

# CARATTERIZZAZIONE GENOTIPICA E SENSIBILITÀ AGLI ANTIBIOTICI DEGLI ISOLAMENTI DI *ESCHERICHIA COLI* DA INFEZIONI URINARIE (UTI) DELLE SCROFE

## GENOTYPING AND ANTIBIOTIC SENSITIVITY OF *ESCHERICHIA COLI* ISOLATES FROM URINARY TRACT INFECTIONS (UTI) IN SOWS

GUSMARA C.<sup>1</sup>, LAUZI S.<sup>1</sup>, ANDREONI S.<sup>2</sup>, LORENZI V.<sup>1</sup>, BARZETTI C.<sup>1</sup>, SALA V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> - Università degli Studi di Milano - Dipartimento di Patologia Animale, Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria

<sup>2</sup> - Università degli Studi di Milano - Scuola di Specializzazione in Patologia Suina

**Parole chiave:** scrofa, infezioni urinarie, *E. coli*, genotipizzazione.

**Key words:** sow, urinary tract infections, *E. coli*, genotyping.

**Riassunto.** I ceppi di *E. coli* isolati da UTI delle scrofe sono stati analizzati in PCR per l'identificazione di diversi fattori di virulenza e del gruppo filogenetico di appartenenza. La maggior parte dei ceppi è stata positiva per le fimbrie tipo 1 e per l'aerobactina. Gli isolamenti differiscono da quelli dell'uomo per il profilo di adesione e per l'emolisina: le fimbrie tipo P e tipo S, così come l'emolisina, sono meno frequenti nei ceppi suini che, a differenza di quelli umani sono, per lo più, classificati nei gruppi filogenetici A e B1. Di tutti gli isolamenti è stata verificata l'antibiotico-sensibilità nei confronti dei principi attivi più frequentemente utilizzati per la terapia delle UTI nelle scrofe.

**Summary.** Porcine *E. coli* strains have been analyzed by PCR for the presence of several virulence factors and identified with regard to placement in the phylogenetic groups. The majority of the tested strains harboured type 1 fimbriae and aerobactin. The strains were quite different from human uropathogenic ones about the adhesion profile and haemolysin, since P and S fimbriae were significantly lower in porcine strains as was haemolysin. Differences with human strains were also observed related to phylogenetic groups, since our strains belonged to *E. coli* clonal groups A and B1. All isolates were tested for sensitivity to antibiotics most frequently used in the treatment of UTI in sows.

### INTRODUZIONE

Infezioni a origine ed eziologia variabile possono interessare le diverse parti dell'apparato urinario della scrofa; tutti i microrganismi coinvolti sono in grado di moltiplicare nell'escreto e alcuni anche di aderire all'epitelio di transizione delle vie urinarie. La loro origine può essere, di volta in volta, enterica, cutanea o ambientale.

Se per un'esposizione ambientale condizionata o in conseguenza di endometriti subacute o croniche, i batteri fecali colonizzano la vagina e l'immunità locale non è in grado di delimitarne la moltiplicazione, l'infezione risale lungo l'uretra, relativamente corta nella scrofa, e raggiunge la vescica; in questa sede, se le condizioni sono idonee, i batteri danno inizio a un processo acuto che può facilmente cronicizzare e, nei casi più gravi, anche estendersi alle vie urinarie e ai reni, sotto forma di pielonefriti e nefriti interstiziali (Martineau & Almond, 2008).

In patologia suina, l'interesse per questi processi è cresciuto solo in anni recenti, in concomitanza con l'evoluzione delle conoscenze sulle batteriosi opportunistiche; le interferenze sull'efficienza riproduttiva (bassa prolificità, ritorni in calore, parti languidi e

natimortalità eccessiva) e l'importanza del problema tra le cause di mortalità e riforma delle scrofe hanno motivato l'interesse di alcuni gruppi di ricerca in Europa.

In un precedente lavoro (Gusmara & coll., 2010) condotto su 690 scrofe di 16 allevamenti, avevamo segnalato come le infezioni urinarie fossero presenti nel 15,2% dei casi (105 scrofe) e come tutti gli allevamenti fossero interessati dal problema, seppur con un'incidenza variabile (dal 2,5 al 32,1%); le specie batteriche evidenziate a una concentrazione almeno pari a 100.000 UFC/ml di urina, indicativa di un processo patologico in corso, sono riportate nella successiva tabella 1, dove appare evidente la prevalenza dei batteri di origine fecale, con una netta predominanza colibacillare.

Batteri isolati	N. isolamenti	% sugli isolamenti
<i>Escherichia coli</i>	94	89,5
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3	2,9
<i>Enterococcus faecalis</i>	2	1,9
<i>Proteus spp.</i>	1	0,9
<i>E. coli</i> + <i>Proteus spp.</i> + <i>E. faecalis</i>	1	0,9
<i>E. coli</i> + <i>E. faecalis</i>	2	1,9
<i>Staphylococcus spp.</i>	2	1,9

**Tabella 1.** Batteri isolati in casi di UTI (Gusmara & coll., 2010).

**Table 1.** Bacterial isolates in UTI cases.

Accertata dunque una prevalenza, del resto ipotizzabile, di *E. coli* tra i batteri responsabili di UTI nella scrofa, restano aperti gli interrogativi sulla provenienza dei ceppi coinvolti e, di conseguenza, sulle effettive possibilità di prevenzione e controllo del problema; gli obiettivi di questo lavoro sono perciò in primo luogo la mappatura genomica degli isolamenti da UTI acute subacute per stabilirne provenienza ed effettiva virulenza, e secondariamente la verifica dei livelli di antibiotico-resistenza nella prospettiva degli interventi di controllo e prevenzione.

Nella specie *Escherichia coli* sono classificati quattro gruppi filogenetici denominati A, B1, B2 e D; gran parte degli isolamenti responsabili d'infezioni e patologie extra-intestinali è catalogata nel gruppo B2 mentre solo una minoranza rientra nel gruppo D. I ceppi commensali sono invece inquadrati nel gruppo A (Picard & coll., 1999).

Gli *E. coli* appartenenti al patotipo UPEC (uropatogeni) costituiscono un gruppo geneticamente eterogeneo, caratterizzato da diversi fattori di virulenza associati alla colonizzazione e alla persistenza nell'apparato urinario (Marrs & coll., 2005); i fattori di virulenza principali sono le adesine (fimbrie tipo 1, P e S), le tossine (emolisina, fattori necrotizzanti citotossici), l'aerobactina e la capsula del tipo II.

La patogenicità per l'epitelio urinario è mediata dalle adesine, grazie alle quali gli UPEC resistono all'azione idromeccanica del flusso urinario, stabilendo anzi in questa sede una nicchia di moltiplicazione; le fimbrie del tipo 1, codificate dai geni *fim* sono responsabili dell'adesione alle cellule epiteliali della vescica.

Altre adesine sono le fimbrie del tipo P, codificate dai geni *papG*, che mediano l'attacco ai recettori presenti sulle cellule uroteliali e dei quali sono state identificate diverse classi: quelli della classe II sono più presenti negli isolamenti che causano pielonefrite, mentre quelli della classe III sono prevalenti nei ceppi responsabili di cistite (Marrs & coll., 2002). Le fimbrie

del tipo S riconoscono infine i recettori dell'ambito renale, vescicale e ureterale (Marre & coll., 1986).

Per altri *E. coli*, il meccanismo di permanenza nel tratto urinario è la elevata velocità di replicazione (Roos & coll., 2006).

Le tossine sono fattori di virulenza importanti in molte patologie coli bacillari: quelle più frequentemente associate agli UPEC sono l' $\alpha$ -emolisina e il fattore necrotizzante citotossico 1 (CNF1); quest'ultimo è stato identificato anche nei ceppi necrotossigeni (NTEC) responsabili di gravi infezioni extraintestinali nell'uomo. Gli stessi producono anche CNF2, di solito associato a ceppi provenienti da animali sani o isolati in corso di diarrea nei ruminanti; recentemente è stato identificato negli isolamenti dai piccoli ruminanti un terzo fattore necrotizzante citotossico (CNF3) (Orden & coll., 2007).

Un altro importante meccanismo patogenetico è la capacità di *E. coli* di acquisire il ferro dai fluidi organici; il fattore di virulenza preposto è l'aerobactina, un sideroforo prodotto ed escreto in carenza di ferro, sintetizzato dai geni *iuc*, mentre le proteine codificate dai geni *iut* ne mediano il trasporto. È stata dimostrata una correlazione diretta tra la produzione di aerobactina e la patogenicità: infatti, la si ritrova nel 6% dei ceppi di derivazione ambientale e nel 38% di quelli isolati da batteriurie asintomatiche e da feci, mentre la prevalenza sale al 73% negli isolamenti da cistiti, batteriemie e pielonefriti. L'aerobactina è frequentemente associata alle fimbrie P e all'emolisina nei ceppi isolati da pielonefriti e sepsi di origine urinaria (Katouli et al., 2005).

Infine, sembrano più associati agli UPEC che ai ceppi di provenienza fecale i geni *kptMS*, che codificano per la capsula di tipo II (Kanamaru & coll., 2003).

## Materiali e metodi

### *Ceppi batterici*

Sono stati considerati 77 isolamenti di *Escherichia coli* provenienti da 12 allevamenti in cui è stata accertata la presenza di infezioni urinarie nelle scrofe; tutti i ceppi provengono da prelievi di urine con una carica batterica  $>10^5$  UFC/ml e sono stati successivamente isolati in colonia singola utilizzando le tecniche batteriologiche classiche.

Dopo la tipizzazione su base biochimica, gli stipti batterici sono stati conservati a  $-20^\circ\text{C}$  in Nutrient Broth (Oxoid) addizionato con glicerolo (15% v/v) fino al passaggio di rivitalizzazione su agar sangue di montone al 5%; le subcolture di questo passaggio sono state utilizzate per la verifica dell'antibiotico-sensibilità e per la genotipizzazione (eseguita su singola colonia).

### *Caratterizzazione genotipica*

Il DNA genomico di tutti i ceppi di *E. coli* è stato estratto mediante bollitura e poi analizzato mediante diverse PCR, utilizzando le indicazioni presenti in letteratura e schematizzate in Tabella 2; ogni isolamento è stato quindi sottoposto ad analisi dei gruppi filogenetici, applicando la multiplex PCR descritta da Clermont e collaboratori (Clermont & coll., 2000).

Sempre mediante PCR, ogni ceppo è stato esaminato per la presenza dei diversi geni associati ai fattori di virulenza: il *panel* utilizzato comprende i geni che codificano per le fimbrie tipo I (gene *fimH*), fimbrie tipo P (geni *papC*, *papE/F*, *papG classe I*, *papG classe II*, *papG classe III*), fimbrie tipo S (gene *sfaD/E*), emolisina (gene *hlyA*), fattori necrotizzanti citotossici (geni *cnf1*, *cnf2*, *cnf3*), aerobactina (geni *iucD* e *iutA*) e per la capsula tipo II (gene *kpsMTII*) (Johnson & Stell, 2000; Toth & coll., 2003; Orden & coll., 2007; Tiba & coll., 2008).

I ceppi positivi per la ricerca dei geni *cnf1* e *cnf2* sono stati sottoposti a sequenziamento per identificarne il tipo; le reazioni di sequenza sono state allestite direttamente dai prodotti di PCR. I prodotti di PCR sono stati purificati, e successivamente sequenziati (chimica del Big Dye terminator v3.1) in entrambe le direzioni utilizzando gli stessi primer di PCR, secondo le

istruzioni della ditta produttrice (Applied Biosystems, Italia). I prodotti del *cycle sequencing* sono stati analizzati mediante il sequenziatore AB 3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Italia). Le sequenze dei campioni sono state analizzate confrontandole con le sequenze di *cnf1* e *cnf2* depositate in banca dati. L'analisi dell'omologia di sequenza nucleotidica (BLAST), l'assemblaggio e l'allineamento delle sequenze dei campioni e di quelle presenti in banca dati sono stati eseguiti utilizzando il pacchetto software BioEdit (<http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit.html>) e i sistemi di analisi NCBI's (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>).

**Tabella 2.** *Geni target e primer utilizzati per la caratterizzazione dei fattori di virulenza e per la tipizzazione dei gruppi filogenetici.*

**Table 2.** *Target genes and primers used for the characterization of the virulence factors and for the typing of phylogenetic groups.*

Gene target	Primer	Prodotto atteso	Bibliografia
<i>fimH</i>	fimH F e fimH R	508	Tiba & coll., 2008
<i>papC</i>	papC F e papC R	328	Tiba & coll., 2008
<i>papE/F</i>	papE/F F e papE/F R	336	Tiba & coll., 2008
<i>papG classI</i>	papGI F e papGI R	692	Tiba & coll., 2008
<i>papG classII</i>	papGII F e papGII R	562	Tiba & coll., 2008
<i>papG classIII</i>	papGIII F e papGIII R	421	Tiba & coll., 2008
<i>sfaD/E</i>	sfaD/E F e sfaD/E R	410	Tiba & coll., 2008
<i>hlyA</i>	hlyA F e hlyA R	1177	Tiba & coll., 2008
<i>cnf1-cn2</i>	CNFs F e CNFs R	633	Toth & coll., 2003
<i>cnf3</i>	CNF3 F e CNF3 R	1246	Orden & coll., 2007
<i>iucD</i>	iucD F e iucD R	602	Tiba & coll., 2008
<i>iutA</i>	AerJ F e AerJ R	302	Johnson & Stell, 2000
<i>kpsMTII</i>	kpsMTII F e kpsMTII R	272	Tiba & coll., 2008
<i>chuA</i>	chuA F e chuA R	279	Clermont & coll., 2000
<i>yjaA</i>	yjaA F e yjaA R	211	Clermont & coll., 2000
TspE4.C2	TspE4.C2 F e TspE4.C2 R	152	Clermont & coll., 2000

### *Antibiogramma*

Gli antibiogrammi sono stati eseguiti su Mueller-Hinton Agar (Difco-DID), applicando la tecnica degli aloni d'inibizione secondo Kirby & Bauer (Bauer, 1959); aggiustando le sospensioni batteriche per l'inoculo al livello 0,5 della scala di McFarland.

Tra i diversi principi attivi solitamente utilizzati in suinocultura sono stati selezionati sei antibatterici, potenzialmente efficaci per meccanismo d'azione ed escreti per via renale: tre fluorochinoloni (Enrofloxacin, Marbofloxacin e Danofloxacin) due aminoglicosidi (Aminosidina e Gentamicina) e l'associazione Trimethoprim-Sulfadimetossina.

### **Risultati**

L'utilizzo della metodica di PCR di Clermont e collaboratori (Clermont & coll., 2000), ha permesso di classificare tutti i 77 ceppi di *E. coli* nei gruppi filogenetici; in particolare, 42 ceppi (54,5%) sono risultati appartenenti al gruppo A, 32 (41,6%) al gruppo B1 e 3 (3,9%) al gruppo D. Non sono stati identificati ceppi di *E. coli* appartenenti al gruppo B2. I risultati delle analisi di PCR per l'identificazione dei fattori di virulenza sono riportati in Tabella 3.

**Tabella 3.** Positività per i geni di virulenza e il gruppo filogenetico nei ceppi di *E. coli* analizzati.  
**Table 3.** Positivity for virulence genes and phylogenetic group of analyzed *E. coli* strains

Gene	Gruppo A (%)	Gruppo B1 (%)	Gruppo B2 (%)	Gruppo D (%)	Totale (%)
<i>fimH</i>	31 (73,8)	25 (78,1)	0 (0)	2 (66,7)	58 (75,3)
<i>papC</i>	0 (0)	2 (6,3)	0 (0)	0 (0)	2 (2,6)
<i>papE/F</i>	0 (0)	1 (3,1)	0 (0)	0 (0)	1 (1,3)
<i>papG I</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>papG II</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>papG III</i>	0 (0)	2 (6,3)	0 (0)	0 (0)	2 (2,6)
<i>sfaD/E</i>	0 (0)	2 (6,3)	0 (0)	0 (0)	2 (2,6)
<i>hlyA</i>	0 (0)	1 (3,1)	0 (0)	0 (0)	1 (1,3)
<i>cnf1-2</i>	0 (0)	2 (6,3)	0 (0)	0 (0)	2 (2,6)
<i>cnf3</i>	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
<i>iucD</i>	16 (38,1)	19 (59,4)	0 (0)	1 (33,3)	36 (46,8)
<i>iutA</i>	13 (31,0)	20 (62,5)	0 (0)	0 (0)	33 (42,9)
<i>kpsMTII</i>	1 (2,4)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1,3)

Per quanto riguarda le adesine, il gene *fimH* è quello più presente: infatti, le fimbrie tipo 1 si ritrovano in 58 ceppi (75,3%), con una percentuale sovrapponibile tra i filogruppi; i 19 isolamenti in cui non è stato identificato il gene *fimH* non appartengono a un unico gruppo filogenetico.

La positività per le fimbrie tipo P è stata osservata in due (2,6%) ceppi del gruppo B1 e si caratterizza per la presenza del gene *papG* di classe III; entrambi i ceppi mostrano un profilo compatibile con fimbrie tipo P funzionali, perché sono positivi anche per gli altri geni del cluster *pap* (geni *papC* e in un ceppo solamente i geni *papE/F*).

Due ceppi (2,6%) sono positivi per il gene *sfaD/E*, che codifica per le fimbrie tipo S e sono classificabili nel gruppo B1; in uno di questi (3,1%), è stata dimostrato il gene che codifica per l'emolisina (*hlyA*).

La positività per i geni *cnf1* e *cnf2*, che codificano per i fattori necrotizzanti citotossici, è stata rilevata in due ceppi (2,6%) del gruppo B1; il sequenziamento ha permesso l'identificazione del fattore citotossico necrotizzante di tipo 1 (CNF-1). Non è stata dimostrata positività per il gene che codifica per CNF3.

Il sistema dell'aerobactina si trova in molti degli isolamenti: il gene *iucD* è stato identificato in 36 ceppi (46,8%) e il gene *iutA* in 33 (42,9%); nel gruppo B1, entrambi i geni sono presenti in 28 ceppi (36,4%), mentre in 8 (10,4%) è presente solo il gene *iucD* e in 5 (6,5%) soltanto *iutA*.

Infine, per quanto riguarda la capsula tipo II, un solo ceppo (1,3%) del gruppo A è stato positivo al gene *kpsMTII*.

Nell'analisi combinata dei geni di virulenza, 8 ceppi (10,4%) ceppi non ne presentano, 25 (32,5%) ne presentano uno solo e in 44 (57,1%) se ne trovano due o più (Tabella 4). Dei ceppi che non presentano geni di virulenza, 6 sono del gruppo A e uno ciascuno dei gruppi B1 e D.

**Tabella 4.** Associazione tra fattori di virulenza in ceppi di *E. coli* isolati.  
**Table 4.** Association among virulence factors in *E. coli* isolates.

Profilo dei geni di virulenza	Numero dei ceppi (%)
<i>fimH</i>	25 (32,5)
<i>iucD-iutA</i>	9 (11,7)
<i>fimH-iucD</i>	8 (10,4)
<i>fimH-iutA</i>	5 (6,5)
<i>fimH-sfaD/E</i>	1 (1,3)
<i>fimH-hlyA</i>	1 (1,3)
<i>fimH-kpsMTII</i>	1 (1,3)
<i>fimH-iucD-iutA</i>	16 (20,8)
<i>iucD-iutA-cnfl</i>	1 (1,3)
<i>papC-papG-cnfl-iucD-iutA</i>	1 (1,3)
<i>fimH-papC-papE/F-papG-sfaD/E-iucD-iutA</i>	1 (1,3)
Nessun gene	8 (10,4)
<b>Totale</b>	<b>77 (100)</b>

Tra i ceppi considerati, sono stati identificati undici possibili profili di virulenza: 41 isolamenti (53,2%) hanno presentato i profili *fimH* (25 ceppi, 32,5%) o *fimH-iucD-iutA* (16 ceppi, 20,8%); analizzando il background filogenetico del profilo *fimH*, la distribuzione è maggiore nei ceppi del gruppo A (17) rispetto a quelli del gruppo B1 (7) e il profilo si osserva anche in un *E. coli* del gruppo D.

Per il profilo *fimH-iucD-iutA* la positività è maggiore nei ceppi del gruppo B1 (10) rispetto a quelli del gruppo A (6);

per gli altri profili di virulenza, i ceppi che presentano il profilo *iucD-iutA* appartengono in modo simile al gruppo A (5 ceppi) o al gruppo B1 (4 ceppi).

Il profilo *fimH-iucD* è prevalente nei ceppi del gruppo A (5 casi), mentre sono positivi 2 del gruppo B1 e uno del D; il profilo *fimH-iutA* si osserva in modo uniforme tra i ceppi del gruppo B1 (3 ceppi) e A (2 ceppi).

I geni *papG* si trovano nei profili con quattro o più geni di virulenza, tra cui *iucD* e *iutA*; profili simili, con la presenza di *papG* e/o *cnfl* sono stati riscontrati negli isolamenti del gruppo B1. Questi ultimi risultano inoltre positivi per i profili *fimH-sfaD/E* e *fimH-hlyA* mentre il profilo *fimH-kpsMTII* si osserva in un ceppo del gruppo A.

#### Sensibilità agli antibiotici

I risultati delle prove di sensibilità agli antibiotici, eseguiti con la tecnica degli aloni d'inibizione, sono qui di seguito riportati nella Tabella 5.

**Tabella 5.** Risultati degli antibiogrammi (metodo degli aloni d'inibizione).  
**Table 5.** Results of the antibiotic-sensitivity test (Kirby-Bauer technique).

	Isolamenti		
	Sensibili (%)	Intermedi (%)	Resistenti (%)
<b>Aminosidina</b>	52 (67,5)	7 (9,1)	18 (23,4)
<b>Gentamicina</b>	47 (61)	19 (24,7)	11 (14,3)
<b>Danofloxacine</b>	44 (57,1)	13 (16,9)	20 (26)
<b>Enrofloxacin</b>	40 (51,9)	12 (15,6)	25 (32,5)
<b>Marbofloxacine</b>	59 (76,6)	4 (5,2)	14 (18,2)
<b>Trimethoprim + Sulfadimetossina</b>	13 (16,9)	0 (0)	64 (83,1)

## DISCUSSIONE

*Escherichia coli* è il principale agente eziologico delle infezioni urinarie (UTI) in molte specie animali e nell'uomo; e nella maggior parte dei casi, e così avviene anche nelle scrofe, i ceppi in grado di determinare le forme cliniche si selezionano dalla flora fecale e le loro capacità patogeniche dipendono dal loro corredo di fattori di virulenza.

Questi ultimi, codificati dai rispettivi geni, consentono ai batteri di aderire all'urotelio della mucosa, favoriscono la colonizzazione e la persistenza nel tratto urinario, causando una risposta infiammatoria locale e, in qualche caso, anche lesioni tissutali (Mulvey, 2002).

Obiettivo principale del nostro lavoro è stato dunque l'individuazione dei fattori di virulenza degli isolamenti di *E. coli*, provenienti da UTI acute o subacute di scrofe a diversi livelli di carriera; allo scopo, è stato impiegato un sistema genotipico basato sulla metodica di PCR. Considerando le similitudini anatomiche e fisiologiche, era attesa una certa similitudine tra i fattori di virulenza dei ceppi UPEC dell'uomo e del suino.

È stata confermata la prevalenza elevata del gene *fimH*, identificato in 58 ceppi, in 25 dei quali non sono stati dimostrati altri geni di virulenza; ciò conferma che le fimbrie tipo 1 sono fattori importanti, che possono contribuire alla patogenicità dei ceppi di *E. coli*. A questo proposito, è stata avanzata l'ipotesi che l'adesione mediata da tali fimbrie possa avere un ruolo importante nell'induzione di processi infiammatori, aumentando la patogenicità dei ceppi che le possiedono (Tiba & coll., 2008).

Trentatré isolamenti positivi per *fimH* presentano anche altri geni di virulenza. La presenza di altre adesine, codificate dai geni *pap* o *sfa*, è presente, seppur in un numero ridotto di casi; questo dato conferma l'associazione, già segnalata negli UPEC (Johnson & coll., 2005) del gene *fimH* con le fimbrie tipo P e S.

Le fimbrie del tipo P contribuiscono alla patogenesi delle infezioni, promuovendo la colonizzazione di *E. coli* e stimolando una risposta infiammatoria spesso imponente (Wullt & coll., 2000).

Le analisi in PCR sono state eseguite anche per il rilievo dei geni associati alla *outer membrane usher* (*papC*), alla sub-unità strutturale minore (*papE/F*) e all'allele per le adesine *papG* (*papGI*, *papGII*, *papGIII*); le classi di quest'ultimo genotipo si differenziano sulla base della specificità recettoriale e del tipo di infezione (Mulvey, 2002): quelle di classe II sono frequenti nei casi di pielonefrite e batteriemia, mentre quelle di classe III si trovano prevalentemente in caso di cistite, e più raramente nella pielonefrite e nella batteriemia (Féria & coll., 2001).

I ceppi *papGI* dovrebbero essere più diffusi tra quelli di derivazione fecale. Diversamente da quanto riportato in letteratura, solo due ceppi tra quelli considerati sono positivi per i geni *papG* e in particolare per quello di classe III; una positività così bassa non era nelle attese e potrebbe

indicare un minor livello di patogenicità degli isolamenti, validando di fatto la connotazione delle UTI della scrofa come sindrome condizionata da fattori che aumentano la recettività individuale, anche nei confronti di batteri relativamente patogeni.

L'associazione delle fimbrie tipo P con l'aerobactina, evidenziata in entrambi i ceppi positivi per i geni *papG*, è supportata dai dati di letteratura, che indicano la presenza contemporanea di questi due fattori nei ceppi che causano cistite (Katouli & coll., 2005); le fimbrie tipo S sono associate a *E. coli* che provocano pielonefrite, meningite e sepsi, anche se recentemente è stato ipotizzato un loro ruolo nelle cistiti (Tiba & coll., 2008); tra quelli analizzati e come riportato in letteratura (Tiba & coll., 2008) solo due presentano contemporaneamente il gene *sfaD/E* e altri tipi di adesine (*fimH* e/o geni *pap*).

Negli UPEC dell'uomo, l'emolisina è un fattore di virulenza molto importante (Raksha & coll., 2003) mentre per quanto riguarda il suino, le indicazioni della letteratura riportano una positività variabile tra 0% e 25,8%; più recentemente, Krag e collaboratori hanno dimostrato l'emolisina nel 5% dei ceppi analizzati (Krag & coll., 2009). Pertanto, la verifica della sua presenza nei ceppi di derivazione suina era uno degli obiettivi del lavoro; invece, il gene *hlyA* che codifica per questo fattore, è stato dimostrato in un solo isolamento (1,3% sul totale).

Il gene *cnf1*, identificato in due ceppi, è presente in associazione con altri fattori di virulenza, in particolare *iucD* e *iutA* e in un ceppo anche con le fimbrie del tipo P; la presenza simultanea di CNF1, fimbrie di tipo P e emolisina, codificati da geni presenti nella stessa isola di patogenicità e segnalata negli isolamenti dall'uomo (Johnson & Stell, 2000) non è invece stata evidenziata nei ceppi da noi considerati.

L'acquisizione del ferro è indispensabile e quindi critica per i patogeni che moltiplicano nei siti di infezione extra-intestinali, dove la concentrazione di questo ione è normalmente scarsa; uno dei sistemi di acquisizione del ferro è la produzione di siderofori, codificata dai geni *iucD* e *iutA* e presente in molti dei ceppi analizzati (*iucD* 46,8% e *iutA* 42,9%).

Gran parte dei ceppi UPEC responsabili di pielonefrite nell'uomo presenta una capsula di tipo II (Tiba & coll., 2008) mentre negli isolamenti dalla scrofa è presente in un solo caso.

Le combinazioni dei fattori di virulenza nei ceppi di *E. coli* individuano diversi profili e gruppi filogenetici diversi; profili di virulenza simili in ceppi appartenenti a gruppi filogenetici diversi può essere indicativa della trasmissibilità dei geni correlati alla virulenza (Graziani & coll., 2009).

Per concludere, i profili di virulenza dei ceppi analizzati non sono sempre sovrapponibili a quelli degli UPEC dell'uomo; in particolare, nei ceppi suini la presenza delle fimbrie (P e S) e dell'emolisina è inferiore rispetto a quelli umani. L'analisi dei gruppi filogenetici ha rilevato nelle scrofe una presenza preponderante del gruppo A e del gruppo B1, confermando quanto riportato in letteratura riguardo ai suini (Krag & coll., 2009), mentre nell'uomo i ceppi uropatogeni appartengono ai gruppi B2 e D. I nostri dati indicano che i ceppi con più di un fattore di virulenza prevalgono nel gruppo B1 rispetto al gruppo A; è anche da rimarcare la presenza di tre ceppi del gruppo D, normalmente associato alle patologie nell'uomo e così poco diffuso nel suino da non consentire conclusioni specifiche sull'effettivo ruolo patogeno.

Le fimbrie del tipo 1 e il sistema aerobactina sono i fattori di virulenza più diffusi negli isolamenti esaminati e ciò rende legittima l'ipotesi che da soli abbiano un ruolo importante nella colonizzazione delle vie urinarie delle scrofe; ciò non si verifica nell'uomo, dove sembrano essere necessari altri fattori di virulenza, ed è quindi probabile che le condizioni degli animali o l'ambiente favoriscano l'infezione.

Riguardo all'antibiotico-sensibilità, è evidente che la maggior parte degli isolamenti è sensibile ai principi attivi esaminati (eccezion fatta per l'associazione trimetoprim-sulfadimetossina); considerando la poli-antibiotico-resistenza spesso associata alle forme enteriche giovanili del suino, questa indicazione va interpretata riguardo alla provenienza delle infezioni.



Marbofloxacin è il principio attivo più efficace tra i fluorochinoloni, mentre tra gli aminoglicosidi, amikacin ha dato risultati migliori rispetto a gentamicina; sono invece piuttosto sconcertanti, e confermano le oggettive difficoltà d'impiego terapeutico, i risultati ottenuti con l'associazione sulfamidico-trimethoprim.

Infine, è opportuno non dimenticare che gli isolamenti provengono da casi conclamati di UTI e che quindi il mantenimento dell'antibiotico-sensibilità potrebbe rappresentare un indicatore di "mancato trattamento", vale a dire dell'ancora scarsa sensibilità degli allevatori a un problema che in altre realtà suinicole (soprattutto nord-Europee) è stato già da tempo affrontato e in buona misura risolto.

Questo lavoro costituisce la logica prosecuzione di un percorso di ricerca sulle UTI, iniziato con la verifica dell'effettiva presenza del problema nelle scrofaie italiane; in quella sede era stata dimostrata l'importanza eziologica di *Escherichia coli*, mentre in questo studio abbiamo considerato la connotazione genomica degli isolamenti dalle scrofe, per verificarne l'espressione patogena e l'eventuale similitudine con gli analoghi uropatogeni dell'uomo.

## BIBLIOGRAFIA

- Clermont O., Bonacorsi S. & Bingen E. (2000). Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol.*; 66(10): 4555-8.
- Féria C., Machado J., Duarte Correia J., Gonçalves J. & Gaastra W. (2001). Distribution of papG alleles among uropathogenic *Escherichia coli* isolated from different species. *FEMS Microbiol Lett.*; 202(2): 205-8.
- Graziani C., Luzzi I., Corro M., Tomei F., Parisi G., Giuffrè M., Morabito S., Caprioli A. & Cerquetti M. (2009). Phylogenetic background and virulence genotype of ciprofloxacin-susceptible and ciprofloxacin-resistant *Escherichia coli* strains of human and avian origin. *J Infect Dis.*; 199(8): 1209-17.
- Gusmara C., Invernizzi F., Andreoni S., Teli L., Mazzotti A. & Sala V. (2010). Osservazioni diagnostiche sulle infezioni urinarie (uti) della scrofa". *Atti del XXXVI Meeting della Società Italiana di Patologia ed Allevamento dei Suini*, pag. 198-204.
- Johnson J.R., Kuskowski M.A., O'Bryan T.T., Colodner R. & Raz R. (2005). Virulence genotype and phylogenetic origin in relation to antibiotic resistance profile among *Escherichia coli* urine sample isolates from Israeli women with acute uncomplicated cystitis. *Antimicrob. Agents Chemother.*; 49(1): 26-31.
- Johnson J.R. & Stell A.L. (2000). Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J Infect Dis.*; 181(1): 261-72.
- Kanamaru S., Kurazono H., Ishitoya S., Terai A., Habuchi T., Nakano M., Ogawa O. & Yamamoto S. (2003). Distribution and genetic association of putative uropathogenic virulence factors iroN, iha, kpsMT, ompT and usp in *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections in Japan. *J Urol.*; 170(6 Pt 1): 2490-3.
- Katouli M., Brauner A., Haghghi L.K., Kaijser B., Muratov V. & Möllby R. (2005). Virulence characteristics of *Escherichia coli* strains causing acute cystitis in young adults in Iran. *J Infect.*; 50(4): 312-21.
- Krag L., Hancock V., Aalbaek B. & Klemm P. (2009). Genotypic and phenotypic characterization of *Escherichia coli* strains associated with porcine pyelonephritis. *Vet Microbiol.*; 134(3-4): 318-26.
- Marre R., Hacker J., Henkel W. & Goebel W. (1986). Contribution of cloned virulence factors from uropathogenic *Escherichia coli* strains to nephropathogenicity in an experimental rat pyelonephritis model. *Infect. Immun.* 54: 761-67.
- Marrs C.F., Zhang L., Tallman P., Manning S.D., Somsel P., Raz. P, Colodner R., Jantunen M.E., Siitonen A., Saxen H. & Foxman B. (2002). Variations in 10 putative uropathogen

- virulence genes among urinary, faecal and peri-urethral *Escherichia coli*. J Med Microbiol.; 51(2): 138-42.
- Marrs C.F., Zhang L. & Foxman B. (2005). *Escherichia coli* mediated urinary tract infections: are there distinct uropathogenic *E. coli* (UPEC) pathotypes? FEMS Microbiology Letters, 252: 183-90.
  - Martineau G.P. & Almond G. (2008). Urinary tract infections in female pigs". CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources 3 (048): 1-9.
  - Mulvey M.A. (2002). Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. Cell Microbiol.; 4(5): 257-71.
  - Orden J.A., Dominguez-Bernal G., Martínez-Pulgarín S., Blanco M., Blanco J.E., Mora A., Blanco J. & de la Fuente R. (2007). Necrotoxigenic *Escherichia coli* from sheep and goats produce a new type of cytotoxic necrotizing factor (CNF3) associated with the *eae* and *ehxA* genes. Int. Microbiol.; 10(1): 47-55.
  - Picard B., Garcia J.S., Gouriou S., Duriez P., Brahimi N., Bingen E., Elion J. & Denamur E. (1999). The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. Infect Immun.; 67(2): 546-53.
  - Raksha R., Srinivasa H. & Macaden R.S. (2003). Occurrence and characterization of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract infections. Indian J Med Microbiol.; 21(2): 102-7.
  - Roos V., Nielsen E.M. & Klemm P. (2006). Asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli* strains: adhesins, growth and competition. FEMS Microbiol Lett.; 262(1): 22-30.
  - Tiba M.R., Yano T. & Leite Dida S. (2008). Genotypic characterization of virulence factors in *Escherichia coli* strains from patients with cystitis. Rev Inst Med Trop Sao Paulo; 50(5): 255-60.
  - Tóth I., Héroult F., Beutin L. & Oswald E. (2003). Production of cytolethal distending toxins by pathogenic *Escherichia coli* strains isolated from human and animal sources: establishment of the existence of a new *cdt* variant (Type IV). J Clin Microbiol.; 41(9): 4285-91.
  - Wullt B., Bergsten G., Connell H., Röllano P., Gebretsadik N., Hull R. & Svanborg C. (2000). P fimbriae enhance the early establishment of *Escherichia coli* in the human urinary tract. Mol Microbiol.; 38(3): 456-64.