

GENI DI VIRULENZA IN *ESCHERICHIA COLI* ISOLATI DA GALLINE OVAIOLE IN CORSO DI COLIBACILLOSI

Circella E.¹, Pennelli D.², Tagliabue S.², Di Paola G.¹, Camarda A.¹

¹Dipartimento di Sanità Pubblica e Zootecnia, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Bari "Aldo Moro", Italia

²Istituto Zooprofilattico della Lombardia ed Emilia Romagna, Sezione di Brescia, Italia

Summary

Escherichia (E.) coli infections cause important systemic and localized infections in poultry. In this study, *E. coli* isolated from lesions (Avian Pathogenic *Escherichia coli* - APEC) of layer hens affected by colibacillosis and from intestinal content of clinically healthy birds (Avian Faecal *Escherichia coli* - AFEC) were serotyped and investigated for the presence of virulence genes to find which were more closely related to the APEC isolates. Although a number of different serogroups observed, O78 was the predominant one among the isolates from colibacillosis. Statistically, the presence of the virulence genes, except for *astA*, was generally more associated with APEC strains. For the presence of specific virulence genes, *E. coli* isolated from lesions were not linked to a specific pathotype. Nevertheless statistically, some genes such as *cva/cvi*, *tsh*, *iss* and *iucD* were more strongly related to the colibacillosis isolates. In our opinion, the detection of these genes in a rapid test could provide useful information about the potential virulence of *E. coli* isolated in commercial layer hen flocks.

INTRODUZIONE

Le infezioni da *Escherichia (E.) coli* nel pollame sono causa di patologie sistemiche e localizzate (Barnes *et al.*, 2008). L'impatto economico di tali patologie nell'industria avicola, legato alla mortalità ed ai cali produttivi ha orientato la ricerca verso l'analisi degli stipiti di *E. coli* coinvolti.

Alcuni sierogruppi come O78, O1, O2 sono più frequentemente associati alla colibacillosi nel pollame (Barnes *et al.*, 2008), sebbene negli anni sia stato riportato il coinvolgimento anche di numerosi altri (Rodriguez-Siek *et al.*, 2005; Circella *et al.*, 2009). Per quanto riguarda i fattori di virulenza che possono rendere uno stipite potenzialmente più patogeno, recentemente numerose ricerche sono state mirate ad identificare i geni che, se espressi, possono aumentare la patogenicità del germe e che possano fungere da markers di virulenza (Ngeleka *et al.* 2002; Johnson *et al.* 2006; Johnson *et al.*, 2008).

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di analizzare, in *E. coli* isolati da galline ovaiole affette da colibacillosi ed ovaiole clinicamente sane, la distribuzione di otto diversi geni di potenziale virulenza (Ewers *et al.* 2005), al fine di individuare i più significativi come markers, in relazione alla loro reale incidenza in stipiti patogeni. È stato inoltre valutato il sierogruppo di appartenenza degli isolati al fine di identificare quelli più frequentemente associati a malattia nel nostro territorio e la distribuzione, in questi, dei geni di virulenza risultati più significativi.

MATERIALI E METODI

221 stipiti di *E. coli* isolati da galline ovaiole sono stati sierotipizzati e sottoposti a ricerca di geni di virulenza. Di questi, 130 (Avian Pathogenic *Escherichia coli* - APEC) provenivano da organi con lesioni (fegato, sacchi aerei, ovidutto) di soggetti affetti da colibacillosi mentre 91 (Avian Faecal *Escherichia coli* - AFEC) sono stati ottenuti da soggetti clinicamente sani mediante tampone cloacale. L'isolamento è avvenuto secondo le metodiche tradizionali e l'identificazione del germe in micrometodo mediante gallerie API20E (*Bio Mérieux, Marcy l'Étoile, Lyon, France*).

Caratterizzazione genetica. *astA* (enteroaggregative toxin), *iss* (increased serum survival protein), *irp2* (iron-repressible protein), *iucD* (aerobactin), *papC* (P-fimbriae), *tsh* (temperature-sensitive hemagglutinin), *vat* (vacuolating autotransporter toxin), *cva/cvi* (colicin V plasmid operon genes) sono stati ricercati mediante Multiplex-PCR (Polymerase Chain Reaction) (Ewers *et al.* 2005).

Analisi statistiche. I dati relativi alla distribuzione dei geni di virulenza nei diversi stipiti di *E. coli* sono stati valutati mediante analisi di **Pearson** al fine di stabilire le più significative correlazioni tra il riscontro dei geni di virulenza e la provenienza di *E. coli* da colibacillosi.

Sierotipizzazione. La sierotipizzazione è stata effettuata utilizzando antisieri monospecifici verso 40 differenti antigeni somatici O (O1, O2, O4, O6, O8, O9, O10, O11, O15, O18, O20, O21, O22, O26, O45, O49, O64, O68, O73, O75, O78, O83, O85, O86, O88, O92, O101, O103, O109, O111, O115, O128, O132, O138, O139, O141, O147, O149, O153, O157) in piastre con pozzetti con fondo ad U in camera umida (Blanco *et al.*, 1998).

RISULTATI

Il riscontro dei geni virulenza ricercati è stato più frequentemente associato agli stipiti provenienti da lesioni (Tabella 1). Le analisi statistiche hanno confermato tali risultati evidenziando una correlazione particolarmente elevata con gli stipiti APEC per *tsh*, *iucD* e *cva/cvi* (Tabella 2). *astA1*, unico gene identificato in percentuali più elevate tra gli stipiti AFEC, ha mostrato una correlazione statistica negativa con *E. coli* provenienti da lesioni.

Rispettivamente 23 e 22 differenti sierogruppi sono stati identificati tra *E. coli* provenienti da lesioni e stipiti di origine intestinale (Tabella 3). O78 è risultato il sierogruppo più frequentemente identificato tra APEC.

Il 40% di stipiti APEC ed il 48.4% di stipiti AFEC non sono risultati tipizzabili sierologicamente.

I geni di virulenza non hanno mostrato sostanziali differenze di distribuzione nei diversi sierogruppi, ad eccezione di *cva/cvi* in *E. coli* O78 e *vat* in O2.

L'associazione di più geni di virulenza in uno stesso ceppo è stata osservata in particolare tra stipiti APEC e soprattutto in O78 e O2. Uno stipite O78 di origine intestinale è risultato totalmente privo dei geni di virulenza ricercati.

DISCUSSIONE

La presenza di geni di potenziale virulenza e la loro associazione in uno stesso ceppo è stata osservata soprattutto in *E. coli* provenienti da lesioni ed in particolare in *E. coli* O78 and O2. Tali geni, spesso associati a stipiti patogeni (Rodriguez-

Siek *et al.*, 2005; Vandekerchove *et al.*, 2005) possono incrementare, se espressi, il potenziale di virulenza del germe.

cva/cvi ha mostrato in questo studio la più elevata correlazione statistica con gli stipiti provenienti da malattia, portando a ritenere che possa avere un ruolo rilevante come *marker* di virulenza.

Tale gene è indicativo della presenza del plasmide ColV (Ewers *et al.*, 2005) che funge da vettore di diversi fattori di virulenza come ad esempio *tsh*, *iss*, geni codificanti per sistemi di acquisizione del ferro (Johnson *et al.*, 2006), o fattori di antibioticoresistenza (Wooley *et al.*, 1996).

Al contrario, *vat* associato in questa ricerca quasi esclusivamente a *E. coli* isolati da lesioni, è stato riscontrato spesso in O2. Per tale gene è stata osservata infatti una elevata associazione con specifici gruppi filogenetici di *E. coli* come il B2 (Restrieri *et al.* 2007), cui O2 frequentemente appartiene. Considerato che la maggioranza di stipiti associati a colibacillosi nel pollame generalmente appartiene ai gruppi A, B1 and D (Clemort *et al.* 2000; Rodriguez-Siek *et al.* 2005), l'importanza di questo gene come *marker* di virulenza potrebbe risultare limitata.

astA1, prevalentemente evidenziato in stipiti di origine intestinale, ha mostrato una correlazione negativa con *E. coli* provenienti da lesioni e con la presenza di altri geni quali *tsh* e *cva/cvi*, portando a ritenere che possa esserci una relazione tra *astA1* ed una ridotta tendenza del germe a diffondere in sede extraintestinale.

Sierogruppi come O78, O2, O1 e O8 decisamente prevalenti o esclusivi in ceppi provenienti da lesioni hanno confermato la loro associazione a stipiti provenienti da malattia (Barnes *et al.*, 2008; Ozawa *et al.* 2008) e la loro potenziale virulenza. Tuttavia, un significativo numero di *E. coli* con presenza multipla di geni di virulenza è risultata non tipizzabile sierologicamente o appartenente a sierogruppi, come O128, meno comunemente associati a malattia nel pollame. Inoltre, uno stipite O78 totalmente privo dei geni di virulenza ricercati è stato isolato tra *E. coli* provenienti da animali sani, confermando l'importanza di associare, alla sierotipizzazione, tecniche di caratterizzazione che forniscano ulteriori informazioni circa il potenziale patogeno del germe.

CONCLUSIONI

Nell'attività clinica di campo, ottenere informazioni circa il potenziale patogeno degli stipiti di *E. coli* circolanti in allevamento può essere di fondamentale importanza per poter eventualmente intervenire prontamente con interventi migliorativi nel management aziendale o protocolli terapeutici, riducendo il rischio di episodi di colibacillosi ricorrenti.

Pertanto, attualmente la ricerca in questo campo è orientata verso l'individuazione di geni che possano fungere da *markers* di virulenza. In questo studio, *E. coli* isolati da ovaiole affette da colibacillosi non sono stati associati a determinati patotipi o a specifici geni di virulenza. Tuttavia, tra i geni ricercati, sembrerebbe che *cva/cvi-tsh-iucD-irp2-iss* siano i più indicati per uno screening rapido di campo. Ulteriori approfondimenti saranno necessari per accertare il ruolo di *astA1* come *marker* negativo di diffusione intestinale.

BIBLIOGRAFIA

1. Barnes, J. H., Nolan, L. K., Vaillancourt J.P. (2008). Colibacillosis. *Diseases of Poultry*, 12th ed. (pp. 691-737). Ames: Blackwell Publishing.
2. Blanco, J.E., Blanco, M., Mora, A., Jansen, W.H., García, V., Vázquez, M.L., Blanco, J. (1998). Serotypes of *Escherichia coli* isolated from septicaemic chickens in Galicia (Northwest Spain). *Veterinary Microbiology*, 61: 229-235
3. Clermont, O., Bonacorsi, S., Bingen, E. (2000). Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 4555-4558.
4. Circella E., Pennelli D., Tagliabue S., Ceruti R., Giovanardi D., Camarda A. (2009). Virulence-associated genes in Avian Pathogenic *Escherichia coli* of turkey. *Italian Journal of Animal Science*, vol. 8; p. 775-779, ISSN: 1594-4077
5. Ewers, C., Janßen, T., Kießling, S., Philipp, H.C., Wieler, L.H. (2005). Rapid detection of virulence-associated genes in Avian Pathogenic *Escherichia coli* by multiplex polymerase chain reaction. *Avian Diseases*, 49: 269-273
6. Johnson, T.J., Siek, K.E., Johnson, S.J., Nolan, L.K. (2006). DNA Sequence of a ColV Plasmid and prevalence of selected Plasmid-encoded virulence genes among avian *Escherichia coli* strains. *Journal of Bacteriology*, 188 (2), 745-758.
7. Johnson, T.J., Wannemuehler, Y., Doetkott, C., Johnson, S.J., Rosenberg, S.C., Nolan, L.K. (2008). Identification of minimal predictors of Avian Pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnostic tool. *Journal of Clinical Microbiology*, 46(12): 3987-3996.
8. Ngeleka, M., Brereton, L., Brown, G., Fairbrother, J.M. (2002). Pathotypes of avian *Escherichia coli* as related to *tsh*-, *pap*-, *pil*- and *iuc*-DNA sequences and antibiotic sensitivity of isolates from internal and the cloacae of broilers. *Avian Diseases*, 46, 143-152.
9. Ozawa M., Kazuki H., Kojima A., Asai T., Sameshima T. (2008). Antimicrobial susceptibilities, serogroups and molecular characterization of Avian Pathogenic *Escherichia coli* isolates in Japan. *Avian Diseases*, 52: 392-397.
10. Restieri, C., Garriss, G., Locas, M., Dozois, C.M. (2007). Autotransporter-encoding sequences are phylogenetically distributed among *Escherichia coli* clinical isolates and reference strains. *Applied and Environmental Microbiology*. 73(5): 1553-1562
11. Rodriguez-Siek, K.E., Giddings, C.W., Doetkott, C., Johnson, T.J., Nolan, L.K., (2005). Characterizing the APEC pathotype. *Veterinary Research*. 36: 241-256
12. Vandekerchove D., Vandemaele F., Adriaensen C., Zaleska M., Hernalsteens J.P., De Baets L., Butaye P., Van Immerseel F., Wattiau P., Laevens H., Mast J., Goddeeris B., Pasmans F. (2005). Virulence-associated traits in avian *Escherichia coli*: comparison between isolates from colibacillosis-affected and clinically healthy layer flocks. *Veterinary Microbiology*, 108: 75-87

13. Wooley R.E., Gibbs P.S., Dickerson H.W., Brown J., Nolan, L. K. (1996). Analysis of plasmids cloned a from virulent avian *Escherichia coli* and transformed into *Escherichia coli* DH5 alpha. *Avian Diseases*, 40 (3), 533-539
14. Zanella, A., Alborali, G. L., Bardotti, M., Candotti, P., Guadagnini, P. F., Martino, P. A. Stonfer, M. (2000). Severe *Escherichia coli* O111 septicaemia and polyserositis in hens at the start of lay. *Avian Pathology*. 29(4): 311-317

Tabella 1. Distribuzione di geni di virulenza in *E.coli* isolati da lesioni o di origine intestinale (n=221).

	<i>AstA1</i>	<i>Iss</i>	<i>Irp2</i>	<i>IucD</i>	<i>PapC</i>	<i>Tsh</i>	<i>Vat</i>	<i>Cva/cvi</i>
<i>APEC</i> (n° 130)	22 ^a (16.9) ^b	102 (78.5)	70 (53.9)	85 (65.4)	17 (13.1)	52 (40)	30 (23)	74 (56.9)
<i>AFEC</i> (n° 91)	25 (27.5)	43 (47.3)	20 (22)	27 (29.7)	6 (6.6)	7 (7.7)	5 (5.5)	8 (8.8)

Note: ^aNumero di isolati positivi, ^b% di positività

Tabella 2. Correlazioni statistiche tra presenza di geni di virulenza e origine (lesioni da colibacillosi) di *E. coli* (n=221).

	<i>Colibacillosis lesions</i>						
	<i>astA1</i>	<i>iss</i>	<i>Irp2</i>	<i>iucD</i>	<i>papC</i>	<i>tsh</i>	<i>vat</i>
<i>astA1</i>	Pearson Correlation						
	Sig. (2-tailed)						
	N						
<i>Iss</i>	Pearson Correlation						
	Sig. (2-tailed)						
	N						
<i>irp2</i>	Pearson Correlation	.348(**)					
	Sig. (2-tailed)	.000					
	N	221					
<i>iucD</i>	Pearson Correlation	.225(**)	.633(**)				
	Sig. (2-tailed)	.001	.000				
	N	221	221				
<i>papC</i>	Pearson Correlation	.185(**)	.321(**)	.336(**)			
	Sig. (2-tailed)	.006	.000	.000			
	N	221	221	221			
<i>Tsh</i>	Pearson Correlation	-.139(*)	.395(**)	.514(**)	.163(*)		
	Sig. (2-tailed)	.039	.000	.000	.015		
	N	221	221	221	221		
<i>Vat</i>	Pearson Correlation	.237(**)	.262(**)	.473(**)	.378(**)	.214(**)	
	Sig. (2-tailed)	.000	.000	.000	.000	.001	
	N	221	221	221	221	221	
<i>Cva/cvi</i>	Pearson Correlation	-.124	.517(**)	.583(**)	.627(**)	.659(**)	.411(**)
	Sig. (2-tailed)	.065	.000	.000	.000	.013	.000
	N	221	221	221	221	221	221

Note: **Significatività 0.01 (2-tailed);

* Significatività 0.05 (2-tailed).

Tabella 3. Sierogruppi riscontrati in *E.coli* isolati da lesioni e di origine intestinale (n=221).

	<i>APEC (n° 130)</i>		<i>AFEC (n° 91)</i>	
<i>Non tipizzabili</i>	52	(40)	44	(48.4)
<i>Tipizzabili</i>	78^a	(60)^b	47	(51.6)
O1	3	(2.3)	-	-
O2	7	(5.4)	2	(2.2)
O4	1	(0.8)	3	(3.3)
O6	1	(0.8)	1	(1.1)
O8	5	(3.8)	-	-
O10	1	(0.8)	1	(1.1)
O11	2	(1.5)	3	(3.3)
O15	-	-	3	(3.3)
O20	1	(0.8)	2	(2.2)
O21	-	-	2	(2.2)
O45	1	(0.8)	1	(1.1)
O73	1	(0.8)	2	(2.2)
O75	2	(1.5)	1	(1.1)
O78	25	(19.2)	2	(2.2)
O86	2	(1.5)	1	(1.1)
O88	3	(2.3)	4	(4.4)
O101	1	(0.8)	1	(1.1)
O103	2	(1.5)	3	(3.3)
O111	1	(0.8)	-	-
O128	6	(4.6)	1	(1.1)
O139	8	(6.2)	5	(5.5)
O141	1	(0.8)	3	(3.3)
O147	-	-	2	(2.2)
O149	2	(1.5)	-	-
O153	1	(0.8)	1	(1.1)
O157	1	(0.8)	3	(3.3)

Note: ^aNumero di isolati, ^b% di positività