

ESCHERICHIA COLI O157 E ALTRI VTEC: QUADRO EPIDEMIOLOGICO E INDICAZIONI OPERATIVE PER L'AUTORITÀ COMPETENTE PER LA SICUREZZA ALIMENTARE

Verocytotoxigenic E. coli (VTEC): epidemiology and operating instructions for the food safety competent authority

Mauro Cravero³, Bartolomeo Griglio¹, Silvia Marro¹, Dario Ariello⁵, Stefano Gatto⁶, Fabrizio Grifoni⁶, Marcello Caputo⁷, Cristina Leonardi⁸, Donatella Vaghi⁹, Patrizia Nebbia¹⁰, Sara Lomonaco², Tiziana Civera¹¹, Cristiana Maurella², Giuseppe Ru², Mauro Negro³

¹ Ce.I.R.S.A. - ASLTO5 Chieri (TO)

² Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta - Biostatistica, epidemiologia e analisi del rischio

³ Servizio Veterinario Igiene degli alimenti di origine animale - ASLCN1

⁴ Servizio Veterinario Igiene degli alimenti di origine animale - ASLTO3

⁵ Servizio Veterinario Sanità animale - ASLTO3

⁶ Servizio Veterinario Igiene degli allevamenti e delle produzioni zootecniche - ASLTO3

⁷ Coordinatore gruppo regionale malattie a trasmissione alimentare

⁸ Servizio Veterinario Igiene degli allevamenti e delle produzioni zootecniche - ASLNO

⁹ Servizio Veterinario Igiene degli alimenti di origine animale - ASLNO

¹⁰ Dipartimento di Scienze Veterinarie, Settore Malattie Infettive - Università degli Studi di Torino

¹¹ Dipartimento di Scienze Veterinarie, Settore ispezione degli alimenti - Università degli Studi di Torino

A
B
S
T
R
A
C
T

Verocytotoxigenic *E. coli* (VTEC), and particularly strains of serotype O157:H7, have emerged as food poisoning pathogens which can cause a severe and potentially fatal illness. They are a major cause of gastro-enteritis that may be complicated by haemorrhagic colitis (HC) or haemolytic uraemic syndrome (HUS), the main cause of acute renal failure in children.

Most outbreaks caused by *E. coli* O157:H7 have been food or water related. Likely vehicles of infection have been undercooked ground beef according to the bibliography. This document provides an updated framework on prevalence data that indicate the actual risk to public health related to the presence of *E. coli* VTEC in food.

Since cattle are found consistently to be a reservoir for *E. coli* strains in the environment, this paper proposes certain farm management practices, particularly those related to maintenance and multiplication of the agent in feed and water, that provide practical means to substantially reduce the prevalence of *E. coli* O157:H7 in cattle farm, and consequently human exposure.

This paper is also intended to be a source document for public health authority. For this purpose it provides guidance on monitoring and surveillance programs and on interpretation of microbiological analysis results.

It also supplies operating instructions for official controls in the light of obligations and objectives of regulation (EC) 882/2004, taking into account the risk assessment and the regulatory framework.

1. INTRODUZIONE

Tra i microrganismi trasmissibili all'uomo attraverso il consumo di alimenti, gli stipiti di *Escherichia coli* produttori di verocitotossine o VTEC (in particolare, il sierotipo O157:H7) hanno assunto importanza crescente a partire dai primi episodi segnalati negli anni '80. La

severità dell'infezione, che presenta quadri variabili, da una diarrea non complicata ad una colite emorragica, fino alla sindrome emolitico-uremica (SEU), unitamente alla bassa dose infettante, rendono il microorganismo particolarmente temibile, soprattutto per i soggetti più vulnerabili, quali i bambini e gli anziani.

Le infezioni da stipiti VTEC rappresentano un serio problema di sanità pubblica in tutti i paesi industrializzati, in particolare USA, Europa, Giappone, Canada e Australia. In queste aree si sono verificati focolai epidemici di vaste proporzioni a carico di consumatori che avevano assunto lo stesso alimento contaminato (Nataro *et al.*, 1998). Per il sierogruppo O157 il principale serbatoio è il bovino, eliminatore asintomatico tramite il suo contenuto intestinale; spesso però è un portatore solo temporaneo e il batterio può sopravvivere nella stalla o nell'ambiente.

Il primo episodio di malattia causata da *E. coli* O157 è stato descritto in Oregon e Michigan (USA) nel 1982 (Riley *et al.*, 1983), quando è stato isolato da individui che avevano sviluppato diarrea con sangue e severi dolori addominali in seguito al consumo di hamburger presso una catena di ristoranti.

Il primo caso di malattia nel Regno Unito risale al 1983 (Griffin *et al.*, 1991), mentre il primo isolamento in Europa continentale è stato in Belgio nel 1987 (Robaey *et al.*, 1987).

2. L'INFEZIONE DA E. COLI VTEC NELL'UOMO

La gravità della malattia nell'uomo varia da una lieve diarrea senza complicazioni ad una colite emorragica con dolori addominali acuti, diarrea sanguinolenta, vomito e febbre lieve o assente (documentata solo nel 30% dei casi; Mead *et al.*, Griffins, 1998). La sindrome emolitico-uremica (SEU), caratterizzata da insufficienza renale acuta, è una complicazione che si presenta nel 10% dei soggetti infetti di età inferiore ai 10 anni. La SEU si instaura per lesioni vascolari indotte dalle tossine a carico dell'endotelio dei glomeruli renali. Le lesioni renali possono arrivare ad una insufficienza renale

acuta con, nei casi più gravi, sintomi di tipo neurologico, come convulsioni, sonnolenza e coma, legati alla ritenzione idrica (Bonardi *et al.*, 2006).

Nella fase acuta, la SEU può essere fatale nel 3-5% dei casi e una percentuale simile può sviluppare insufficienza renale cronica (Caprioli *et al.*, 2001).

Nel corso del 2005, nell'Unione Europea (EFSA, 2006), si sono registrati 3.314 casi di infezione umana da stipiti VTEC, con un'incidenza di 1,2 casi/100.000 abitanti, pur di gran lunga inferiore all'incidenza europea di altre malattie a trasmissione alimentare, quali la campylobatteriosi (51,6 casi/100.000 abitanti) e la salmonellosi (38,2 casi/100.000 abitanti).

Dal 1988 in Italia è stato istituito un sistema nazionale di sorveglianza volontario della sindrome emolitico-uremica in età pediatrica. La Direttiva CE 2003/99 ha incluso le infezioni da *Escherichia coli* produttori di verocitotossine tra le zoonosi da sottoporre a sorveglianza obbligatoria in tutti i Paesi membri. Tale direttiva in Italia è stata recepita con il Decreto Legislativo n. 191 del 4 aprile 2006 (Attuazione della Direttiva 2003/99/CE sulle misure di sorveglianza delle zoonosi e degli agenti zoonotici). Le operazioni di sorveglianza previste dalla Direttiva CE 2003/99, tra le altre misure, comprendono mirate indagini epidemiologiche atte a chiarire l'origine dei focolai tossinfettivi. La conferma dei casi di VTEC è effettuata sulla base della classificazione prevista dalla decisione CE n. 2012/506/UE che prevede la contemporanea presenza di criteri clinici (diarrea, dolore addominale o per i casi di sindrome emolitica, la presenza di insufficienza renale acuta con anemia emolitica microangiopatica o trombocitopenia) e almeno uno tra i 4 criteri di laboratorio:

- isolamento di un ceppo di *Escherichia coli* che produce Shigatossine (Stx) o contiene geni *stx1* o *stx2*;
- isolamento di *Escherichia coli* O157 non fermentante il sorbitolo (NSF) (senza test dell'Stx o del gene *stx*);
- identificazione diretta dell'acido nucleico dei geni *stx1* o *stx2* (senza isolamento del ceppo);
- identificazione diretta di Stx libero nelle feci (senza isolamento del ceppo).

Dal 1988 al 2005 sono stati segnalati 460 casi di SEU pediatrica, con un tasso di incidenza medio annuale di 0,3 casi su 100.000 abitanti (età compresa tra 0 e 15 anni). L'incidenza più alta si è sempre registrata nei bambini con età inferiore a 5 anni. Nel nostro paese, nel 70-80% dei casi la SEU è riconducibile ad un'infezione da stipiti VTEC ed in particolare da VTEC O157 (39%) e da VTEC O26 (21%), mentre meno frequenti risultano le infezioni da VTEC O111, O145 e O103. L'incidenza più elevata si è registrata in comuni del nord Italia densamente abitati e a forte vocazione agricola, a dimostrazione che nell'epidemiologia della SEU i fattori legati all'ambiente e all'attività agricola sembrano giocare un ruolo determinante (Tozzi *et al.*, 1994; Tozzi *et al.*, 2004; Scavia *et al.*, 2005). I risultati di uno studio (Snedeker *et al.*, 2009) che ha considerato 90 focolai riscontrati fra il 1982 e il 2006 in diversi paesi (Regno Unito, Irlanda, Danimarca, Norvegia, Finlandia, Stati Uniti, Canada e Giappone), hanno evidenziato come fonte di infezione, nell'ordine: il consumo di alimenti contaminati (42,2% dei focolai), il consumo di prodotti caseari (12,2%), il contatto con animali (7,8%), l'ingestione di acqua contaminata (6,7%)

e la contaminazione ambientale (2,2%). La causa era sconosciuta nel restante 28,9% dei focolai.

Indagini svolte su focolai associati ad alimenti contaminati hanno evidenziato i seguenti cibi a rischio per *E. coli* O157: carne macinata, hamburger, bistecca intenerita per iniezione, carne cruda; spiedini, alimenti pronti per il consumo affettati compreso quelli a base di pollame, carne di maiale e prodotti di carne bovina, salumi e altri prodotti a base di carne fermentata; carne di cervo essiccata, latte crudo, formaggi prodotti a base di latte crudo e latte termizzato, ghiaccio, crema, succo di mela, uva, insalata di cavolo, lattuga, spinaci, ravanelli, germogli di erba medica e meloni (EFSA, 2007).

I tipi di alimenti associati alle epidemie e la ripartizione geografica dei casi differiscono tra i diversi paesi. Queste differenze sono un indicatore delle preferenze locali alimentari, delle abitudini culinarie e dei modelli di distribuzione dei prodotti alimentari. La più grande epidemia descritta finora è accaduta a Sakai City (Giappone) nel 1996 con 7.966 casi (2.764 microbiologicamente confermati, 106 con sindrome emolitica uremica) ed è stata causata da germogli di ravanello bianco servito per pasti scolastici (Michino *et al.*, 1999).

Negli Stati Uniti la carne macinata di bovino è stata identificata quale via di trasmissione di *E. coli* O157 nel 41% degli episodi di origine alimentare (Rangel *et al.*, 2005) verificatisi tra il 1982 e il 2002.

In Scozia, tra il 1994 e il 2003, il 40% dei focolai è stato di origine alimentare (Strachan *et al.*, 2006) (pari al 83% dei casi), il 54% è stato di origine ambientale e il 6% ha visto coinvolte entrambe le vie di trasmissione (Pennington, 2010).

Sempre negli Stati Uniti numerosi focolai, di origine alimentare, hanno interessato più Stati. In questi casi gli alimenti coinvolti sono stati in 16 focolai (67%) la carne di bovino e in 6 (25%) altri alimenti. Raramente vengono registrati in Europa focolai multistato: nel 2007 si è verificato un focolaio in Islanda e Paesi Bassi causato da una partita di lattuga (Friesema *et al.*, 2008) e più recentemente (2011) è stata osservata un'epidemia causata da un ceppo O104:H4 che ha interessato Germania e Francia, la cui fonte sono risultati i germogli di *Trigonella foenum-graecum* (EFSA, 2011).

Casi di malattia imputabili al contatto diretto o indiretto con i ruminanti si sono verificati in aziende agricole, fiere agricole (UK), fiere di contea (USA), fattorie didattiche e direttamente nei campi. La più grande epidemia di questo tipo registrata finora è avvenuta in Inghilterra nei mesi di agosto e settembre 2009, con 93 infezioni, 78 pazienti con sintomatologia e 17 con sindrome uremicoemolitica (HPA, 2010). La valutazione quantitativa del rischio microbico ha evidenziato come, nel nord-est della Scozia, il rischio era 100 volte maggiore in caso di visita ai pascoli rispetto al consumo di hamburger.

Anche studi svedesi (Kistemann *et al.*, 2004) e canadesi (Valcour *et al.*, 2002), utilizzando sistemi di informazione geografica, hanno dimostrato che l'incidenza di malattia umana da *E. coli* enteroemorragico è maggiore nelle aree rurali, le quali hanno un'elevata densità di bovini e ovini rispetto alle zone urbane.

La trasmissione da persona a persona, è stata registrata molte volte nei Servizi di assistenza per bambini, negli asili e nelle istituzioni di assistenza alle persone con

disabilità fisiche, di apprendimento o di assistenza a persone afflitte da disabilità mentale. La trasmissione domestica è più comune tra i soggetti di età 1-4 anni e 15-34 anni (Parry *et al.*, 1998).

Sono state individuate le seguenti vie di trasmissione secondarie:

- da persona a persona in casa (45,6%);
- da persona a persona negli asili (11,1%);
- da acque di balneazione (nuoto, canoa e piscine, 10%);
- da persona a persona nelle istituzioni (4,5%) e
- sconosciuta (5,5%).

Vari casi di infezione sono stati attribuiti a cause occupazionali e hanno interessato macellai e laboratoristi (Spina *et al.*, 2005).

In numerosi Paesi sono stati condotti specifici studi di Risk Assessment per quantificare l'effettivo ruolo, nella trasmissione della malattia, del consumo di carni crude o tartare.

Tra i fattori considerati di difficile valutazione vi è quello dei flussi commerciali che portano all'introduzione di animali o alimenti da altri Paesi con la possibilità di importanti ricadute sulla diffusione dei patogeni.

Un'ipotesi molto interessante suggerisce che i ceppi VTEC isolati dall'uomo possano rappresentare popolazioni diverse da quelle riscontrabili negli animali, come per esempio nel bovino, o che ne siano soltanto una sottopopolazione. Pertanto, anche se gli stipti isolati dall'uomo e dagli animali di fatto condividono gli stessi antigeni di superficie e gli stessi meccanismi di virulenza, non è ancora chiaro se si tratti di medesimi cloni o, semplicemente, di sottopopolazioni diverse tra loro (Boerlin *et al.*, 1999).

3. PREVALENZA DI *E. COLI* O157 E ALTRI VTEC NEL BOVINO E IN ALTRI ANIMALI E FATTORI DI RISCHIO

Molti studi hanno valutato la prevalenza di *E. coli* O157 nei bovini evidenziando una grande variabilità nella distribuzione del microrganismo, con occasionali aumenti e periodi di apparente assenza.

Nei bovini da latte la prevalenza stimata del patogeno nelle feci risulta oscillare tra lo 0,2 ed il 48,8%, con valori che negli Stati Uniti si attestano tra lo 0,4 ed il 40%, mentre in altri paesi (Canada, Italia, Giappone e Regno Unito) i valori variano tra l'1,7 ed il 48,8%. La percentuale maggiore di positività riguarda gli animali giovani. Inoltre la prevalenza risulta essere maggiore nei mesi più caldi rispetto ai mesi freddi.

In Italia sono stati effettuati diversi studi per dimostrare il ruolo del bovino come reservoir di VTEC O157. La prevalenza dei portatori intestinali tra i bovini macellati può variare dallo 0 al 16,5% e dipende dall'età e dallo stato nutrizionale dei bovini esaminati, nonché dalla stagione dell'anno e dai metodi analitici utilizzati (Bonardi *et al.*, 2001; Bonardi *et al.*, 1999; Conedera *et al.*, 1997). La variabilità nell'escrezione può incidere sulla contaminazione della carcassa durante il processo di macellazione, che si presenta anch'essa piuttosto variabile (Bonardi *et al.*, 2001).

E. coli O157:H7 non è patogeno per il bovino adulto, dove si comporta da commensale nel tubo digerente. Solo in casi eccezionali gli *E. coli* VTEC sono in grado di causare diarrea nel vitello (Cray *et al.*, 1995; Kang *et al.*, 2004).

In questi casi i sierotipi più importanti sono O5:H-, O26:H-, O26:H11, O111:H- e O118:H16, comunque associati con malattia anche nell'uomo.

Dal bovino adulto, asintomatico, si possono isolare diverse decine di sierogruppi di *E. coli* produttori di verocitotossine, molti dei quali patogeni anche per l'uomo. Attualmente solo una minoranza dei microrganismi isolati dal bovino appartiene al sierogruppo O157, mentre tra i non-O157, si segnala con una certa frequenza l'isolamento dei sierogruppi O5, O26, O103, O111, O118 e O145 (Mainil *et al.*, 2005).

La persistenza e la diffusione di *E. coli* O157 nelle aziende zootecniche possono essere influenzate dalla durata, la prevalenza, la quantità di eliminazione da parte dei singoli animali e dalle condizioni di sopravvivenza batterica e crescita nell'ambiente dell'allevamento (Conedera *et al.*, 2001). L'escrezione fecale nei singoli capi di bestiame è transitoria (Shere *et al.*, 1998) e difficilmente prevedibile: in un qualsiasi momento la maggior parte delle mandrie di bovini può non diffondere il microrganismo, mentre in altri può contenere molti animali con feci positive.

In una recente pubblicazione, Matthews *et al.* (2006a) hanno dimostrato la presenza, all'interno di una mandria, di animali classificabili come eliminatori (*shedders*) in elevate quantità o "*super shedders*". Altri recenti studi hanno confermato la presenza di *super shedders* di *E. coli* O157 (Chase-Topping *et al.*, 2007; Fegan *et al.*, 2004; Low *et al.*, 2005; Omisakin *et al.*, 2003), tuttavia sembra che non vi sia pieno accordo in letteratura sulla definizione di *super shedder*. Per "eliminazione in elevate quantità" si intende un conteggio di *E. coli* $\geq 10^3$ (Low *et al.*, 2005) oppure $\geq 10^4$ in 1 g di feci (Naylor *et al.*, 2003; Omisakin *et al.*, 2003; Ogden *et al.*, 2004; Chase-Topping *et al.*, 2007). Low *et al.* (2005) hanno individuato due sottopopolazioni di animali (*shedders* di alto livello e *shedders* di basso livello) che sono state classificate, rispettivamente, in base al superamento o meno del limite di 10^3 ufc/g di feci. Infezioni sperimentali hanno dimostrato che soltanto gli animali nei quali *E. coli* colonizza il tratto terminale del retto hanno elevati livelli di escrezione del microrganismo nelle feci, al contrario degli animali semplicemente portatori nei quali non c'è una vera colonizzazione dell'epitelio mucosale (Naylor *et al.*, 2003; Low *et al.*, 2005). Comprendere tale tipo di colonizzazione è un passo fondamentale per lo sviluppo di metodi per il controllo.

Una delle modalità per ottenere significative riduzioni della presenza del microrganismo nella stalla è quindi quella di individuare la piccola porzione di popolazione che espelle elevati livelli di *E. coli* O157, cioè gli eliminatori di alto livello (Matthews *et al.*, 2006b). L'identificazione dei fattori di rischio che influenzano la presenza di un eliminatore di alto livello riveste pertanto una grande importanza per lo sviluppo di interventi finalizzati alla riduzione della diffusione del batterio e, di conseguenza, per prevenire le infezioni *E. coli* O157 nell'uomo.

E. coli O157 può essere presente anche negli ovini e nei suini. In uno studio eseguito in Gran Bretagna nel 2003, al momento della macellazione, risultava positivo per *E. coli* O157 il contenuto intestinale del 4,7% dei bovini, lo 0,7% delle pecore e lo 0,3% dei suini esaminati.

Studi epidemiologici eseguiti sulla specie ovina hanno evidenziato la presenza di stipti di *E. coli* O157 produt-

tori di verocitotossine nelle feci di animali macellati in Gran Bretagna, con prevalenze variabili dal 2,2% (Chapman *et al.*, 1997) al 7,5% (Chapman *et al.*, 2001).

In Spagna, è stato dimostrato che una minoranza di agnelli (1%) eliminava VTEC O157 con le feci, rispetto al 35% dei soggetti che invece eliminavano stipiti VTEC appartenenti a 22 sierogruppi diversi, tra i quali O6, O91, O117, O128, O146, O166. Molti sierotipi di *E. coli* verocitotossici isolati dalle pecore sono patogeni per l'uomo; in particolare, i sierotipi O76:H19, O91:H, O128:H-, O128:H2 e O157:H7 sono responsabili di gravi infezioni che possono culminare con la sindrome emolitica uremica. Sempre dal latte ovino e da formaggi prodotti con latte ovino, in Spagna sono stati isolati diversi sierogruppi di *E. coli* verocitotossici, ma nessuno appartenente al sierogruppo O157 (Rey *et al.*, 2003; Rey *et al.*, 2006).

In Italia, nella Regione Lazio, sono stati isolati stipiti VTEC O157 dal latte ovino con una prevalenza pari allo 0,6% dei campioni esaminati e questo suggerisce che anche nel nostro paese le pecore possano fungere da reservoir di *E. coli* produttori di verocitotossine (Rubini *et al.*, 1999).

È anche accertato il ruolo della capra quale serbatoio di VTEC O157 (Zschöck *et al.*, 2000) e il latte caprino si conferma quale possibile veicolo di trasmissione del microrganismo all'uomo. Uno studio eseguito in provincia di Bergamo ha infatti identificato uno stipite di *E. coli* O157 produttore di VT2 ed intimina (o eae) positivo in latte crudo di capra (Picozzi *et al.*, 2005). Anche in Spagna è stato isolato VTEC O157 dal latte crudo di capra dove invece risultavano non contaminati i formaggi caprini (Rey *et al.*, 2006).

In uno studio di Teagasc (2006) è stato riportato che la prevalenza di *E. coli* VTEC O157 sulla pelle di bovini o sul vello di ovini, presso il macello, è maggiore rispetto alla prevalenza fecale e su carcasse in diverse popolazioni animali, con un aumento di prevalenza in queste matrici da <4,5% a 7,3-22% sulle pelli (Reid *et al.*, 2002; O'Brien *et al.*, 2005).

Per completare le conoscenze sul ruolo dei ruminanti quali serbatoi di *E. coli* verocitotossici, è stato studiato anche il ruolo dei selvatici. È stato testato il contenuto intestinale di cervi, camosci e caprioli abbattuti o ritrovati morti nelle province di Trento e Pordenone ed alcuni soggetti (lo 0,3% dei caprioli e l'1,5% dei cervi) sono risultati positivi per VTEC O157. La presenza di questi microrganismi nelle feci dei ruminanti selvatici merita sicuramente ulteriori accertamenti, in quanto potrebbe esistere sia la circolazione di VTEC O157 in ambito selvatico, quanto l'introduzione del batterio nella popolazione dei selvatici, dai ruminanti domestici attraverso il pascolo comune (Conedera *et al.*, 2004a).

4. FATTORI DI RISCHIO PER LA DIFFUSIONE DI *E. COLI* VTEC IN ALLEVAMENTO

L'identificazione di pratiche di gestione atte a ridurre l'escrezione di *E. coli* O157:H7 da parte del bestiame può ridurre il rischio di esposizione umana al patogeno. Tuttavia, ci sono molti fattori che interagiscono contemporaneamente in allevamento e che, di conseguenza, rendono difficile manipolare l'ecologia dei patogeni di origine alimentare, come *E. coli* O157:H7. Mentre alcuni fattori come la dimensione della man-

dria sono risultati ininfluenti, altri hanno invece dimostrato di svolgere un ruolo nell'aumento o diminuzione dell'escrezione di *E. coli* patogeni nelle feci.

4.1 Stagione

L'eliminazione attraverso le feci di *E. coli* O157:H7 è più comune nella stagione calda, osservazione in linea con la maggior parte dei casi segnalati negli Stati Uniti (Riley *et al.*, 1983; Rodrigue *et al.*, 1995) e in altri Paesi (Dev *et al.*, 1991; Akashi *et al.*, 1994; Orr *et al.*, 1994). Negli Stati Uniti, Hancock *et al.*, (1997c) hanno indagato l'escrezione di *E. coli* O157:H7 in 9 allevamenti di bovine da latte per circa un anno e hanno riportato tassi di prevalenza più elevati tra il mese di giugno e a ottobre rispetto al periodo compreso tra dicembre e marzo. In uno studio durato 1 anno, in Canada, la prevalenza di *E. coli* O157:H7 in vacche da riforma e da rimonta al momento della macellazione è stata più elevata durante i mesi estivi (Van Donkersgoed *et al.*, 1999). Risultati simili sono stati riportati per allevamenti da latte nel Regno Unito (Mechie *et al.*, 1997). Questi dati suggeriscono che i fattori ambientali come il freddo possono limitare la trasmissione orizzontale, l'infezione, la reinfezione o la colonizzazione di *E. coli* O157:H7.

4.2 Età

L'età dell'animale sembra essere un fattore significativo nella epidemiologia di *E. coli* O157:H7. Animali giovani hanno dimostrato di essere più suscettibili alla colonizzazione da parte del patogeno (Hancock *et al.*, 1997a). Hancock *et al.*, (1998b) hanno esaminato migliaia di *E. coli* isolati da animali giovani (vitelli o giovenche) e adulti (vacche) in due allevamenti bovini da latte in cui si era verificata un'epidemia da *E. coli* O157:H7. Sono stati isolati più di 50 tipi distinguibili di *E. coli*, tutti residenti nel tratto terminale dell'apparato gastrointestinale. Hancock ha rilevato percentuali molto più elevate di isolati produttori di tossine nei bovini giovani. In generale, l'eliminazione fecale di *E. coli* O157:H7 è più comune nei giovani (da 2 a 24 mesi di età) piuttosto che nei bovini adulti (Hancock *et al.*, 1994b, 1997c). Il tasso di prevalenza del patogeno nei giovani bovini da carne e da latte può essere attribuito alla maggiore suscettibilità di questa fascia di età alla sua colonizzazione (Hancock *et al.*, 1998b), che avviene a partire da una quantità di *E. coli* O157:H7 corrispondente a 250 ufc.

4.3 Utilizzo del letame

È stata rilevata un'associazione reale, non spuria, tra lo spandimento del letame sui pascoli e l'infezione del bestiame al pascolo con *E. coli* O157:H7, suggerendo il letame bovino come fattore di rischio. I risultati dell'indagine di Wang *et al.*, (1996), infatti, hanno indicato che *E. coli* O157:H7 può sopravvivere nelle feci per un lungo periodo di tempo e mantenere la sua capacità di produrre verocitotossine. Quindi le feci bovine possono essere un potenziale veicolo per la trasmissione di *E. coli* O157:H7 al bestiame, al cibo e all'ambiente. Tale correlazione, tuttavia, potrebbe non essere confermata (Hancock *et al.*, 1997a) perché la prevalenza del patogeno è risultata simile anche in studi su pascoli bovini, con o senza lo spargimento di effluente.

In un altro studio (Garber *et al.*, 1999), su un totale di 4.361 vacche, tuttavia, l'effetto dei diversi metodi di gestione del letame era significativo. Il compostaggio del letame (Lung *et al.*, 2001), con il raggiungimento di 45°C per 72 ore si è dimostrato essere in grado di inattivare *E. coli*.

4.4 Acqua di abbeverata

Gli abbeveratoi sono risultati frequentemente positivi per *E. coli* O157:H7 (Faith *et al.*, 1996; Lejeune *et al.*, 1997; Hancock *et al.*, 1998b) e sono stati implicati nella trasmissione del patogeno. Inoltre, *E. coli* O157:H7 può sopravvivere sui sedimenti nell'abbeveratoio per almeno 4 mesi e sembra potersi moltiplicare in questo ambiente (Lejeune *et al.*, 1997).

4.5 Alimentazione animale

I mangimi destinati ai ruminanti possono essere una fonte di infezione da *E. coli* patogeni. In uno studio sono state indagate la presenza e la replicazione di *E. coli* nei mangimi (Lynn *et al.*, 1998). *E. coli* è stato isolato in 63 campioni di mangimi su 209 (30,1%) raccolti da più fonti commerciali e dalle aziende agricole, indicando una diffusa contaminazione fecale (Lynn *et al.*, 1998). *E. coli* è stato isolato (fino a 1000 CFU/g di mangime) anche in campioni di mangimi unifeed, contenenti mais insilato, in 12 allevamenti da latte su 16. L'insilato con concentrazioni più alte di propionato e più basse di lattato ha inibito la replicazione di *E. coli* (Lynn *et al.*, 1998).

Sono state suggerite correlazioni tra la prevalenza di *E. coli* O157:H7 e la dieta (Dargatz *et al.*, 1997), il regime alimentare (Cray *et al.*, 1995; Jordan *et al.*, 1998) e il tipo di vegetali consumati (Duncan *et al.*, 1998). Uno studio di Dargatz *et al.*, 1997 ha suggerito che un breve periodo di adattamento a diete con alta concentrazione di orzo può aumentare la probabilità di positività nelle feci su bovini da carne. Nello stesso lavoro si è evidenziato che l'alimentazione con farina di soia riduceva la probabilità di rilevamento di animali positivi.

5. PREVALENZA DI *E. COLI* O157 E ALTRI VTEC NEGLI ALIMENTI IN ITALIA

Nonostante la rilevanza che assume il bovino nell'epidemiologia dell'infezione, le carni bovine, ed in particolare quelle macinate, che rappresentano uno degli alimenti a maggior rischio, raramente risultano contaminate. È quanto si è osservato in un'indagine eseguita sull'intero territorio nazionale da 9 dei 10 Istituti Zooprofilattici Sperimentali, che hanno esaminato 931 campioni di carne bovina macinata ed hanno riscontrato ceppi VTEC O157 solo in quattro (0,43%) campioni carni. Nello stesso studio sono stati esaminati anche 2948 prodotti a base di latte, dai quali non sono mai stati isolati stipiti di *E. coli* verocitotossici.

I prodotti lattiero-caseari erano rappresentati da formaggi a latte crudo o pastorizzato, con meno di 60 giorni di stagionatura, prodotti con latte vaccino o con latte ovino, nonché da mozzarelle di bufala (Conedera *et al.*, 2004b). Questa indagine, eseguita su vasta scala, ha indubbiamente evidenziato scarsa correlazione esistente tra la presenza del microrganismo nell'animale "serbatoio" e l'effettiva contaminazione dell'alimen-

to, evidenziando una elevata efficacia, a tutto vantaggio del consumatore, delle misure di gestione igienica introdotte nella produzione di alimenti.

In controtendenza sono invece i risultati di uno studio condotto nella regione Piemonte, nel quale si è rilevata la presenza di *E. coli* patogeni (EPEC, VTEC, ETEC) in formaggi prodotti sia a partire da latte crudo, che da latte trattato termicamente. Tra gli stipiti di *E. coli* verocitotossici è stato isolato un ceppo VTEC O26 (Decastelli *et al.*, 2004).

Recentemente nel nostro paese è stato messo in luce il ruolo del bufalo (*Bubalus bubalis*) quale serbatoio di VTEC O157. In Campania, regione in cui la bufala è allevata per la produzione della mozzarella e per il consumo di carne, in forte crescita, un'indagine eseguita su 289 animali appartenenti a 65 allevamenti, ha evidenziato una prevalenza media di escretori fecali pari al 14,5%. Un'indagine triennale, eseguita sempre nella regione Campania su diversi stabilimenti adibiti alla produzione della mozzarella di bufala, non ha invece mai riscontrato stipiti VTEC O157 nei prodotti (Galiero *et al.*, 2005b) che, secondo il disciplinare, vengono ottenuti da latte non sottoposto a trattamento termico. Il raggiungimento delle temperature idonee alla filatura della pasta (58-65°C) è possibile mediante aggiunta di acqua alla cagliata, che può raggiungere i 95°C (Decreto 10 maggio 1993): è proprio il rispetto delle condizioni igieniche durante il processo di filatura, ed il controllo delle contaminazioni post-processo, che garantisce la salubrità del prodotto finito.

Non esistono studi in grado di quantificare il ruolo degli alimenti importati nel nostro Paese.

6. IL RUOLO DEL LABORATORIO E L'INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI DELLE ANALISI NEI PROGRAMMI DI MONITORAGGIO E SORVEGLIANZA DI *E. COLI* VTEC

Le indagini di laboratorio rivestono un ruolo fondamentale nella identificazione dei microrganismi sia nei casi di malattia dell'uomo sia per la individuazione delle possibili fonti di infezione.

A seguito di una richiesta dell'EFSA (EFSA, 2013), il gruppo di esperti scientifici sui pericoli biologici (BIOHAZ) ha concluso che esiste un'ampia varietà di VTEC nelle popolazioni di animali produttori di alimenti la cui importanza per la salute pubblica non è ancora chiara. Una varietà limitata di sierotipi (O157, seguito da O26, O103, O91, O145 e O111) è associata a rischi per la salute pubblica; tuttavia isolati di questi sierotipi non sono necessariamente patogeni quando vengono riscontrati in alimenti o animali vivi.

I sierotipi O26:H11, O45:H2, O103:H2, O111:H8, O121:H19, O145:H28, O157:H7 sono quelli più frequentemente isolati in forme gravi di malattia a livello mondiale.

La possibilità di comprendere il ruolo dei VTEC dipende in misura notevole dalla possibilità di disporre di metodi analitici equivalenti fra i diversi Stati Membri. L'epidemia tedesca del 2011 di *E. coli* O104:H4 ha dimostrato chiaramente la difficoltà di predire l'emergenza di "nuovi" tipi patogeni di VTEC indagando solamente sulla presenza del gene *eae* o concentrandosi su un gruppo ristretto di sierogruppi.

Il nuovo standard ISO/TS 13136:2012 migliora la strategia di ricerca dei VTEC negli alimenti mediante un ampliamento della portata dello standard precedente a tutti i VTEC. Mentre nella precedente versione della ISO/TS 13136 era previsto che il tentativo di isolamento del microrganismo nel campione avvenisse soltanto a seguito del riscontro, nello screening effettuato con la PCR, della presenza dei geni VTX, eae e l'appartenenza ad uno dei 7 sierogruppi, nella nuova versione ISO/TS 13136:2012 è previsto che il tentativo di isolamento venga fatto anche su tutti i campioni in cui si rilevi la presenza del gene VTX.

L'approccio mediante lo screening molecolare, così come già avviene per la ricerca di altri microrganismi come *Salmonella spp.* e *Listeria monocytogenes*, consente, in modo rapido, di identificare i campioni sicuramente negativi. Per *E. coli*, la positività in questa fase (presenza del gene VTX) rende il campione sospetto di possibile contaminazione da parte di un *E. coli* VTEC. È pertanto richiesta la conferma mediante isolamento del microrganismo per dimostrare l'effettiva presenza dei geni VTX e degli altri fattori di virulenza su una cellula vitale escludendo la presenza di DNA libero o di VTX di derivazione fagica nella coltura di arricchimento.

In caso di indagini legate a tossinfezioni alimentari che evidenzino dal punto di vista epidemiologico un ruolo da parte di *E. coli* VTEC, l'individuazione preliminare di parametri di patogenicità mediante PCR dovrebbe portare comunque all'adozione di misure precauzionali in particolare su alimenti nei quali i geni isolati corrispondano a quelli provenienti dai campioni biologici provenienti dai pazienti, anche prima di arrivare all'isolamento del ceppo.

Nei casi invece in cui si riscontri la presenza dei fattori di patogenicità in alimenti non direttamente collegabili ad un episodio tossinfettivo (es. programmi di monitoraggio o sorveglianza), l'EFSA (2013) evidenzia l'esigenza di pervenire all'isolamento adottando uno schema di classificazione molecolare che prevede che eventuali prodotti *ready-to-eat* risultati contaminati mediante isolamento di uno degli *E. coli* VTEC appartenente, come sierogruppo, al gruppo I (O157, O26, O103, O145, O111, O104) in combinazione con i geni VTX e eae o aaiC e aggR, dovrebbero essere considerati potenzialmente a rischio in quanto in grado di causare diarrea e sindrome emolitica emorragica. Per ogni altro sierogruppo, in presenza degli stessi geni, dovrebbero essere considerati un rischio potenzialmente alto per diarrea. In assenza di questi geni, i dati disponibili non consentono alcuna deduzione rispetto a potenziali rischi.

In linea con le indicazioni dell'EFSA risulta la pubblicazione del Reg. UE 209/2013, che modifica il Reg. CE 2073/2005, introducendo un criterio microbiologico di sicurezza alimentare per i VTEC nei germogli prevedendo quale parametro l'assenza in 25 grammi.

7. PROTOCOLLI DI INTERVENTO

L'attenzione crescente verso le infezioni da *E. coli* VTEC richiede la definizione di un quadro di interventi che consenta, da parte delle autorità competenti locali, di operare in linea con gli obblighi e gli obiettivi previsti dal Reg. CE 882/2004 tenendo conto della valutazione del rischio e del quadro normativo europeo che ad oggi ha preso in considerazione l'isolamento di *E. coli* pro-

duttori di tossina Shiga (STEC) O157, O26, O111, O103, O145 e O104:H4 quale parametro di sicurezza alimentare esclusivamente nei germogli.

La Regione Piemonte ha già invece, nell'emanazione del protocollo tecnico, esteso tale criterio anche agli alimenti di origine animale ritenendo tale scelta necessaria nella definizione dell'ALOP (*Appropriate Level of Protection*) per i consumatori piemontesi.

Nessuna indicazione è stata invece sinora fornita rispetto al riscontro della presenza di *E. coli* VTEC, nell'ambito di programmi di ricerca o di piani di monitoraggio, nelle feci di animali destinati alla produzione di alimenti o nell'ambiente dove tali animali sono allevati.

7.1 Positività in alimenti

In linea con le indicazioni dall'EFSA ed in coerenza con quanto stabilito dal Reg. UE 209/2013 per i germogli, la ricerca di *E. coli* VTEC dovrebbe essere effettuata esclusivamente su alimenti *ready-to-eat*, escludendo dalla ricerca gli alimenti sottoposti a trattamenti termici in grado di inattivare il batterio o da consumarsi previa cottura, individuati tenendo conto anche delle indicazioni rese disponibili ai consumatori ai sensi del Reg. CE 178/2002 o sulla base di specifiche indicazioni normative (es. commercializzazione latte crudo presso la stalla).

Sono individuati i seguenti criteri per la definizione di campione positivo a seguito di analisi effettuate secondo la norma ISO/TS 13136:2012:

Alimenti prelevati nel corso di programmi di monitoraggio/sorveglianza e non collegati direttamente ad episodi di tossinfezione alimentare:

1. isolamento di uno degli *E. coli* VTEC appartenenti, come sierogruppo, al gruppo I (O157, O26, O103, O145, O111, O104), in combinazione con la presenza dei geni VTX e eae o aaiC e aggR.

Alimenti prelevati sulla base di correlazioni epidemiologiche in caso di tossinfezione alimentare potenzialmente legata ad una infezione da *E. coli* VTEC (Decisione 2012/506/EU):

1. isolamento di un ceppo di *E. coli* in grado di produrre shigatossine o con la presenza dei geni STX1 o STX2 oppure
2. isolamento di un *E. coli* O157 non fermentante il sorbitolo oppure
3. identificazione diretta, senza isolamento del batterio, dei geni STX oppure
4. identificazione dei geni STX direttamente dall'alimento senza isolamento del batterio.

In presenza di un rapporto di prova del laboratorio con un esito che rientri nelle definizioni e situazioni di positività sopra riportate, l'Autorità competente provvederà ad adottare i provvedimenti sanitari previsti dal regolamento CE n. 882/2004 e dal regolamento CE n. 178/2002 (blocco della commercializzazione, individuazione e rimozione delle cause, ritiro e richiamo dal mercato, ecc.).

L'autorità competente procederà inoltre, ai sensi dell'articolo 55 del regolamento CE n. 882/2004 e della

vigente normativa nazionale, ad attivare le procedure sanzionatorie (notizia di reato).

7.2 Positività in allevamenti di animali destinati alla produzione di alimenti

Sulla base di quanto riportato dalla letteratura, il riscontro di *E. coli* VTEC nelle feci di animali, nei locali di stabulazione o nei pascoli, è da considerare una situazione fisiologica che non indica né una situazione di infezione dell'allevamento né un pericolo diretto per la sicurezza alimentare.

Anche in questo caso la positività è definita come:

isolamento di uno degli E. coli VTEC appartenenti, come sierogruppo, al gruppo I (O157, O26, O103, O145, O111, O104) in combinazione con la presenza dei geni VTX e eae o aaiC e aggR.

In altri Paesi, dove la problematica si è rivelata essere particolarmente critica, oltre all'applicazione di misure di biosicurezza e profilassi diretta, sono state sperimentate altre metodologie di prevenzione basate sulla riduzione della colonizzazione intestinale da parte di *E. coli*. Hanno dimostrato svolgere un ruolo in tal senso trattamenti con probiotici e/o vaccini, e/o batteriofagi e/o modificazioni della dieta (Callaway *et al.*, 2004). In presenza di un rapporto di prova del laboratorio con un esito che rientri nelle definizioni di positività sopra riportate, l'autorità competente provvederà ad adottare provvedimenti sanitari finalizzati a ridurre la diffusione del patogeno in allevamento e ridurre il rischio di esposizione umana nelle successive fasi di produzione di alimenti.

Sulla base dei fattori di rischio individuati dalla revisione della letteratura vengono indicati i seguenti provvedimenti di biosicurezza:

- pulizia e disinfezione straordinaria di mangiatoie e abbeveratoi con cadenza quindicinale durante tutto il periodo estivo (maggio-ottobre);
- verifica e rimozione delle situazioni di possibile contaminazione fecale di acqua di abbeverata e mangime;
- evitare il pascolo e la somministrazione di erba fresca da terreni in cui sia stata effettuata la fertirrigazione nello stesso periodo estivo; tale foraggio dovrebbe essere destinato a fienagione;
- la fertirrigazione e lo spandimento di letame potranno avvenire solo dopo almeno 60 giorni di stoccaggio;
- la mungitura dei soggetti positivi dovrebbe essere effettuata dopo tutti gli altri con particolare attenzione ad evitare contaminazioni fecali ed alla successiva pulizia e disinfezione della sala mungitura;
- in caso si tratti di latte destinato "crudo" alla produzione di formaggi, dovranno essere intensificate le analisi in autocontrollo per assicurare l'assenza di contaminazione da *E. coli* VTEC;
- in caso si tratti di fattoria didattica dovranno essere sospese le visite da parte di bambini per l'intera durata del periodo estivo o dovrà essere messo in atto uno specifico protocollo finalizzato all'attuazione di misure igieniche (lavaggio delle mani con frequenza, evitare il contatto con animali, strutture, alimenti crudi, ecc);

- dovrà essere ridotto al minimo l'imbrattamento del mantello degli animali inviati al macello;
- indicazione sulle Informazioni sulla Catena Alimentare (ICA) della positività per *E. coli* VTEC nelle feci per gli animali riscontrati positivi e inviati alla macellazione nel periodo estivo (maggio-ottobre) in cui sia stata riscontrata la positività; tali animali, al macello, dovranno essere sottoposti a macellazione con particolare attenzione a ridurre i rischi di contaminazione fecale delle carni.

Le misure potranno essere revocate al termine del periodo considerato a rischio (1° novembre) oppure a seguito di analisi negative effettuate dall'OSA in autocontrollo su un numero idoneo di campioni.

7.3 Miglioramento del sistema di sorveglianza sui casi di *E. coli* VTEC negli animali e nell'uomo

La prevalenza, i meccanismi di trasmissione in allevamento, le modalità con cui vi è il passaggio dall'animale all'uomo sono ancora poco conosciuti nella nostra realtà. A fronte di un aumento dell'attenzione rispetto ai casi di SEU, legata anche al recente episodio dei gemogli in Germania e al ruolo del Centro di Referenza presso l'ISS, il rischio che si corre è quello di effettuare interventi di prevenzione dal forte impatto economico su settori, quale quello della produzione di alimenti, che potrebbero non avere un ruolo prevalente nella determinazione della malattia nell'uomo. Nel 2009 l'EFSA ha proposto specifiche tecniche armonizzate per il monitoraggio e la segnalazione del VTEC in popolazioni di animali e categorie di alimenti pertinenti.

- Programmi di monitoraggio a livello di popolazione animale bovina ed ovicaprina

Nel 2009 l'EFSA ha proposto specifiche tecniche armonizzate per il monitoraggio e la segnalazione del VTEC in popolazioni di animali e categorie di alimenti pertinenti.

Secondo una strategia di campionamento basata sul rischio, l'EFSA raccomanda di monitorare presso il



