



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

ZOONOSI: EPIDEMIOLOGIA SORVEGLIANZA E CONTROLLO

ed. I: 6,7 ottobre 2021

Infezioni da *Escherichia coli* produttori di tossine Shiga (STEC)



National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases our work, our stories 2011-2012
Derraglio, Courtesy Olaf Hajek



Paola De Santis UOC Microbiologia degli Alimenti
Lab. Biotecnologia Applicata agli Alimenti



...di cosa parleremo

Rilevanza di *Escherichia coli* produttori di Shiga-tossine (STEC)
come agente eziologico di zoonosi

Trasmissione all'uomo e dei meccanismi patogenetici

Classificazione

Principali patologie indotte da *Escherichia coli* patogeni

Metodi di diagnosi e controllo della contaminazione
da *Escherichia coli* negli alimenti

PS: Le slides con questo simbolo



contengono le risposte al questionario

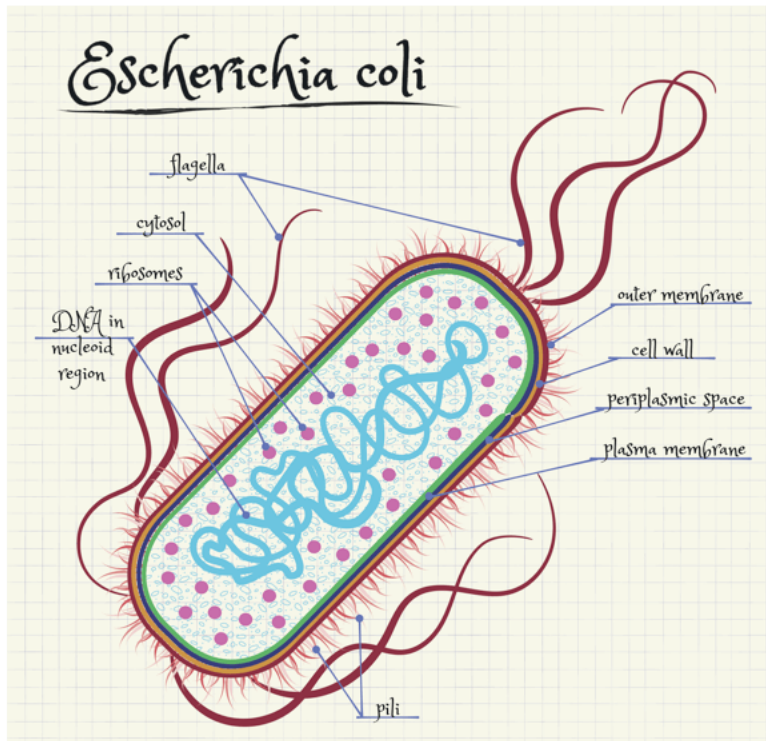




Diffusione in natura. Gli *Escherichia coli* fanno parte della **normale** flora intestinale di animali e uomo. Il naturale serbatoio di STEC è rappresentato dal tratto gastroenterico dei ruminanti domestici (bovino, capra, pecora) e selvatici (cervo, camoscio, stambecco, etc..).

Tra i ruminanti domestici, il **bovino** rappresenta il principale serbatoio, in particolare del sierotipo O157:H7.





Contribuisce alla produzione di vitamina k2

Previene la colonizzazione da parte di altri agenti patogeni (esclusione competitiva)

Indicatore di contaminazione fecale insieme ad altri “coliformi”



Escherichia coli patogeni condividono strategie di virulenza

Adesione alle cellule ospiti
mediante fimbrie o pili

Sovvertimento dei processi
metabolici della cellula ospite,
mediato da proteine effettrici
secrete

Dirottamento e manipolazione dei percorsi metabolici e **invasione**
coordinata della cellula ospite

Evasione della risposta
immunitaria dell'ospite

Colonizzazione efficiente

Malattia

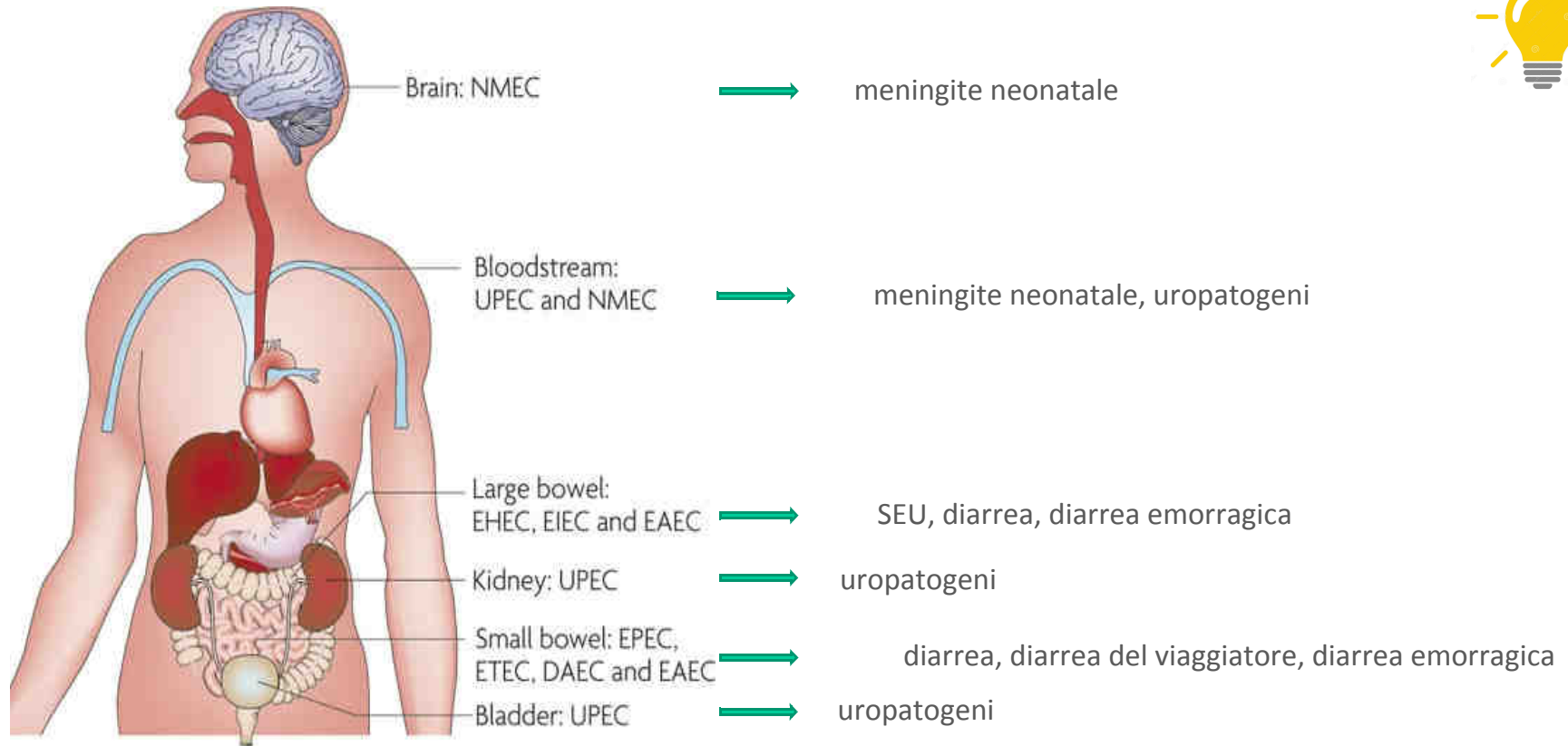


Gli *Escherichia coli* patogeni presentano diversità nel loro assetto genetico.

- ✓ Molti fattori di virulenza sono contenuti in **plasmidi di virulenza**, acquisiti attraverso il trasferimento orizzontale di geni (HGT)
- ✓ Altri sono integrati nel cromosoma da **batteriofagi** o **elementi trasponibili**
- ✓ La **perdita** di alcuni geni (*cadA*) e **l'acquisizione** di pINV (HGT) è necessaria agli *Escherichia coli* enteroinvasivi (incluso Shigella) per adattarsi all'ambiente intracellulare

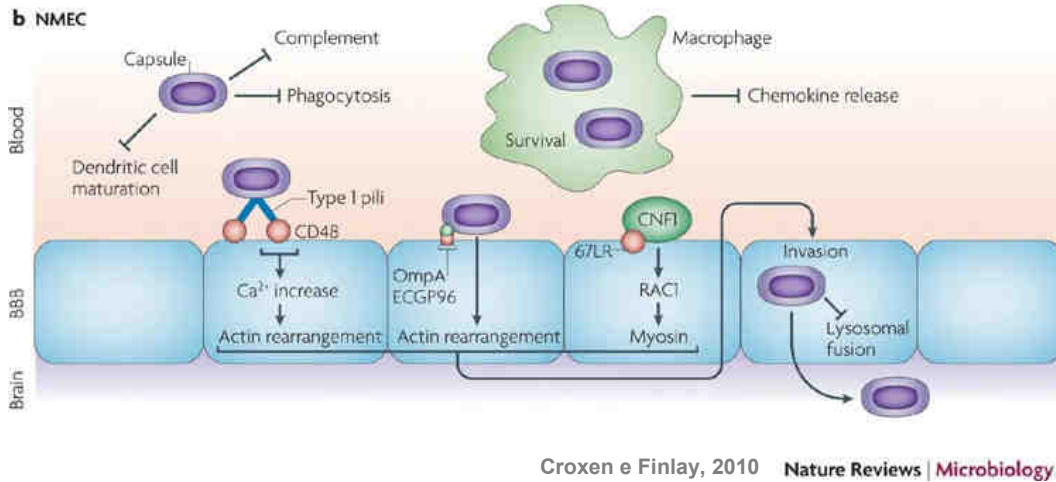


Gli *Escherichia coli* patogeni sono classificabili in base al sito di colonizzazione in vari «patotipi»: 6 diarrogeni, 2 extraintestinali



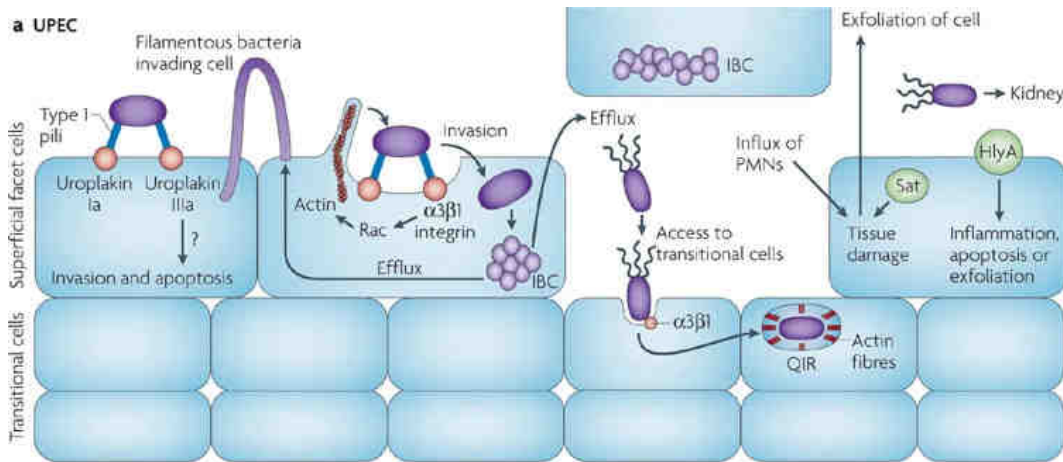
Croxen e Finlay, 2010 **Nature Reviews | Microbiology**





NMEC (neonatal meningitis *E. coli*)

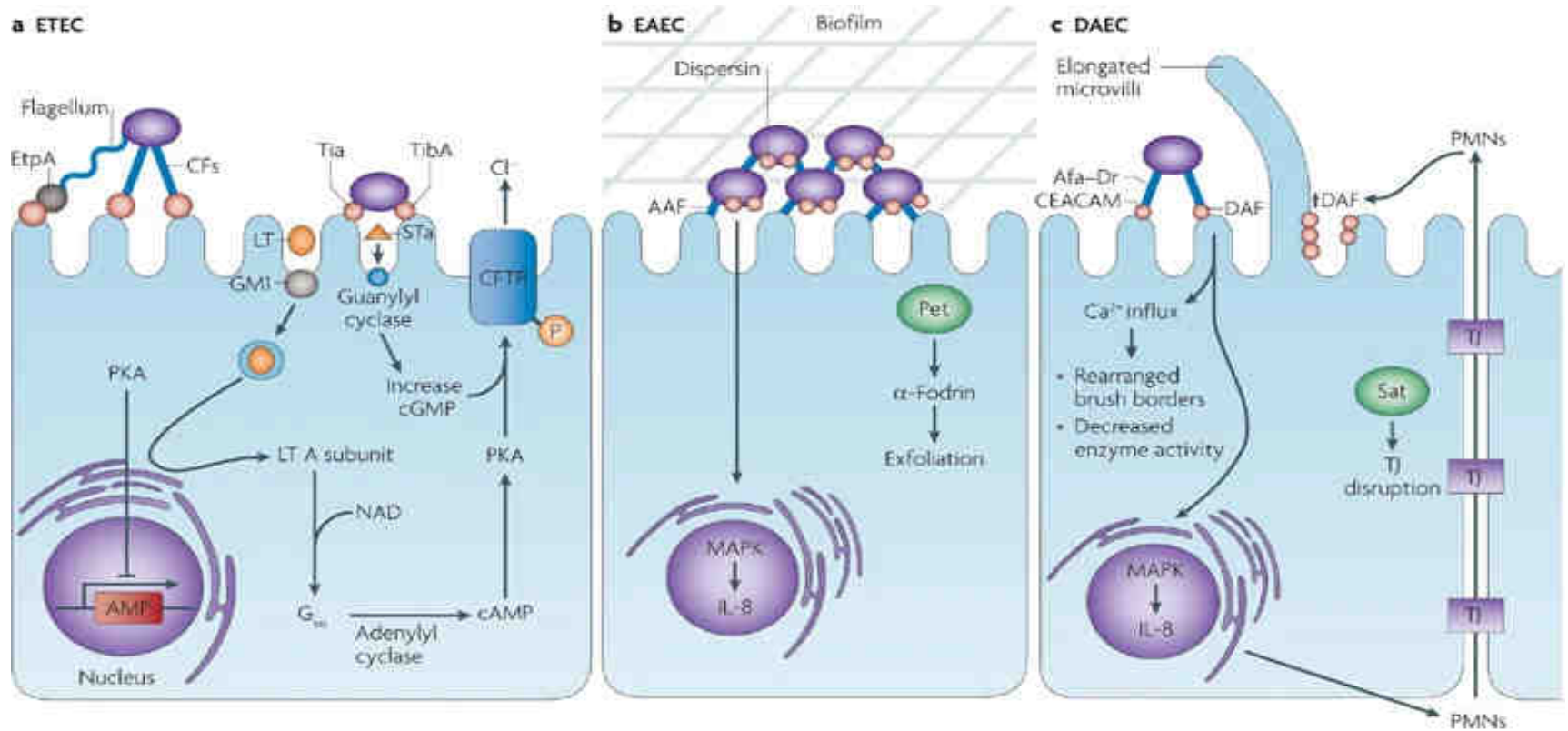
Causano meningite neonatale
Evasione difese immunitarie e
 superamento della barriera emato-
 encefalica per **mimetismo** mediante
 una capsula di molecole di acido sialico



UPEC uro-patogeni

Causano infezioni del tratto urinario
Adesione all'uroepitelio attraverso i pili
 di tipo 1. **Lisi cellulare** causata da
 emolisine α e β . **Colonizzano** uretra e
 possono arrivare fino a vescica (cistiti
 ricorrenti), prostata e reni (pielonefrite)





Croxen e Finlay, 2010 **Nature review** | **Microbiology**

ETEC enterotossigeni

Adesione agli enterociti dell'intestino tenue mediata da fimbrie. Producono due **enterotossine**: LT termolabile ed ST termostabile. Causano «diarrea del viaggiatore»;

EAEC entero-aggregativi

Adesione (aggR), mediante fimbrie AAF, biofilm, **sintesi** di enterotossine e citotossine Stx1 e 2 (intestino tenue e crasso)
Diarrea acuta

DAEC diffusivi - aderenti

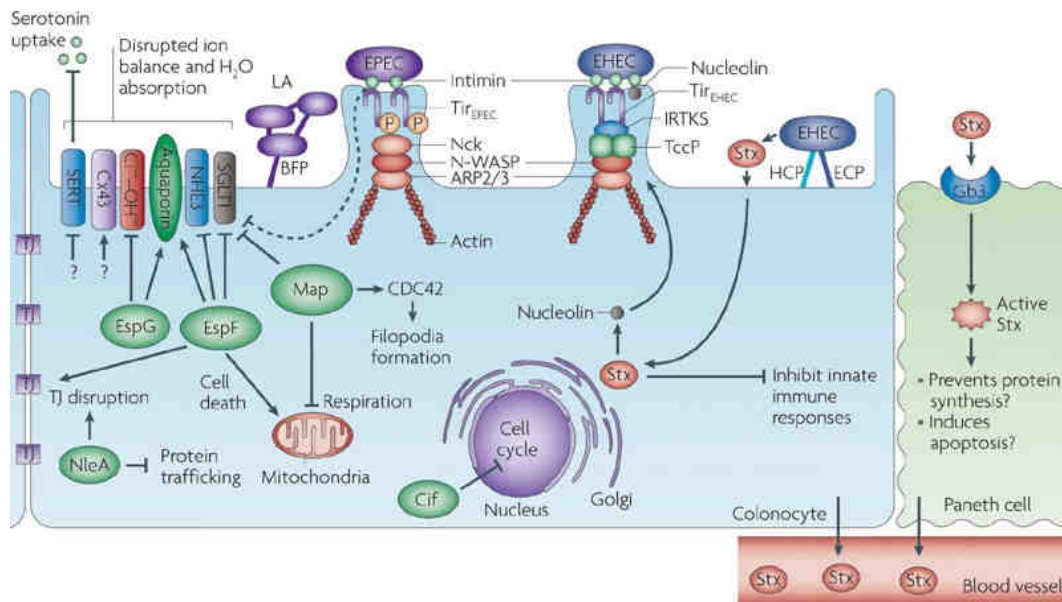
Invasione di enterociti (intestino tenue) mediata da fimbrie di tipo Afa-Dr e **replicazione** al loro interno. Soprattutto in soggetti immunodepressi





Causano sindrome identica alla shigellosi, con diarrea e febbre alta





Croxen e Finlay, 2010 *Nature Reviews | Microbiology*

EPEC entero-patogeni

Aderiscono agli enterociti (intestino tenue) tramite **intimina** (gene *eae*). Questa adesione causa riarrangiamento dei microfilamenti di actina delle cellule dell'ospite con conseguente deformazione (non sintetizzano tossine).

Invasione delle cellule e attivazione risposta infiammatoria.

Causano diarrea

EHEC entero-emorragici

Aderiscono mediante fimbrie, sintetizzano **intimina** (gene *eae*)
 Producono **verocitotossine** (Stx1, Stx2) che inibiscono la sintesi proteica e portano a distruzione degli enterociti (intestino crasso).
 Causano gastroenteriti, enterocoliti e diarrea emorragica. Possono indurre sindrome emolitico-uremica (SEU).

Prototipo: O157:H7

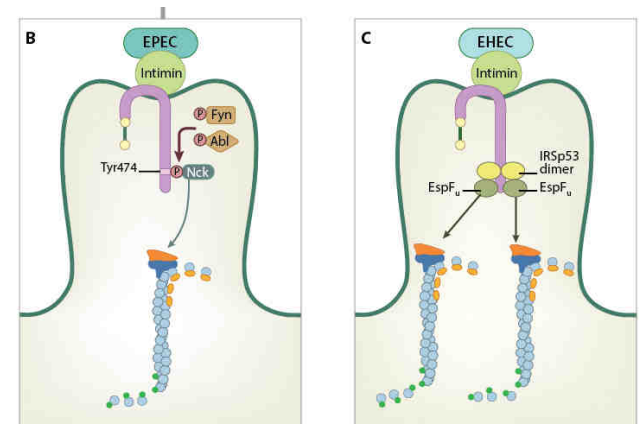


Il fattore di adesione **intimina** (gene *eae*) dei patotipi EPEC e EHEC è responsabile del meccanismo attachement/effacement (ADESIONE/DISTRUZIONE)

- 1) **Adesione:** microcolonie batteriche sulla superficie epiteliale. Stretto contatto enterociti - intimina
- 2) **Distruzione:** perdita dei microvilli. In questa fase la cellula ospite accumula proteine del citoscheletro danneggiato al di sotto dei batteri adesi e forma una struttura che tende ad avvolgere singolarmente ciascun batterio. Internalizzazione di una parte dei batteri



www.zeiss.com/sem Courtesy of Prof. Dr. Rohde, HZI Braunschweig6





Gli ***E. coli*** verocitotossici (**STEC**) sono un gruppo di *E. coli* in grado di produrre **Shiga-tossine** (Stx1 e Stx2) denominate verocitotossine per il loro effetto citotossico su cellule Vero (derivate da rene di scimmia)

I geni (*stx1* e *stx2*) per la sintesi delle tossine vengono trasmessi grazie a fagi (*E. coli* privo della capacità di sintetizzare Shiga-tossine la può acquisire in coltura mista con ceppi STEC)

I «**patotipi**» produttori di Shiga-tossine sono **EHEC** e **EAEC**



Classificazione sierologica e di virulenza

Antigene somatico O ~ 186

Antigene flagellare H ~ 53

Antigene somatico O + Antigene flagellare H

Sierotipo = 470 sierotipi di *E. coli*

Shiga-tossine

Stx1 con 4 subtipi
(Stx1a, Stx1c, Stx1d, Stx1e)

Stx2 con 8 subtipi
(Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f, Stx2g, Stx2i)

(Mora et al. 2012)



- ✓ Sierogruppi >mente associati a casi di SEU

EHEC O157:H7 + «Big Six»: •**O26** •**O45** •O103 •O111 •**O121** •O145

EAEC O104:H4 ricercato negli alimenti dal 2011

- ✓ Subtipi di Shiga-tossine >mente associate a SEU

Livello	Geni	Potenziale per:
1	<i>stx2a + eae</i> o <i>aggR</i>	D/BD/SEU
2	<i>stx2d</i>	D/BD/SEU
3	<i>stx2c + eae</i>	D/BD
4	<i>stx1a + eae</i>	D/BD

D= diarrea; BD= diarrea emorragica; SEU= sindrome emolitico-uremica

- ✓ Fattori individuali predisponenti
- ✓ Uso di antibiotici nella terapia delle infezioni da *E. coli*

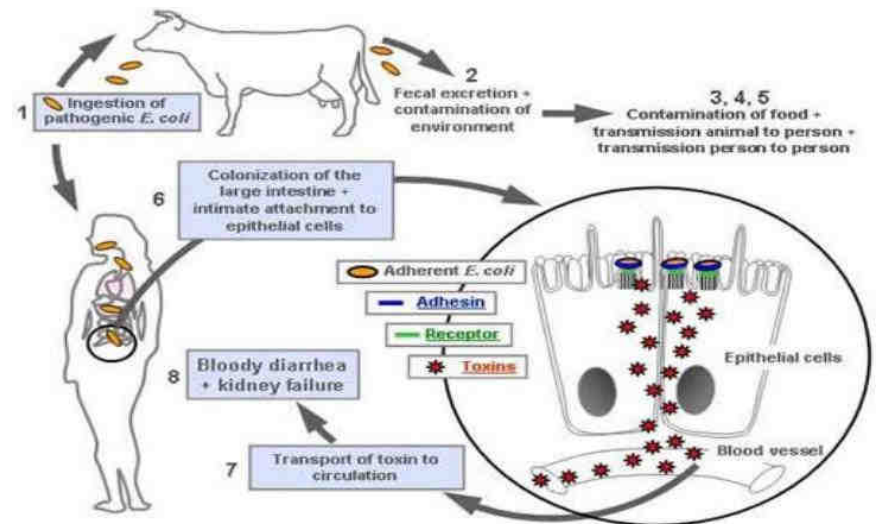


Modalità di trasmissione

- ✓ La principale via di trasmissione di *Escherichia coli* all'uomo è rappresentata dal consumo di **alimenti** e acqua contaminati da materiale fecale.

- ✓ **contatto diretto** con animali infetti (fattorie didattiche, allevamenti, etc..)

- ✓ **contatto persona-persona**



La contaminazione può riguardare sia **alimenti d'origine animale** (carne e derivati, latte e latticini) sia **vegetali**

La contaminazione dei **vegetali** può avvenire:

- ✓ Durante la produzione o la raccolta (possibile internalizzazione)
- ✓ Durante le fasi di manipolazione, trasporto e lavorazione
- ✓ Alla vendita
- ✓ Alla somministrazione

La contaminazione **alimenti d'origine animale** può avvenire:

- ✓ In allevamento
- ✓ Durante il trasporto
- ✓ Macellazione/Mungitura
- ✓ Trasformazione (carne, latte, derivati)
- ✓ Distribuzione
- ✓ Consumo collettivo e/o domestico



La malattia

Forme epidemiche (tossinfezione alimentare)

Forme sporadiche

Predilezione generale < 10 anni di età ma....

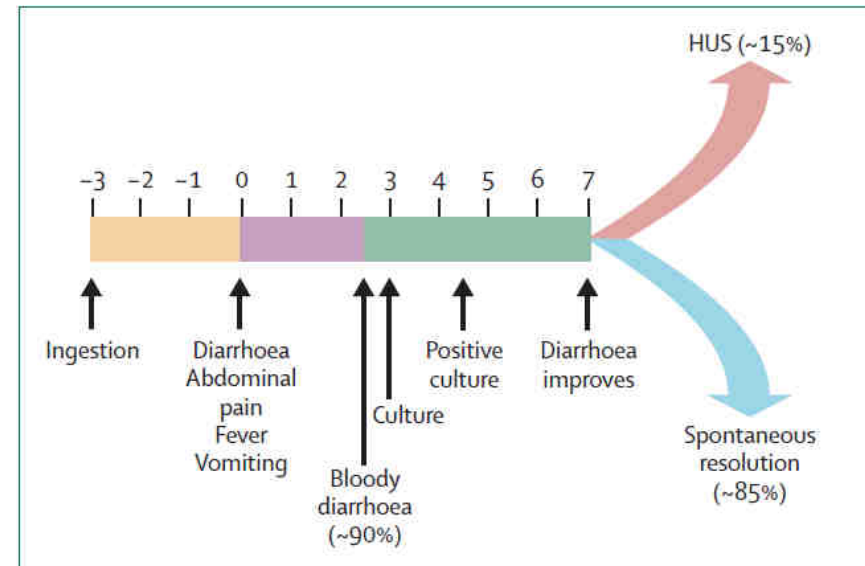
Focolaio epidemico 2011 (O104:H4) età adulta 88%, età media 44 anni

In Gran Bretagna 2016 (O157) età adulta



Sintomatologia

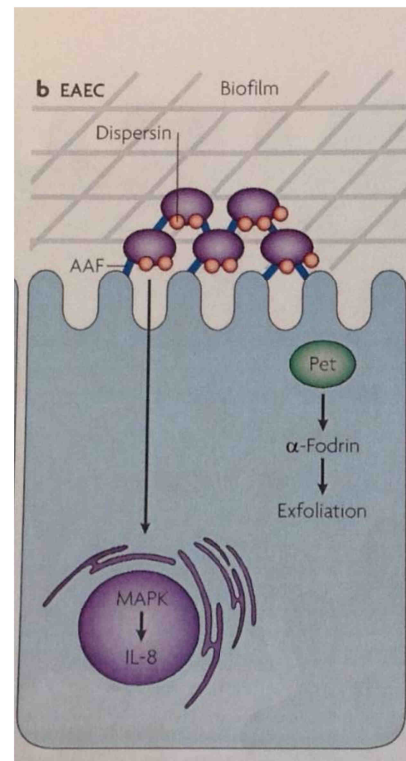
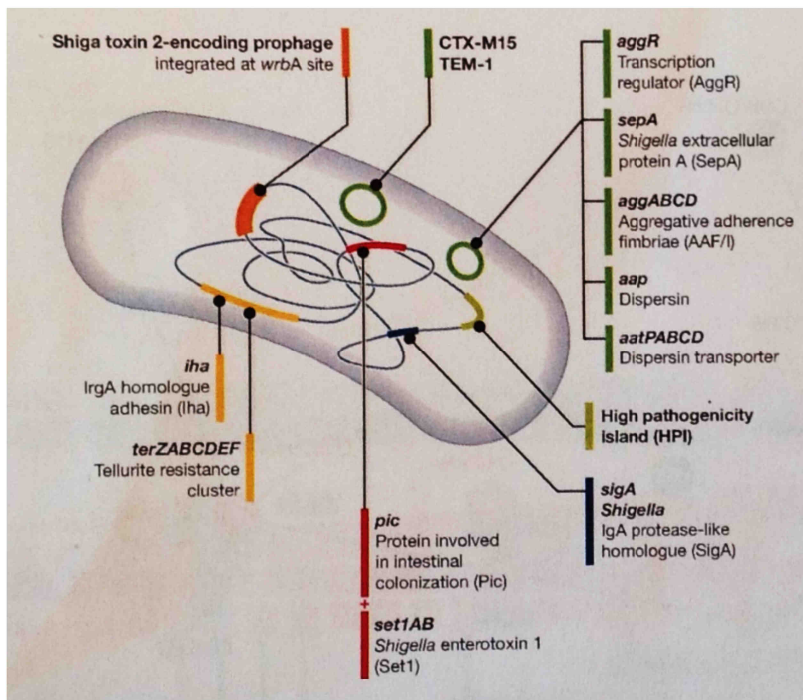
- ✓ Incubazione 2-12 gg
- ✓ Febbre raramente presente
- ✓ Dolori addominali intensi, diarrea variabile
- ✓ Progressione a diarrea emorragica in 1-2 gg
- ✓ Evoluzione in SEU in 7-10 gg
- ✓ Complicanze SEU: Insufficienza renale, Stroke, Convulsioni, Coma, Emorragie. Ipertensione arteriosa 15-20% dopo 3 anni



***E. coli* O104:H4**

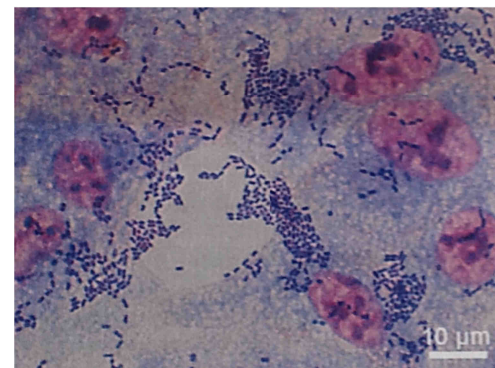
Focolaio Primavera 2011 Germania

4000 persone malate
900 casi di SEU
52 decessi



Estate 2011 Francia

15 persone malate
9 casi SEU



***Stesso ceppo* O104:H4**



Diagnosi nell'uomo

Identificazione Shiga-tossina e EHEC

- ✓ Ricerca e identificazione della tossina nelle feci
- ✓ IgG o IgM anti EHEC nel siero *E. coli* O26 ; O45; O157; O111; O103; O121; O145.
- ✓ Coprocoltura per EHEC

Il Laboratorio di Referenza per VTEC, assegnato dalla Commissione Europea all'Istituto Superiore di Sanità dal 1 Giugno 2006, collabora alla sorveglianza SEU mediante il registro SEU presso ISS



Rapporto SEU 1 giugno 2020 - 31 maggio 2021 = 57 casi SEU
96% età pediatrica



Metodi di Prevenzione

Fondamentale il controllo della filiera di produzione

- ✓ Ambiente e acque superficiali
- ✓ Alimenti e foraggi per gli animali
- ✓ Allevamento
- ✓ Trasporto
- ✓ Macellazione/Mungitura
- ✓ Trasformazione (carne, latte, derivati)
- ✓ Distribuzione
- ✓ Consumo collettivo (ristorazione e mense)
- ✓ Norme igieniche in ambito domestico



Metodi di laboratorio per STEC negli alimenti

ISO/TS 13136:2012 “Microbiology of food and animal feed – Real-Time polymerase chain reaction (PCR) – based method for the detection of food - borne pathogens – Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups ”

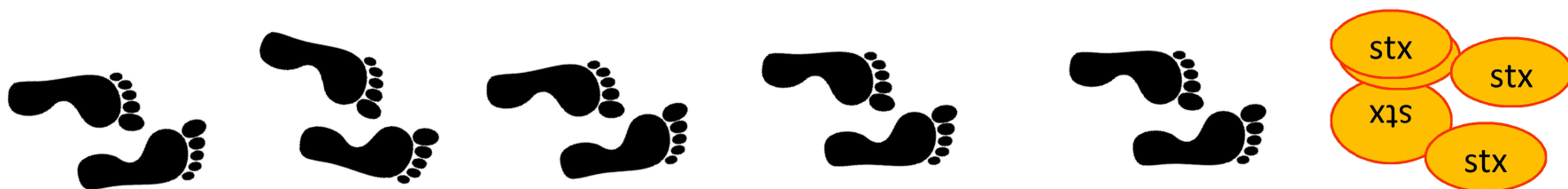
Campo d'applicazione:

- Prodotti alimentari per l'uomo e mangimi per animali;
- Campioni ambientali raccolti nelle aree di produzione o manipolazione degli alimenti;
- Campioni ambientali nell'area di produzione primaria



Data la plasticità del genoma di *E. coli* che può dare origine a **nuovi** e **atipici** sierotipi patogeni, come già successo nel 2011 in Germania e Francia con il ceppo *E. coli* O104:H4, gli STEC sono individuati in base alla positività per i geni *stx*, mediante il metodo della PCR real time

Il metodo segue..... il gene



Procedura (1)



Screening geni target:

stx1 + stx2 + eae

sierogruppi «Top 5»:

gene *rfbE* (O157)

gene *wbdI* (O111)

gene *wzx* (O26)

gene *ihp1* (O145)

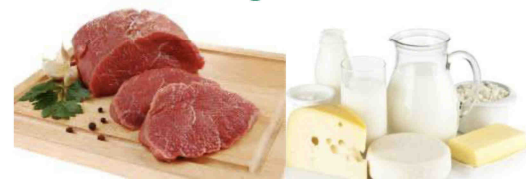
gene *wzx* (O103)

O104

reg. EU n° 209/2013

mod reg 2073/2005

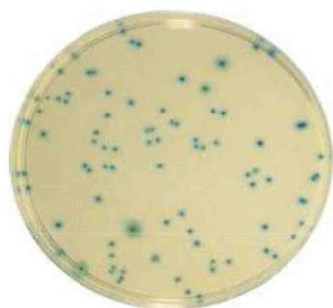
25 grammi



24h



- Conferma: Isolamento dei ceppi di *E. coli* da colture di arricchimento positive allo screening



50 colonie PCR real time

Stessi *stx* e
sierogruppi
trovati positivi
allo screening

Necessario per confermare che la positività in PCR real time nelle colture di arricchimento sia generata dalla presenza del gene nelle cellule batteriche vitali



Espressione dei risultati: screening



Campioni negativi allo screening per i geni **stx**:

Assenza di STEC

No screening *eae* e sierogruppi
Eccezione: se focolaio epidemico



Campioni positivi allo screening per i geni **stx** o *stx* con o senza individuazione sierogruppo «Top 5» ma senza isolamento del ceppo:

Presunta presuntiva di STEC

Campioni positivi allo screening per i geni **stx** e *eae* con o senza individuazione sierogruppo «Top 5» ma senza isolamento del ceppo:

Presunta presuntiva di STEC sierogruppo OXX + lesione attaching/effacing (AE)



Espressione dei risultati: conferma



Isolamento colonie positive per i geni *stx*:
Presenza di STEC



Isolamento colonie positive per i geni *stx* e *eae*:
**Presenza di STEC in grado di causare la lesione
attaching/effacing (AE)**



Isolamento colonie positive per i geni *stx* e *eae* e positivi
per uno dei geni di sierogruppo «Top 5»:
Presenza di STEC appartenente al sierogruppo OXX



Conclusione

- ✓ Monitoraggio allevamenti (bovini e altre specie)
 - Nazionale e con metodi validati
- ✓ Informazione equilibrata ai consumatori
 - “Rischio-zero” non esiste
 - Trattamento termico e cottura
- ✓ Informazione per allevatori
 - Produttori di alimenti
 - Procedure d’igiene
- ✓ Ruolo del Laboratorio di Riferenza Europeo presso ISS
- ✓ Collaborazione medici – veterinari
 - Indagini epidemiologiche coordinate
 - Genotipizzazione ceppi



Fonti bibliografiche

- EU One Health Zoonoses Report 2019 . EFSA Journal 2021;19(2):6406 doi: 10.2903/j.efsa.2021.6406
- European Centre for Disease Prevention and Control. Seventh external quality assessment scheme for verocytotoxin-producing *E. coli* (VTEC) typing. Stockholm: ECDC; 2016.
- EFSA BIOHAZ Panel, Koutsoumanis K, et al. 2020. Scientific Opinion on the pathogenicity assessment of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the public health risk posed by contamination of food with STEC. EFSA Journal 2020;18(1):5967, 105 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2020.5967>
- Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (stec) and food: attribution, characterization, and monitoring. FAO&WHO report n°31
- EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2021. The European Union One Health 2019 Zoonoses Report. EFSA Journal 2021;19(2):6406, 286 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6406>
- CRLVTEC sito internet: <http://www.iss.it/vtec/>



.... domande?



Grazie dell'attenzione!

