

INTRODUZIONE E SCOPO

Escherichia coli è una specie batterica in grado di causare diarrea nelle infezioni gastrointestinali. Il 4-10% dei soggetti della popolazione sono portatori sani di ceppi enteropatogeni. La maggior parte dei ceppi è considerata commensale/mutualistica mentre alcuni ceppi, invece, possiedono caratteristiche di virulenza che li rendono patogeni, determinando infezioni a principale interessamento intestinale. Sulla base di differenze sierologiche, epidemiologiche e patologiche si distinguono sette gruppi principali di E. Coli anche se i più diffusi sono: E. Coli Enterotossici (ETEC), che colpiscono bambini e turisti nelle zone meno sviluppate nel mondo; E. Coli Enteroinvasivi (EIEC), che possono provocare dissenteria e febbre; E. Coli Enteropatogeni (EPEC) causa di diarrea liquida a volte con perdita di sangue, una delle principali forme di diarrea infantile nei paesi in via di sviluppo; E. Coli Enteroemorragici (EHEC) che possono provocare diarrea emorragica e sindrome uremico-emolitica; E. Coli Enteroaggreganti (EAEC) provoca diarrea sia nei bambini che negli adulti immunodepressi o provenienti da paesi in via di sviluppo. La ricerca di E. Coli avviene, in generale, soltanto dietro specifiche indicazioni del clinico rispetto alla ricerca di altri agenti patogeni responsabili di gastroenteriti infettive per i quali, invece, non vi sono comportamenti univoci da parte dei laboratori, alcuni li cercano di routine, altri dietro richiesta e altri ancora secondo altri criteri clinici. Le metodiche diagnostiche basate su sistemi molecolari multiplex consentono di individuare contemporaneamente, i principali ceppi di E. Coli enteropatogeni responsabili delle sintomatologie cliniche più gravi direttamente da tamponi fecali, indirizzando il clinico verso la più appropriata e tempestiva scelta terapeutica. Nel presente studio sono stati confrontati i percorsi diagnostici costruiti su test tradizionali ed analisi di biologia molecolare in termini di risultati, tempi di risposta, tempi di esecuzione e tracciabilità automatizzata del percorso analitico.

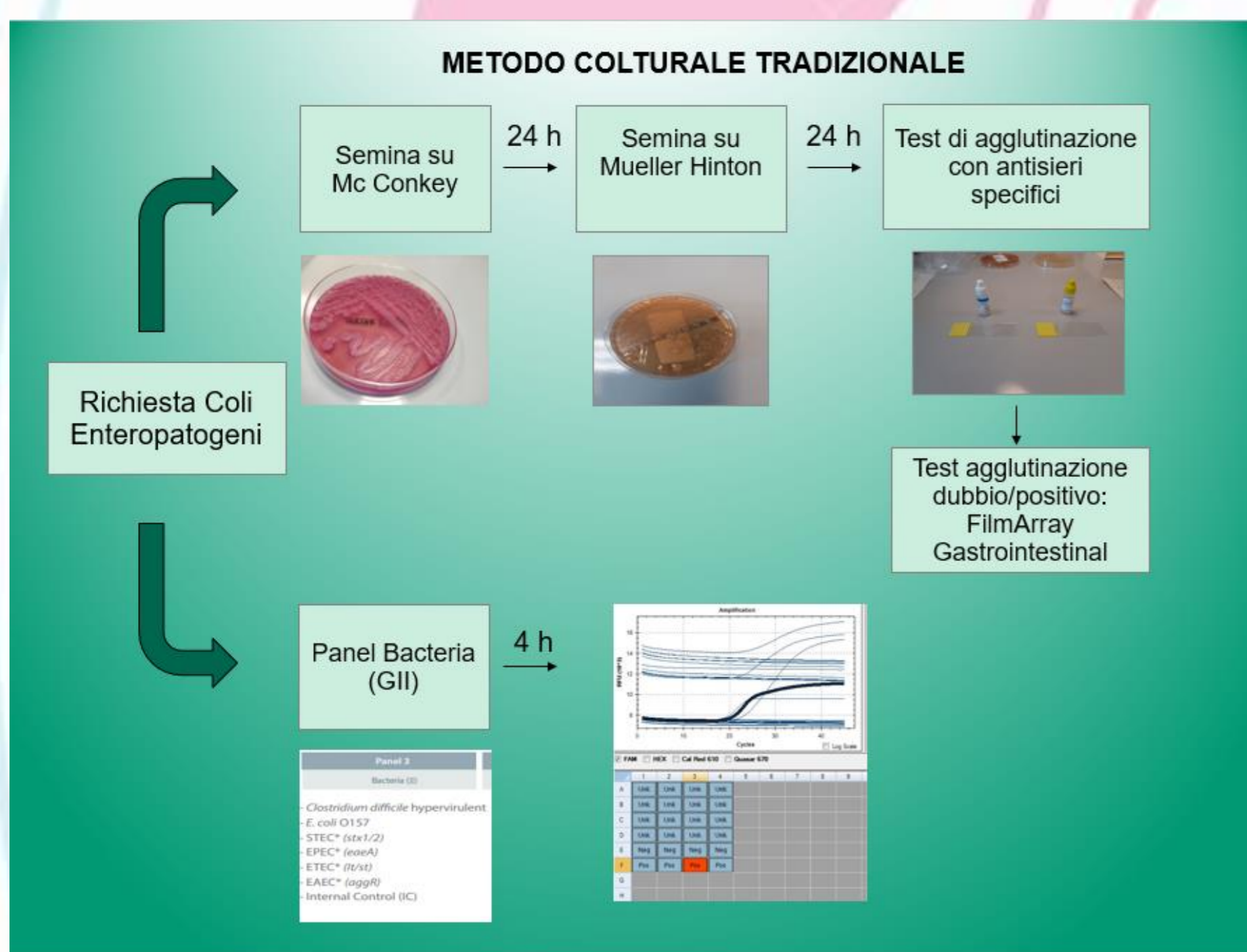


Fig.1 Metodo di analisi tradizionale per ricerca dei ceppi di E.Coli enteropatogeni

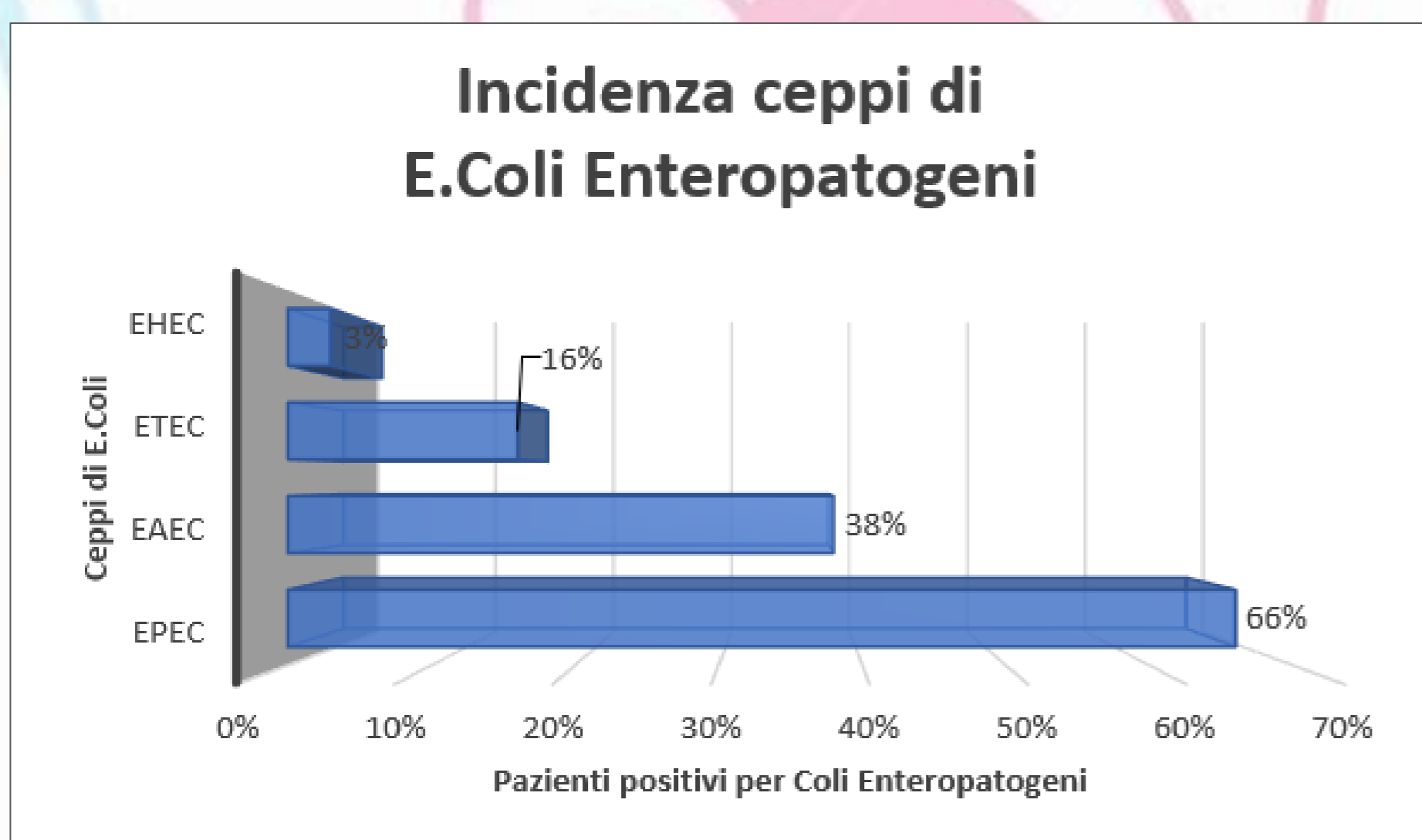


Fig.2 Incidenza espressa in percentuale dei diversi ceppi di E.Coli enteropatogeni

400 TAMPONI FECALI (Marzo 2022-Dicembre 2022)	PCR MULTIPLEX		
	POS	NEG	TOTALE
METODO TRADIZIONALE	128	24	152
METODO TRADIZIONALE	32	216	248
TOTALE	160	240	400

Fig.3 Tabella di contingenza frequenza assoluta

400 TAMPONI FECALI (Marzo 2022-Dicembre 2022)	PCR MULTIPLEX	
	POS	NEG
METODO TRADIZIONALE	80%	10%
METODO TRADIZIONALE	20%	90%
TOTALE	100%	100%

Fig.4 Tabella di contingenza frequenze percentuali

MATERIALI E METODI

Lo studio, effettuato presso l'Ospedale San Luca (Lucca, Italia) da marzo a dicembre 2022 è stato realizzato confrontando i risultati ottenuti su 400 campioni fecali di soggetti di entrambi i sessi, di fascia di età compresa da pochi mesi di vita fino ad individui di età maggiore di 80 anni, per ricerca di E. Coli enteropatogeni. I metodi di analisi in uso per la processazione dei campioni comprendono i metodi colturali seguiti da successiva identificazione mediante test di agglutinazione per conferma e tipizzazione del ceppo di E. Coli tramite FilmArray Gastrointestinal-GI Panel. (Biomérieux, Francia) (Figura 1). I risultati ottenuti con il metodo in uso sono stati confrontati con i dati ottenuti dal test PCR Multiplex Allplex™ Gastrointestinal Full panel Assay (Seegene, Repubblica di Corea).

RISULTATI

I risultati ottenuti dall'analisi dei tamponi fecali processati durante lo studio eseguito, sono stati descritti mediante tabelle di contingenza (frequenza assoluta e frequenze percentuali). Con il test PCR Multiplex sono stati identificati 160 casi di positività per almeno un ceppo di E. Coli enteropatogeno (40%). Il metodo tradizionale (metodo colturale e test di agglutinazione) ha confermato la positività per 128 tamponi analizzati mentre sono risultati discordanti 32 campioni negativi e 24 campioni positivi secondo il metodo colturale. I dati ottenuti mostrano un'incidenza differente per i ceppi di E. Coli identificati: E. Coli Enteropatogeni (EPEC) 66%; E. Coli Enteroaggreganti (EAEC) 38%; E. Coli Enterotossici (ETEC) 16%; E. Coli Enteroemorragici (EHEC) 3% (Figura 2). I risultati analizzati mediante la tabella di contingenza hanno indicato un grado di concordanza del 86% tra il metodo tradizionale (colturale) e quello molecolare, evidenziando una maggiore accuratezza e specificità del test molecolare (Figura 3 e 4).

CONCLUSIONI

Negli ultimi anni è stata posta maggior attenzione all'utilizzo di nuove metodiche di analisi basate sui test di biologia molecolare per l'identificazione e la tipizzazione dei ceppi di E. Coli. Le metodiche molecolari sono, infatti, caratterizzate da elevata specificità e sensibilità di rilevamento del patogeno indagato e maggiore rapidità di esecuzione rispetto ai metodi colturali della microbiologia classica (3 giorni con il metodo in uso, 4 ore con la PCR Multiplex) riducendo, così, i tempi di risposta a 24 ore dal prelievo, rispetto a 3/4 giorni previsti con il metodo tradizionale. Lo studio presentato dimostra, quindi, come l'utilizzo di pannelli dedicati per la ricerca molecolare potrebbero sostituire i metodi tradizionali per le analisi di routine e non utilizzarli esclusivamente per la loro conferma. L'utilizzo di questi pannelli garantirebbe una maggiore efficienza ed efficacia del percorso di analisi attraverso una riduzione dei tempi di analisi e di risposta, una maggiore tracciabilità automatizzata dei campioni ed una riduzione del numero di personale tecnico e dirigente dedicato per la processazione e la validazione dei campioni.

Bibliografia

- Wang L, Wakushima M, Aota T, Yoshida Y, Kita T, Maehara T, et al. Specific properties of enteropathogenic Escherichia coli isolates from diarrheal patients and comparison to strains from foods and fecal specimens from cattle, swine, and healthy carriers in Osaka City, Japan. Appl Environ Microbiol 2013;79:1232-40.
- Afset JE, Anderssen E, Bruant G, Harel J, Wieler L, Bergh K. Phylogenetic backgrounds and virulence profiles of atypical enteropathogenic Escherichia coli strains from a case-control study using multilocus sequence typing and DNA microarray analysis. J Clin Microbiol 2008;46:2280-90.
- Afset JE, Bruant G, Brousseau R, Harel J, Anderssen E, Bevanger L, et al. Identification of virulence genes linked with diarrhea due to atypical enteropathogenic Escherichia coli by DNA microarray analysis and PCR. J Clin Microbiol 2006;44:3703-11.
- Hu and A.G. Torres. Enteropathogenic Escherichia coli: foe or innocent bystander? Clin Microbiol Infect. August 2015;21(8):729-734
- Jenkins C, Smith HR, Lawson AJ, Willshaw GA, Cheasty T, Wheeler JG, et al. Serotypes, intimin subtypes, and antimicrobial resistance patterns of atypical enteropathogenic Escherichia coli isolated in England from 1993 to 1996. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1996;25:19-24.