



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Progetto di Ricerca Corrente 2011

Ricerca di *E. coli* O104:H4, di altri *E. coli* enteroaggregativi produttori di Shiga tossina e dei loro potenziali precursori in reflui zootecnici mediante PCR RT

N. identificativo progetto: IZS LT 03/11 RC

Data di avvio: 01/12/2012

Data di scadenza: 30/11/2015

Durata: 24 mesi

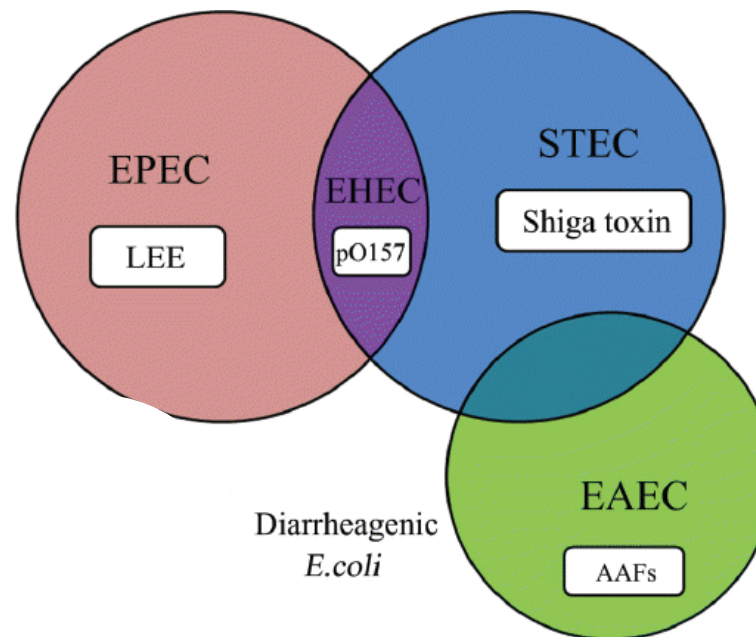


E. coli patogeni che causano diarrea

EHEC: *E. coli* enteroemorragici

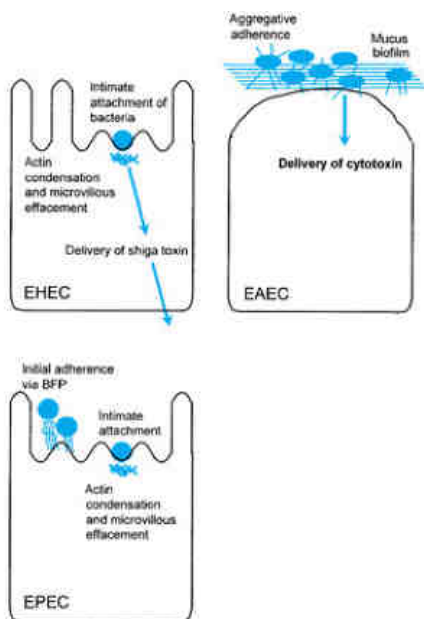
STEC: *E. coli* produttori di Shiga tossine

EPEC: *E. coli* enteropatogenici



Diarrheagenic
E. coli

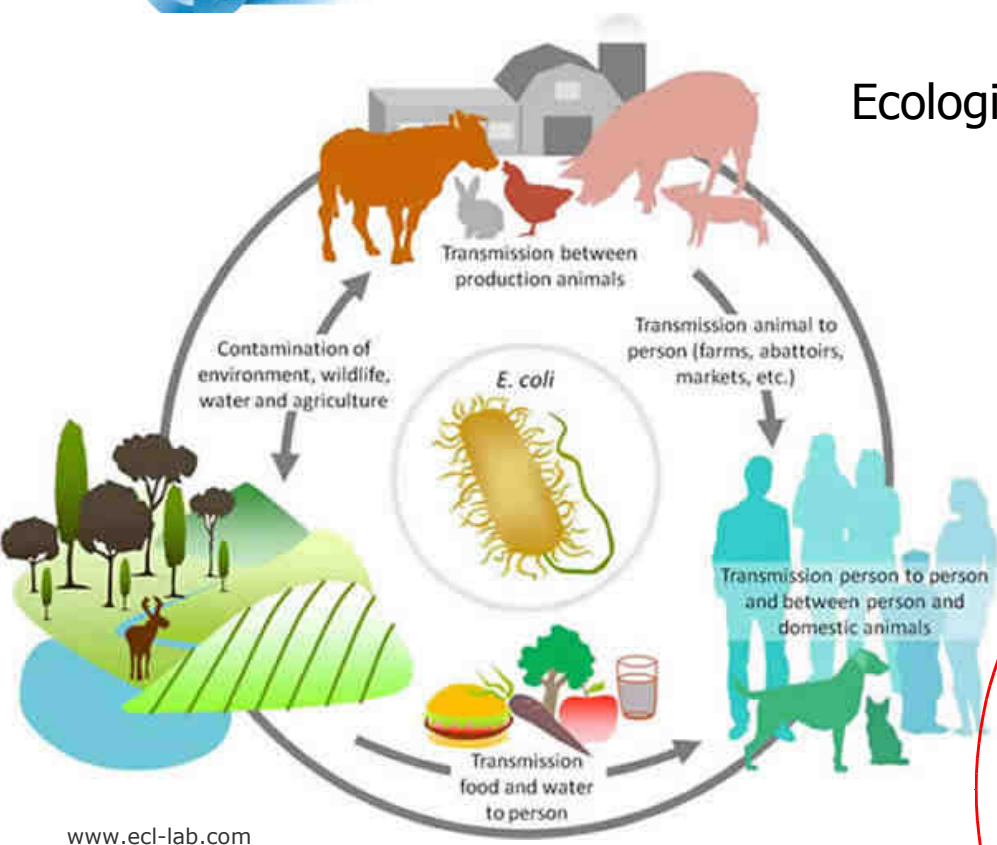
J. Prev. Vet. Med. Vol. 40, No. 4: 172-178, December 2016



EAEC: *E. coli* enteroaggregativi

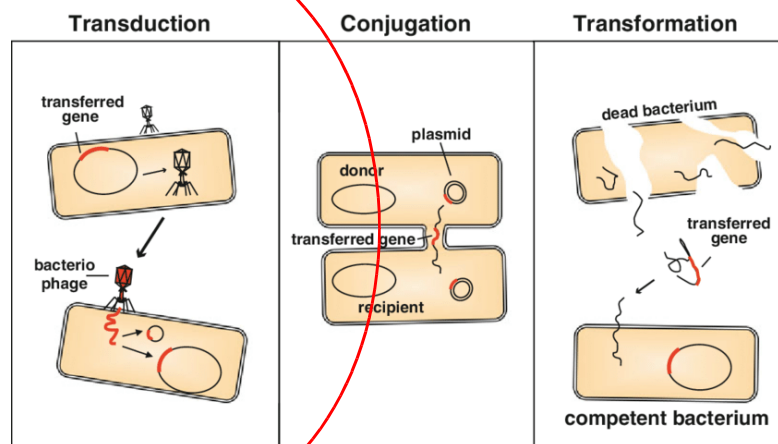


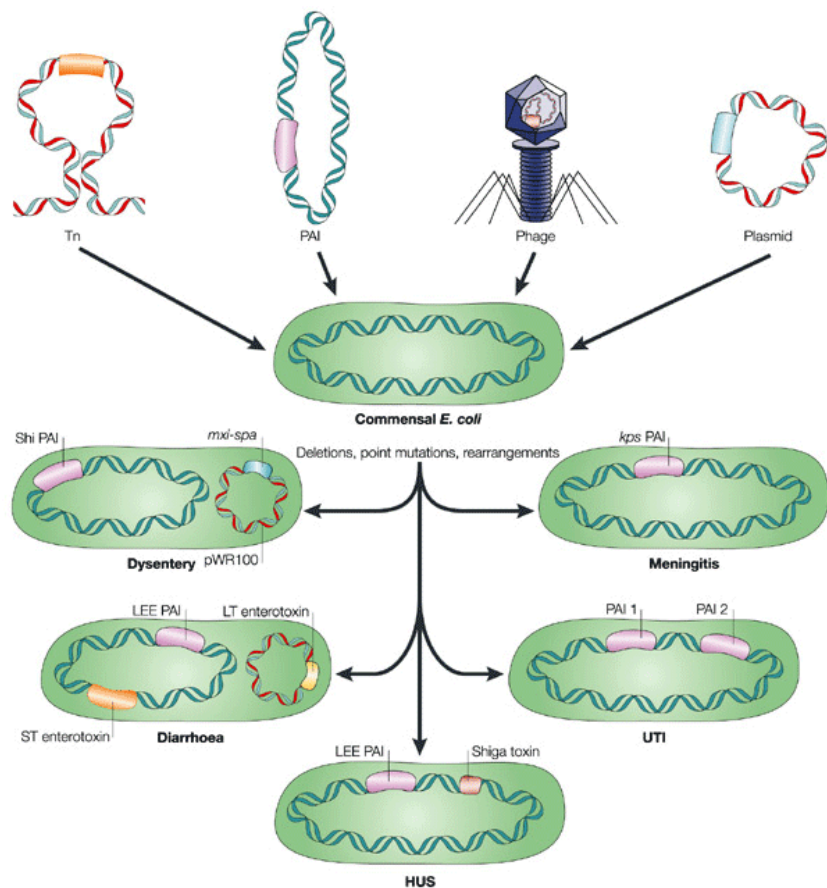
Ecologia di *E. coli*



www.ecl-lab.com

Meccanismi di trasferimento di materiale genetico da un microrganismo ad un altro





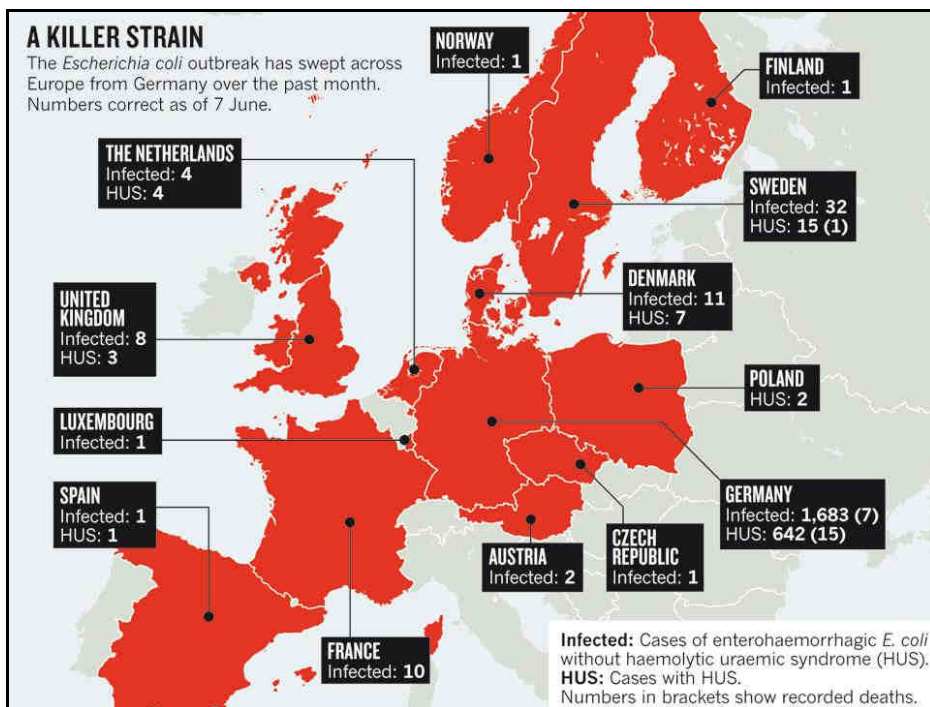
Nature Reviews | Microbiology



| <i>E. coli</i> | Target genetico |
|----------------|---|
| EPEC | Gene <i>eae</i> (intimina) |
| STEC | Geni <i>vtxs</i> (verocitotossine) |
| EHEC | Geni <i>vtx</i> + <i>eae</i> o ? |
| EAEC | Geni <i>aggR-aaIC</i> |
| ETEC | Geni LT (tossina termolabile) Geni ST (tossina termostabile) |
| EIEC | Gene <i>ipaH</i> |



Epidemia di infezione da E.coli O104:H4 del 2011



- A partire dal mese di maggio fino al luglio del 2011
- Centrato nell'area settentrionale della Germania
- Coinvolte 3910 persone in 13 paesi
 - 264 casi di SEU
 - 677 infezioni da STEC non-SEU
 - 518 possibili casi di SEU
 - 2451 possibili casi di infezioni da STEC non-SEU
- 46 decessi
 - 29 casi di SEU
 - 17 casi non-SEU

Fonte: **Notiziario** – 28 luglio 2011 EPICENTRO ISS



Perché ha avuto così grande risonanza?

Il complicato quadro epidemiologico

Veicolo di infezione atipico: germogli vegetali (fieno greco)

Il ceppo epidemico di VTEC è stato identificato come *E.coli* O104:H4, sierotipo poco comune, precedentemente individuato solo in casi umani

Elevato grado di virulenza: la SEU è normalmente una patologia tipica dell'età pediatrica mentre l'epidemia tedesca ha colpito principalmente adulti di sesso femminile

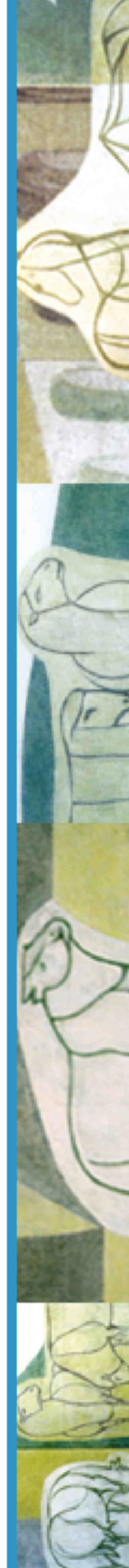


Ci sono state notevoli implicazioni Internazionali

(Workshop novembre 2011 a Berlino)

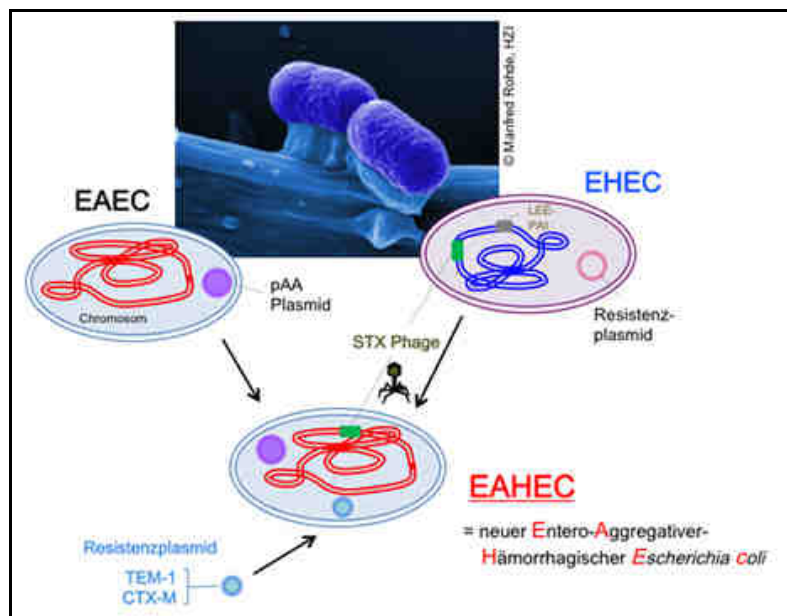
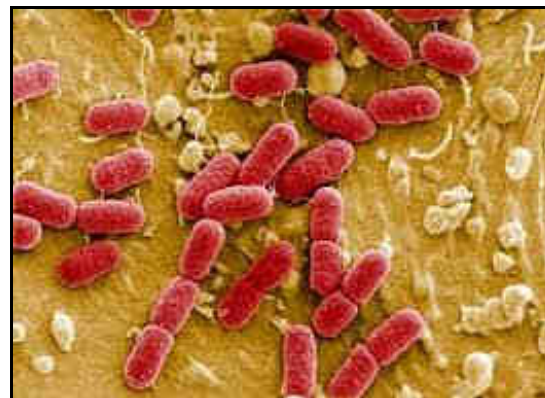
e normative:

- ritardo e revisione della bozza della ISO 13136
- modifica dei criteri microbiologici 2073



Il ceppo di **STEC O104:H4** coinvolto non era ancora mai stato descritto: *E.coli* produttore di verocitotossine senza il gene *eae*.

Deriva probabilmente da una insolita combinazione di vari fattori



- i geni codificanti per la Stx portati, come negli STEC, da un batteriofago lisogenico e
- un altro gruppo di *E. coli*, gli enteroaggregativi (EAEC), che normalmente non producono Stx ed esplicano il proprio potere patogeno colonizzando la mucosa intestinale con un meccanismo di adesione aggregativa.



Gli EAEC sono dei patogeni a trasmissione interumana conosciuti per il loro ruolo nel determinismo della diarrea persistente dei neonati (>14 giorni) e dei bambini, nei paesi in via di sviluppo.

Sino ad ora non è stato descritto nessun serbatoio animale per gli EAEC.

La circolazione di STEC O104:H4 entroaggregativi e le epidemie ad essi correlate, hanno messo in evidenza che fenomeni di ricombinazione tra batteri enterici possono generare nuovi fenotipi i quali, introdotti in una popolazione suscettibile, potrebbero causare gravi problemi di sanità pubblica.

E' possibile che il ceppo patogeno coinvolto nella recente epidemia tedesca sia il risultato dell'incontro tra un ceppo EAEC, di probabile origine umana ed un fago Stx tipico dei ruminanti.





Titolo del progetto: Ricerca di *E. coli* O104:H4, di altri *E. coli* enteroaggregativi produttori di Shiga tossina e dei loro potenziali precursori in reflui zootecnici mediante PCR RT

Responsabile scientifico del progetto: Stefano Bilei IZSLT

Elenco delle Unità operative impegnate nel progetto:

| | | |
|------------|---------------------------------------|--------------|
| UO. 1..... | Responsabile U.O.: Stefano Bilei | IZS LT |
| UO. 2..... | Responsabile U.O.: Alfredo Caprioli | ISS |
| UO. 3..... | Responsabile U.O.: Gabriella Conedera | IZS VE |
| UO. 4..... | Responsabile U.O.: Lucia De Castelli | IZS TO |
| UO. 5..... | Responsabile U.O.: Barbara Bertasi | IZS LER |
| UO. 6..... | Responsabile U.O.: Stefania Scuota | IZS UM |
| UO. 7..... | Responsabile U.O.: Antonio Fadda | IZS SARDEGNA |
| UO. 8..... | Responsabile U.O.: Roberto Condoleo | IZS LT |



- ✓ Effettuare la ricerca di EAEC in reflui zootecnici da allevamenti di ruminanti e suini destinati alla produzione di alimenti, valutando in parallelo la presenza di batteriofagi portatori di geni *stx*.
- ✓ Mettere in evidenza la eventuale presenza di ceppi O104:H4 o altri EAEC *stx*-produttori, per stimare la prevalenza dei loro precursori e quindi il rischio che questi batteri possano emergere dall'incontro tra un ceppo EAEC e un fago *stx*.
- ✓ Sviluppare una metodica in PCR RT per la ricerca di EAEC nei reflui e negli alimenti.



Disegno dello studio

Popolazione e unità epidemiologica

La popolazione target è rappresentata dalle aziende presenti sul territorio delle regioni delle Unità Operative. Sono state considerate unicamente le aziende che allevano le seguenti specie domestiche

Bovini (da latte); Bovini (da carne); Bufali; Suini; Ovini.

L'unità epidemiologica dello studio è l'azienda ed i risultati sono stati espressi in termini qualitativi (Presenza/assenza dei microrganismi e/o dei fagi *stx*).

Criteri di esclusione

Non sono state incluse nello studio aziende zootecniche che

hanno un numero di capi inferiore a 15 per la specie bovina, 10 per quella bufalina, 10 per la suina, 50 per l'ovina



Schema di campionamento

Prelievo di materiale fecale (reflui zootecnici) o pool di materiale fecale

Il piano ha tenuto conto dei seguenti fattori: **specie; stagionalità** (distribuzione dei campioni durante l'anno)

Ogni Unità Operativa si è occupata di monitorare gli allevamenti di una o due specie animali scelte in base alla realtà produttiva territoriale.

La raccolta di informazioni relative all'azienda sottoposta ad indagine è stata effettuata mediante un questionario per rilevare eventuali fattori associati alla presenza di *E. coli* patogeni

Numerosità campionaria

L'adozione di criteri statistici avrebbe portato ad una numerosità campionaria eccessivamente elevata rispetto alle risorse a disposizione. La bassa prevalenza attesa degli EAEC e la stratificazione per specie e stagione, avrebbe comportato la necessità di testare un numero di allevamenti molto alto per avere una stima accurata della prevalenza.

Si è scelto di eseguire uno studio preliminare limitando il monitoraggio a **50 allevamenti** per specie, testati **4 volte l'anno** (circa ogni tre mesi in relazione alle diverse stagioni) per rilevare un eventuale trend stagionale. Il numero complessivo degli allevamenti è stato ripartito tra tutte le unità operative.



Modalità di prelievo

Il campione prelevato è rappresentato da ca 50 g di materiale fecale/liquami prelevato dalla letamaia dell'allevamento più punti possibili della massa fecale o dalle deiezioni di più capi, dal terreno o dall'animale in vita.

Per ogni campione prelevato è stato compilato il verbale di prelievo in cui è indicata la tipologia di campione (reflui/pool di feci con numero indicativo di animali), la specie di appartenenza, data, identificativo aziendale e le prove richieste .

Prove analitiche

Il materiale fecale prelevato è stato sottoposto ad analisi biomolecolari e colturali per la ricerca di:

1. *Escherichia coli* Enteroaggregativi:POS sviluppata dall'ISS(EU-RL VTEC_Method_05_Rev 1)
2. *Escherichia coli* O104:H4 (EU-RL VTEC_Method_04_Rev 1)
3. *Escherichia coli* Verocitotossici (ISO/TS 13136:2012)
4. Batteriofagi liberi portatori di geni *stx* (EU-RL VTEC_Method_02_Rev 0)



Per gli *E. coli* enteroaggregativi è stata considerata la presenza dei geni *aggR* e/o *aaiC*

Per gli STEC sono state previste diverse definizioni di positività a seconda della rilevazione dei soli geni d'interesse nella fase di screening o anche di isolamento e conferma microbiologica:

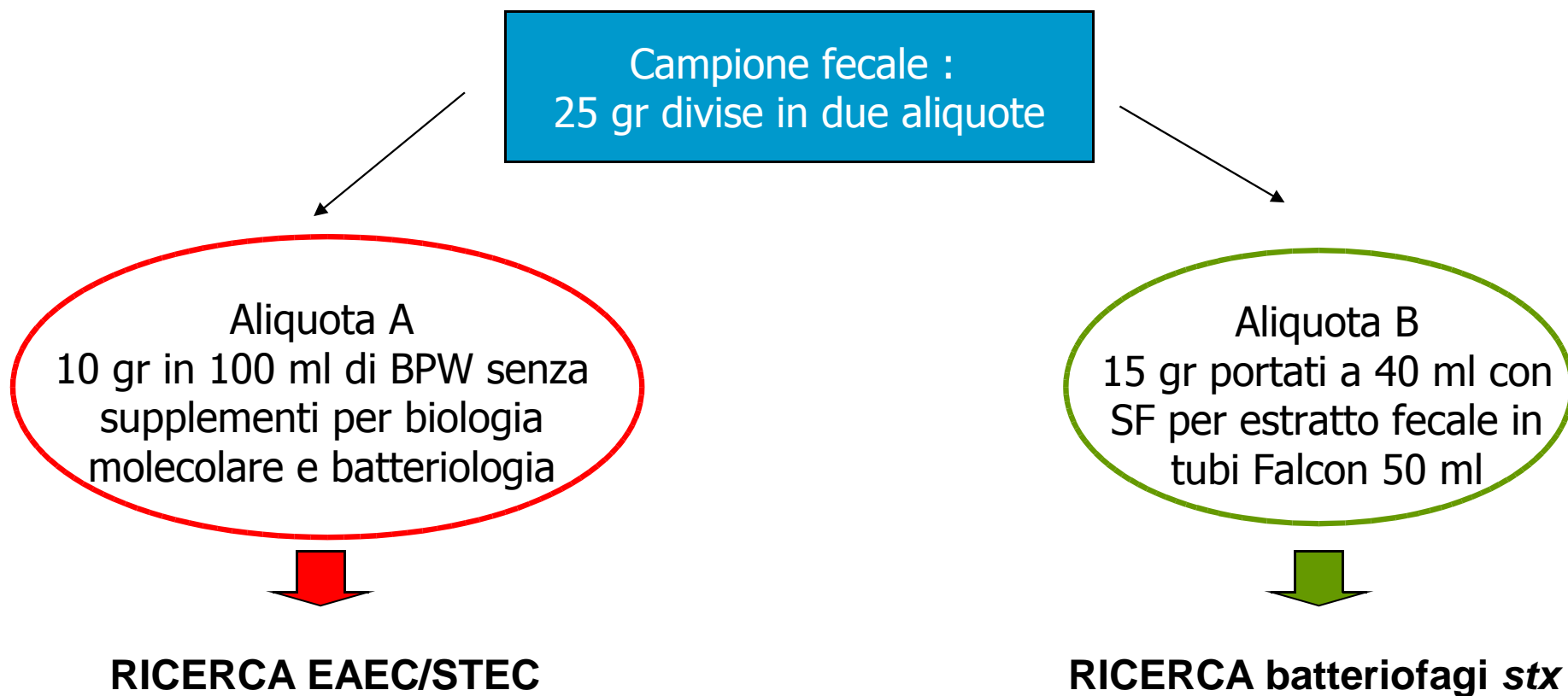
- la positività in fase screening è definita come "Presunta presenza di STEC" (con specificati i geni rilevati e l'eventuale specifica del sierogruppo/i rilevato);
- la positività in fase di isolamento sarà definita come "Presenza di STEC" con specificati i geni rilevati e l'eventuale specifica del sierogruppo/i identificato

(vedi "NOTA SULL'ESPRESSIONE DEI RISULTATI OTTENIBILI APPLICANDO IL METODO ISOTS 13136:2012 NEL RAPPORTO DI PROVA")

Per i batteriofagi *stx* è stata considerata la positività della loro presenza .



Protocollo di laboratorio per l'analisi dei campioni di feci/reflui zootecnici



Aliquota A

- Arricchimento O.N. @37°C
- Prelievo di 1ml di arricchimento per preparazione acido nucleico e Real Time PCR per:
 - ✓ *aggR* e *aalC*
 - ✓ *vtx1* *vtx2* *eae* sierogruppi “big 5”
 - ✓ O104:H4
- Stock a -20 dell'acido nucleico rimanente
- Prelievo di 4 ml di brodo di arricchimento + 0,6 ml di glicerolo e stock @-80°C per back up microbiologia



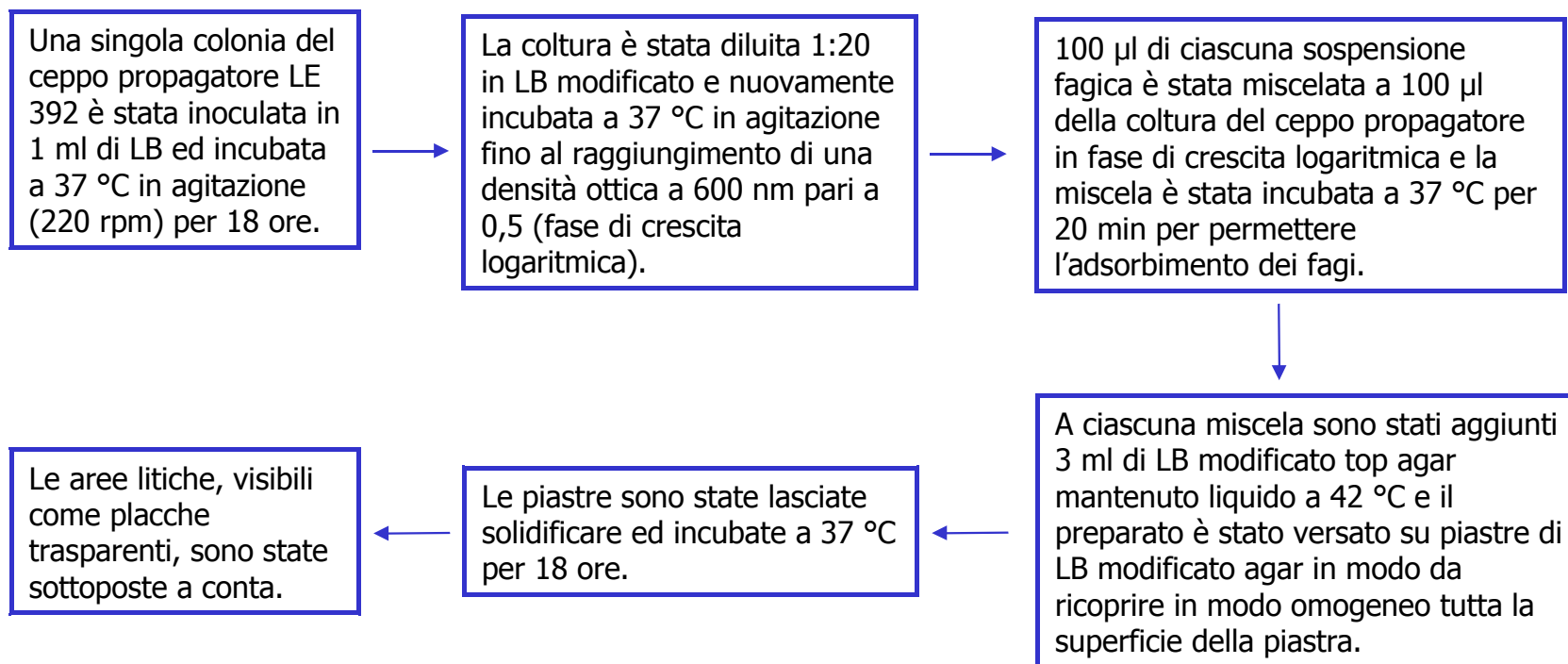
Aliquota B

- Agitazione vigorosa (vortex o simili o anche a mano)
- Centrifugazione a bassi giri
- Prelievo di 3 ml e centrifugazione in centrifuga tipo Eppendorf ad “alti giri”
- Prelievo di 2 ml evitando di toccare il pellet e filtrazione attraverso 0,45 micron
- 1ml: estrazione acido nucleico e Real Time PCR *vtx* (secondo ISO TS 13136)
- 1 ml : stock a -80 in DMSO 7% per esperimenti di induzione



Isolamento di batteriofagi portatori di geni stx

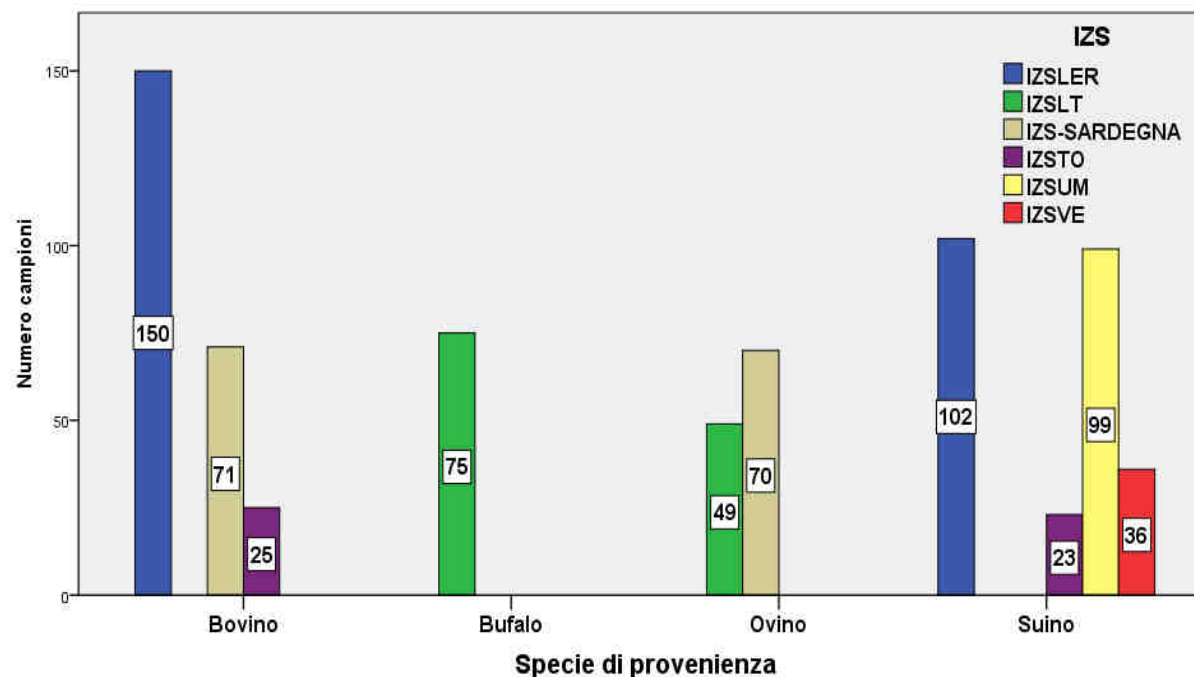
Le UO hanno inviato all'ISS (UO 2) i campioni di estratto fecale conservato in DMSO risultati positivi alla ricerca dei geni stx. Presso il LNR per *E.coli* si è proceduto alla ricerca dei batteriofagi secondo la seguente procedura: **Visualizzazione delle placche di lisi mediante infezione del ceppo propagatore con sospensioni fagiche** (plaque lift)



Campioni analizzati

Il grafico riporta il numero di campioni di reflui zootecnici distinti per specie prelevati ed analizzati delle diverse unità operative nell'ambito della ricerca "*E. coli* O104:H4, di altri *E. coli* enteroaggregativi produttori di Shiga tossina e dei loro potenziali precursori in reflui zootecnici mediante PCR RT".

| TOT | | n.camp. | % |
|-----|--------|---------|-------|
| | Suino | 260 | 37.1% |
| | Bovino | 246 | 35.1% |
| | Ovina | 119 | 17% |
| | Bufalo | 75 | 10.7% |



Risultati screening fattori di virulenza

| | Totale | Assenza | Presunta presenza (<i>stx</i>) |
|--------|--------|------------|-------------------------------------|
| Suino | 260 | 87 33,50% | 173 66,50% |
| Bovino | 245 | 66 26,90% | 179 73,10% |
| Ovino | 119 | 29 24,40% | 90 75,60% |
| Bufalo | 75 | 33 44,00% | 42 56,00% |
| Totale | 699 | 215 30,80% | 484 69,20% |

Risultati screening sierogruppi "big 6"

| | Totale | O157 Presunta Presenza | O26 Presunta Presenza | O103 Presunta Presenza | O111 Presunta Presenza | O145 Presunta Presenza | | Totale | O104 Presunta Presenza |
|--------|--------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|--------|--------|------------------------------|
| Bovino | 166 | 35 21,1% | 49 29,5% | 55 33,1% | 3 1,8% | 55 33,1% | Bovino | 170 | 13 7,6% |
| Bufalo | 36 | 4 11,1% | 6 16,7% | 6 16,7% | 0 0,0% | 6 16,7% | Bufalo | 36 | 2 5,6% |
| Ovino | 79 | 21 26,6% | 27 34,2% | 35 44,3% | 3 3,8% | 45 57,0% | Ovino | 82 | 19 23,2% |
| Suino | 164 | 58 35,4% | 95 57,9% | 107 65,2% | 49 29,9% | 89 54,3% | Suino | 173 | 46 26,6% |
| Totale | 445 | 118 26,5% | 177 39,8% | 203 45,6% | 55 12,4% | 195 43,8% | Totale | 461 | 80 17,4% |



Risultati isolamento

| | Isolamento ceppi con geni <i>stx</i> | | | <i>stx1</i> + | | <i>stx2</i> + | | <i>eae</i> + | |
|--------|--------------------------------------|----------|-------|---------------|------|---------------|-------|--------------|-------|
| | Totale Analizzati | Presenza | | Presenza | | Presenza | | Presenza | |
| Suino | 146 | 21 | 14,4% | 1 | 1,0% | 21 | 14,4% | 10 | 10,2% |
| Bovino | 119 | 9 | 7,6% | 2 | 1,7% | 8 | 6,7% | 15 | 12,6% |
| Ovino | 0 | 0 | 0,0% | 0 | 0,0% | 0 | 0,0% | 0 | 0,0% |
| Bufalo | 2 | 0 | 0,0% | 0 | 0,0% | 0 | 0,0% | 0 | 0,0% |
| Totale | 267 | 30 | 11,2% | 3 | 1,4% | 29 | 10,9% | 25 | 11,4% |

Risultati ricerca dei geni degli EAEC *aggR/aaIC*

| | Campioni | | |
|--------|------------|-------------|-------------|
| | Analizzati | <i>aggR</i> | <i>aaIC</i> |
| Bovino | 246 | 0 | 2 |
| Bufalo | 75 | 0 | 0 |
| Ovino | 119 | 0 | 0 |
| Suino | 260 | 0 | 2 |
| Totale | 700 | 0 | 4 |

Risultati ricerca di batteriofagi portatori dei geni *stx*

| | Totale | | |
|--------|----------|---------------|---------------|
| | Campioni | <i>stx1</i> + | <i>stx2</i> + |
| Bovino | 237 | 4 | 1 |
| Bufalo | 75 | 0 | 0 |
| Ovino | 118 | 3 | 1 |
| Suino | 260 | 0 | 0 |
| Totale | 690 | 7 | 2 |



- ✓ Gli *E. coli* Enteroaggregativi (EAEC) sono patogeni umani agenti di gastroenteriti noti per essere diffusi tramite cicli di infezioni inter-umane attraverso il circuito oro-fecale.
- ✓ L'emergenza di ceppi EAEC produttori di shiga tossine (Stx) come quelli implicati in episodi epidemici (Germania 2011) e casi sporadici di infezione, hanno sollevato dei dubbi circa la loro possibile circolazione negli animali da reddito considerati serbatoio naturale dei ceppi di STEC e dei batteriofagi che veicolano i geni *stx*.
- ✓ Le prove effettuate nel corso di questa ricerca e relative alla identificazione della presenza di EAEC nei reflui zootecnici hanno dato tutte esito negativo.
- ✓ Questo dato conferma le evidenze di letteratura presentate in lavori effettuati in altri paesi che dimostrano l'assenza di questo particolare patotipo di *E. coli* nell'ambito zootecnico.
- ✓ La presenza di STEC nei campioni analizzati ha evidenziato proporzioni di campioni positivi compatibili con i dati di letteratura.



✓I nostri dati si aggiungono a quelli riportati nei pochi studi sulla presenza dei ceppi EAEC negli animali da reddito e confermano che questi stipiti non sono circolanti in queste specie e che pertanto l'applicazione di piani per il loro monitoraggio negli animali non sarebbe raccomandato .

✓I risultati della ricerca hanno evidenziato che la concentrazione dei fagi *stx* nei campioni analizzati secondo i nostri dati è da ritenersi molto bassa, al di sotto del limite di rilevabilità dei saggi utilizzati, tuttavia questa osservazione non è sufficiente per escludere che questi microrganismi siano capaci di trasferirsi a cellule batteriche recipienti, inclusi i ceppi EAEC qualora questi reflui entrassero in contatto con ambienti in cui circola questo particolare patotipo di E. coli.

✓I reflui zootecnici possono rappresentare un rischio qualora questi materiali vengano in contatto con altri ambienti tra cui i reflui provenienti dall'ambiente urbano negli impianti di trattamento .





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

Grazie dell'attenzione

