%	4%	0%	0%	0%
Enrofloxacin	0%	21%	0%	20%	100%	79%	100%	80%
Amoxicillina	0%	7%	100%	0%	100%	93%	0%	100%
Ampicillina	0%	7%	100%	0%	100%	93%	0%	100%
Trimethoprim+ Sulfametossazolo	75%	21%	100%	0%	25%	79%	0%	100%
Colistina	100%	100%	100%	100%	0%	0%	0%	0%
Ossitetraciclina	0%	0%	0%	0%	100%	100%	100%	100%

NT = ceppi non tipizzati

*Era presente un solo ceppo del sierotipo O111

Tabella 3. *Pattern* fenotipico e genotipico di resistenza agli antibiotici dei ceppi di *E. coli* indagati in questo studio. Di ciascun ceppo sono elencati anche il numero di identificazione dell'animale da cui è stato isolato ed il ciclo di allevamento in cui quest'ultimo era inserito, la sede anatomica da cui è stato isolato il ceppo ed il suo sierotipo.

Animale	Ciclo produttivo	Sierotipo	Lattosio	Organo	Profilo fenotipico di antibiotico-resistenza		Presenza di integroni		Cassette geniche di antibiotico-resistenza	PM (pb)
					di antibiotico-resistenza	di antibiotico-resistenza	cl. 1	cl. 2		
13432-1	1	O78	-	cervello	AML, AMP, ENR, OT, SSS, S, CAT	AML, AMP, ENR, OT, SSS, S, CAT	-	-		
14359-1	1	O78	-	liquido pericardico	AML, AMP, ENR, OT	AML, AMP, ENR, OT	-	-		
14964-1	1	O78	-	liquido pericardico	AML, AMP, ENR, OT, SSS, S	AML, AMP, ENR, OT, SSS, S	-	-		
17421-1	1	O2	-	cervello	OT, SSS	OT, SSS	-	-		
18041-1	1	NT	-	fegato	AML, AMP, SXT, OT, SSS, S	AML, AMP, SXT, OT, SSS, S	-	-		
18456-1	1	O78	-	cervello	AML, AMP, ENR, OT, SSS, S	AML, AMP, ENR, OT, SSS, S	-	-		
19038-1	1	O111	+	polmone	ENR, OT, SSS, S	ENR, OT, SSS, S	-	-		
19700-1	1	O78	+	cervello	AML, AMP, ENR, OT	AML, AMP, ENR, OT	-	-		
20317-1	1	O78	-	liquido pericardico	AML, AMP, ENR, OT, SSS, S	AML, AMP, ENR, OT, SSS, S	-	-		
20318-1	1	O78	-	art. tibiotarsica	AML, AMP, ENR, OT, SSS, S	AML, AMP, ENR, OT, SSS, S	-	-		
27028-1	2	O2	+	cervello	AML, AMP, OT, S	AML, AMP, OT, S	-	-		1500
27619-2	2	O2	+	cervello	AML, AMP, SXT, ENR, OT, SSS, S, CAT	AML, AMP, SXT, ENR, OT, SSS, S, CAT	+	-	<i>dfrA1-aadA1</i>	1500
27620-1	2	O2	+	cervello	AML, AMP, OT, S	AML, AMP, OT, S	-	-		1500
28234-1	2	O2	+	liquido pericardico	AML, AMP, SXT, ENR, OT, SSS, S, SH, CAT	AML, AMP, SXT, ENR, OT, SSS, S, SH, CAT	+	-	<i>dfrA1-aadA1</i>	1500
28234-1	2	O2	+	milza	SH, CAT	SH, CAT	+	-	<i>dfrA1-aadA1</i>	1500
29610-1	2	O78	+	liquido pericardico	AML, AMP, ENR, OT, S	AML, AMP, ENR, OT, S	-	-		
29610-1	2	O78	+	cervello	AML, AMP, ENR, OT, S	AML, AMP, ENR, OT, S	-	-		
29610-2	2	O78	-	cervello	AML, AMP, ENR, OT, SSS, S	AML, AMP, ENR, OT, SSS, S	-	-		
29611-1	2	O78	+	cervello	AML, AMP, ENR, OT	AML, AMP, ENR, OT	-	-		
410-1	2	O78	+	cervello	CN, AML, AMP, ENR, OT, SSS, S	CN, AML, AMP, ENR, OT, SSS, S	+	-	<i>estX-aadA1</i>	1800
1037-1	2	O78	+	cervello	AML, AMP, SXT, ENR, OT, S	AML, AMP, SXT, ENR, OT, S	-	-		
1037-1	2	O78	+	liquido pericardico	AML, AMP, SXT, ENR, OT, SSS, S	AML, AMP, SXT, ENR, OT, SSS, S	-	-		
1037-1	2	O78	+	art. tibiotarsica	AML, AMP, SXT, ENR, OT, SSS, S	AML, AMP, SXT, ENR, OT, SSS, S	-	-		
1037-2	2	O78	+	cervello	AML, AMP, ENR, OT, S	AML, AMP, ENR, OT, S	-	-		
1037-2	2	O78	+	art. tibiotarsica	AML, AMP, ENR, OT, SSS, S	AML, AMP, ENR, OT, SSS, S	-	-		
1038-1	2	NT	+	polmone	AML, AMP, ENR, OT, SSS, S	AML, AMP, ENR, OT, SSS, S	+	-		1500
1038-2	2	O78	+	cervello	AML, AMP, ENR, OT, S, CAT	AML, AMP, ENR, OT, S, CAT	-	-	<i>dfrA1-aadA1</i>	1500

Animale	Ciclo produttivo	Sierotipo	Lattosio	Organo	Profilo fenotipico di antibiotico-resistenza		Presenza di integroni		Cassette geniche di antibiotico-resistenza	PM (pb)
					di antibiotico-resistenza	di antibiotico-resistenza	cl. 1	cl. 2		
1038-3	2	O78	+	cervello	AML, AMP, ENR, OT, S	-	-	-		
1038-4	2	O78	+	polmone	AML, AMP, ENR, OT, S	-	-	-		
2216-1	2	NT	+	polmone	AML, AMP, SXT, ENR, OT, SSS, S	-	-	+	<i>aadA1</i> , <i>sat2-aadA1</i>	1000
2497-1	2	O78	+	polmone	AML, AMP, SXT, ENR, OT, SSS, S ^{SH}	-	-	-		
2759-1	2	O78	+	art. coxofemorale	S, CAT	-	-	-		
3302-1	2	O78	+	art. coxofemorale	AML, AMP, SXT, ENR, OT, SSS, S	-	-	-		
3302-1	2	O78	+	art. coxofemorale	AML, AMP, SXT, ENR, OT, SSS, S	-	-	-		
3302-1	2	O78	+	art. tibiotarsica	AML, AMP, ENR, OT, SSS, S	-	-	-		
3302-4	2	O78	+	art. coxofemorale	AML, AMP, ENR, OT, SSS, S	-	-	-		
3302-4	2	O78	+	art. tibiotarsica	AML, AMP, ENR, OT, SSS, S, SH	-	-	-		
3302-4	2	O78	+	art. tibiotarsica	AML, AMP, ENR, OT	-	-	-		
12685-1	3	O2	+	liquido pericardico	AML, AMP, SXT, ENR, OT, SSS, S, SH	-	-	+	<i>dfrA1-sat2-aadA1</i>	2000
12685-2	3	O2	+	cervello	AML, AMP, SXT, ENR, OT, SSS, S	-	-	+	<i>dfrA1-sat2-aadA1</i>	2000
13282-1	3	O2	+	cervello	AML, AMP, SXT, ENR, OT, SSS, S ^{SH}	-	-	+	<i>dfrA1-sat2-aadA1</i>	2000
14486-1	3	O2	+	cervello	AML, AMP, SXT, ENR, OT, SSS, S ^{SH}	-	-	+	<i>dfrA1-sat2-aadA1</i>	2000
4486-2	3	O2	+	cervello	AML, AMP, SXT, ENR, OT, SSS, S ^{SH}	-	-	+	<i>dfrA1-sat2-aadA1</i>	2000
14486-1	3	NT	+	polmone	AML, AMP, SXT, ENR, OT, SSS, S ^{SH}	+	-	-	-	
14486-2	3	NT	+	polmone	AML, AMP, SXT, ENR, OT, SSS, S ^{SH}	+	-	-	-	
15189-1	3	O2	+	cervello	AML, AMP, SXT, ENR, OT, SSS, S ^{SH}	-	-	+	<i>dfrA1-sat2-aadA1</i>	2000
15189-2	3	O2	+	cervello	AML, AMP, SXT, ENR, OT, SSS, S ^{SH}	-	-	+	<i>dfrA1-sat2-aadA1</i>	2000
15189-3	3	O2	+	cervello	AML, AMP, SXT, ENR, OT, SSS, S ^{SH}	-	-	+	<i>dfrA1-sat2-aadA1</i>	2000