



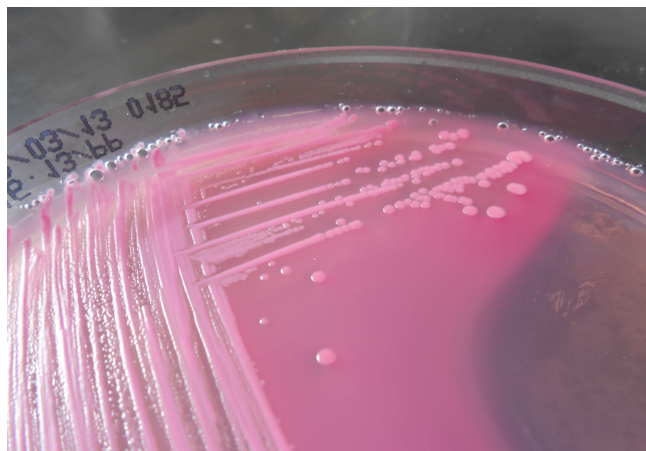
Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

## DIAGNOSTICA MOLECOLARE APPLICATA ALLA SICUREZZA ALIMENTARE: METODI ISO

6 e 7 ottobre 2015

### ISO 13136:2012 Escherichia coli (STEC) Applicazione e problematiche legate all'interpretazione dei risultati

*Paola De Santis*



*Università di Roma Tor Vergata*



Gli *Escherichia coli* verocitotossici (STEC) sono un gruppo di *E. coli* enteroemorragici in grado di produrre delle tossine denominate verocitossine.

La malattia nell'uomo è più frequentemente causata dal sierogruppo O157.

Sono in aumento tuttavia i casi legati ad altri sierogruppi: O26, O111, O103 e O145 (O104)



**Diffusione in natura.** Gli *E. 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, cane etc..) e selvatici (cervo, camoscio, stambecco, etc..). Tra i ruminanti, i bovini rappresentano il principale serbatoio, in particolare di *E. coli* O157.



**Modalità di trasmissione.** La principale via di trasmissione del batterio all'uomo è rappresentata dal consumo di **alimenti** e acqua contaminati da materiale fecale, ma anche il **contatto diretto** con animali infetti (fattorie didattiche, allevamenti, etc..) e **contatto persona-persona**. Gli alimenti a rischio sono la **carne cruda** e le preparazioni a base di carne poco cotta, il **latte** crudo, i prodotti caseari e i **vegetali** crudi.

La contaminazione delle carni avviene durante le fasi di macellazione e sezionamento;

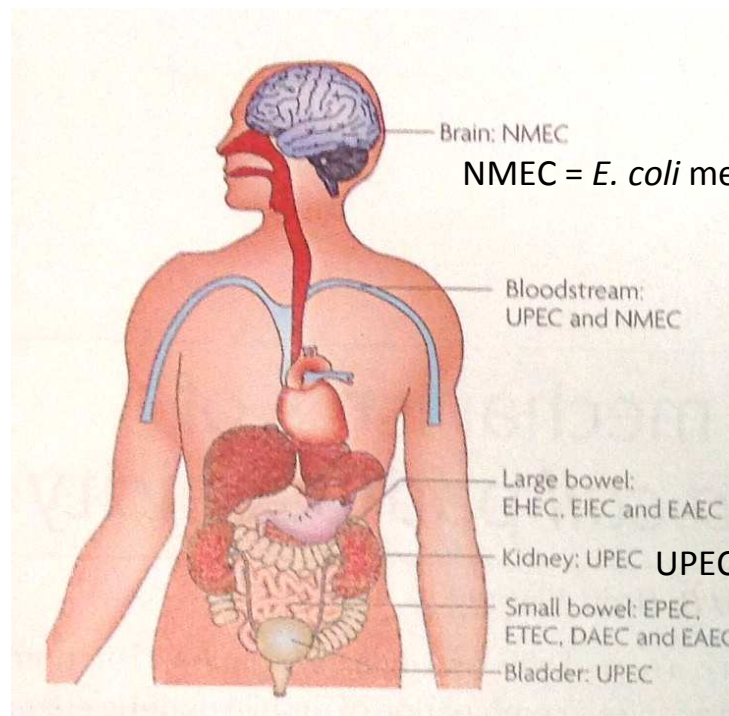
I prodotti lattiero-caseari sono fonte di infezione se prodotti con latte non pastorizzato oppure in caso di contaminazione post-pastorizzazione.



**Sintomi.** I casi di STEC nell'uomo sono sporadici. I sintomi **principali** sono:

- diarrea da lieve a severa;
- tipo emorragico;
- crampi e dolore addominale;
- assenza di febbre.

Le infezioni possono essere causa di patologie più gravi come la **sindrome emolitica uremica (SEU)** caratterizzata da danno renale acuto, anemia emolitica e piastrinopenia. La SEU compare in più del 10% delle persone infettate ed è causa di danno renale acuto soprattutto nei bambini e anziani e nel 3-5% può essere fatale.



NMEC = *E. coli* meningite neonatale

UPEC = *E. coli* uropatogenici

EPEC = *E. coli* enteropatogeni

ETEC = *E. coli* enterotossigenici

DAEC = *E. coli* diffusamente aderenti

Piccolo Intestino

EHEC = *E. coli* enteroemorragici

EIEC = *E. coli* enteroinvasivi

Grosso Intestino

EAEC = *E. coli* enteroaggregativi

Piccolo e Grosso Intestino





**Prevenzione.** La diffusione e la trasmissione delle infezioni causate da *E. coli* STEC può essere controllata con l'utilizzo di opportune misure igieniche durante la macellazione, la lavorazione e la commercializzazione. Gli accorgimenti domestici sono:

- **PULIZIA:** lavarsi accuratamente le mani con sapone ed acqua calda prima e dopo aver manipolato gli alimenti soprattutto se crudi.
- **SEPARARE ALIMENTI CRUDI E COTTI:** Non riutilizzare per altri alimenti, se non dopo lavaggio accurato, coltelli e taglieri utilizzati per alimenti crudi.
- **COTTURA:** importante cuocere bene le carni, soprattutto bovine, e consumare il latte crudo previa bollitura.



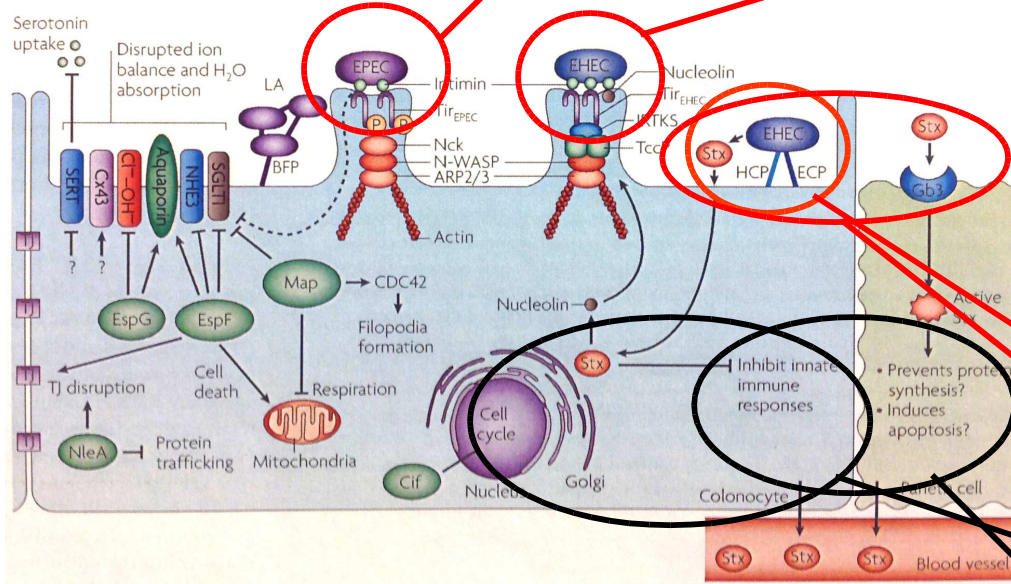
## Lesione attaching and effacing' (AE):

Distruzione dei microvilli

Adesione del batterio alla membrana enterocita lesionata

Formazione di piedistalli e placche di actina

## Meccanismo d'azione EPEC e EHEC:



**Fattori di adesione:** adesione alla cellula ospite

Intimina = gene *eae*

Fimbrie

Pili

} appendici

**Fattori di sovvertimento dei processi cellulari:**

Secrezione proteine:

Evasione del sistema immunitario

**Colonizzazione batterica**

Adesione mediante Fimbrie e Pili

Micropinocitosi e  
recettori specifici su Cellule di Paneth  
Inibizione risposta immunitaria

Morte cellulare per blocco della  
sintesi proteica

## Elementi mobili:

Plasmidi di virulenza

Fagi → Stx1 e Stx2

**Stx:** meccanismo di rilascio  
mediato da lisi fagica in risposta  
a danno DNA e SOS-response

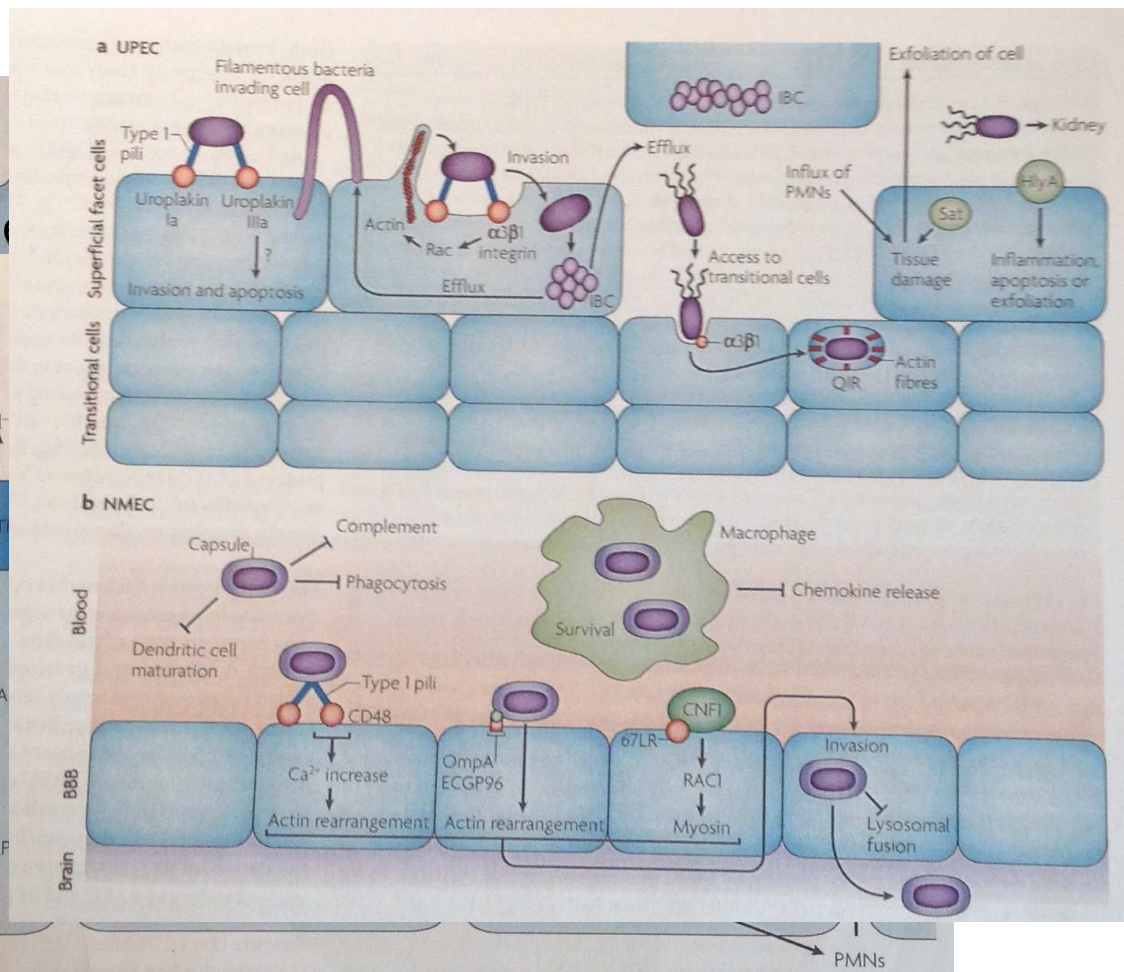
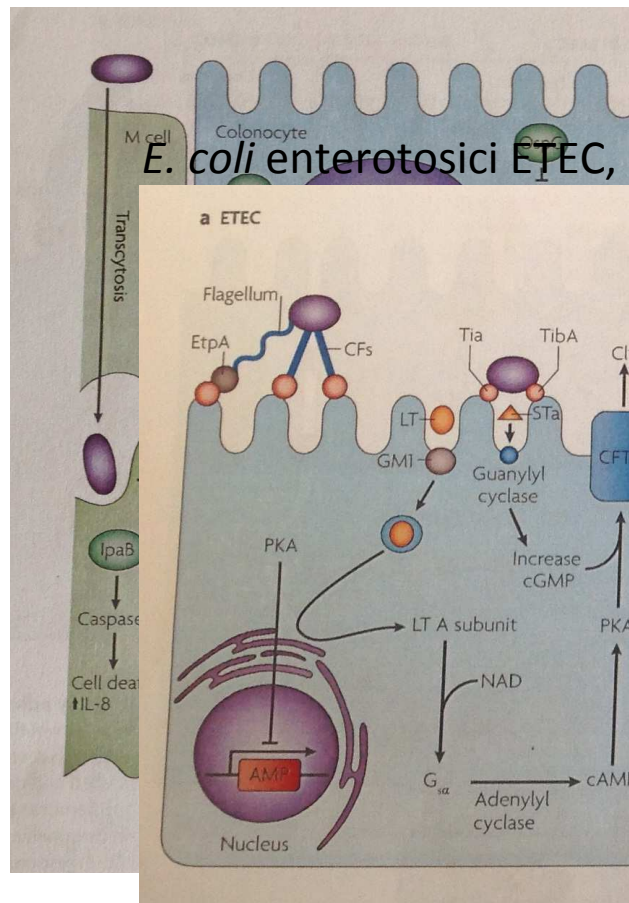




## Altri meccanismi d'azione:

### E. coli extraintestinali UPEC e NMEC

### E. coli enteroinvasivi EIEC





# THE EUROPEAN UNION

## SUMMARY REPORT

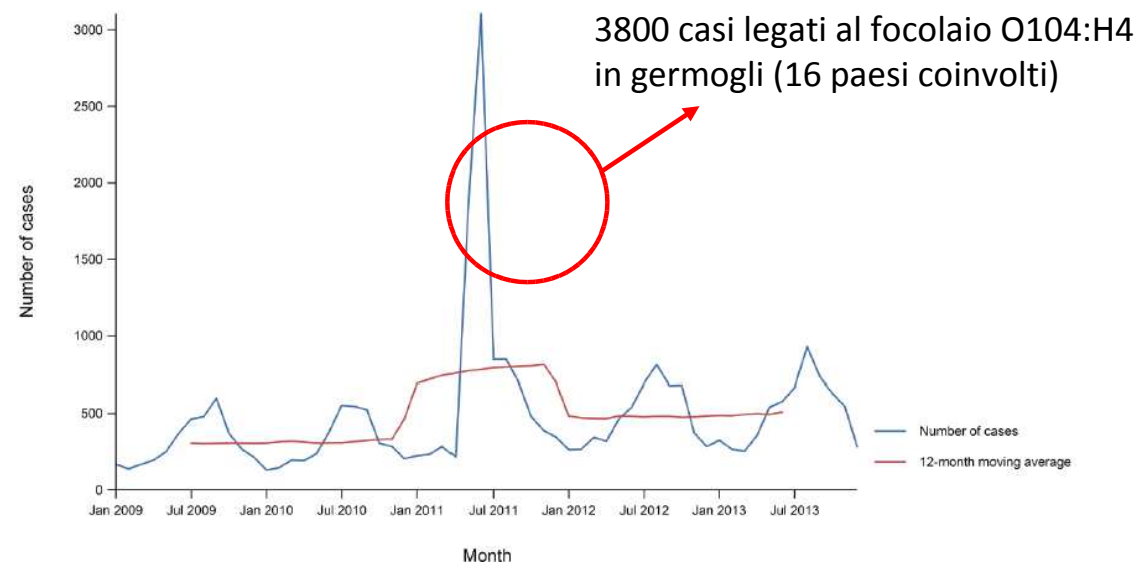


EU summary report on zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks 2013

### Trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013

Approved on 18 December 2014

Published on 28 January 2015



Source: Austria, Belgium, Bulgaria, Cyprus, Denmark, Estonia, Finland, France, Germany, Greece, Hungary, Iceland, Ireland, Italy, Latvia, Lithuania, Luxembourg, Malta, the Netherlands, Norway, Poland, Slovakia, Slovenia, Sweden, and United Kingdom. Croatia, the Czech Republic, Spain and Romania did not report data over the whole period at the level of detail required for the analysis. Portugal does not have any surveillance system for this disease.

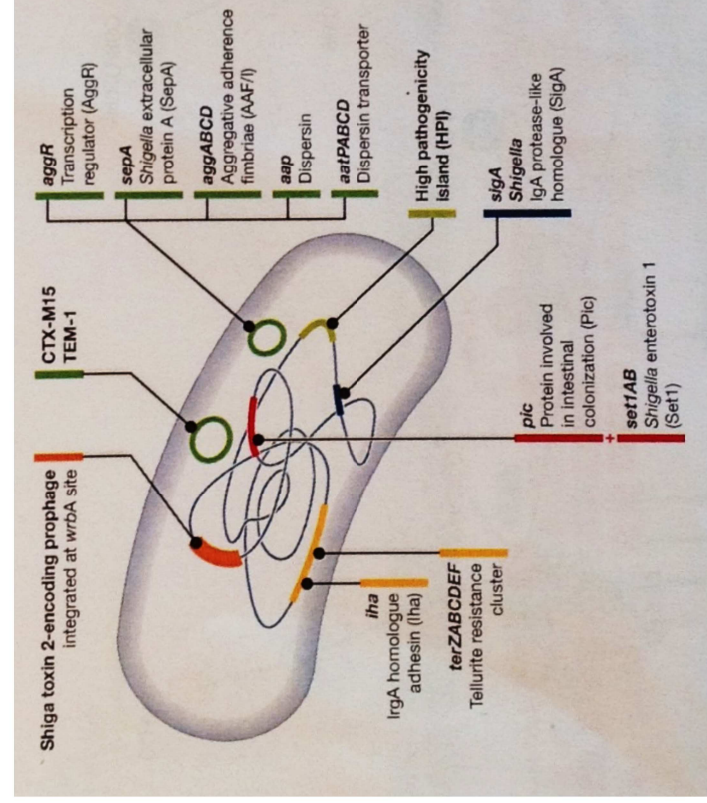
**Distribuzione della malattia.** Nel 2011 il numero totale di casi umani di *E. coli* STEC in Europa è stato di 9487. I casi di SEU soprattutto dovuti a *E. coli* O157, ma anche a O26 e infine O103.

	2013					2012		2011		2010		2009	
	National Coverage <sup>(a)</sup>	Data Format <sup>(a)</sup>	Total Cases	Confirmed Cases & Rates		Confirmed Cases & Rates		Confirmed Cases & Rates		Confirmed Cases & Rates		Confirmed Cases & Rates	
				Cases	Rate	Cases	Rate	Cases	Rate	Cases	Rate	Cases	Rate
EU Total	-	-	6112	6043	1.59	5680	1.50	9487	2.58	3656	1.00	3580	0.98



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

**Focolaio Primavera 2011 Germania**

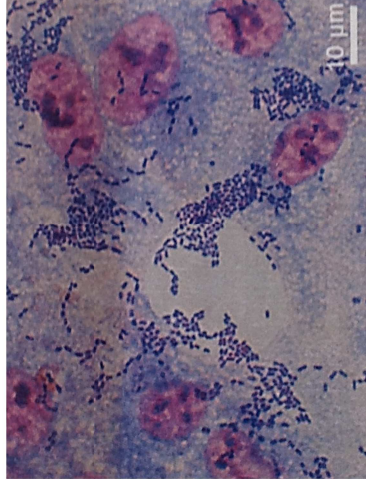
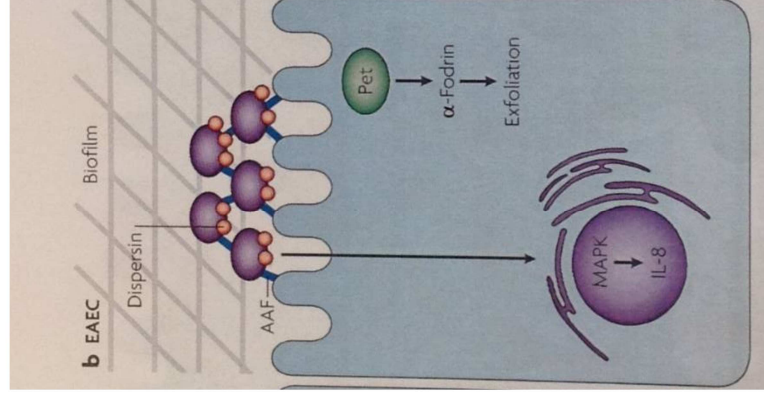


**Stesso ceppo O104:H4**

**4000 persone malate**  
**900 casi di SEU**  
**54 decessi**

**Estate 2011 Francia**

**15 persone malate**  
**9 casi SEU**

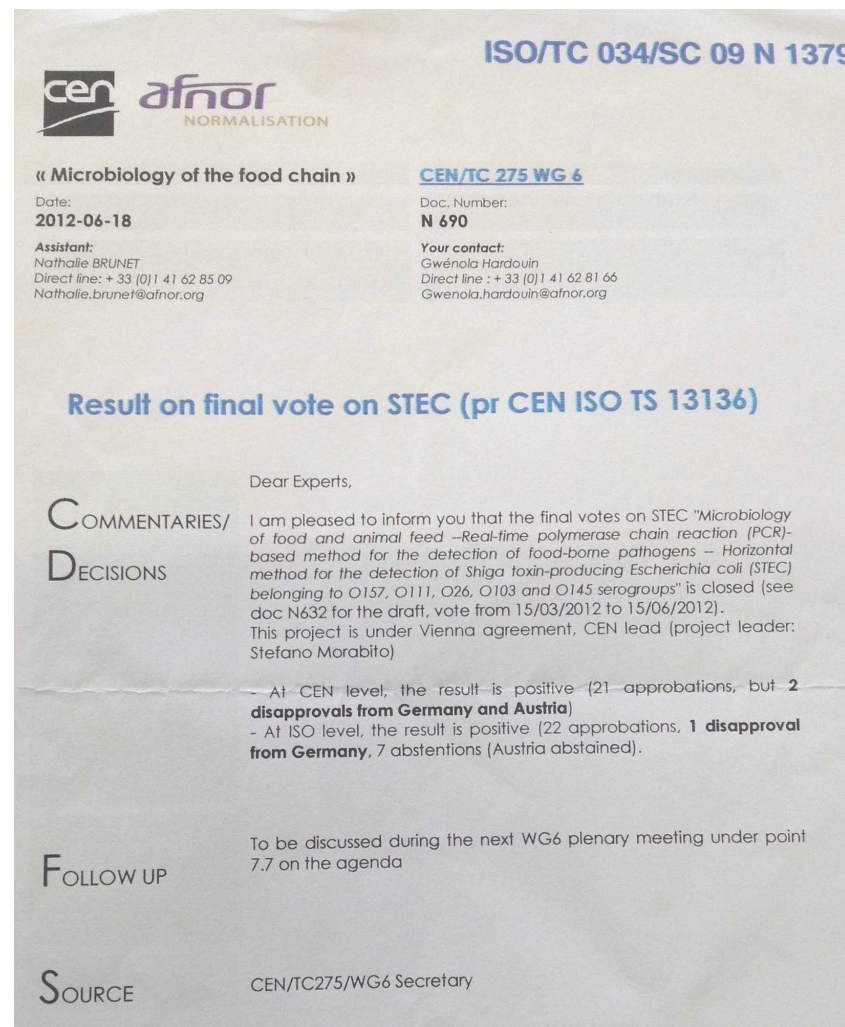
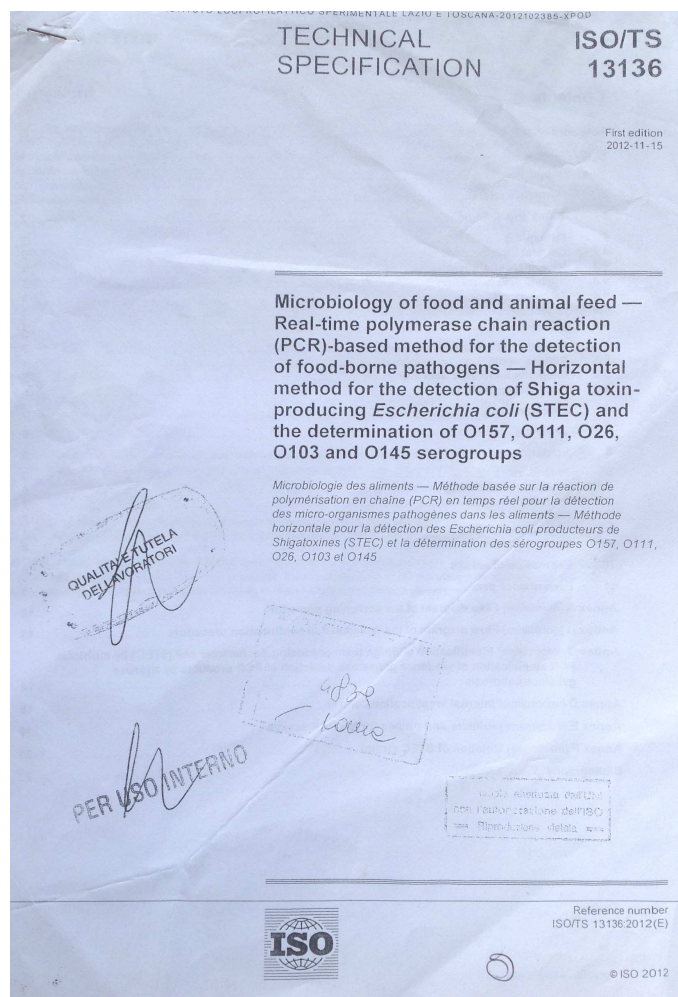






Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana M. Aleandri

## ISO/TS 13136:2012





Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

## DESTINO della ISO/TS 13136:2012

- ✓ In vigore per 3 anni, rinnovata per altri 3 anni; quindi o diventa un International Standard o viene ritirata
- ✓ Rivista per diventare International Standard
- ✓ Ritirata





Data la plasticità del genoma di *E. coli* che può dare origine a nuovi e atipici sierogruppi patogeni, come già successo nel 2011 in Germania e Francia con il ceppo *E. coli* O104:H4, gli STEC saranno individuati in quanto positivi per i geni *stx*.

Il metodo segue..... il gene



**ISO/TS 13136:2012** descrive l'identificazione di *Escherichia coli* produttori di tossina/e Shiga (STEC) mediante la rilevazione dei geni:

- a) di virulenza *stx* e *eae*;
- b) associati ai sierogruppi O157, O111, O26, O103, and O145.

Quando uno o entrambi i geni *stx* sono rilevati, si procede al **tentativo** di isolamento del ceppo.

Per l'isolamento è **possibile** utilizzare tecniche di arricchimento sierogruppo-specifiche (e.g. immunomagnetic separation: IMS).

Il protocollo utilizza il metodo PCR real-time come tecnologia di riferimento per la rilevazione dei geni sia di virulenza che sierogruppo-associati.

ISO/TR 13136:2012 si applica a:

- 1) prodotti alimentari per l'uomo e mangimi per animali;
- 2) campioni ambientali raccolti nelle aree di produzione o manipolazione degli alimenti;
- 3) campioni ambientali nell'area di produzione primaria



## Termini e definizioni

*E. coli* produttori di Shiga tossine: *E. coli* che possiedono i geni per le tossine Stx = **STEC**

*E. coli* produttori di Shiga tossine che causano la lesione attaching & effacing (AE): *E. coli* che possiedono i geni per le tossine Stx e il gene *eae* che codifica per l'intimina = **STEC che causano la lesione AE**

*E. coli* "BIG 5" produttori di Shiga tossine che causano la lesione attaching & effacing (AE): *E. coli* che possiedono i geni per le tossine Stx e il gene *eae* che codifica per l'intimina e appartiene ai sierogruppi altamente patogeni O157, O111, O26, O103 e O145.



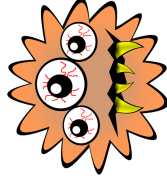
## Procedura (1)

### Screening

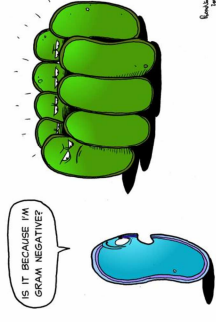
#### 1 Arricchimento microbico:

mTSB + novobiocina

mTSB + acriflavina (latte e formaggi)



BPW



Buste con filtro

Diluizione del campione  $10^{-1}$

2

Incubazione del brodo di arricchimento:

37°C 18-24h





3

Purificazione del DNA dal brodo di arricchimento

4

Rilevazione dei geni target nel brodo di arricchimento:

PCR real time



5

Geni target:

*stx 1*

*stx2a, stx2b, stx2c*

*eae*

*sierogruppi:*

*rfbE (O157)*

*wbdl (O111)*

*wzx (O26)*

*ihp1 (O145)*

*wzx (O103)*

O104 reg. EU n° 209/2013 mod reg 2073/2005



## Conferma

6

Isolamento dei ceppi di *E. coli* :

brodi di arricchimento positivi

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



7

### Metodo per l'isolamento:

Sierogruppo noto allo screening brodi di arricchimento:

**O157:** Arricchimento sierogruppo specifico (IMS O157)

CT-SMAC

SMAC senza antibiotici (*E. coli* O157 sorbitolo + sensibili a Tellurite)

Sono analizzate anche colonie sorbitolo negative

**O26:** MacConkey con ramnosio (RMAC) (O26 ramnosio -)

La conferma di *E. coli* può essere fatta con metodi biochimici multi-assay  
(Api gallerie) oppure con test indolo





## Negativo

1

Campioni negativi allo screening in PCR per i geni *stx*:  
**Assenza di STEC in x grammi o x ml**

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



2

## Positivo senza isolamento del ceppo

Campioni positivi allo screening in PCR per i geni *stx* senza isolamento del ceppo:

**Presunta presenza di STEC in x grammi o x ml**

Campioni positivi allo screening in PCR per i geni *stx* e *eae* senza isolamento del ceppo:

**Presunta presenza di STEC in grado di causare la lesione attaching/effacing (AE) in x grammi o x ml**

Campioni positivi allo screening in PCR per i geni *stx* e *eae* e positivi per uno dei geni di sierogruppo senza isolamento del ceppo:

**Presunta presenza di STEC appartenente al sierogruppo OXX in grado di causare la lesione attaching/effacing (AE) in x grammi o x ml**



3

## Positivo con isolamento del ceppo

Campioni positivi allo screening in PCR solo per i geni *stx* con isolamento del ceppo *stx*-positivo:

**Presenza di STEC in x grammi o x ml**

Campioni positivi allo screening in PCR per i geni *stx* e *eae* con isolamento del ceppo *stx* + *eae*-positivo :

**Presenza di STEC in grado di causare la lesione attaching/effacing (AE) in x grammi o x ml**

Campioni positivi allo screening in PCR per i geni *stx* e *eae* e positivi per uno dei geni di sierogruppo con isolamento del ceppo *stx* + *eae*-positivo:

**Presenza di STEC appartenente al sierogruppo OXX in x grammi o x ml**






Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Sito internet per ulteriori informazioni:

<http://www.iss.it/vtec/>



## European Union Reference Laboratory VTEC

(EN) Person in charge: [Alfredo Caprioli](#)

Search

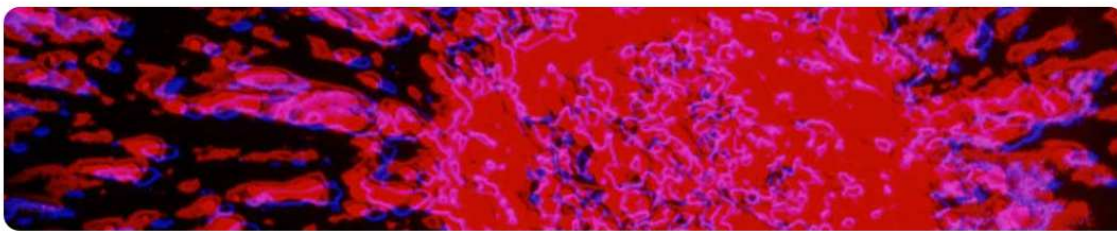
You're in: [ISS](#) > [VTEC](#)

On this website

- Home
- About EU-RL-VTEC
- EU-RL Staff
- Laboratory methods
- Proficiency Tests
- Training at the EU-RL
- E. coli genomics
- Annual Workshops
- Documents
- EU-NRLs for VTEC
- OTHER NRLs for VTEC
- EU-RLs
- Publications of the EU-RL
- EU-RL Services
- Focus on

Utility

Contact us



### Focus on

#### Galaxy platform ARIES

EU-RL VTEC and IT services of the Istituto Superiore di Sanità in Rome, have developed a web platform for the analysis of genomic data in the field of public health and food safety, with the aim of deploying a comprehensive bioinformatics approach to the study of food-borne zoonoses and infectious diseases at the human and animal interface.

**The Galaxy platform [ARIES](#) (Advanced Research Infrastructure for Experimentation in genomics) will be accessible in the next few days!**

ARIES is currently optimized for the analysis of E. coli genomes, but the tools implemented can be adapted to the analysis of other pathogens upon request, by integrating reference databases.

The use of a common and easy-to-use platform will...

Published 09-25-2015 in Focus on , last update 09-25-2015 [More...](#)

Share: [in](#) [Share](#) [Tweet](#) [G+](#)

