

Understanding avian pathogenic Escherichia coli

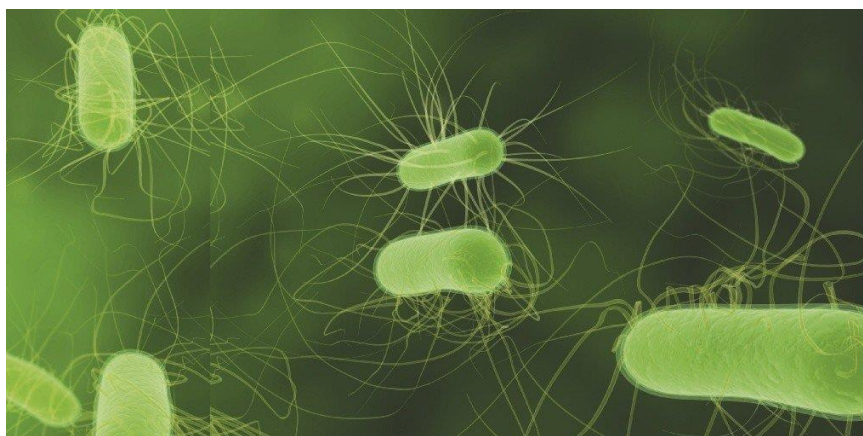
Colibacillosis and associated diseases caused by pathogenic Escherichia coli strains have long burdened the global poultry industry. However, advances in analytical research tools and feed additive technologies provide an opportunity both to understand the issue better and incorporate targeted nutritional strategies in a risk management plan.

BY EVAN CHANEY, CARGILL AND TIMOTHY JOHNSON, UNIVERSITY OF MINNESOTA

Avian Pathogenic E. coli, or simply APEC, is an extra-intestinal subgroup of pathogenic Escherichia coli that can cause disease in susceptible poultry, most commonly leading to clinical colibacillosis. Because colibacillosis is generally a secondary disease — and E. coli and APEC are extremely diverse — it has been challenging to identify and differentiate between APEC strains. For decades, commensal E. coli inhabitants of the poultry gut have been largely differentiated from pathogenic variants like APEC using classical serotyping, specific virulence gene markers and the associated disease pathology. Today, however, these basic concepts are increasingly challenged by advances in molecular research and field observations.

Evolving APEC pathotype

Historically, clinical isolates from diseased birds were often dominated by serogroup O78 or O2, which was reported in textbooks for years. Early in the 21st century plasmids known as 'ColV' and 'ColBM' were identified among specific APEC-containing virulence genes — these have been subsequently referred to as the APEC plasmids and are recognised as a differentiating feature of isolates from various serogroups causing colibacillosis. Advances such as genome sequencing and bioinformatics, coupled with changing etiology, have begun to reveal a more complex disease process and variability among isolates. New serogroups are continually emerging and the presence of an APEC plasmid alone is now considered insufficient to predict virulence, as these plasmids are now commonly found in commensal E. coli from a healthy avian gastrointestinal tract. The use of high-resolution genomics has revealed that APEC likely becomes successful through a mix-and-match combination of certain serogroup or sequence type chromosomal backgrounds combined with APEC plasmid variants. Clearly, there are dominant mix-andmatch combinations which are responsible for the vast majority of colibacillosis cases in poultry, and there is substantial strain overlap across different bird types raised for poultry production.



Avian Pathogenic E. coli, or simply APEC, is an extra-intestinal subgroup of pathogenic Escherichia coli that can cause disease in susceptible poultry, most commonly leading to clinical colibacillosis.

PHOTO: DREAMSTIME

Non-specific management of APEC risk

Like most disease-causing microbial agents, intervening in the transmission cycle is essential to preventing exposure. An emphasis on biosecurity and general management practices are the primary defences against APEC intrusion into a flock. APEC may enter a system via multiple routes and, aside from vertical transmission from breeder stock, used litter may be a leading exposure source. However, exposure alone does not indicate a strong probability of an outbreak, as APEC is very likely to be present in most healthy flocks. While some APEC are capable of eliciting disease alone, APEC risk is highest when a population becomes susceptible as a result of stress from environmental or primary infectious sources, increasingly compromising flock and individual bird resilience. While APEC is transmitted via the faecal-oral route, respiratory transmission also occurs and is the primary route of disease. Environmental stressors, such as increasing ammonia levels or dust, increase respiratory stress and exacerbate disease susceptibility. Other stress stimuli, such as heat stress, nutrient deficiencies or other disease challenges, also increase susceptibility to APEC, emphasising the focus on biosecurity and good management practices.

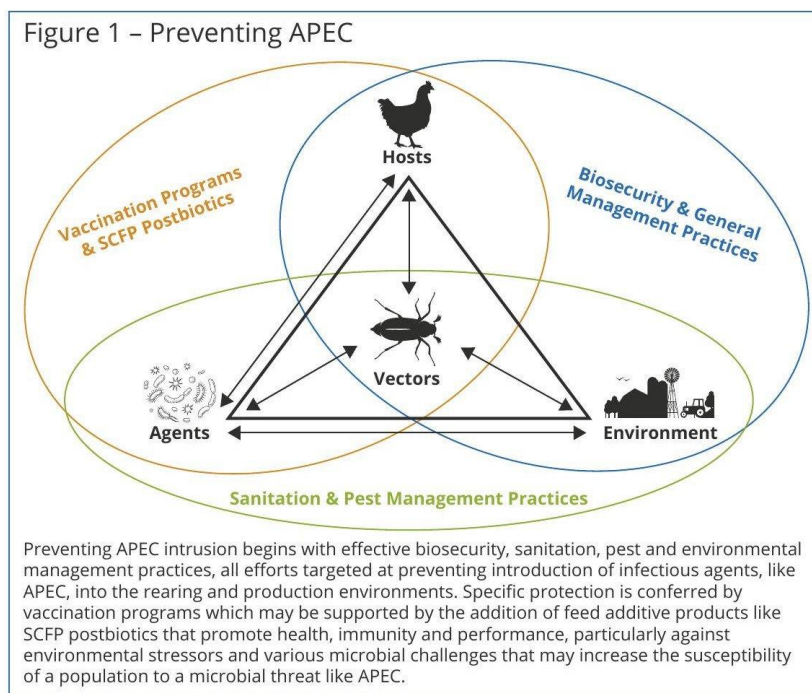
Specific management of APEC risk

The most common and targeted preventative tool to reduce APEC risk is vaccination. A commercially-available live-attenuated vaccine is available for serogroup 078 and offers some degree of cross protection for other serogroups. However, APEC vaccination is often customised for an operation by the development and administration of autogenous vaccines. In general, vaccination approaches confer protection against problematic APEC strains that may be predominant and endemic to an operation or geographical region. However, other serogroups or strains may emerge for which the vaccine does not offer protection. While there is ongoing research on novel vaccine technologies that would offer broad, heterologous protection, most are far from gaining regulatory approval or commercial availability. Vaccination is likely to benefit from the combined application of other technologies, such as antibiotic-alternative feed additives that promote health through modulation of the immune system and gut microbiome, thereby potentially helping to reduce susceptibility to APEC. The use of such technologies could, for example, support vaccination efforts and improve general resilience over production life, consistent with their daily use.

Feed additive technologies

As mentioned, feed additives that promote gut health, microbiome and immune system modulation generally may support improved systemic health and therefore resilience against environmental stressors and infectious challenges, such as APEC. In recent years, postbiotics derived from proprietary ex vivo *Saccharomyces cerevisiae* fermentations, often described as *Saccharomyces cerevisiae* fermentation products (SCFPs), have increasingly been evaluated in various animal species. In poultry, these products have been shown to play a role in supporting improved functional health, performance and disease resilience. Environmental stressors increase susceptibility to APEC infections because of compromised immunity. Thus improved stress responses modulated by effective feed additives can aid in offsetting adverse impacts on production and increased susceptibility to infectious diseases. A common environmental source in poultry production is heat stress. To give an example, SCFP postbiotic administration was evaluated in a broiler heat stress model in which the SCFP postbiotic significantly lowered corticosterone, heterophil/ lymphocyte ratios and physical asymmetry scores. In another study, two levels of SCFP postbiotic inclusion were compared to a control diet in broilers challenged with *Eimeria tenella*, demonstrating that SCFP postbiotic support improved average daily gain and

significantly increased CD3+, CD4+, and CD8+ T-lymphocyte counts, as well as other immunity markers. From these studies we may conclude that SCFP postbiotic supplementation helps improve immune function and growth performance under coccidia challenge, a primary disease stressor. SCFP postbiotics have repeatedly been associated with reductions in the colonisation potential of various Salmonella serovars, as well as Campylobacter spp. In view of the taxonomical similarities shared by Salmonella and E. coli, as well as the overall impact of the additive on improving performance and health responses under various challenges, it is reasonable to consider SCFP postbiotic a candidate feed additive solution for managing APEC risk. Thereby supporting existing biosecurity, management and vaccination strategies. A study in the proceedings of the 2022 American Association of Avian Pathologists (AAAP) conference reported on the evaluation of SCFP postbiotic in an APEC 078 direct challenge model. The study divided 120 chickens into eight experimental groups of which four were fed a control diet and the remainder were fed the same diet supplemented with the SCFP postbiotic feed additive. At 14 days of age, the chickens were challenged via an oral or intratracheal route with APEC 078 and subsequently necropsied at 21 days of age with colibacillosis lesion scoring and tissue sampling for APEC enumeration. The authors of the study reported "consistently lower lesion scores" for those APEC-challenged birds fed the SCFP postbiotic product, suggesting a potential protective effect was imparted.



Prospective solutions

Phytogenics, or plant extract-based feed additives, as well as organic acids may also hold promise as prospective solutions for managing APEC risk. A variety of plant extracts, like SCFP postbiotics, have demonstrated varying effectiveness in modulating immunity and microbiome dynamics under various stress or infectious challenge models. A recent study, for example, reported on the combination of thyme and carvacrol essential oils in combination with hexanoic, benzoic and butyric acids in an APEC 078 broiler challenge model. The comprehensive study reported the combined treatment was associated with lower gross lesion scores and E. coli colonisation, improved feed conversion and modulation of a variety of immune markers and microbiome taxa. Collectively, these effects contributed to mild alleviation of disease severity induced by the APEC

#FunduszePromocji

078 challenge. In another study, researchers explored garlic and ginger extract supplementation in broiler chicks challenged with a multi-drug resistant APEC 078 isolate after in vivo and ex vivo research demonstrated favourable microbial growth inhibition and enhanced immunomodulatory outcomes. Birds receiving the dietary extracts for three weeks prior to challenge were reported to have significantly reduced mortality and tissue colonisation loads when compared to the challenged controls. The addition of oregano essential oil to drinking water was comparatively evaluated with difloxacin and controls as a therapeutic intervention to an APEC 027 intra-tracheal challenge. Birds were evaluated and sampled in intervals up to 21 days post infection with detailed hematological, biochemical and histological analyses. Oregano essential oil supported livability comparatively to the antibiotic treatment and, similarly, provided indications of reduced severity of the infection comparable to the antibiotic, leading researchers to conclude that it has practical use as an antibiotic alternative, and a hepato and nephro-protective therapeutic. Other research groups have recently reported in vitro effects of phytogetic extracts, such as cinnamon essential oil and combinations of multiple compounds, against multiple serotypes and strains of APEC isolates, perhaps strengthening the idea that such feed-additive products may confer added protection alongside vaccination alone and risk management practices.

In conclusion, there is unlikely to be a single solution to all known or emergent APEC strains. However, growing evidence suggests that feed additive technologies, particularly postbiotics and phytogetics, may offer benefits in promoting resilience against APEC infection and, subsequently, help reduce the severity of infection if it occurs. Notably, many of these products are likely to be complementary to co-administer together with APEC vaccines and also aid in managing other biosecurity-related concerns, such as foodborne pathogens (*Salmonella* or *Campylobacter*), or other microbial agents of concern for poultry health and welfare. However, feed additives vary greatly in function, application and mechanisms which also need to be considered. Ultimately, vaccination, biosecurity and good farm management practices will remain key preventative measures against APEC for the foreseeable future. However, the right feed additive solutions are likely to provide additional support and should be carefully considered as part of the nutritional strategy.

Zrozumienie chorobotwórczych szczepów *Escherichia coli* u ptaków

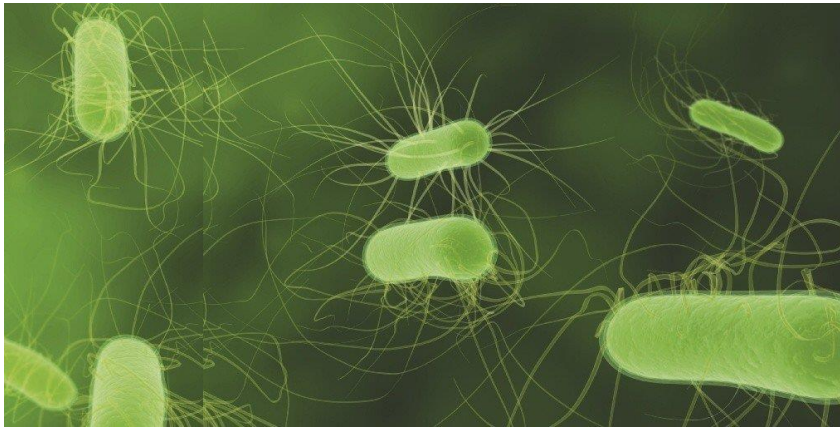
Kolibakterioza i związane z nią choroby wywoływane przez patogenne szczepy *Escherichia coli* od dawna obciążają światowy przemysł drobiarski. Jednak postępy w analitycznych narzędziach badawczych i technologiach dodatków paszowych dają możliwość zarówno lepszego zrozumienia problemu, jak i włączenia ukierunkowanych strategii żywieniowych do planu zarządzania ryzykiem.

EVAN CHANEY, CARGILL I TIMOTHY JOHNSON, UNIWERSYTET W MINNESOCIE

Ptasie patogenne *E. coli*, lub po prostu APEC, to pozajelitowa podgrupa patogennych *Escherichia coli*, która może powodować choroby u podatnego drobiu, najczęściej prowadzące do klinicznej kolibakteriozy. Ponieważ kolibakterioza jest na ogół chorobą wtórną - a *E. coli* i APEC są niezwykle zróżnicowane - identyfikacja i rozróżnienie szczepów APEC stanowiło wyzwanie. Przez dziesięciolecia komensalni mieszkańcy jelit drobiu *E. coli* byli w dużej mierze odróżniani od wariantów patogennych, takich jak APEC, przy użyciu klasycznego serotypowania, specyficznych markerów genów wirulencji i powiązanej patologii choroby. Obecnie jednak te podstawowe koncepcje są coraz częściej kwestionowane przez postępy w badaniach molekularnych i obserwacjach terenowych.

Ewolucja patotypu APEC

Historycznie, kliniczne izolaty od chorych ptaków były często zdominowane przez serogrupę 078 lub 02, które przez lata były opisywane w podręcznikach. Na początku XXI wieku zidentyfikowano plazmidy znane jako "ColV" i "ColBM" wśród specyficznych genów wirulencji zawierających APEC - zostały one następnie nazwane plazmidami APEC i są uznawane za cechę różnicującą izolaty z różnych serogrup powodujących kolibakteriozę. Postępy, takie jak sekwencjonowanie genomu i bioinformatyka, w połączeniu ze zmieniającą się etiologią, zaczęły ujawniać bardziej złożony proces chorobowy i zmienność wśród izolatów. Nieustannie pojawiają się nowe serogrupy, a sama obecność plazmidu APEC jest obecnie uważana za niewystarczającą do przewidywania zjadliwości, ponieważ plazmidy te są obecnie powszechnie spotykane w komensalnych *E. coli* ze zdrowego przewodu pokarmowego ptaków. Zastosowanie genomiki o wysokiej rozdzielczości ujawniło, że APEC prawdopodobnie osiąga sukces dzięki kombinacji pewnych chromosomalnych środowisk serogrup lub typów sekwencji w połączeniu z wariantami plazmidów APEC. Najwyraźniej istnieją dominujące kombinacje typu mix-and-match, które są odpowiedzialne za zdecydowaną większość przypadków kolibakteriozy u drobiu, a także występuje znaczne nakładanie się szczepów u różnych gatunków ptaków hodowanych w drobiarstwie.



Ptasia patogenna E. coli, lub po prostu APEC, jest pozajelitową podgrupą patogennej Escherichia coli, która może powodować choroby u podatnego drobiu, najczęściej prowadząc do klinicznej kolibakteriozy. FOTO: DREAMSTIME

Niespecyficzne zarządzanie ryzykiem APEC

Podobnie jak w przypadku większości czynników mikrobiologicznych wywołujących choroby, interwencja w cyklu przenoszenia jest niezbędna do zapobiegania zakażeniom. Nacisk na bezpieczeństwo biologiczne i ogólne praktyki zarządzania są podstawowymi środkami obrony przed wtargnięciem APEC do stada. APEC może przedostać się do systemu wieloma drogami, a oprócz pionowej transmisji ze stada hodowlanego, głównym źródłem narażenia może być zanieczyszczona ściółka. Jednak samo narażenie nie wskazuje na duże prawdopodobieństwo wybuchu epidemii, ponieważ APEC prawdopodobnie występuje w większości zdrowych stad. Podczas gdy niektóre APEC są w stanie same wywołać chorobę, ryzyko APEC jest najwyższe, gdy populacja staje się podatna w wyniku stresu środowiskowego lub pierwotnych źródeł zakaźnych, co w coraz większym stopniu osłabia odporność stada i poszczególnych ptaków. Chociaż APEC jest przenoszony drogą fekalno-oralną, występuje również przenoszenie drogą oddechową i jest to główna droga choroby. Środowiskowe czynniki stresogenne, takie jak wzrost poziomu amoniaku lub pyłu, zwiększają stres oddechowy i zwiększają podatność na choroby. Inne bodźce stresowe, takie jak stres cieplny, niedobory składników odżywczych lub inne wyzwania chorobowe, również zwiększają podatność na APEC, podkreślając nacisk na bezpieczeństwo biologiczne i dobre praktyki zarządzania.

Specyficzne zarządzanie ryzykiem APEC

Najbardziej powszechnym i ukierunkowanym narzędziem zapobiegawczym w celu zmniejszenia ryzyka APEC są szczepienia. Dostępna na rynku żywa szczepionka atenuowana jest dostępna dla serogrupy 078 i oferuje pewien stopień ochrony krzyżowej dla innych serogrup. Jednak szczepienia APEC są często dostosowywane do potrzeb danej operacji poprzez opracowanie i podanie szczepionek autogennych. Ogólnie rzecz biorąc, szczepienia zapewniają ochronę przed niebezpiecznymi szczepami APEC, które mogą być dominujące i endemiczne dla danej lokalizacji lub regionu geograficznego. Mogą jednak pojawić się inne grupy serologiczne lub szczepy, przed którymi szczepionka nie zapewnia ochrony. Chociaż trwają badania nad nowymi technologiami szczepionek, które zapewniałyby szeroką, heterologiczną ochronę, większość z nich jest daleka od uzyskania zatwierdzenia przez organy regulacyjne i dostępności komercyjnej. Szczepienia prawdopodobnie skorzystają z połączonego zastosowania innych technologii, takich jak alternatywne dla antybiotyków dodatki paszowe, które promują zdrowie poprzez modulację układu odpornościowego i mikrobiomu jelitowego, potencjalnie pomagając w ten sposób zmniejszyć podatność na APEC. Wykorzystanie takich technologii mogłoby na przykład wesprzeć

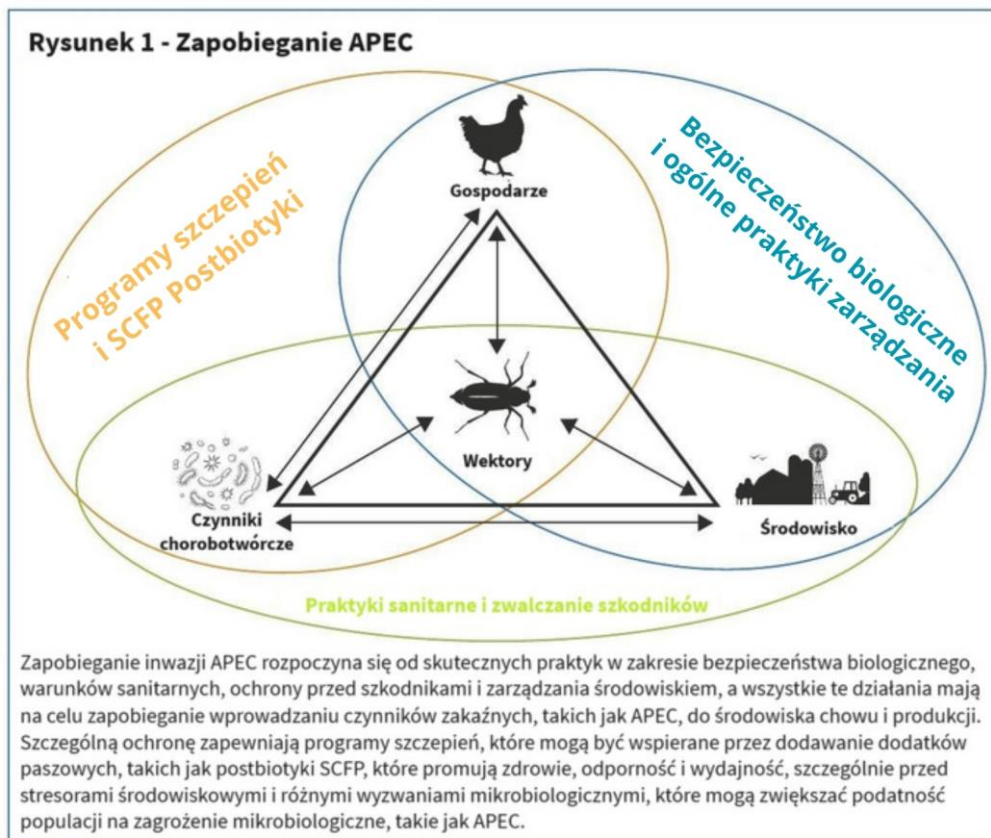
#FunduszePromocji

wysiłki związane ze szczepieniami i poprawić ogólną odporność w całym okresie produkcji, zgodnie z ich codziennym stosowaniem.

Technologie dodatków paszowych

Jak wspomniano, dodatki paszowe, które promują zdrowie jelit, mikrobiom i modulację układu odpornościowego, mogą ogólnie wspierać poprawę zdrowia systemowego, a tym samym odporność na stresory środowiskowe i wyzwania zakaźne, takie jak APEC. W ostatnich latach postbiotyki pochodzące z własnej fermentacji *ex vivo* *Saccharomyces cerevisiae*, często określane jako produkty fermentacji *Saccharomyces cerevisiae* (SCFP), są coraz częściej oceniane u różnych gatunków zwierząt. W przypadku drobiu wykazano, że produkty te odgrywają rolę we wspieraniu poprawy zdrowia funkcjonalnego, wydajności i odporności na choroby. Stresory środowiskowe zwiększają podatność na infekcje APEC z powodu obniżonej odporności. Dlatego też lepsza reakcja na stres modulowana przez skuteczne dodatki paszowe może pomóc w zrównoważeniu niekorzystnego wpływu na produkcję i zwiększonej podatności na choroby zakaźne. Powszechnym źródłem stresu środowiskowego w produkcji drobiu jest stres cieplny. Dla przykładu, podawanie postbiotyku SCFP oceniano w modelu stresu cieplnego brojlerów, w którym postbiotyk SCFP znacząco obniżył poziom kortykosteronu, stosunek heterofili do limfocytów i wyniki asymetrii fizycznej. W innym badaniu porównano dwa poziomy włączenia postbiotyku SCFP do diety kontrolnej u brojlerów zakażonych *Eimeria tenella*, wykazując, że wsparcie postbiotykiem SCFP poprawiło średni dzienny przyrost i znacząco zwiększyło liczbę limfocytów T CD3+, CD4+ i CD8+, a także inne markery odporności. Na podstawie tych badań można wywnioskować, że suplementacja postbiotykami SCFP pomaga poprawić funkcje odpornościowe i wydajność wzrostu w warunkach prowokacji kokcydiami, głównym stresorem chorobowym. Postbiotyki SCFP wielokrotnie wiązały się ze zmniejszeniem potencjału kolonizacji różnych serotypów *Salmonella*, a także *Campylobacter* spp. W świetle podobieństw taksonomicznych dzielonych przez *Salmonellę* i *E. coli*, a także ogólnego wpływu dodatku na poprawę wydajności i reakcji zdrowotnych w obliczu różnych wyzwań, uzasadnione jest uznanie postbiotyku SCFP za kandydata na dodatek paszowy do zarządzania ryzykiem APEC. W ten sposób wspierając istniejące strategie bezpieczeństwa biologicznego, zarządzania i szczepień. W badaniu opublikowanym podczas konferencji Amerykańskiego Stowarzyszenia Patologów Ptaków (AAAP) w 2022 r. przedstawiono ocenę postbiotyku SCFP w modelu bezpośredniego zagrożenia APEC 078. W badaniu podzielono 120 kurcząt na osiem grup eksperymentalnych, z których cztery karmiono dietą kontrolną, a pozostałe karmiono tą samą dietą uzupełnioną postbiotycznym dodatkiem paszowym SCFP. W wieku 14 dni kurczęta zostały zakażone APEC 078 drogą doustną lub dotchawiczą, a następnie poddane sekcji zwłok w wieku 21 dni z oceną zmian kolibakteriozy i pobraniem próbek tkanek w celu zliczenia APEC. Autorzy badania stwierdzili "konsekwentnie niższe wyniki zmian chorobowych" u ptaków zakażonych APEC karmionych postbiotykiem SCFP, co sugeruje potencjalny efekt ochronny.

Rysunek 1 - Zapobieganie APEC



Perspektywiczne rozwiązania

Fitogeniki lub dodatki paszowe na bazie ekstraktów roślinnych, a także kwasy organiczne mogą również stanowić obiecujące rozwiązania w zakresie zarządzania ryzykiem APEC. Różnorodne ekstrakty roślinne, takie jak postbiotyki SCFP, wykazały różną skuteczność w modulowaniu odporności i dynamiki mikrobiomu w różnych modelach stresu lub wyzwań infekcyjnych. Najnowsze badania donoszą na przykład o połączeniu olejków eterycznych z tymianku i karwakrolu z kwasami heksanowym, benzoesowym i masłowym w modelu prowokacji APEC 078 u brojlerów. Kompleksowe badanie wykazało, że połączone leczenie wiązało się z niższymi wynikami w zakresie uszkodzeń brutto i kolonizacji *E. coli*, lepszą konwersją paszy i modulacją różnych markerów odpornościowych i taksonów mikrobiomu. Łącznie efekty te przyczyniły się do lekkiego złagodzenia nasilenia choroby wywołanej prowokacją APEC 078. W innym badaniu naukowcy zbadali suplementację ekstraktem z czosnku i imbiru u kurcząt brojlerów zakażonych wielolekoopornym izolatem APEC 078 po tym, jak badania *in vivo* i *ex vivo* wykazały korzystne hamowanie wzrostu drobnoustrojów i lepsze wyniki immunomodulacyjne. Ptaki otrzymujące ekstrakty dietetyczne przez trzy tygodnie przed prowokacją miały znacznie zmniejszoną śmiertelność i obciążenie kolonizacją tkanek w porównaniu z grupą kontrolną. Dodatek olejku eterycznego z oregano do wody pitnej został oceniony porównawczo z difloksacyną i grupą kontrolną jako interwencja terapeutyczna w przypadku prowokacji dotchawiczej APEC 027. Ptaki oceniano i pobierano próbki w odstępach do 21 dni po zakażeniu, przeprowadzając szczegółowe analizy hematologiczne, biochemiczne i histologiczne. Olejek eteryczny z oregano wspomagał przeżywalność w porównaniu z antybiotykoterapią i, podobnie, zapewniał oznaki zmniejszonego nasilenia infekcji porównywalne z antybiotykiem, co doprowadziło naukowców do wniosku, że ma on praktyczne zastosowanie jako alternatywa dla antybiotyków oraz jako środek terapeutyczny chroniący wątrobę i nerki. Inne grupy badawcze niedawno zgłosiły *in vitro* działanie ekstraktów fitogenicznych, takich jak olejek eteryczny z cynamonu i kombinacje wielu związków, przeciwko

#FunduszePromocji

wielu serotypom i szczepom izolatów APEC, być może wzmacniając ideę, że takie produkty paszowe mogą zapewniać dodatkową ochronę oprócz samych szczepień i praktyk zarządzania ryzykiem.

Podsumowując, jest mało prawdopodobne, aby istniało jedno rozwiązanie dla wszystkich znanych lub pojawiających się szczepów APEC. Jednak coraz więcej dowodów sugeruje, że technologie dodatków paszowych, w szczególności postbiotyki i fitogeniki, mogą przynieść korzyści w promowaniu odporności na infekcje APEC, a następnie pomóc zmniejszyć nasilenie infekcji, jeśli do niej dojdzie. Warto zauważyć, że wiele z tych produktów może uzupełniać się ze szczepionkami APEC, a także pomagać w radzeniu sobie z innymi problemami związanymi z bezpieczeństwem biologicznym, takimi jak patogeny przenoszone przez żywność (*Salmonella* lub *Campylobacter*) lub inne czynniki mikrobiologiczne mające wpływ na zdrowie i dobrostan drobiu. Jednak dodatki paszowe różnią się znacznie pod względem funkcji, zastosowania i mechanizmów, które również należy wziąć pod uwagę. Ostatecznie szczepienia, bezpieczeństwo biologiczne i dobre praktyki zarządzania gospodarstwem pozostaną kluczowymi środkami zapobiegawczymi przeciwko APEC w dającej się przewidzieć przyszłości. Jednak odpowiednie rozwiązania w zakresie dodatków paszowych mogą zapewnić dodatkowe wsparcie i powinny być starannie rozważone jako część strategii żywieniowej.