

COMUNICAZIONE 21

DIAGNOSI BATTERIOLOGICA E BIOMOLECOLARE DELLA COLIBACILLOSI NEL POLLO

D. Giovanardi¹, E. Campagnari¹, R. L. Sperati¹, G. Ortali², V. Furlattini², P. Pesente¹

¹Laboratorio Tre Valli. San Martino Buon Albergò, Verona

²AIA S.p.A. San Martino Buon Albergò, Verona

Parole chiave: APEC, fattori di virulenza, PCR

Bacteriological and biomolecular diagnosis of poultry colibacillosis

Keywords: APEC, virulence factors, PCR

Summary: The authors describe 13 cases of colibacillosis in Italy in seven breeder flocks and 7 cases in seven broiler flocks coming from three of them. The most significant lesions were peritonitis in breeders and omphalitis in broiler chicks. *Escherichia coli* was isolated from all the clinical cases and PCR was used to identify the virulence factors fimbriae type 1, type P, aerobactin and Tsh. These factors could give further information on the pathogenicity of the isolated *E.coli*.

Correspondence: Davide Giovanardi - Laboratorio Tre Valli, Corte Pellegrina, 3; 37036 - San Martino Buon Albergò, Verona
Email: davide.giovanardi@AIA-spa.it

Introduzione

La colibacillosi è una delle principali cause di mortalità negli allevamenti avicoli con alte perdite economiche. I ceppi patogeni di *Escherichia coli* aviari (APEC, Avian Pathogenic *Escherichia coli*) causano una varietà di lesioni come polisierosite, aerosacculite, pericardite, peritonite, salpingite, sinovite, osteomielite e infezioni del sacco vitellino (4). La via di infezione più comune è quella respiratoria frequentemente seguita da setticemia (6). Sebbene *E.coli* sia presente nella normale microflora ambientale e del tratto intestinale del pollo, certi ceppi esprimono uno o più fattori di virulenza in grado di causare malattia (4). Storicamente la patogenicità dei ceppi APEC è stata ricercata mediante tipizzazione sierologica del ceppo isolato in quanto, a seconda degli autori, i sierotipi più frequentemente riscontrati (O1, O2, O78) erano presenti nel 15-61% dei casi di colibacillosi (1).

Negli ultimi anni sono state approfondite le conoscenze sui fattori di virulenza degli APEC dimostrando come essi utilizzino differenti meccanismi di azione rispetto agli *E.coli* responsabili delle forme enteriche dei mammiferi.

Tra i fattori di virulenza maggiormente studiati e documentati in bibliografia vi sono: le fimbrie di tipo 1 (3), il Tsh (Temperature-sensitive haemoagglutinin) (2), le fimbrie di tipo P e il sistema aerobactina (5).

Le fimbrie di tipo 1 e il Tsh sono dei fattori di adesione in grado di permettere la colonizzazione degli APEC alla trachea (fimbrie) ed ai sacchi aerei (Tsh).

La resistenza, nel torrente circolatorio, all'azione del complemento e alla fagocitosi macrofagica, è conferita dalle fimbrie di tipo P e dai lipopolisaccaridi capsulari (LPS). Il sistema aerobactina permette a *E.coli* di acquisire il ferro libero ematico che altrimenti non sarebbe presente in concentrazione sufficiente per la sua sopravvivenza.

La biologia molecolare ha individuato le sequenze geniche di questi fattori di virulenza e, con il presente lavoro, si intende caratterizzare con PCR (Polimerase Chain Reaction) la loro distribuzione in alcuni allevamenti del nord Italia considerando il loro valore diagnostico a supporto di quello fornito dalla batteriologia tradizionale.

Materiali e metodi

Campionamento

Durante il periodo Marzo 2003-Giugno 2003 sono stati presi in considerazione 20 casi clinici di colibacillosi: tredici casi in sette allevamenti di riproduttori (a, b, c,

d, e, f, g) e sette casi in sette allevamenti di broiler di età compresa tra uno e sette giorni di cui cinque casi provenienti dal riproduttore b, 1 caso proveniente da c, 1 caso proveniente da g. Inoltre, si è provveduto a testare la progenie di ogni riproduttore per la presenza di *E.coli* nel sacco vitellino di uova beccate non schiuse.

Isolamento batteriologico

L'isolamento di *E.coli* è stato ottenuto su EMB (Eosin Methylene Blue) agar (Oxoid) incubando le piastre per 24 ore a 37°C; l'identificazione è stata effettuata tramite le correnti tecniche biochimiche. La tipizzazione sierologica è stata eseguita con antisieri O1:K1, O2:K2 e O78:K80 (V.L.A. Weybridge).

Indagine biomolecolare

PCR Per l'analisi biomolecolare *E.coli* è stato propagato in terreno liquido EC (Difco) per 12 ore a 37°C. La ricerca dei fattori di virulenza è stata eseguita mediante PCR estraendo il DNA di *E.coli* con DNAzol (Invitrogen) e utilizzando primers specifici per la ricerca dei geni *fimC* (fimbrie tipo 1), *iucD* (aerobactina), *tsh* e *papC* (fimbrie tipo P) (4).

Risultati e discussione

Lesioni anatomopatologiche

Le lesioni anatomopatologiche, rilevate in sede necroscopica, erano in tutti i casi clinici riconducibili a peritonite, periepatite, aerosacculite toracica e, nei broiler, anche a pericardite e onfalite.

Isolamento batteriologico e sierotipizzazione

In totale sono stati isolati e tipizzati 103 ceppi di *Escherichia coli* dei quali 64 (62%) da visceri di riproduttori e broiler (rispettivamente 30% e 32%) e 39 (38%) dagli embrioni delle uova beccate non schiuse. Nella tabella 1 sono indicati in dettaglio le matrici organiche dove *E.coli* è stato isolato.

Tabella 1 Distribuzione *E.coli* isolato da visceri di riproduttori e broiler.

Table 1: Distribution of *E.coli* isolated from viscera in breeders and broiler chicks

| | Cer | S.aer | Peric | S.vit | Feg | Mil | Ova |
|------|-----|-------|-------|-------|-----|-----|-----|
| Rip. | 23% | 48% | 0% | 0% | 7% | 10% | 10% |
| Bro. | 30% | 0% | 18% | 49% | 3% | 0% | 0% |

Legenda: Cer=cervello; S.aer=sacco aereo; Peric=pericardio; S.vit=sacco vitellino; Feg=fegato; Mil=milza; Ova=ovaio.

Dalla tabella 1 notiamo come la maggior parte di *E.coli* siano stati isolati da sacchi aerei (riproduttori) e da

sacco vitellino (broiler). La maggioranza degli *E.coli* risultavano essere sierologicamente non tipizzabili (58%), i restanti erano O78 (32%) e O2 (10%). In tabella 2 è specificata la distribuzione, in percentuale, dei sierotipi di *E.coli* isolati da visceri e uova beccate.

Tabella 2, Distribuzione sierotipi *E.coli*
Table 2. *E.coli* serotypes distribution

| Sierot. <i>E.coli</i> | O78 | NT | O2 |
|-----------------------|-----|------|-----|
| Cervello | 70% | 30% | 0% |
| S.aereo | 13% | 74% | 13% |
| S.vitellino | 75% | 25% | 0% |
| Pericardio | 83% | 17% | 0% |
| Ovaio | 0% | 100% | 0% |
| Milza | 33% | 77% | 0% |
| Fegato | 33% | 77% | 0% |
| U.beccate | 0% | 80% | 20% |

Legenda: NT - *E.coli* non tipizzabile

Dalla tabella si osserva come il sierotipo O78 sia maggiormente rappresentato tra i visceri indicativi di una setticemia fatale o di una onfalite in atto (cervello, pericardio e sacco vitellino).

La maggior parte degli *E.coli* isolati dalle uova beccate risulta invece essere non tipizzabile.

Nella tabella 3 sono descritti gli *E.coli*, in percentuale, maggiormente isolati per riproduttore, uova beccate e broiler in ciascuna filiera riproduttiva.

Tabella 3. Distribuzione sierotipi *E.coli* a seconda dell'origine

Table 3. *E.coli* serotypes distribution based on the different origin

| Allevam. | Riproduttore | Uova bec. | Broiler |
|----------|--------------|-----------|-----------|
| a | NT (75%) | NT (100%) | NE |
| b | O78 (100%) | NT (100%) | O78 (93%) |
| c | NT (60%) | NT (100%) | NT (100%) |
| d | NT (100%) | NT (100%) | NE |
| e | O2 (100%) | O2 (100%) | NE |
| f | NT (50%) | NT (100%) | NE |
| g | NT (75%) | NT (78%) | NT (100%) |

Legenda: NT: *E.coli* non tipizzabile ; NE : non eseguito

Dalla tabella si dimostra come vi sia una relazione tra i sierotipi di *E.coli* maggiormente presenti nei riproduttori e quelli isolati nella loro progenie (uova beccate e broiler).

PCR

La ricerca dei fattori di virulenza precedentemente descritti, è stata eseguita su tutti i 103 ceppi di *E.coli* isolati. Le percentuali di positività sono le seguenti: Fimbrie di tipo 1 (95%), sistema aerobactina (78%), Tsh (62%) e fimbrie tipo P (4%).

Nella tabella 4 sono descritti in dettaglio le percentuali di positività per i geni dei fattori di virulenza per ogni sierotipo di *E.coli* isolato.

Tabella 4. Distribuzione fattori di virulenza per sierotipo di *E.coli*

Table 4. *E.coli* virulence factors distribution

| | O78 | NT | O2 |
|-------|------|-----|------|
| Fim C | 100% | 91% | 100% |
| lucD | 91% | 72% | 70% |
| Tsh | 91% | 40% | 100% |
| Pap C | 3% | 5% | 0% |

Legenda: *FimC*-gene fimbrie tipo 1; *lucD*-gene sistema aerobactina; *Tsh*-gene della Temperature-sensitive haemoagglutinin; *PapC*-gene fimbrie tipo P

Come si evince dalla tabella 4 i sierotipi O78 e O2 presentano ciascuno la più alta percentuale di positività per due fattori di virulenza su quattro (*FimC*, *lucD* per O78 e *FimC* e *Tsh* per O2), indicando come questi sierotipi siano potenzialmente patogeni.

Nella tabella 5 sono distribuite in percentuale le positività per ogni fattore di virulenza isolato da visceri e uova beccate.

Tabella 5. Distribuzione fattori di virulenza in percentuale da visceri e uova beccate

Table 5. *E.coli* virulence factors distribution from viscera and eggs

| | <i>luc D</i> | <i>Tsh</i> | <i>FimC</i> | <i>PapC</i> |
|-------------|--------------|------------|-------------|-------------|
| Cervello | 76% | 70% | 100% | 18% |
| S.aereo | 66% | 53% | 93% | 6% |
| S.vitellino | 100% | 94% | 100% | 0% |
| Pericardio | 100% | 100% | 100% | 0% |
| Uova becc. | 69% | 43% | 90% | 0% |

Dalla tabella 5 si nota come il pericardio ha la più alta percentuale di positività per tre fattori di virulenza su quattro (*FimC*, *lucD*, *Tsh*) seguito da cervello (*FimC*, *PapC*) e da sacco vitellino (*lucD*, *FimC*) con due. Per quanto riguarda il cervello notiamo la più alta positività per il gene *Pap C*.

In particolare abbiamo rilevato come la positività di *E.coli* per i tre fattori combinati *lucD*, *Tsh*, *FimC*, che ne individua un patotipo, è indice di elevata patogenicità in quanto riscontrata nei ceppi isolati da pericardio (100%), sacco vitellino (81%), cervello (65%) e sacco aereo (53%).

La colibacillosi è spesso condizionata nel suo andamento da altri fattori di tipo ambientale ed infettivo; per questo riteniamo che il patotipo possa fornire valide indicazioni sulla reale patogenicità dei ceppi di *E. coli* sierotipizzabili e non.

Ringraziamenti

Si ringrazia il Dott. Lothar H. Wieler, Institut für Microbiologie und Tierseuchen, Freie Universität, Berlin per aver fornito i ceppi di referenza. Si ringraziano i Sig. Marchi M., Margonari C. e Polinari S. per la preziosa collaborazione tecnica offerta.

Bibliografia

- Dho-Moulin M. et al. (1999); Avian pathogenic Escherichia coli (APEC); Vet. Res. 30: 299-316
- Dozois C. M. et al. (2000); Relationship between the Tsh autotransporter and Pathogenicity of avian Escherichia coli Localization and analyses of the tsh Genetic Region; Infection and Immunity 68: 4145-4154
- Dozois C.M. et al. (1993); Bacterial Colonization and in vivo Expression of F1 (Type 1) Fimbrial antigens in Chickens Experimentally Infected with Pathogenic Escherichia coli; Avian Diseases 38: 321-329
- Jan Ben T. et al. (2001); Virulence-associated genes in avian pathogenic Escherichia coli (APEC) isolated from internal organs of poultry having died from colibacillosis; Int. J. Med. Microbiol. 291: 371-378
- Ngeleka M. et al. (2002); Pathotypes of avian Escherichia coli as related to tsh-, pap-, pil-, and iuc-DNA sequences, and antibiotic sensitivity of isolates from internal tissue and the cloacae of broilers; Avian Diseases 46: 143-152
- Pourbackhsh S.A. et al. (1997); Dynamics of Escherichia coli Infection Experimentally Inoculated Chickens; Avian Diseases 41: 221-223