

# ***ESCHERICHIA COLI* ENTEROTOSSIGENI ISOLATI DA FOCOLAI DI COLIBACILLOSI ENTERICA POST-SVEZZAMENTO**

## ***ENTEROTOXIGENIC ESCHERICHIA COLI ISOLATED FROM OUTBREAKS OF POST WEANING ENTERIC COLIBACILLOSIS***

TORREGGIANI C., TORRI D., MAIOLI G., PROSPERI A., CHIAPPONI C.,  
BONILAURI P., GHERPELLI Y., MANFREDI R., DOTTORI M., LUPPI A.

*Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell'Emilia Romagna, IZSLER*

**Parole chiave:** ETEC, Fattori di virulenza, Colibacillosi enterica post-svezzamento

**Key Words:** ETEC, Virulence factors, Post-weaning enteric colibacillosis

### **RIASSUNTO**

Il presente studio riporta la prevalenza dei diversi virotipi di *Escherichia coli* enterotossigeni (ETEC) isolati nell'anno 2019 da 182 focolai di diarrea post svezzamento (PWD) presentatisi in altrettante aziende suinicole Italiane. La diagnosi di colibacillosi enterica è stata confermata dall'esame batteriologico eseguito da campioni di tamponi rettali e contenuto intestinale; i ceppi sono stati genotipizzati impiegando una metodica multiplex PCR per i geni codificanti per le fimbrie F4, F5, F6, F18, F41 e per le tossine (tossine termostabili, STa e STb, tossina termolabile, LT e tossina Shiga-like, (Stx2e). Tutti i ceppi di *E. coli* isolati, per un totale di 182 ETEC, erano emolitici e la prevalenza delle principali fimbrie e tossine tra i ceppi inclusi nello studio è risultata essere: F4 (41.3%), F18 (58.7%), STa (81.6%), STb (81.2%), LT (28.3%) and Stx2e (10.8%). Il virotipo isolato più frequentemente è stato F18 STa STb (29.1%), seguito da F4 STa STb (14.3%).

### **ABSTRACT**

In the present study, the virotype's prevalence of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) isolated from 182 outbreaks of post weaning diarrhoea (PWD) occurred in as many as pig farms in Italy in 2019 was reported. The diagnosis of enteric colibacillosis was confirmed by bacteriological examination from samples of rectal swabs and luminal contents. Strains were genotyped using a multiplex PCR method for genes coding for F4, F5, F6, F18, F41 and for toxins (thermostable toxins, STa and STb, thermolabile toxin, LT and Shiga-like toxin, Stx2e). All the 182 *E. coli* strains isolated were haemolytic and the prevalence of the main fimbriae and toxins among the strains included in the study were: F4 (41.3%), F18 (58.7%), STa (81.6%), STb (81.2%), LT (28.3%) and Stx2e (10.8%). The most frequently isolated virotype was F18 STa STb (29.1%), followed by F4 STa STb (14.3%).

### **INTRODUZIONE**

La diarrea post svezzamento (PWD) rappresenta una delle principali cause di perdite economiche nell'allevamento suino, per l' aumento della mortalità e nei soggetti che superano la fase acuta della malattia, diminuzione di incremento ponderale e peggioramento delle performances produttive, oltre ad un aumento dei costi per l'acquisto di farmaci antibiotici.

I ceppi di *Escherichia coli* enterotossigeni (ETEC) sono una delle più importanti cause di PWD e rappresentano un patotipo dotato di adesine fimbriali che mediano l'adesione del

batterio a recettori specifici localizzati sugli enterociti intestinali del suino ed enterotossine che alterano l'omeostasi del piccolo intestino, causando un'ipersecrezione di fluidi ed elettroliti nel lume e determinando la caratteristica diarrea descritta nella PWD. Nei casi di PWD si osserva anoressia o disoressia con comparsa di diarrea acquosa pochi giorni dopo lo svezzamento a cui si associa marcata disidratazione, diminuzione delle performances produttive e aumento della mortalità. Talvolta la comparsa di diarrea può essere preceduta da mortalità improvvisa.

Gli ETEC responsabili della diarrea post-svezzamento presentano generalmente fimbrie F4 (K88) o F18. Molto raramente possono essere isolati ceppi con fimbrie F5, F6 e F41, che tipicamente sono responsabili della colibacillosi enterica in suinetti sottoscrofa. Le principali enterotossine prodotte dagli ETEC del suino, chiave del meccanismo patogenetico della colibacillosi, sono la tossina termolabile (LT) e due tossine termostabili (STa e STb).

Le fimbrie F4 a loro volta si suddividono in F4ab, F4ac e F4ad, sebbene la maggior parte dei casi di PWD sia causata da ceppi di *E. coli* F4ac. Le fimbrie F18 invece possiedono due varianti antigeniche ovvero F18ab, presente generalmente nella malattia degli edemi e la variante F18ac, associata a casi di PWD. Il virotipo è determinato dalla combinazione dei diversi fattori di virulenza, rappresentati da fimbrie e tossine. La circolazione dei diversi virotipi di ETEC responsabili dei casi di colibacillosi enterica in una determinata area geografica o sistema produttivo, è una condizione dinamica, con possibilità di forti variazioni nel tempo (Luppi et al., 2014). L'obiettivo di questo studio è stato quello di descrivere la prevalenza dei geni di virulenza in ceppi ETEC responsabili di focolai di PWD in Italia nell'anno 2019.

## **MATERIALI E METODI**

Nel corso del 2019 sono stati isolati presso le sezioni diagnostiche di Reggio Emilia e Parma dell'IZSLER 182 ceppi di *Escherichia coli* enterotossigeni da altrettanti focolai di PWD osservati in aziende suinicole italiane.

Tali ceppi sono stati isolati da materiale patologico costituito da contenuto intestinale e tamponi rettali prelevati da suini con quadri clinici riferibili a colibacillosi enterica, insorti 1-3 settimane post svezzamento. I tamponi rettali o il contenuto degli intestini sono stati seminati su terreno Agar sangue e su Gassner agar e incubati per 18-24 ore a 37°C in ambiente aerobio. In seguito al periodo di incubazione previsto è stata eseguita una valutazione morfologica e quantitativa delle colonie cresciute sui terreni colturali citati. In particolare, è stata valutata la presenza di emolisi su Agar sangue, infatti, a questo proposito, occorre sottolineare che la maggior parte degli ETEC isolati da casi di diarrea post-svezzamento sono emolitici quando coltivati su terreni a base di sangue. E' stata considerata significativa per la diagnosi di colibacillosi la crescita in coltura pura o quando la percentuale delle colonie di *E. coli* patogeno presenti in coltura erano  $\geq 70\%$ . Successivamente alla valutazione morfologica e la conferma biochimica, per ogni ceppo di *E. coli*, è stata eseguita la genotipizzazione impiegando una metodica multiplex PCR per i geni codificanti per le fimbrie F4, F5, F6, F18, F41 e per le tossine Sta, STb, LT e Stx2e (Casey and Bosworth, 2009). I ceppi sono stati classificati come ETEC se in possesso di almeno un gene codificante per le fimbrie ed uno per le tossine. Quando all'interno dello stesso focolaio sono stati ottenuti ceppi appartenenti allo stesso virotipo, questo è stato conteggiato come unico isolato nel calcolo della prevalenza.

## **RISULTATI**

Tutti i ceppi di *E. coli* isolati (182) si presentavano emolitici su terreno Agar sangue con

prevalenza delle fimbrie e delle tossine così distribuita: F4 (41.3 %), F18 (58.7 %), STa (81.6%), STb (81.2%), LT (28.3%) e Stx2e (10.8%). Come descritto precedentemente con il termine virotipo si intende la combinazione dei diversi fattori di virulenza che caratterizzano un ceppo all'interno di un patotipo. Dall'analisi dei risultati della genotipizzazione condotta nel presente studio risulta che il virotipo F18 STa STb, presente nel 29.1% dei casi, risultava quello isolato più frequentemente, seguito da F4 STa STb osservato invece nel 14.3% (Tabella 1). Nell'8.2% dei casi sono stati osservati focolai misti con isolamento di due virotipi differenti per la tipologia delle fimbrie (F4 e F18).

**Tabella 1.** Frequenza dei diversi virotipi ETEC isolati.

**Table 1.** ETEC virotypes' prevalence.

Virotipo	%
F18 STa STb	29.1
F4 STa STb	14.3
F18 STa STb LT	9.9
F18 STa STb Stx2e	7.7
F18 STa	7.1
F4 STb LT	7.1
F4 STb	6.6
F4 STa STb LT	4.4
F4 STa	3.4
F4 STa LT	2.8
F4 LT	2.7
F18 STa STX2e	1.7
F18 STb	1.2
F18 STa STb LT Stx2e	1
F18 STa LT	0.5
F18 STx2e	0.5

## DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Il presente studio offre un quadro sulla prevalenza dei virotipi di ETEC isolati da 182 focolai di colibacillosi enterica in Italia nell'anno 2019. Il dato che dev'essere discusso riguarda la prevalenza dei ceppi F18 e F4 che come noto sono i principali responsabili delle forme di colibacillosi che si verificano nel post-svezzamento. Dai risultati ottenuti si osserva che i ceppi ETEC F18 mostrano una maggiore frequenza, nei casi di colibacillosi enterica, rispetto agli ETEC F4. Questi dati evidenziano una variazione nella dinamica della circolazione dei ceppi ETEC responsabili della colibacillosi enterica del suino, considerando che precedenti studi sull'argomento dimostravano una netta prevalenza di ETEC F4 in casi di colibacillosi post-svezzamento. Dati di prevalenza provenienti da casi di colibacillosi in allevamenti italiani indicano che ETEC F4 nel 2002 era responsabile dell'89.2% dei focolai (Luppi et al., 2014). Nello stesso studio, riportante i dati d'isolamento e tipizzazione di ceppi ETEC fino al 2012 si osservava già un graduale

spostamento della prevalenza verso ceppi con fimbrie F18, con una percentuale di casi sostenuti da ceppi ETEC F4 nel 2012 pari al 64.4% . In un recente studio pubblicato nel 2016 ETEC F4 era il ceppo più comunemente isolato in casi di PWD in Olanda, Francia, Germania e Italia (45,1% dei casi), contro un'incidenza del 33,9% per i ceppi ETEC F18 (Luppi et al., 2016). Risultati simili, a favore di una maggiore prevalenza di ETEC F4, sono stati riportati in indagini meno recenti eseguite in Danimarca (Frydendahl, 2002), Polonia (Osek et al., 2000) e Ungheria (Zajacova et al., 2012).

Le informazioni presentate in questo studio evidenziano la variabilità della prevalenza dei virotipi ETEC in focolai di colibacillosi enterica nel corso del tempo. Gli elementi che possono essere ipotizzati come responsabili di un'alternanza di diversi virotipi sono imputabili a diversi aspetti, tra i quali si possono annoverare fattori legati all'ospite, come ad esempio specifiche caratteristiche genetiche che modulano la presenza di specifici recettori a livello intestinale per le fimbrie degli ETEC (Bao et al., 2008), interventi profilattici come ad esempio la vaccinazione, fattori alimentari e fattori dipendenti dall'agente eziologico come ad esempio la resistenza agli antibiotici.

E' stata dimostrata l'esistenza di geni che controllano l'espressione dei recettori intestinali del suino per ETEC, l'assenza di questi recettori determina tra i suini genotipi ETEC resistenti. Per ETEC F4, polimorfismi a singolo nucleotide (SNPs) situato sui geni Mucin4 (MUC4), Mucin 13 (MUC13), Mucin 20 (MUC20), recettore della transferrina (TFRC), non-recettore tirosina chinasi 2 (ACK1) oltre ad altri, sono stati proposti come marcatori genetici per la resistenza / suscettibilità ETEC nel suino.

Una maggiore prevalenza di suini con genotipo MUC4 sensibile è stato osservato in razze commerciali, come Large White e Landrace, mentre una frequenza più bassa dell'allele sensibile è stata segnalata nelle razze locali (Luise et al., 2019).

Tuttavia, la correlazione tra il polimorfismo MUC4 e la suscettibilità per ETEC F4 non è del tutto coerente, in particolare per la resistenza, infatti una certa percentuale di suini con genotipo MUC4 resistente mostrano adesione intestinale di ETEC con fimbrie F4ac. Altri geni tra cui MUC13, MUC20 e TFRC hanno quindi attirato l'attenzione dei ricercatori, per il possibile ruolo nella resistenza genetica nei confronti di ETEC F4 (Fairbrother and Gyles, 2012).

Per quanto riguarda la resistenza dei suini all'infezione da ETEC F18, i ricercatori hanno raggiunto la convergenza maggiore per un SNP situato sul gene FUT1. Bao et al. ha dimostrato che, per la maggior parte, le razze Duroc e Pietrain hanno presentato il genotipo FUT1 resistente mentre il cinghiale e razze Cinesi hanno mostrato esclusivamente genotipi sensibili.

In alcuni paesi come la Danimarca esistono programmi di selezione per la resistenza verso F4, tutto ciò ha comportato una riduzione dei soggetti sensibili a ETEC F4 nella popolazione suina danese (Luise et al, 2019). A questo proposito l'aumento della presenza di loci di resistenza per F18 e F4 nella popolazione suina, attraverso la selezione, è un approccio sicuramente interessante per prevenire la PWD da ETEC. Tuttavia, è importante sottolineare come esista la possibilità di co-selezione di caratteri fenotipici indesiderati strettamente connessi con i genotipi F4 e F18 resistenti (Fairbrother and Gyles, 2012)..

Altri fattori che interverrebbero sulla modulazione dei recettori fimbriali sono alcuni componenti alimentari, come ad esempio le lectine, proteine di cui ne sono soprattutto ricchi i cereali e le leguminose (Kelly et al., 1994).

Da qualche anno, per il controllo della colibacillosi enterica nel post-svezzamento, viene impiegata la vaccinazione con ceppi naturalmente avirulenti, prima in forma monovalente (F4), poi bivalente (F4/F18) per via orale. Tale strategia vaccinale ha

lo scopo di immunizzare i suinetti prima dell'inizio del periodo post svezzamento, stimolando un'immunità mucosale, attraverso la produzione di IgA a livello intestinale. E' difficile stabilire se ed eventualmente quanto, l'impiego dei vaccini sopraccitati abbia potuto influenzare, attraverso una pressione selettiva sulla popolazione batterica, l'emergere di determinati virotipi a scapito di altri, anche considerando che il vaccino bivalente, in particolare, pur contenendo varianti antigeniche di *E. coli* F18ac e F4ac, conferisce protezione crociata nei confronti di ETEC F18ab, F4ab e F4ad (Nadeu et al., 2017).

Ultimo, ma non per importanza, vale la pena sottolineare il ruolo che gli antimicrobici hanno nella selezione della popolazione batterica patogena e commensale. A questo proposito non si può escludere che le variazioni quali-quantitative nell'uso di molecole antimicrobiche a scopo terapeutico e metafilattico, osservate in questi ultimi anni, abbia potuto favorire e modulare il riemergere di determinati virotipi a scapito di altri.

Monitorare l'epidemiologia dei ceppi ETEC responsabili dei focolai di colibacilloso enterica in un allevamento o in un'area come potrebbe essere una regione ad alta densità suinicola è un importante strumento per un corretto approccio nella prevenzione e nella gestione della problematica sanitaria in allevamento.

La diagnosi di colibacilloso attraverso l'impiego di criteri quantitativi batteriologici e la successiva genotipizzazione per evidenziare i fattori di virulenza rivestono un ruolo diagnostico fondamentale. La conoscenza del virotipo responsabile di un focolaio di colibacilloso e l'eventuale variabilità dei ceppi isolati in corso di focolai, permettono una corretta analisi della problematica e forniscono informazioni per la scelta di misure di controllo e di prevenzione.

## BIBLIOGRAFIA

1. Bao W.B., Wu S.L., Musa H.H., Zhu G.Q., Chen G.H., (2008), "Genetic variation at the alpha-1-fucosyltransferase (FUT1) gene in Asian wild boar and Chinese and Western commercial pig breeds.", *J Anim Breed Genet.*,125(6):427-430.
2. Casey T.A., Bosworth B.T., (2009), "Design and evaluation of a multiplex polymerase chain reaction assay for the simultaneous identification of genes for nine different virulence factors associated with *Escherichia coli* that cause diarrhea and edema disease in swine.", *J Vet Diagn Investig.*, 21:25-30.
3. Fairbrother J.M., Gyles C.L. (2012) Colibacillosis in: Ziemmerman J.J., Karriker L.A., Ramirez A., Schwartz K.J., Stevenson G.W., editors. *Diseases of Swine*, 10 ed. UK: WileyBlackwell, 723-47.
4. Frydendahl K., (2002) "Prevalence of serogroups and virulence genes in *Escherichia coli* associated with postweaning diarrhoea and edema disease in pigs and a comparison of diagnostic approaches", *Vet Microbiol.* 85(2):169-82.
5. Kelly D, Begbie R., King T.P.,(1994), *Nutr Res Rev* 7:233-257.
6. Luise D., Lauridsen C., Bosi P., Trevisi P., (2019), "Methodology and application of *Escherichia coli* F4 and F18 encoding infection models in post-weaning pigs", *Journal Anim Sci Biotechnol*, 10:53.
7. Luppi A., Bonilauri P., Gherpelli Y., Rosamilia A., Biasi G., Maioli G., Dottori M., (2014), "Prevalence of F4 Hemolytic *E. coli* isolated from pigs with post-weaning diarrhea", "Proceedings of the 23rd International Pig Veterinary Society (IPVS) Congress" June 8 – 11, Cancun, Quintana Roo, Mexico, VOLUME II, 469.
8. Luppi A., Gibellini M.V., Gin T., Vangroenweghe F., Vandebroucke V., Bauerfeind R., Binilauri P., Labarque G. and Hidalgo A., (2016), "Prevalence of virulence factors in enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from pigs with post-weaning diarrhoea

- in Europe”, *Porcine Health Management* 2:20. DOI 10.1186/s40813-016-0039-9.
9. Nadeau É., Fairbrother J.M., Zentek J., Bélanger L., Tremblay D., Tremblay C.-L., Röhe I., Vahjen W., Brunelle M., Hellmann K., Cvejic C., Brunner B., Schneider C., Bauer K., Wolf R., Hidalgo Á., (2017), “Efficacy of a single oral dose of a live bivalent *E. coli* vaccine against post-weaning diarrhea due to F4 and F18-positive enterotoxigenic *E. coli*” *The Veterinary Journal*, 226, 32–39.
  10. Osek J., (1999), “Prevalence of virulence factors of *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy piglets after weaning”, *Vet Microbiol.*, 68:209–17.
  11. Zajacova ZS, Konstantinova L, Alexa P., (2012), “Detection of virulence factors of *Escherichia coli* focused on prevalence of EAST1 toxin in stool of diarrheic and non-diarrheic piglets and presence of adhesion involving virulence factors in astA positive strains”, *Vet Microbiol.* 154:369–75