

## COMUNICAZIONE 10

### IDENTIFICAZIONE DI *HELICOBACTER* IN SPECIE AVIARI CON METODICHE BIOMOLECOLARI

C. Tramuta, S. Buttignol, E. Bert, P. Nebbia

Dipartimento di Produzioni animali, Epidemiologia ed Ecologia - Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Torino

Parole chiave, *Helicobacter*, galline ovaiole, Polymerase chain reaction, sequenziamento.

#### ***Helicobacter* spp. identification in avian species using biomolecular assay**

Key Words: *Helicobacter* spp., laying hens, Polymerase chain reaction, sequencing

Summary: A PCR assay to detect *Helicobacter* spp. in avian species was carried out. The 16S rRNA gene was amplified with primers specific for members of the genera *Helicobacter*. A total of 10 laying hens were tested and 8 cecal samples resulted positive for *Helicobacter* spp. presence. Sequencing showed the bacteria to belong to the *H. pullorum* species.

Correspondence: Nebbia Patrizia, Dipartimento di Produzioni animali, Epidemiologia ed Ecologia, Sezione di Malattie infettive-Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Torino, Via Leonardo da Vinci n°44, 10095 Grugliasco (Torino). E-mail: patrizia.nebbia@unito.it

#### **Introduzione**

Gli *Helicobacter* spp. colonizzano lo stomaco e l'intestino dell'uomo e di molti animali, mammiferi e uccelli. Rivestono grande importanza nella medicina umana, in particolare *H. pylori* è notoriamente associato a gastriti, ulcere e tumori epatici, mentre in medicina veterinaria sono soprattutto i carnivori domestici a presentare infezione da questi microrganismi, la cui presenza è associata a patologie gastrointestinali (9). In particolare negli ultimi anni è stato oggetto di studio il potere patogeno di alcune specie di *Helicobacter* dette enteroepatiche. Simili alle specie gastriche, sono responsabili di infiammazioni croniche e neoplasie e possono colonizzare le vie biliari e il fegato (9).

Nei volatili sono state isolate fino ad oggi due specie di *Helicobacter*: *H. pametensis* (isolato da feci di uccelli selvatici) (3,8) e *H. pullorum*, isolato dai ciechi di polli, fegato e contenuto intestinale di galline ovaiole (1,10). Il potere patogeno di queste specie è tuttora sconosciuto, ma in base alle analogie con i *Campylobacter* si è ipotizzato che *H. pullorum* possa rappresentare una minaccia di zoonosi per l'uomo, essendo stato isolato in uomini con diarrea (1,4).

Alcuni fattori rendono difficoltosa la diagnosi: l'infezione è quasi sempre subclinica, l'esame batteriologico è difficile da allestire sia per le particolari esigenze culturali di questi batteri sia per la presenza della flora gastroenterica, che ostacola la crescita in purezza del germe. Per questi motivi molti studi sono stati condotti per ottenere metodi rapidi, accurati, alternativi alla coltura, per mettere in evidenza gli *Helicobacter* in individui infetti (2,5,7).

In questo studio, condotto su galline ovaiole, abbiamo messo a punto una metodica che permette di identificare, a partire da organo, differenti specie di *Helicobacter*. Si tratta di un lavoro preliminare sulla ricerca di *Helicobacter* in diverse specie animali.

#### **Materiali e metodi**

**Campioni.** Sono stati prelevati campioni da 10 galline ovaiole morte, provenienti da un allevamento semintensivo situato nella Provincia di Torino.

Sui soggetti veniva effettuata l'autopsia. Dal fegato e dagli intestini (ciechi e duodeno), che presentavano lesioni necrotico-emorragiche, venivano prelevati campioni per l'estrazione del DNA.

**Estrazione del DNA.** Veniva eseguita dai campioni di fegato, duodeno, ciechi e dal contenuto cecale. Per l'estrazione è stato usato il *Wizard genomic DNA*

*purification kit*<sup>®</sup> (Promega-USA). Sui campioni ottenuti è stata eseguita la quantificazione del DNA mediante spettrofotometro. **Controllo interno** è stata eseguita una PCR con primers universali per la 16S rRNA (5) per verificare la qualità dell'estrazione.

**Amplificazione di una sequenza interna al gene rRNA 16S di *Helicobacter* genus.** Per l'amplificazione sono stati utilizzati i primers pubblicati da Beckwith (2). Primer sense: CTATGACGGGTATCCGGC, primer antisense: ATTCCACCTACCTCTCCCA che amplificano una porzione di 375 paia di basi. La reazione di amplificazione avveniva alle seguenti temperature: denaturazione 94°C per 2 secondi, appaiamento 53°C per 2 secondi, allungamento 72°C per 30 secondi, per 45 cicli.

Per evidenziare gli amplificati veniva eseguita una corsa elettroforetica su gel d'agarosio al 2,5%, con successiva colorazione in bromuro d'etidio.

**Sequenziamento:** cinque campioni positivi alla PCR venivano purificati con il QIAquick PCR Purification Kit (Quiagen-USA) e sequenziati con ABI prism 310 Genetic Analyzer<sup>®</sup> (ABI-USA).

#### **Risultati**

L'estrazione del DNA dagli organi con la metodica da noi utilizzata risultava valida. Allo spettrofotometro si rilevava un quantitativo medio di DNA di 40µg/µl con un valore di purezza di 1,9 (OD260/OD280). Tutti i campioni sono risultati positivi alla PCR con i primers universali.

Sul totale delle 10 galline esaminate, 8 erano positive alla ricerca di *Helicobacter* genus.

La ricerca dell'*Helicobacter* ha dato risultati differenti secondo i campioni di partenza: nei ciechi si è potuta rilevare la maggior parte dei positivi; la metà dei campioni ottenuti dal contenuto cecale era positiva; la totalità dei campioni da duodeno e quasi tutti campioni estratti da fegato risultavano negativi (fig. 1).

Il sequenziamento dei prodotti di PCR risultati positivi alla ricerca di *Helicobacter* ha permesso di identificare gli amplificati come appartenenti alla specie *H. pullorum*, con un e-value di e-142 e un'identità del 99% alla ricerca su Blast-n (NCBI). Con gli stessi valori, l'allineamento evidenziava *H. canadensis*.

#### **Discussione**

E' risaputo che la quantità di DNA estratto dipende dal protocollo usato e dal tipo di matrice ed è possibile che a partire da campioni come feci, contenuto cecale, fegato, la presenza di inibitori infici i risultati della PCR. Abbiamo quindi eseguito un'amplificazione sul

DNA estratto dai diversi organi con i primers universali, dimostrando la presenza di DNA amplificato in tutti i campioni in esame. Questo dato è importante anche per il proseguo del nostro lavoro, in cui intendiamo ricercare *Helicobacter* spp. nelle feci di animali in vita.

Con la PCR per il genere *Helicobacter* abbiamo osservato la presenza di questo microrganismo soprattutto a livello dei ciechi, il che fa ritenere che vi sia un maggior tropismo verso quest'organo rispetto a fegato e duodeno.

Le sequenze da noi ottenute sono risultate sovrapponibili a quelle della regione 16S rRNA di *H. pullorum* e di *H. canadensis*. Poiché *H. canadensis* non risulta al momento essere mai stato isolato negli animali, ma solo nell'uomo (dati non pubblicati) abbiamo ritenuto corretto identificare le nostre sequenze come appartenenti a *H. pullorum*.

L'identificazione di una sola specie di *Helicobacter* inoltre concorda con i dati bibliografici, che vedono in *H. pullorum* il principale agente infettante nel pollo (3,4,8). La percentuale di positività (80%) a *H. pullorum* riscontrata nel nostro campione corrisponde a quella ottenuta da Atabay e collaboratori (1) a partire da carcasse di polli. Come suggerito da questi autori, riteniamo che, analogamente a quanto osservato per *Campylobacter jejuni*, *H. pullorum* dovrebbe essere maggiormente considerato quale potenziale causa di patologie gastrointestinali negli animali e nell'uomo.

In conclusione riteniamo utile proseguire questa indagine su volatili sia d'allevamento sia da compagnia per ottenere ulteriori dati sull'infezione da *H. pullorum* e per identificare eventuali altre specie di *Helicobacter*.

## Bibliografia

1. Atabay, H.I., J.E. Corry, S.L. On. (1998). Identification of unusual *Campylobacter*-like isolates from poultry products as *Helicobacter pullorum*. J. Appl. Microbiol., 84: 1017-1024
2. Beckwith C.S., Franklin C.L., Hook R.R.Jr, Besch-Williford C.L., Riley L.K. (1997). Fecal PCR assay for diagnosis of *Helicobacter* infection in laboratory rodents. J. Clin. Microbiol., 35:1620-1623.
3. Dewhirst, F.E., C. Seymour, G.J. Fraser, B.J. Paster, J.G. Fox. (1994). Phylogeny of *Helicobacter* isolates from bird and swine feces and description of *Helicobacter pametensis* sp. nov. Int. J. Syst. Bacteriol., 44:553-560.
4. Fox J.G., Chien C.C., Dewhirst F.E., Paster B.J., Shen Z., Melito P.L., Woodward D.L., Rodgers F.G. (2000) *Helicobacter canadensis* sp. Nov. isolated from human with diarrhea as an example of an emerging pathogen. J. Clin. Microbiol., 38:2546-2549.
5. Gramley W.A., A. Asghar, H.F. Frierson Jr, and S.M. Powell. (1999) Detection of *Helicobacter pylori* DNA in fecal samples from infected individuals. J. Clin. Microbiol., 37: 2236-2240
6. Park C.S., J. Kim. (1999). Rapid and easy detection of *Helicobacter pylori* by in situ hybridization. J. Korean Med. Sci., 14: 15-20
7. Seymour C., Lewis R.G., Kim M., Gagnon D.F., Fox J.G., Dewhirst F.E., Paster B.J. (1994). Isolation of *Helicobacter* strains from wild bird and swine feces. Appl. Environ. Microbiol., 60:1025-1028.
8. Solnick J.V., Schauer D.B. (2001) Emergence of diverse *Helicobacter* species in the pathogenesis of gastric and enterohepatic diseases. Clin. Microbiol. Rew., 14:59-97.
9. Stanley J., Linton D., Burnens A.P., Dewhirst F.E., On S.L., Porter A., Owen R.J., Costas M. (1994). *Helicobacter pullorum* sp. nov.- genotype and phenotype of a new species isolated from poultry and from human patients with gastroenteritis. Microbiology, 140:3441-3449.

Figure 1. Presenza di *H. pullorum* nei diversi organi  
Figure 1: presence of *H. pullorum* on different organs

