

## BATTERI ENTEROPATOGENI E ANTIBIOTICO-RESISTENZA NEL GABBIANO REALE (*Larus michahellis*)

Russo T.P.<sup>1</sup>, Dipineto L.<sup>1</sup>, Borrelli L.<sup>1</sup>, Varriale L.<sup>1</sup>, Pace A.<sup>1</sup>, Minichino A.<sup>1</sup>, Pompameo M.<sup>2</sup>, Menna L.F.<sup>1</sup>, Santaniello A.<sup>1</sup>, Fioretti A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali, Università degli Studi di Napoli Federico II, via F. Delpino 1, 80137 Napoli (NA), Italia;

<sup>2</sup> Presidio Ospedaliero Veterinario, ASL Napoli 1 Centro, strada Comunale del Principe 13a, 80145 Napoli (NA), Italia

### Summary

The yellow-legged gull (*Larus michahellis*) is an omnivorous and opportunistic species that feeds in natural habitats, such as seashores, lakes, and rivers, as well as in farmlands and urban surroundings. Large gulls (*Larus* sp.) are often implicated in the dissemination of several enteric diseases, mainly due to their large population size and their exploitation of landfills. This study was aimed at estimating the role of yellow-legged gull as a potential reservoir of *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and *Yersinia* spp. and at evaluating the antimicrobial resistance of isolated strains. A total of 225 yellow-legged gulls, recovered at the public Wildlife Rescue and Rehabilitation Centre of University of Naples Federico II, were analysed. Enteropathogenic bacteria were isolated from 96/225 (42.67%) gulls examined. In particular, *Campylobacter* spp. was isolated from 60/225 (26.67%) birds and identified as *C. coli* (36/60; 60%) and as *C. jejuni* (24/60; 40%). *Salmonella* spp. was isolated from 3/225 samples (1.33%), and all strains were identified as *Salmonella arizonae*. STEC were recovered in 30/225 (13.3%) samples and serotyped as *E. coli* O128 (40%), O26 (30%), O157 (20%) and O11 (10%); *Yersinia* spp. was never isolated.

All isoaltes exhibited antimicrobial resistance to several molecules, including critically important antimicrobials (i.e. quinolones, tetracyclines) and multidrug resistance. Our results highlight the importance of yellow-legged gulls as potential reservoirs of pathogenic and resistant strains and their role in the maintenance and transmission of these bacteria in the environment, with potential implications for public health.

### INTRODUZIONE

Il gabbiano reale zampegiale (o gabbiano reale mediterraneo) (*Larus michahellis*) è considerato un animale opportunisto in grado di adattarsi a differenti tipi di ambiente. La popolazione italiana del gabbiano reale, così come in molti altri paesi del mediterraneo, ha subito un forte incremento durante la seconda metà del 1900. La popolazione nidificante, stimata in 24.000-27.000 coppie nidificanti nel 1983, ha raggiunto 45.000-60.000 coppie all'inizio del 2000, mostrando un aumento del 58-125%. Tale incremento sembrerebbe legato prevalentemente a due fattori: la diminuzione della persecuzione diretta dell'uomo sulle colonie di gabbiani e l'aumento delle risorse trofiche legate alle attività antropiche (Serra et al., 2016). In aggiunta, diversi report considerano questi volatili dei potenziali vettori di alcuni agenti patogeni nonché ospiti di mantenimento di batteri antibioticoresistenti

(Franklin et al., 2020) come riportato da diverse indagini condotte in differenti paesi europei (Moore et al., 2002; Stedt et al, 2014; Migura and Garcia et al., 2017; Moré et al., 2017; Barguigua et al., 2019). Tuttavia, sono presenti pochi studi analoghi effettuati in Italia su questa tematica. La presente indagine, pertanto, è stata condotta con l'obiettivo di esaminare il ruolo del gabbiano come potenziale vettore di agenti zoonotici nonché come potenziale reservoir di ceppi antibioticoresistenti. Nello specifico, questo studio ha focalizzato l'attenzione sulle popolazioni di gabbiano reale zampegiale nella città di Napoli al fine di valutare la prevalenza di *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Escherichia coli* produttori di shigatossine e *Yersinia* spp., e di stimarne la relativa antibioticoresistenza.

## MATERIALI E METODI

### *Campionamento*

Durante il periodo Aprile/Luglio del quadriennio 2016-2019, sono stati esaminati 225 gabbiani reale zampegiale provenienti dal Centro di Recupero Animali Selvatici dell'Università Federico II di Napoli. I volatili venivano campionati al momento del loro arrivo al Centro dove veniva eseguito, su ciascuno di essi, un tampone cloacale. I tamponi venivano inoculati in phosphate-buffered saline (PBS) e trasportati a +4°C al laboratorio del Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali dell'Università di Napoli Federico II.

### *Isolamento e identificazione batterica*

I campioni sono stati processati al fine di isolare *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp., *Escherichia coli* produttori di shigatossine (STEC) e *Yersinia* spp. In particolare, per ciascun batterio, una aliquota (100 µl) di PBS veniva utilizzata per l'isolamento mediante tecniche colturali. L'identificazione è stata eseguita mediante PCR e tecniche sierologiche. Gli isolati di *Salmonella* spp. sono stati tipizzati dal Centro di referenza nazionale e Laboratorio di referenza OIE per le salmonellosi (IZSVe).

### *Antibiogramma*

Tutti i ceppi venivano sottoposti ad antibiogramma mediante la tecnica di diffusione in agar (Kirby-Bauer) seguendo i criteri descritti dal Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). I ceppi di *Campylobacter* spp. venivano testati nei confronti di azitromicina (AZM 15 µg), ciprofloxacina (CIP 5 µg), cloramfenicolo (CHL 30 µg), doxiciclina (DO 30 µg), eritromicina (E 15 µg), enrofloxacina (ENR 5 µg), gentamicina (CN 10 µg), acido nalidixico (NA 30 µg) e tetraciclina (TE 30 µg). *Salmonella* e STEC venivano testati nei confronti di ampicillina (AMP 10 µg), amoxicillina (AMO 30 µg), amoxicillina-clavulanato (AMC 20+10 µg), apramicina (APR 40 µg), ceftazidime (CAZ 30 µg), ciprofloxacina (CIP 5 µg), cloramfenicolo (CHL 30 µg), colistina solfato (10 µg), doxiciclina (DO 30 µg), enrofloxacina (ENR 5 µg), gentamicina (CN 10 µg), acido nalidixico (NA 30 µg) streptomina (S 10 µg), sulfonamide (S3 300 µg), tetraciclina (TE 30 µg) e sulfamethoxazolo-trimethoprim (SXT 1,25+23,75 µg). Per tutti i ceppi, gli aloni di inibizione venivano misurati e valutati come sensibili, intermedi e resistenti seguendo i criteri CLSI ed EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing). Al fine di valutare la presenza di batteri ESBL (Extended

Spectrum Beta-Lactamase), tutti i ceppi venivano anche sottoposti al combination disk diffusion test, usando cefpodoxime (CPD; 10 µg; Oxoid), cefpodoxime/acido clavulanico (CD; 10/1 µg; Oxoid), e ETEST® ESB (ESBL CT/CTL 16/1; bioMérieux).

## RISULTATI

I risultati ottenuti hanno evidenziato la presenza di batteri enteropatogeni in 96/225 [42,67%; 95% intervallo di confidenza (IC) = 36,38–49,2 %] gabbiani esaminati. Non sono state registrate coinfezioni (tabella 1).

*Campylobacter* spp. è stato isolato da 60/225 (26,67%; 95% IC = 21.38- 32.80%) campioni. Tra questi, 36/60 (60%) venivano identificati come *C. coli* e 24/60 (40%) come *C. jejuni*. Tutti i *Campylobacter* testati risultavano sensibili al cloramfenicolo e alla gentamicina. Le maggiori percentuali di resistenza venivano registrate per la tetraciclina (62,5% per *C. jejuni* e 52,78% per *C. coli*), ciprofloxacina (37,5% e 33,3%) e per l'acido nalidixico (37,5% e 27,7%).

In particolare, 9/36 (25%) *Campylobacter coli* erano resistenti alla tetraciclina e ciprofloxacina, 3/36 (8,3%) alla tetraciclina, ciprofloxacina ed eritromicina, e 3/36 (8,3%) era anche resistente all'acido nalidixico e all'azitromicina; 6/24 (25%) *Campylobacter jejuni* erano resistenti all'azitromicina, ciprofloxacina e tetraciclina, 4/24 (33,3%) all'eritromicina e 2/24 (8,3%) erano anche resistenti all'acido nalidixico.

*Salmonella* spp. veniva isolata da 3/225 (1,33%; 95% IC = 0,0045 – 0,0384 %) campioni; tutti i ceppi sono stati sierotipizzati come *Salmonella arizonae* e 2/3 (66,6 %) risultava resistente alla sulfonamide.

*E. coli* produttori di shigatossine venivano isolati da 30/225 (13.3%; 95% IC = 9.5 – 18.3%) gabbiani e sierotipizzati come *E. coli* O128 (n=12; 40%), *E. coli* O26 (n=9; 30%), *E. coli* O157 (n=6; 20%) ed *E. coli* O11 (n=3; 10%). Come evidenziato dalla PCR, il 100% dei ceppi veicolava i geni *stx1*, *stx2* ed *eae*. Tutti gli STEC erano sensibili al cloramfenicolo. Le maggiori percentuali di resistenza si registravano per la tetraciclina (56,6%), seguita dalla ampicillina (50%) e poi dalla ciprofloxacina (33,3%). Undici (36.6%) STEC isolati erano resistenti alla tetraciclina e all'ampicillina e 4 erano resistenti anche all'enrofloxacin. Il 6,67% dei 30 STEC isolati mostravano resistenza alla tetraciclina, ampicillina e sulfamethoxazolo-trimethoprim. Due (6,67%) *E. coli* O26 erano positivi al test ESB. I campioni processati per *Yersinia* spp. risultavano costantemente negativi.

## DISCUSSIONE

Sono stati condotti diversi studi sulla prevalenza di batteri enteropatogeni nei gabbiani con risultati eterogenei dovuti anche alle diverse specie di gabbiani esaminati. Nella nostra indagine, *Campylobacter* spp. veniva isolato da 60/225 volatili e *C. coli* risultava la specie predominante. Tali risultati si discostano da quelli rilevati in studi simili dove il ceppo di *Campylobacter* spp. maggiormente isolato risultava *C. jejuni* (Moré et al. 2017; Migura-Garcia et al. 2017; Broman et al. 2002). Per quel che concerne l'antibioticoresistenza, le più alte percentuali sono state registrate nei confronti di tetraciclina (56,6%), ciprofloxacina (35%), acido nalidixico (31,67%) ed enrofloxacin (30%). Inoltre, il 22% dei *Campylobacter* spp. isolati mostrava anche fenomeni di multiresistenza (*i.e.* resistente a 3 o più

classi di antibiotici). Questi risultati si discostano da quelli ritrovati in altri paesi in cui non si evidenziava resistenza all'eritromicina né tantomeno multiresistenza (Moré et al., 2017; Migura-Garcia et al., 2017). Nella nostra indagine, *Salmonella* spp. è stata isolata nel 1,33% dei campioni esaminati, evidenziando alti tassi di sensibilità agli antibiotici testati. Tali risultati sono notevolmente più bassi di altri studi in cui la prevalenza di *Salmonella* oscilla dal 30% al 60% (Moré et al., 2017; Migura-Garcia et al., 2017) con alti tassi di antibioticoresistenza. Le discordanze tra i nostri risultati con quelli degli altri studi consultati potrebbero essere legate alle differenti specie di gabbiani esaminate e alle diverse circostanze geografiche così come alle loro condizioni di vita, alle abitudini di foraggiamento, e all'eventuale approvvigionamento da discariche di rifiuti.

In merito agli isolamenti di *E. coli*, i ceppi isolati dalla presente indagine veicolavano tutti i geni *stx1*, *stx2*, codificanti la produzione di shigatossine e il gene *eae*, collegato alla patogenicità. Inoltre, il 76,6% degli isolati era resistente ad almeno 2 antibiotici e 9 ceppi mostravano resistenza ad almeno 3 antibiotici. Le maggiori percentuali di resistenza si registravano nei confronti di tetraciclina e ampicillina in linea con gli studi condotti da Barguigua et al. (2010) e Stedt et al. (2014). In aggiunta, sebbene *Yersinia* spp. non sia mai stata isolata nella presente indagine, quando isolata nel gabbiano, da studi analoghi, ha mostrato sempre bassa patogenicità e virulenza (Niskanen et al., 2003) ponendo al minimo il potenziale rischio per la salute pubblica.

In conclusione, il presente studio conferma il gabbiano come potenziale vettore e diffusore di batteri enteropatogeni con differenti gradi di antibioticoresistenza. Ciò risulta di particolare rilievo nelle zone costiere delle città urbanizzate in cui la popolazione di gabbiani è in continua crescita e laddove tali volatili potrebbero entrare in stretto contatto con l'uomo.

## BIBLIOGRAFIA

1. Barguigua A, Rguibi Idrissi H, Nayme K, Timinouni M. (2019). Virulence and Antibiotic Resistance Patterns in *E. coli*, Morocco. *Ecohealth*. 16(3):570-575.
2. Broman T, Palmgren H, Bergström S, Sellin M, Waldenström J, Danielsson-Tham ML, Olsen B. (2002). *Campylobacter jejuni* in black-headed gulls (*Larus ridibundus*): prevalence, genotypes, and influence on *C. jejuni* epidemiology. *J Clin Microbiol*. 40(12):4594-4602.
3. Franklin AB, Ramey AM, Bentler KT, Barrett NL, McCurdy LM, Ahlstrom CA, Bonnedahl J, Shriner SA, Chandler JC. (2020). Gulls as Sources of Environmental Contamination by Colistin-resistant Bacteria. *Sci Rep*. 10(1):4408.
4. Migura-Garcia L, Ramos R, Cerdà-Cuellar M. (2017). Antimicrobial Resistance of *Salmonella* Serovars and *Campylobacter* spp. Isolated from an Opportunistic Gull Species, Yellow-legged Gull (*Larus michahellis*). *J Wildl Dis*. 53(1):148-152.
5. Moore JE, Gilpin D, Crothers E, Canney A, Kaneko A, Matsuda M. (2002). Occurrence of *Campylobacter* spp. and *Cryptosporidium* spp. in seagulls (*Larus* spp.). *Vector Borne Zoonotic Dis*. 2(2):111-114.
6. Moré E, Ayats T, Ryan PG, Naicker PR, Keddy KH, Gaglio D, Witteveen M, Cerdà-Cuellar M. (2017). Seabirds (Laridae) as a source of *Campylobacter* spp., *Salmonella* spp. and antimicrobial resistance in South Africa. *Environ*

- Microbiol. 19(10):4164-4176.
7. Niskanen T, Waldenström J, Fredriksson-Ahomaa M, Olsen B, Korkeala H. (2003). *virF*-positive *Yersinia pseudotuberculosis* and *Yersinia enterocolitica* found in migratory birds in Sweden. *Appl Environ Microbiol.* 69(8):4670-4675.
  8. Serra L, Andreotti A, Kirov D, Nardelli R, Nissardi S, Pirrello S, Popov D, Sadooul N, Volponi S, Zucca C. (2016). Guidelines for management of the breeding populations of the Yellow-legged Gull *Larus michahellis* in the salt pans and coastal wetlands of the Mediterranean Project LIFE10NAT/IT/000256. ISPRA, Manuali e Linee Guida 144/2016.
  9. Stedt J, Bonnedahl J, Hernandez J, McMahon BJ, Hasan B, Olsen B, Drobni M, Waldenström J. (2014). Antibiotic resistance patterns in *Escherichia coli* from gulls in nine European countries. *Infect Ecol Epidemiol.* 4:21565.