

IL SUINO QUALE PORTATORE FARINGEO DI STIPITI DI *YERSINIA ENTEROCOLITICA* PATOGENI PER L'UOMO

THE ROLE OF PIGS AS PHARYNGEAL CARRIERS OF HUMAN PATHOGENIC YERSINIA ENTEROCOLITICA STRAINS

Bonardi S.¹, Paris A.¹, Salmi F.¹, Bacci C.¹, Floriani M.E.², Bignami S.², D'Incau M.³, Tagliabue S.³, Brindani F.¹

¹ Dipartimento di Salute Animale, Sezione di Ispezione degli Alimenti di origine animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Università di Parma

² Azienda USL di Mantova – Distretto Veterinario di Viadana

³ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Sede di Brescia

SUMMARY

From March 2007 to January 2008, a total of 170 pigs at slaughter were tested for *Y. enterocolitica* contamination in tonsils tissue. The animals came from 125 different farms located in four regions of Northern Italy. *Y. enterocolitica* was isolated from 19 out of 170 (11.2%) tonsils samples. The prevalent bio-serotype (68.4%) was 4/O:3, followed by bio-serotypes 1A/O:8 (15.8%), 1A/O:5 (10.5%) and 4/O:8 (5.2%). Among bio-serotype 4/O:3, several strains possessed *yadA*, *ail* and *ystA* virulence genes.

Key words

Yersinia enterocolitica, bio-serotypes, virulence genes, pig, tonsils.

INTRODUZIONE

Alla specie *Yersinia enterocolitica* appartengono microrganismi distribuiti nell'ecosistema acquatico e terrestre, la maggior parte dei quali sono considerati apatogeni e ubiquitari. Solo alcuni stipiti, provvisti di meccanismi di virulenza, sono patogeni per l'uomo, che generalmente contrae l'infezione mediante l'ingestione di acqua e alimenti contaminati. La yersiniosi umana è prevalentemente un'infezione del tratto gastroenterico, caratterizzata da enterite o enterocolite, talvolta complicata da linfadenite acuta meseraica o da ileite terminale, che in alcuni soggetti può evolvere in forma setticemica (1).

L'eterogeneità della specie si riflette anche in differenze di tipo biochimico, sulle cui basi si sono individuati 6 biotipi (1A, 1B, 2, 3, 4, 5) con diverso significato clinico ed epidemiologico (2). Al biotipo 1A appartengono ceppi un tempo ritenuti non patogeni,

ma attualmente considerati patogeni opportunisti (3). I restanti biotipi comprendono microrganismi patogeni per uomo e animali, isolati nel corso di manifestazioni gastro-enteriche o loro complicanze. Dal punto di vista sierologico, *Y. enterocolitica* viene suddivisa in sierogruppi sulla base dell'antigene somatico O. La maggior parte delle infezioni umane è sostenuta da stipiti appartenenti ai sierogruppi O:3, O:9 e O:5,27 e O:8 (1). Molto importante per la classificazione degli stipiti patogeni per l'uomo è quindi la distinzione in bio-serotipi, sulla base dell'appartenenza di un ceppo ad un biotipo e ad un gruppo sierologico. Secondo dati attendibili, la maggior parte delle infezioni umane è sostenuta dai bio-serotipi 2/O:9, 3/O:9, 3/O:5,27, 4/O:3 e 1B/O:8 (1, 4, 5).

I fattori di virulenza di *Y. enterocolitica* possono essere espressi da geni a localizzazione plasmidica o cromosomiale. Il gene plasmidico *yadA* codifica la proteina di natura fibrillare YadA (*Yersinia adhe-*

sin A) (6) che promuove il legame del batterio a cellule epiteliali della mucosa intestinale (7) e fagociti (8), nonché a numerose proteine della matrice extracellulare, favorendo la colonizzazione di diversi tessuti (9). Inoltre, alla proteina YadA si deve la resistenza all'attività battericida del siero (10). Tra i fattori di virulenza cromosomici vale la pena ricordare la proteina di membrana Invasina, codificata dal gene *inv*, responsabile del legame alle cellule M e della conseguente colonizzazione delle placche del Peyer (9). Pure importante è la proteina AiL (attachment/invasion Locus), codificata dal gene *ail*, che consente al batterio di raggiungere e penetrare le cellule M (11), di legarsi ai leucociti circolanti facilitando la diffusione ai linfonodi regionali, fegato e milza (12) e di coadiuvare i fattori plasmidici nell'aumentare la resistenza al siero (13). Infine, va citata l'enterotossina termostabile Yst (*Yersinia stable toxin*), codificata dal gene *yst* (14), di cui sono note alcune varianti: YstA, caratteristica degli stipiti patogeni, YstB e YstC (15, 16).

Data l'importanza della specie suina nel ciclo epidemiologico della yersiniosi, e considerato il tropismo del germe per il tessuto linfatico, nella presente indagine si è voluto studiare il ruolo del suino quale portatore faringeo di stipiti di *Y. enterocolitica* patogeni per l'uomo.

MATERIALI E METODI

Nel periodo Marzo 2007 - Gennaio 2008 sono stati analizzati 170 campioni di amigdale prelevate da altrettanti suini macellati in due stabilimenti della provincia di Mantova. Gli animali provenivano da 125 allevamenti, ubicati in 20 province delle regioni Lombardia, Emilia-Romagna, Veneto e Piemonte.

I campioni, posti in contenitori sterili, sono stati mantenuti a temperatura di refrigerazione ed analizzati il giorno stesso del prelievo.

Per l'isolamento di *Y. enterocolitica*, 10 g di tessuto tonsillare sono stati diluiti in 90 ml di *Yersinia* PBS Broth (Biolife) e un'aliquota di 10 l è stata seminata direttamente su piastre di *Yersinia* Selective Agar addizionato di Cefsulodin, Irgasan e Novobiocina (*Yersinia* CIN Agar, Biolife). Le brodoculture sono state conservate per 5 settimane ad una temperatura di 5 °C ± 3 °C e, con cadenza settimanale (7°, 14°, 21°, 28° giorno), si è ripetuta la semina su *Yersinia* CIN Agar. Dopo incubazione delle piastre a 30 °C per 48 ore, le colonie caratteristiche sono state sottoposte a prove biochimico-sierologiche di conferma. Per l'identificazione di specie è stato utiliz-

zato il sistema miniaturizzato API 20E ® (bioMérieux), mentre la suddivisione in sierogruppi è stata realizzata mediante sieroaagglutinazione rapida (*Yersinia enterocolitica* Antiseri Set, Denka Seiken). L'identificazione dei biotipi è stata effettuata seguendo il protocollo di Bottone (1).

Le indagini molecolari sono state finalizzate alla ricerca dei geni *yadA*, *ail*, *inv*, *ystA* e *ystB*, associati alla virulenza. A tale scopo, dai ceppi di *Y. enterocolitica*, dopo incubazione in Tryptone Soya Broth (TSB, Oxoid) a 30 °C per 24 ore, è stato estratto il DNA genomico mediante l'impiego della resina chelante Chelex 6% (IstaGene™ Matrix – BIO RAD).

Per l'amplificazione del gene plasmidico *yadA* (238 bp) e di quello cromosomico *ail* (315 bp) è stata condotta una simplex-PCR seguendo i protocolli di Blais e Phillippe (17) e Thoerner *et al.* (18), rispettivamente. L'amplificazione dei geni cromosomici *inv* (183 bp), *ystA* (79 bp) e *ystB* (146 bp) è stata ottenuta applicando una multiplex-PCR (18).

Gli ampliconi sono stati risolti mediante agar gel-elettroforesi e colorazione con etidio bromuro, utilizzando un gel di agarosio all' 1,2% per il gene *yadA* e al 2,5% per le altre sequenze.

RISULTATI

Come illustrato nella tabella 1, 19 campioni di amigdale su 170 (11,2%) sono risultati contaminati da *Y. enterocolitica*. I soggetti positivi provenivano da 19 allevamenti diversi, ubicati in provincia di Mantova, Brescia, Reggio Emilia, Verona, Parma e Cuneo. L'isolamento dei ceppi di *Y. enterocolitica* non ha fatto registrare variazioni stagionali.

Per quanto riguarda la distribuzione dei bio-sierotipi, la maggior parte degli stipiti apparteneva al sierogruppo O:3 biotipo 4 (13 su 19, pari al 68,4%), mentre il 15,8 % (3/19) apparteneva al bio-sierotipo 1A/O:8, il 10,5% (2/19) al bio-sierotipo 1A/O:5 e solo il 5,2% (1/19) al bio-sierotipo 4/O:8.

Varia è apparsa la distribuzione dei geni associati alla virulenza, con prevalenza, all'interno del bio-sierotipo 4/O:3, di stipiti positivi per entrambi i geni *ail* e *ystA* e di ceppi positivi per le tre sequenze *yadA*, *ail* e *ystA*.

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

I risultati della presente indagine sottolineano l'importanza del suino quale serbatoio di stipiti di *Y. enterocolitica* patogeni per l'uomo. Il legame tra l'animale serbatoio e l'infezione umana è principal-

N° ceppi di <i>Y. enterocolitica</i>	Bio-sierotipi	Geni di virulenza	
13	4/O:3	1 1 5 5 1	<i>ystA</i> <i>yadA, ystA</i> <i>ail, ystA</i> <i>yadA, ail, ystA</i> <i>ail, ystA, ystB</i>
1	4/O:8	1	<i>ail, ystA</i>
2	1A/O:5	1 1	<i>inv, ystB</i> <i>inv, ystA, ystB</i>
3	1A/O:8	1 1 1	<i>yadA</i> <i>ystB</i> <i>yadA, inv, ystB</i>

Tabella 1: Distribuzione di geni associati alla virulenza nei bio-sierotipi di *Y. enterocolitica* isolati dalle amigdale di suini macellati.

mente dovuto all'ingestione di carne suina cruda o poco cotta (3). Dato che nel suino gli stipiti patogeni di *Y. enterocolitica* vengono isolati prevalentemente a livello tonsillare (19) e solo in misura minore dal contenuto intestinale, le tonsille rappresentano la principale fonte di contaminazione per le carcasse (20). Le fasi critiche del processo di macellazione sono pertanto rappresentate dall'escissione della lingua e delle tonsille, dalle operazioni di disosso della testa e dall'eviscerazione (21). Nello studio attuale la prevalenza di suini portatori di *Y. enterocolitica* a livello tonsillare (11,2%) è apparsa inferiore al 14,7% riscontrato in un'indagine svolta negli anni 1999-2000 (22).

La prevalenza, tra gli stipiti di *Y. enterocolitica*, del bio-sierotipo patogeno 4/O:3 conferma la sua elevata diffusione nella popolazione suina ed il tramite che questa svolge nell'epidemiologia dell'infezione umana (23). I fattori genetici legati alla virulenza di *Y. enterocolitica* hanno presentato una certa variabilità all'interno dei bio-sierotipi. Un dato importante, a nostro parere, è la presenza di geni di patogenicità nei ceppi del biotipo 1A, il cui potere patogeno andrebbe quindi valutato sulla base di appropriati studi genomici.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Bottone E. J. (1999). *Yersinia enterocolitica*: overview and epidemiologic correlates. *Microb. Infect.* **1**, 323-333.
- 2) Wauters G., Kandolo K., Janssens M. (1987). Revised biogrouping scheme of *Yersinia enterocolitica*. *Contrib. Microbiol. Immunol.* **9**, 14-21.
- 3) Bottone E. J. (1997). *Yersinia enterocolitica*: the charisma continues. *Clin. Microbiol. Rev.* **10**, 257-276.
- 4) Prentice M.B., Cope D., Swann R.A. (1991). The epidemiology of *Yersinia enterocolitica* infection in the British Isles 1983-1988. *Contrib. Microbiol. Immunol.* **12**, 17-25.
- 5) McNally A., Cheasty T., Fearnley C., Dalziel R.W., Paiba G.A., Manning G., Newell D.G. (2004). Comparison of the biotypes of *Yersinia enterocolitica* isolated from pigs, cattle and sheep at slaughter and from humans with yersiniosis in Great Britain during 1999-2000. *Lett. Appl. Microbiol.* **39**, 103-108.
- 6) Cornelis G. R., Boland A., Boyd A. P., Geuijen C., Iriarte M., Neyt C., Sory M. P., Stainier I. (1998). The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**, 1315-1352.
- 7) Paerregaard A., Espersen F., Jensen O.M., Skurnik M. (1991). Interactions between *Yersinia enterocolitica* and rabbit ileal mucus: growth, adhesion, penetration, and subsequent changes in surface hydrophobicity and ability to adhere to ileal brush border membrane vesicles. *Infect. Immun.*, **59**, 253-260.
- 8) Ruckdeschel, K., Roggenkamp A., Schubert S., Heesemann J. (1996). Differential contribution of *Yersinia enterocolitica* virulence factors to evasion of microbicidal action of neutrophils. *Infect. Immun.* **64**, 724-733.
- 9) Clark M. A., Hirst B. H., Jepson M. A. (1998). M-cell surface 1 integrin expression and invasin-mediated targeting of *Yersinia pseudotuberculosis* to mouse Peyer's patch

- M cells. *Infect. Immun.* **66**, 1237–1243.
- 10) China B., Sory M. P., N'Guyen B. T., de Bruyere M., Cornelis G. R. (1993). Role of the YadA protein in prevention of opsonization of *Yersinia enterocolitica* by C3b molecules. *Infect. Immun.* **61**, 3129–3136.
- 11) Grutzkau A., Hanski C., Naumann M. (1993). Comparative study of histopathological alterations during intestinal infection of mice with pathogenic and non-pathogenic strains of *Yersinia enterocolitica* serotype O:8. *Virchows Arch. A Pathol. Anat. Histopathol.* **423**, 97-103.
- 12) Iriarte M., Cornelis G. R. (1999). The 70-kilobase virulence plasmid of yersiniae. In: Pathogenicity islands and other mobile virulence elements. J. B. Kaper and J. Hacker (Eds.). ASM Press, Washington, D.C. pp. 91-126.
- 13) Bliska J. B., Falkow S. (1992). Bacterial resistance to complement killing mediated by the Ail protein of *Yersinia enterocolitica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**, 3561–3565.
- 14) Delor I., Kaeckenbeek A., Wauters G., Cornelis G. R. (1990). Nucleotide sequence of *yst*, the *Yersinia enterocolitica* gene encoding the heat-stable enterotoxin, and prevalence of the gene among pathogenic and non-pathogenic *Yersiniae*. *Infect. Immun.* **58**, 2983-2988.
- 15) Ramamurthy T., Yoshino K., Huang X., Balakrish Nair G., Carniel E., Maruyama T., Fukushima H., Takeda T. (1997). The novel heatstable enterotoxin subtype gene (*ystB*) of *Yersinia enterocolitica*: nucleotide sequence and distribution of the *yst* genes. *Microb. Pathog.* **23**, 189–200.
- 16) Singh I., Virdi J. S. (2004). Production of *Yersinia* stable toxin (YST) and distribution of *yst* genes in biotype 1A strains of *Yersinia enterocolitica*. *J. Med. Microbiol.* **53**, 1065–1068.
- 17) Blais B.W., Phillippe L.M. (1995). Comparative analysis of *yadA* and *ail* polymerase chain reaction methods for virulent *Yersinia enterocolitica*. *Food Control.* **6**, 211-214.
- 18) Thoerner P., Bin Kingombe C.I., Bögli-Stuber K., Bisig-Choisat B., Wassenaar T.M., Frey J., Jemmi T. (2003). PCR detection of virulence genes in *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* and investigation of virulence gene distribution. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 1810-1816.
- 19) Fredriksson-Ahomaa M., Niskanen T., Bucher M., Korte T., Stolle A., Korkeala H. (2003). Different *Yersinia enterocolitica* 4:O3 genotypes found in pig tonsils in Southern Germany and Finland. *Syst. Appl. Microbiol.* **26**, 132-137.
- 20) Thibodeau V., Frost E. H., Chénier S., Quessy S. (1999). Presence of *Yersinia enterocolitica* in tissues of orally inoculated pigs and the tonsils and feces of pigs at slaughter. *Can. J. Vet. Res.* **63**, 96-100.
- 21) Kapperud G. (1991). *Yersinia enterocolitica* in food hygiene. *Int. J. Food Microbiol.* **12**, 53-66.
- 22) Bonardi S., Brindani F., Pizzin G., Lucidi L., D'Incau M., Liebana E., Morabito S. (2003). Detection of *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* spp. and Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in pigs at slaughter in Italy. *Int. J. Food Microbiol.* **85**, (1-2), 101-110.
- 23) Ostroff S. (1995). *Yersinia* as an emerging infection: epidemiologic aspects of yersiniosis. *Contrib. Microbiol. Immunol.* **13**, 5-10.