MATERIALI E METODI

# *Identificazione di E. coli*

I 49 campioni conferiti sono stati sottoposti a esame batteriologico con semina su piastre di agar MacConkey e di agar sangue (Oxoid, Italia) e successiva incubazione in aerobiosi per 18 ± 2 ore a 37 ± 2° C. Le colonie sospette di *E. coli* sono state identificate morfologicamente (appaiono rosa su MacConkey e/o con emolisi su piastre di agar sangue) e colorazione di Gram. Per ogni caso/animale, è stata prelevata una colonia sospetta e seminata in BHI (Brain Heart Infusion) agar inclinato (Oxoid, Italia) e l’identificazione è stata condotta tramite il metodo biochimico API 20E (bioMérieux, Francia).

Per l'indagine ESBL (produttori di beta-lattamasi a spettro allargato), una colonia sospetta di *E. coli* è stata inoculata in 1 ml di brodo BHI con supplemento di 1 mg/L di cefotaxime per la fase di pre-arricchimento. In seguito ad incubazione *overnight*, una goccia di BHI brodo è stata seminata su agar MacConkey con supplemento di 1 mg/L di cefotaxime. I ceppi positivi sono stati identificati attraverso la crescita di colonie rosa-rosa scuro ed una di queste è stata prelevata per le successive analisi molecolari.

# *Analisi del gruppo filogenetico e caratterizzazione dei geni di resistenza (ESBL e MCR)*

Una singola colonia batterica per campione è stata risospesa in 250 μl di acqua DNasi-RNasi free e il DNA è stato estratto mediante lisi-ebollizione (98°C per 10 minuti). Il gruppo filogenetico di ciascun isolato è stato determinato attraverso una PCR multiplex che discrimina i sette gruppi principali (A, B1, B2, C, D, E o F) come descritto da Clermont et al. (2013).

La rilevazione dei geni di resistenza presenti negli isolati è stata eseguita utilizzando un pannello di reazioni PCR. I geni del gruppo CTX-M sono stati analizzati tramite PCR multiplex, la cui positività singola o multipla, identifica i cinque gruppi filogenetici principali: CTX-M1, CTX-M2, CTX-M9 e CTX-M8 e CTX-M25 (Woodford et al., 2006). Inoltre, singole reazioni PCR sono state utilizzate per il gene SHV (Arlet et al., 1997), il gene TEM (Mabilat et al., 1990), utilizzando primer universali come precedentemente descritto (Chang et al., 2001; Ahmed et al., 2007; Crémet et al., 2011; Gbonon et al., 2018) e geni AmpC (CMY-2, CMY-4, CMY -6, CMY-7, CMY-12, CMY-13, CMY-14, CMY-18, LAT-3) (Dierikx et al., 2010). La ricerca dei geni mcr (plasmid-mediated colistin resistance determinants), mcr-1, mcr-2, mcr-3, mcr-4 and mcr-5, è stata condotta tramite PCR multiplex come descritto da Rebelo et al. (2018).

RISULTATI

Su un totale di 49 ceppi conferiti, le analisi sono state condotte su 47 isolati dal momento che due di essi sono risultati inquinati. Dalle analisi molecolari è emersa una prevalenza di *E. coli* dell’85,10% (40/47) e del 14,89% (7/47) per *E. fergusonii* (Tabella 1). Rispetto alle analisi sui geni di resistenza, nei ceppi di *E. coli* è emersa una prevalenza dell’10,00% (4/40) per il gene TEM e del 2,50% (1/40) per SHV (Tabella 1). Rispetto a *E. fergusonii*, è stata riscontrata una prevalenza del 14,29% (1/7) per il gene SHV (Tabella 1).

Tabella 1: elenco dei ceppi e relativi risultati della caratterizzazione del gruppo filogenetico e dei geni di resistenza, ESBL e MCR.

|  |  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| **N°** | **GRUPPO FILOGENETICO** | **CTX-M** | **SHV** | **CMY** | **TEM** | **MCR** |
| **1** | A | N | N | N | N | N |
| **2** | A | N | N | N | N | N |
| **3** | F | N | N | N | N | N |
| **4** | A | N | N | N | N | N |
| **5** | F | N | N | N | N | N |
| **6** | *E. fergusonii* | N | N | N | N | N |
| **7** | A | N | N | N | **P** | N |
| **8** | A | N | N | N | N | N |
| **9** | A | N | N | N | N | N |
| **10** | A | N | N | N | N | N |
| **11** | F | N | N | N | N | N |
| **12** | *E. fergusonii* | N | **P** | N | N | N |
| **13** | A | N | N | N | N | N |
| **14** | D | N | N | N | N | N |
| **15** | A | N | N | N | N | N |
| **16** | *E. fergusonii* | N | N | N | N | N |
| **17** | A | N | N | N | N | N |
| **18** | A | N | N | N | N | N |
| **19** | A | N | N | N | N | N |
| **20** | A | N | N | N | **P** | N |
| **21** | A | N | N | N | N | N |
| **22** | F | N | N | N | N | N |
| **23** | A | N | N | N | N | N |
| **24** | A | N | N | N | N | N |
| **25** | F | N | N | N | N | N |
| **26** | F | N | N | N | N | N |
| **27** | *E. fergusonii* | N | N | N | N | N |
| **28** | F | N | N | N | N | N |
| **29** | A | N | N | N | N | N |
| **30** | A | N | N | N | **P** | N |
| **31** | A | N | N | N | N | N |
| **32** | A | N | N | N | N | N |
| **33** | A | N | N | N | N | N |
| **34** | F | N | N | N | N | N |
| **35** | A | N | N | N | N | N |
| **36** | *E. fergusonii* | N | N | N | N | N |
| **37** | A | N | N | N | N | N |
| **38** | A | N | **P** | N | N | N |
| **39** | A | N | N | N | N | N |
| **40** | B1 | N | N | N | **P** | N |
| **41** | A | N | N | N | N | N |
| **42** | - | - | - | - | - | - |
| **43** | A | N | N | N | N | N |
| **44** | A | N | N | N | N | N |
| **45** | E | N | N | N | N | N |
| **46** | A | N | N | N | N | N |
| **47** | *E. fergusonii* | N | N | N | N | N |
| **48** | *E. fergusonii* | N | N | N | N | N |
| **49** | - | - | - | - | - | - |

Dai risultati emersi la presenza del gene di resistenza TEM è quella più frequente per quanto riguarda *E. coli*, seguita da un unico caso per il gene SHV. Al contrario, per *E. fergusonii*,nonostante vada sottolineata la limitata numerosità del campione, l’unico gene di resistenza riscontrato è l’SHV.

***Bibliografia***

Ahmed AM, Motoi Y, Sato M, Maruyama A, Watanabe H, Fukumoto Y et al. Zoo Animals as Reservoirs of Gram-Negative Bacteria Harboring Integrons and Antimicrobial Resistance Genes. Appl Environ Microbiol (2007) 73:6686–6690. doi:10.1128/AEM.01054-07

Arlet G, Rouveau M, Philippon A. Substitution of alanine for aspartate at position 179 in the SHV-6 extended-spectrum β-lactamase. FEMS Microbiol Lett (1997) 152:163–167. [doi:10.1111/j.1574-6968.1997.tb10423.x](https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1997.tb10423.x)

Chang F-Y, Siu LK, Fung C-P, Huang M-H, Ho M. Diversity of SHV and TEM b-Lactamases in Klebsiella pneumoniae: Gene Evolution in Northern Taiwan and Two Novel b-Lactamases. SHV-25 and SHV-26. Antimicrob Agents Chemother (2001) 45:2407–2413. doi: 10.1128/AAC.45.9.2407–2413.2001

Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. Environ Microbiol Rep (2013) 5:58–65.

Crémet L, Caroff N, Dauvergne S, Reynaud A, Lepelletier D, Corvec S. Prevalence of plasmid-mediated quinolone resistance determinants in ESBL Enterobacteriaceae clinical isolates over a 1-year period in a French hospital. Pathol Biol (2011) 59:151-156.

Dierikx C, van Essen-Zandbergen A, Veldman K, Smith H, Mevius D. Increased detection of extended-spectrum β-lactamase producing Salmonella enterica and Escherichia coli isolates from poultry. Vet Microbiol (2010) 145:273–278.

Gbonon V, Afran SA, Guessennd KN, Toty AA, Diplo TFB, N’Guetta ASP et al. Detection of TEM and SHV Genes in Clinical Escherichia coli and Klebsiella pneumoniae Strains ESBL Isolated in Neonatology and Pediatric Units. Int J Microbiol Res (2018) 23(2): 1-7. MRJI.39354 ISSN: 2456-7043

Mabilat C, Goussard S, Sougakoff W, Spencer RC, Courvalin P. Direct sequencing of the amplified structural gene and promoter for the extended-broad-spectrum β-lactamase TEM-9 (RHH-1) of *Klebsiella pneumonia*. Plasmid (1990) 23:27–34.

Rebelo AR, Bortolaia V, Kjeldgaard JS, Pedersen SK, Leekitcharoenphon P, Hansen IM, Guerra B, Malorny B, Borowiak M, Hammerl JA, Battisti A, Franco A, Alba P, Perrin-Guyomard A, Granier SA, De Frutos Escobar C, Malhotra-Kumar S, Villa L, Carattoli A, Hendriksen RS. Multiplex PCR for detection of plasmid-mediated colistin resistance determinants, mcr-1, mcr-2, mcr-3, mcr-4 and mcr-5 for surveillance purposes. Euro Surveill. 2018;23(6):pii=17-00672. https://doi.org/10.2807/1560-7917.ES.2018.23.6.17-00672

Woodford N, Fagan EJ, Ellington MJ. Multiplex PCR for rapid detection of genes encoding CTX-M extended-spectrum (beta)-lactamases. J Antimicrob Chemother (2006) 57:154–5. [doi:10.1093/jac/dki412](https://doi.org/10.1093/jac/dki412)