

Prevalenza di marker genetici di virulenza in ceppi di *Escherichia coli* isolati da conigli.

**E. Mazzolini¹, A. Passera¹, S. Deotto¹, L. Bano², E. Tisato³, C. Bacchin²,
A. Guolo², G. Cattoli³, F. Agnoletti²**

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Laboratorio di Udine, Via Della Roggia 100, 33030 Campofornido, Udine, Italy; ²Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Laboratorio di Treviso, Viale Brigata Treviso 13/A, 31100 Treviso, Italy;

³Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Area Sanità Animale, Viale dell'Università 10, 35020 Legnaro, Padova, Italy

Corresponding Author: Dr. Elena Mazzolini, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Laboratorio di Udine, Via Della Roggia 100, 33030 Campofornido (UD), Italy Tel. +39 0432 561529 - Fax: +39 0432 562676 E-mail: emazzolini@izsvenezie.it

ABSTRACT: Prevalence of virulence genetic markers in *Escherichia coli* strains isolated from rabbits. *Escherichia coli* is able to hurt the cells of the rabbit intestine wall thanks to the *eae* gene product. The adhesive factors related to fimbriae and codified by *af/r1* and *af/r2* genes were also described in isolates of rabbit origin. The presence of the *eae*, *af/r1* and *af/r2* genes was investigated as well as the biotype (n.5 sugars in n.149 isolates) and O-type (n.18 lipopolisaccaride antigens in n.135 isolates). The *af/r1* gene was never detected in the isolates. 97% of *eae*+ strains were *af/r2*+. The B12, B14, B28 and B30 *eae*+ strains yield the *af/r2* gene in respectively the 100%, 96%, 75% and 83% of isolates. The *eae*+ *af/r2*+ strains belonging to the B12, B14 and B28 biotype were mostly O103 strains, while the B30 biotype *eae*+ *af/r2*+ was O103 in 13.3% of the strains.

Keywords: *Escherichia coli*, rabbit, *eae* gene, fimbriae.

INTRODUZIONE – *Escherichia coli* rappresenta uno dei principali patogeni enterici del coniglio ed in questa specie i ceppi responsabili di malattia appartengono al patotipo definito REPEC (Rabbit enteropathogenic *E.coli*), la cui patogenicità è basata prevalentemente sulla presenza di un complesso intimina-TIR (Translocated Intimin Receptor) che permette al microrganismo di aderire alla mucosa intestinale e distruggere i microvilli degli enterociti. Il gene responsabile della produzione del complesso intimina-TIR è omologo al gene *eae* dei ceppi enteropatogeni di *E.coli* dell'uomo e costituisce il principale requisito per l'attribuzione di proprietà enteropatogene agli isolati dal coniglio (Blanco *et al.*, 1996). In *E.coli* isolati da coniglio sono stati inoltre descritti i fattori di adesività legati alle fimbrie AF/R1 (O'Hanley e Cantey, 1978) e AF/R2 (Milon *et al.*, 1983). I ceppi *eae*+ *af/r2*+ appartenenti al sierotipo O103:H3 ramnosio negativo sono caratterizzati da elevata patogenicità e generalmente legati a gravi focolai di enterocolite nei conigli in svezzamento (Camguilhem e Milon, 1989; Blanco *et al.*, 1996). L'adesina codificata dal gene *af/r2* permette la colonizzazione da parte di *E.coli* del tratto distale dell'intestino dei conigli e rappresenta il primo passo verso il processo infiammatorio. Ceppi di *E.coli* privati del gene *af/r2* presentano difficoltà nella colonizzazione dell'intestino ed una importante riduzione della patogenicità (Pillien *et al.*, 1996). Recentemente in conigli con

enteropatia il gene *af/r2* è stato rinvenuto nel 83,3% dei ceppi *eae+* di *E.coli* (Penteado *et al.*, 2002). La frequenza di isolamento di ceppi REPEC nel corso dell'attività diagnostica presso i nostri laboratori è stata precedentemente descritta (Agnoletti *et al.*, 2004). Il presente lavoro estende l'indagine ai geni *af/r1* e *af/r2* di *E.coli* isolati da conigli affetti da enteropatia e da conigli sani.

MATERIALI E METODI – *E. coli* era isolato dal contenuto cecale dei conigli mediante semina in terreno selettivo EMB Agar (Oxoid LTD, Basingstoke, England) ed identificato con il sistema API20E (bioMerieux, Marcy l'Etoile, France). I 149 ceppi esaminati erano sottoposti alla classificazione basata sulla fermentazione di 5 zuccheri (biotipo) (Camguilhem e Milon, 1989) e, tra questi, 135 all'esame dell'antigene lipopolisaccaridico (O-tipo) verso i 18 diversi O-antigeni individuati in *E.coli* isolato da conigli : O2, O8, O10, O15, O20, O22, O26, O49, O75, O86, O92; O103, O109, O128, O132, O141, O149, O153 (Laboratorio de Referencia de *E.coli*, Universidad de Santiago de Compostela - Lugo, Spagna). Il gene *eae* veniva ricercato in *E.coli* mediante PCR utilizzando i primer *eae-s* e *eae-a* (Karch *et al.*, 1993), l'amplificato produce un frammento 875-bp. Per la ricerca dei geni *af/r1* e *af/r2* è stata utilizzata una "PCR duplex" con i primer: *af/r1-s* e *af/r1-s*; *af/r2-s* e *af/r2-s* e l'amplificato atteso era rispettivamente di 312bp e 463bp (Penteado *et al.*, 2002).

Tabella 1 - Distinti per biotipo sono indicati i risultati della ricerca del gene *eae*, *af/r1* e *af/r2* in 149 ceppi di *E.coli* isolati da coniglio; inoltre per 135 ceppi viene indicato l'O-tipo. N. numero ceppi di *E.coli*; NT = non tipizzabile; n.e. = non esaminato.

biotipo	<i>eae</i>	N.	Gene AF/R1 negativo			
			<i>af/r2</i> neg	O tipo (N.)	<i>af/r2</i> pos	O tipo (N.)
B5	+	1			1	O103 (1)
B12	+	44			44	O103 (39); NT (4); n.e. (1)
	-	1	1	NT (1)		
B14	+	23	1	O15 (1)	22	O103 (22)
B15	+	1			1	O103 (1)
B17	-	2	2	n.e.		
B19	+	1			1	O153 (1)
	-	1	1	n.e.		
B20	+	4			4	
	-	1	1	n.e.		
B21	-	1	1	NT (1)		
B22	+	3			3	O103 (3); n.e. (1)
	-	2	2	O103 (1); NT(1)		
B23	-	5	4	O2 (3); O8 (1)	1	O2 (1)
B27	-	1	1	O2 (1)		
B28	+	4	1	O153 (1)	3	O103 (2); n.e. (1)
B29	+	2			2	O103 (1); O153 (1)
	-	4	4	O8 (1); NT (1); n.e.(2)		
B30	+	18	3	O103 (3)	15	O8 (2); O103 (3); O132 (2); O141(3); O149 (1) O153 (3); NT (1)
	-	29	27	O2 (3); O8 (8); O141 (4); NT (8); n.e. (4)	2	O141 (1); NT (1)
B31	-	1	1	n.e. (1)		

RISULTATI E CONCLUSIONI – Dall'esperienza diagnostica maturata nel nostro laboratorio in base alla sola presenza del gene *eae* non era possibile spiegare la maggior gravità di focolai di colibacillosi causati da ceppi provvisti di tale marker genetico ed appartenenti ai biotipi B12 e B14 rispetto a ceppi, ugualmente *eae*⁺ ma ramnosio positivi, quali il B28 ed il B30. Da ciò deriva la ricerca nei nostri isolati di altri marker di patogenicità, già descritti nel coniglio. I risultati del lavoro, sintetizzati in tabella 1, evidenziano che il gene *af/r1* non è stato individuato in alcun ceppo mentre il gene *af/r2* era associato al gene *eae* nel 97% dei ceppi esaminati; nei biotipi B12 il gene *af/r2* era sempre associato al gene *eae* ed è stato rinvenuto anche nel 96% dei ceppi B14, nel 83% dei ceppi B30 *eae*⁺ ed in 3 dei 4 (75%) ceppi con biotipo B28 *eae*⁺. Focalizzando l'attenzione sui ceppi *eae*⁺ e *af/r2*⁺ appartenenti ai biotipi B12, B14, B28 e B30, mediante la classificazione intraspecie basata sull'antigene lipopolisaccaridico, si osserva che O103 è ampiamente rappresentativo del biotipo B12 (90,7%), B14 (100%) e B28 (100%) ma non del biotipo B30 (13,3%). Quest'ultimo è stato recentemente individuato come il più diffuso in Brasile (Penteado *et al*, 2002).

In conclusione il fattore di adesività AF/R1, originariamente individuato nel ceppo RDEC-1 (Cantey e Blake, 1977), sembra assente nei ceppi di *E.coli* attualmente circolanti nei nostri allevamenti, in analogia a riscontri di altri ricercatori (Vandekerchove D., comunicazioni personali). Inoltre il gene *af/r2* sembra frequentemente associato al gene *eae*, ma questi due fattori di virulenza si dimostrano ancora insufficienti a spiegare le differenze di patogenicità osservate in campo, e sostanzialmente riconducibili ad una maggiore aggressività dei ceppi ramnosio negativi B12 e B14 rispetto ai ceppi B28 e B30 *eae*⁺ e *af/r2*⁺ ramnosio positivi.

BIBLIOGRAFIA – **Agnoletti, F.**, Favretti, M., Deotto, S., Passera, A., Tisato, E., Bano, L., Mazzolini, E., 2004. Report of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) isolated from enteric outbreaks in italian intensive rabbit herds. In: Proc. 8th World Rabbit Congress, sept. 2004, Puebla, Messico, pp 416-421. **Blanco, J.E.**, Blanco, M., Blanco, J., Mora, A., Balanguer, L., Mourino, M., Jansen, W.H., 1996. O serogroups, biotypes and *eae* genes in *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy rabbits. J. Clin. Microbiol., 34, 3101-3107. **Camguilhem, R.**, Milon, A., 1989. Biotypes and O serogroups of *Escherichia coli* involved in intestinal infections of weaned rabbits: clue to diagnosis of pathogenic strains. J. Clin. Microbiol., 27, 743-747. **Cantey, J.R.**, Blake, R.K., 1977. Diarrhea due to *Escherichia coli* in the rabbit: a novel mechanism. J. Infect. Dis., 135, 454-462. **Karch, H.**, Bohm, H., Schmidt, H., Gunzer, F., Aleksic, S., Heesemann, J., 1993. Clonal structure and pathogenicity of Shiga-like toxin-producing, sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:H-. J. Clin. Microbiol., 31, 1200-1205. **Milon, A.**, Esslinger, L., Camguilhem, R., 1983. Adhesion of *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic weaned rabbits to intestinal villi and HeLa cells. Infect. Immun., 58, 2690-2695. **O'Hanley, P.D.**, Cantey, J.R., 1978. Surface structure of *Escherichia coli* that produce diarrhea by variety of enteropathic mechanisms. Infect. Immunol., 21, 874-878. **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. Serobiotypes and virulence genes of *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy rabbits in Brazil. Vet. Micr., 89, 41-51. **Pillien, F.**, Chalareng, C, Boury, M., Tasca, C, D e Rycke, J., Milon, A., 1996. Role of Adhesive Factor/Rabbit 2 in experimental enteropathogenic "*Escherichia coli* O103 diarrhea of weaned rabbit". Vet. Mic., 50, 105-115.