

# EPISODI DI MORTALITÀ DETERMINATI DA *E. COLI* NEL CAPRIOLO NELL'APPENNINO SETTENTRIONALE

Guberti V.\*, Battisti A.\*\*\*, De Marco M. A.\*, Morabito S.#, Delogu M.^, Di Guardo G.\*\*\*, Buccella C.\*\*\*, Lavazza A.§, Raganella Pelliccioni E.\*

\* Istituto Nazionale per la Fauna Selvatica, Ozzano Emilia (BO)

\*\* Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, Roma

# Istituto Superiore di Sanità, Laboratorio di Veterinaria, Roma

^ Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Ozzano Emilia (BO).

§ Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia, Brescia.

**Riassunto** - Viene descritta un'epidemia di *E. coli* enteropatogeni (EPEC) in una metapopolazione di Capriolo dell'Appennino settentrionale (Fo). La metapopolazione censita era di 132 animali di cui 40 muniti di radiocollare. La morbilità negli animali radiocollari è stata del 12.5% (DS 5.2%), la letalità del 80% (DS 18%) e la mortalità del 10% (DS 4.7%). Il batterio responsabile dell'infezione è stato classificato come *E. coli* (EPEC) 0:74. Vengono descritte le principali lesioni anatomo-patologiche e i sintomi clinici registrati negli animali infetti.

**Abstract** - 0:74 *Escherichia coli* epidemic in a Roe deer metapopulation of the Northern Apennines, Italy. An epidemic of enteropathogenic (EPEC) *E. coli* in a free living metapopulation of Roe deer *Capreolus capreolus* of the Northern Apennines (Italy) is described. 40 out of the 132 censued animals were radiocollared. In the radiocollared animals the infection resulted in a morbidity of 12.5% (SD 5.2%), with a lethality of 80% (SD 18%) and the whole mortality reached 10% (SD 4.7%). The *E. coli* responsible of the infection was classified as 0:74. The pathological lesions and some clinical features of the infection are described.

J. Mt. Ecol., 7 (Suppl.): 283- 286

## 1. Introduzione

All'inizio del 1998, in una sub-popolazione di Capriolo (*Capreolus capreolus*) dell'Appennino Forlivese, costituita da 132 soggetti (censiti), 40 dei quali provvisti di radiocollare, sono stati osservati casi di diarrea con conseguente emaciazione e morte di una parte dei soggetti con sintomatologia. La malattia, nella subpopolazione radiocollata, ha evidenziato una morbilità stimata del 12.5%+5.2, una letalità dell'80%+18 ed una mortalità totale del 10%+4.7.

L'infezione è apparsa in modo epidemico nell'area di studio, senza alcuna segnalazione di malattia delle popolazioni di capriolo limitrofe. Tale evenienza fa supporre che l'iniziale serbatoio epidemiologico fosse rappresentato da altre specie simpatriche. Allo stato attuale non è stato possibile operare un soddisfacente campionamento sulle specie domestiche nell'area di studio, né si è venuti a conoscenza di eventuali casi di mortalità riferibili ad enterite. I soggetti malati presentavano cattive condizioni fisiche, marcata diarrea rilevabile a distanza (imbrattamento della regione perineale e delle aree mediali delle cosce), notevole riduzione dell'home range, ottundimento del sensorio prima dell'*exitus*, che occorreva in circa 7-10

giorni dall'apparire della sintomatologia rilevabile a distanza.

## 2. Materiali e metodi

Sono stati eseguiti esami anatomopatologici sui soggetti rinvenuti morti e su quelli macellati in seguito ad abbattimento. Porzioni rappresentative di vari distretti di intestino tenue e crasso sono state sottoposte ad esami colturali per agenti batterici, virali, micotici e per accertamenti di microscopia elettronica. Strisci di materiale intestinale sono stati preparati per l'osservazione a fresco e per colorazione di Ziehl Neelsen per *Mycobacterium* spp.. Analoghe porzioni sono state fissate in formalina tamponata al 10% e successivamente incluse in paraffina per gli esami istologici. Per gli esami batteriologici sono state eseguite colture e colture di arricchimento rispettivamente per *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Yersinia* spp., *Campylobacter* spp. Da pool di colonie di *E. coli* è stata effettuata la ricerca del gene *eae* mediante Polymerase Chain Reaction (PCR) (Schmidt *et al.*, 1994b), il test di tossicità su cellule Vero (Giammanco *et al.*, 1996). La ricerca del gene *eae* mediante PCR stata ripetuta da singole colonie isolate in purezza a partire dai pool positivi.

### 3. Risultati e discussione

All'esame autoptico, gli animali mostravano i caratteristici segni di cachessia, disidratazione e totale assenza di depositi adiposi, ed enterite catarrale come unico rilievo anatomo-patologico. Istologicamente si osservava atrofia, erosione e necrosi dei villi intestinali, talvolta con evidenti fenomeni di fusione apicale. Nella tonaca propria si osservava frequentemente un diffuso infiltrato di cellule infiammatorie mononucleate.

Gli esami culturali eseguiti a partire da tratti di intestino tenue ed intestino crasso di 10 soggetti rinvenuti morti e che presentavano diarrea prima del decesso e di 2 soggetti apparentemente sani sono esposti in Tabella 1.

In particolare, in 4 soggetti con diarrea sono stati isolati stipti di *Y. enterocolitica*. Uno stipte tra questi è stato finora identificato come sierotipo O:8.

A partire da colture primarie di *E. coli* da intestino tenue e da intestino crasso di 4 soggetti con diarrea sono stati individuate sequenze relative al gene cromosomale *eae*. Tale gene, che codifica per una proteina di membrana responsabile del fenomeno di "attaching and effacing" a carico dei microvilli degli enterociti (Yu e Kaper, 1992), è tipico di ceppi di *E. coli*

enteropatogeni (EPEC) e di *E. coli* enteroemorragici (EHEC). I successivi saggi di tali stipti per la produzione di verotossine (VTs) ha dato esito negativo, per cui essi sono da ritenersi EPEC. Uno di questi stipti è stato sierologicamente identificato come O:74.

L'adesione di EPEC alla parete del piccolo e grosso intestino produce una lesione definita "AE lesion". Tale tipo di lesione è nota per essere costantemente associata, anche in studi su modelli animali, a piena virulenza degli stipti di *E. coli* in grado di determinarla. Essa consiste in un'iniziale distruzione dei microvilli dell'enterocita, seguita spesso da una modificazione della morfologia della membrana cellulare (che accoglie i singoli batteri in una tipica struttura pendente a forma di coppa) e della struttura del citoscheletro al di sotto dell'area di adesione (Ulshen & Rollo, 1980; Rothbaum *et al.*, 1982). I meccanismi fisiopatologici successivi alla colonizzazione intestinale da parte di EPEC e che conducono all'abnorme secrezione di fluidi ed alla diarrea, non sono ancora del tutto chiari. La fosforilazione di proteine del citoscheletro e l'aumento di ioni calcio intracellulari (Donnenberg & Kaper, 1992) potrebbero influenzare la permeabilità intestinale. La soffe-

**Tab. 1** - Esiti delle indagini microbiologiche eseguite su 12 caprioli dell'Appennino Forlivese

Capriolo	Sesso	Classe/età	Località	Data	Note	Esito microbiologico
T56	F	II/19 mesi	Tredozio (FO)	21/01/98	diarrea	<i>E. coli eae</i> <i>Y. enterocolitica</i>
T 57	M	II/3-4 anni	Tredozio (FO)	21/01/98	no diarrea, predato	negativo
T 58	F	II/ 3-4 anni	Tredozio (FO)	31/01/98	diarrea, cahettico	<i>E. coli eae</i> <i>Y. enterocolitica</i>
ATC	M	III	Modigliana (FO)	21/01/98	diarrea	negativo
T 53	F	III/8-9 anni	Dovadola (FO)	16/01/98	diarrea	<i>E. coli eae</i> <i>Y. enterocolitica</i>
A 105	F	II	Tredozio	07/02/98	diarrea	negativo
F 29	F	II	Tredozio	06/02/98	diarrea	negativo
T 66	F	II	Tredozio	06/02/98	diarrea	negativo
T 61	M	II	Tredozio	27/01/98	diarrea	<i>E. coli eae</i> <i>Y. Enterocolitica</i>
T 65	M	III	Tredozio	06/02/98	no diarrea	Negativo
T 51	M	nd	Tredozio	04/01/98	diarrea	Negativo
T 52	M	I	Tredozio	08/01/98	diarrea	Negativo

nd = non determinata; Classe I = 7-19 mesi; Classe II = >19 mesi-6-7 anni; Classe III = >7 anni.

renza cellulare e la perdita di superficie assorbente da parte degli enterociti, potrebbero in parte spiegare la persistenza della diarrea.

Nel corso delle osservazioni finora condotte su tale popolazione di caprioli, da altri 3 soggetti su 10 con diarrea e da 1 soggetto su 2 senza sintomi è stata rilevata la presenza di *E. coli* produttori di verotossine (VTEC). Le verotossine (VTs), distinte in almeno due forme principali, VT1 e VT2, sono proteine ad azione citotossica che inibiscono la sintesi proteica delle cellule eucariote. Sono simili per sequenze aminoacidiche e per meccanismo di azione alle Shiga toxins (STs) prodotte da *Shigella dysenteriae*, e perciò attualmente vengono anche definite come Shiga-like toxins (SLT1 ed SLT2). Sono codificate da geni presenti in batteriofagi temperati. E' però noto come la produzione di VTs o la presenza di sequenze geniche codificanti per esse in stipiti di *E. coli* non è condizione sufficiente perchè i suddetti siano annoverati tra gli agenti patogeni per gli animali e per l'Uomo. Infatti, stipiti VTEC sono frequentemente presenti tra le popolazione intestinali di *E. coli* di individui sani. A tale proposito, Patton *et al.* (1993) hanno rinvenuto sequenze codificanti per VT nel 50% circa di bambini apparentemente in buono stato di salute.

E' evidente che la produzione di VT è da considerarsi un indicatore di patogenicità solo se associato alla presenza di uno o più fattori di virulenza (Karch *et al.*, 1987; Schmidt *et al.*, 1994a).

Per poter esplicitare azione di patogenicità (enteriti emorragiche e sequele come la Haemolytic Uremic Syndrome, HUS) è quindi necessario che gli stipiti VTEC possiedano almeno fattori di adesione (Fig. 1). Gli stipiti di questa particolare subpopolazione, provvisti almeno di fattore di adesione e produttori di VTs, sono generalmente definiti enterohaemorrhagic *E. coli*.

A tale proposito è significativo il riscontro in 4 caprioli di stipiti di *E. coli* positivi per il gene *eae*, e quindi in possesso di un fattore di adesione, tutti mancanti della capacità di produrre VTs. Gli unici ceppi di *E. coli* produttori di VTs riscontrati in altri 4 caprioli sui 12 esaminati mancavano invece di fattori di adesione, e quindi non possono essere considerati potenzialmente patogeni. In sostanza, sono stati riscontrati EPEC soltanto in soggetti negativi per VTEC.

La proporzione di caprioli positivi per VTEC (4/12) e per EPEC (4/12) tra quelli oggetto di questa nota potrebbe derivare dalla presenza di analoghi stipiti nella locale popolazione di bovini ed ovini, con i quali i primi condividono, per alcuni periodi dell'anno, aree di pascolo. A tale proposito, su 4 campioni di feci di bovini al pascolo in queste aree, 3 erano positivi per VTEC. Sono già state descritte, del resto, prevalenze significative di VTEC in varie popolazioni di bovini ed ovini in assenza di sintomi (Sidjabat-Tambunan & Bensik, 1997).

#### 4. Conclusioni

Le ricerche finora condotte e l'acquisizione di dati preliminari, che indicherebbero almeno l'esclusione di vari agenti patogeni per l'apparato intestinale ed il possibile coinvolgimento di altri, spingono ad approfondire lo studio di tale popolazione dal punto di vista sanitario.

Resta da determinare:

*i.* in quale misura gli stipiti EPEC rinvenuti nella locale popolazione di capriolo siano responsabili, da soli od in associazione ad altri agenti patogeni, del corredo sintomatologico osservato. Infatti in 2 soggetti su 4 positivi per EPEC è stata rinvenuta la contemporanea presenza di ceppi *Y. enterocolitica*. Tale specie batterica è infatti in grado di provocare focolai di enterite nei cervidi (Wilson, 1993). E' tuttavia

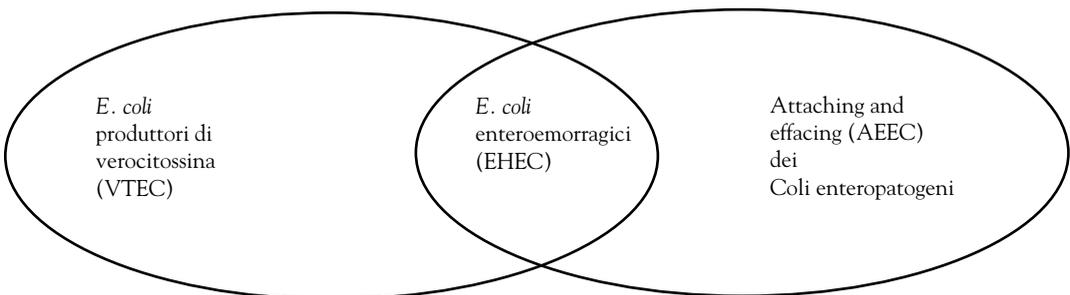


Fig. 1 – rappresentazione schematica di alcune popolazioni di *E. coli* riscontrabili negli animali e nell'uomo

necessario ricercare la presenza di fattori di patogenicità negli stiptiti in questione per poter meglio valutare un loro eventuale ruolo nella malattia;

ii. più in generale, quale interazione esiste tra le locali popolazioni di ruminanti domestici e il capriolo e quale comunione o interscambio di microparassiti intercorra tra esse.

Allo stato delle conoscenze finora acquisite, il fenomeno morboso osservato sembra essere un problema prettamente di Sanità animale. Non si ravvisano infatti, per le ragioni suesposte, un rischio di salute pubblica maggiore che in altre aree in cui esiste l'interazione uomo-capriolo, o più estensivamente, l'interazione uomo-ruminanti, siano essi domestici o selvatici.

Per ottenere un quadro più dettagliato sull'eziologia, la patogenesi, l'epidemiologia di questa sindrome morbosa, è necessario ottenere informazioni più dettagliate sul campo, relativamente alla struttura di popolazione, ai gruppi di età colpiti, alla morbilità, alla durata della malattia, alla letalità, all'interazione tra questa specie e quelle domestiche. Questo è il presupposto per includere nello studio un numero più significativo di individui malati e sani, in modo tale da che si possa concorrere a chiarire il problema.

E' quindi auspicabile che tale approfondimento venga condotto attraverso un'adeguata integrazione delle competenze tra specialisti in materia di gestione sanitaria della fauna selvatica e quanti sono deputati alla gestione sanitaria di specie domestiche.

### Bibliografia

DONNENBERG M. S. & KAPER J. B. (1992) - Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 60: 3953-3961.

GIAMMANCO A., MAGGIO M., GIAMMANCO G., MORELLI R., MINELLI F., SCHEUTZ F. & CAPRIOLI A. (1996) - Characteristics of *Escherichia coli* strains belonging to enteropathogenic *E. coli* serogroups

isolated in Italy from children with diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology*, 34:689-694.

KARCH H., HEESEMANN J. & LAUFS R. (1987) - A plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O:157:H7 is required for the expression of a new fimbrial antigen and for the adhesion to epithelial cells. *Infection and Immunity*, 55:455-461.

PATTON A., PATON J. C., GOLDWATER P. N. & MANNING P. A. (1993) - Direct detection of *Escherichia coli* Shiga-like toxin genes in primary fecal cultures by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 31:3063-3067.

ROTHBAUM R., MCADAMS A. J., GIANELLA R. & PARTIN J.C. (1982) - A clinicopathological study of enterocyte-adherent *Escherichia coli*: a cause of protracted diarrhea in infants. *Gastroenterology*, 83, 441-454.

SCHMIDT H., KARCH H. & BEUTIN L. (1994a) - The large-sized plasmids of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O:157 strains encode hemolysins which are presumably members of the *E. coli* alpha-hemolysin family. *FEMS Microbiology Letter*, 117:189-196.

SCHMIDT H., PLASCHKE B., FRANKE S., RUSSMANN H., SCHWARZKOPF A., HEESEMANN J. & KARCH H. (1994b) - Differentiation in virulence patterns of *Escherichia coli* possessing the *eae* gene. *Medical Microbiology and Immunology*, 183:23-31.

SIDJABAT-TAMBUNAN H. & BENSINK J. C. (1997) - Verotoxin-producing *Escherichia coli* from the faeces of sheep, calves and pigs. *Australian Veterinary Journal*, 75, 292-293.

ULSHEN M. H. & ROLLO J. L. (1980) - Pathogenesis of *Escherichia coli* gastroenteritis in man - another mechanism. *New England Journal of Medicine*, 302:99-101.

WILSON P. R. (1993) - Management and diseases of farmed *cervidae* and other ungulates. In: Office International des Epizooties. *Comprehensive reports on technical items presented to the International Committee or to Regional Commissions*, p. 199-216.

YU J. E. & KAPER J. B. (1992) - Cloning and characterization of the *eae* gene of the enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O:157:H7. *Molecular Microbiology*, 6:411-417.