

ANTIBIOTICO-RESISTENZA E INTEGRONI DI CLASSE 1 E 2 IN CEPPI DI *ESCHERICHIA COLI* ISOLATI DA SPECIE AVICOLE COMMERCIALI

Dotto G.¹, Giacomelli M.¹, Giovanardi D.², Franciosini M.³, Grilli G.⁴, Piccirillo A.¹

¹ Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione, Università degli Studi di Padova. Viale dell'Università, 16 - 35020, Legnaro (Padova).

² Laboratorio Tre Valli, Viale A. Veronesi, 5 - 37132 San Michele Extra (Verona).

³ Dipartimento di Scienze Biopatologiche ed Igiene delle Produzioni Animali e Alimentari, Università degli Studi di Perugia. Via San Costanzo, 4 - 06126 Perugia.

⁴ Dipartimento di Scienze Veterinarie e Sanità Pubblica, Università di Milano. Via Celoria, 10 - 20133 Milano.

Summary

A total of 355 *E. coli* were analyzed to determine the phenotypic and genotypic (*i.e.* class 1 and 2 integrons) antimicrobial resistance (AMR). Strains were tested by the disk diffusion method according to CLSI (2006) standard against 21 antimicrobial drugs belonging to 8 classes. Class 1 and class 2 integrons were detected by PCR as described by Lévesque *et al.* (1995) and White (2001), slightly modified. Gene cassettes content was characterized by DNA sequencing. Phenotypic AMR results were: 90.4% of isolates resistant to tetracycline, followed by 85.9% to ampicillin, 80.6% to doxycycline, 80.3% to triple sulphonamides, 74.4% to nalidixic acid, 67% to streptomycin, 63.9% to trimethoprim/sulfamethoxazole, 50.1% to cephalothin, 40.3% to chloramphenicol, 31% to enrofloxacin, 25.1% to amoxicillin/clavulanic acid, 24.5% to norfloxacin, 23.9% to ciprofloxacin, 16.9% to kanamycin, 16.1% to gentamicin, 15.2% to ceftiofur, 9% to cefotaxime, 5.1% to ceftazidime, 3.4% to apramycin, 2.8% to colistin, and 1.4% to florfenicol. Both class 1 and class 2 integrons were found: 36% of strains carried class 1 integrons, 9% class 2 integrons and 3.4% both classes. Gene cassettes were mainly *aadA*, *sat*, *dfrA* and their variants, alone or in combination; whereas *orfF* and *estX* genes were more rarely detected. These genes confer resistance to aminoglycosides (*i.e.* streptomycin, streptothricin, and spectinomycin) and trimethoprim. AMR and integrons seems to be common among *E. coli* from poultry. Integrons represent important contributors in the dissemination of AMR.

INTRODUZIONE

L'antibiotico-resistenza è il risultato di un complesso processo multifattoriale supportato da una serie di elementi genetici mobili capaci di veicolare e trasferire determinanti di resistenza. Il trasferimento orizzontale di materiale genetico tra batteri è un fenomeno particolarmente diffuso e piuttosto comune nell'ecologia dei batteri, soprattutto nei gram-negativi (Stokes & Hall, 1989). Esistono diverse strutture genetiche spesso tra loro correlate, in grado di promuovere l'acquisizione e il trasferimento tra batteri di *cluster* di geni di resistenza agli antimicrobici, in particolare plasmidi, trasposoni e integroni (Carattoli, 2001).

Gli integroni sono strutture genetiche in grado di acquisire, integrare ed esprimere geni contenuti in cassette mobili, definiti geni-cassetta. Ad oggi sono state

descritte molte cassette geniche codificanti resistenze verso diversi antimicrobici, in particolare aminoglicosidi, β -lattamici, trimethoprim e cloramfenicolo (Mazel, 2006). Queste strutture contengono tre componenti funzionali: i) il gene *intI*, che codifica per un enzima, l'integrasi, facente parte della famiglia delle tirosin-ricombinasi sito-specifiche che catalizza l'inserimento delle cassette geniche nel ii) sito di ricombinazione *attI*, e iii) un promotore responsabile dell'espressione dei geni-cassetta inseriti (Carattoli, 2001). In base alla sequenza del gene *intI* codificante per l'integrasi, si distinguono diverse classi di integroni, caratterizzate da differenze sia da un punto di vista strutturale che funzionale. Tuttavia, le classi più diffuse e meglio caratterizzate sono le prime due e sembrano essere quelle maggiormente coinvolte nella diffusione dell'antibiotico-resistenza tra batteri, sia gram-positivi, sia gram-negativi (Carattoli, 2001; Mazel, 2006).

Lo scopo del presente studio è di determinare i profili fenotipici e genotipici di antibiotico-resistenza di ceppi di *E. coli* commensali (AFEC) e patogeni (APEC) isolati da volatili d'allevamento, con particolare riguardo alla ricerca e caratterizzazione degli integroni di classe 1 e 2.

MATERIALI E METODI

Ceppi batterici

L'indagine è stata condotta su un totale di 355 ceppi di *Escherichia coli*, di cui 188 isolati da tacchini da carne (158 APEC e 30 AFEC), 110 da broiler (APEC) e 57 da galline ovaiole (31 APEC e 26 AFEC) provenienti da allevamenti avicoli industriali del Centro e Nord Italia, raccolti tra il 2008 e il 2012.

Determinazione dell'antibiotico-resistenza fenotipica

La valutazione della sensibilità alle molecole antimicrobiche è stata eseguita utilizzando il metodo di diffusione in piastra di Kirby-Bauer (1966), secondo la procedura raccomandata dal *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI). Sono state testate 21 molecole antimicrobiche appartenenti a 8 classi: aminoglicosidi (apramicina 15 μ g, APR; kanamicina 30 μ g, K; gentamicina 10 μ g, GM; streptomina 10 μ g, STR); fluorochinoloni (acido nalidixico 30 μ g, NA; ciprofloxacina 5 μ g, CIP; enrofloxacin 5 μ g, ENR; norfloxacina 10 μ g, NOR); tetracicline (doxiciclina 30 μ g, DO; tetraciclina 30 μ g, TET); sulfamidici potenziati (trisulfamidico 300 μ g, S3; sulfametossazolo + trimethoprim 25 μ g, SXT); fenicoli (cloramfenicolo 30 μ g, CAF; florfenicolo 30 μ g, FFC); penicilline (ampicillina 10 μ g, AM; amoxicillina + acido clavulanico 30 μ g, AMC); cefalosporine (cefalotina 30 μ g, CF; ceftiofur 30 μ g, CFT; cefotaxime 30 μ g, CTX; ceftazidime 30 μ g, CAZ); polimixine (colistina 10 μ g, CT). I risultati sono stati interpretati secondo i criteri stabiliti per le *Enterobacteriaceae* dal CLSI (CLSI, 2002, 2006, 2007) e dalla *Société Française de Microbiologie* (SFM, 2011), ad eccezione delle molecole APR ed ENO la cui valutazione è stata eseguita secondo i *breakpoint* forniti dalla ditta produttrice. La qualità è stata verificata utilizzando *E. coli* ATCC 25922 come controllo.

Estrazione del DNA

I campioni sono stati sottoposti a estrazione del DNA batterico utilizzando il kit commerciale *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche Diagnostics

Corporation, Marnes La Coquette, Francia), seguendo il protocollo indicato dalla ditta produttrice.

Rilievo degli integroni di classe 1 e 2

Il DNA di ogni campione è stato sottoposto ad amplificazione della regione variabile utilizzando i *primer* decritti rispettivamente da Lévesque *et al.* (1995) e White (2001). Le reazioni di amplificazione sono state eseguite nel termociclatore 2720 *Thermal Cycler* (Applied Biosystems, Monza, Italia) in un volume finale di 50 μ l. L'amplificazione è stata eseguita utilizzando la *High Fidelity Taq DNA polymerase* (Applied Biosystems). La miscela di reazione era composta da 1X *Buffer*, 0.2 mM di ciascun nucleotide trifosfato, 2 mM di $MgSO_4$, 0,5 μ M di ciascun *primer*, 1 U di *HF Platinum® Taq DNA polymerase* e 100 ng di DNA estratto. Il profilo di amplificazione prevedeva 40 ripetizioni del ciclo caratterizzato da una fase di denaturazione a 94°C per 30 secondi, una fase di *annealing* a 55°C per 30 secondi ed una di estensione a 68°C per 5 minuti, preceduto da una fase di attivazione dell'enzima a 94°C per 2 minuti e seguito da una post-estensione a 72°C per 5 minuti. A ogni reazione sono stati aggiunti un controllo positivo e un bianco di reazione. I prodotti di PCR sono stati separati mediante elettroforesi su gel di agarosio 1% (w/v) in *Buffer TBE 1X* (Tris 90 mM, acido borico 90 mM, EDTA 2 mM, pH 8) con l'aggiunta di 0.1 μ l/ml (v/v) di *SybrSafe™ TM DNA Gel Stain* (Invitrogen, San Giuliano Milanese, Italia). Le bande sono state visualizzate con il transilluminatore *Gel Doc™ XR* (BioRad, Segrate, Italia) e, per verificare le dimensioni degli amplificati, ad ogni corsa elettroforetica è stato aggiunto il marcatore di peso molecolare *DNA Ladder 100 bp* (Genespin, Milano, Italia).

Caratterizzazione dei geni cassetta

Prima di procedere al sequenziamento nucleotidico, i prodotti di PCR sono stati purificati utilizzando il kit commerciale *High Pure PCR Clean-up Micro Kit* (Roche Diagnostic Corporation) secondo le specifiche fornite dalla ditta produttrice e quindi sottoposti a corsa elettroforetica. Gli amplificati purificati sono stati sequenziati in entrambe le direzioni utilizzando il kit *BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1* (Applied Biosystems) secondo il protocollo descritto dalla ditta produttrice e gli stessi *primer* usati per l'amplificazione. I prodotti di reazione sono stati sottoposti a elettroforesi capillare con lo strumento *ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer* (Applied Biosystems). Gli elettroferogrammi delle sequenze ottenute sono stati letti separatamente e poi assemblati al fine di ottenere una sequenza consenso. L'analisi e l'assemblaggio dei cromatogrammi sono stati eseguiti utilizzando il *software ChromasPro*, v1.42 (Technelysium Pty Ltd., Tewantin, Australia). È stata poi eseguita una ricerca per similarità delle sequenze consenso con i dati disponibili in *Genbank* utilizzando il programma BLAST. In questo modo è stato possibile definire le cassette geniche contenute nella regione variabile di ciascun integrone.

RISULTATI

Profili di antibiotico-resistenza

Le resistenze più elevate sono state riscontrate nei confronti di tetracicline, sulfamidici, chinoloni di prima generazione e di alcuni β -lattamici e aminoglicosidi

(Tabella 1). Per quanto riguarda le tetracicline, il 90,4% dei ceppi è risultato resistente alla tetraciclina e l'80,6% alla doxiciclina. Livelli di resistenza simili sono stati riscontrati anche nei confronti dell'ampicillina (85,9%), del trisulfamidico (80,3%) e dell'acido nalidixico (74,4%). Anche se più contenute, sono state inoltre evidenziate resistenze nei confronti della streptomina (67%), del sulfametossazolo/trimetoprim (63,9%), della cefalotina (50,1%), del cloramfenicolo (40,3%) e dell'enrofloxacin (31%). Le sensibilità più elevate sono state invece riscontrate nei confronti del florfenicolo (91,8%) e della colistina (90,1%), della maggior parte degli aminoglicosidi (ad eccezione della streptomina) dove percentuali di ceppi del 49,6%, 80,3% e 96,1% hanno mostrato sensibilità alla kanamicina, alla gentamicina e all'apramicina, alle cefalosporine ceftazidime (91,5%), cefotaxime (77,2%) e ceftiofur (62,5%) e alla combinazione dell'amoxicillina con l'acido clavulanico (60,8%). Per quanto riguarda i chinoloni, invece, i livelli più elevati di sensibilità sono stati evidenziati nei confronti delle molecole di seconda generazione norfloxacin (69,9%) e ciprofloxacina (62%).

Presenza e caratterizzazione degli integroni di classe 1 e di classe 2

Il 36% dei campioni (128/355 ceppi) è risultato positivo agli integroni di classe 1, mentre il 9% (32/355 ceppi) alla classe 2. Di questi, 12 (3,4%) erano positivi ad entrambe le classi (Tabella 2). Le dimensioni delle regioni variabili erano comprese tra poche centinaia di basi (500-600 pb) e 2000 pb e le cassette geniche riscontrate più di frequente erano *aadA*, *sat*, *dfrA* e loro varianti, singole o in combinazione tra loro, codificanti rispettivamente per gli enzimi *dihydrofolate-reductase*, *aminoglycoside 3' adenylyltransferase* e *streptothricin acetyltransferase* responsabili della resistenza ad alcuni aminoglicosidi (streptomina, spectinomina e streptotricina) e al trimetoprim. Oltre a questi geni, sono state riscontrate, seppur in un numero limitato di ceppi, anche le cassette *orfF* ed *estX* codificanti per ipotetiche proteine la cui funzione tuttavia non è ancora conosciuta. È inoltre importante ricordare che gli integroni di classe 1 in quanto tali, presentano nella propria regione conservata CS3' il gene *sulI* codificante per l'enzima *dihydropteroate-synthase* che conferisce resistenza ai sulfamidici, il gene *qacEDI* responsabile della resistenza ai composti dell'ammonio quaternario e un *Open Reading Frame* (ORF5) la cui funzione è tuttavia ancora sconosciuta.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il fenomeno dell'antibiotico-resistenza rappresenta un problema per la sanità pubblica e la sua diffusione è attribuita principalmente alla capacità dei batteri di scambiarsi orizzontalmente materiale genetico attraverso plasmidi, spesso associati agli integroni (Sunde & Norstrom, 2006).

Questo studio è nato con l'obiettivo di definire i profili fenotipici e genotipici di antibiotico-resistenza, in particolare la presenza e la caratterizzazione degli integroni di classe 1 e 2 in *E. coli* isolati da volatili domestici campionati in Italia tra il 2008 e il 2012. La presenza degli integroni di classe 1 e 2 è stata riscontrata sia in ceppi AFEC, sia APEC isolati da tutte le specie avicole considerate, ad esclusione dei ceppi APEC delle galline ovaiole che sono risultati tutti negativi agli integroni di classe 2. Gli integroni di classe 1 sono stati riscontrati con una frequenza maggiore negli AFEC isolati dai tacchini da carne (63,3%), mentre gli integroni di classe 2 negli AFEC

isolati dalle galline ovaiole (34,7%). Il rilievo della presenza di integroni in un numero elevato di ceppi APEC e AFEC è in accordo con quanto riscontrato in letteratura. Diversi Autori, infatti, riportano la presenza di queste strutture, in percentuali variabili a seconda dell'origine anche geografica, sia in ceppi commensali che patogeni isolati sia in allevamento che da prodotti carnei di origine avicola (Bass *et al.*, 1999; Lanz *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2004; Sunde & Norstrom, 2006; Kim *et al.*, 2007; Smith *et al.*, 2007; Machado *et al.*, 2008; Khaita *et al.*, 2008; Trobos *et al.*, 2008; Zhang *et al.*, 2009; Jouini *et al.*, 2009). Anche la minor presenza di integroni di classe 2 rispetto a quelli di classe 1 è in linea con quanto riportato in letteratura. Infatti, queste strutture si riscontrano meno frequentemente rispetto agli integroni di classe 1 e solo pochi Autori riportano di ceppi positivi ad entrambe le classi (Fluit & Schmitz, 2004).

Per quanto riguarda gli integroni di classe 1 presenti nel corredo genetico dei ceppi AFEC isolati dai tacchini da carne e dalle galline ovaiole, le cassette geniche riscontrate con frequenza maggiore sono state le combinazioni dei geni *aadA* e *dfrA* (nelle varianti alleliche *dfrA1-aadA1* e *dfrA12-aadA2*), seguite da *dfrA12-orfF-aadA2* e singolarmente i geni *dfrA7* e *sat*. Questi geni, ad eccezione di *orfF* la cui funzione non è ancora nota, codificano per enzimi responsabili della resistenza alla streptomina, spectinomina, streptotricina e al trimethoprim. Anche gli integroni di classe 2 hanno presentato cassette geniche tra le più frequentemente riscontrate in letteratura, vale a dire *sat2*, *aadA1* e *dfrA1*.

Analogamente ai ceppi AFEC, la maggior parte degli integroni di classe 1 presenti nei ceppi di APEC isolati da tacchini e broiler hanno presentato la combinazione genica *dfrA-aadA* nelle varianti *dfrA1-aadA1*, *aadA5-dfrA17* e *aadA2-dfrA12*, seguita dalla cassetta genica *aadA* (*aadA1*, *aadA2*, *aadA5* e *aadA13*). Sei ceppi isolati da broiler e tacchini hanno invece presentato nella regione variabile dell'integrone il gene *sat* da solo o in combinazione con *aadA1*. Meno frequenti sono risultate le combinazioni *estX-aadA1* e *dfrA12-orfF-aadA2*. Nelle galline ovaiole, invece, era prevalente il gene *estX*. Questo riscontro è interessante, in quanto questo gene è stato spesso correlato agli integroni di classe 2, mentre solo raramente è stato associato a quelli di classe 1. Questo gene codifica per un'ipotetica esterasi o idrolasi la cui funzione non è ancora conosciuta. Tuttavia, dalla letteratura sembra esista una somiglianza con il gene *sat* responsabile della resistenza alla streptotricina (Partridge, 2005). Per quanto riguarda gli integroni di classe 2, le cassette geniche riscontrate sono state varie combinazioni dei geni *dfrA1*, *sat2* e *aadA1*. La presenza di un numero limitato di cassette geniche è in accordo con quanto riportato nella maggior parte degli articoli presenti in letteratura. Infatti, nonostante ad oggi siano state descritte in queste strutture moltissime cassette in grado di conferire resistenza a quasi tutte le classi di antimicrobici, i geni che si riscontrano più frequentemente negli integroni di classe 1 e 2 sono *dfrA* e *aadA* e *sat*, soprattutto per quanto concerne gli integroni di classe 2. Il numero e la tipologia delle cassette geniche riscontrate in queste strutture infatti è particolarmente limitata a causa di una ridotta capacità dell'integrasi di promuovere la loro inserzione nel sito di ricombinazione (Mazel, 2006).

In conclusione, questo studio fornisce un importante contributo in merito alla diffusione degli integroni in ceppi di *E. coli* isolati da avicoli domestici. Tuttavia, sono necessarie ulteriori indagini al fine di chiarire se queste specie avicole possono fungere da *reservoir* di determinanti genetici di antibiotico-resistenza e trasmetterli all'uomo.

BIBLIOGRAFIA

1. Bass L, Liebert CA, Lee MD, Summers AO, White DG, Thayer SG and JJ Maurer. (1999). Incidence and characterization of integrons, genetic elements mediating multiple-drug resistance, in avian *Escherichia coli*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43: 2925-2929.
2. Bauer AW, Kirby WMM, Sherris JC and M Turck. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Techn. Bull. Regist. Med. Technol.* 36: 493-496.
3. Carattoli A. (2001). Importance of integrons in the diffusion of resistance. *Vet. Res.* 32: 243-259.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute. (2002). Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard, 2nd edition. M31-A2, vol.22, no.6. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.
5. Clinical and Laboratory Standards Institute. (2006). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; approved Standard, 9th edition. M2-A9, vol. 26, no. 1. Clinical and Laboratory Standard Institute, Wayne, PA, USA.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute. (2007). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 17th informational supplement. M100-S17, vol. 26, no. 3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA.
7. Fluit AC and FJ Schmitz. (2004). Resistance integrons and super-integrons. *Clin. Microbiol. Infect.* 10: 272-288.
8. Jouini A, Ben Slama K, Saenz Y, Klibi N, Costa D, Vinué L, Zarazaga M, Boudabous A and C Torres. (2009). Detection of multiple-antimicrobial resistance and characterization of the implicated genes in *Escherichia coli* isolates from food of animal origin in Tunis. *J. Food Prot.* 72: 1082-1088.
9. Khaitsa ML, Oloya J, Doetkott D and R Kegode. (2008). Antimicrobial resistance and association with class 1 integrons in *Escherichia coli* isolates from turkey meat products. *J. Food Prot.* 71: 1679-84.
10. Kim TE, Jeong YW, Cho SH, Kim SJ and HJ Kwon. (2007). Chronological study of antibiotic resistances and their relevant genes in Korean Avian Pathogenic *Escherichia coli* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 45: 3309-3315.
11. Lanz R, Kuhnert P and P Boerlin. (2003). Antimicrobial resistance and resistance gene determinants in clinical *Escherichia coli* from different animal species in Switzerland. *Vet. Microbiol.* 91: 73-84.
12. Lévesque C, Piché L, Larose C and PH Roy. (1995). PCR Mapping of Integrons Reveals Several Novel Combinations of Resistance Genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 185-191.
13. Machado E, Coque TM, Cantón R, Sousa JC and L Peixe. (2008). Antibiotic resistance integrons and extended-spectrum β -lactamases among *Enterobacteriaceae* isolates recovered from chickens and swine in Portugal. *J. Antimicrob. Chemother.* 62: 296-302.
14. Mazel D. (2006). Integrons: agents of bacterial evolution. *Nature Reviews Microbiology* 4: 608-620.
15. Partridge SR. (2005). Correctly Identifying the Streptothricin Resistance Gene Cassette. *J. Clin. Microbiol.* 43: 4298-4300.

16. Smith JL, Drum DJ, Dai Y, Kim JM, Sanchez S, Maurer JJ, Hofacre CL and MD Lee. (2007). Impact of antimicrobial usage on antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* strains colonizing broiler chickens. *App. Environ. Microbiol.* 73: 1404-1414.
17. Stokes HW and RM Hall. (1989). A novel family of potentially mobile DNA elements encoding site-specific gene-integration functions: integrons. *Mol. Microbiol.* 3: 1669-1683.
18. Sunde M and M Norström. (2006). The prevalence of, associations between and conjugal transfer of antibiotic resistance genes in *Escherichia coli* isolated from Norwegian meat and meat products. *J. Antimicrob. Chemother.* 58: 741-747.
19. Trobos M, Jacobsen L, Olsen KE, Frimondt-Moller N, Hammerum AM, Pedersen K, Agerso Y, Porsbo LJ and JE Olsen. (2008). Prevalence of sulphonamide resistance and class 1 integron genes in *Escherichia coli* isolates obtained from broilers, broiler meat, healthy humans and urinary infections in Denmark. *Int. J. Antimicrob. Agents* 32: 367-369.
20. Yang H, Chen S, White DG, Zhao S, McDermott P, Walker R and J Meng. (2004). Characterization of Multiple-Antimicrobial-Resistant *Escherichia coli* isolates from diseased chickens and swine in China. *J. Clin. Microbiol.* 42: 3483-3489.
21. White PA, McIver CJ and WD Rawlinson. (2001). Integrons and gene cassettes in the *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 2658-2661.
22. Zhang XY, Ding LJ and J Yue. (2009). Occurrence and characteristic of class 1 and class 2 integrons in resistant *Escherichia coli* isolates from animals and farm workers in northeastern China. *Microb. Drug Resist.* 15: 323-328.

Classe	Principio attivo	Broiler			Tacchino			Gallina ovaioia			Totale		
		S	I	R	S	I	R	S	I	R	S	I	R
Aminoglicosidi	Apramicina 15 µg	95,5	0	4,5	95,7	1,1	3,2	96,5	1,8	1,8	96,1	0,6	3,4
	Gentamicina 10 µg	73,6	8,2	18,2	80,3	1,6	18,1	93,0	1,8	5,3	80,3	3,7	16,1
	Streptomycina 10 µg	14,5	22,7	62,7	11,2	11,7	77,1	28,1	31,6	40,4	14,9	18	67
	Kanamycina 30 µg	43,6	20	20	47,3	36,2	16,5	68,4	19,3	12,3	49,6	33,5	16,9
Cefalosporine	Cefalotina 30 µg	19,1	21,8	59,1	17,6	34	48,4	26,3	33,3	40,4	19,4	30,4	50,1
	Cefotaxime 30 µg	66,4	20	13,6	85,1	7,4	7,4	71,9	22,8	5,3	62,5	22,3	15,2
	Ceftiofur 30 µg	56,4	25,5	18,2	65,4	20,7	13,8	66,7	21,1	12,3	77,2	13,8	9
	Ceftazidime 30 µg	87,3	7,3	5,5	95,2	1,6	3,2	87,7	1,8	10,5	91,5	3,4	5,1
Penicilline	Ampicillina 10 µg	18,2	2,7	79,1	4,3	1,1	94,7	21,1	10,5	68,4	11	3,1	85,9
	Amoxicillina + Acido Clavulanico 30 µg	73,6	16,4	10	46,3	14,4	39,4	84,4	8,8	7,0	60,8	14,1	25,1
Chinoloni e Fluorochinoloni	Acido nalidixico 30 µg	20	1,8	78,2	23,9	1,6	74,5	29,8	3,5	66,7	23,7	2,0	74,4
	Enrofloxacinina 5 µg	24,5	21,8	53,6	40,4	43,6	16	52,6	10,5	36,8	37,5	31,5	31
	Ciprofloxacina 5 µg	51,8	9,1	39,1	67,6	19,7	12,8	63,2	5,3	31,6	62	14,1	23,9
	Norfloxacinina 10 µg	53,6	8,2	38,2	80,3	4,8	14,9	66,7	3,5	29,8	69,9	5,6	24,5
Sulfamidici	Sulfametossazolo +Trimethoprim 25 µg	36,4	0	63,6	29,3	1,1	69,7	50,9	3,5	45,6	34,9	1,1	53,9
	Triplo-sulfamidico 300 µg	2,7	0,9	76,4	13,3	4,3	82,4	14,0	3,5	82,5	16,6	3,1	80,3
Tetracicline	Tetraciclina 30 µg	12,7	0	87,3	3,7	1,6	94,7	8,8	0	91,2	8,7	0,8	90,4
	Doxiciclina 30 µg	14,5	10	75,5	4,3	10,1	85,6	7,0	17,5	75,4	8,7	10,7	80,6
Fenicoli	Cloramfenicolo 30 µg	44,5	4,5	50,9	66	3,2	30,9	38,6	8,8	52,6	54,9	4,8	40,3
	Florfenicolo 30 µg	92,7	7,3	0	89,9	7,4	2,7	96,5	3,5	0	91,8	6,8	1,4
Polimixine	Colistina 10 µg	85,5	9,1	5,5	92,6	6,9	0,5	86,0	8,8	5,3	90,1	7	2,8

Tabella 1. Percentuali di ceppi di *E. coli* risultati sensibili (S), intermedi (I) e resistenti (R) alle molecole antimicrobiche testate, isolati da broiler, tacchini e galline ovaiole.

Tabella 2. Presenza di integroni di classe 1 e 2 e cassette geniche dei ceppi di *E. coli* isolati da tacchini, broiler e galline ovaiole.

Specie	Ceppi <i>E. coli</i>	Integroni classe 1		Integroni classe 2		Integroni classe 1 e 2		Cassette geniche	
		N°	%	N°	%	N°	%	<i>Int1</i>	<i>Int2</i>
Tacchini	158 APEC	48/188	30,4	14/188	8,9	3/188	2	<i>aadA1</i> (19/48) <i>aadA13</i> (1/48) <i>dfrA1, aadA1</i> (25/48) <i>dfrA12, aadA2</i> (2/48) <i>estX, aadA1</i> (1/48)	<i>dfrA1, aadA1</i> (5/14) <i>sat2, aadA1</i> (1/14) <i>dfrA1, sat2, aadA1</i> (8/14)
	30 AFEC	19/30	63,3	2/30	6,7	1/30	3,3	<i>dfrA7</i> (1/19) <i>sat</i> (parziale) (1/19) <i>dfrA1, aadA1</i> (11/19) <i>dfrA12, aadA2</i> (1/19) <i>dfrA12, orfF</i> (parziale) (1/19) <i>dfrA12, aadA2, orfF</i> (parziale) (3/19) <i>dfrA12, aadA2, orfF</i> (1/19)	<i>sat2, aadA1</i> (2/2)
	188 Totale	67/188	35,6	16/188	8,5	4/188	2,1		
	Broiler	110 APEC	43/110	39	7/100	6,4	4/110	3,6	<i>aadA1</i> (13/43) <i>aadA2</i> (1/43) <i>aadA5</i> (1/43) <i>dfrA7</i> (1/43) <i>sat</i> (2/43) <i>sat</i> (parziale) (2/43) <i>dfrA1, aadA1</i> (19/43) <i>dfrA17, aadA5</i> (1/43) <i>estX, aadA1</i> (1/43) <i>sat2, aadA1</i> (1/43) <i>dfrA12, orfF, aadA2</i> (1/43)
Galline ovaiole	31 APEC	11/31	35,5	0/31	0	0/31	0	<i>aadA1</i> (2/11) <i>estX</i> (8/11) <i>dfrA1, aadA1</i> (1/11)	
	26 AFEC	6/26	23	9/26	34,7	4/26	15,4	<i>aadA1</i> (3/6) <i>dfrA1, aadA1</i> (3/6)	<i>sat2, aadA1</i> (5/9) <i>dfrA1, sat2, aadA1</i> (4/9)
Totale	355	128	36	32	9	12	3,4		