

CARATTERIZZAZIONE DI *E. COLI* PATOGENI ISOLATI IN MATRICI OVINE

CHARACTERIZATION OF PATHOGENIC *E. COLI* ISOLATED IN SHEEP AT SLAUGHTERHOUSE

Mazzette R., Busia G., Mureddu A., Mazza R., Consolati S.G., Meloni D.

Dipartimento di Biologia Animale, Sezione Ispezione degli Alimenti - Università di Sassari

SUMMARY

Fleeces, carcass surface, mucosal gut and faeces samples, collected from 95 slaughtered sheep and lambs from three abattoirs, were examined. The aim of this study was: 1) to evaluate the prevalence of the Verocytotoxic *E. coli* (VTEC); 2) to obtain virulence profile (*stx*₁, *stx*₂, *hlyA* and *eae*) by multiplex PCR; 3) to define the ovine-specific serogroup pathogenic power for the humans. An overall prevalence of 11.1% (adults 14%, lambs 7.8%) was found by direct PCR test. The VTEC occurrence was 18.9% in fleeces, 14.7% on carcasses and 10.5% in mucosal gut. According to the multiplex PCR the following results were obtained: 21% of the isolates belonged to VTEC pathogroup, within 92% were EHEC; 37.9% were identified as EPEC pathogroup. Forty one % of the strains were negative for all the genes. None of the isolates belonged to O157 and O146 serogroups, while the 57% resulted O91.

KEYWORDS

E. coli, VTEC, PCR, sheep, serotype

INTRODUZIONE

Gli *E. coli* produttori di verocitotossine (VTEC) sono considerati attualmente tra i patogeni emergenti (1) e sono inclusi tra gli agenti di zoonosi nel piano di sorveglianza previsto dalla Direttiva 2003/99/Ce. Essi sono infatti responsabili di casi di malattia gastro-intestinale nell'uomo, tra i quali diarrea emorragica e colite emorragica (CE), che in alcuni soggetti possono essere complicate da fenomeni di tipo neurologico e renale (sindrome emolitico-uremica o SEU). La presenza di VTEC negli alimenti di origine animale costituisce un potenziale pericolo per la salute umana, come dimostrato dagli episodi epidemici verificatisi in molti paesi industrializzati, quali Canada, USA, Giappone ed Europa (2). I bovini costituiscono il principale *reservoir* di VTEC, ma anche i piccoli ruminanti svolgono un importante ruolo nella trasmissione di ceppi patogeni all'uomo. Il sierogruppo O157 risulta il più frequentemente associato a casi di CE e SEU, insieme all'O111, O26, O113 ed O103 (3;4;5). Tuttavia, sono frequenti, specialmente in Europa, casi di infezione (6) determinati da altri sierogruppi (O91, O117, O118,

O121, O128, O145 e O146), di frequente riscontrato anche nell'ovino (7). L'importanza dei ceppi VTEC non-O157, come causa di CE, SEU ed altre malattie gastrointestinali, ed il loro ruolo epidemiologico, spesso sottovalutati in passato, negli ultimi anni sono stati indagati, anche grazie allo sviluppo e all'impiego di metodi molecolari ed immunologici, che sono tuttavia in fase di standardizzazione. Alcuni studi suggeriscono che ceppi VTEC non-O157, isolati da feci ovine e bovine, presentano sottotipi di Shigatossine geneticamente differenti, che mostrano una specificità animale-ospite (8;9). Tuttavia le conoscenze risultano ancora limitate, in relazione alle caratteristiche dei sieropatotipi e al profilo specifico di patogenicità, oltre che alle modalità con cui essi si diffondono nell'ambiente, negli animali e, attraverso gli alimenti, anche all'uomo. Relativamente agli agnelli da latte è stata inoltre evidenziata una maggiore variabilità, rispetto agli ovini adulti, di sierotipi di VTEC atipici, che colonizzano l'intestino in maniera transitoria. Tali differenze potrebbero risultare dall'effetto combinato dell'età, in relazione alle caratteristiche fisiologiche del tratto intestinale dei lattanti, alla dieta o ad una differente risposta

immunitaria (5). Obiettivi del presente lavoro sono stati: 1) la valutazione del ruolo epidemiologico degli ovini nella diffusione dei VTEC attraverso le carni, mediante lo studio della prevalenza in pecore e agnelli macellati in Sardegna, 2) la caratterizzazione del profilo di patogenicità dei ceppi isolati mediante PCR multiplex; 3) la determinazione dei sierotipi specifici degli ovini, al fine della definizione del loro potenziale patogeno per l'uomo.

MATERIALI E METODI

L'indagine è stata condotta presso 3 macelli a capacità industriale situati in Sardegna, nell'arco di un anno. A partire da 95 soggetti (50 pecore e 45 agnelli) di razza Sarda sono stati prelevati complessivamente n.380 campioni, provenienti dalle seguenti matrici: a) raschiato della mucosa del colon e del retto (10 g immediatamente dopo l'eviscerazione); b) cute dell'addome e del petto (20 cm² prelevati a livello della linea d'incisione); c) superficie delle carcasse (300 cm²), mediante strofinamento di sponges su petto, addome e coscia; d) feci, (10 g immediatamente dopo l'eviscerazione), prelevate mediante cucchiaio sterile. Un'aliquota pari a 10 g di ciascuna matrice è stata sottoposta ad arricchimento selettivo in modified-Tryptone Soya Broth (m-TSB), contenente novobiocina [20 mg/l] ed incubata a 37 °C per 18-20 h. Da ciascun brodo di arricchimento è stato effettuato uno screening molecolare rapido, mediante la metodica *EU Food PCR Project*, modificata. Su 1 ml di ciascun campione veniva effettuata: 1) l'estrazione del DNA, mediante le resine Chelex-100 (Bio-Rad, USA) e 2) l'amplificazione dei geni *stx*₁ e *stx*₂. I brodi risultati positivi allo screening molecolare sono stati sottoposti a separazione immunomagnetica (IMS) manuale, impiegando il Dynal MPC®-E-1 per la ricerca dei sierogruppi O157, O26, O103, O111 ed O145. Da ciascun complesso Dynabeads-microrganismo è stata effettuata la semina sui seguenti terreni: CT-SMAC (agar cefixime tellurite sorbitolo di MacConkey) per la ricerca di O157, CT-RMAC (agar cefixime tellurite ramnosio di MacConkey) per O26 ed EHLy agar per i sierogruppi O103, O111 e O145 e le piastre sono state incubate a 37 °C per 24 h. Gli isolati con caratteristiche morfologiche tipiche venivano sottoposti ad identificazione fenotipica con il Sistema API 20E (BioMérieux). Su tutti gli isolati risultati *E. coli* alle prove fenotipiche, è stata eseguita una PCR multiplex per la ricerca dei geni *stx*₁, *stx*₂, *hlyA* ed *eae*, secondo le condizioni descritte da Paton e Paton e nel Report EFSA del 2009 (10;11). Successivamente, una selezione di ceppi, isolati a partire da animali diversi e/o da matrici diverse provenienti dallo stesso

animale, è stata sottoposta a caratterizzazione molecolare mediante PCR Real Time (RT-PCR) utilizzando il Lightcycler 480 Roche (Roche Diagnostics, UK), per la ricerca dei geni *per*, *wzx*, *wzx*, *wyz*, *lhp1* che codificano, rispettivamente, per i sierogruppi O157, O26, O103, O111 e O145; sugli stessi isolati sono state inoltre condotte due distinte PCR (simplex e duplex) per la ricerca del sierogruppo O91 (gene *wbsD*) e O146 (geni *wzx* e *wzy*), secondo i protocolli, rispettivamente, di Perelle et al. (12) e Liu et al. (13).

RISULTATI

La prevalenza complessiva dei VTEC, rilevata sulla base dello screening preliminare mediante PCR, è risultata pari al 11,1% e superiore nelle pecore adulte (14%) rispetto agli agnelli (7,8%). In relazione alle singole matrici, sono risultati positivi il 18,9% dei campioni di cute, il 14,7% delle carcasse ed il 10,5% delle mucose (tabella n.1). A seguito delle semine sui terreni selettivi, sono stati isolati n.124 ceppi, di cui n.29 presunti O157 (sorbitolo negativi sul CT-SMAC), isolati in varie matrici prelevate in stabilimenti distinti; n.21 presunti O26 (ramnosio negativi sul CT-RMAC), isolati in varie matrici; n.74 dall'EHLy agar, di cui n.26 presunti O103, n.24 presunti O111 e n.24 presunti O145. Tutti gli isolati si sono confermati *E. coli* all'identificazione fenotipica di specie. La caratterizzazione molecolare effettuata mediante PCR multiplex ha messo in evidenza la presenza di almeno un fattore di virulenza nel 59% (n.73) degli isolati, con i seguenti profili di patogenicità: 1) presenza di uno dei geni *vtx* (patogruppo VTEC): rispettivamente il 21% (n.26), di cui l'85% (n.22) presentava anche il gene *eae* ed il 62% (n.16) anche *hlyA* (patogruppo EHEC); 2) presenza di tutti i geni ricercati (*vtx1*, *vtx2*, *eae*, *hlyA*): 6,5% (n.8). In particolare n.17 ceppi presentavano entrambi i geni *vtx*. La prevalenza degli EPEC è risultata pari al 37,9% (n.47). Non è stata invece rilevata la presenza di nessuno dei fattori ricercati nel 41,1% (n.51) degli isolati. Complessivamente la sierotipizzazione mediante RT-PCR è stata effettuata su n.37 isolati, provenienti da 34 campioni. Per nessuno è stata confermata l'appartenenza al sierotipo precedentemente ipotizzato sulla base dei risultati dell'IMS (O157, O26, O103, O111 ed O145). Relativamente alla determinazione dei sierogruppi, effettuata mediante PCR, nessuno degli isolati è risultato appartenere al sierogruppo O146, mentre n.21 (56,8%) ricadevano nel sierogruppo O91. Di questi, n.5 hanno mostrato un profilo di patogenicità riconducibile al sierogruppo VTEC, dei quali n.1 era EHEC, n.4 risultavano EPEC; n.4 invece erano *stx*- ma posi-

tivi al gene *eae*, di questi n.2 erano anche *hlyA*+; infine, n.12 erano negativi per la presenza di tutti i geni di virulenza ricercati (tabella n.2).

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

La ricerca dei VTEC effettuata mediante PCR direttamente sulle matrici, ha evidenziato una prevalenza di ovini portatori (11,1%) più elevata rispetto a quanto riportano altri autori per O157:H7 (0,3-7 %) (14). La cute si è confermata una matrice a rischio (1), specie nelle pecore ed inoltre risulta rilevante la positività delle carcasse, che può essere ricondotta alla contaminazione fecale visibile, frequente soprattutto negli agnelli, che presentavano feci di consistenza molle e talvolta diarroiche. In questi casi l'aumento della velocità della catena, che si verifica nei periodi in cui si concentra la macellazione degli ovini, è spesso causa di inadeguata applicazione di buone pratiche igieniche e di macellazione.

I risultati della sierotipizzazione mostrano che gli ovini rappresentano un importante reservoir di differenti sierotipi di *E. coli* potenzialmente patogeni. Infatti il riscontro di numerosi O91 nelle matrici ovine conferma i dati riportati da precedenti autori (8;15), ma l'assenza, in alcuni di essi, dei geni che codificano per le verocitotossine e l'intimina indica che questi non appartengono ai sierotipi più patogeni. Tuttavia l'individuazione di alcuni fattori di adesione e citotossici (dati non pubblicati), non permette di escludere un loro potenziale effetto patogeno sulle cellule epiteliali (14).

E' da sottolineare il riscontro di 4 ceppi VTEC ed EPEC che rivestono un rilevante significato epidemiologico e sanitario. In particolare, Aktan et al. (16) hanno ipotizzato un miglior adattamento degli EPEC nella pecora, che sarebbe maggiormente esposta a tale patogruppo rispetto ad altre specie, anche se ancora non sono state chiarite le fonti di contaminazione. Queste ipotesi necessitano di ulteriori indagini e suggeriscono che gli ovini sono un *reservoir* di *E. coli eae*+ sierologicamente e geneticamente differenti. La presenza dei geni *vtx* in questi isolati è risultata tuttavia meno frequente rispetto a quanto riportato in precedenti indagini (17;18). Ciò può essere dovuto alla diversa sensibilità dei metodi utilizzati, alle differenti matrici considerate e a fenomeni di riarrangiamento genetico mediato da batteriofagi che codificano per il gene *stx* (3).

Tabella 1. Risultati della valutazione della

prevalenza (%) di VTEC in ovini macellati, mediante metodica di screening PCR, in relazione alla matrice e all'età degli animali

	matrici			
	cute	carcassa	mucosa	feci
Pecore	13,7	9,5	6,3	-
Agnelli	5,3	5,2	4,2	-
Totale	18,9	14,7	10,5	-

- : al di sotto del limite di rilevabilità della metodica

Figura 1. Amplificati ottenuti da PCR multiplex (*stx1*, *stx2*, *hlyA*, *eae*). Lane 1: marker (100 pb); lane 2: controllo di reazione; lane 3-10: DNA degli isolati; lane 11: controllo negativo; lane 12: controllo positivo.

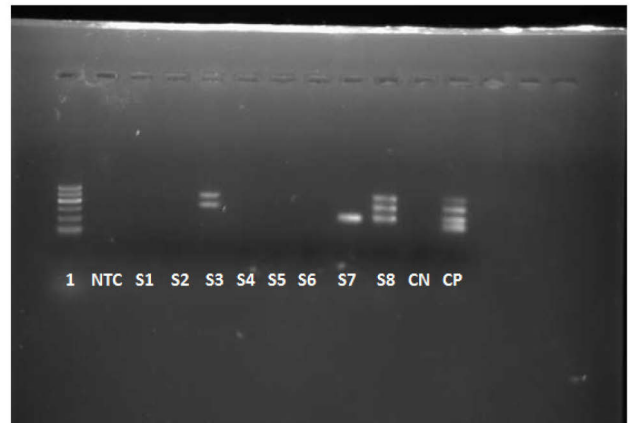


Tabella 2. Relazione tra i sierogruppi (ottenuti mediante PCR Real time), i profili di virulenza (ottenuti mediante PCR multiplex), la matrice e l'età dell'animale.

Siero gruppo	animale	matrice	stx1	stx2	eae	hlyA
O91 ^{ad}	agnello	mucosa	-	-	+	-
O91 ^{ad}	pecora	carcassa	-	-	-	-
O91 ^{ad}	pecora	cute	-	+	+	-
O91 ^{ad}	pecora	cute	-	-	-	-
O91 ^{ad}	pecora	carcassa	-	-	-	-
O91 ^{ad}	pecora	carcassa	-	-	-	-
O91 ^{ad}	pecora	mucosa	-	-	-	-
O91 ^{ad}	pecora	mucosa	+	+	-	-
O91 ^{ad}	pecora	carcassa	-	-	-	-
O91 ^{ad}	pecora	carcassa	-	-	-	-
O91 ^{ad}	pecora	carcassa	-	-	-	-
O91 ^{ad}	pecora	mucosa	-	-	-	-

O91 ^{ad}	pecora	carcassa	-	-	-	-
O91 ^{ad}	agnello	carcassa	-	-	+	+
O91 ^{ad}	pecora	carcassa	-	-	+	+
O91 ^{ad}	pecora	mucosa	-	-	-	-
O91 ^{ad}	pecora	mucosa	+	+	+	-
O91 ^{ad}	pecora	carcassa	+	+	+	+
O91 ^{ad}	agnello	cute	+	+	+	-
O91 ^{ad}	pecora	cute	-	-	-	-
O91 ^{ad}	agnello	carcassa	-	-	+	-

^aSierotipi precedentemente associati con ceppi VTEC isolate da casi di SEU. ^bSierotipi precedentemente isolati in ceppi umani. ^cSierotipi precedentemente isolati in ceppi bovini. ^d Sierotipi precedentemente isolati in ceppi ovini

BIBLIOGRAFIA

- Karmali, M.A., Gannon, V., Sargeant, J.M. (2010). Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Veterinary Microbiology*, 140, 360–370.
- Bonardi, S., Leccese, C. (2006). Il ruolo della specie bovina e di altri ruminanti nell'epidemiologia delle infezioni da *Escherichia Coli* vero citotossici. *Annali della Facoltà di Medicina Veterinaria di Parma*, XXVI, 205-218.
- Beutin, L., Geier, D., Zimmermann, S., Aleksic, S., Gillespie, H. A., Whittam, T. S. (1997). Epidemiological relatedness and clonal types of natural populations of *Escherichia coli* strains producing Shiga toxins in separate populations of cattle and sheep. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 2175–2180.
- Kudva, I.T., Hatfield, P.G., Hovde, C.J. (1997). Characterization of *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* serotypes isolated from sheep. *Journal of Clinical Microbiology*, 35, 892–899.
- Djordjevic, S.P., Ramachandran, V., Bettelheim, K. A., Vanselow, B. A., Holst, P., Bailey, G., Hornitzky, M. A. (2004). Serotypes and Virulence Gene Profiles of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains Isolated from Feces of Pasture-Fed and Lot-Fed Sheep. *Applied and Environmental Microbiology*, 70 (7), 3910–3917.
- Zweifel, C., Zychowska, M.A., Stephan, R. (2004). Prevalence and characteristics of shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. isolated from slaughtered sheep in Switzerland. *International Journal Food Microbiology*, 92, 45–53.
- Blanco, J., Blanco, M., Blanco, J. E., Mora, A., Alonso, M. P., Gonzalez, E. A. and Bernardez, M. I. (2001). Epidemiology of verocytotoxigenic (VTEC) in ruminants, p. 113–148. In G. Duffy, P. Garvey, and D. McDowell (ed.), *Verocytotoxigenic Escherichia coli*. Food and Nutrition Press Inc., Trumbull, Conn.
- Blanco, M., Blanco, J. E., Mora, A., Rey, J., Alonso, J. M., Hermoso, M., Hermoso, J., Alonso, M. P., Dahbi, G., Gonzalez, E. A., Bernardez, M. I., Blanco, J. (2003). Serotypes, virulence genes, and intimin types of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* isolates from healthy sheep in Spain. *Journal of Clinical Microbiology*, 41, 1351–1356.
- Urdahl, A.M., Alvseike, O., Skjerve, E., Wasteson, Y. (2001). Shiga toxin genes (*stx*) in Norwegian sheep herds. *Epidemiol Infect*, 127, 129 – 134.
- Paton, J.C., Paton, A.W. (1998). Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. *Journal of Clinical Microbiology*, 11, 450–479.
- Scientific Report Technical specifications for the monitoring and reporting of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) on animals and food (VTEC surveys on animals and food). *EFSA Journal* 2009; 7 (11):1366.
- Perelle, S., Dilasser, F., Grout, J., Fach, P. (2002). Identification of the O-antigen biosynthesis genes of *Escherichia coli* O91 and development of a O91 PCR serotyping test. *Journal of Applied Microbiology*, 93(5), 758–764
- Liu, Y., DedRoy, C., Fratamico, P. (2007). Sequencing and analysis of the *Escherichia coli* serogroup O117, O126, and O146 O-antigen gene clusters and development of PCR assays targeting serogroup O117-, O126-, and O146-specific DNA sequences. *Molecular and Cellular Probes*, 21, 295-302.
- Kaper, J.B., Elliott, S., Sperandio, V., Perna, N.T., Mayhew, G.F., Blattner, F.R. (1998). Attaching-and-effacing intestinal histopathology and the locus of enterocyte effacement. *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga Toxin-Producing *E. coli* Strains (O'Brien AD and Kaper JB, eds), 163–182. ASM Press, Washington, DC.
- Hussein, H.S., Thran, B.H., Glimp, H.A. (2003). Verotoxin-producing *Escherichia coli* in sheep grazing an irrigated pasture or arid rangeland forages. *Experimental Biology and Medicine*, 228 (4), 358-364.

16. Aktan, I., Sprigings, K. A., La Ragione, R. M., Faulkner, L. M., Paiba, G. A., Woodward, M. J. (2004). Characterisation of attaching-effacing *Escherichia coli* isolated from animals at slaughter in England and Wales. *Veterinary Microbiology*, 102, 43–53.
17. Rey, J., Blanco, J. E., Blanco, M., Mora, A., Dahbi, G., Alonso, J. M., Hermoso, M., Hermoso, J., Pilar, Alonso M., Usera, M. A., González, E. A., Bernárdez, M. I., Blanco, J. (2003). Serotypes, phage types and virulence genes of Shiga-producing *Escherichia coli* isolated from sheep in Spain. *Veterinary Microbiology*, 94, 47–56.
18. Sánchez, S., Martínez, R., García, A., Benítez, J.M., Blanco, J., Blanco, J.E., Blanco, M., Dahbi, G., López, C., Mora, A., Alonso, J.M., Rey, J. (2010). Variation in the prevalence of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in four sheep flocks during a 12-month longitudinal study. *Small Ruminant Research*, 144-148.

Lavoro finanziato con fondi PRIN 2007.