

**Le malattie degli animali:
rischi per la *food security* e la *food safety***

**Indagini su *E.coli* verocitotossici in allevamento,
a seguito di casi umani di SEU**

Folgaria (TN), 25 febbraio 2016

Conedera Gabriella

OVERVIEW

- Breve richiamo sulle categorie di E. coli rilevanti negli animali
- Reservoir animali di VTEC
- VTEC nei Ruminati e loro ruolo nella trasmissione all'uomo
- Esperienze su indagini per VTEC in allevamento, con particolare riferimento a recente caso di SEU da VTEC O26 in provincia di Trento
- Considerazioni conclusive e riflessioni per la prevenzione

CATEGORIE DI E. COLI RILEVANTI NEGLI ANIMALI

E.coli classificati in specifici patotipi in base a fattori di virulenza e manifestazioni cliniche negli animali

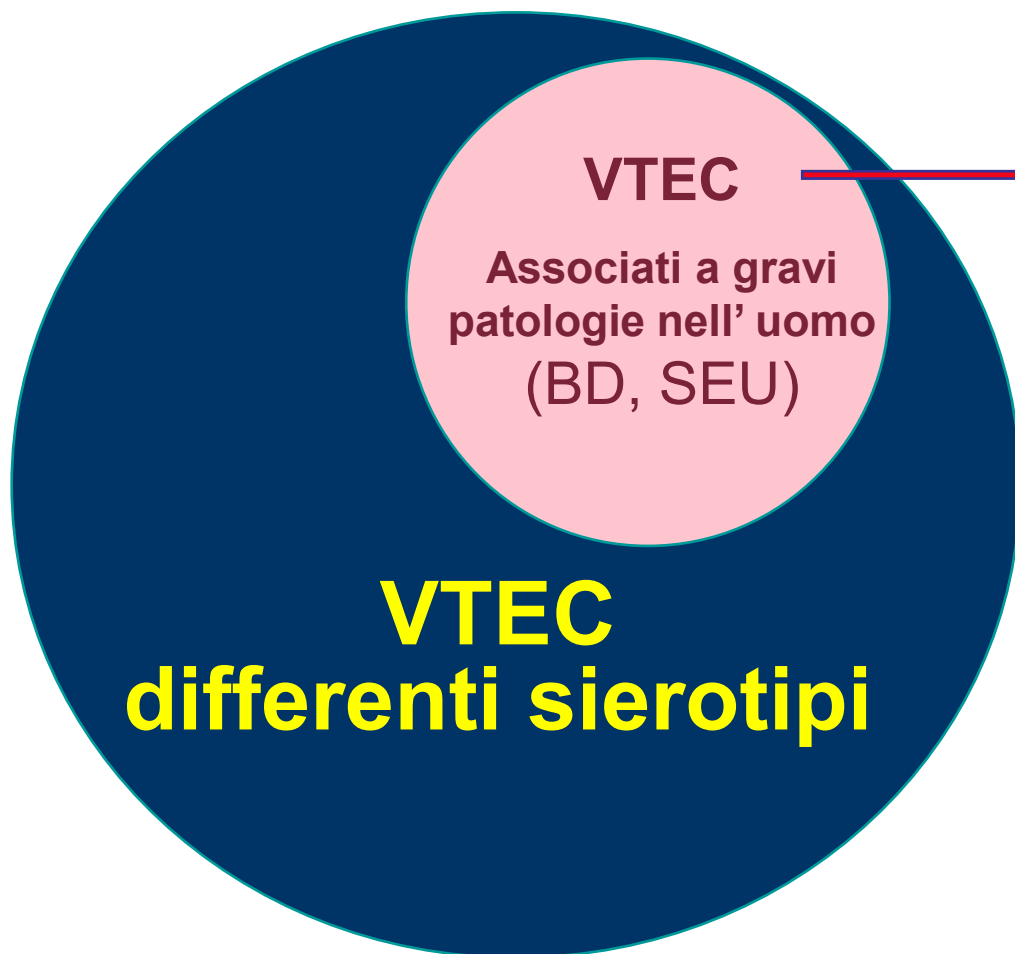
- **Diarrogeni (DEC):**
 - ETEC (= Enterotoxigenic): Tossine, ST, LT, EAST; adesine F4,5,6,17, 18, 41, AIDA; sierotipi ospite-associati
 - EPEC (= Enteropathogenic) e AE-VTEC (Attaching-Effacing Verotoxigenic) : lesioni A/E; OMP intima e Tir; possibili altri fattori di adesione
 - Altri: NTEC= Necrotoxigenic, DAEC = Diffusely Adherent
- **Enterotossigenici (malattia degli edemi):** STx2e; F18; specifici sierotipi, emolitici)
- **Extra-intestinali:**
 - Invasivi
 - Uropatogeni

EPEC e AE-VTEC

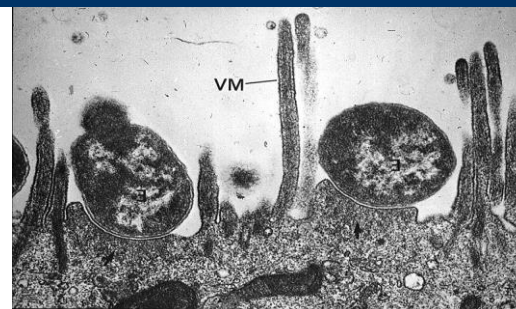
- Possono causare diarrea nei ruminanti e soprattutto nel vitello (fino a 3 mesi di età)
- Diarrea generalmente moderata, talvolta emorragica, spesso persistente; influenzata da ulteriori agenti infettivi e non infettivi
- Solo alcuni sierotipi coinvolti in enterite nel vitello (O26:H11, O111:H-; O5:H-, O118:H16)
- EPEC causa di enterite hanno per lo più lo stesso sierotipo dei ceppi AE-VTEC (interrogativi sulla loro reale identità e ruolo zoonosico)

- **Moltissimi sierotipi VTEC sono stati isolati dal tratto g-intestinale di numerose specie animali, per lo più asintomatici.**
- **Gli animali possono essere portatori di VTEC patogeni per l'uomo, alcuni dotati di specifici sierogruppi («top five») e fattori di virulenza ad elevata patogenicità e responsabili di gravissime patologie nell'uomo.**
- **La sola presenza del gene Stx, senza ulteriori fattori di virulenza, non è tuttavia indicazione di patogenicità per l'uomo.**

E.coli Enteroemorragici (EHEC)



Lesioni
Attaching/Effacing



appartengono ad un ristretto
numero di sierogruppi:
O157, O26, O103, O111, O145
Sono definiti
E.coli Enteroemorragici

(cortesia ISS, Roma)

RESERVOIR e OSPITI SPILLOVER

- **Reservoir animali di VTEC**

- **Capaci di mantenere i VTEC (a livello intestinale) anche senza una continua esposizione ad essi e di trasmettere l'infezione.**
- **I bovini, assieme ad altri ruminanti domestici (ovini, caprini, bufali) e selvatici (in particolare cervo) sono considerati il reservoir (= serbatoio) naturale**



Orskov, et al. Cattle as reservoir of verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Lancet*. 1987 Aug 1;2(8553):276.

RESERVOIR e OSPITI SPILLOVER

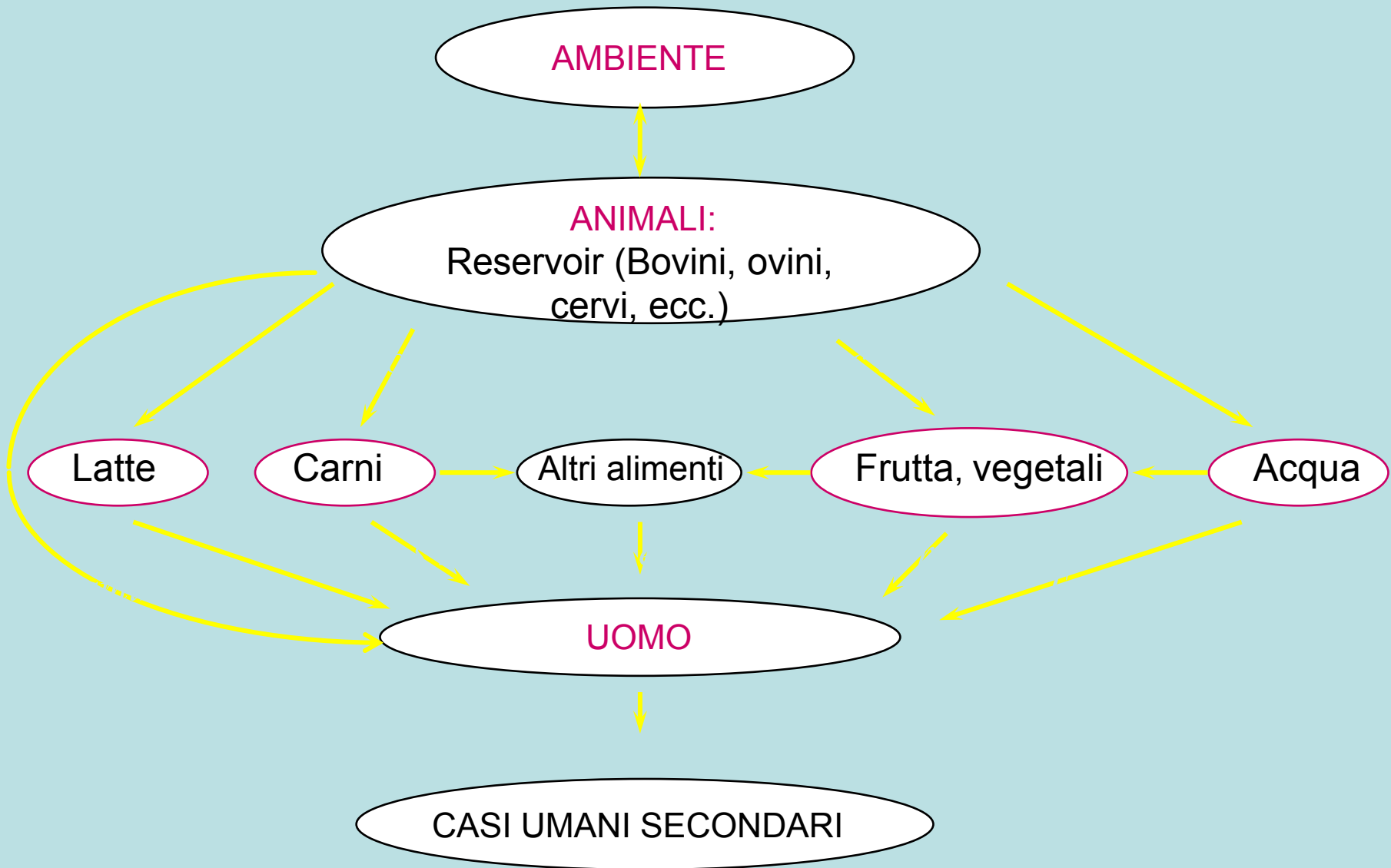
- **Ospiti spillover**

- **Suscettibili alla colonizzazione, ma non la mantengono se non ulteriormente esposti ad una fonte di VTEC.**
- **Possono trasmettere la malattia**
- **Evidenze epidemiologiche indicano che possono avere tale ruolo: uccelli, suini, cani, cavalli**
- **Casi umani sono riportati da contatto con cavalli e cani: possono veicolare VTEC derivanti da animali da allevamento.**
- **Ruolo di uccelli (storni, piccioni, etc) che vivono in vicinanza di allevamenti; roditori (isolamento di VTEC O157 e non-O157 da ratti), insetti (mosche, coleotteri, etc.): trasmissione tra e all'interno di allevamenti**

RESERVOIR e OSPITI SPILLOVER

- **La varietà di specie animali reservoir e ospiti spillover e la sopravvivenza dei VTEC in diverse nicchie ambientali porta a complesse vie di trasmissione, non sempre facili da individuare e da interrompere.**
- **E' essenziale considerare tutte le fonti e veicoli di trasmissione (anche potenziali e nuovi), oltre al ruolo dell'uomo, nel corso di indagini epidemiologiche e per la mitigazione del rischio.**

Possibili vie di trasmissione di *Escherichia coli* O157 e altri VTEC



E. coli O157 e altri VTEC - Vie di trasmissione all'uomo



(cortesia ISS, Roma)

ECOLOGIA di *E. COLI* O157 e altri VTEC NEL BOVINO

- Il bovino è esposto ai VTEC attraverso feci di animali eliminatori, per contatto diretto e indiretto (ambiente, alimenti, acqua contaminati)
- *E. coli* O157: **localizzazione g-intestinale** (vari tratti: rumine, colon, retto);
sito principale di colonizzazione: giunzione ano-rettale (RAJ)
- La colonizzazione è asintomatica
- Escrezione generalmente di breve durata ma con variabilità (generalmente non superiore a 1-2 mesi), talvolta intermittente, di norma in bassa carica

- Prevalenza di animali escretori bassa all'interno dell'allevamento, ma soggetta a notevoli fluttuazioni con aumenti rilevanti associate a:
 - stagionalità (mesi caldi),
 - variazioni alimentari
 - tipo di stabulazione
 - fattori stressanti (trasporto, digiuno, gruppi)
- Prevalenza maggiore nei giovani animali (vitelli post-svezzamento e manze)

- **Differenti sottotipi di *E.coli* O157 possono essere presenti in uno stesso allevamento**
- **Una precedente infezione non previene la reinfezione con lo stesso ceppo**

- **Prolungata sopravvivenza nelle feci (e anche liquami), anche per mesi (inattivazione rapida nel letame)**
- **Frequentemente isolato dall'acqua di abbeveratoi e vasche di abbeverata (sopravvivenza protratta, anche 4 mesi) con mantenimento e disseminazione in allevamento**
- **Possibile l'isolamento anche da altre specie presenti in allevamento (con disseminazione inter e intra allevamenti)**

Fattori di rischio in allevamento

(Studi non sempre univoci)

- Lettieria molto umida, con ristagni d'acqua
- Rimescolamento di animali, contatti di giovani animali con adulti e movimentazioni
- Instabilità di gruppi
- Veicolazione di feci attraverso attrezzature, veicoli, calzature e pratiche gestionali non corrette
- I super-shedder....eliminatori in carica elevata

I SUPER-SHEDDER

- Condizione studiata soprattutto per VTEC O157 ma riconosciuta anche per altri STEC altamente patogeni (O26).
- **Escrezione di VTEC O157 è molto variabile:** tra individui e nel tempo, spesso sporadica, di breve durata e non costante.
- **Concentrazione di microrganismi nelle feci è generalmente bassa, ma con grandi variazioni:** 10-10⁹ cfu/g di feci.

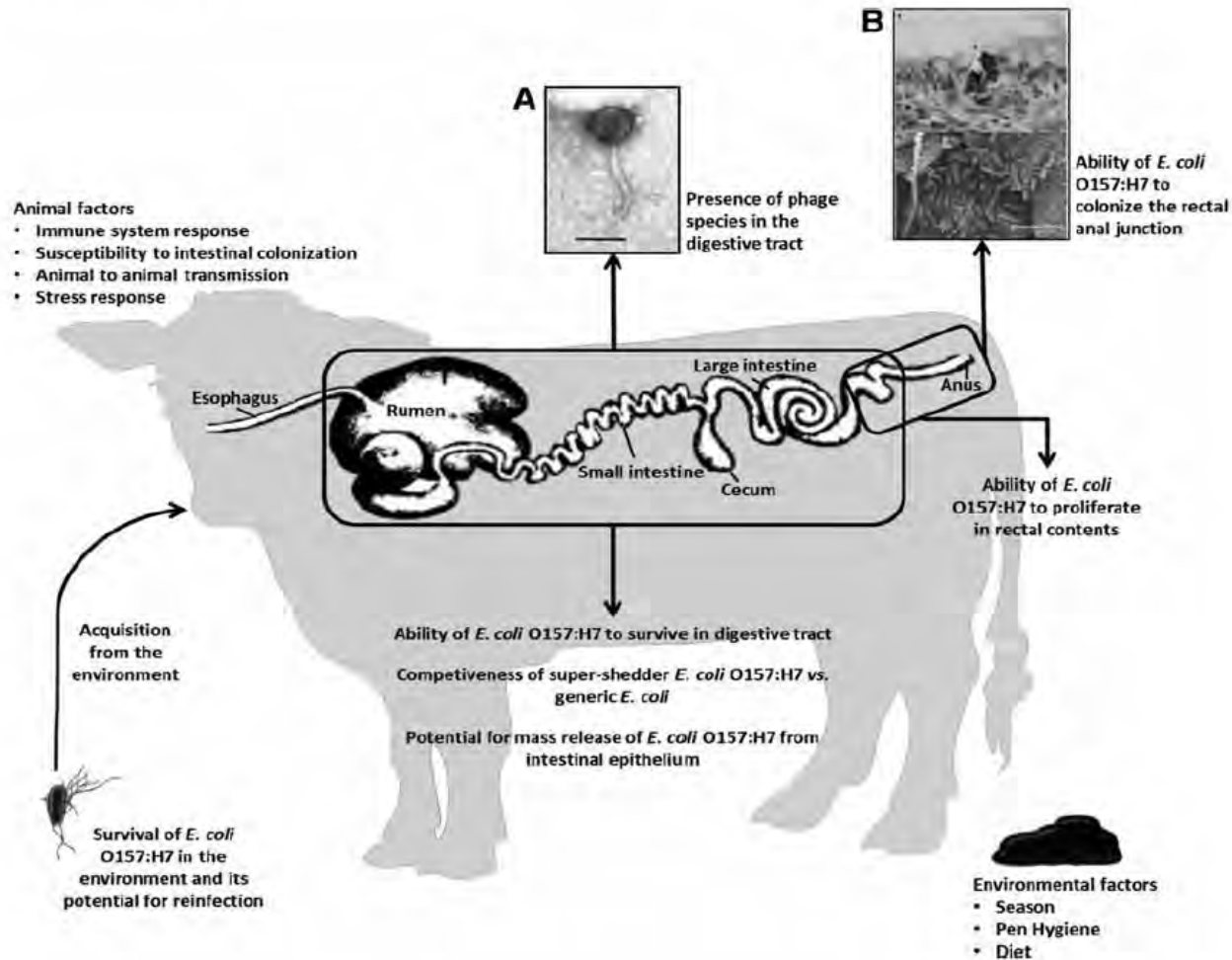
Definizione di Super-shedder: > 10⁴ cfu/g feci

- **Forte impatto su trasmissione da animale ad animale, contaminazione ambientale e delle carcasse al macello** ... ma mancanza di metodi efficaci per identificare i s-s all'interno dell'allevamento

Ipotesi: formazione di biofilm batterici, per efficace colonizzazione del sito RAJ, rilasciati in modo intermittente nelle feci dei s-s.

I SUPER-SHEDDER

SUPER-SHEDDING OF *E. COLI* O157:H7



Possibili fattori coinvolti nello sviluppo di un s-s, legati all'**animale**, al **microrganismo** e all'**ambiente**

I SUPER-SHEDDER

- Fenomeno complesso e ancora da approfondire, con fattori legati al microrganismo, all'animale e all'ambiente:
 - Differenze fenotipiche e genotipiche tra ceppi VTECO157 isolati da s-s e l-s; ruolo dei fagi.
 - Differenze della comunità microbica intestinale tra individui s-s e l-s.
 - Caratteristiche genetiche e stato immunitario dell'animale e del RAJ (tessuto linfatico)
 - Suscettibilità alla colonizzazione
 - Fattori ambientali (stagionalità, igiene allevamento, alimentazione, eventi stressanti)

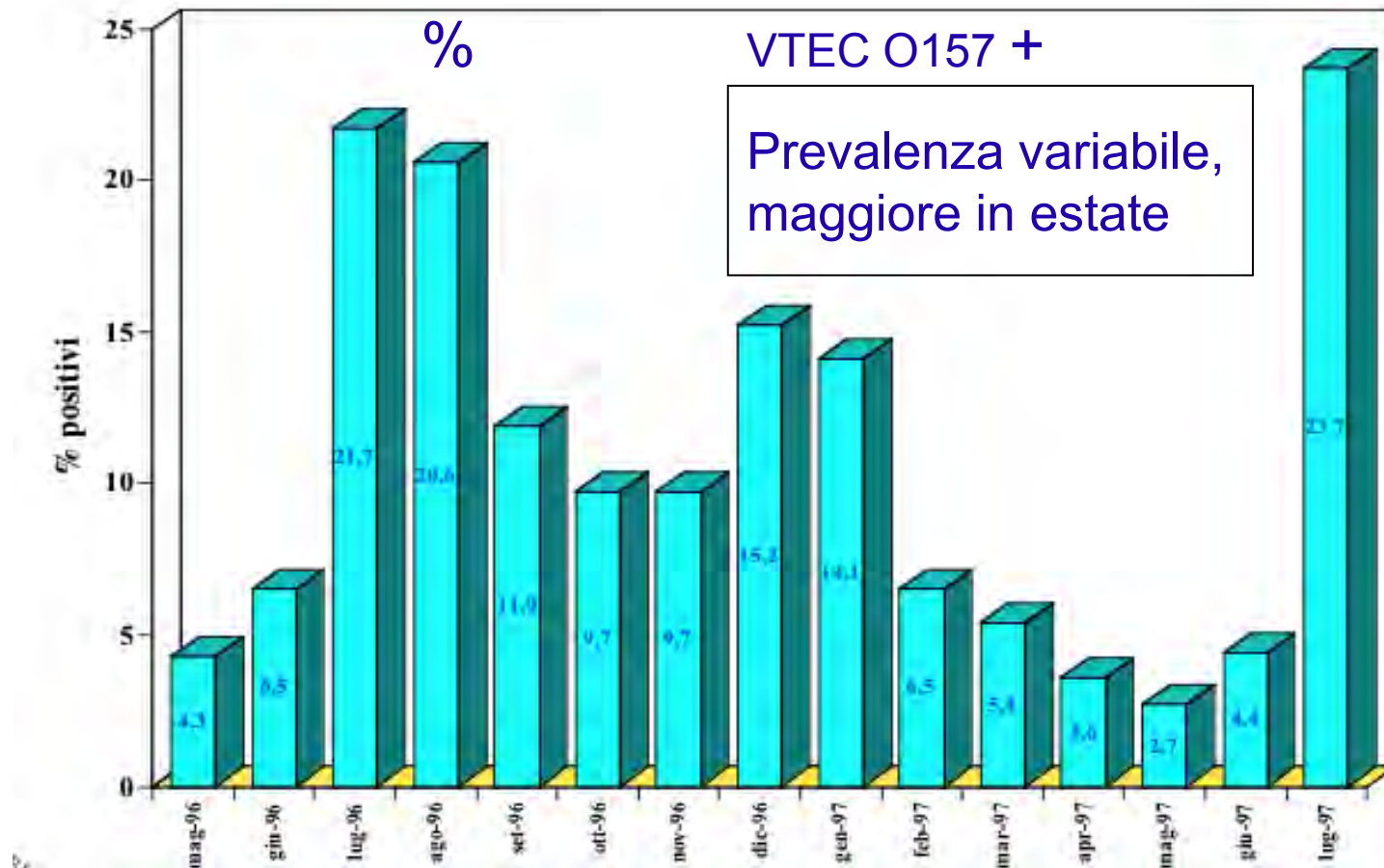
PREVALENZA DI *E.COLI* O157 NEI BOVINI

Notevoli differenze tra i vari studi, legate a:

Attenzione ad interpretarli correttamente!

- Popolazione target (allevamenti da carne/latte; macello; età degli animali)
- Strategia di campionamento
- Sensibilità dei metodi utilizzati
- Variazioni geografiche e stagionali

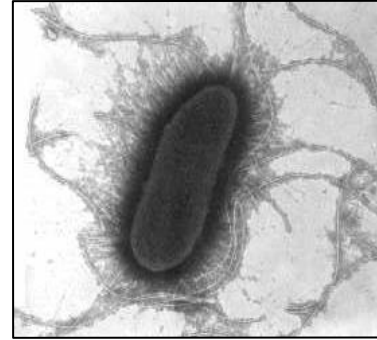
E.coli O157 in un'azienda bovina del Veneto, 1999 (G. Conedera et Al., Izs Venezia)



Gruppo di 92 giovani animali seguito mensilmente per 15 mesi (prevalenza animali escretori da 2.7 a 23.7%)

Prevalenza di VTEC O157 in liquami bovini freschi di allevamenti bovini del Veneto

- Allevamenti da latte: 17,5 % (103 allev.)
- Allevamenti da carne: 22,4 % (85 allev.)
- > prevalenza in primavera-estate
- Riconfermata presenza nel liquame stoccato del 34.4% degli allevamenti
- Presenza in bassi numeri



*Targhetta, Mancin, Conedera.
Atti Meeting PEN (Pathogenic
E. coli Network), Stockholm
2008*

Piccoli ruminanti

- **Ovini e caprini**

reservoir importante di VTEC O157 e di VTEC O26 in vari Paesi e di numerosi altri sierotipi (Norvegia, Australia, Spagna, Germania, Italia) .

- **Colonizzazione:** RAJ, ma pare anche diffusa nell'intestino distale
- Segnalazioni in alcuni paesi di **infezioni umane per contatto con ovini** (open farms) e per consumo di **alimenti di origine ovina (formaggi, salsicce)**
- **Escrezione:** segnalata maggiore nell'adulto rispetto ai giovani; di norma più breve che nel bovino. Maggiore prevalenza nei mesi caldi

L'indagine epidemiologica in caso di SEU

- Possibili criticità legate alla naturale tempistica di diagnosi dei casi
- Indicazioni derivanti dal questionario ISS (intervista alla famiglia) e informazioni mediche e di laboratorio (ospedale e ASL) con potenziali associazioni a determinati alimenti, acqua, contatto con animali e ambiente, aspetti ricreazionali, etc.
- E' essenziale considerare tutte le fonti e veicoli di trasmissione (anche potenziali e nuovi), oltre al ruolo dell'uomo, nel corso di indagini epidemiologiche e per la mitigazione del rischio.

L'indagine in azienda

Esaminare in allevamento in modo sistematico i più rilevanti fattori che possono influenzare introduzione, persistenza, disseminazione, trasferimento al latte dei VTEC, all'interno dell'azienda

Possono essere associati a: mandria, aspetti strutturali, management aziendale, alimentazione, mungitura

Animali

- Specie animali e razze presenti
- Consistenza delle diverse specie (N capi)
- N soggetti in lattazione
- Capi delle diverse specie acquistati ultimo anno
- Aspetti produzione di latte
- Valutazione stato pulizia animali
- Patologie mandria (attuali e ultimi mesi)

Stabulazione

- Tipologia di stabulazione
- Separazioni tra specie diverse
- Manutenzione lettiera / cuccette
- Gruppi funzionali
- Rimescolamento animali
- Contatto adulti con giovani animali
- Raggruppamenti vitelli
- Presenza di paddock esterni
- Sistema allontanamento deiezioni bovine in lattazione (raschiatore, grigliato, flushing) e frequenza
- Pulizia ambienti di stabulazione
- Insetti, roditori, volatili (presenza, sistemi di lotta)

L'indagine in azienda

Acqua

- Approvvigionamento acqua (pozzo e sua profondità, acquedotto, acque superficie)
- Caratteristiche dell'acqua (eventuali analisi)
- Abbeveratoi (tipologia, singoli o collettivi, vasche, grado di pulizia e manutenzione)

Alimentazione

- Razione e componenti (utilizzo di insilato, foraggi, unifeed, etc)
- Stoccaggio alimenti (modalità, adeguatezza)
- Modalità di somministrazione (mezzi utilizzati, se dedicati)
- Utilizzo del pascolo (esclusivo o promiscuo, se specie diverse, se fauna selvatica)
- Spandimento di liquami nei pascoli utilizzati (aziendali, di altre aziende, di altre specie)
- Cambi di alimentazione (e gradualità)

L'indagine in azienda

Strutture di mungitura

- Impianto mungitura (tipo, problematiche, controlli, adeguamenti)
- Pulizia area pre-mungitura
- Cisterna del latte (N., capacità, temperatura refrigerazione)
- Adeguatezza locale cisterna
- Sanificazione impianti e ambienti

Management della mungitura

- Addetti mungitura (N., familiari o dipendenti, esperienza)
- Pulizia vestiario mungitori
- Routine e igiene mungitura
- Modalità pulizia mammella
- Sanificazione mammella pre_mungitura
- Sanificazione mammella post-mungitura
- Pulizia contenitori per dipping

L'indagine in azienda

Sulla base dei fattori rilevati, delle conoscenze sull'ecologia del microrganismo, degli obiettivi che ci poniamo anche in base alle informazioni ricevute sul caso, si procederà al campionamento.

Problematiche da considerare...

Indagini su *E.coli* verocitotossici in allevamento, a seguito di un caso umano di SEU da VTEC O26

- **Indagine epidemiologica**

- Il 16 giugno 2015 la famiglia della bambina, affetta da SEU al rientro dalle vacanze, ha visitato una fattoria didattica; lì i bambini hanno avuto contatti con gli animali e con il loro ambiente e sono stati direttamente coinvolti in una dimostrazione di produzione di formaggi

- **Il NRL ha allertato l'ASL e l'IZS Venezia**

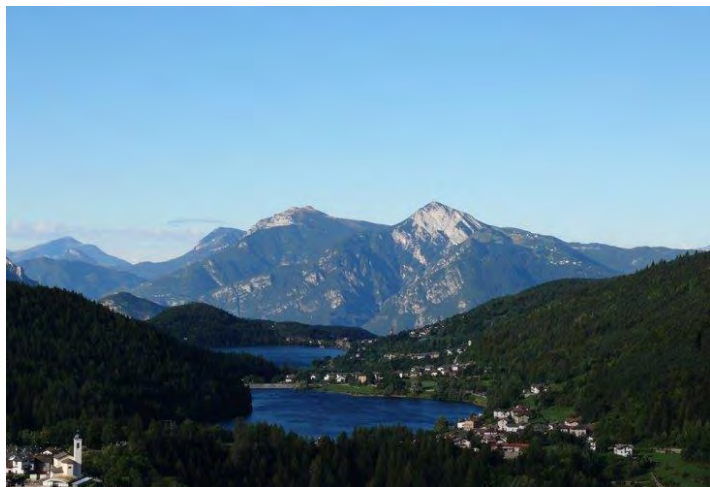
- **Conferiti campioni di feci e di siero al NRL.
Feci: isolamento di VTEC O26 (vtx2+);
siero: positivo agli Ab anti O26**

**APSS-TN e IZS-Ve: indagine sulla
fattoria didattica, luglio 2015**



Indagine relativa alla fattoria didattica

- Fattoria aperta al pubblico, con visite organizzate in diversi periodi dell'anno (turisti, scolaresche e anziani)
- Zona prealpina, a circa 1050 m slm
- Attività a conduzione familiare (con diverso ruolo di ciascun membro della famiglia)
- Piccolo caseificio, completamente separato dalla fattoria e dall'ambiente per lo stoccaggio del latte
- Produzione di formaggi bovini, ovini e caprini; gelati e yogurt
- Serviti principalmente alimenti di propria produzione



Indagine relativa alla fattoria didattica

- **Allevamento con**
 - **Bovini da latte (20),**
 - **pecore (circa 60, incroci di razza Frisona)**
 - **suini (3)**
 - **capre (11): in zona distante e separata (latte trasportato alla fattoria per la produzione di formaggio)**
- **Bovini e pecore nei mesi caldi tenuti al pascolo durante il giorno (pascoli separati), all'interno la notte (aree dello stesso stabile separate da un corridoio centrale)**



1° CAMPIONAMENTO: latte e prodotti lattiero caseari (6 luglio)

CAMPIONAMENTO

- 3 campioni di latte di massa (bovino, ovino e caprino)
- 3 campioni di formaggio (bovino, ovino e caprino), (Reg. 2073, 5 U.C.); lotti di produzione vicini alla visita della bambina
- **METODO:** ISO/TS 13136 (25g)

RISULTATI

- Nessun isolamento di VTEC dai campioni di latte e formaggio
- **Latte:**
 - bovino: positivo per il gene vtx2
 - ovino: positivo per il gene eae
- **Formaggi:** tutti positivi per il gene eae
 - bovino: negativo per i geni vtx
 - Ovino e caprino: alcune U.C. positive anche per il gene vtx1
- **tutti i formaggi:** conte elevate di Stafilococchi coagulasi positivi ed E. coli



1° CAMPIONAMENTO: feci (7 luglio)

CAMPIONAMENTO

- 20 campioni fecali di pecore (9 campioni rettali; 11 campioni di feci fresche da terra)
- 20 campioni rettali bovini
- 3 da suini
- METODO: ISO/TS 13136 (10gr)

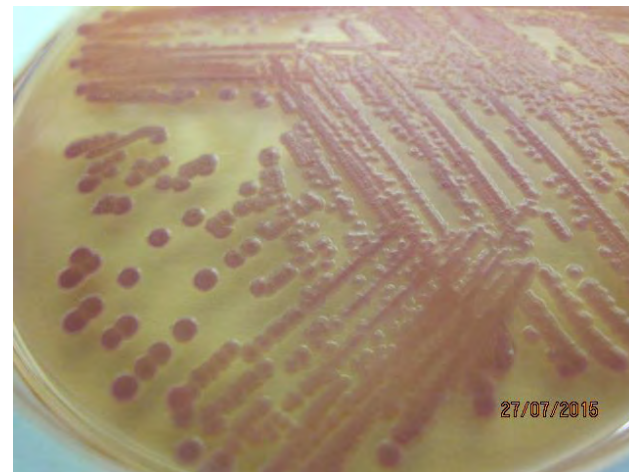


RISULTATI

- La maggior parte dei campioni fecali risultati positivi per geni vtx (bovini: 17/20; ovini: 19/20), spesso in associazione a gene eae
- Nessuna positività al gene O26 nei campioni bovini e suini
- 9/20 dei campioni ovini sono risultati positivi ai geni O26, vtx1, vtx2 ed eae
- 2 dei 9 campioni ovini positivi O26: isolamento ceppi VTEC O26, vtx2+ eae (solo da CT-SMAC, no da TBX, RMAC)
- Subtipizzazione Vtx: vtx2a

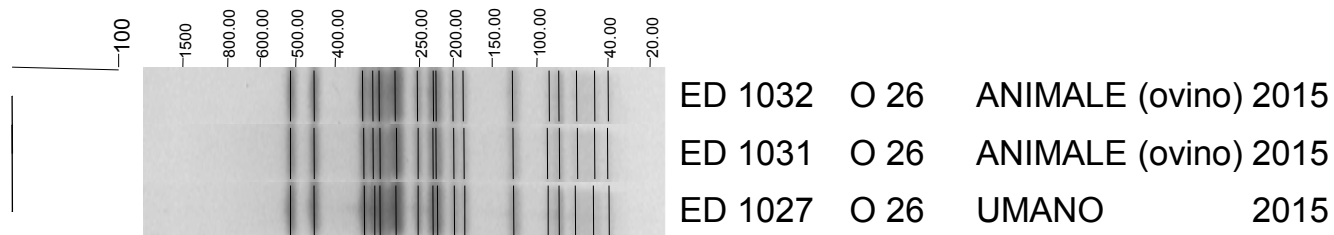
Confronto fra ceppi umani e animali

- **E. coli O26 Vtx2** è piuttosto raro negli ovini e nei bovini
- L'analisi **PFGE** presso l'ISS ha mostrato un **profilo identico** tra il ceppo della bambina e i ceppi ovini



Isolato O26 VTEC da ovino su CT-SMAC

PFGE_XbaI



Sopralluogo congiunto: APSS Trento e IZS Venezia

Evidenziati alcuni punti critici:

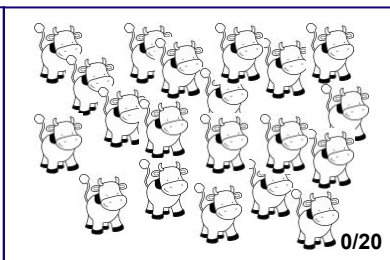
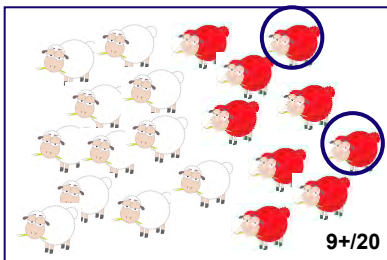
- Gestione degli animali e della mungitura effettuati dalla stessa persona (Igiene vestiti e stivali)
- Possibile cross-contaminazione tra aree sporche e pulite durante le visite
- Feci fresche di pecora su un pendio in prossimità dell'area frequentata dai visitatori
- Informazioni al pubblico sui possibili rischi derivanti dal contatto con gli animali comunicate solo verbalmente: assenza di cartelli
- Servizi igienici nuovi e ben organizzati, ma con lavandini prossimi all'ingresso della fattoria, piuttosto che all'area per consumo dei pasti e all'area con contatto animali
- Dimostrazione della produzione di formaggio ai bambini, che a volte assaggiano direttamente con le mani



Misure di controllo

- Istruzioni generali date dal Servizio Veterinario su:
 - Buone pratiche igieniche e di lavorazione (allevamento e caseificio)
 - Necessità di netta separazione tra alcune attività (ad esempio zona mungitura e spogliatoio)
 - Separazione tra le differenti specie animali
 - Divieto di contatto diretto dei visitatori con gli ovini
 - Necessità di un Manuale per i visitatori con regole di accesso alle diverse aree
 - Divieto di consumo di cibi prodotti durante le dimostrazioni
 - Informazioni e segnali per i visitatori
- Altri provvedimenti:
 - Campionamenti successivi per monitorare gli animali e la sicurezza alimentare
 - Iniziative per la formazione specifica per gestori di fattorie didattiche
 - Approfondimenti specifici per operatori dell'Azienda sanitaria

Positività per O26 nei diversi campionamenti

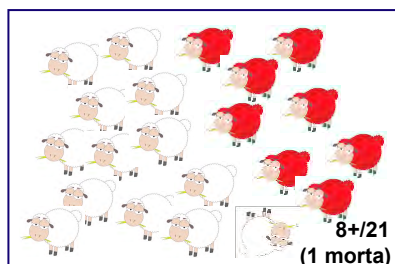


1° campionamento (7 luglio)

Ovini: 2 isolamenti VTEC O26

9/20 positivi ai geni

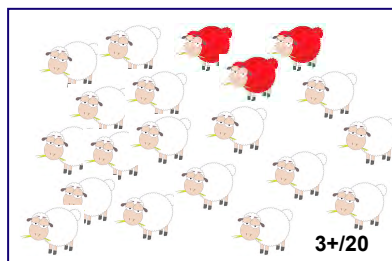
Bovini: nessuna positività



2° campionamento (27 luglio)

Ovini: nessun isolamento VTEC O26

8/21 positivi ai geni

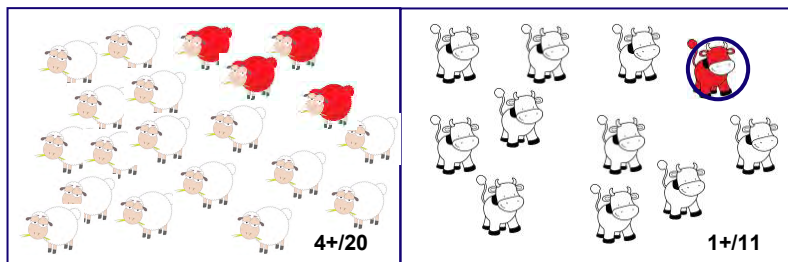


3° campionamento (28 settembre)

Ovini: nessun isolamento VTEC O26

3/20 positivi ai geni

Positività per O26 nei diversi campionamenti



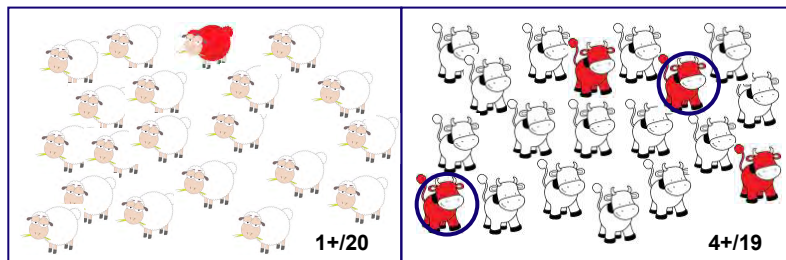
4° campionamento (17 novembre 2015)

Ovini: nessun isolamento VTEC O26

4/20 positivi ai geni

Bovini: 1 isolamento VTEC O26

1/11 positivo ai geni



5° campionamento (02 febbraio 2016)

Ovini: nessun isolamento VTEC O26

1/20 positivo ai geni

Bovini: 2 isolamenti VTEC O26

4/20 positivi ai geni

...e in futuro, come evolverà?

Campionamenti: feci

Positività per O26 nei diversi campionamenti (luglio 2015-febbraio 2016)

Campionamenti	OVINI		BOVINI	
	Geni O26 eae vtx	Isolamento VTEC O26	Geni O26 eae vtx	Isolamento VTEC O26
1° - 07/07/2015	9/20	2x	0/20	-
2° - 27/07/2015	8/20	-	NE	
3° - 28/09/2015	3/20	-	NE	
4° - 17/11/2015	4/20	-	1/11	1x
5° - 02/02/2016	1/20	-	3/19	2x

Identità di profilo PFGE anche del ceppo bovino (4° campionamento) con quelli ovini e del caso umano

Campionamenti: altre matrici

Filtri latte e acque di abbeverata: nessun VTEC O26 isolato

- **Filtri latte (impianto mungitura) : tot 4**
3 positivi per geni O26, vtx1, vtx2 ed eae
(2 ovini e 1 bovino)



- **Campioni d'acqua di abbeverata: tot 6**
2 positivi geni O26 ed eae



Conclusioni



- Importanza della pronta diagnosi del caso umano e della tempestiva indagine epidemiologica per l'identificazione delle fonti d'infezione.
- Fondamentale la **collaborazione** e la **comunicazione** tra le diverse istituzioni di sanità pubblica coinvolte (ASL, ospedale NRL, IZS)

approccio **ONE HEALTH !**

- Necessità di rafforzare la **formazione specifica** sui potenziali rischi, a seconda degli ambiti interessati e delle criticità rilevate, per tutti i soggetti coinvolti

VTEC can be an environmental risk



Cortesia di B. Reilly, 2002

Ringraziamenti

- **IZSVe – Pordenone staff**

- **A. Pierasco**

- **C. Targhetta**

- **S. Rigo**

- **E tutti i tecnici**



- **NRL *E. coli* staff**



- **IZSVe – Trento staff**

- **G. Farina**



- **APSS Trento**



- **G.B. Turra**

- **M. Tita**

- **G. Monsorno**

- **M. Fedel**

- **M.G. Zuccali**

- **V. Carraro**

- **ASUR Marche**

- **S. Impullitti**

- **L. Persiani**



***Grazie per
l'attenzione!***

email: gconedera@izsvenezie.it