

COMUNICAZIONE 22

VARIABILITA' GENETICA ED EPIDEMIOLOGIA DEGLI APEC LUNGO LA FILIERA AVICOLA

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

¹Laboratorio Tre Valli. San Martino Buon Albergò, Verona

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

Parole chiave: APEC, fattori di virulenza, PCR, RAPD

APEC genetic variability and epidemiology in the avian production chain

Keywords: APEC, virulence factors, PCR, RAPD

Summary: The authors perform an epidemiological study that shows the APEC transmission from breeder to the broiler chicks could be possible and speculate the reason why from onfalitis the pathogenic strain has never been isolated.

Correspondence: Evelyn Campanari, Laboratorio Tre Valli, Corte Pellegrina, 3; 37036 - San Martino Buon Albergò, Verona
Email: Evelyn.campagnari@aia-spa.it

Introduzione

La caratteristica di *E. coli* in tutte le specie animali, compreso l'uomo, è quella di far parte, in gran numero, della normale flora batterica intestinale (ceppi commensali) e di essere la causa, in un numero limitato di ceppi, di infezioni intestinali od extra-intestinali (ceppi patogeni). A questo ultimo gruppo appartengono gli APEC (Avian Pathogenic *Escherichia coli*).

E' quindi fondamentale l'uso di un efficiente metodo di differenziazione dei ceppi commensali da quelli patogeni: la tradizionale sierotipizzazione dei ceppi isolati, i test di sensibilità e, negli ultimi anni, i fattori di virulenza, forniscono numerose informazioni per la diagnostica ma non sufficienti per lo studio epidemiologico della malattia.

E' stato ad esempio dimostrato che ognuno dei sierogruppi prevalenti O1, O2, O78 è composto da cloni geneticamente diversi (9). Forse, anche per quanto sopra esposto, in bibliografia numerosi sono i riferimenti agli agenti infettivi predisponenti la colibacillosi (es. *Mycoplasma gallisepticum*, virus della bronchite infettiva) mentre solo in pochi lavori è stata approfondita l'epidemiologia degli APEC e le azioni da intraprendere per prevenire e controllare la colibacillosi. In genere i metodi che differenziano il genotipo come la RAPD (1) (6) sono considerati più discriminatori dei metodi fenotipici e la combinazione dei dati dà le informazioni più complete.

La tecnica della RAPD si basa sul principio per cui un singolo oligonucleotide, scelto arbitrariamente, può appaiarsi in siti diversi del genoma su entrambi i filamenti del DNA; se questi distano non più di qualche kb tra loro la regione genica compresa tra essi può essere amplificata. Poiché questo appaiamento avviene in modo casuale più volte nel genoma, si ottiene un profilo di fingerprinting specifico per specie o ceppo.

Alcuni studi hanno valutato le relazioni genetiche tra ceppi patogeni isolati da casi di colisetticemia (3) o da casi di Swollen Head Syndrome, onfaliti e commensali (2) ma non risultano studi su ceppi di *E. coli* provenienti da casi di colibacillosi lungo la filiera riproduttore-incubatoio-ingrasso.

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-g).
- sette casi in sette allevamenti di broiler di età

compresa tra uno e sette giorni di cui cinque (b1, b2, b3, b4, b5) provenienti dal riproduttore b.

- un caso (c1) proveniente da c e un altro (g1) da g.
- Inoltre, si è provveduto a testare la progenie di ogni riproduttore a livello di incubatoio per la presenza di *E. coli* nel sacco vitellino in uova beccate non schiuse. Le filiere sono identificate con le lettere da A a G

Tipizzazione sierologia

La tipizzazione sierologica è stata eseguita con antisieri O1:K1, O2:K2 e O78: K80 (V.L.A. Weybridge).

Ricerca dei fattori di virulenza

Eseguita secondo quanto descritto in precedenza (4).

RAPD

Il *E. coli* è stato propagato in terreno liquido EC (Difco) per 12 ore a 37°C. La RAPD è stata eseguita su 20 ng di DNA estratto con DNAzol Reagent (Invitrogen) usando il kit Ready-To-Go (Amersham Bioscience) e i primers 1290 (6) e 6 (1). Il prodotto della reazione è stato visualizzato su gel al 2% di agarosio in TAE, colorato con etidio bromuro e l'immagine è stata acquisita con GelDoc 2000 (Biorad). Il pattern elettroforetico è stato analizzato con Gel Compare II versione 2.0 (Applied Maths).

Risultati e discussione

I dati ottenuti dall'indagine epidemiologica mediante RAPD sono in parte evidenziati in Figura 1. Il dendrogramma, pur evidenziando la presenza di ceppi di *E. coli* diversi nell'ambito della stessa filiera, ha indicato chiaramente la presenza di cloni. Le elevate omologie per i fattori di virulenza e per i pattern di antibiotico-resistenza di questi cloni, confermano i risultati della RAPD:

Tabella 1. Sierotipo e % positività dei fattori di virulenza dei cloni in filiera C

Table 1: Serotype and % of virulence factors' positivity of clones in line C

	Sier.	ludC	Tsh	FimC	Papc
Rip.	NT	100%	0%	100%	0%
Broil.	NT	100%	0%	100%	0%

Tabella 2. Sierotipo e % positività fattori di virulenza dei cloni in filiera E

Table 2. Serotype and % of virulence factors' positivity of clones in line E

	Sier.	ludC	Tsh	FimC	Papc
Rip.	O2	100%	100%	100%	0%
U.becc.	O2	100%	100%	100%	0%

Tabella 3. Sierotipo e % positività fattori di virulenza dei cloni in filiera B

Table 3. Serotype and % of virulence factors' positivity of clones in line E

	Sier.	ludC	Tsh	FimC	Papc
Rip.B	O78	100%	100%	100%	0%
Bro.B.	O78	96%	96%	100%	0%

Legenda: FimC-gene fimbrie tipo 1; ludC-gene sistema aerobactina; Tsh-gene della Temperature-sensitive haemoagglutin; PapC-gene fimbrie tipo P

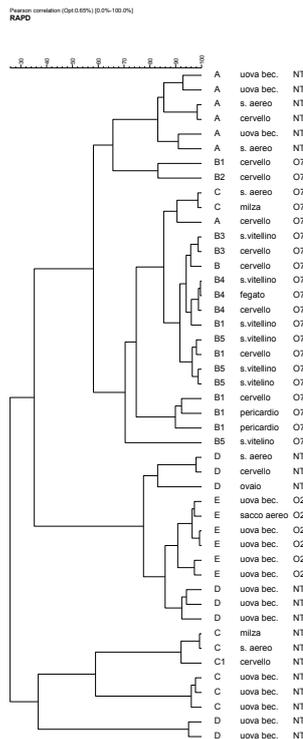


Figura 1. Albero filogenetico di E.coli generato con RAPD. Legenda: Nelle tre colonne da sinistra a destra sono indicati: allevamento, origine e sierotipo degli isolati di E.coli utilizzati per la RAPD

Figure 1. Phylogenetic tree of E.coli generated with RAPD

In letteratura è stata dimostrata sperimentalmente la trasmissione di *E. coli* non patogeno tra riproduttore e broiler al momento della schiusa attraverso la via respiratoria (7). Non è trascurabile, ai fini epidemiologici, che da *E. coli* isolati da onfaliti non siano stati ritrovati ceppi patogeni per l'embrione (2). In questo studio, analogamente a quanto indicato per lo *Staphylococcus aureus* e *Salmonella* (5), anche se sono previste ulteriori indagini a completamento della ricerca, sono emersi elementi in grado di ipotizzare la possibilità di trasmissione di *E. coli* patogeno dai riproduttori ai broiler; questa potrebbe avvenire verticalmente oppure per penetrazione di *E. coli*

all'interno dell'uovo a causa di una contaminazione fecale del guscio.

Il ritrovamento lungo la filiera dello stesso clone, come evidenziato in questo studio, ed il mancato ritrovamento di ceppi patogeni in casi di onfaliti, come segnalato in letteratura, potrebbe essere spiegato dal fatto che solo gli embrioni infetti con *E. coli* apatogeni o con un numero estremamente limitato di ceppi patogeni giungerebbero alla schiusa; di conseguenza il loro isolamento sarebbe difficoltoso. Per le loro caratteristiche di patogenicità gli APEC potrebbero successivamente moltiplicarsi e diffondersi attraverso la via respiratoria oppure, dal sacco vitellino, dare setticemia.

Un'altra ipotesi nascerebbe dal fatto che cloni non patogeni possono acquisire fattori di patogenicità; la presenza di plasmidi (es: Colicin V) o "high-pathogenicity island" potrebbe spiegare il rapido ed efficiente trasferimento di fattori di virulenza. L'acquisizione, il mantenimento o l'espressione dei geni di virulenza sembrerebbe avvenire più facilmente in ceppi con un particolare background genetico evidenziato, ad esempio, dalla similarità alla RAPD (8).

In conclusione, gli strumenti diagnostici utilizzati in questo studio, ci forniscono connessioni epidemiologiche più chiare tra riproduttori e broiler e danno maggiore rilevanza pratica al controllo dell'antibiotico-resistenza nei riproduttori, al miglioramento delle condizioni igieniche delle uova e, in ultima analisi, alle informazioni tempestive tra le fasi di riproduzione e di ingrasso che possono incidere sulla salute della progenie.

Bibliografia

1. Chansiripornchai N. et al. (2001); Differentiation of avian pathogenic *Escherichia coli* strains by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis; Veterinary Microbiology 80: 75-83
2. da Silveira W. D. et al. (2003); Determination of the Clonal structure of Avian *Escherichia coli* strains by Isoenzyme and Ribotyping analysis; J. Vet. Med. 50: 63-69
3. de Moura et al. (2001); Genetic variability of avian *Escherichia coli* strains evaluated by enterobacterial repetitive intergenic consensus and repetitive extragenic Palindromic Polymerase Chain Reaction; Avian Diseases 45: 173-181
4. Giovanardi D. et al. (2003); Diagnosi batteriologica e biomolecolare della colibacillosi nel pollo; Atti Convegno Società Italiana Patologia Aviaria
5. Glavits R. et al. (1983); Pathological studies in chicken embryos and day-old chicks experimentally infected with *Salmonella typhimurium* and *Staphylococcus aureus*; Acta Veterinaria Hungarica 32:39-49
6. Maurer J.J. et al. (1998); Molecular Typing of Avian *Escherichia coli* Isolates by Random Amplification of Polymorphic DNA; Avian Diseases 42:431-451
7. Montgomery R. D. et al. (1988); Consequences to Chicks hatched from *Escherichia coli* inoculated embryos; Avian Diseases 43:553-563
8. Picard B. et al. (1998); The link between Phylogeny and Virulence in *Escherichia coli* Extraintestinal Infection
9. White D.G. et al (1993); Clonal relationships and variation in virulence among *Escherichia coli* strains of avian origin; microbial Pathogenesis 14: 399-409