

STUDIO DEI FATTORI DI VIRULENZA E PROFILO DI ANTIMICROBICO-RESISTENZA IN CEPPI DI *ESCHERICHIA COLI* ISOLATI DA GALLINE OVAIOLE DA CONSUMO

Rossini R.³, Gambi L.¹, Menandro M.L.², Franzo G.², Paola M.¹, Tosi G.¹, D’Incau M.¹, Fiorentini L.¹

¹ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell’Emilia Romagna, Sede territoriale di Forlì, Via Don Eugenio Servadei 3E/F, 47122 Forlì (FC), Italia;

² Università degli Studi di Padova, Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute, Viale dell’Università, 16 - 35020 Legnaro (PD), Italia;

³ Medico Veterinario Libero Professionista.

Summary

Colibacillosis is the most frequent bacterial disease in avian species: it induces significant economic losses on industrial poultry breeding, especially if characterized by a long production cycles like those of laying hens, in which the disease tends to become endemic and it is difficult to eradicate. Management strategies and the use of antibiotic treatments are essential for the control of the infection. However, over the years, there has been an increase in the isolation of *Escherichia coli* strains with multiple resistance to various classes of antimicrobials, which turns out to be a serious problem for the breeders but also for the public health. In this study antimicrobial resistance feature, the serogroup and the presence of APEC virulence genes have been investigated in *E. coli* strains isolated during outbreaks of colibacillosis in laying hens from intensive farming located in Emilia Romagna and in other Italian regions. The relationship of the results of each parameters was evaluated. A total of 71 *E. coli* strains were, therefore, subjected to serotyping for the identification of serogroup (based on somatic antigen “O”), to PCR to detect the presence of virulence genes and to Kirby Bauer antimicrobial susceptibility test. A statistical study was also carried out to evaluate a correlation between these parameters. The most frequently isolated serogroups were O2 (21%) and O88 (13%). Resistance was most frequently detected against nalidixic acid (49%) and ampicillin (38%) and all strains were sensitive to ceftiofur and florfenicol. Overall, 25% of the isolates showed resistance to at least three or more antimicrobials (MDR) and 56% of the isolates were defined APEC strains (presence of at least 5 virulence genes). The most frequently encountered virulence gene was *iss* (90% of cases), followed by *iucD* (85%), *cvi/cva* (70%), *irp2* (70%) and *tsh* (63%). On the other hand, virulence gene *astA* was detected in only 6% of the strains analyzed, followed by *papC* (14%) and *vat* (35%). The correlation between the different parameters (resistance genes, serotype and antimicrobial resistance) did not highlight particular associations. The comparison of the obtained results with those of similar studies highlights the importance of the continuous monitoring in order to have a real evaluation of the national epidemiological situation and, especially with regard to antimicrobial resistance, to be adopted the preventive measures with a view to a *One Health* approach towards APEC infections.

INTRODUZIONE

La colibacillosi, è la malattia batterica più comune nel pollame ed è correlata ad

ingenti perdite economiche del settore avicolo. La problematica è particolarmente sentita negli allevamenti che prevedono cicli produttivi lunghi, come per la gallina ovaia, in relazione al fatto che tende ad endemizzare e divenire difficilmente debellabile. Per il controllo dell'infezione, risultano fondamentali adeguate strategie di *management* aziendale volte a ridurre l'impatto dei fattori predisponenti la malattia, ma spesso, è necessario il ricorso all'utilizzo di trattamenti con antimicrobici (Barnes et al., 2009; Camarda, 2009). Tuttavia, l'incremento dell'insorgenza dei ceppi di *Escherichia coli* con resistenze multiple nei confronti di varie classi di antimicrobici, favorisce il fallimento dei trattamenti terapeutici ed una pressione selettiva nei confronti dei ceppi resistenti (Sgariglia et al., 2019; Xu et al., 2019) indiscriminate use of antibiotics may lead to therapy failure and economic losses for the breeder. The aims of this study were to, determine the antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolates, evaluate the correlation between *E. coli* isolation and systems of breeding included in this study, and identify the avian pathogenic *E. coli* (APEC. Ad oggi, l'antimicrobico-resistenza è considerata uno dei rischi più emergenti e preoccupanti per la salute pubblica a livello globale; per ridurre l'incidenza di questo fenomeno è fondamentale un approccio *OneHealth*, basato sulla stretta relazione tra la salute umana, animale ed ambientale (ECDC, 2019). Gli APEC (*Avian Pathogenic Escherichia coli*) più comunemente isolati in corso di colibacillosi, appartengono a vari sierogruppi tra cui O1, O2, O8, O15, O18, O35, O78, O88, O109 ed O115 (Dho-Moulin & Fairbrother, 1999) polyserositis, septicemia and other mainly extraintestinal diseases in chickens, turkeys and other avian species. APEC are found in the intestinal microflora of healthy birds and most of the diseases associated with them are secondary to environmental and host predisposing factors. APEC isolates commonly belong to certain serogroups, O1, O2 and O78, and to a restricted number of clones. Several experimental models have been developed, permitting a more reliable evaluation of the pathogenicity of *E. coli* for chickens and turkeys. Hence, virulence factors identified on APEC are adhesins such as the F1 and P fimbriae, and curli, the aerobactin iron sequestering system, K1 capsule, temperature-sensitive hemagglutinin (Tsh ed i ceppi isolati in Europa sono risultati nel 56,5% appartenenti a sei sierogruppi (O1, O2, O5, O8, O18 e O78) (Schouler et al., 2012) an extensive characterization of 1,491 *E. coli* isolates was conducted, based on serotyping, virulence genotyping, and experimental pathogenicity for chickens. The isolates originated from lesions of avian colibacillosis (n = 1,307. Attualmente, in letteratura non sono presenti molti studi che indagano la prevalenza dell'antimicrobico-resistenza negli *E. coli*, ed in particolare negli *Avian Pathogenic Escherichia coli* (APEC) in Italia (Sgariglia et al., 2019) indiscriminate use of antibiotics may lead to therapy failure and economic losses for the breeder. The aims of this study were to, determine the antibiotic resistance of *Escherichia coli* isolates, evaluate the correlation between *E. coli* isolation and systems of breeding included in this study, and identify the avian pathogenic *E. coli* (APEC. Lo scopo del presente studio è stato quello di valutare le caratteristiche fenotipiche relative al *pattern* di antimicrobico-resistenza, identificare il sierogruppo di appartenenza ed effettuare una valutazione genotipica dei geni di virulenza APEC in ceppi di *Escherichia coli* isolati da casi clinici di colibacillosi in galline ovaiole provenienti da allevamenti intensivi italiani, prevalentemente allocati in Emilia Romagna. Si è inoltre valutata l'eventuale correlazione tra i risultati ottenuti dai parametri studiati (antimicrobico-resistenza, sierogruppo, fattori di virulenza degli APEC).

MATERIALI E METODI

Campionamento

In questo studio sono stati presi in considerazione 71 ceppi di *E. coli*, isolati da altrettanti episodi di malattia osservati in 32 diversi allevamenti intensivi di galline ovaiole distribuiti in 10 diverse regioni italiane (prevalentemente in Emilia Romagna), tra il 2018 ed il 2020.

Esame batteriologico ed identificazione batterica

Dai campioni biologici prelevati in sede necroscopica o conferiti al laboratorio come pool di organi, è stato effettuato l'esame batteriologico per semina diretta su Agar Sangue e, per la crescita selettiva delle enterobatteriacee, su Hektoen Enteric Agar. In alcuni casi si è proceduto all'inoculo in brodo di arricchimento e successiva semina sui terreni solidi selettivi e differenziali. I terreni così inoculati sono stati incubati a 37°C per 24-48 ore in condizioni di aerobiosi; la successiva identificazione dei microrganismi sospetti è avvenuta con l'ausilio del sistema identificativo miniaturizzato Microgen™GnA+B-iDSysSystem (Microgen Bioproducts Ltd, UK).

Caratterizzazione antigene somatico

I ceppi di *E.coli* isolati sono stati sottoposti alla caratterizzazione sierologica per l'identificazione dell'antigene somatico. La metodica utilizzata permette di valutare la presenza di 30 differenti antigeni somatici (O1, O2, O5, O8, O9, O15, O18, O20, O22, O26, O45, O49, O55, O64, O78, O86, O88, O101, O103, O111, O113, O118, O128, O138, O139, O141, O147, O149, O153, O157) attraverso la tecnica sierologica di agglutinazione lenta a caldo mediante l'impiego di antisieri. Quando la prova risulta positiva per uno solo degli antisieri il ceppo viene considerato appartenente al sierogruppo omologo. Per le titolazioni il ceppo viene considerato appartenente al sierogruppo il cui antisiero ha agglutinato a titolo d'uso o ad una diluizione inferiore. Qualora 5 o più antisieri risultino positivi alla reazione di agglutinazione o se il controllo negativo risulta non favorevole, il ceppo è considerato autoagglutinante e il sierogruppo non determinabile (ND).

Antibiogramma

L'antibiogramma è stato effettuato sui 71 ceppi isolati secondo la metodica di Kirby-Bauer, in conformità con le linee guida nazionali del Centro di Referenza per l'Antibiotico Resistenza (CRAB) e le linee guida internazionali del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Dei 71 ceppi di *E. coli* del presente studio, 69 sono stati analizzati secondo la suddetta metodica per valutare la resistenza o sensibilità ai seguenti antimicrobici: acido nalidixico (30 µg), aminosidina (60 µg), amoxicillina/acido clavulanico (10/20 µg), ampicillina (10µg), apramicina (15µg), cefalotina (30 µg), ceftiofur (30µg), colistina solfato (10 µg), enrofloxacin (5 µg), florfenicolo (30µg), gentamicina (10µg), kanamicina (30µg), tetraciclina (30 µg), yrimethoprim/sulfonamidi (1,25/23,75 µg). Invece 2 dei 71 ceppi sono stati valutati per tutti gli antimicrobici ad esclusione del Trimethoprim associato ai sulfonamidi. L'interpretazione dei risultati è avvenuta secondo quanto previsto dalle linee guida nazionali del Centro di Referenza per l'Antibiotico Resistenza (CRAB) e le linee guida internazionali del *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, OIE Manual 2012, VET-S2).

Individuazione dei geni APEC

Nel corso dello studio è stata effettuata un'analisi biomolecolare tramite PCR tradizionale per la ricerca dei geni di virulenza degli APEC, attraverso l'utilizzo del kit Kylt® APEC (AniCon Labor GmbH, DE), seguendo le indicazioni fornite dal produttore. La lettura delle bande di migrazione ottenuta dopo la corsa elettroforetica in gel di agarosio, è avvenuta utilizzando UVITEC della Cambridge®, interpretando l'immagine ottenuta con lo schema fornito dal produttore nel manuale Kylt® APEC, riportato nella tabella seguente (tabella 1).

n. di Bande del Controllo Positivo	Gene amplificato	Dimensione dell'amplificato
1	<i>astA</i>	111 bp
2	<i>iss</i>	309 bp
3	<i>irp2</i>	413 bp
4	<i>pap C</i>	501 bp
5	<i>cvi / cva</i>	598 bp
6	<i>iucD</i>	693 bp
7	<i>tsh</i>	824 bp
8	<i>vat</i>	978 bp

Tabella 1: chiave di lettura delle bande ottenute con elettroforesi del manuale Kylt® APEC. (AniCon Labor GmbH, DE)

Analisi statistica

I dati sperimentali ottenuti sono stati organizzati in un database Excel. In aggiunta ai dati grezzi, sono state create delle ulteriori variabili composte, fra cui la classificazione dei ceppi in APEC (se presenti da 5 a più geni di virulenza) o *Multi Drug Resistant* (MDR, se presenti da 3 a più resistenze a diverse classi antimicrobiche). Diverse statistiche descrittive sono state calcolate al fine di valutare la distribuzione e l'associazione fra le caratteristiche di ceppi presi in esame. La correlazione fra le variabili in esame (i.e. geni di virulenza, antimicrobico resistenza, caratterizzazione del ceppo, etc.) è stata quantificata calcolando il *tau* di Goodman-Kruskal, una misura di associazione fra variabili categoriche che presenta la caratteristica di non essere simmetrica, utilizzando la libreria *GoodmanKruskal* in R.

RISULTATI

Esame anatomo-patologico

Nell'83% dei casi (59 carcasse analizzate) le lesioni riscontrate sono riconducibili a colibacillosi sistemica con interessamento di più organi ed apparati: ovaio, milza, pericardio, fegato, intestino, cervello, cuore, polmoni, sacchi aerei, articolazioni plantari e tibiotarsiche. L'esame anatomo-patologico ha evidenziato quadri di aerossacculite (23%), pericardite (44%), epatite (54%), polisierosite fibrinosa (58%), enterite (34%), ovarite fibrinosa (75%), sinovite ed osteoartrite (8%) e meningite (9%).

Ricerca antigene somatico

Dei 71 ceppi di *E. coli* sierotipizzati, il 55% non appartiene ai sierogruppi testati, mentre nel 21% (n.=15) dei casi, i ceppi sono risultati appartenenti al sierogruppo O2, per il 13% (n.=9) al sierogruppo O88 e per il 6% (n.=4) all'O78. I restanti ceppi (5%) sono risultati appartenere al sierogruppo O1, O9, O45, O111 (1 ceppo ognuno) (grafico 1).

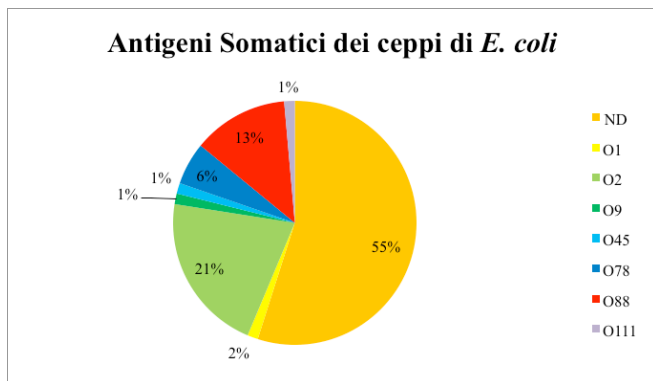
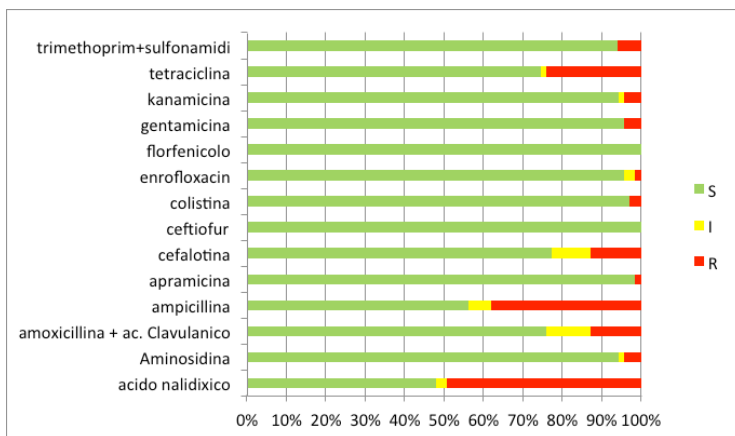


Grafico 1: percentuale dei ceppi di *E. coli* che appartengono ad un determinato sierogruppo.

Antibiogramma

Dalla valutazione degli antibiogrammi è emerso che le molecole antimicrobiche nei confronti delle quali i 71 ceppi presentano più frequentemente resistenza sono l'acido nalidixico, l'ampicillina e le tetracicline, mentre le molecole nei confronti delle quali la resistenza è nulla, o comunque molto bassa, sono il ceftiofur, il florfenicolo, l'apramicina ed l'enrofloxacin, come si evince dal grafico 2 e dalla tabella 2.

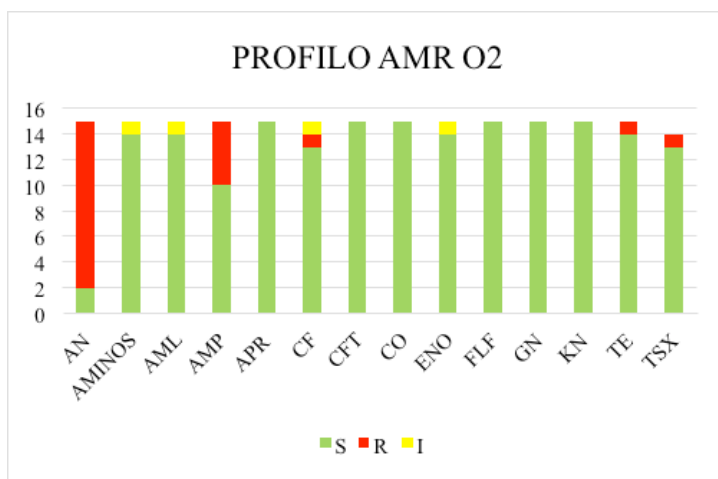


Istogramma 2: percentuali di ceppi di *E. coli* risultati sensibili, intermedi o resistenti nei confronti delle varie molecole antimicrobiche testate.

	S		I		R	
Acido Nalidixico	34	48%	2	3%	35	49%
Aminosidina	67	94%	1	1%	3	4%
Amoxicillina + Ac. Clavulanico	54	76%	8	11%	9	13%
Ampicillina	40	56%	4	6%	27	38%
Apramicina	70	99%	0	0%	1	1%
Cefalotina	55	77%	7	10%	9	13%
Ceftiofur	71	100%	0	0%	0	0%
Colistina	69	97%	0	0%	2	3%
Enrofloxacin	68	96%	2	3%	1	1%
Florfenicolo	71	100%	0	0%	0	0%
Gentamicina	68	96%	0	0%	3	4%
Kanamicina	67	94%	1	1%	3	4%
Tetraciclina	53	75%	1	1%	17	24%
Trimethoprim+Sulfonamidi	65	92%	0	0%	4	6%

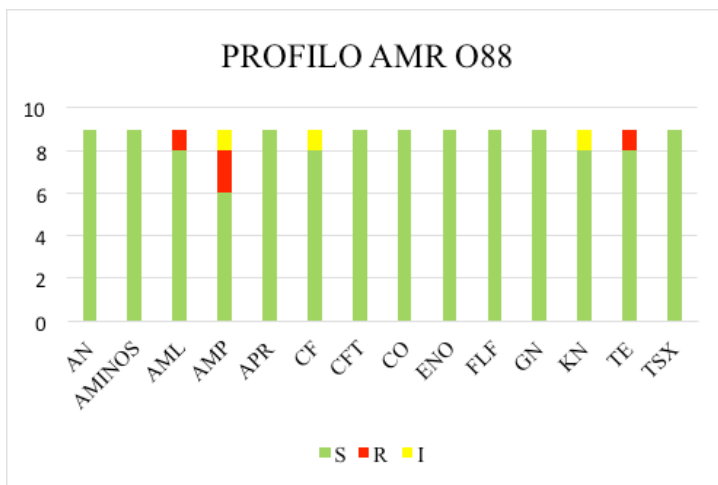
Tabella 2: numero e percentuale dei ceppi di *E. coli* risultati sensibili, ad intermedia sensibilità e resistenti nei confronti delle molecole antimicrobiche testate. Numero totale di ceppi analizzati 71.

Dei 71 ceppi esaminati, 18 (25%) sono risultati multiresistenti (MDR), quindi con resistenza nei confronti di più di 3 classi di antibiotici contemporaneamente. Dei 15 ceppi con sierogruppo O2, 13 sono risultati resistenti all'acido nalidixico (87%), 5 all'ampicillina (33%), 1 alle tetracicline (6%) ed 1a trimethoprim/sulfonamidi (6%); 1 ceppo ha mostrato una resistenza intermedia dei confronti dell'enrofloxacin, uno alla cefalotina, uno all'aminosidina ed infine uno all' amoxicillina/acido clavulanico. I ceppi con sierogruppo O2 isolati nel corso di questo studio sono risultati tutti sensibili nei confronti di apramicina, ceftiofur, colistina, florfenicolo, gentamicina e kanamicina (istogramma 3).



Istogramma 3: profilo di antimicrobico-resistenza dei ceppi di *E. coli* con sierogruppo O2, presi in considerazione nel presente studio, nei confronti delle molecole antimicrobiche testate.

Dei 9 ceppi con sierogruppo O88, 2 sono risultati resistenti all'ampicillina (22%), 1 all'aminosidina (11%) ed 1 alla tetraciclina (11%). Un ceppo ha dimostrato avere resistenza intermedia nei confronti di ampicillina, 1 alla cefalotina e un altro alla kanamicina. Infine, i ceppi con sierogruppo O88 isolati nel corso di questo studio sono risultati tutti sensibili all'acido nalidixico, amoxicillina/acido clavulanico, apramicina, ceftiofur, colistina, enrofloxacin, florfenicolo, gentamicina e trimethoprim/sulfonamidi (istogramma 4).



Istogramma 4: profilo di antimicrobico-resistenza dei ceppi di *E. coli* con sierogruppo O88, presi in considerazione nel presente studio, nei confronti delle molecole antimicrobiche testate.

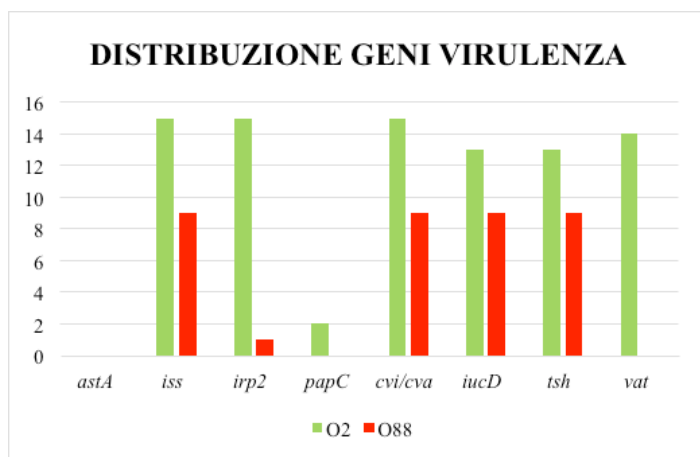
Ricerca geni di virulenza

In seguito all'indagine biomolecolare eseguita tramite PCR, è emerso che 4 ceppi di *E. coli* sui 71 analizzati presentavano nel loro genoma il gene *AstA*, 64 il gene *iss*, 50 l'*irp2*, 10 il *papC*, 50 il gene *iucD*, 45 il *tsh* e 25 il gene *vat*. Il gene di virulenza più frequentemente riscontrato è stato *iss* (90% dei casi), seguito da *iucD* (85%), *cvi/cva* (70%), *irp2* (70%) e *tsh* (63%). Il gene di virulenza riscontrato più raramente invece è stato *astA*, presente nel 6% dei ceppi analizzati, seguito da *papC* (14%) e *vat* (35%) (tabella 3).

Geni	Ceppi di <i>E.coli</i>			
	Assenza		Presenza	
<i>AstA</i>	67	94%	4	6%
<i>iss</i>	7	10%	64	90%
<i>irp2</i>	21	30%	50	70%
<i>papC</i>	61	86%	10	14%
<i>cvi/cva</i>	21	30%	50	70%
<i>iucD</i>	11	15%	60	85%
<i>tsh</i>	26	37%	45	63%
<i>vat</i>	46	65%	25	35%

Tabella 3: numero e percentuale di ceppi di *E. coli* presi in considerazione nel presente studio che presentano o meno nel loro genoma un determinato gene di virulenza.

Secondo quanto riportato nel manuale kit Kylt® APEC, vanno considerati APEC i ceppi di *E. coli* che presentano almeno 5 geni di virulenza indagati con metodica biomolecolare. Sulla base di ciò è emerso che 40 ceppi su 71 (56%) isolati nel corso del presente studio risultano possedere 5 o più geni di virulenza e possono perciò essere definiti APEC.



Istogramma 5: numero di ceppi di *E. coli* appartenenti ai sierogruppi O2 e O88 che hanno presentato un determinato gene APEC di virulenza nel loro genoma.

Dei 15 ceppi con sierogruppo O2, nessuno ha presentato il gene *astA*, tutti hanno presentato i geni *iss*, *irp2* e *cvi/cva*, 13 ceppi (87%) hanno presentato i geni *iucD* e *tsh*, in 14 (93%) il gene *vat* e solo due il gene *papC* (13%) (Istogramma 5). Dei 9 ceppi con sierogruppo O88, nessuno ha presentato i geni *astA*, *papC* e *vat*, tutti hanno presentato i geni *iss*, *cvi/cva*, *iucD* e *tsh*; uno solo dei 9 ceppi ha dimostrato di presentare il gene *irp2* (11%) (istogramma 5). La distribuzione dei geni di virulenza nei due sierogruppi maggiormente rappresentati è tendenzialmente sovrapponibile per la presenza/assenza dei geni *astA*, *iss*, *cvi/cva*, *iucD* e *tsh*. Si discostano invece in quanto il sierogruppo O2 presenta i geni *papC* e *vat*, che vengono a mancare nel sierotipo O88 e per la prevalenza del gene *irp2*, sempre presente nei ceppi appartenenti al sierogruppo O2 e presente solo in un ceppo (11%) appartenente al sierogruppo O88 (istogramma 5). Inoltre, tutti i ceppi O2 hanno presentato almeno 5 fattori di virulenza, mentre solo 1 ceppo O88 ha presentato 5 geni di virulenza e tutti gli altri 4.

Analisi statistica

Calcolando il *tau* di Goodman-Kruskal, non si è evidenziata alcuna correlazione fra sierogruppi, fattori di virulenza e MDR. Tra i ceppi MDR è stato possibile evidenziare una maggiore probabilità di questi di essere ampicillina resistenti (0.64). Nessuna correlazione superiore a 0.5 è stata riscontrata tra l'appartenenza agli APEC e i geni di virulenza considerati.

DISCUSSIONE

In Italia l'industria avicola è largamente sviluppata ed in costante crescita nell'ultimo decennio; in particolare l'allevamento della gallina ovaioia rappresenta un settore molto fiorente dell'economia italiana (ISMEA, 2020a; UNAITALIA, 2020). La colibacillosi è la malattia batterica più comune nel pollame ed è correlata ad ingenti perdite economiche del settore avicolo (Barnes et al., 2009; Dho-Moulin & Fairbrother, 1999; Guabiraba & Schouler, 2015); è una problematica particolarmente sentita negli animali che presentano cicli produttivi lunghi, in quanto la malattia tende ad endemizzare e diviene quindi difficile da debellare (Camarda, 2009). Per il controllo dell'infezione, risultano fondamentali adeguate strategie di *management* aziendale volte a ridurre l'impatto dei fattori predisponenti la malattia, ma anche il ricorso all'utilizzo di trattamenti con antibiotici (Barnes et al., 2009; Camarda, 2009). Tuttavia, negli anni, si è assistito ad un incremento dell'isolamento di ceppi APEC con resistenze multiple nei confronti di vari classi di antimicrobici, che esita, di conseguenza, nella riduzione di efficacia dei trattamenti terapeutici e nella selezione dei ceppi resistenti (Sgariglia et al., 2019; Xu et al., 2019). In questo studio sono stati presi in considerazione 71 ceppi di *E. coli*, isolati da altrettanti episodi di malattia osservati in 32 diversi allevamenti intensivi di galline ovaiole distribuiti in 10 diverse regioni italiane (prevalentemente in Emilia Romagna), tra il 2018 ed il 2020. Nel 45% dei ceppi di *E. coli* è stato possibile identificare l'antigene somatico O; i sierogruppi più frequentemente isolati sono stati O2 (21%) e O88 (13%), che sono tra quelli maggiormente presenti in Europa (Schouler et al., 2012) e più frequentemente collegati a focolai di colibacillosi negli avicoli (Dho-Moulin & Fairbrother, 1999) mentre risultano differenti da quello isolato con maggior frequenza in Oriente (O78) (Xu

et al., 2019). Il sierogruppo O78, nel corso di questo studio, è stato identificato solo nel 6% dei casi, attestandosi con una prevalenza inferiore a quella attesa, in quanto, solitamente, questo sierogruppo risulta essere tra i più frequentemente isolati nel corso di colibacillosi aviare (Dho-Moulin & Fairbrother, 1999; Schouler et al., 2012). I restanti ceppi sono risultati appartenere al sierogruppi O1, O9, O45, O111. Il dato che emerge da questa valutazione, è l'estrema eterogeneità sierotipica degli *E. coli* e la cui prevalenza sembra dipendere dal singolo allevamento. Alla sierotipizzazione degli *E. coli* è stato associato lo studio dei fattori di virulenza eseguito con metodica biomolecolare. Alcuni autori hanno tentato di correlare il numero di geni di virulenza posseduti dai ceppi di *E. coli* e la possibilità di questi di causare patologia e hanno proposto che i ceppi debbano possedere almeno 5 geni di virulenza per essere considerati APEC (Rodriguez-Siek et al., 2005). Questa definizione deriva da studi epidemiologici sulla distribuzione di numerosi geni di virulenza effettuati su ceppi APEC e ceppi commensali enterici degli avicoli (*avian fecalis E. coli* - AFEC), con lo scopo di individuare un metodo biomolecolare rapido che possa aiutare nell'identificare gli APEC stessi (Cordoni et al., 2016; De Carli et al., 2015; Johnson et al., 2008). Nel presente studio, per la valutazione dei geni di virulenza è stato utilizzato un kit commerciale che ha permesso di evidenziare la presenza di 8 geni di virulenza. Nel 56% dei casi, i ceppi testati, sono risultati APEC sulla base della presenza di almeno 5 geni di virulenza. Questo dato è risultato maggiore rispetto a quello riscontrato in Centro Italia (31%) utilizzando lo stesso kit diagnostico (Sgariglia et al., 2019). Il gene di virulenza più frequentemente riscontrato è stato *iss* (90% dei casi), seguito da *iucD* (85%), *cvi/cva* (70%), *irp2* (70%) e *tsh* (63%). Il gene di virulenza riscontrato più raramente invece è stato *astA*, presente nel 6% dei ceppi analizzati, seguito da *papC* (14%) e *vat* (35%). Le prevalenze dei geni indagati, sono tendenzialmente simili a quelle riscontrate per gli stessi geni negli APEC isolati da episodi di colibacillosi del Centro Italia (Sgariglia et al., 2019). La distribuzione dei geni di virulenza nei due sierogruppi maggiormente rappresentati è tendenzialmente sovrapponibile per la presenza/assenza dei geni *astA*, *iss*, *cvi/cva*, *iucD* e *tsh*; si discostano invece in quanto il sierogruppo O2 presenta i geni *papC* e *vat*, che vengono a mancare nel sierotipo O88 e per la prevalenza del gene *irp2*, sempre presente nei ceppi appartenenti al sierogruppo O2 e presente solo nell'11% dei ceppi appartenenti al sierogruppo O88. Infine, tutti i ceppi appartenenti al sierogruppo O2 e solo un O88 sono risultati APEC secondo la definizione correlata alla presenza dei 5 geni di virulenza. Nel corso del presente studio gli *E. coli* sono stati testati nei confronti di 14 antibiotici. Tutti i ceppi sono risultati sensibili a ceftiofur e florfenicolo, invece sono risultati frequentemente resistenti all'acido nalidixico (49%) e all'ampicillina (38%). Altri studi hanno presentato risultati simili ma con tassi di resistenza più elevati (Bakhshi et al., 2017; Matin et al., 2017; Sgariglia et al., 2019; Shrestha et al., 2017; Subedi et al., 2018; Yang et al., 2004). Anche la resistenza alle tetracicline, nel presente studio, è risultata considerevole (24%), ma comunque inferiore a dati emersi nel corso di altri studi (Sgariglia et al., 2019; Vandemaële et al., 2002; Younis et al., 2017). La resistenza nei confronti di gentamicina e kanamicina non è risultata elevata (4%) e non si discosta tanto da quanto riscontrato in uno studio italiano del 2019 (Sgariglia et al., 2019), dato in contrasto con quanto riportato da altri autori che hanno registrato

tassi di resistenza maggiori (Yassin et al., 2017; Younis et al., 2017). La resistenza all'enrofloxacin è risultata bassa (1%), mentre in un recente studio italiano era risultata moderatamente alta (Sgariglia et al., 2019) e, ancor maggiore, in studi condotti in Oriente (Subedi et al., 2018; Yassin et al., 2017). La resistenza nei confronti di Trimethoprim/sulfonamidi si è attestata attorno al 6%, con un tasso nettamente inferiore a quanto riportato in altri studi (Sgariglia et al., 2019; Xu et al., 2019; Yassin et al., 2017). Nei confronti di amoxicillina/acido clavulanico il tasso di resistenza si è attestato al 13%, in linea con quanto riscontrato in Italia lo scorso anno (Sgariglia et al., 2019), mentre in altri studi la resistenza risulta essere decisamente maggiore (Younis et al., 2017) o nettamente inferiore (Yassin et al., 2017). I ceppi hanno mostrato una resistenza del 3% nei confronti della colistina, maggiore rispetto a quanto riportato in uno studio condotto in Medio Oriente (Bakhshi et al., 2017). I dati raccolti nel presente studio hanno dimostrato che i ceppi sono risultati poco resistenti (1%) all'azione di apramicina e aminosidina (4%), mentre per la cefalotina, è stata registrata una resistenza maggiore (13%). I sierogruppi O2 e O88 presentano due differenti profili di antimicrobico-resistenza. Il sierogruppo O2 è risultato nell'87% dei casi resistente all'acido nalidixico, mentre l'O88 risultava sensibile nei confronti di tale molecola. La resistenza nei confronti dell'ampicillina è risultata in entrambi i sierogruppi piuttosto elevata (33% in O2, 22% in O88), come anche quella nei confronti della tetraciclina (6% per O2, 11% per O88); il sierogruppo O2 presenta, inoltre una resistenza nei confronti di Trimethoprim/sulfonamidi, mentre il sierogruppo O88 all'aminosidina (11%). Dal presente studio emerge quindi un dato degno di attenzione, quale la totale sensibilità dei ceppi nei confronti di ceftiofur e la bassa resistenza nei confronti dell'enrofloxacin. Tali antimicrobici appartengono, infatti, rispettivamente alle cefalosporine di 3° generazione ed ai chinoloni, classi antimicrobiche di importanza critica anche per la salute umana e che pertanto devono essere sottoposte, in ambito veterinario, ad uso strettamente controllato. Il risultato ottenuto con i ceppi studiati è particolarmente incoraggiante anche in considerazione dei dati pubblicati dall'*European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC) nel 2019 e relativi ai tassi di antimicrobico-resistenza del triennio 2015-2018, che riportavano un *trend* in aumento delle resistenze a tali classi da parte degli *E. coli* (ECDC, 2019). Inoltre, dal presente studio emerge che il tasso di antimicrobico-resistenza è tendenzialmente inferiore a quello registrato in Paesi Orientali (Matin et al., 2017; Shrestha et al., 2017; Subedi et al., 2018; Xu et al., 2019; Yang et al., 2004) e si avvicina maggiormente ai dati ottenuti in uno studio Italiano del 2019, ma anche in questo caso i ceppi MDR sono minori nel presente studio (25%) rispetto a quanto riscontrato nel Centro Italia (40%) (Sgariglia et al., 2019). Tale differenza potrebbe essere giustificata dal fatto che nel presente studio la valutazione dell'antibiotico-resistenza si riferisce all'allevamento della gallina ovaioia, mentre lo studio condotto in Centro Italia considera diverse tipologie di allevamento e specie avicole (Sgariglia et al., 2019). Contrariamente a quanto accade in altri Paesi, nei quali l'utilizzo di antibiotici risulta ancora molto frequente (Matin et al., 2017; Shrestha et al., 2017; Subedi et al., 2018; Xu et al., 2019; Yang et al., 2004) il sistema di allevamento avicolo, ed in particolare quello della gallina ovaioia da consumo presente in Italia, nel corso degli ultimi anni è migliorato in termini di biosicurezza e *management* aziendale, con conseguente

riduzione dei trattamenti antimicrobici da cui sembra derivare un calo della pressione selettiva a cui questi microrganismi sono sottoposti. Lo studio statistico di correlazione tra i diversi parametri (geni di resistenza, sierotipo e resistenza agli antimicrobici) non ha permesso di evidenziare particolari associazioni e tali parametri sembrano essere più legati al singolo allevamento e, per quanto riguarda i tassi di antimicrobico-resistenza alle pratiche manageriali.

CONCLUSIONI

Lo studio dei ceppi APEC derivati da diverse tipologie di allevamento in termini biosicurezza e gestione aziendale in diverse aree geografiche, potrebbe permettere di comprendere come i ceppi di *Escherichia coli* evolvano nel tempo e dare quindi indicazioni sugli esiti derivanti dall'attuazione delle pratiche volte al miglioramento del *management* e dall'applicazione delle direttive sulla riduzione degli antimicrobici, aspetti fondamentali per gli allevatori e per gli organi competenti in Sanità Pubblica sul territorio, finalizzati alla pianificazione di azioni nell'ottica di un approccio *OneHealth*.

BIBLIOGRAFIA

1. Bakhshi, M., Fatahi Bafghi, M., Astani, A., Ranjbar, V. R., Zandi, H., & Vakil, M. (2017). Antimicrobial Resistance Pattern of *Escherichia coli* Isolated from Chickens with Colibacillosis in Yazd, Iran. *Journal of food quality and hazards control*, 4(3), 74–78.
2. Barnes, H. J., Nolan, L. K., & Vaillancourt, J. P. (2009). Colibacillosis. In *Diseases of Poultry* (12° Edizione, pagg. 691–737). J. M. Saif.
3. Camarda, A. (2009). Infezioni da *Escherichia Coli*. In *Manuale di Patologia Aviaria* (1° Edizione, pagg. 77–83). Le Point Veterinarie SRL.
4. CLSI VET01-A4: Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals; Approved Standard- Fourth Edition July 2013.
5. CLSI M100-S23 2013 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Teststing; Twenty-Third Informational Supplement January 2013.
6. CLSI M100-S25 2013 Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Teststing; Twenty-Fifth Informational Supplement January 2015.
7. Cordoni, G., Woodward, M. J., Wu, H., Alanazi, M., Wallis, T., & La Ragione, R. M. (2016). Comparative genomics of European avian pathogenic *E. Coli* (APEC). *BMC genomics*, 17(1), 960.
8. De Carli, S., Ikuta, N., Lehmann, F. K. M., da Silveira, V. P., de Melo Predebon, G., Fonseca, A. S. K., & Lunge, V. R. (2015). Virulence gene content in *Escherichia coli* isolates from poultry flocks with clinical signs of colibacillosis in Brazil. *Poultry Science*, 94(11), 2635–2640.
9. Dho-Moulin, M., & Fairbrother, J. M. (1999). Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Veterinary Research*, 30(2–3), 299–316.
10. ECDC, E. C. for D. P. and C. (2019). *Surveillance of antimicrobial resistance in Europe 2018—Annual report of the European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) 2018*.
11. Guabiraba, R., & Schouler, C. (2015). Avian colibacillosis: Still many black holes. *FEMS Microbiology Letters*, 362(15).

12. ISMEA, I. di S. per il M. A. Al. (2020a). Report ISMEA Tendenze avicoli: Panoramica sull'annata 2019. *Tendenze avicoli*.
13. Johnson, T. J., Wannemuehler, Y., Doetkott, C., Johnson, S. J., Rosenberger, S. C., & Nolan, L. K. (2008). Identification of Minimal Predictors of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Virulence for Use as a Rapid Diagnostic Tool. *Journal of Clinical Microbiology*, *46*(12), 3987–3996.
14. Matin, M. A., Islam, M. A., & Khatun, M. M. (2017). Prevalence of colibacillosis in chickens in greater Mymensingh district of Bangladesh. *Veterinary World*, *10*(1), 29–33.
15. OIE Manual 2012 Laboratory Methodologies for bacterial antimicrobial susceptibility testing.
16. Rodriguez-Siek, K. E., Giddings, C. W., Doetkott, C., Johnson, T. J., & Nolan, L. K. (2005). Characterizing the APEC pathotype. *Veterinary Research*, *36*(2), 241–256.
17. Schouler, C., Schaeffer, B., Brée, A., Mora, A., Dahbi, G., Biet, F., Oswald, E., Mainil, J., Blanco, J., & Moulin-Schouleur, M. (2012). Diagnostic Strategy for Identifying Avian Pathogenic *Escherichia coli* Based on Four Patterns of Virulence Genes. *Journal of Clinical Microbiology*, *50*(5), 1673–1678.
18. Sgariglia, E., Aconiti Mandolini, N., Napoleoni, M., Medici, L., Fraticelli, R., Conquista, M., Gianfelici, P., Staffolani, M., Fisichella, S., Capuccella, M., Sargenti, M., & Perugini, G. (2019). Antibiotic resistance pattern and virulence genes in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) from different breeding systems. *Veterinaria Italiana*, *55*(1), 26–33.
19. Shrestha, A., Bajracharya, A. M., Subedi, H., Turha, R. S., Kafle, S., Sharma, S., Neupane, S., & Chaudhary, D. K. (2017). Multi-drug resistance and extended spectrum beta lactamase producing Gram negative bacteria from chicken meat in Bharatpur Metropolitan, Nepal. *BMC Research Notes*, *10*(1), 574.
20. Subedi, M., Luitel, H., Devkota, B., Bhattarai, R. K., Phuyal, S., Panthi, P., Shrestha, A., & Chaudhary, D. K. (2018). Antibiotic resistance pattern and virulence genes content in avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) from broiler chickens in Chitwan, Nepal. *BMC veterinary research*, *14*(1), 113.
21. UNAITALIA, U. N. F. A. C. e U. (2020). Annata avicola 2019. *UNAITALIA Informa*. <https://www.unaitalia.com/mercato/annata-avicola/>
22. Vandemaele, F., Vereecken, M., Derijcke, J., & Goddeeris, B. (2002). Incidence and antibiotic resistance of pathogenic *Escherichia coli* among poultry in Belgium. *Veterinary Record*, *151*(12), 355–356.
23. VET-S2: Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated From Animals; Second Informational Supplement July 2013.
24. Xu, X., Sun, Q., & Zhao, L. (2019). Virulence Factors and Antibiotic Resistance of Avian Pathogenic *Escherichia coli* in Eastern China. *Journal of Veterinary Research*, *63*(3), 317–320.
25. Yang, H., Chen, S., White, D. G., Zhao, S., McDermott, P., Walker, R., & Meng, J. (2004). Characterization of Multiple-Antimicrobial-Resistant *Escherichia coli* Isolates from Diseased Chickens and Swine in China. *Journal of Clinical Microbiology*, *42*(8), 3483–3489.

26. Yassin, A. K., Gong, J., Kelly, P., Lu, G., Guardabassi, L., Wei, L., Han, X., Qiu, H., Price, S., Cheng, D., & Wang, C. (2017). Antimicrobial resistance in clinical *Escherichia coli* isolates from poultry and livestock, China. *PLOS ONE*, *12*(9), e0185326.
27. Younis, G., Awad, A., & Mohamed, N. (2017). Phenotypic and genotypic characterization of antimicrobial susceptibility of avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from broiler chickens. *Veterinary World*, *10*(10), 1167–1172.