

Caractérisation de la résistance aux antibiotiques et identification des gènes de résistance de souches d' *Escherichia coli* entéropathogènes (EPEC) du lapin en Italie

A.G. PERUGINI¹, A. CERRONE¹, F. AGNOLETTI², E. MAZZOLINI³,
D. FENIZIA¹, M. BARTOLI¹, G. CATTOLI⁴, L. BANO², F. CAPUANO¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Via Salute, 80055 Portici (Na), Italie

²Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Laboratorio di Treviso, Viale Brigata Treviso 13/A, 31100 Treviso, Italie

³Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Laboratorio di Udine, Via Della Roggia 100, 33030 Campoformido (UD), Italie

⁴Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Laboratorio di Virologia, Viale dell'Università 10, 35020 Legnaro (PD), Italie

Résumé. L'évolution de la résistance aux antibiotiques concerne la plupart des bactéries responsables des infections les plus courantes. Aujourd'hui l'analyse génétique des bactéries révèle une fréquence relativement importante des gènes de résistance à beaucoup des antibiotiques utilisés en médecine humaine et vétérinaire. Dans la présente étude, la sensibilité phénotypique aux antibiotiques et la détection génotypique des résistances ont été analysées chez 198 souches REPEC (Rabbit enteropathogenic *Escherichia coli*), isolées en Italie. Ces souches ont aussi été caractérisées par la présence des gènes *eae*, *AF/R1* ou *AF/R2*, codants pour des facteurs de virulence typiquement associés aux *E. coli* entéropathogènes.

Abstract- Characterization of resistance patterns and detection of resistance genes in *Enteropathogenic Escherichia coli* (EPEC) isolates from rabbits in Italy. The dissemination of antibiotic resistance genes among bacterial strains is an increasing problem in infectious diseases. The use of antimicrobials in any venue, including growth promotion in veterinary medicine, can potentially lead to widespread dissemination of antimicrobial-resistant bacteria. In this research, after the analysis of 198 REPEC (Rabbit enteropathogenic *Escherichia coli*) strains for specific virulence factors, such as intimin and fimbriae, which participate in the pathogenesis of the bacterium, the antimicrobial susceptibilities and the carriage of some resistance genes by these isolates have been examined.

Introduction

L'utilisation des antibiotiques en médecine vétérinaire a considérablement amélioré l'état sanitaire des animaux, mais la facilité de cette utilisation a déterminé la sélection de bactéries résistantes et l'augmentation de leurs multirésistances.

La caractérisation moléculaire des mécanismes de résistance aux antibiotiques a mis en évidence l'existence de structures génétiques mobiles qui jouent un rôle très important dans la dissémination des résistances : les plasmides, les intégrons et les transposons.

Même si les nouveaux moyens de la biologie moléculaire permettent de détecter la résistance aux antibiotiques, la technique de l'antibiogramme reste encore la méthode de référence ; c'est pourquoi les phénotypes de résistance ont été analysés chez 198 souches d'EPEC isolées de lapins. On a utilisé la PCR pour évaluer non seulement la présence des gènes *eae*, *AF/R1* ou *AF/R2*, mais aussi celle d'un petit groupe de gènes de résistance à quelques antibiotiques utilisés en médecine vétérinaire (aminosides, sulfonamides, triméthoprim).

1. Matériel et méthodes

Entre 1999 et 2005, 198 souches d' *E. coli* entéropathogènes ont été isolées du contenu intestinal après autopsie de lapins soumis pour diagnostic. Les souches isolées provenaient des lapins avec diarrhée.

1.1. Identification et caractérisation des bactéries et étude de la sensibilité aux antibiotiques

Les échantillons de contenu intestinal ont été ensemencés sur gélose MacConkey, et incubés à 37°C pendant 24h. La caractérisation biochimique a été réalisée sur galerie API 20ESystem (bioMérieux, Marcy l'Etoile, France).

La sensibilité aux différents antibiotiques a été étudiée par diffusion en gélose Mueller-Hinton (Oxoid LTD, Basingstoke, England), selon la méthode des disques sur boîtes de Pétri stériles (Bauer *et al.*, 1996), selon les NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1999, 2001) pour : triméthoprim-sulfaméthoxazole, énoxacin, fluméquin, norfloxacin, quinolones (Gen III), sulfate de colistine, pénicilline G, amoxicilline, tétracyclines (doxycycline et oxytétracycline), gentamicine, néomycine, aminosidine, apramycine, tilmicosine, tylosine, céfalotine et céfopérazone.

Tableau 1: résultats de l'analyse phénotypique des souches étudiées (Nombre et % de souches identifiées en fonction de la sensibilité aux antibiotiques testés)

Antibiotique	1999-2001			2002-2005		
	S	I	R	S	I	R
Triméthoprine-sulfaméthoxazole	61(49,6)	3 (2,4)	59 (48,0)	16 (26,7)	13 (21,7)	31 (51,0)
Enoxacine	78(75,0)	20 (19,2)	6 (5,77)	12 (24,0)	12 (24,0)	26 (52,0)
Fluméquine	66(53,6)	36 (29,3)	21 (17,1)	5 (12,2)	18 (43,9)	26 (63,4)
Norfloxacin	84(98,9)	0 (0,0)	1 (1,1)	-	-	-
Quinolone(GenIII)	-	-	-	2 (18,2)	8 (72,7)	1 (9,1)
Sulphate de colistine	42(34,2)	61 (49,6)	20 (16,1)	53 (91,4)	3 (5,2)	2 (3,4)
Pénicilline g	0 (0,0)	0 (0,0)	110 (100)	0 (0,0)	0 (0,0)	12 (100)
Amoxicilline	53(62,4)	3 (3,5)	29 (34,1)	36 (75)	4 (8,3)	8 (16,7)
Doxycycline	5 (5,1)	5 (5,1)	88 (89,8)	2 (3,3)	1 (1,7)	57 (95)
Oxytétracycline	7(5,7)	0 (0,0)	116 (94,3)	0 (0,0)	0 (0,0)	61 (100)
Gentamicine	60(48,8)	12 (9,8)	51 (41,4)	5 (8,2)	6 (9,8)	50 (82)
Néomycine	13(10,6)	25 (20,3)	85 (69,1)	32 (53,3)	19 (31,7)	9 (15)
Aminosidine	69(60,5)	21 (18,4)	24 (21,1)	51 (83,6)	0 (0,0)	10 (16,4)
Apramycine	84(68,3)	8 (6,5)	31 (25,2)	9 (14,8)	2 (3,3)	50 (81,9)
Tilmicosine	4 (3,3)	10 (8,3)	107 (88,4)	7 (14,9)	4 (8,5)	36 (76,6)
Tylosine	0 (0,0)	0 (0,0)	101(100)	1 (2,9)	0 (0,0)	33 (97,1)
Céfalotine	4 (4,7)	14 (16,5)	67 (78,8)	-	-	-
Céfopérazone	-	-	-	48 (98,0)	1(2,0)	0 (0,0)

S= souches sensibles à l'antibiotique

I= souches de sensibilité intermédiaire à l'antibiotique

R= souches résistantes à l'antibiotique

-antibiotique non testé

Tableau 2: Nombre et (%) d'isolats positifs (PCR) pour différents gènes de résistance, parmi les isolats avec phénotype de résistance

Antibiotique	Gène de résistance	1999-2001	2002-2005
(Stx*) <u>triméthoprine+</u> <u>sulfaméthoxazole</u>		(n=59)	(n=31)
	dhfrI	26 (44,07)	0 (0)
	dhfrV	1 (1,7)	0 (0)
	dhfrVII	20 (33,9)	6 (19,35)
	dhfrIX	19 (32,2)	22 (70,97)
	dhfrXIII	2 (3,39)	1 (3,23)
	Sul 1	42 (71,19)	11 (35,5)
	Sul 2	32 (54,24)	22 (71,0)
Gentamicine		(n=51)	(n=50)
	aac(3)-IV	20 (39,22)	44 (88,0)
	aadB	8 (15,69)	5 (10,0)
	aaaC2	0 (0)	0 (0)
Néomycine (et kanamycine)		(n=85)	(n=9)
	aphA1	3 (3,53)	1 (11,11)
	aphA2	1 (1,18)	2 (22,22)
	aadB	0 (0)	0 (0)
Apramycine		(n=31)	(n=50)
	aac(3)-IV	17 (54,84)	45 (90,0)

(Stx : triméthoprine + sulfaméthoxazole)

Chaque souche a été caractérisée et analysée pour la présence des facteurs de virulence (intimine et fimbriae), correspondant à différents gènes sur l'ADN, par PCR.

1.2. PCR

En bref, les isolats, obtenus sur gélose McConkey (ou comparable), ont été bouillis dans 0,2 mL d'eau distillée stérile, puis centrifugés à 13000 rpm pendant 5 minutes. Les surnageants ont été utilisés pour la recherche, dans chaque souche, des gènes de pathogénicité *eae* (Oswald *et al.*, 2000), AF/R1 et AF/R2 (Penteado *et al.*, 2002), et des gènes de résistance pour les aminosides *aadB*, *aaaC2*, *aac* (3)-IV, *aphA1* *aphA2*, pour le triméthoprim, *dhfrI*, *dhfrV*, *dhfrVII*, *dhfrIX*, *dhfrXIII*, (Mathew *et al.*, 2003; Maynard *et al.*, 2004), et pour les sulfonamides *sul1* et *sul2* (Grape *et al.*, 2003).

2. Résultats

Les résultats sur la sensibilité aux antibiotiques *in vitro* sont résumés dans le tableau 1.

L'analyse moléculaire détecte que parmi les souches analysées, identifiées par le biotypage, 65,2 % sont positives au gène *eae* et, parmi celles-ci, 88,4 % sont positives pour AF/R2 et, de façon surprenante, 11,6 % positives pour AF/R1. Les souches positives, toutefois, ont été isolées à partir d'un seul élevage.

Les isolats révèlent une fréquence élevée de la présence des gènes *sul2* (55%) et *sul1* (43%), aussi bien que des gènes *dhfrIX* (45%) et *aac*(3)-IV (3%).

La distribution des gènes de résistance parmi les souches résistantes au test sur gélose est résumée dans le tableau 2.

3. Discussion

Les EPEC représente un groupe important de pathogènes étudiés chez le lapin. Les souches associées à des poussées épidémiques de diarrhée chez des lapereaux nouveau-nés, lapereaux avant sevrage ou après sevrage, ont été isolées et identifiées par (sérotypage.)biotypage.

La pathogénicité des EPEC est caractérisée par l'adhérence aux cellules épithéliales de l'intestin (par les *fimbriae*), l'attachement intime aux cellules épithéliales (garanti par la protéine EAE ou intimine), la colonisation de l'intestin grêle et du gros intestin, l'effacement des microvillosités des entérocytes, la dégénérescence des cellules épithéliales et l'infiltration des neutrophiles polymorpho-nucléaires dans la *lamina propria*.

Les résultats de l'analyse phénotypique sur la sensibilité aux antibiotiques effectuée sur les souches de REPEC isolées en Italie sont conformes aux résultats de l'analyse moléculaire effectuée à partir de l'ADN pour évaluer la présence des gènes de résistance aux mêmes antimicrobiens.

En effet, les souches non sensibles sont caractérisées par la présence, au niveau chromosomique, du gène de résistance pour l'antibiotique testé et, au contraire,

les souches sensibles à un antibiotique sont caractérisées par l'absence du gène de résistance.

Cependant, il y a quelques cas, peu nombreux, caractérisés par une apparente discordance entre les deux typologies de résultats ; par exemple, une souche sensible au test *in vitro*, peut être positive à la PCR, pour le gène de résistance ou, au contraire, une souche résistante au test sur gélose, peut être négative au test moléculaire.

Le premier cas peut être expliqué si on considère la possibilité d'une mutation du gène ou de la région de régulation de l'activation transcriptionnelle, qui empêche, par exemple, la production de l'enzyme nécessaire à la manifestation du phénotype de résistance.

L'absence du gène de résistance, dans l'ADN d'une souche ayant le phénotype de résistance, au contraire, peut être expliquée si on considère qu'on a analysé seulement un petit groupe de gènes responsables de la résistance à tous les antibiotiques testés. L'ADN des souches isolées, en effet, a été testé pour la présence de 5 gènes *dhfr*, alors que la résistance au triméthoprim peut être associée aussi à d'autres gènes (Yu *et al.*, 2004).

Conclusion

La présence d'*Escherichia coli* non seulement entéropathogènes, mais aussi résistants, ou multirésistants, aux antibiotiques peut être considérée comme dangereuse, surtout si on considère la diffusion possible des gènes de résistance parmi la population de bactéries de l'«écosystème» intestinal.

Pour évaluer l'existence possible de multirésistances, dans les souches d'EPEC isolées, on doit compléter le 'screening' moléculaire sur les souches déjà caractérisées, pour identifier, autant que possible, le(s) gène(s) de résistance aux antibiotiques utilisés en cuniculture.

Références

- BAUER, A.W., KIRBY, W.M., SHERRIS, J.C., TURCK M., 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45, 493-496.
- GRAPE M., SUNDSTROM L., KRONVALL G., 2003. Sulphonamide resistance gene *sul3* found in *Escherichia coli* isolates from human sources *J. Antimicrob. Chemother.*, 52(6), 1022 – 1024.
- MATHEW A.G., ARNETT D.B., CULLEN P., EBNER P.D., 2003. Characterization of resistance patterns and detection of apramycin resistance genes in *Escherichia coli* isolated from swine exposed to various environmental conditions. *Int. J. Food Microbiol.*, 89, 11-20.
- MAYNARD C., BEKAL S., SANSCHAGRIN F., LEVESQUE R.G., BROUSSEAU R., MASSON L., LARIVIÈRE S., AND HAREL J., 2004. Heterogeneity among virulence and antimicrobial resistance gene profiles of extraintestinal *Escherichia coli* isolates of animal and human origin. *J. Clin. Microbiol.*, 42: 5444-5452.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, 1999. Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Test for Bacteria isolated from Animals Approved Standard M31A, vol. 19, No.11. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.

- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, 2001. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing M100-S11, vol. 21, No.1. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA
- LARIVIÈRE S., HAREL J., 2004. Heterogeneity among virulence and antimicrobial resistance gene profiles of extraintestinal *Escherichia coli* isolates of animal and human origin. *J. Clin. Microbiol.*, 42(12), 5444-5452.
- OSWALD, E., SCHMIDT H., MORABITO S., KARCH H., MARCHES O., CAPRIOLI A., 2000. Typing of intimin genes in human and animal enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*: characterization of a new intimin variant. *Infect. Immun.*, 68, 64–71.
- PENTEADO A.S., UGRINOVICH L.A., BLANCO J., BLANCO M., BLANCO J.E., MORA A., ANDRADE J.R.C., CORRÊA .S.S., PESTANA DE CASTRO A.F., 2002. Serotypes and virulence genes of *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy rabbits in Brazil. *Vet. Microbiol.*, 89: 41-51.
- YU H.S., LEE J.C., KANG H. Y., JEONG Y.S., LEE E.Y., CHOI C.H., TAE S.H., LEE Y.C., CHO D.T., 2004. Prevalence of *dhfr* genes associated with integrons and dissemination of *dhfrA17* among urinary isolates of *Escherichia coli* in Korea. *J. Antimicrob. Chemother.*, 53, 445-450.