

I principali approcci alla diagnostica delle infezioni da STEC: appropriatezza prescrittiva ed interpretazione dei risultati analitici

Stefano Andreoni¹, Valeria Michelacci², Rosangela Tozzoli², Eleonora Ventola²

¹Azienda Ospedaliero Universitaria Maggiore della Carità, Novara

²Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Indice

Caratteristiche generali degli <i>Escherichia coli</i> patogeni	2
<i>Escherichia coli</i> produttori di Shiga Tossina	3
Approccio diagnostico alle infezioni da STEC	4
Indagine anamnestica	5
Esami microbiologici	5
Indagini molecolari	8
Isolamento di <i>Escherichia coli</i> STEC	10
Caratterizzazione dei ceppi STEC isolati	11
Test immunoenzimatici	12
Rilevazione sierologica di infezioni da STEC	13
Identificazione della presenza della Shiga Tossina libera nei campioni fecale	13
Sicurezza in laboratorio	14
Workflow di elezione per la ricerca di STEC	14
Bibliografia	15

Caratteristiche generali degli *Escherichia coli* patogeni

Escherichia coli fa parte della normale flora intestinale dell'uomo, dove è presente come normale commensale. Tuttavia, attraverso l'acquisizione e la perdita di componenti genetiche, può diventare un agente patogeno altamente diversificato e adattato.

Le varianti patogene di *E. coli* causano morbilità e mortalità in tutto il mondo. Il loro meccanismo di colonizzazione, le tossine prodotte, il sito bersaglio, i sintomi, il decorso clinico e le complicanze in seguito all'infezione, possono differire in modo significativo.

I ceppi di *E. coli* patogeni vengono solitamente classificati in patogruppi in base al distretto corporeo in cui causano la malattia e al meccanismo patogenetico (1):

- ✓ stipiti in grado di causare patologie in distretti extraintestinali (ExPEC, Extraintestinal Pathogenic *E. coli*), responsabili di meningiti, sepsi e infezioni del tratto urinario;
- ✓ stipiti che causano patologie intestinali associate a diarrea (*E. coli* diarreagenici: DEC, Diarrheagenic *E. coli*).

All'interno della classe dei DEC si ritrovano almeno sei gruppi o patotipi identificabili: *E. coli* enteropatogeni (EPEC, EnteroPathogenic *E. coli*), *E. coli* enterotossigenici (ETEC, EnteroToxigenic *E. coli*), *E. coli* enteroaggregativi (EAEC, EnteroAggregative *E. coli*), *E. coli* enteroinvasivi (EIEC, EnteroInvasive *E. coli*), *E. coli* ad aderenza diffusa (DAEC, Diffusely Adherent *E. coli*) ed *E. coli* produttori di Shiga tossina (anche definita Verocitotossina) (STEC, Shiga Toxin-producing *E. coli*, o VTEC Verocytotoxin-producing *E. coli*).

Questa classificazione è associata a caratteristiche patogenetiche e tutt'ora in uso, tuttavia non completamente esaustiva in quanto, a causa della plasticità del genoma di *E. coli*, non è raro osservare ceppi con sovrapposizione in termini di presenza di determinanti di virulenza caratteristici di diversi patotipi. Un esempio molto noto di questi stipiti con caratteristiche di virulenza comuni a diversi patotipi, i cosiddetti ceppi "ibridi", è il ceppo *E. coli* patogeno O104 che ha causato la grave e vasta epidemia in Germania nel 2011, e possedeva geni di virulenza sia di STEC che EAEC (2). Oltre ai ceppi ibridi EAEC/STEC, nel corso

degli anni sono stati identificati anche stipiti con caratteristiche tipiche dei patotipi STEC e ETEC (3) ed ExPEC/STEC (4). Tali ceppi ibridi possono causare malattia grave nell'uomo, e risulta quindi importante la fine caratterizzazione degli stipiti isolati da casi clinici.

Escherichia coli produttori di Shiga Tossina

Tra i vari patotipi, il sottogruppo STEC comprende un gruppo eterogeneo di ceppi in grado di causare infezioni caratterizzate da un ampio spettro di sintomi, con un quadro clinico che varia da lieve, come diarrea non complicata, a grave come la colite emorragica e la Sindrome Emolitico Uremica (SEU), una complicanza sistemica caratterizzata da anemia emolitica microangiopatica, trombocitopenia ed insufficienza renale.

La caratteristica comune di tutti i ceppi STEC è dalla capacità di produrre una potente citotossina, la Shiga-tossina (Stx), di cui si conoscono due tipi, Stx1 e Stx2, grazie all'espressione di geni (*stx1* e *stx2*) veicolati da un batteriofago di tipo lambdaide integrato nel cromosoma. La Stx è in grado di indurre un effetto citopatico sulle cellule Vero, caratteristica per la quale è conosciuta anche come Verocitotossina. È stata descritta una elevata variabilità nelle sequenze dei geni *stx*, e si possono riconoscere diversi sottotipi sia di *stx1* che di *stx2*, alcuni dei quali maggiormente associati a casi di malattia grave. Infatti, sebbene anche la Stx1 sia stata collegata a malattia nell'uomo, gli STEC che producono Stx2, e in particolare i sottotipi Stx2a, Stx2c e Stx2d, sono più spesso associati allo sviluppo delle forme più gravi di infezione (5, 6).

Gli stipiti di *E. coli* possono essere classificati sierologicamente sulla base delle differenze di struttura dei principali antigeni di superficie: in particolare, l'antigene somatico O, definisce il sierogruppo di un isolato, e l'antigene flagellare H, la cui combinazione definisce il sierotipo (O:H).

Nella maggior parte del mondo, STEC O157:H7 è il sierotipo più comune che causa la malattia umana, ma è da tempo evidente che anche ceppi di STEC non-O157 danno un importante contributo a casi sporadici ed epidemie in tutto il mondo. In Europa nell'anno 2021, il sierogruppo O26 sta emergendo come sierogruppo STEC associato ai casi gravi di infezione da STEC ed in particolare

SEU, al secondo posto dopo l'O157 (7). Tuttavia, ad oggi, sempre più sierogruppi STEC sono segnalati come cause di malattie gravi nell'uomo e tale carattere non è più considerato un segno distintivo di indicazione di patogenicità. Infatti, sebbene alcuni sierotipi STEC, in particolare O157:H7, siano più frequentemente associati a forme gravi di malattia nell'uomo e possano provocare colite emorragica e SEU, recenti valutazioni sulla patogenicità condotte sia dall'OMS/FAO (8) che dall'EFSA (9) superano il concetto del sierotipo quale indicatore di patogenicità per l'uomo, concentrandosi invece sul profilo dei geni di virulenza ed in particolare *stx* (e relativi sottotipi) ed il fattore di colonizzazione *eae* quali principali determinanti di patogenicità.

I ceppi STEC hanno come principale serbatoio il tratto gastro-intestinale di bovini che, contaminando alimenti ed acqua, trasmettono l'infezione all'uomo (zoonosi). Le infezioni da STEC si contraggono generalmente in seguito al consumo di alimenti crudi o non opportunamente cotti o acque contaminate, ma la patologia può conseguire anche da un contatto diretto con animali infetti o colonizzati o con ambienti contaminati.

I ceppi STEC sono responsabili di forme diarroiche di varia entità, generalmente caratterizzate da diarrea ematica, dolore addominale, nausea e vomito. Le tossine Stx appartengono alla famiglia delle tossine proteiche AB₅ e sono costituite da una subunità A enzimaticamente attiva e da un pentamero di subunità B che ha funzione di recettore (10). Le Stx agiscono come potenti inibitori del meccanismo di sintesi proteica nelle cellule eucariotiche inattivando le subunità ribosomiali 60S (11), provocando la morte cellulare.

Oltre che in microbiologia clinica, ci sono importanti implicazioni in microbiologia veterinaria (animali come serbatoi di ceppi STEC), microbiologia ambientale (terra e acqua contaminate da STEC) e microbiologia alimentare (contaminazione, manipolazione e preparazione).

Approccio diagnostico alle infezioni da STEC

La rapida identificazione delle infezioni da STEC è molto importante, in quanto l'uso di antibiotici per trattare le infezioni da STEC è controverso, infatti è stato

osservato che può provocare un aumento della produzione o del rilascio di Shiga tossine. La somministrazione di antimicrobici può quindi rappresentare un fattore di rischio significativo per la progressione della malattia verso le forme più gravi di malattia indotta da STEC, la SEU (12). Inoltre, recentemente è stato proposto che una generosa infusione di liquidi per via endovenosa possa portare a effetti positivi sia a breve che a lungo termine esiti della malattia, riducendo il danno d'organo (13). Pertanto, una tempestiva identificazione eziologica è fondamentale per la gestione clinica dei pazienti.

Indagine anamnestica

La diagnostica di laboratorio per le infezioni da STEC fornisce un dato che deve sempre essere contestualizzato, tenendo conto delle informazioni anamnestiche e della clinica del soggetto a cui si fa diagnosi (tutti questi aspetti sono ampliamenti trattati negli altri obiettivi del presente corso)

Esami microbiologici

Generalmente, tenuto conto del rapporto costo-beneficio, gli esami microbiologici su campioni di feci vengono effettuati in presenza di un forte sospetto (clinico-anamnestico) di diarrea infettiva (diarrea acuta, severa, con sintomi di malattia invasiva o quelli con una storia di complicanze associate alla malattia gastrointestinale, associata a un possibile evento epidemico, in presenza di sangue e/o muco, in pazienti in età avanzata, in bambini sotto i 5 anni, in soggetti immunodepressi).

L'ACG (*American College of Gastroenterology*) raccomanda di routine la coltura di feci per pazienti con qualsiasi dei seguenti sintomi: diarrea severa o persistente, temperatura > 38°C, diarrea con sangue o la presenza di lattoferrina, leucociti o sangue occulto. Le raccomandazioni dell'IDSA (*Infectious Diseases Society of America*) sono simili: raccomandano la coltura per pazienti con diarrea per oltre 1 giorno, in presenza di febbre, disidratazione, malattia sistemica, feci ematiche o una storia clinica che include patogeni batterici, per una diagnosi differenziale.

L'esecuzione di indagini colturali su campioni di feci composte (non diarroiche) o in momenti successivi alla scomparsa della sintomatologia, viene solitamente scoraggiata, con l'eccezione dei casi di controllo su soggetti con precedenti riscontri colturali positivi per STEC, per escludere una condizione di "portatore asintomatico".

Di consuetudine, presso i laboratori che si occupano di microbiologia clinica, qualora venga previsto un accertamento diagnostico colturale ("coprocoltura") per sospetta diarrea infettiva, senza ulteriori indicazioni, l'iter diagnostico "tradizionale", prevede la ricerca di *Salmonella*, *Shigella* e *Campylobacter*.

L'estensione di indagini ad altri microrganismi, in particolare a STEC, è generalmente legata o ad una specifica prescrizione, o a particolari condizioni cliniche (soggetti immunodepressi) o a specifiche caratteristiche dei campioni (feci ematiche). A questo proposito può risultare molto utile, ma spesso non così agevole, poter usufruire di dati anamnestici che possano evidenziare possibili esposizioni ai fattori di rischio prima dell'inizio della sintomatologia, utili per la diagnosi di STEC-HUS.

Il ricorso ad accertamenti diagnostici tempestivi, anche costosi (test molecolari) è particolarmente indicato in pazienti appartenenti a categorie a maggior rischio di sviluppare conseguenze sistemiche gravi e potenzialmente fatali come la SEU e nei bambini piccoli (<5 anni) con diarrea ematica.

In aggiunta al valore per la cura del paziente, la coltura delle feci, così come le indagini molecolari, sono un mezzo importante per la Sanità Pubblica. Gli isolati da coprocolture sono impiegati per individuare e mappare epidemie a livello locale, nazionale ed internazionale. Una potenziale criticità legata all'utilizzo esclusivo di indagini molecolari, è la mancanza dell'isolamento del microrganismo, necessario per le indagini di Sanità Pubblica e una caratterizzazione fine.

L'accertamento diagnostico per sospetta infezione da *E. coli* STEC dovrebbe prevedere la raccolta delle feci per la coltura batterica il prima possibile nei pazienti con:

- Diarrea non emorragica (di solito > 5 volte al giorno) che può progredire in diarrea emorragica

- Diarrea dolorosa e non sanguinolenta
- Diarrea con febbre (durante situazioni di epidemia)
- Diarrea con vomito
- Diarrea acuta in pazienti immunocompromessi
- Diarrea in un paziente con un familiare o altri contatti con una coltura fecale positiva per STEC
- SEU diagnosticata o sospetta

Idealmente i campioni da analizzare (feci, tamponi fecali, tamponi rettali con segni evidenti di materiale fecale) dovrebbero essere raccolti entro tempi brevi dall'inizio della sintomatologia, in pazienti che non hanno ricevuto trattamento antibiotico da un minimo di 48 ore.

Al fine di eseguire le successive analisi, dovrebbero essere fornite adeguate istruzioni sulle corrette modalità di raccolta dei campioni. Il paziente deve raccogliere il materiale in recipienti sterili e trasferirlo in contenitori con tappo a vite, correttamente contrassegnati. I campioni non devono essere contaminati con urine, con l'acqua dei sanitari o con carta igienica (può contenere sali di bario), perché potrebbero interferire con il risultato dell'indagine colturale.

I campioni dovrebbero essere esaminati subito. Se non possono essere processati andrebbero refrigerati ed esaminati entro 1-2 ore o congelati a -20°C o -70°C per tempi più lunghi.

Tutti i tamponi rettali dovrebbero essere posti in terreno di trasporto (Cary-Blair, Stuart's, Amie's) e testati entro 2-3 giorni (il terreno di trasporto deve coprire completamente il tampone).

Nel contesto diagnostico, si inserisce la tecnologia dei dispositivi di trasporto e prelievo LBM (*Liquid Based Microbiology*): essi rappresentano un sistema di prelievo innovativo (sonde floccate) abbinato ad uno specifico terreno di trasporto/arricchimento, pronto all'uso ed in fase liquida, all'interno di un unico contenitore. La combinazione tra floccati e sistema di trasporto liquido offre significativi vantaggi: a) capacità di preservare la vitalità dei patogeni enterici durante la conservazione ed il trasporto dei campioni fecali da sottoporre a coltura; b) la possibilità di standardizzare la semina dei campioni utilizzando un terreno di trasporto liquido abbinato o meno ad un sistema automatico; c) la

possibilità di un utilizzo sia per test colturali sia per la ricerca di antigeni e acidi nucleici.

Indagini molecolari

Tecniche di biologia molecolare trovano sempre più largo impiego nei laboratori di diagnostica, e sono a supporto anche della rilevazione della presenza di STEC. Infatti, per *E. coli* STEC sono stati sviluppati e sono disponibili sistemi molecolari, quali la PCR (reazione a catena della polimerasi) convenzionale o PCR Real Time, per il rilevamento di geni che codificano le Shiga-tossine direttamente nei campioni fecali o previo arricchimento in brodo. Questi sistemi potenzialmente molto sensibili e da ritenersi test di elezione, possono fornire diagnosi rapide, contribuendo ad un approccio clinico-terapeutico più efficace e tempestivo soprattutto in quelle situazioni a maggior rischio di complicanze (come la SEU).

Per le gastroenteriti, così come per altre patologie infettive, data l'eterogeneità della componente eziologica, sono stati sviluppati e descritti in letteratura sistemi molecolari multiplex volti all'individuazione di patogeni enterici batterici, virali e parassitari. Tra questi sistemi, si riconoscono i pannelli sindromici (PS), in grado di determinare, in tempi rapidi, da campione primario, la presenza di molteplici target rappresentativi dei patogeni prevalenti per determinate sindromi cliniche. L'approccio "sindromico", consente di valutare l'insieme dei potenziali microrganismi patogeni partendo da un sospetto diagnostico clinico di probabile o possibile natura infettiva.

Negli ultimi anni sistemi molecolari multiplex hanno trovato sempre più spazio, nell'arena diagnostica gastroenterologica e come kit commerciali, e la letteratura scientifica internazionale è andata via via arricchendosi di numerose esperienze in merito. L'uso di questi sistemi in affiancamento o in sostituzione dei sistemi convenzionali rimane tuttavia controverso: se da un lato l'approccio molecolare può garantire un incremento della sensibilità rispetto ai metodi tradizionali, vi sono perplessità sulla specificità dei pannelli multiplex e sull'interpretazione dei risultati positivi, specialmente quelli a positività multipla. Inoltre, spesso tali sistemi prevedono saggi che non comprendono

l'arricchimento del campione fecale. Questo approccio presenta lati positivi e non: infatti se da un lato consente una rapida indagine e in presenza di sintomatologia compatibile permette la tempestiva diagnosi, potrebbe avere limitazioni di sensibilità se l'agente patogeno è in quantità più basse del limite di rilevazione del metodo, ed inoltre non prevede l'isolamento del ceppo STEC, passaggio importante per la successiva caratterizzazione. Inoltre, spesso tali kit non permettono di discriminare tra la presenza dei geni *stx1* ed *stx2*, informazione che può invece fornire un'indicazione importante, in quanto come accennato in precedenza, ceppi STEC in grado di produrre la Stx2 sono più frequentemente associati a casi di malattia grave.

Approcci diagnostici molecolari, non basati su kit commerciali, consistono in saggi di screening per la presenza dei geni codificanti le Shiga tossine in colture di arricchimento utilizzando PCR multiplex in *real-time*. Tale tecnica è molto sensibile e presenta una specificità maggiore rispetto alla PCR convenzionale, ed è di elezione per l'analisi di matrici complessi. La fase di arricchimento del campione in brodo è consigliabile, permettendo la rivitalizzazione dei germi presenti nei campioni clinici, che talvolta possono essere prelevati da pazienti che hanno assunto antibiotici. A tale scopo, una aliquota del campione fecale o il tampone vengono inoculati in terreno ricco (TSB) e incubati per 18-24 ore a 37°C. Viene quindi effettuata l'estrazione del DNA: l'utilizzo della semplice bollitura, applicazione in uso per la PCR convenzionale, non è consigliabile per l'effettuazione della PCR Real Time, tuttavia è possibile usare kit molto rapidi, basati su resine non immobilizzate, che permettono la purificazione di acido nucleico opportuna per le applicazioni di Real Time PCR. In seguito si effettua l'amplificazione dei geni *stx1* ed *stx2*, che può essere seguita in tempo reale, mediante l'osservazione delle curve di amplificazione relative ai due target. In seguito all'identificazione di uno o entrambi i geni *stx*, si può condurre anche la ricerca del gene *eae*, codificante l'intimina e responsabile del meccanismo di colonizzazione noto come "Attaching and Effacing", spesso identificato in ceppi STEC che causano sintomatologia grave.

In seguito allo screening, si procede con il tentativo di isolamento. Le colture fecali possono essere eseguite contemporaneamente su piastre di MacConkey

agar, o nel caso non si osservi una crescita opportuna sul terreno solido, si può seminare dal brodo di arricchimento. Quando un test positivo indica un'infezione da STEC, gli isolati di coltura possono essere utilizzati per un'ulteriore caratterizzazione.

Esempi di metodiche molecolari basate su PCR convenzionale e PCR Real Time sono disponibili sul sito del Laboratorio Nazionale di Riferimento per *E. coli* (14).

Isolamento di *Escherichia coli* STEC

Una volta identificata la presenza di STEC in un campione clinico, si procede con il tentativo di isolamento dello stipite, per consentirne la successiva caratterizzazione, come ad esempio la sottotipizzazione dei geni codificanti le Shiga Tossine, determinazione della presenza di geni associati alla colonizzazione dell'intestino, geni di virulenza accessori, o identificazione del sierogruppo. In caso di impossibilità di procedere all'isolamento, i campioni e/o gli isolati Shiga tossine/STEC positivi dovrebbero essere inviati ad un centro di riferimento per conferma e caratterizzazione genetica.

Oltre alla produzione di tossine Shiga, i ceppi STEC sono fenotipicamente indistinguibili dagli *E. coli* commensali, comunemente presenti nell'intestino umano. Pertanto, la rilevazione di STEC in campioni complessi e la conferma degli isolati di *E. coli* come STEC si basa sull'identificazione della presenza in singole colonie dei geni codificanti le Stx.

Con l'eccezione dei ceppi O157, non esistono terreni selettivi e differenziali che permettano di evidenziare la presenza di STEC e l'isolamento può risultare piuttosto problematico. I campioni clinici, come campioni fecali e tamponi, risultati positivi per STEC nella fase di screening, possono essere seminati su piastre di terreno compatibile con la crescita di *E. coli*, come MacConkey agar, un terreno che contiene Sali biliari che permettono la crescita delle Enterobatteriacee e permette la rilevazione della fermentazione del lattosio, caratteristica comune alla maggior parte dei ceppi di *E. coli*. Le singole colonie presenti sulla piastra vengono quindi saggiate per la presenza dei geni *stx1* ed *stx2*.

La maggior parte dei ceppi di *E. coli* O157 non fermenta o fermenta lentamente il sorbitolo. Per utilizzare questa proprietà ai fini diagnostici è stato sviluppato un terreno al sorbitolo (SMAC: Sorbitol MacConkey agar) e una variante di questo contenente cefixime e tellurito (CT-SMAC: cefixime tellurite Sorbitol MacConkey agar). Le colonie di *E. coli* sorbitolo-negative appaiono incolori su questi due substrati, ma CT-SMAC agar ha il vantaggio di eliminare molta flora enterica che cresce su agar SMAC. Le feci vengono seminate su SMAC e incubate per 18-24 ore a 37°C. Inoltre *E. coli* O157 differisce dagli altri *E. coli* per la mancata fermentazione del sorbitolo e la negatività per β -glucuronidasi. Le colonie sorbitolo negative (incolori) vengono testate successivamente con antisiero per *E. coli* O157 e per la presenza dei geni *stx* per conferma di STEC. Tuttavia, sono stati descritti anche ceppi STEC O157 in grado di fermentare il sorbitolo.

Un ulteriore approccio consiste nel rilevare l'attività dell'enzima β -glucuronidasi, normalmente presente in *E. coli*, usando brodi o terreni contenenti 4-metilumbelliferil- β -D-glucuronide (MUG). L'azione dell'enzima genera un metabolita fluorescente che può essere rilevato con una sorgente di luce UV. Tuttavia, a differenza di circa il 92% di *E. coli*, la maggior parte dei ceppi di *E. coli* O157: non presentano questo enzima e sono quindi MUG-negative.

Negli ultimi anni sono stati sviluppati anche terreni cromogeni per l'identificazione presuntiva di *E. coli* STEC appartenenti ad alcuni sierogruppi. CHROMagar O157 rileva il sierogruppo O157 mentre CHROMagar STEC permette di evidenziare sia O157 che altri sei sierogruppi prevalenti di STEC (O26, O45, O103, O111, O121, O145). Tuttavia, va comunque confermata la presenza dei geni *stx* nelle colonie sospette. Inoltre, data l'ormai accertata pluralità dei sierogruppi dei ceppi che causano infezioni in Italia, l'orientamento è confermare la presenza di STEC mediante l'identificazione dei geni *stx* piuttosto che seguire la presenza di *E. coli* appartenenti a determinati sierogruppi.

Caratterizzazione dei ceppi STEC isolati

La caratterizzazione dei ceppi STEC isolati è un punto cruciale, perché permette descrivere i ceppi circolanti e di grande importanza nella ricerca del patogeno nei veicoli di infezione nel corso delle indagini su focolai epidemici.

La ricerca di geni di virulenza accessori, come ad esempio la presenza del gene *eae* coinvolto nel meccanismo di colonizzazione di tipo Attaching and Effacing, e la sottotipizzazione dei geni *stx*, mediante tecniche di biologia molecolare, sono strumenti utili a definire la patogenicità dei ceppi STEC. A causa della presenza di ceppi ibridi può essere interessante andare ad indentificare la presenza dei principali geni associati ad altri patogruppi di DEC (come ad esempio il gene *aggR* caratteristico dei ceppi EAEC).

Anche se non rappresenta un determinante di virulenza, la determinazione del sierogruppo che descrive l'antigene O, è una caratterizzazione che può essere effettuata mediante saggi microbiologici (ad es. agglutinazione su vetrino) o biomolecolari (come la PCR) e viene spesso eseguita per identificare i ceppi circolanti.

Nonostante l'uso di antibiotici non sia consigliato per le infezioni da STEC, la caratterizzazione dello spettro di antibiotico-resistenza è una tecnica di caratterizzazione sempre più utilizzata a scopi epidemiologici, grazie anche all'avvento delle tecnologie di sequenziamento che permettono di rilevare la presenza di geni di antibiotico-resistenza.

Test immunoenzimatici

È possibile utilizzare un dosaggio immunoenzimatico (EIA) per determinare la presenza di Stx1 o Stx2. Inoltre esistono in commercio immunodosaggi per il rilevamento di antigeni di O157 e H7 da approntare direttamente dalle feci o da brodi di arricchimento colturali. L'attuale ridotta sensibilità e lo scarso valore predittivo negativo ne limitano l'impiego diagnostico.

A supporto della diagnosi di infezione da STEC esistono test immunoenzimatici, immunocromatografici per la ricerca nelle feci delle Shiga tossine. Alcuni test sono anche approvati FDA per l'uso direttamente sulle feci, senza arricchimento in brodo, ma le prestazioni variano tra i produttori. Generalmente si raccomanda

che il test venga eseguito su colture di brodo di arricchimento incubate durante la notte, piuttosto che un test diretto su campioni di feci.

Eventuali brodi di arricchimento con test positivo per *Stx* dovrebbero essere inoltrati ad un Centro di Riferimento per l'isolamento e la caratterizzazione molecolare.

Sebbene siano ancora attuali approcci per la rilevazione di STEC nei laboratori di microbiologia clinica mediante indagini colturali ed immunologiche, è stata osservata negli ultimi anni una tendenza verso metodi basati sulla PCR per il rilevamento rapido di STEC (geni *stx1* e *stx2*), con conseguente miglioramento dei tassi di rilevamento.

Rilevazione sierologica di infezioni da STEC

I test sierologici rappresentano uno strumento diagnostico utile per ottenere un'evidenza indiretta di infezione da STEC quando i risultati dei metodi diretti sono negativi. L'approccio si basa sulla rilevazione nel siero di pazienti affetti da SEU di anticorpi contro il lipopolissaccaride (LPS), corrispondente all'antigene O, di *E. coli* circolanti nel siero del paziente utilizzando un test ELISA (15).

L'anticorpo sierico anti-LPS può persistere per diverse settimane, risultando di valore diagnostico. Tuttavia tale metodica presenta limitazioni: non esistendo kit commerciali il saggio viene effettuato solo in laboratori di riferimento, solitamente è utilizzato per determinare la presenza di un piccolo pannello di sierogruppi di *E. coli*, e in ultimo un risultato negativo potrebbe riflettere la tempistica di prelievo del campione.

Identificazione della presenza della Shiga Tossina libera nei campioni fecali

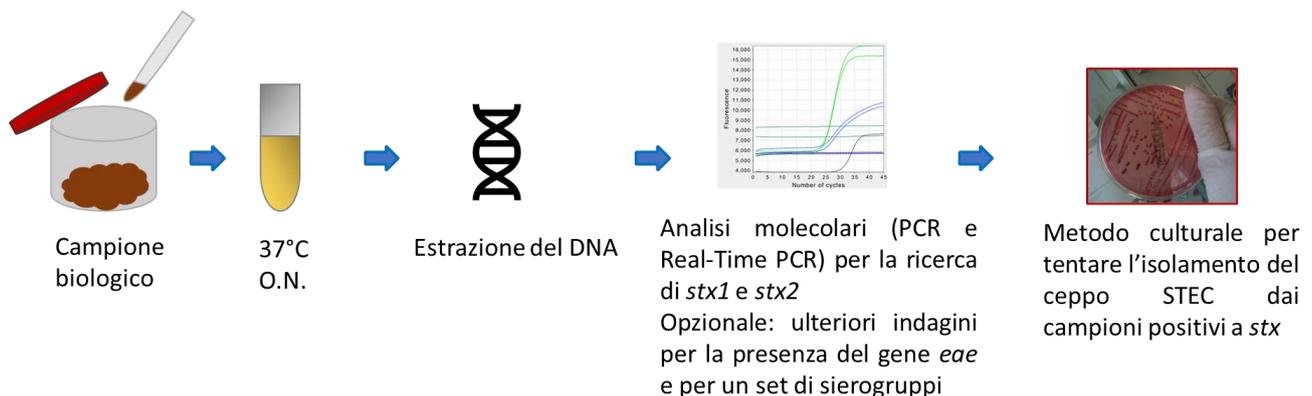
La rilevazione della Shiga tossina fecale libera permette di identificare l'infezione da STEC in assenza di isolamento STEC o di altre evidenze microbiologiche, molecolari o sierologiche. La tossina viene rilevata mediante l'osservazione del tipico effetto citopatico prodotto su monostrati di cellule Vero. Il test è molto sensibile e può rilevare la presenza della tossina fecale libera dopo che il batterio è stato eliminato a seguito, ad esempio, di un trattamento antibiotico.

L'uso di questo saggio richiede l'esperienza in biologia cellulare, nel riconoscimento della morfologia dell'effetto citopatico mediato da Stx e esperimenti di neutralizzazione con anticorpi anti-Stx1 e/o anti-Stx2 per confermare la specificità della citotossicità osservata (15). Per questi motivi, questo test viene eseguito solo da laboratori di riferimento.

Sicurezza in laboratorio

Gli *Escherichia coli* diarreegenici sono patogeni umani ed in particolare gli *E. coli* produttori di Shiga tossina sono in grado di causare malattia grave. Gli STEC sono inseriti nel 3° gruppo per rischio infettivo nell'allegato XLVI del D. Lgs. 9 Aprile 2008, n. 81 - Testo Unico sulla salute e sicurezza sul lavoro. La carica infettante per O157 è piuttosto bassa (≤ 50 microrganismi) e sono state descritte infezioni contratte in laboratorio. Pertanto, per la manipolazione di colture pure è raccomandato l'uso dei dispositivi di contenimento, e di protezione individuale, quali camice e guanti in lattice monouso, e utilizzo di cappe di biosicurezza per il contenimento degli agenti patogeni.

Workflow di elezione per la ricerca di STEC



L'immagine rappresenta il flusso di elezione per le indagini per la ricerca di STEC in campioni fecali o tamponi rettali (metodi disponibili sul sito web del Laboratorio Nazionale ed Europeo di Riferimento per *Escherichia coli*

<https://www.iss.it/en/vtec-laboratory-methods>)

Il campione biologico viene direttamente o più opportunamente in seguito arricchimento in un brodo nutritivo, sottoposto ad estrazione del DNA per le successive indagini molecolari, effettuate nei reparti di Microbiologia Clinica degli Ospedali. I sistemi molecolari per la diagnosi di STEC, sia sotto forma di kit commerciali che sistemi aperti di PCR convenzionali o PCR Real Time, mirano al rilevamento dei geni che codificano le *stx1* e *stx2*. Questi sistemi sono molto sensibili e sono da ritenersi il test di elezione, fornendo diagnosi rapide e contribuendo ad un approccio clinico-terapeutico più efficace e tempestivo. Un risultato negativo per la presenza di STEC (ovvero determinazione dei geni *stx*) ha un valore predittivo maggiore di un risultato negativo ottenuto mediante approccio unicamente microbiologico.

I campioni risultati positivi per la presenza dei geni *stx*, possono essere ulteriormente analizzati procedendo con metodi culturali per tentare l'isolamento del ceppo STEC, testando singole colonie di *E. coli* cresciute su piastra (ad es. MacConkey) per la presenza dei geni *stx*. Qualora il laboratorio di I livello non fosse equipaggiato per la fase di isolamento, il campione risultato positivo per STEC nella fase di screening può essere conferito a laboratori di II livello o al Laboratorio Nazionale di Riferimento per *E. coli* presso l'Istituto Superiore di Sanità, al fine di tentare l'isolamento del ceppo STEC e la sua ulteriore caratterizzazione (aspetto approfondito nel successivo Obiettivo Specifico).

Un risultato positivo per STEC ai test molecolari, anche in assenza di un ceppo isolato, e in presenza di sintomi compatibili con l'infezione, indica una evidenza di infezione da STEC.

Bibliografia

1. Nataro JP, Kaper JB. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev. 11:142–201.
2. Scheutz F, Nielsen EM, Frimodt-Møller J, Boisen N, Morabito S, Tozzoli R, Nataro JP, Caprioli A. Characteristics of the enteroaggregative Shiga toxin/verotoxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 strain causing the

- outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, May to June 2011. Euro Surveill. 2011 Jun 16;16(24):19889. doi: 10.2807/ese.16.24.19889-en
3. Nyholm O, Heinikainen S, Pelkonen S, Hallanvuo S, Haukka K, Siitonen A. 2015. Hybrids of Shigatoxigenic and Enterotoxigenic *Escherichia coli* (STEC/ETEC) Among Human and Animal Isolates in Finland. Zoonoses Public Health. 62(7):518-24.
 4. Mariani-Kurkdjian P, Lemaître C, Bidet P, Perez D, Boggini L, Kwon T, Bonacorsi S. Haemolytic-uraemic syndrome with bacteraemia caused by a new hybrid *Escherichia coli* pathotype. New Microbes New Infect. 2014 Jul;2(4):127-31. doi: 10.1002/nmi2.49. Epub 2014 May 27.
 5. Friedrich AW, Bielaszewska M, Zhang WL, et al (2002) *Escherichia coli* harboring Shiga toxin 2 gene variants: frequency and association with clinical symptoms. J Infect Dis 185 (1):74-84. doi:10.1086/338115
 6. Melton-Celsa, A.R. Shiga Toxin (Stx) Classification, Structure, and Function. Microbiol. Spectr. 2014, 2, EHEC-0024-2013
 7. EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2022. The European Union One Health 2021 Zoonoses Report. EFSA Journal 2022;20(12):7666, 273 pp.
 8. FAO/WHO, 2018. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and food: attribution, characterization, and monitoring. Microbiological Risk Assessment Series. Rome. Available online:<http://www.fao.org/3/ca0032en/CA0032EN.pdf>. Place
 9. EFSA BIOHAZ Panel, Koutsoumanis K, Allende A, Alvarez-Ordóñez A, Bover-Cid S, Chemaly M, Davies R, De Cesare A, Herman L, Hilbert F, Lindqvist R, Nauta M, Peixe L, Ru G, Simmons M, Skandamis P, Suffredini E, Jenkins C, Monteiro Pires S, Morabito S, Niskanen T, Scheutz F, da Silva Felício MT, Messens W and Bolton D, 2020. Scientific Opinion on the pathogenicity assessment of Shigatoxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the public health risk posed by contamination of food with STEC. EFSA Journal 2020;18(1):5967, 105 pp

10. Fraser, M.E.; Fujinaga, M.; Cherney, M.M.; Melton-Celsa, A.R.; Twiddy, E.M.; O'Brien, A.D.; James, M.N. Structure of shiga toxin type 2 (Stx2) from *Escherichia coli* O157:H7. *J. Biol. Chem.* 2004, 279, 27511–27517
11. Melton-Celsa AR, O'Brien AD (2014) New Therapeutic Developments against Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*. *Microbiol Spectr* 2 (5). doi:10.1128/microbiolspec.EHEC-0013-2013
12. Agger M, Scheutz F, Villumsen S, et al (2015) Antibiotic treatment of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) infection: a systematic review and a proposal. *J Antimicrob Chemother* 70 (9):2440-2446. doi:10.1093/jac/dkv162
13. Ardissino G, Tel F, Possenti I, et al (2016) Early Volume Expansion and Outcomes of Hemolytic Uremic Syndrome. *Pediatrics* 137 (1). doi:10.1542/peds.2015-2153
14. ISS- European Union Reference Laboratory for Escherichia coli- metodi analitici <https://www.iss.it/en/coli-metodi-analitici>
15. Morabito S, Minelli F, Tozzoli R. Integrated Approach for the Diagnosis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections in Humans. *Methods Mol Biol.* 2021;2291:1-17. doi: 10.1007/978-1-0716-1339-9_1.