

***Yersinia enterocolitica* approccio One-Health: indagine sulle fonti di trasmissione all'uomo a partire da isolati pervenuti dal territorio nazionale**

Elisabetta Delibato¹, Laura De Santis², Francesco Tomassetti², Ventola Eleonora¹, Michelacci Valeria¹, Barbara Bertasi³, Yolande Proroga⁴, Silvana Farneti⁵, Sarah Lovari²

¹ Istituto Superiore di Sanità; ² Istituto Zooprofilattico di Lazio e Toscana; ³ Istituto Zooprofilattico di Lombardia ed Emilia Romagna
⁴ Istituto Zooprofilattico del Mezzogiorno; ⁵ Istituto Zooprofilattico di Umbria e Marche

Introduzione

- ❖ I dati EFSA nel 2021 individuano in *Yersinia enterocolitica* (Ye) il terzo agente zoonotico a livello europeo di malattie a trasmissione alimentare.
- ❖ La scarsa conoscenza dei suoi meccanismi multifattoriali di patogenicità, delle modalità di infezione degli animali e di interazione con la filiera alimentare rende difficile attuare piani di sorveglianza efficaci.
- ❖ Dal 2015, a seguito di un parere dell'EFSA, è stato emanato un metodo di riferimento basato sulla Real Time PCR (ISO/TS 18867) che individua come target di patogenicità il gene *ail*.
- ❖ Alla specie Ye appartengono stipiti caratterizzati da una notevole variabilità negli attributi di virulenza e solo alcuni bio-sierotipi sono patogeni per l'uomo e gli animali.
- ❖ Grazie al coinvolgimento di Unità Operative (UO) provenienti da tutto il territorio nazionale, il progetto ha permesso di indagare la prevalenza del patogeno in varie matrici alimentari ed ambientali e di implementare metodologie molecolari innovative per definire nuovi approcci di identificazione e caratterizzazione dei ceppi di Ye circolanti sul territorio italiano.

Materiali e Metodi

Campionamento

- Sono stati collezionati dalle UO operanti su tutto il territorio nazionale **2177** campioni

UO1-IZSLT	1276
UO3-IZSLER	73
UO4-IZSME	414
UO5-IZSUM	414

appartenenti a varie tipologie Fig.1

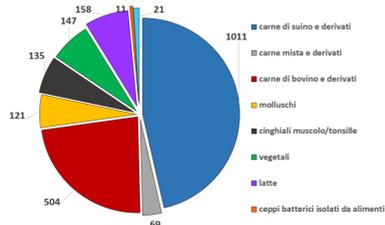


Fig.1

- Sono stati caratterizzati :

- 87 ceppi batterici collezionati dalla UO2 ISS (Fig.2)

Ceppi di *Yersinia enterocolitica*

Biotipo	2	3	4	1A	Tot.
N. ceppi	5	1	32	49	87

- 26 ceppi batterici di origine umana provenienti dalla UO1
- 15 ceppi batterici di origine alimentare provenienti dalla UO1
- 14 ceppi batterici di origine umana provenienti dalla UO5



Fig.2

Metodi molecolari

* **Amplificazione gene *ail*** in accordo con ISO 18867:2015

* **Caratterizzazione geni di virulenza:** 2 piattaforme molecolari comprendenti 13 reazioni di amplificazione (Fig.3)

* **Sierotipizzazione molecolare** per i sierogruppi

O:8, O:3, O:5-O:5,27 e O:9 (Fig.4)

* **Whole Genome Sequencing** per la caratterizzazione dei ceppi di *Yersinia enterocolitica*

WGS eseguita sulla piattaforma ARIES (<https://w3.iss.it/site/aries/>) mediante: assemblaggio con SPAdes, rilevamento dei geni di resistenza antimicrobica (AMR) con ABRicate, rilevamento dei geni di virulenza (*ail*, *ystA*, *ystB*, *myfA*, *hreP*, *fepD*, *fes*, *ymoA*, *sat*, *virF* e *yadA*) e dei geni associati ai sierogruppi con blastn (cut-off di identità dell'80% e copertura minima della query del 60%). L'analisi del core genome-MLST (cgMLST) è stata eseguita con lo strumento chewBBACA.

piattaforma I	piattaforma II
<i>ail</i> - adhesion invasion locus	<i>ystC</i> - Yersinia stable toxin
<i>ystA</i> - Yersinia stable toxin	<i>hreP</i> - Host responsive element
<i>ystB</i> - Yersinia stable toxin	<i>fes</i> - enterochelin esterase
<i>myfA</i> - mucoide Yersinia factor	<i>fepD</i> - enterochelin ABC transporter
	<i>fepA</i> - enterochelin receptor protein
	<i>virF</i> - plasmid transcriptional factor
	<i>yadA</i> - plasmid adhesion protein
	<i>ymoA</i> - Yersinia modulator
	<i>sat</i> - streptogramin acetyltransferase

Fig.3

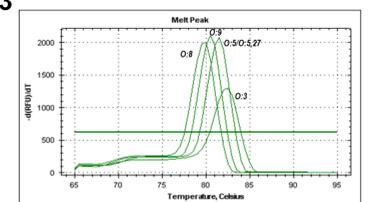


Fig.4 Curve di melting relative ai sierotipi O:8, O:3, O:5,27, O:9 e O:5

Risultati

- ✓ La prevalenza totale di identificazione della Ye patogena è risultata pari a 1,84 %;
- ✓ Il suino e il cinghiale si sono confermati quali principali serbatoi del patogeno, con una prevalenza di 1,56% sul totale dei campioni analizzati (Fig.5);
- ✓ I risultati ottenuti dalla ricerca hanno confermato la presenza del microorganismo oltre che nella filiera suinicola anche in altre categorie alimentari, come molluschi, bovini, latte crudo e vegetali, evidenziando tuttavia la prevalenza di ceppi di Ye "non patogeni";
- ✓ I risultati ottenuti dall'analisi molecolare dei ceppi isolati (n=40) da uomo hanno confermato la presenza del gene *ail* nel 75% e del gene *ystB* (presente nella maggior parte dei ceppi considerati «non patogeni») nel 25%
- ✓ Caratterizzazione molecolare dei ceppi di *Y. enterocolitica* (Fig.6)

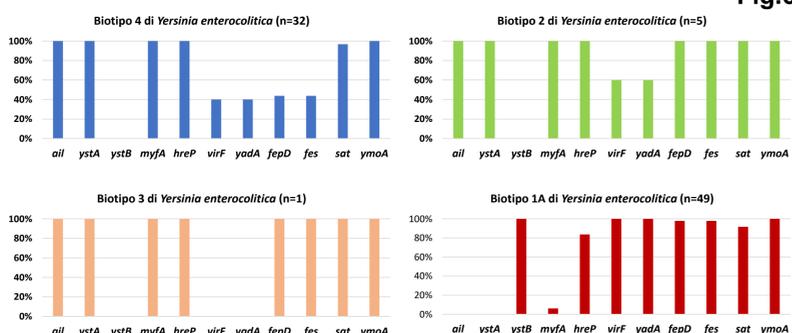


Fig.6

- ✓ La piattaforma real time PCR SYBR Green è stata utilizzata per sierotipizzare i ceppi di Ye; i risultati sono stati confrontati con quelli ottenuti dalla sierotipizzazione classica confermando una concordanza tra i due metodi del 100%.

- ✓ I risultati ottenuti dall'analisi dei ceppi mediante WGS hanno evidenziato una concordanza del 100% con i risultati ottenuti mediante Real-Time PCR sia per la sierotipizzazione che per la valutazione dei geni di virulenza

- ✓ L'analisi WGS relativa ai geni di AMR ha permesso di identificare: *vatF*, *rosA*, *rosB* e *blaA* nel 100% dei ceppi, *CRP* nel 96,4%, *sul1* e *qacEdelta1* nel 14,3%, *aadA12* nel 10,7%, *catI* nel 7,1% e *aadA1*, *tetA* e *tetR* nel 3,6%

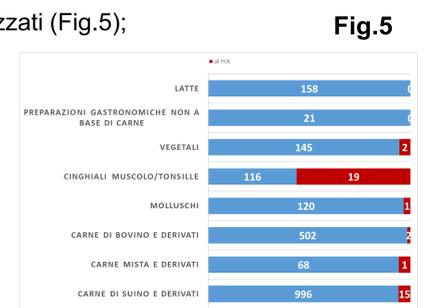


Fig.5

Discussione

La prevalenza totale di Ye patogena nei 2177 campioni analizzati si è confermata bassa (1,84 %) in linea con quanto riportato dal rapporto EFSA del 2019 per l'Italia. Il suino e il cinghiale si sono confermati quali principali serbatoi del patogeno; i risultati ottenuti hanno confermato la presenza di Ye anche in altre categorie alimentari, come molluschi, bovini, latte crudo e vegetali, evidenziando tuttavia la prevalenza di ceppi di Ye "non patogeni". I ceppi isolati da uomo hanno mostrato la presenza di Ye patogena (*ail* +) confermando quindi la sua circolazione nel territorio del centro Italia. I nostri risultati, seppur sovrapponibili con quelli riportati dall'ECDC, suggeriscono una sotto notifica dei casi umani di yersiniosi a livello nazionale, rispetto ad altri paesi europei e al numero di isolati di origine umana collezionati dai Centri di Riferimento Regionale degli IZSLT e IZSUM. Inoltre alcuni ceppi di Ye isolati da uomo sono risultati *ail* negativi e *ystB* positivi, avvalorando la tesi che anche nell'uomo possano essere presenti biotipi di Ye considerati «non patogeni». La messa a punto e l'implementazione di strategie analitiche molecolari utilizzate per l'analisi dei campioni e dei ceppi isolati ha permesso di rilevare con rapidità la presenza di Ye e individuarne le caratteristiche di patogenicità. Il sistema di sequenziamento dell'intero genoma (WGS) messo a punto consentirà di effettuare studi di epidemiologia molecolare, correlare le diverse fonti e valutare il rischio relativo a tale microorganismo, permettendo infine di avere informazioni sulla natura e la localizzazione a livello molecolare dei determinanti della resistenza antimicrobica.