

PROIECT PD: 370
NR PROIECT 111/ 28.07.2010
ETAPA UNICA ANUL 2012

Director de proiect:
ASIST DR FODOR IONICA MIHAELA

SINTEZA LUCRĂRII

**STUDIUL FENOTIPIC SI GENOTIPIC AL TULPINILOR DE E COLI CARE
PRODUC INFECTII EXTRAINTESTINALE LA PUII DE CARNE, STABILIREA
CIRCUITULUI EPIDEMIOLOGIC SI A RISCULUI ZONOTIC**

E. coli este cel mai frecvent agent patogen izolat de la puii de carne, prezentând o importanță economică deosebită, prin pierderile foarte mari prin mortalitate (40%) și întârziere în creștere.

Tulpinile de *E. coli*, încadrate în patotipul *APEC* (*Avian Pathogenic E. coli*), sunt responsabile de infecții extraintestinale, datorate proprietăților invazive ale acestora, având, cel mai adesea, punctul de declanșare la nivel respirator.

Tulpinile *APEC* circulante sunt majoritar multi rezistente la antibiotice și chiar la unele dezinfectante utilizate în unitățile de creștere a păsărilor. Ca atare, conduita terapeutică și programele de biosecuritate trebuie construite pe baza rezultatelor de laborator și a evaluării prevalenței tulpinilor *APEC*.

Antibiorezistența este o problemă majoră atât în medicina veterinară, cât și în cea umană. Capacitatea de antibiorezistență a microorganismelor a crescut mult în ultimii ani, datorită utilizării îndelungate a produselor antiinfecțioase în terapia veterinară și umană, astfel încât mare parte din boli au devenit reemergente, iar antibioticele ineficace.

Datele de ultimă oră din literatura de specialitate arată că tulpinile *APEC* sunt similare cu tulpinile implicate în infecțiile urinare la om, fiind considerate zoonotice.

În cazul colisepticemiei, frecvent întâlnită la puii de carne, se constată fenomenul de rezistență multiplă la antibiotice. Fenomenul este guvernat în principal de plasmidele R, care induc determinismul genetic al rezistenței extracromozomale la antibiotice. Utilizarea nerațională a antibioticelor a indus selecționarea unor tulpini bacteriene de *E. coli* cu rezistență multiplă, fenomen frecvent întâlnit, în efectivele de pui de carne crescuți în sistem intensiv.

Materiale și metode

Obiectivul proiectului în anul de raportare 2012 a fost realizat în totalitate și a urmărit:

1.1. Tehnica multiplex PCR la tulpinile *APEC* izolate de la puii de carne.

Pentru realizarea obiectivului în anul 2012 au fost luate în studiu tulpinile de *E. coli* izolate în perioada 2010-2012 din ferme avicole specializate în creșterea puilor de carne, în care au evoluat episoade de colibaciloză aviară. În vederea realizării **acestui obiectiv** au fost efectuate următoarele activități:

1.1. Identificarea unor gene la tulpinile de *E. coli* izolate.

1.2. Caracterizarea genotipică a tulpinilor de *E. coli* izolate

Tehnica multiplex PCR la tulpinile *APEC* izolate de la puii de carne a fost realizată în cadrul Laboratorului de Biologie Moleculară al S.N. Institutul Pasteur S.A., București.

Prezența genelor *ompA*, *iss* și *fimH* a fost urmărită prin screening multiplex PCR

(Polymerase Chain Reaction - reacția polimerizică în lanț), la un număr de 49 tulpini de *Escherichia coli*, identificate fenotipic, izolate din focare de colibaciloză aviară.

Testele de amplificare prin multiplex PCR / multiprimer PCR (mPCR) au fost realizate pe eșantioane de ADN brut (1 μl / reacție), din pasaje timp de 18 ore pe agar BHI (Brain Heart Infusion) sau direct pe colonii (o colonie de pe mediu solid a fost transferată în tubul de amplificare PCR, în care au fost prezenți toți reagenții necesari reacției, amestecul a fost tratat termic timp de 15 min., la 4°C, după care a urmat programul de amplificare).

Amorsele utilizate, în concentrație de 25 pmole fiecare, au fost sintetizate comercial; secvența acestora, alături de talia ampliconilor generați, sunt specifice genelor detectate. Reacțiile de amplificare, în varianta triplex PCR, au fost realizate în amplificatorul Perkin Elmer GeneAmp PCR System 9600 (PE Applied Biosystem), în volum total pe reacție de 25 μl, pentru care au fost utilizate kiturile comerciale PuReTaq™ Ready-To-Go™ PCR beads (GE Healthcare). Controlul pozitiv a fost reprezentat de tulpina PIB4293; controlul negativ a fost reprezentat de tulpina JM109 (Promega P9801); controlul de reacție a fost constituit din toți reagenții, mai puțin proba ADN.

Programul de amplificare (programul de „cycling”) utilizat a fost: 94°C, timp de 10 min., 1x; 94°C, timp de 1 min. + 55°C, timp de 1 min. și 30 sec. + 72°C, timp de 2 min. și 30 sec., 30x; 72°C, timp de 10 min, 1x; 4°C, nelimitat. Analiza ampliconilor post-PCR a fost realizată prin gel-electroforeză TBE 1,5x. Digitalizarea imaginii s-a efectuat cu ajutorul echipamentului E.A.S.Y. RH (Herolab GmbH) și a programului logic ImageWin2PC. Calculul digital, al taliei ampliconilor obținuți, s-a realizat prin intermediul programului logic UnScanIt (Silk Sci. Ink.), față de standardele ADN comerciale (PCR marker, Sigma) (4, 6).

Pentru această tehnică, sunt utilizate următoarele aparate și programe:

- amplificator PCR Perkin Elmer GeneAmp PCR System 9600 (PE Applied Biosystem);
- aparat electroforeză (cuvă și placă de electroforeză) Consort E425 (Bioblock®);
- aparat pentru analiza gelurilor de electroforeză E.A.S.Y. RH (Herolab GmbH);
- balanță electronică Kern ABJ;
- hotă în flux laminar Forma Scientific 1205;
- plită electrică Thermolyne 1 (Cimarec®);
- programul logic ImageWin2PC;
- programul logic UnScanIt (Silk Sci. Ink.).

Materialele necesare efectuării tehnicii sunt:

- agaroză normală Agarose 9012-36-6 (Molecular Sigma® Biology);
- albastru de bromfenol;
- amorse pentru proteinele codificate de genele: *ompA* (F); *ompA* (R); *iss 1*; *iss 2*; *fimH 1*; *fimH 2*;
- apă ultrapură Nuclease-Free Water;
- bromură de etidiu;
- căpăcele pentru tuburile PCR cu beads-uri;
- extract de ADN de *Escherichia coli* tulpina PIB4293;
- hârtie de parafilm Parafilm “M” (Pechiney Plastic Packaging);
- kituri comerciale PuReTaq™ Ready-To-Go™ PCR beads (GE Healthcare);
- marker PCR Promega 100 bp DNA Ladder;
- pahar Erlenmeyer;
- pipete automate;
- soluție TBE (tris-borat-EDTA);
- tuburi Eppendorf.

Etapele tehnicii multiplex PCR sunt:

- sub hota cu flux laminar Forma Scientific 1205 se pregătește mastermixul;
- se calculează cantitățile necesare;

- cu ajutorul unei pipete automate, într-un tub Eppendorf se introduce cantitatea necesară de apă ultrapură Nuclease-Free Water (23,5 µl pentru fiecare probă + 1 probă suplimentară + 1 probă martor);
- se adaugă câte 0,25 µl din fiecare amorsă pentru proteinele: *ompA* (F); *ompA* (R); *iss* 1; *iss* 2; *fimH* 1; *fimH* 2, rezultând astfel mastermixul, care se omogenizează ușor;
- se iau tuburi PCR cu kituri comerciale PuReTaq™ Ready-To-Go™ PCR beads (GE Healthcare), care conțin taq-polimeraza, tampoane de reacție etc. (beads), în care se introduc câte 25 µl de mastermix în fiecare tub PCR cu probe și 24 µl de mastermix în tubul PCR martor;
- cu vârful pipetei automate se prelevează o probă din fiecare tulpină izolată, care se introduce în tuburile PCR ce conțin mastermix + beads;
- în tubul PCR martor se introduce 1 µl dintr-un extract de ADN de *Escherichia coli*, tulpina PIB4293, rezultând astfel proba martor;
- tuburile PCR se acoperă cu căpăcele, după care se omogenizează ușor;
- tuburile PCR se introduc la frigider timp de 15 min., pentru a se produce un șoc termic, care să permită eliberarea materialului genetic din bacteriile testate;
- după 15 minute, tuburile PCR se scot de la frigider și se introduc în amplificatorul PCR Perkin Elmer GeneAmp PCR System 9600 (PE Applied Biosystem);
- se selectează programul dorit, după care se așteaptă finalizarea lui;
- când programul a ajuns la final, se constată că acesta durează 3 ore și 56 de min.;
- se cântăresc, la balanța electronică Kern ABJ, 0,3750 g agaroză normală Agarose 9012-36-6 (Molecular Sigma® Biology), care se introduc într-un pahar Erlenmeyer;
- se adaugă până la volumul de 25 ml soluție TBE (tris-borat-EDTA) și se omogenizează;
- amestecul, astfel obținut, se topește pe o plită electrică Thermolyne 1 (Cimarec®), așteptându-se până ce amestecul începe să fiarbă, rezultând astfel gelul de agaroză 1,5 %;
- până ce amestecul nu începe să fiarbă, acesta nu se agită, deoarece agaroză rămâne prinsă de peretele paharului Erlenmeyer;
- se adaugă 5 µl de bromură de etidiu (cu atenție, deoarece este cancerigenă);
- gelul de agaroză, astfel obținut, se toarnă pe o placă de electroforeză, prevăzută cu un piepten și se lasă să se solidifice gelul;
- se scot capetele de cauciuc ale plăcii, după care placa, împreună cu pieptenele, se introduce în cuvă, se conectează la sursă, se setează pe 120 V, timp de 1 oră și 60 mA; în cuvă se găsește soluția de electroforeză tris-borat-EDTA 1x;
- pe o hârtie de parafilm Parafilm "M" (Pechiney Plastic Packaging) se amestecă 5 µl albastru de bromfenol cu 10 µl de probă, pentru fiecare probă în parte;
- în godeurile rămase, după îndepărtarea pieptenului, se adaugă amestecul de 15 µl (albastru de bromfenol + probă);
- în ultimul godeu se introduce un marker PCR Promega 100 bp DNA Ladder;
- se inițiază procesul de migrare, ce durează timp de 1 oră, după care se extrage placa de electroforeză din cuva de electroforeză, iar probele se citesc la aparatul pentru analiza gelurilor de electroforeză E.A.S.Y. RH (Herolab GmbH);
- dacă probele sunt pozitive, ampliconii pentru proteinele care codifică genele *ompA*, *iss* și *fimH* trebuie să fie toate la același nivel cu ampliconii markerului PCR, obținându-se următoarele perechi de baze (bp): *ompA* 1421, *iss* 737, *fim H* 670.

Rezultate obținute

Rezultatele obținute, în urma efectuării screening-ului, prin tehnica multiplex PCR, sunt redate sintetic, în tabelul 1.

Caracterizarea tulpinilor de *Escherichia coli*

Nr. crt.	Specificare	Nr.	%	
1	Tulpini testate	49	100	
2	Fermentare lactoză	Mediu S - S	49	100
		Mediu Levin	49	100
3	Mediu cu roșu de Congo	45	91,83	
4	mPCR	ompA	46	93,87
		iss	43	87,75
		fimH	48	97,95
5	nici o gena	nici o gena	1	2,05
6	2 gene	(ompA + iss)	0	0
		(ompA + fimH)	6	12,24
		(iss + fimH)	3	6,12
7	3 gene	(ompA + iss + fimH)	39	79,59
8	mPCR	48	97,95	

Această tehnică a permis detecția prezenței concomitente a genelor *ompA*, *iss* și *fimH*. În finalul reacției, respectiv în cadrul procesului de migrare prin electroforeză, ampliconii pentru proteinele *ompA*, *iss* și *fimH*, de la tulpinile testate, au fost la același nivel cu ampliconii tulpinii martor. S-au obținut următoarele perechi de baze (bp): *ompA* 1421, *iss* 737, *fimH* 670 (fig. 1).

Screeningul efectuat, în varianta multiplex (multiprimer), a pus în evidență prezența celor 3 gene, care guvernează sinteza unor factori de virulență, caracteristice tulpinilor APEC, la un număr de 48 de tulpini (97,95 %) (tabelul 1).

Gena *ompA*, care codifică o proteină de membrană externă, responsabilă de atașarea bacteriană, a fost prezentă la 46 (93,87 %) din tulpinile testate, gena *iss*, care codifică o proteină de membrană externă, ce induce rezistența la complement și, implicit, favorizează colonizarea tulpinilor APEC, a fost prezentă la 43 (87,75 %) din tulpinile testate, iar gena *fimH*, care codifică sinteza fimbriei de tip 1, a fost prezentă la 48 (97,95 %) din tulpinile testate (tabelul 1).

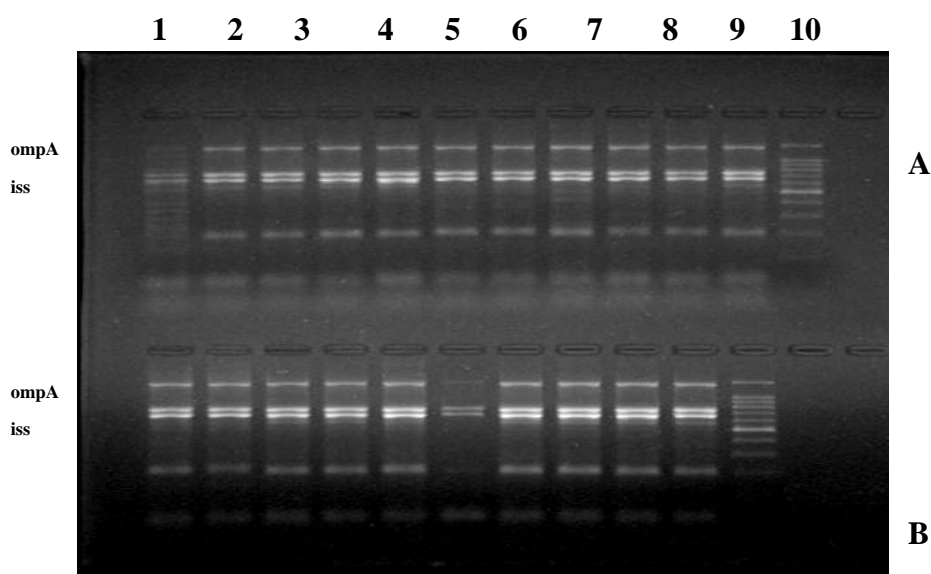


Fig. 1. Multiplex PCR pentru genele *ompA* + *iss* + *fimH*

Tipizare moleculară prin PCR multiamorsa (multiplex PCR), ca patotip APEC. Control prin gel-electroforeză post PCR A: tulpinile 3535-3544. B: tulpinile 3545-3553. Liniile 11 (A) și 10 (B): Martor pozitiv *E. coli* PIB 4293 ((*ompA*⁺ - *iss*⁺ - *fimH*⁺); liniile 12 (A) și 11 (B): Standard ADN – 100 bp DNA Ladder (Promega)

Rezultatele obținute ne arată că asocierea a două gene a fost prezentă astfel: asocierea genelor *ompA* + *fimH* a fost prezentă tot la 6 tulpini (12,24%), iar asocierea genelor *iss* + *fimH* a fost prezentă la 3 tulpini (6,12%), iar asocierea genelor *ompA* + *iss* nu a fost prezentă la nici o tulpină (tabelul 1).

Cel mai frecvent a fost întâlnită asocierea celor 3 gene (*ompA* + *iss* + *fimH*), care codifică principalii factori de patogenitate ai tulpinilor APEC, acestea fiind observate la 39 de tulpini (79,59 %) (tabelul 1).

Analizând rezultatele obținute, prin screening-ul efectuat, observăm că o singură tulpina nu a prezentat gene de virulență.

Discuția rezultatelor

Rezultatele obținute evidențiază prezența tulpinilor APEC, la puii de carne, caracterizate genotipic prin prezența a cel puțin o genă, dintre cele 3 care guvernează principalii factori de patogenitate ai acestui patotip și, care, pot fi transmise prin contact direct sau indirect, în stații de incubație și în adăposturi.

Varianta multiplex PCR utilizată, a permis identificarea celor 3 gene, dovedind că poate fi utilizată în laboratoare utilizate corespunzător, pentru caracterizarea tulpinilor de *Escherichia coli* izolate de la păsări. Această variantă, elaborată în țara noastră, chiar dacă nu permite identificarea mai multor gene, poate fi considerată ca o metodă de rutină.

Aceste gene au mai multe caracteristici, care sunt redate în tabelul 2.

Tabelul 2

Caracteristicile genelor și amorselor utilizate (5)

Nr. crt.	Gena	Amorsa	Secvența amorselor (5' - 3') Sens („forward”) - antisens („reverse”)	Amplicon bp	Referințe bibliografice
	ompA	ompA-1	ctt gcg gag gct tgt ctg ag	1421 (1425)	Pfaff-McDonough (5), 2000, GenBank V00307 (gi42159)
		ompA-2	agg cat tgc tgg gta agg aa		
	iss	iss-1	gtg gcg aaa act agt aaa aca gt	737	Pfaff-McDonough, 2000, GenBank AF042279
		iss-2	cgc ctc ggg gtg gat aa		
	fimH	H1	caa aac ctg gtc gtg gat ct	670	Popa Virgilia 2004, GenBank AE00052
		H2	ttg ccg tta atc cca gac tc		

Cercetările au evidențiat prezența celor 3 gene, responsabile de codificarea principalilor factori de patogenitate ai tulpinilor APEC, care produc colibaciloza aviară. Astfel, gena *ompA*, care codifică sinteza unei proteine de membrană externă, responsabilă de fenomenele de atașare bacteriană, la celulele epiteliului respirator, a fost prezentă la 93,87 % din tulpinile testate, iar gena *fimH*, care este o componentă a operonului *fim*, responsabilă de sinteza fimbrii de tip I, cu care *Escherichia coli* se atașează de celulele epiteliului respirator, a fost prezentă tot în proporție de 97,95 %. Gena *iss*, responsabilă de sinteza unei proteine de membrană externă, care induce rezistența la complement, favorizând astfel colonizarea și multiplicarea colibacililor în sânge, a fost prezentă la 87,75 % din tulpinile testate (tabelul 1).

Analizând rezultatele, furnizate de screening-ul multiplex PCR, se observă că tulpinile de *Escherichia coli* la care cele 3 gene sunt asociate concomitent, se regăsesc în proporția cea mai mare, 39 (79,59 %). Asocierea a două gene a fost prezentă la 9 (18,36 %) dintre tulpini, iar prezența unei singure gene nu a fost identificată la nici una dintre tulpinile testate.

Screening-ul efectuat, în intervalul de timp amintit, arată că frecvența tulpinilor APEC a crescut progresiv, în cei 3 ani. Acest fenomen este consecința transmiterii tulpinilor APEC,

prin contact direct și indirect, între pui de carne, realizat atât în stațiile de incubație, cât și în ferme (1, 3).

Comparând rezultatele furnizate de screening-ul multiplex, cu rezultatele furnizate de fixarea colorantului roșu de Congo, se observă că proporția tulpinilor pozitive este asemănătoare, ceea ce confirmă observațiile mai multor cercetători, care recomandă acest caracter fenotipic în discriminarea tulpinilor APEC patogene de cele nepatogene, mai ales în cadrul serogrupului O₇₈ (2, 3, 6).

Aceste date sunt similare cu cele comunicate de alți autori (1, 7), confirmându-se astfel că acest caracter poate fi un marker epidemiologic, în identificarea tulpinilor APEC, deoarece, fiind o metodă rapidă și ieftină, poate fi preluată de către laboratoarele de diagnostic.

O altă caracteristică a tulpinilor APEC, semnalată și de alți autori (1, 3, 8), o reprezintă rezistența multiplă la antibiotice, prezentă la majoritatea tulpinilor luate în studiu și care poate fi transmisă intraspecific, dar și interspecific, prin intermediul plasmidului R.

Rezultate similare au fost comunicate și de către alți autori (1, 3), însă, prin numărul mare de tulpini investigate, se detașează cercetările efectuate de către RODRIGUEZ-SIEK (7), care a testat un număr de 451 de tulpini de *Escherichia coli*, izolate de la cadavre, din focare de colibaciloză și 104 tulpini izolate din fecale, de la păsări clinic sănătoase. Cercetările efectuate au evidențiat prezența celor 3 gene amintite anterior, dar și a altor gene, care guvernează alți factori de patogenitate (aerobactina), localizate atât în ADN-ul bacterian, cât și în plasmidul R. Prezența unor astfel de gene a fost într-o proporție extrem de mică, la tulpinile izolate din fecale, de la păsări sănătoase, ceea ce confirmă originea extraintestinală a tulpinilor APEC.

Importanța economică a infecțiilor cu *Escherichia coli*, la păsări, asociată cu frecvența tot mai crescută a tulpinilor implicate în etiopatogeneza acestor infecții, impune o monitorizare atentă a tulpinilor și o caracterizare genotipică, pe baza căreia să fie conturat, definitiv, patotipul APEC.

CONCLUZII

- Tehnica PCR, utilizată în cadrul acestor cercetări, este o tehnică moleculară de evidențiere a genelor *ompA*, *iss* și *fimH*, folosind trei reacții de amplificare, de tip multiplex.
- Screeningul efectuat, în varianta multiplex PCR, a stabilit o frecvență ridicată a tulpinilor APEC, izolate din focare de colibaciloză aviară.
- Frecvența tulpinilor APEC a crescut progresiv, pe parcursul celor 3 ani, dovedind o extindere a infecțiilor cu aceste tulpini, în efectivele de pui de carne.
- Rezultatele obținute au evidențiat faptul că cele 3 gene, care codifică factori de patogenitate, sunt, de regulă, asociate câte două sau câte trei.
- Prezența acestor trei gene este corelată cu capacitatea de a lega roșul de Congo, un caracter fenotipic de discriminare a tulpinilor APEC.
- Profilul de rezistență la antibiotice a fost semnalat, în proporții variabile, la tulpinile aparținând patotipului APEC.
- Tehnica multiplex PCR permite identificarea precoce a tulpinilor APEC și reprezintă un instrument util în monitorizarea infecțiilor colibacilare la păsări.

Bibliografie

1. Barnes, H. J., Lisa K. Nolan, Vaillantcourt, J.P. (2008). Colibacillosis, in Diseases of Poultry, 12 th edition, editor in Chief, Saif, Y.M., Blackwell Publishing, Ames, Iowa, 691-732.
2. Cătană, N., Popa, Virgilia, Herman, V., Fodor Ionica (2008) – Phenotypical and genotypical characteristics of *E. coli* strains isolated from avian colibacillosis outbreaks, *Lucr. St. Med. Vet. Timisoara*, XLI, 340-343.
3. Ewers, Christa, JanBen Traute, Wieler, L.H. (2003). Aviare pathogene *Escherichia coli* (APEQ), *Munch. Tierarztl. Wschr.*, 116, 381-395.
4. Germani, Y. (1995) *Methodes de laboratoire. Pouvoir enteropathogen bacteries. Escherichia coli agents d'enterites*, I. Pasteur.
5. Pfaff-Mcdonough, S. J.; Horne, S. M.; Giddings, C. W.; Ebert, J. O.; Doetkott, C.; Smith, M. H.; Nolan, L. K. 2000. *Complement resistance-related traits among Escherichia coli isolates from apparently healthy birds and birds with colibacillosis*. *Avian Disease*. 44: 23-33
6. Popa Virgilia, Andreea Stanica, Daniela Botus, Ramona Mihailescu (2007) *Screening prin multiplex PCR privind prezența tulpinilor de E. coli patogene pentru păsări (APEC) în perioada octombrie 2006-iunie 2007 în efectivele avicole din vestul României*, *Avicol Magazin*, 14 (4), 36-38.
7. Rodriguez-Siek, Kylie. E., Giddings, C. W., Doetkott, C., Johnson, T. J., Fakhr, M. K., Nolan, L. K. (2005). *Comparison of Escherichia coli isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis*, *Microbiology (Reading)*, 151 (6): 2097-2110.
8. Salehi, T. Z. (2005) – *Antibiotic susceptibility of Escherichia coli isolates from chickens*, *Indian Veterinary Journal*, 82, 12, 1329-1330.