



**UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI
PADOVA**

**Facoltà di Medicina Veterinaria
Dipartimento di Sanità pubblica, Patologia comparata
e Igiene Veterinaria**

TESI DI LAUREA

**VALUTAZIONE DELLA PREVALENZA DI PORTATORI ASINTOMATICI
DI CEPPI VEROCITOTOSSICI DI *E. COLI* (VTEC) NEI BOVINI DA
MACELLO, CON SEPARAZIONE IMMUNOMAGNETICA.**

Relatore: Ch.mo Prof. Valerio Giaccone

Correlatore: Dott. Leonardo Alberghini

Laureando: Valentina Nannini

ANNO ACCADEMICO 2009-2010

INDICE

Capitolo 1 - Riassunto	pag. 5
Capitolo 2 - Introduzione	pag. 7
2.1 - Enterobacteriaceae: Generalità	pag. 7
2.2 - <i>Escherichia coli</i>	pag. 10
2.2.1 - Caratteristiche microbiologiche	pag. 10
2.2.2 - Sindromi cliniche	pag. 11
2.3 - Ceppi enteroemorragici	pag. 13
2.3.1 - Caratteristiche generali	pag. 13
2.3.2 - Infezione nell'uomo e negli animali, stato di portatore	pag. 16
2.3.3 - Casi nell'uomo	pag. 18
2.3.4 - Aspetti legislativi	pag. 21
Capitolo 3 – Obiettivi	pag. 23
Capitolo 4 - Materiali e metodi	pag. 24
4.1 - Arricchimento	pag. 25
4.2 - Separazione	pag. 25
4.3 - Isolamento	pag. 27
4.4 - Conferma	pag. 27
4.4.1 - Test biochimici	pag. 28
4.4.2 - Test sierologici	pag. 30
4.5 - Conservazione	pag. 32
Capitolo 5 - Risultati	pag. 33
Capitolo 6 - Discussione e Conclusioni	pag. 42
6.1 - Discussione	pag. 42
6.2 - Conclusioni	pag. 47

Capitolo 7 - Appendice	pag. 53
7.1 - Terreni e supplementi	pag. 53
7.1.1 - CT	pag. 53
7.1.2 - <i>EC Broth</i>	pag. 53
7.1.3 - Novobiocina	pag. 54
7.1.4 - PBS	pag. 55
7.1.5 - SMAC	pag. 55
7.1.6 - TSB	pag. 57
7.2 - Immunoseparazione	pag. 58
7.2.1 - <i>Dynabeads® anti-E. Coli O157</i>	pag. 58
7.3 - Test biochimici	pag. 59
7.3.1 - API20E	pag. 59
7.4 - Test sierologici	pag. 63
7.4.1 - <i>Dryspot E. coli O157 Latex Test</i>	pag. 63
7.5 - Conservazione	pag. 64
7.5.1 - <i>Microbank™</i>	pag. 64
7.5.2 - Standard McFarland	pag. 64

Capitolo 8 - Riferimenti bibliografici e Webgrafia	pag. 66
8.1 - Riferimenti bibliografici	pag. 66
8.2 - Webgrafia	pag. 72

CAPITOLO 1 - RIASSUNTO

Tra i microorganismi trasmissibili all'uomo con il consumo di alimenti, gli stipti di *Escherichia coli* O157 produttori di verocitotossine (in particolare, il sierotipo O157:H7) hanno assunto importanza crescente a partire dai primi episodi segnalati negli anni '80. La severità dell'infezione, che presenta quadri variabili da una diarrea non complicata ad una colite emorragica, fino alla sindrome emolitico-uremica (SEU), unitamente alla bassa dose infettante, rendono il microorganismo particolarmente temibile, soprattutto per i soggetti più vulnerabili, quali i bambini e gli anziani. Per il sierogruppo O157, il principale serbatoio è il bovino, eliminatore asintomatico tramite il suo contenuto intestinale; spesso però è un portatore solo temporaneo e il batterio può stazionare nella stalla o nell'ambiente.

Lo scopo di questo lavoro è quello di ricercare la prevalenza di *E. coli* verocitotossici nel contenuto intestinale di bovini da macello provenienti da 48 aziende piemontesi e una lombarda e macellati presso un macello del Nord Italia, scelto per l'elevato carico di macellazione (400-450 bovini/giorno). Il prelievo dei campioni è stato effettuato dal gennaio al marzo del 2010, per un totale di 398 campioni di contenuto intestinale di bovini appartenenti alle categorie vitellone/bovino adulto, castrato/bovino adulto, vacca e vitello. Entro 48 ore dalla macellazione, i campioni sono pervenuti tramite trasporto a temperatura di refrigerazione, presso il Laboratorio di Microbiologia degli Alimenti dell'Università di Padova. In questa sede sono state condotte tutte le analisi per rilevare la presenza di *E. coli* verocitotossici, in particolare del sierotipo O157:H7. L'isolamento dei batteri dai campioni è stato condotto tramite immuno-separazione magnetica utilizzando microsfere rivestite di anticorpi (*Dynabeads® anti- E. coli* O157, Invitrogen Dynal), dopo una fase di arricchimento in *EC Broth* o TSB, entrambi addizionati con novobiocina, per inibire la crescita di ceppi non O157. Dopo l'immuno-separazione magnetica, 50 µl della sospensione così ottenuta sono stati inoculati su una piastra di CT-SMAC (*Cefixime Tellurite Sorbitol MacConkey Agar*, Oxoid, terreno raccomandato per l'isolamento di *Escherichia coli* O157:H7) e la tecnica utilizzata è stata la semina in quattro quadranti. Le piastre che presentavano colonie sorbitolo negative (incolori, in quanto *E. coli* O157:H7 non fermenta il sorbitolo) sono state valutate tramite test biochimico (API20E, Biomérieux) e test sierologico (test di agglutinazione al lattice, *Dryspot E. coli* O157 Latex Test, Oxoid). I campioni risultati positivi sono stati complessivamente nove (2,26%) e provenivano tutti da vitelloni e vacche originari di tre allevamenti ubicati nella provincia piemontese di Torino. La bassa prevalenza trovata è in accordo con studi effettuati in precedenza, tuttavia il rischio sanitario connesso soprattutto al consumo di latte crudo non

pastorizzato o di carni crude o poco cotte, di origine bovina o di altri ruminanti, nel nostro paese non è trascurabile, soprattutto a causa del decorso severo della patologia e delle possibili complicazioni a lungo termine, in particolare la sindrome emolitico-uremica.

CAPITOLO 2 - INTRODUZIONE

2.1 - Enterobacteriaceae: generalità

I batteri della specie *Escherichia coli* appartengono alla famiglia delle Enterobacteriaceae, costituita da 40 generi e più di 150 specie di bacilli Gram-negativi, classificati sulla base delle proprietà biochimiche e della struttura antigenica e sulla base di tecniche di ibridazione e di sequenziamento degli acidi nucleici. Tuttavia, nonostante la grande varietà di generi compresi in questa famiglia, meno di 20 specie sono responsabili del 95% delle infezioni nell'uomo.

Le Enterobacteriaceae sono batteri ubiquitari, infatti si trovano nel terreno, nelle acque superficiali e nel mondo vegetale e fanno parte della flora enterica della maggior parte dei

mammiferi e uccelli, compreso l'uomo. Causano numerose malattie nella specie umana, fra cui il 30-35% delle setticemie, più del 70% delle infezioni delle vie urinarie e molte infezioni intestinali (Murray *et al.*, 2008). Alcune specie sono sempre associate a malattia; altre (come ad esempio *E. coli*) fanno parte della normale flora, ma possono causare

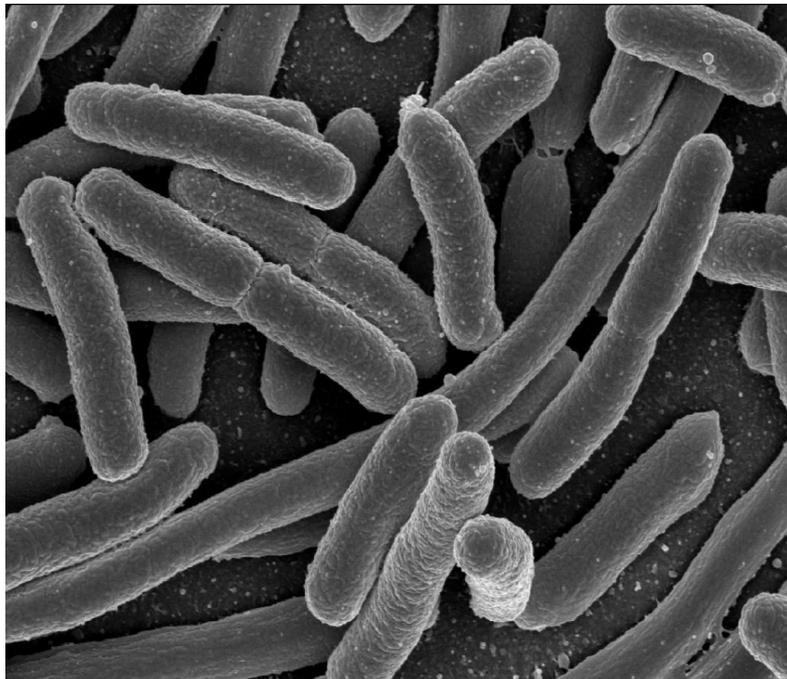


Illustrazione 1: Escherichia coli

infezioni opportunistiche; un terzo gruppo ancora diventa patogeno solo quando acquisisce geni di fattori di virulenza su plasmidi, batteriofagi o isole di patogenicità (gruppo di geni circondati da elementi mobili simili a trasposoni, che consentono loro di muoversi all'interno del cromosoma o in un altro batterio).

I batteri di questa famiglia sono di piccole dimensioni (da 0,3-1,0 X 1,0-6 μm), mobili o immobili, asporigeni e condividono un antigene comune. Crescono rapidamente in aerobiosi e anaerobiosi (sono anaerobi facoltativi) in una notevole varietà di terreni di coltura selettivi. Hanno esigenze nutrizionali semplici, fermentano il glucosio, riducono i

nitrati e sono catalasi positivi e ossidasi negativi (ad eccezione di *Plesiomonas shigelloides*, che è ossidasi positivo). Quest'ultima caratteristica (assenza di attività citocromo-ossidasi) permette di distinguere rapidamente le Enterobacteriaceae da altri bacilli Gram-negativi (Murray *et al.*, 2008). Inoltre le caratteristiche morfologiche di una colonia in diversi terreni selettivi consentono di identificare i membri della famiglia, ad esempio *Escherichia coli* è in grado di fermentare il lattosio e quindi viene distinto da altri batteri che non lo fermentano o lo fermentano molto lentamente (*Proteus spp.*, *Shigella spp.*, *Salmonella spp.* e specie di *Yersinia*). Altre Enterobacteriaceae presentano resistenza ai sali biliari in alcuni terreni selettivi; si tratta di patogeni enterici che così vengono discriminati dai microorganismi commensali, inattivati dagli acidi biliari.

Alcuni membri della famiglia sono dotati di una capsula, mentre altri presentano all'esterno uno strato mucoso lasso e diffusibile. Il lipopolisaccaride (LPS) o endotossina, termostabile, è il maggiore antigene della parete cellulare ed è costituito da tre componenti: il polisaccaride somatico O, un core polisaccaridico comune a tutte le Enterobacteriaceae (antigene comune) ed il lipide A.

La classificazione sierologica della famiglia si basa su tre principali gruppi di antigeni: il polisaccaride somatico O, l'antigene capsulare K (sia proteico che polisaccaridico) e la proteina flagellare H. Attualmente sono stati identificati 174 antigeni O, 80 antigeni K e 56 antigeni H. Per ciascun genere esistono specifici antigeni O, ma comunemente si possono verificare reazioni crociate tra i generi più strettamente correlati (ad esempio, *E. coli* con *Shigella spp.*). Gli antigeni si identificano mediante agglutinazione con specifici anticorpi, tuttavia gli antigeni K, labili al calore, possono interferire con la ricerca degli antigeni O, quindi, allo scopo di evitare il problema, si può portare il microorganismo a temperatura di ebollizione in modo da inattivare gli antigeni K. Gli antigeni H sono proteine flagellari termolabili, possono essere assenti o subire variazioni antigeniche (Murray *et al.*, 2008).

La maggior parte dei germi di questa famiglia è mobile e possiede flagelli peritrichi con l'eccezione degli isolati comuni di *Klebsiella spp.*, *Shigella spp.* e *Yersinia spp.*. Molti possiedono anche fimbrie (o pili), che possono essere divise in due classi: fimbrie comuni, codificate dal cromosoma comune, e fimbrie sessuali, codificate dai plasmidi coniugativi. Le prime sono importanti per la capacità del batterio di aderire a recettori specifici sulla cellula ospite, le seconde, invece, facilitano il trasferimento genetico tra batteri.

All'interno della famiglia sono stati identificati numerosi fattori di virulenza, che sono rappresentati dall'endotossina o LPS, dalla capsula, dalla variazione di fase antigenica, dai sistemi di secrezione di tipo III, dal sequestro dei fattori di crescita, dalla resistenza

all'uccisione mediata dal siero e dalla resistenza antimicrobica. Alcuni sono comuni a tutti i generi, altri sono specifici di ceppi virulenti.

L'endotossina o LPS è un fattore di virulenza dei batteri Gram-negativi aerobi ed anaerobi; la sua attività dipende dal lipide A, rilasciato a seguito di lisi della cellula. E' responsabile di molte delle manifestazioni sistemiche delle infezioni da Gram-negativi, quali attivazione del complemento, rilascio di citochine, leucocitosi, trombocitopenia, coagulazione intravasale disseminata (CID), febbre, diminuita circolazione periferica, shock e morte.

La capsula protegge le Enterobacteriaceae dalla fagocitosi grazie agli antigeni capsulari idrofilici, che respingono la superficie cellulare idrofoba del fagocita. Questi antigeni interferiscono con il legame degli anticorpi al batterio, sono deboli immunogeni e deboli attivatori del complemento. Tuttavia il ruolo protettivo della capsula è ridotto a seguito della produzione di specifici anticorpi anticapsulari.

La variazione di fase antigenica consiste nel fatto che sia l'antigene capsulare K che l'antigene flagellare H, le cui espressioni sono sotto il controllo del microorganismo, possono essere alternativamente espressi o non espressi (variazione di fase), proteggendo così il batterio dalla distruzione anticorpo-mediata.

Il sistema di secrezione di tipo III è costituito da circa venti proteine e consente il rilascio di geni di virulenza in cellule eucariotiche bersaglio. E' presente solo in alcuni batteri della famiglia (ad esempio, *Yersinia spp.* e *Salmonella spp.*) e anche in altri germi Gram-negativi, che, sebbene presentino fattori di virulenza con effetti differenti, hanno il medesimo meccanismo di introduzione. In assenza del sistema di secrezione di tipo III i batteri perdono la loro virulenza.

Un esempio di sequestro dei fattori di crescita è il comportamento dei batteri nei confronti del ferro, che è un importante fattore di crescita, ma è legato al gruppo eme delle proteine (come emoglobina e mioglobina) o a proteine chelanti il ferro (ad esempio, transferrina o lattoferrina). Il batterio, quindi, agisce producendo i propri composti chelanti, i siderofori enterobactina e aerobactina. Il ferro può anche essere rilasciato dalle cellule ospiti in seguito all'azione delle emolisine prodotte dal batterio.

La resistenza al "killing sierico" è la proprietà di alcuni batteri virulenti, in grado di causare infezioni sistemiche, di resistere alla lisi complemento-mediata, impedendo il legame dei componenti del complemento (i fattori coinvolti sono però ancora poco definiti).

La resistenza agli antimicrobici è la capacità dei batteri di resistere ad alcuni antibiotici; questa resistenza è codificata da plasmidi e può essere trasmessa tra i batteri della stessa specie, tra generi o tra famiglie diverse.

2.2 - *Escherichia coli*

2.2.1 - Caratteristiche microbiologiche

Il genere *Escherichia* comprende sette specie: *E. coli* è la specie più comune e più importante dal punto di vista clinico. Il nome deriva dal suo scopritore, Theodor Escherich, pediatra tedesco che isolò il batterio dalle feci di neonati e lo correlò ad un'enterite fatale che colpiva i bambini. Inizialmente, il batterio prese il nome di *Bacillus communis coli* e solo dopo la morte del pediatra acquisì il nome di *Escherichia coli*.

Tutti i tipi diversi di batteri fecali della specie *coli* e tutti i suoi simili che vivono nel terreno (nel suolo o in piante in via di appassimento, il cui batterio più comune è *Enterobacter aerogenes*) vengono raggruppati insieme sotto il nome di coliformi. Tecnicamente il "gruppo coliforme" comprende batteri

aerobi e alcuni anaerobi, non formanti spore, Gram-negativi e a forma di bastoncino (bacilli), che fermentano il lattosio con la produzione di gas nell'arco di 48 ore a 35 °C. *E. coli* è il principale rappresentante dei coliformi fecali, che possono essere utilizzati come indicatori dell'inquinamento fecale degli alimenti.

All'interno della specie *E. coli* si distinguono almeno 171 sierotipi, caratterizzati da diverse combinazioni degli antigeni O, K, H e F. Si tratta di batteri tipicamente termotrofi: non sviluppano sotto i 7° C e sopra i 45° C, sono inattivati in 15 secondi sopra i 70°C. La maggior parte dei sierotipi di solito non è patogena, ma fortemente alterante per gli alimenti perché metabolizza gli zuccheri producendo CO₂. Possiede un ampio spettro di fattori di virulenza; oltre ai fattori generali posseduti da tutti i membri della famiglia delle Enterobacteriaceae, i ceppi responsabili, per esempio, di infezioni del tratto urinario e gastroenteriche possiedono anche altri particolari fattori di virulenza. Due categorie generali di tali fattori sono le adesine e le esotossine. Le adesine permettono al batterio di permanere nel tratto gastroenterico ed urinario in quanto lo rendono capace di aderire alle cellule di rivestimento e di evitare di essere eliminato dalla motilità intestinale o dal flusso urinario. I ceppi di *E. coli* presentano numerose adesine altamente specializzate, che comprendono antigeni del fattore di colonizzazione (CFA/I, CFA/II, CFA/III), fimbrie di adesione aggreganti (AAF/I, AAF/II), pili a fasci (Bfp), intimina, pili P (che si legano agli



Illustrazione 2: Theodor Escherich (1857-1911)

antigeni del gruppo sanguigno P), proteine Ipa (antigene plasmidico di invasione) e fimbrie Dr (che si legano agli antigeni del gruppo sanguigno Dr). *E. coli* produce anche diverse esotossine, le tossine *Shiga* o verocitossine (Stx-1 e Stx-2), le tossine termostabili (STa e STb), le tossine termolabili (LT-1 e LT-2) e le emolisine (HlyA), importanti nella patogenesi dell'infezione causata *E. coli* uropatogeni (Murray *et al.*, 2008).

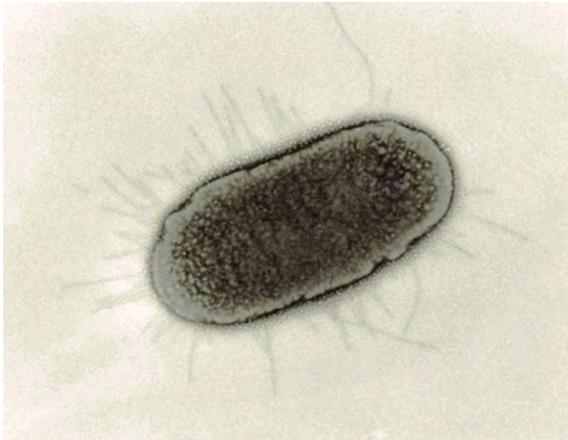


Illustrazione 3: *Escherichia coli*

2.2.2 - Sindromi cliniche

Un gran numero di *E. coli* è presente nel tratto gastroenterico e può essere causa di diverse sindromi cliniche: sepsi, meningiti neonatali, infezioni delle vie urinarie e gastroenteriti. La maggior parte delle infezioni (ad eccezione delle meningiti neonatali e delle gastroenteriti) sono endogene, così la normale flora batterica di un individuo può determinare infezione quando le difese immunitarie sono ridotte.

La setticemia, di solito, è secondaria ad infezioni del tratto urinario o gastroenterico; la colonizzazione del torrente ematico può avvenire a causa di traumi intestinali o tumori del colon e del tenue. Le scarse misure igieniche nel posizionamento di cateteri o di accessi venosi centrali sono comuni cause di batteriemie da *E. coli*. La mortalità associata alla setticemia dipende dalla fonte di infezione e dalla patologia di base del paziente e ha un'incidenza più elevata in soggetti immunodepressi o con infezioni intra-addominali o del sistema nervoso centrale.

Per quanto riguarda le infezioni del tratto urinario, la maggior parte dei batteri Gram-negativi che causa infezioni delle vie urinarie proviene dal colon, risale fino alla vescica e può migrare al rene o alla prostata. Anche se molti ceppi di *E. coli* possono causare infezioni del tratto urinario, di solito queste sono più comunemente associate ad alcuni sierotipi, particolarmente virulenti grazie alla loro capacità di produrre adesine, che si legano alle cellule di rivestimento della vescica e delle vie urinarie (fimbrie formanti fasci,

pili P e fimbrie Dr), ed emolisina HlyA, che lisa gli eritrociti e altri tipi cellulari con il rilascio di citochine e stimolazione di una risposta infiammatoria.

E. coli, insieme agli streptococchi del gruppo B, causa la maggior parte delle infezioni del sistema nervoso centrale in neonati di età inferiore ad un mese di vita. Il 75% di questi ceppi di *E. coli* possiede l'antigene capsulare K1. Questo sierogruppo è anche presente comunemente nel tratto gastroenterico di donne gravide e di neonati, ma il motivo di questa predilezione è ancora sconosciuto.

I ceppi responsabili delle gastroenteriti sono suddivisi in sei gruppi, classificati in base alle caratteristiche di virulenza, al meccanismo patogenetico, alla sindrome clinica associata e al sierogruppo O: enteropatogeni (EPEC), enterotossigeni (ETEC), verocitotossici (VTEC, detti anche enteroemorragici), enteroinvasivi (EIEC), enteroaggreganti (EAEC) e enteroaggreganti-diffusi (DAEC). Di solito vengono trasmessi all'uomo tramite il consumo di alimenti; in particolare, per l'igiene degli alimenti, sono importanti i ceppi verocitotossici, rappresentati da una quindicina di sierotipi, il più noto dei quali è O157:H7, ma tutti possono essere agenti di infezione.

-*E. Coli* enteropatogeni: furono i primi *E. coli* ad essere associati alla malattia diarroica e rimangono causa importante di diarrea in età pediatrica nei paesi in via di sviluppo. La malattia è causata dalla capacità di questi ceppi di aderire all'epitelio dell'intestino tenue e di interferire con l'assorbimento delle sostanze; questo provoca la formazione di un ambiente iperosmolare nel lume dell'intestino, un conseguente richiamo d'acqua e, infine, la diarrea. Il quadro di adesione all'epitelio e la distruzione dei microvilli giustifica la definizione di lesioni A/E (*attachment/effacement*, adesione/elisione).

-*E. coli* enterotossigeni: causano gastroenteriti che si riscontrano molto comunemente nei paesi in via di sviluppo e possono causare diarrea nei viaggiatori. Perché si verifichi l'infezione, la carica batterica deve essere elevata ed è quindi conseguente all'ingestione di alimenti o acqua contaminati da feci infette. Gli ETEC producono due classi di enterotossine: tossine termostabili (STa e STb) e tossine termolabili (LT-1 e LT-2). Mentre l'LT-2 non è associata a malattia nell'uomo, l'LT-1 è simile dal punto di vista strutturale e funzionale alla tossina di *Vibrio cholerae* e causa malattia nell'uomo. Anche STa (ma non STb) è associata a malattia nell'uomo. Non è possibile distinguere la malattia causata dalla tossina termolabile da quella causata dalla tossina termostabile. I geni che codificano LT-1 e STa si trovano su plasmidi trasferibili che possono portare anche i geni che codificano per le adesine (in particolare AAF/I e AAF/II). I recettori per questi fattori di colonizzazione sono glicoproteine. La diarrea causata dagli ETEC si manifesta dopo 1-2

giorni di incubazione e dura 3-4 giorni. I sintomi (crampi, nausea, vomito e diarrea acquosa) sono simili al colera, ma più lievi. Non si osservano né alterazioni istologiche né infiammazione della mucosa enterica.

-*E. coli* enteroemorragici o verocitossici: sono i ceppi più comunemente responsabili di malattia nei paesi industrializzati. Di questi ceppi si parlerà più diffusamente in seguito.

-*E. coli* enteroinvasivi: sono rari negli Stati Uniti e non comuni nei paesi in via di sviluppo. I ceppi patogeni sono associati essenzialmente a pochi sierotipi O: O124, O143 e O164; sono strettamente simili per le proprietà fenotipiche e patogene a ceppi di *Shigella*. I batteri sono in grado di invadere e distruggere l'epitelio del colon, determinando inizialmente diarrea acquosa. Pochi pazienti procedono verso la forma dissenterica della malattia caratterizzata da febbre, crampi addominali, sangue e leucociti nelle feci. Il movimento all'interno del citoplasma e nelle cellule adiacenti è reso possibile dalla formazione di filamenti di actina (simili a quelli che si osservano in *Listeria spp.*). La distruzione delle cellule epiteliali può portare anche ad ulcerazione della mucosa del colon.

-*E. coli* enteroaggreganti: sono coinvolti in casi di diarrea persistente negli infanti nei paesi in via di sviluppo e nei viaggiatori. I batteri si agglutinano formando degli ammassi; questo processo è mediato da fimbrie formanti fasci, le fimbrie I e II aggreganti e di aderenza (AAF/I e AAF/II), portate da un plasmide. I batteri stimolano la secrezione di muco, che va ad avvolgerli in un biofilm, che si stratifica sull'epitelio dell'intestino tenue. A seguito della riduzione della lunghezza dei microvilli, si osservano infiltrazione mononucleata ed emorragia. Probabilmente la loro azione è mediata dalla produzione di una citotossina, anche se la sua esistenza non è ancora stata dimostrata.

-*E. coli* diffusamente aderenti o enteroaggreganti-diffusi: sono stati riconosciuti per la loro caratteristica adesione alle colture cellulari; stimolano l'allungamento dei microvilli e l'inglobamento dei batteri stessi nella membrana cellulare. La malattia consiste in una diarrea acquosa che si riscontra principalmente in bambini con età compresa tra 1 e 5 anni (Murray *et al.*, 2008).

2.3 - Ceppi enteroemorragici

2.3.1 - Caratteristiche generali

I ceppi enteroemorragici (EHEC) vengono definiti anche verocitotossici e questo nome è dovuto al fatto che producono una potente citotossina, simile a quella prodotta da *Shigella spp.*, chiamata verocitotossina (o *Shiga-like toxin*), che a sua volta, deve il suo nome al fatto che, se viene messa a contatto con un monostrato di cellule in linea (cellule

VERO), ne provoca rapidamente la distruzione. Venne scoperta nel 1977 grazie, appunto, alla sua attività citopatica sulle cellule VERO (Karmali, 1989; Melton Celsa e O'Brien, 1998). La definizione, invece, di enteroemorragici, tiene conto del quadro clinico associato all'infezione.

Il sierotipo che causa principalmente malattia è O157:H7 (e la sua variante immobile, O157:H-); non sono però i soli *E. coli* produttori di verocitossine patogeni per l'uomo, in quanto altri sierotipi sono in grado di indurre quadri clinici indistinguibili da quelli descritti per VTEC O157 (Bonardi *et al.*, 2006), in particolare O111, O26, O103 e O145. Il sierotipo O157:H7, al contrario degli altri, non fermenta il sorbitolo e questo permette la sua identificazione nei terreni *Agar McConkey* contenenti sorbitolo (si valutano le colonie che mancano dell'attività fermentativa e quindi incolori).

La gravità della malattia varia da una lieve diarrea senza complicazioni ad una colite emorragica con dolori addominali acuti, diarrea sanguinolenta, vomito e febbre bassa o assente (documentata solo nel 30% dei casi; Mead e Griffin, 1998). La sindrome emolitico-uremica (SEU), caratterizzata da insufficienza renale acuta, trombocitopenia e anemia emolitica microangiopatica, è una complicazione che si presenta nel 10% dei ragazzi infetti di età inferiore ai 10 anni. La SEU si instaura per lesioni vascolari indotte dalle tossine a carico dell'endotelio dei glomeruli renali. Come conseguenza del danno endoteliale, si verifica un accumulo di piastrine a livello della corticale renale, con formazione di trombi e piastrinopenia. Il passaggio dei globuli rossi all'interno dei vasi lesionati ne determina la rottura con conseguente anemia emolitica microangiopatica. Le lesioni renali portano a insufficienza renale acuta, accompagnata da anuria o oliguria. L'aumento della volemia conseguente alla ritenzione idrica può indurre sintomi di tipo neurologico, come convulsioni, sonnolenza e coma (Bonardi *et al.*, 2006). Nella fase acuta, la SEU può essere fatale nel 3-5% dei casi e una percentuale simile può sviluppare insufficienza renale cronica (Caprioli *et al.*, 2001). La porpora trombotica trombocitopenica (PTT) si manifesta prevalentemente nei soggetti adulti e il quadro clinico è caratterizzato da anemia emolitica microangiopatica, trombocitopenia e problemi neurologici. I danni vascolari sono a carico di diversi organi e per questo è di solito più grave rispetto alla SEU. Inoltre, è causa di minori danni al rene, ma disturbi più gravi a carico del sistema nervoso centrale.

I ceppi EHEC possiedono un plasmide di 60 MDa, che trasporta geni per i fattori di virulenza. Tra i più importanti si hanno i geni *vtx1* e *vtx2*, deputati alla sintesi delle verocitossine, ed il gene *eae* che codifica per la proteina intimina (una proteina batterica

di membrana). Infine, il gene *hlyA* codifica la sintesi dell'enteroemolisina, indispensabile per l'approvvigionamento di ferro e quindi per la sopravvivenza del batterio. I ceppi possono esprimere la tossina Stx-1, Stx-2 o entrambe; per la tossina Stx-1 di recente sono state individuate due varianti, mentre per la tossina Stx-2 sono da tempo note cinque varianti, tanto che si può parlare di un gruppo di tossine *Stx-2* (Melton Celsa e O'Brien, 1998). La tossina Stx-1 è essenzialmente uguale alla tossina *Shiga* prodotta da *Shigella dysenteriae* (dalla cui sequenza aminoacidica differisce solo per un aminoacido), mentre Stx-2 ha il 56% di omologia (fra le due tossine Stx, dal punto di vista sierologico, non esiste reazione crociata); entrambe le tossine sono codificate da batteriofagi lisogeni. Sono composte da una subunità A, dotata di attività enzimatica, e cinque subunità B identiche, che si legano ad uno specifico glicolipide presente sulla membrana della cellula ospite (globotriaosilceramide, Gb3, si riscontra a livello dei villi intestinali e delle cellule endoteliali renali). Una volta che la subunità A è stata internalizzata, viene scissa in due molecole ed il frammento A1 si lega all'RNA ribosomiale 28S, bloccando la sintesi proteica. Le tossine vengono prodotte nel colon e per via ematica raggiungono le cellule endoteliali arteriolari del rene e del grosso intestino, che nell'uomo sono ricche di recettori Gb3, provocando seri danni a tali distretti vascolari. Inoltre, queste tossine inducono anche l'apoptosi delle cellule dell'epitelio intestinale; la distruzione dei villi intestinali che ne consegue, causa una diminuzione dell'assorbimento con un relativo aumento della secrezione dei fluidi. La sindrome emolitico-uremica è associata alla produzione di Stx-2, che distrugge le cellule endoteliali del glomerulo renale, causando una diminuzione della filtrazione glomerulare e insufficienza renale acuta. Le tossine Stx stimolano anche la produzione di citochine, in particolare TNF e interleuchina-6, che, tra gli altri effetti, causano un aumento dell'espressione di Gb3. Un altro fattore di virulenza è rappresentato dalla proteina intimina, responsabile dell'adesione dei VTEC alle cellule dell'epitelio intestinale. L'adesione e le conseguenti modificazioni citoscheletriche a carico dell'enterocita portano alla caratteristica lesione A/E (*attaching/effacing*, adesione/elisione), che consiste in una prima fase di adesione del batterio all'enterocita ("*attachement*"), a cui segue la distruzione dei microvilli ("*effacement*"); avremo, quindi, la scomparsa dei microvilli e la formazione di tipiche strutture a piedistallo che sostengono il batterio adeso. Ne deriva che i principali fattori essenziali alla patogenesi delle manifestazioni cliniche sono la produzione delle verocitotossine e la capacità di aderire alle cellule della mucosa intestinale.

Un altro fattore di virulenza è l'enteroemolisina, una "*pore forming toxin*" monomerica che si inserisce nella membrana cellulare, provocando la formazione di pori (Bonardi *et al.*,

2006).

2.3.2 - Infezione nell'uomo e negli animali, stato di portatore

Come è stato detto precedentemente gli *E. coli* enteroemorragici possono causare una grave sindrome nell'uomo. La malattia inizialmente si manifesta con diarrea non sanguinolenta con forti dolori addominali dopo 3-4 giorni di incubazione; in circa la metà dei pazienti compare anche il vomito. Entro 2 giorni dall'inizio, nel 30-65% dei pazienti compare una diarrea sanguinolenta, ma nella maggior parte dei soggetti non trattati i sintomi scompaiono dopo 4-10 giorni; una grave complicazione, però, è rappresentata dalla sindrome emolitico-uremica (SEU), che si verifica soprattutto nei bambini di età inferiore ai 5 anni e negli anziani. Nel 3-5% dei casi può portare a morte e almeno nel 30% a gravi complicazioni (ad esempio, insufficienza renale acuta, ipertensione, manifestazioni a carico del sistema nervoso centrale) (Murray *et al.*, 2008).

La malattia ha un andamento stagionale, infatti è più frequente nei mesi caldi ed è stata attribuita soprattutto al consumo di latte crudo o mal pastorizzato e di carni rosse macinate crude o poco cotte, infatti *E. coli* è sensibile ai trattamenti termici e viene distrutto dalla pastorizzazione e dalla cottura degli alimenti. L'infezione può derivare anche dall'ingestione di acqua contaminata, in cui il patogeno può sopravvivere a lungo; sono note, infatti, alcune epidemie conseguenti all'utilizzo di pozzi o sorgenti contaminati, o dovute all'immersione in acque non clorate. Altre fonti di infezione sono rappresentate da vegetali crudi e frutta. Si possono avere anche contaminazioni crociate in fase di produzione: in bibliografia sono riportati casi dovuti al consumo di succhi di frutta non pastorizzati. Inoltre, la spiccata acidotolleranza del microorganismo, ne permette la sopravvivenza anche in alimenti particolarmente acidi, come il sidro di mela non pastorizzato, associato più volte ad episodi epidemici e nel quale *E. coli* O157 è in grado di sopravvivere per periodi che vanno da 10 a 31 giorni a 8° C e 2-3 giorni a 25° C (Caprioli *et al.*, 2001). Infatti, è stato dimostrato che ceppi di questo batterio sono in grado di sopravvivere a pH inferiori a 2,5 per più di due ore e che nella fase stazionaria essi sono più resistenti a bruschi cali di pH, rispetto alla fase esponenziale di crescita. Queste caratteristiche di acidotolleranza sono state confermate anche dall'analisi di insaccati misti responsabili di un focolaio epidemico, da cui *E. coli* è stato isolato a distanza di tre mesi dalla produzione (Meng e Doyle, 1998). Dati sperimentali hanno confermato che *E. coli* è in grado di sopravvivere a fermentazione, asciugatura e stoccaggio degli insaccati a media stagionatura (pH 4,5) per due mesi a 4° C (Caprioli *et al.*, 2001).

Per quanto riguarda il sierogruppo O157, il principale serbatoio è il bovino, eliminatore asintomatico tramite il suo contenuto intestinale; spesso però è un portatore solo temporaneo e il batterio può stazionare nella stalla o nell'ambiente. In diversi paesi, è stato dimostrato che questo microorganismo è presente, con prevalenze variabili, nel tratto gastroenterico del bovino. La sua acidotolleranza potrebbe rappresentare un fattore di adattamento alla lieve acidità del rumine; un altro sito di colonizzazione è la giunzione retto-ale. E' stato anche verificato che la percentuale di prevalenza può sensibilmente aumentare se gli animali sono sottoposti ad eventi stressanti. Questo può essere dovuto ad alterazioni del pH ruminale, ma soprattutto alla diminuzione della concentrazione di acidi grassi volatili, che hanno un ruolo inibente verso la crescita di *E. coli* O157 (Caprioli *et al.*, 2001). La cessazione dello stato di portatore avviene in circa 30-40 giorni. L'eliminazione del batterio avviene tramite le feci, ha una durata variabile nei singoli animali e può essere intermittente. Le carni bovine si possono contaminare durante la macellazione e il latte durante la fase di mungitura. Pochi, invece, sono i dati relativi alla diffusione di questo microorganismo nelle carni di vitelli a carne bianca (Colavita *et al.*, 2008).

Altri potenziali serbatoi sono ovini, caprini, suini, pollame, selvaggina, cani, gatti, piccioni, gabbiani. In particolare, i polli, come i bovini, si comportano nella maggior parte dei casi come portatori ed eliminatori asintomatici. Recentemente, poi, nel nostro paese, è stato messo in luce il ruolo del bufalo quale serbatoio (Astarita *et al.*, 2007). Per quanto riguarda i prodotti della pesca, il loro ruolo è ancora da definire, ma sembrano scarsamente inquinati.

In uno studio italiano (Bonardi *et al.*, 2003), sono stati isolati VTEC O157 dal contenuto intestinale di un suino macellato, che proveniva da un allevamento in cui l'alimentazione comprendeva siero di latte bovino. Questa pratica potrebbe essere il punto cruciale per il passaggio di *E. coli* O157 dai ruminanti al suino.

Le indagini sul ruolo degli animali nell'epidemiologia dei VTEC non O157, invece, sono ancora molto scarse e perciò in molti focolai di infezione non è possibile stabilire un legame con gli animali serbatoio. Tuttavia, fino a pochi anni fa, si riteneva che il sierogruppo O26 fosse isolabile esclusivamente dai bovini e dai prodotti da essi derivati, ma recentemente stipiti VTEC O26 sono stati isolati anche da ovini che non presentavano segni gastroenterici. Inoltre, gli stipiti O26 possono essere considerati patogeni sia per l'uomo che per gli animali. Gli stipiti O111 vengono isolati dal bovino, anche se recenti studi in Scozia, Inghilterra e Italia non hanno mai identificato *E. coli* O111 nelle feci bovine. Più scarsi i dati relativi al sierotipo O145, isolato da bovini asintomatici, e al

sierotipo O103, isolato da feci bovine, ma con prevalenze piuttosto modeste se comparate a quelle del sierotipo O26 (Bonardi *et al.*, 2006).

Negli animali, l'infezione da VTEC è responsabile di due patologie ben definite: nel suino causa la malattia degli edemi, mentre nel vitello è responsabile di un'enterite emorragica. Quest'ultima è piuttosto rara, mentre sono molto più frequenti infezioni asintomatiche con eliminazione fecale del patogeno, che è solo transitoria; l'animale, inoltre, difficilmente presenta una sintomatologia evidente tale da permetterne l'identificazione clinica, specialmente se si tratta di soggetti adulti (Cavirani, 1998). Il numero degli eliminatori, poi, tende ad aumentare nei mesi estivi (Chapman *et al.*, 1997). La malattia degli edemi nel suino, invece, è di solito associata ai sierotipi O138, O139 e O141; essi producono una verocitotossina, probabilmente una variante della Stx-2, a livello intestinale (nota anche come VT2e). Viene poi assorbita attraverso il torrente ematico e portata alle cellule bersaglio, di solito le cellule endoteliali delle arteriole. Il batterio è un normale componente della flora microbica del suino, ma la patologia compare solo in particolari condizioni stressanti per l'animale, come i cambiamenti di alimentazione (Quinn *et al.*, 1994). I ceppi produttori di VT2e sono stati isolati raramente nell'uomo e sempre associati a forme moderate di diarrea (Armstrong *et al.*, 1996).

2.3.3 – Casi nell'uomo

Escherichia coli O157:H7 è stato identificato per la prima volta nel 1982 come causa di un'epidemia di colite emorragica e sindrome emolitico-uremica negli Stati Uniti. Nel corso di un'indagine epidemiologica su due focolai di diarrea emorragica associati al consumo di hamburger in ristoranti appartenenti alla stessa catena di fast-food, il *Center for Disease Control and Prevention* (CDC) di Atlanta identificò un ceppo di *E. coli* che esprimeva l'antigene somatico O157 e quello flagellare H7. Dopo il verificarsi di numerosi episodi tossinfettivi, *E. coli* O157:H7 iniziò ad essere considerato un microorganismo altamente patogeno per l'uomo. Da allora, è considerato la principale causa di diarrea emorragica ed è isolato da coprocolture come terzo patogeno dopo *Salmonella* e *Campylobacter* (Decastelli *et al.*, 2004).

Tra il 1983 e il 1991 si è verificato un forte incremento di infezioni da *E. coli* O157 verocitotossico: nella sola Scozia si è passati da 10 casi nel 1984 e 1986 ad oltre 200 casi nel 1991. Il maggior tasso di infezione, però, si è registrato in Canada, paese in cui di routine si esegue la ricerca del batterio negli ospedali e nei centri di salute pubblica. Dal 1993 si è registrata una riduzione del numero dei casi in Canada e Scozia grazie

all'introduzione di piani di prevenzione. Studi canadesi hanno evidenziato un rischio maggiore di contrarre l'infezione nei soggetti in continuo contatto con il bestiame (Wilson *et al.*, 1996) e appartenenti alle aree rurali (Mac Donald *et al.*, 1996).

Tabella 1 - Principali episodi epidemici verificatisi nel mondo (Karch *et al.*, 1999).

PAESE	ANNO	SIEROTIPO EHEC	CASI IDENTIFICATI	CASI DI SEU	DECESSI	VEICOLO DI TRASMISSIONE
USA	1989 1990	O157:H7	243	2	4	Acqua potabile
Canada	1991	O157:H7	521	22	2	Carne macinata e altri alimenti per cross-contaminazione
USA	1992 1993	O157:H7	732	55	4	Hamburger
Scozia	1994	O157:H7	>100	9	1	Latte bovino per contaminazione successiva alla pastorizzazione
Australia	1995	O111:H-	>200	22	0	Insaccato bovino-suino
Svezia	1995	O157:H7	110	29	0	Non identificato
Giappone	1996	O157:H7	8.576	106	3	Germogli ("white radish sprout")
Scozia	1996	O157:H7	501	27	20	Carne

In Nord America (Stati Uniti e Canada) e in Gran Bretagna quasi tutti gli episodi sono stati di origine alimentare e il veicolo di solito implicato era rappresentato da hamburger o comunque carne appartenente alla specie bovina cotta in modo non adeguato. Per questo motivo l'infezione divenne nota come "*hamburger disease*". Al contrario, in Europa continentale, nessun episodio epidemico è mai stato associato al consumo di hamburger o di altri tipi di carne di origine bovina, ma le fonti di infezione sono risultate essere il latte crudo caprino e bovino e il latte trasformato (Caprioli e Tozzi, 1998).

In Italia, il primo caso di infezione da *E. coli* O157 venne descritto nel 1988, anno in cui si istituì il sistema di sorveglianza nazionale della sindrome emolitico-uremica in età pediatrica, coordinato dall'*Istituto Superiore di Sanità*. Questo sistema di sorveglianza, su base volontaria, ha permesso di identificare, dal 1988 al 2000, 245 casi di infezione da VTEC; 7 casi appartenevano alla provincia di Cuneo (Caprioli *et al.*, 2001). Gli studi epidemiologici hanno permesso di dimostrare come, nel corso degli anni, non si abbia avuto una tendenza all'aumento, anche se sono stati registrati due episodi epidemici, associati ad infezione da *E. coli* O111 (Caprioli *et al.*, 1994) e da *E. coli* O157 (Tozzi *et al.*, 1994), rispettivamente nel 1992 e nel 1993; in entrambi i casi la fonte di infezione non è mai stata individuata. Nel complesso, le indagini sierologiche e microbiologiche hanno dimostrato l'infezione da VTEC nel 73% dei pazienti. La maggior parte era dovuta a *E. coli* O157, ma i sierotipi non O157 (O26, O111 e O103) rappresentavano circa un terzo delle infezioni da VTEC diagnosticate (Caprioli *et al.*, 1992; Caprioli *et al.*, 1997).

E' evidente, inoltre, la stagionalità che caratterizza questo tipo di infezione, infatti il 59,6% dei casi si è presentato tra giugno e settembre. Le ragioni alla base di questa stagionalità sono molteplici: maggiore prevalenza del patogeno nei bovini e in altre specie animali durante l'estate, maggiore esposizione della popolazione ai tipi di alimento più frequentemente coinvolti (come, ad esempio, carne cotta al *barbecue*), maggiore probabilità che si verifichino abusi termici durante la cottura degli alimenti e deficit nei processi di cottura (Caprioli *et al.*, 2001).

L'85% dei pazienti era rappresentato da bambini con età inferiore ai 6 anni. L'incidenza dell'infezione da VTEC si è assestata intorno a 0,2-0,5 casi ogni 100.000 abitanti nella fascia d'età 0-15 anni (Caprioli *et al.*, 1997), valori comunque inferiori di 4-5 volte a quelli registrati in Gran Bretagna, Germania, Belgio e altri paesi dell'Europa centrale (Caprioli e Tozzi, 1998). Malgrado questa incidenza relativamente bassa, anche nel nostro paese la SEU costituisce una delle principali cause di insufficienza renale acuta nell'infanzia.

Con l'emanazione della Decisione 253/2002/CE, la Comunità europea ha affrontato il

problema inserendo le infezioni da *Escherichia coli* enteroemorragici (EHEC) tra le malattie con obbligo di denuncia. Studi condotti esaminando stipiti di *E. coli* isolati da bambini con diarrea, hanno potuto identificare che solo una percentuale compresa tra 0% e 0,8% dei soggetti era effettivamente infetta da VTEC.

Attualmente si calcola che questi batteri causino circa 73.000 infezioni e quasi 600 morti all'anno negli Stati Uniti. Un recente caso di questa patologia, che ha portato a gravi complicazioni, ha sconvolto l'opinione pubblica americana: si tratta del caso di Stephanie Smith, 22 anni, paralizzata dal 2007 a causa di una tossinfezione alimentare da *E. coli* O157:H7, attribuita al consumo di carne bovina macinata poco cotta (*Il Corriere della Sera*, 5 ottobre 2009). La ragazza inizialmente accusò forti dolori addominali con diarrea sanguinolenta, successivamente fu ricoverata al *St. Cloud Hospital* del Minnesota ed entrò in coma; vi rimase per 9 mesi. Al suo risveglio, il suo sistema nervoso era seriamente compromesso.

Nell'Unione Europea, invece, nel corso del 2005 si sono registrati 3.314 casi di infezione umana da stipiti VTEC, con un'incidenza di 1,2 casi ogni 100.000 abitanti, pur di gran lunga inferiore all'incidenza europea di altre malattie a trasmissione alimentare, quali la campilobatteriosi (51,6 casi/100.000) e la salmonellosi (38,2/100.000) (Bonardi *et al.*, 2006). Nel 2007, invece, vi sono stati un totale di 2.905 casi nell'uomo, confermati in laboratorio, riportati in 23 Stati membri (EFSA, 2009).

2.3.4 - Aspetti legislativi

La Direttiva CE 2003/99 ha incluso le infezioni da *Escherichia coli* produttori di verocitotossine tra le zoonosi da sottoporre a sorveglianza obbligatoria in tutti i Paesi membri. Tale direttiva in Italia è stata recepita con il Decreto Legislativo n. 191 del 4 aprile 2006 (Attuazione della Direttiva 2003/99/CE sulle misure di sorveglianza delle zoonosi e degli agenti zoonotici). Le operazioni di sorveglianza previste dalla Direttiva CE 2003/99, tra le altre misure, comprendono mirate indagini epidemiologiche atte a chiarire l'origine dei focolai tossinfettivi.

Il Regolamento 178/2002 stabilisce i requisiti generali per la sicurezza degli alimenti, in accordo con i quali gli alimenti non devono essere immessi sul mercato se non sicuri per la salute umana e gli operatori del settore alimentare hanno l'obbligo di ritirare dal commercio questi alimenti. Lo SCVPH (*Scientific Committee on Veterinary Measures relating to Public Health*) ha emesso un'opinione relativamente agli *E. coli* verocitotossici negli alimenti il 21-22 gennaio 2003. La conclusione è stata che, applicando gli standard microbiologici per *E. coli* O157:H7 alle produzioni finali, è improbabile assistere ad una

significativa riduzione del rischio per il consumatore. Tuttavia, le linee guida, che hanno lo scopo di ridurre la contaminazione fecale degli alimenti lungo tutta la catena alimentare, possono contribuire ad una riduzione del rischio per la salute pubblica, inclusi i rischi relativi a *E. coli* verocitotossico. Lo SCVPH ha stilato un elenco delle categorie di alimenti nelle quali questi batteri rappresentano un pericolo per la salute pubblica: carni crude o poco cotte, soprattutto di ruminanti, carni macinate e fermentate o prodotti derivanti da queste, latte crudo e prodotti a base di latte crudo, frutta e verdura fresche, succhi di frutta o di vegetali non pastorizzati.

CAPITOLO 3 - OBIETTIVI

Lo scopo di questo lavoro è quello di ricercare la prevalenza di *E. coli* verocitotossici nel contenuto intestinale di bovini da macello provenienti da 48 aziende piemontesi e una lombarda e macellati presso un macello del Nord Italia, scelto per l'elevato carico di macellazione (400-450 bovini/giorno). L'isolamento dei batteri dai campioni è stato condotto tramite immuno-separazione magnetica utilizzando microsfele rivestite di anticorpi (*Dynabeads® anti- E. coli O157*, Invitrogen Dynal). Questa indagine è stata svolta in modo da effettuare un'analisi del rischio connessa al consumo umano di alimenti di origina bovina, come latte e carne, in quanto i batteri sopracitati hanno come serbatoio principale il bovino ed è stata messa in evidenza una correlazione tra la positività fecale e la contaminazione delle carni: casi di elevata positività nelle feci bovine, si riflettono, infatti, su una maggiore presenza di *E. coli* O157 nelle carni.

CAPITOLO 4 - MATERIALI E METODI

Dal gennaio al marzo 2010, in uno stabilimento di macellazione della provincia di Vercelli, sono stati prelevati complessivamente 398 campioni di contenuto intestinale di bovini da macello appartenenti alle categorie vitellone/bovino adulto, castrato/bovino adulto, vacca e vitello e provenienti da 49 allevamenti, 48 ubicati nelle province piemontesi di Torino, Novara, Cuneo, Asti, Vercelli, Biella e Alessandria e uno nella provincia lombarda di Brescia.

Entro 48 ore dalla macellazione, ogni due settimane, i campioni sono pervenuti tramite trasporto a temperatura di refrigerazione, presso il Laboratorio di Microbiologia degli Alimenti dell'Università di Padova. In questa sede sono state condotte tutte le analisi per rilevare la presenza di *E. coli* verocitotossici, in particolare del sierotipo O157:H7, quello più frequentemente implicato nelle infezioni enteriche dell'uomo. Le analisi svolte comprendono test biochimici (API 20E) e sierologici (*Dryspot E. coli* O157 latex test) per verificare nella maniera più precisa possibile la presenza dei suddetti batteri nel campione. Tutte le operazioni svolte, ad eccezione della raccolta dei campioni, sono state effettuate sotto cappa aspirante o biologica, nel caso dei test biochimici, in quanto questi ultimi test contengono componenti di origine animale e i controlli sull'origine e/o sullo stato sanitario degli animali non possono garantire in maniera assoluta che questi prodotti non contengano nessun agente patogeno trasmissibile all'operatore. Inoltre, si utilizzano sempre camice e guanti sterili.

I campioni di ogni partita sono stati raggruppati in pool costituiti da un numero variabile da 5 a 8 campioni, tenendo conto della categoria produttiva (vitellone/bovino adulto, castrato/bovino adulto, vacca, vitello).

Le analisi si suddividono nelle seguenti fasi:

- arricchimento
- separazione e concentrazione
- isolamento
- conferma
- conservazione

4.1 - Arricchimento

I campioni sono stati posti all'interno di 12 sacchetti di plastica, ciascuno contenente un pool, in quanto le postazioni del rotore *Dynal® sample mixer* sono 12. Ogni sacchetto aveva un peso complessivo di circa 5 g di feci con l'aggiunta di 90 ml di brodo di arricchimento in modo da garantire la sopravvivenza dei batteri contenuti nelle feci, favorirne la moltiplicazione ed eliminare i batteri diversi da *E. coli* o simili. Inizialmente era stato scelto l'*EC Broth* (Oxoid), successivamente si è utilizzato il brodo TSB (*Tryptone Soy Broth*, Oxoid), ottenuto secondo la SOP (Procedura Operativa Standard) n. 001, per provare ad estrarre un maggior numero di batteri. In seguito, si è poi ritornati all'utilizzo dell'*EC Broth*, in quanto non vi sono stati miglioramenti con l'impiego del brodo TSB. L'*EC Broth* è un terreno liquido per il conteggio dei coliformi fecali e non fecali nelle acque, negli alimenti e in altri campioni. Il TSB, invece, è un terreno d'uso generale che supporta la crescita di una grande varietà di microrganismi. Per le sue caratteristiche nutrizionali, per l'assenza di inibitori, per la possibilità di aggiungere come supplemento composti diversi, si presta bene per l'isolamento dei patogeni. E' utilizzato per la coltivazione di microrganismi anaerobi, aerobi facoltativi, inclusi alcune muffe e, aggiungendo agar a concentrazioni di 0,1-0,2%, per la coltivazione degli anaerobi obbligati. Sia l'*EC Broth* che il TSB sono stati addizionati con un antibiotico, la novobiocina, attiva contro batteri cocchi Gram-positivi (enterococco, stafilococco e pneumococco). La novobiocina è conservata in forma di polvere (la dose per ogni litro di brodo è di 20 µg) e per ricostituirla si aggiungono 2 ml di acqua distillata sterile per ogni dose.

I sacchetti sono poi stati posti ad incubare a 32° C per 24 ore.

4.2 - Separazione e concentrazione

Trascorse le 24 ore di incubazione, è stata effettuata la separazione di *E. coli* O157 dal brodo di arricchimento, come previsto dalla norma ISO 16654:2001. La procedura viene condotta mediante separazione immunomagnetica utilizzando microsferi rivestite di anticorpi, le

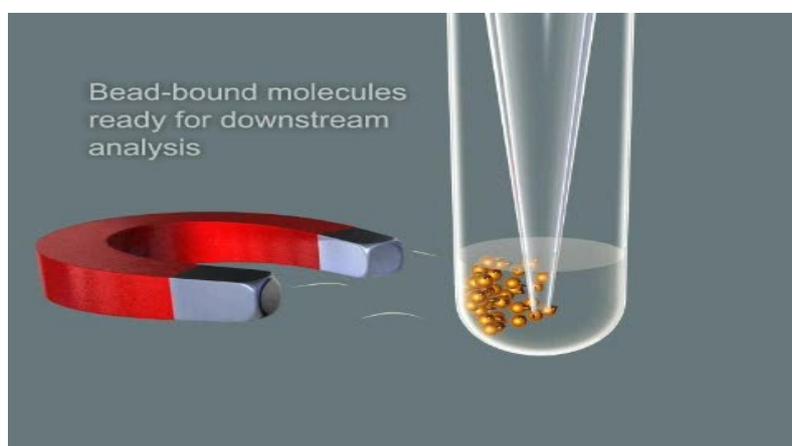


Illustrazione 4: Immunoseparazione

Dynabeads® anti- E. coli O157 (Invitrogen Dynal). Le *Dynabeads®* sono particelle supermagnetiche sulle quali sono adsorbiti anticorpi diretti contro diversi antigeni di *E. coli* O157. L'uso di tali particelle, assieme ad una barra magnetica, permette di isolare dal mezzo di coltura le sole cellule legate agli anticorpi. La sensibilità dei tradizionali metodi di coltura può migliorare significativamente utilizzando l'immuno-separazione.

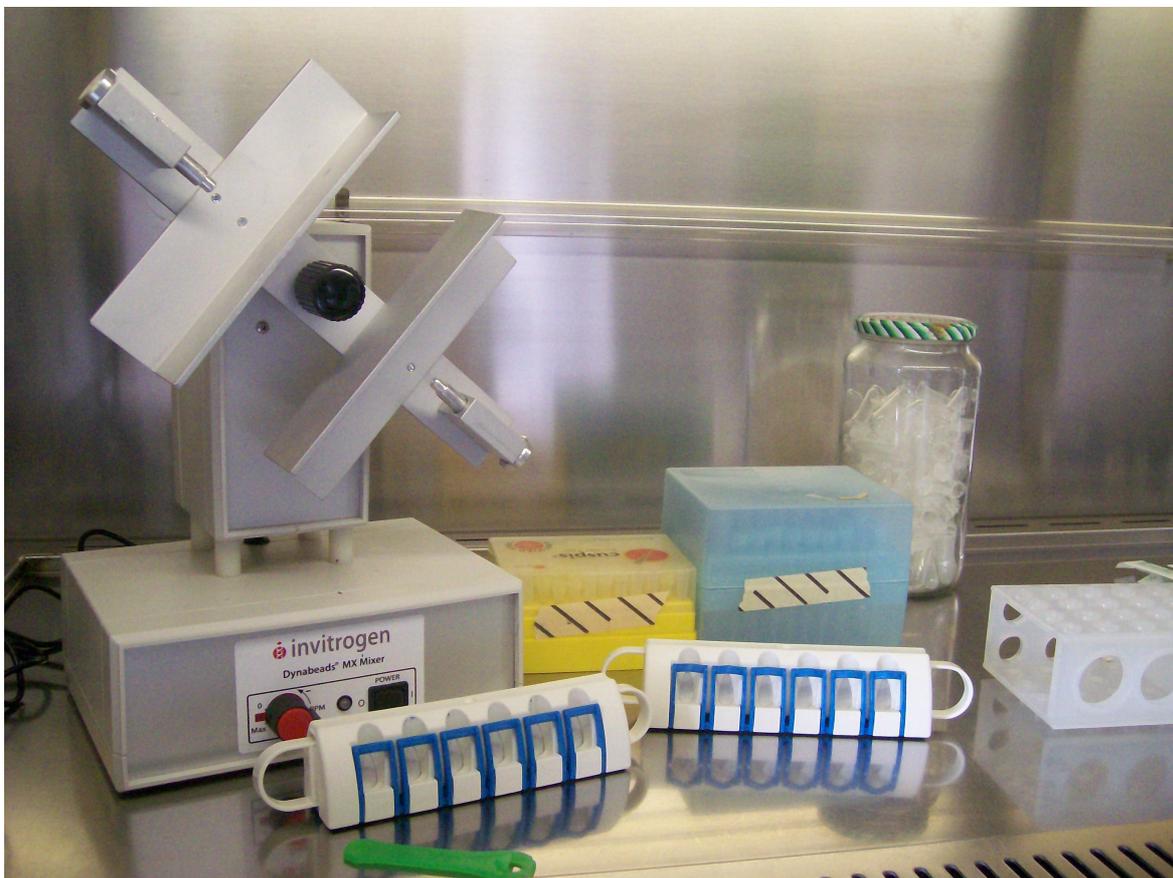


Illustrazione 5: Rotore e rack utilizzati per l'immunoseparazione (Invitrogen Dynal)

Le operazioni sono state condotte seguendo la SOP n. 010. La procedura inizia ponendo all'interno della cappa aspirante il rotore, il rack per la concentrazione delle particelle, i campioni e un numero di provette da 2 ml pari al numero dei campioni, quindi in questo caso sono state utilizzate 12 provette. Ciascuna provetta viene marcata con il codice del campione corrispondente e si depone 1 ml di ogni campione in ciascuna provetta. Dopo aver preso dal frigorifero le provette contenenti le *Dynabeads® anti-E. Coli O157*, si depongono 20 μ l di *Dynabeads®* in ogni provetta. Si prende il rack e si estrae la barra magnetica, si inserisce la provetta nel rack e si monta il rack sul rotore. Quindi si avvia la rotazione, che viene mantenuta per 30 minuti a velocità intermedia. Trascorso il tempo necessario, si toglie il rack dal rotore, si inserisce la barra magnetica nel rack e si mescola

per inversione tre volte. Il campione, quindi, viene lasciato incubare per 3 minuti a temperatura ambiente. Successivamente si preleva il surnatante e si estrae la barra magnetica; si depongono 1 ml di PBS in ciascuna provetta. Il PBS (*Phosphate Buffered Saline*) è un tampone isotonic a pH 7.2, che viene impiegato per la sospensione e la diluizione di microorganismi non esigenti. Consente il lavaggio delle cellule senza danneggiarle.

Dopo aver aggiunto il PBS, si mescola per inversione tre volte, si inserisce la barra magnetica nel rack e si incuba nuovamente per 3 minuti a temperatura ambiente.

Successivamente si ripetono per due volte i seguenti passaggi:

- prelevare il surnatante
- estrarre la barra magnetica
- deporre 1 ml di PBS in ciascuna provetta
- mescolare per inversione tre volte
- incubare per 3 minuti a temperatura ambiente

Dopo aver eseguito questi passaggi, si preleva il surnatante, si estrae la barra magnetica e si depongono 100 µl di PBS in ciascuna provetta.

4.3 - Isolamento

Ogni campione viene mescolato con il vortex e poi si seminano 50 µl della sospensione così ottenuta su una piastra di CT-SMAC (*Cefixime Tellurite Sorbitol MacConkey Agar*, Oxoid, terreno raccomandato per l'isolamento di *Escherichia coli* O157:H7), mediante



Illustrazione 6: Terreno CT-SMAC raccomandato per l'isolamento di E. coli O157:H7

semina in quattro quadranti, che è una tecnica di semina che prevede appunto la divisione della piastra in quattro quadranti; nel primo quadrante viene seminato l'inoculo tal quale, mentre nei successivi viene prelevata una parte del quadrante precedente e seminata. Questa tecnica permette di ridurre la concentrazione dei batteri del primo quadrante fino ad ottenere colonie singole, nel quarto quadrante.

quadrante.

Le piastre vengono poi lasciate incubare per 24 ore a 37° C.

4.4 - Conferma

Le piastre che presentano colonie sorbitolo negative (incolori, in quanto *E. coli* O157:H7 non fermenta il sorbitolo) vengono valutate tramite test biochimico (API20E, Biomérieux) e test sierologico (test di agglutinazione al lattice, *Dryspot E. coli* O157 Latex Test, Oxoid).

4.4.1 - Test biochimici

L'API20E è un sistema standardizzato di identificazione delle Enterobacteriaceae e di altri bacilli Gram-negativi non esigenti e comprende 21 test biochimici miniaturizzati, oltre ad una base dati specifica. La galleria API è costituita da 20 microprovette contenenti substrati disidratati. Le reazioni prodotte durante il periodo di incubazione si traducono in viraggi di colore spontanei o rilevati dall'aggiunta di reattivi.



Illustrazione 7: Galleria API20E

- Preparazione della galleria: si riunisce fondo e coperchio di una vaschetta di incubazione e si distribuiscono circa 5 ml di acqua distillata o demineralizzata (o semplicemente acqua senza additivi o derivati che potrebbero liberare gas, come ad esempio Cl_2 , CO_2 , ecc.) nei pozzetti per creare un ambiente umido. Si annota il riferimento del ceppo sulla linguetta laterale della vaschetta, si estrae la galleria dal suo involucro e la si mette nella vaschetta di incubazione.
- Preparazione dell'inoculo: si apre una fiala di API NaCl 0,85% Medium (5 ml) o una fiala API Suspension Medium (5 ml). Servendosi di una pipetta, si preleva una sola colonia batterica ben isolata dal terreno usato per la coltura dei batteri, utilizzando preferibilmente colonie giovani (18-24 ore di crescita). Si mescola adeguatamente per ottenere una sospensione batterica omogenea, che deve essere utilizzata immediatamente dopo la preparazione.
- Inoculo della galleria: si riempiono microprovette e cupole dei test CIT, VP e GEL con la sospensione batterica servendosi della pipetta usata per il prelievo. Si riempiono, poi, solo le microprovette (e non le cupole) degli altri test. Si crea, quindi, un'anaerobiosi nei test ADH, LDC, ODC, H_2S e URE riempiendo le cupole con olio di paraffina. Si richiude la vaschetta di incubazione e si lascia incubare a

36° C +/- 2° C per 18-24 ore.

- Lettura della galleria: dopo l'incubazione la lettura viene effettuata servendosi della Tabella di Lettura. Se tre o più test (test GLU + o -) sono positivi, si annotano sulla scheda di registrazione dei risultati tutte le reazioni spontanee, quindi si procede con i test che richiedono l'aggiunta dei reattivi:

-Test TDA: si aggiunge una goccia di reattivo TDA. Una colorazione marrone-rossastra indica una reazione positiva.

-Test IND: si aggiunge una goccia di reattivo JAMES. Una colorazione rosa che si diffonde in tutta la cupola indica una reazione positiva.

-Test VP: si aggiunge una goccia dei reattivi VP1 e VP2. In questo caso è necessario attendere almeno 10 minuti. Un colore rosa o rosso indica una reazione positiva. Una debole colorazione rosa che appaia dopo i 10 minuti deve essere considerata negativa. Il test di ricerca della produzione dell'indolo deve essere eseguito alla fine, poiché questa reazione libera gas che potrebbe alterare l'interpretazione di altri test della galleria.

Se invece il numero dei test positivi è inferiore a tre (compreso GLU), non si aggiungono i reattivi, ma si mette ad incubare nuovamente la galleria per altre 24 ore. Successivamente si rilevano i test che necessitano dell'aggiunta dei reattivi; per completare l'identificazione può essere utile eseguire dei test complementari.

- Interpretazione: l'identificazione si ottiene partendo dal profilo numerico; sulla scheda dei risultati i test sono separati in gruppi di tre e a ciascuno viene attribuito un valore pari a 1, 2 o 4. Aggiungendo all'interno di ogni gruppo i valori corrispondenti alle reazioni positive ed essendo la galleria API costituita da 20 postazioni, si ottengono alla fine sette cifre. Quando, poi, si ha una positività alla reazione dell'ossidasi, che costituisce il ventunesimo test, le si attribuisce il valore 4. L'identificazione viene, quindi, effettuata utilizzando il profilo numerico (si ricerca il profilo numerico nella lista dei profili) oppure si ottiene tramite il software di identificazione (si digita sulla tastiera il profilo numerico a sette cifre). Talvolta però il profilo numerico a sette cifre non risulta sufficiente e quindi diventano necessari ulteriori test:

-Riduzione dei nitrati in nitriti (NO_2) e azoto (N_2): si aggiunge una goccia dei reattivi Nit 1 e Nit 2 nel microtubo GLU. Si attendono dai 2 ai 5 minuti; una colorazione rossa indica una reazione positiva per la produzione dei nitriti. Una reazione negativa (colorazione gialla) può essere dovuta alla produzione di azoto (eventualmente segnalata dalla presenza di microbolle); si aggiungono, quindi, 2-3

mg di reattivo Zn nella cupola GLU. Se dopo 5 minuti il tubo rimane giallo, la reazione è positiva per la produzione di azoto, se, invece, la cupola è arancio-rossa la reazione è negativa (i nitrati ancora presenti nel tubo sono stati ridotti a nitriti dallo zinco). Questa reazione potrebbe essere interessante per identificare i bacilli Gram-negativi ossidasi positivi. Il test di riduzione dei nitrati deve essere eseguito alla fine per le stesse ragioni del test dell'indolo.

-Mobilità (MOB): si inocula una fiala di API M Medium.

-Ossidazione del glucosio (OF-O): si inocula una fiala di API OF Medium.

-Fermentazione del glucosio (OF-F): si inocula una fiala di API OF Medium.

Questi test complementari possono essere utilizzati per costituire un profilo a nove cifre, identificabile con il software di identificazione.

4.4.2 - Test sierologici

Il *Dryspot E. coli O157 Latex Test* è un test di agglutinazione al lattice usato per l'identificazione di *E. coli* sierogruppo O157 (identifica, mediante agglutinazione su vetrino, i ceppi di *E. coli* che possiedono l'antigene del sierogruppo O157). Il test fornisce migliori risultati se utilizzato in associazione con il *Sorbitol MacConkey Agar* o con il *Sorbitol MacConkey Agar* supplementato con *Cefixime Tellurite Supplement*.

Il materiale compreso nel kit commerciale è costituito principalmente da cartoncini di reazione *Dryspot E. coli O157*, strip di controllo positivo (spot rosa) e strip di controllo negativo (spot verdi). Il prodotto generalmente viene conservato in frigorifero, quindi bisogna lasciare che le bustine raggiungano la temperatura ambiente prima di aprirle, al fine di impedire la formazione di condensa sui cartoncini. I reagenti essiccati, infatti, se assorbono umidità, possono deteriorarsi e fornire risultati falsati. Dopo aver aperto la bustina, si raccomanda di eseguire il test entro 10 minuti.



Illustrazione 8: *Dryspot E. coli O157 Latex Test*

Gli stick di controllo essiccati devono essere utilizzati ogni volta prima dell'esecuzione delle analisi, per verificare il corretto funzionamento del reagente al lattice. Si aggiunge una goccia (50 µl) di soluzione fisiologica sterile nel piccolo cerchio posto alla base dell'area ovale di reazione. Si preleva dalla busta una strip di controllo positivo e si stacca uno stick, avendo cura di non toccare l'estremità flessibile dove sono localizzati gli spot essiccati. Si ruota lo stick in

modo da avere gli spot colorati rivolti verso il basso e lo si pone sul cartoncino con gli spot a contatto con la soluzione fisiologica. Quindi si mescola con movimento circolare per 10 secondi per reidratare il reagente essiccato; continuando ad usare lo stick, si mescola la soluzione nel reagente test *Dryspot O157*, finché tutti i reagenti non risulteranno perfettamente reidratati ed omogenei. Si ruota il cartoncino e si osserva se avviene l'agglutinazione. Il procedimento viene ripetuto utilizzando uno stick di controllo negativo. Il controllo positivo deve mostrare agglutinazione entro 1 minuto di reazione con il reagente essiccato, mentre il controllo negativo non deve evidenziare nel primo minuto alcuna agglutinazione.

Si procede, quindi, con l'esecuzione del test. Si aggiunge una goccia (50 µl) di soluzione fisiologica sterile (0,9%) nei cerchi piccoli predisposti alla base di ciascun ovale, sia nelle aree del test, che nelle aree di controllo, assicurandosi che il liquido non si mescoli con il

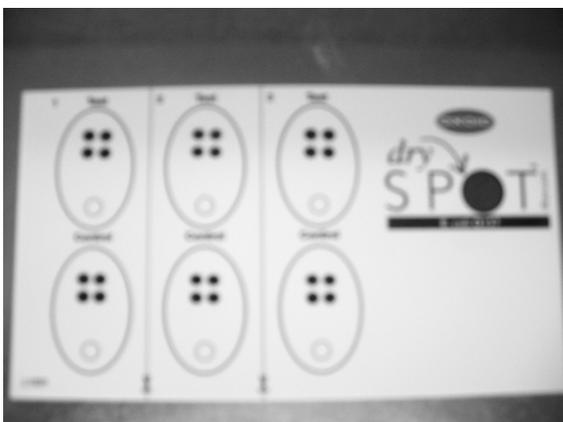


Illustrazione 9: *Dryspot E. coli O157 Latex Test*

reagente al lattice essiccato. Usando un'ansa o i bastoncini di miscelazione forniti dal kit, si preleva da una piastra del terreno di coltura una porzione significativa della colonia sospetta, che viene poi emulsionata adeguatamente con la goccia di soluzione fisiologica, assicurandosi che la sospensione così ottenuta risulti omogenea.

Quindi si mescola, sempre con l'ausilio di un'ansa o con un bastoncino di miscelazione, la sospensione con gli spot di lattice essiccato finché non si sono completamente sospesi e si spande la miscela sull'intera area di reazione. Usando una seconda ansa o un nuovo bastoncino di miscelazione, si ripete lo stesso procedimento usando il lattice di controllo. Infine, si ruota il cartoncino per 60 secondi e si osserva, in condizioni di luce normale, se interviene l'agglutinazione. Non bisogna utilizzare lenti di ingrandimento per la lettura.

Lettura e interpretazione dei risultati:

-Risultato positivo: interviene agglutinazione delle particelle di lattice entro 1 minuto. Il risultato positivo indica la presenza di *E. coli* sierogruppo O157. Il test di controllo non deve presentare agglutinazione (risultato negativo) per confermare la positività del test.

-Risultato negativo: assenza di agglutinazione entro 1 minuto. La colorazione blu di fondo dell'area di reazione rimane invariata ed omogenea.

Eventuali reazioni di agglutinazione tardive (oltre i 60 secondi) devono essere ignorate.

I risultati del test non possono essere interpretati se il reagente di controllo mostra agglutinazione; questa evidenza indica che la coltura causa autoagglutinazione, infatti il reagente di controllo è utilizzato per verificare che la colonia non appartenga ad un ceppo autoagglutinante.

Occasionalmente, si possono osservare reazioni granulari o di natura viscosa.

4.5 - Conservazione

Le colonie risultate positive ai test precedenti vengono conservate per usi futuri tramite il sistema *Microbank™* (Pro-lab Diagnostics), costituito da provette sterili contenenti sfere porose che servono da mezzo di supporto per i microorganismi.

Si inizia la procedura marcando ciascuna fiala con il codice del ceppo corrispondente, che deve essere sempre uno solo. In condizioni asettiche, si apre il tappo a vite della provetta e si inocula nel brodo crioconservante una colonia giovane (di circa 18-24 ore di crescita), prelevata con una spatola da una coltura pura, fino a raggiungere una torbidità pari a 3-4 gradi della scala McFarland. Dopo aver chiuso il tappo della provetta, la si inverte per tre o quattro volte in modo da emulsionare adeguatamente la sospensione di microorganismi (non utilizzare il vortex). A questo punto, i microorganismi sono legati alla superficie porosa delle sfere; si elimina il liquido crioconservante in eccesso, lasciando le sfere il più possibile asciutte. Si registra il codice del ceppo sulla griglia fornita oppure su un altro mezzo permanente di registrazione. La provetta inocolata viene, quindi, conservata a -80° C.



Illustrazione 10: Microbank™ (Pro-lab Diagnostics)

CAPITOLO 5 – RISULTATI

Dal 20 gennaio al 16 marzo 2010 sono stati prelevati, in uno stabilimento di macellazione della provincia di Vercelli, scelto per l'elevato carico di macellazione (400-450 bovini/giorno), complessivamente 398 campioni di contenuto intestinale di bovini da macello appartenenti alle categorie vitellone/bovino adulto (torelli interi o femmine di razze da carne o a duplice attitudine, macellati in età compresa tra 12 mesi e 24-26 mesi), castrato/bovino adulto, vacca/bovino adulto (bovina adulta dopo i tre anni d'età o oltre il sesto mese di gravidanza) e vitello (maschio delle razze da latte o femmine eccedenti la rimonta delle razze da latte o a duplice attitudine, alimentati solo con sostitativi del latte e macellati a 4-6 mesi d'età). I campioni provenivano da 49 allevamenti, 48 ubicati nelle province piemontesi di Torino (20 allevamenti), Cuneo (17 allevamenti), Novara (4 allevamenti), Vercelli (3 allevamenti), Biella (2 allevamenti), Asti (1 allevamento) e Alessandria (1 allevamento) e uno nella provincia lombarda di Brescia.

Entro 48 ore dalla macellazione, ogni due settimane, i campioni sono pervenuti tramite trasporto a temperatura di refrigerazione, presso il Laboratorio di Microbiologia degli Alimenti dell'Università di Padova.

Le date in cui i campioni sono pervenuti sono state il 20/1/2010 (85 campioni), il 3/2/2010 (82 campioni), il 17/2/2010 (79 campioni), il 3/3/2010 (81 campioni) e il 16/3/2010 (71 campioni).

La tabella 2 riassume le aziende dalle quali provengono i campioni di contenuto intestinale di bovino prelevati al macello in ciascuna delle date prese in esame, la provincia d'origine dell'allevamento, la data d'arrivo presso il Laboratorio di Microbiologia degli Alimenti dell'Università di Padova e il numero di campioni prelevati per ciascuna azienda.

Tabella 2a - Sono riportate le aziende prese in esame, indicando anche la provincia nella quale sono ubicate, e il numero di campioni confluiti al laboratorio nelle date nelle quali sono state effettuate le prove.

AZIENDA	PROVINCIA D'ORIGINE	DATA D'ARRIVO	NUMERO DI CAMPIONI
Azienda 1	Torino	20/1/2010	6
		16/3/2010	5
Azienda 2	Torino	20/1/2010	19
Azienda 3	Novara	20/1/2010	7
		3/2/2010	2
		3/3/2010	9
Azienda 4	Cuneo	20/1/2010	7
Azienda 5	Brescia	20/1/2010	26
Azienda 6	Torino	20/1/2010	4
		17/2/2010	4
Azienda 7	Torino	20/1/2010	8
Azienda 8	Torino	20/1/2010	2
		3/2/2010	3
		3/3/2010	4
Azienda 9	Torino	20/1/2010	1
		17/2/2010	5
		3/3/2010	4
Azienda 10	Torino	20/1/2010	1
Azienda 11	Cuneo	20/1/2010	1
Azienda 12	Asti	20/1/2010	1
Azienda 13	Torino	20/1/2010	2
		17/2/2010	4
		3/3/2010	1
Azienda 14	Cuneo	3/2/2010	4
		3/3/2010	3
Azienda 15	Torino	3/2/2010	3
		17/2/2010	3
Azienda 16	Cuneo	3/2/2010	2
Azienda 17	Torino	3/2/2010	1
Azienda 18	Novara	3/2/2010	6
Azienda 19	Torino	3/2/2010	6
Azienda 20	Vercelli	3/2/2010	2

(continua)

(Segue)

Tabella 2b - Sono riportate le aziende prese in esame, indicando anche la provincia nella quale sono ubicate, e il numero di campioni confluiti al laboratorio nelle date nelle quali sono state effettuate le prove.

AZIENDA	PROVINCIA D'ORIGINE	DATA D'ARRIVO	NUMERO DI CAMPIONI
Azienda 21	Cuneo	3/2/2010	2
		3/3/2010	3
Azienda 22	Biella	3/2/2010	1
Azienda 23	Cuneo	3/2/2010	10
		3/3/2010	3
Azienda 24	Alessandria	3/2/2010	7
Azienda 25	Cuneo	3/2/2010	9
Azienda 26	Vercelli	3/2/2010	25
		17/2/2010	7
Azienda 27	Cuneo	17/2/2010	2
Azienda 28	Torino	17/2/2010	1
Azienda 29	Torino	17/2/2010	5
Azienda 30	Torino	17/2/2010	10
Azienda 31	Torino	17/2/2010	3
Azienda 32	Torino	17/2/2010	1
Azienda 33	Novara	17/2/2010	3
		3/3/2010	2
Azienda 34	Cuneo	17/2/2010	5
		3/3/2010	5
Azienda 35	Cuneo	17/2/2010	15
Azienda 36	Torino	17/2/2010	10
Azienda 37	Biella	17/2/2010	1
Azienda 38	Cuneo	3/3/2010	4
Azienda 39	Cuneo	3/3/2010	1
Azienda 40	Torino	3/3/2010	5
Azienda 41	Cuneo	3/3/2010	1
Azienda 42	Cuneo	3/3/2010	2
Azienda 43	Cuneo	3/3/2010	1
Azienda 44	Novara	3/3/2010	4
Azienda 45	Vercelli	3/3/2010	5
		16/3/2010	50
Azienda 46	Cuneo	16/3/2010	12

(continua)

(Segue)

Tabella 2c - Sono riportate le aziende prese in esame, indicando anche la provincia nella quale sono ubicate, e il numero di campioni confluiti al laboratorio nelle date nelle quali sono state effettuate le prove.

AZIENDA	PROVINCIA D'ORIGINE	DATA D'ARRIVO	NUMERO DI CAMPIONI
Azienda 47	Torino	3/3/2010	11
Azienda 48	Cuneo	3/3/2010	1
Azienda 49	Torino	16/3/2010 (1)	5

(1) In data 16/3/2010 per 11 campioni di contenuto intestinale di bovino non si è potuto determinare l'azienda d'origine e la categoria produttiva dell'animale, in quanto l'etichetta identificativa non era presente o non era correttamente leggibile.

La positività del campione fecale è stata rilevata tramite inoculazione del campione, dopo la fase di arricchimento (in *EC Broth* o TSB, entrambi addizionati con novobiocina) e di separazione immuno-magnetica (*Dynabeads® anti- E. coli O157*, Invitrogen Dynal), su piastre di terreno CT-SMAC (*Cefixime Tellurite Sorbitol MacConkey Agar*, Oxoid) tramite la tecnica di semina in quattro quadranti. La positività registrata riguarda i campioni di contenuto intestinale di bovino da cui sono state isolate colonie aventi caratteristiche morfologiche tipiche per *E. coli* O157, in particolare quelle che sono risultate incolori, ossia negative alla fermentazione del sorbitolo su CT-SMAC (in quanto *E. coli* O157:H7 non è in grado di fermentarlo). Questi campioni sono stati, poi, valutati tramite test biochimico (API20E, Biomérieux) e test sierologico (test di agglutinazione al lattice, *Dryspot E. coli O157 Latex Test*, Oxoid): sono risultati positivi al test di agglutinazione al lattice sensibilizzato con anticorpi specifici nei confronti dell'antigene del sierogruppo O157 di *E. coli* e quasi tutti, eccetto un campione, sono risultati positivi alla produzione di indolo. I campioni che hanno dato un risultato positivo sono stati in tutto 9 (2,26% dei campioni, su un totale di 398): 4 campioni in data 20/1/2010, tutti provenienti dall'azienda 2, ubicata nella provincia di Torino, e 5 campioni in data 3/2/2010, di cui uno proveniva dall'azienda 18 e 4 provenivano dall'azienda 19, anch'esse entrambe ubicate nella provincia di Torino. Quindi sono risultati positivi 3 allevamenti su un totale di 49 esaminati (pari al 6,12%). Tutte e tre le aziende sono state testate una sola volta; comunque i campionamenti sono stati effettuati tutti in maniera casuale senza considerare l'azienda d'origine, la categoria produttiva dell'animale e il numero di campioni prelevati per ciascuna azienda. Infatti, per alcune di esse, i campioni di contenuto intestinale sono stati prelevati in due o più giorni diversi. Per quanto riguarda la categoria produttiva dell'animale, i primi 4 campioni appartengono alla categoria vitellone/bovino adulto, mentre gli altri 5 alla categoria vacca/bovino adulto. Questo dato ci conferma la maggiore prevalenza di *E. coli* O157 negli animali adulti, che sono più frequentemente portatori asintomatici dell'infezione rispetto ai vitelli, infatti nessun campione di feci di vitello è stato riscontrato positivo per *E. coli* O157.

Grafico 1 – Si indica la prevalenza dei campioni positivi rispetto ai campioni negativi.

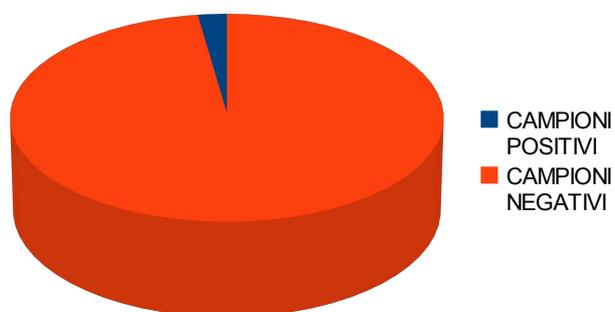


Grafico 2 – Si indica la prevalenza di aziende positive rispetto alle aziende negative.

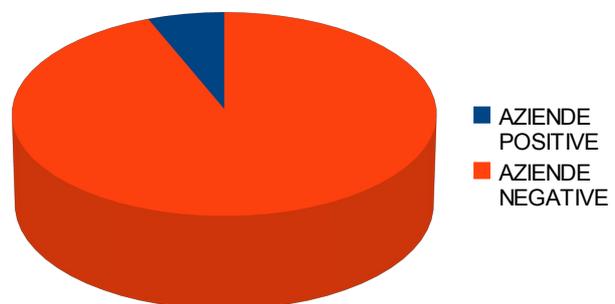


Tabella 3 - Riferimenti anagrafici dei campioni risultati positivi.

N° CAMPIONE	DATA D'ARRIVO	AZIENDA	PROVINCIA D'ORIGINE	CATEGORIA PRODUTTIVA
Campione 16	20/1/2010	Azienda 2	Torino	Vitellone
Campione 19	20/1/2010	Azienda 2	Torino	Vitellone
Campione 20	20/1/2010	Azienda 2	Torino	Vitellone
Campione 28	20/1/2010	Azienda 2	Torino	Vitellone
Campione 170	20/1/2010	Azienda 19	Torino	Vacca
Campione 173	20/1/2010	Azienda 19	Torino	Vacca
Campione 177	20/1/2010	Azienda 18	Torino	Vacca
Campione 179	20/1/2010	Azienda 19	Torino	Vacca
Campione 182	20/1/2010	Azienda 19	Torino	Vacca

I campioni che hanno dato luogo a colonie incolori su CT-SMAC, quindi sorbitolo negative, come già detto, sono stati testati tramite test di agglutinazione al lattice (test sierologico) e tramite test biochimico API20E. Il test di agglutinazione al lattice è un test quantitativo, che fornisce nell'arco di un minuto una risposta positiva o negativa. L'API20E, invece, comprende 21 test biochimici, nei quali il campione viene posto in contatto con diversi substrati specifici; le reazioni prodotte durante il periodo di incubazione (il test, infatti richiede tempi più lunghi rispetto al precedente) si traducono in viraggi di colore spontanei o rilevati dall'aggiunta di reattivi. Nella tabella 4 sono stati riassunti i risultati del test; l'identificazione del batterio viene, poi, effettuata a partire dal profilo numerico a sette cifre, che si ottiene compilando la scheda dei risultati, che viene ricercato nella lista dei profili oppure si ottiene tramite il software di identificazione (si digita sulla tastiera il profilo numerico a sette cifre).

Tabella 4 - Si indicano la positività/negatività ai singoli test biochimici API20E per ciascun campione fecale sorbitolo negativo. IND, VP e GEL (in giallo) sono i test per i quali si sono trovate differenze tra i campioni.

	NUMERO DEL CAMPIONE								
	16	19	20	28	170	173	177	179	182
ONPG	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ADH	+	+	+	+	+	+	+	+	+
LDC	+	+	+	+	+	+	+	+	+
ODC	+	+	+	+	+	+	+	+	+
CIT	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-
URE	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TDA	-	-	-	-	-	-	-	-	-
IND	+	+	+	+	+	+	-	+	+
VP	-	-	-	-	+	+	+	+	+
GEL	-	-	-	-	-	-	-	+	-
GLU	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MAN	+	+	+	+	+	+	+	+	+
INO	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SOR	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RHA	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SAC	+	+	+	+	+	+	+	+	+
MEL	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AMY	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ARA	+	+	+	+	+	+	+	+	+
OX	-	-	-	-	-	-	-	-	-

CAPITOLO 6 – DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

6.1 - Discussione

Lo studio ha evidenziato una bassa prevalenza di portatori asintomatici di *E. coli* O157:H7 tra i bovini da macello provenienti dagli allevamenti piemontesi e dall'allevamento lombardo presi in esame. Questi dati sono, tuttavia, in accordo con i risultati ottenuti in studi condotti negli anni passati in altri paesi. In particolare, alcune ricerche del batterio tramite immuno-separazione magnetica effettuate utilizzando come substrato la carne bovina macinata hanno evidenziato una prevalenza più bassa rispetto a quella trovata nel nostro laboratorio in diversi paesi europei: 1,1% in Olanda (Heuvelink *et al.*, 1999), 1,5% e 0,4% in Inghilterra (Champan *et al.*, 2000; Champan *et al.*, 2001), 0,2% in Scozia (Coia *et al.*, 2001), mentre Wasteson e Lassen (1998) in Norvegia e Lindqvist *et al.* (1998) in Svezia non hanno trovato il microorganismo. Invece, una percentuale di contaminazione più elevata (3,8%) è stata riportata in Argentina (Chinen *et al.*, 2001), paese nel quale l'incidenza annuale della sindrome emolitico-uremica nei bambini è particolarmente elevata (Tozzi *et al.*, 2001).

Inoltre, i bassi livelli di contaminazione sono in accordo anche con i dati relativi all'incidenza dell'infezione da *E. coli* verocitotossici nell'uomo nel nostro paese (Caprioli e Tozzi, 1998; Tozzi *et al.*, 2003), che è risultata ridotta. Tuttavia, i bassi livelli di contaminazione non sono sempre correlati ad una limitata incidenza dell'infezione, infatti, anche in Gran Bretagna la percentuale di contaminazione rilevata da alcuni studi è risultata contenuta (Little e de Louvois, 1998; Chapman *et al.*, 2000; Champan *et al.*, 2001; Coia *et al.*, 2001), ma in questo paese l'incidenza di infezioni da *E. coli* O157 è piuttosto elevata (Smith *et al.*, 1998). Questi risultati suggeriscono che anche altre possibili fonti di infezione potrebbero essere importanti; dati epidemiologici mettono in evidenza che l'infezione potrebbe derivare non solo dal consumo di alimenti di origine animale, ma anche dal consumo di frutta e verdura, dal contatto con animali (come hanno riportato alcuni studi canadesi, effettuati nel 1996 da Wilson *et al.* e da Mac Donald *et al.*, che hanno evidenziato un rischio maggiore di contrarre l'infezione nei soggetti in continuo contatto con il bestiame e appartenenti alle aree rurali), dall'ingestione o dal contatto con acque contaminate (nelle quali il patogeno può sopravvivere a lungo, anche per diverse settimane, specialmente a basse temperature, come testimoniano alcune epidemie conseguenti all'utilizzo di pozzi o sorgenti contaminati, o dovute all'immersione in acque

non clorate). Queste vie di trasmissione dipendono dalla capacità di *E. coli* O157 di persistere e moltiplicare nelle deiezioni dei ruminanti non sottoposte a processi completi di maturazione, che possono poi essere utilizzate come fertilizzanti, contaminando i vegetali, o disperse nell'ambiente, contaminando il suolo, le fonti idriche e le acque di balneazione (Caprioli *et al.*, 2001). Un'indagine effettuata tra l'autunno del 2005 e la primavera ed estate del 2006 ha valutato la presenza di *E. coli* verocitotossico in deiezioni fresche in allevamenti bovini di alcune province del Veneto, ricercandolo anche nelle vasche di stoccaggio dei liquami (Conedera *et al.*, 2007). La ricerca è stata effettuata su un totale di 188 campioni di liquame fresco (raccolgendo un campione per ciascun allevamento, complessivamente 103 allevamenti di bovini da latte e 85 di bovini da carne); sono stati poi testati tramite immuno-separazione magnetica. VTEC O157 è stato isolato dal 19,7% degli allevamenti, con maggiore prevalenza in quelli di bovini da carne (22,4%), rispetto a quelli da latte (17,5%). Inoltre è stata evidenziata una maggiore prevalenza di allevamenti positivi nel periodo primavera-estate (stagioni nelle quali è segnalata la maggiore escrezione fecale del microorganismo). La presenza di *E. coli* O157 è stata riscontrata anche nei liquami presenti nelle vasche di stoccaggio nel 34,4% degli allevamenti trovati positivi. Questo dato, quindi, indica che il rischio di contaminazione del suolo e delle fonti idriche in caso di spandimento di liquami insufficientemente stoccati non va sottovalutato e che i liquami devono essere sottoposti ad un adeguato periodo di maturazione, che riduce significativamente tale rischio.

Inoltre, uno studio del 2006 (Bonardi *et al.*, 2006), ha riportato che la prevalenza di *E. coli* O157 nei vitelloni macellati in Italia, oscilla tra 0% e 17% e dipende dall'età e dallo stato nutrizionale dei bovini esaminati, dalla stagione dell'anno e dai metodi analitici utilizzati, mentre si sono ottenuti risultati abbastanza contenuti nei prodotti carnei, come, ad esempio, nelle carni macinate; nei vitelli a carne bianca, invece, la prevalenza del microorganismo risulta compresa tra 0% e 0,5% e si ipotizza che questi bassi valori siano riconducibili al frequente utilizzo di alimenti medicati in questa tipologia di allevamento e al fatto che i vitelli vengono trasformati in monogastrici funzionali, alterando probabilmente quelle caratteristiche che fanno della specie bovina il serbatoio naturale dei VTEC (Bonardi *et al.*, 2006). Anche nei vitelli esaminati nella nostra ricerca non si sono riscontrate positività per *E. coli* O157, mentre si conferma una maggiore prevalenza del batterio negli animali adulti, che sono più frequentemente portatori asintomatici dell'infezione. Uno studio condotto da Colavita *et al.* (2008), invece, ha messo in evidenza valori di positività sensibilmente superiori nelle feci e sulle carcasse dei vitelli a carne a bianca esaminati. Questi valori potrebbero essere ricondotti alle modifiche apportate nel

regime alimentare degli animali come effetto della normativa sul benessere dei vitelli, infatti l'aggiunta di fibra alla razione porta allo sviluppo del ruminale e quindi di un ambiente gastroenterico abbastanza simile a quello del vitellone. Anche l'allevamento in "box multipli" porta ad una maggiore possibilità di diffusione del microorganismo tra questi animali.

Per quanto riguarda il metodo utilizzato per la separazione del microorganismo, l'immuno-separazione magnetica (*Dynabeads anti-E. Coli O157*), consente di aumentare notevolmente la sensibilità dei metodi tradizionali di separazione, soprattutto se utilizzata in associazione al terreno CT-SMAC (*Cefixime Tellurite Sorbitol MacConkey Agar*, Oxoid, terreno raccomandato per l'isolamento di *Escherichia coli O157:H7*). Si ottiene, quindi, una riduzione della percentuale di risultati falsi negativi che, con l'immuno-separazione magnetica, sono pari al 2-10% e dipendono dalla quantità di campione inoculata, dalla presenza di una flora microbica competitiva e dalla matrice di provenienza. Con metodi di identificazione che non utilizzano l'immuno-separazione, i risultati falsi negativi aumentano significativamente e spesso superano il 25%. Risultati falsi positivi, invece, di solito non si verificano, in quanto le colonie sospette vengono testate con diversi test di identificazione. Tuttavia questa affermazione è vera solo se si rispettano le buone pratiche di laboratorio e se si evita la cross-contaminazione dei campioni.

Inoltre, anche i tempi di risposta necessari per la determinazione di *E. coli O157:H7* sono inferiori con il metodo immuno-magnetico rispetto ai metodi tradizionali, come riportato nella tabella 5 (Mutti *et al.*, 1998).

Tabella 5 - Confronto fra i tempi di risposta (giorni) necessari per la determinazione di E. coli O157:H7 con i metodi in esame.

METODO DI ANALISI	TEMPI DI RISPOSTA (giorni)
Tradizionale	4-6
Immunomagnetico	3-4

Tuttavia, il sistema tradizionale non comporta particolari difficoltà nell'esecuzione, mentre per l'esecuzione del saggio immunomagnetico sono richieste una buona manualità e precisione. Relativamente al costo delle analisi, il metodo tradizionale e quello immunomagnetico non richiedono particolari investimenti in termini di acquisto delle attrezzature (mentre la spesa per quello immunoenzimatico è più ingente).

La procedura che utilizza le *Dynabeads anti-E. Coli O157* è considerata il metodo di riferimento per le analisi statistiche. Uno studio del 2006 (Aminul Islam *et al.*, 2006) ha confrontato il metodo *Dynabeads anti-E. Coli O157* con il *Vitek Immunodiagnostic Assay System (VIDAS) Immuno-Concentration E. coli O157 (ICE)*, utilizzando 637 campioni di feci e 360 campioni di carne. Il VIDAS ICE è un kit commerciale composto da uno strip contenente il reagente pronto all'uso e SPR (*Solid Phased Recetacle*), che costituisce la fase solida, sulla cui superficie sono adsorbiti specifici anticorpi. Lo studio ha riportato che non vi sono differenze significative nei risultati ottenuti con i due metodi, tuttavia il *Dynabeads anti-E. Coli O157* è meno costoso, ma più laborioso, infatti il processo di concentrazione con questa procedura richiede circa 100 minuti per 30 campioni, mentre tramite l'utilizzo del VIDAS ICE, l'intera immunoconcentrazione viene effettuata in maniera automatica in 40 minuti, per un massimo di 30 campioni (inclusi i controlli). Inoltre, il *Dynabeads anti-E. Coli O157* determina maggiori rischi di cross-contaminazione, mentre il VIDAS ICE è un metodo automatizzato, quindi più veloce, ed è anche più sicuro per l'operatore.

Per quanto riguarda il terreno utilizzato per la coltura del microorganismo, è stato scelto il CT-SMAC (*Cefixime Tellurite Sorbitol MacConkey Agar*, Oxoid) in quanto è un terreno raccomandato per l'isolamento di *Escherichia coli* O157:H7, poiché questo ceppo non è in grado di fermentare il sorbitolo. Lo SMAC è stato il primo terreno di coltura ad essere creato per l'isolamento di EHEC O157; in questo mezzo, il lattosio è sostituito dal sorbitolo e la composizione dei suoi agenti selettivi è stata modificata per migliorare la sua selettività. Le colonie di *E. coli* O157 appaiono incolori sullo SMAC, mentre altri *E. coli* formano delle colonie rosate. Tuttavia, sono stati trovati anche ceppi patogeni di *E. coli* O157 che fermentano il sorbitolo in 24 ore, anche se l'attuale prevalenza di queste varianti non è conosciuta. Il terreno SMAC è stato anche modificato con l'aggiunta di cefixime e tellurito (CT) per migliorarne ulteriormente la selettività. La minima concentrazione inibitoria del CT per EHEC O157 è più elevata rispetto a quella degli altri *E. coli* e degli altri batteri sorbitolo-negativi, come *Aeromonas spp.* e *Plesiomonas spp.* Inoltre, una piccola parte dei ceppi di *E. coli* O157 che fermentano il sorbitolo sono sensibili ad alte concentrazioni di tellurito, quindi non crescono sul CT-SMAC.

Recentemente sono stati messi a punto anche nuovi terreni selettivi a base di sostanze cromogene che permettono di individuare vari gruppi o specie di enterobatteri. Un esempio è il *Chromagar O157*, un terreno di coltura non selettivo per l'isolamento, l'identificazione diretta, la differenziazione e la conta di agenti patogeni del tratto urinario (consente di identificare e differenziare *Escherichia coli* ed enterococchi senza test di conferma). Questi terreni cromogeni consentono di identificare specifici microorganismi senza necessità di isolare le singole colonie per eseguire test di identificazione sfruttando l'attività enzimatica dei batteri stessi, infatti le colonie formate da uno specifico microorganismo sono riconoscibili ad occhio nudo direttamente sulla piastra di coltura grazie alla specifica colorazione che assumono; per esempio, tramite l'impiego del terreno *Chromagar O157* le colonie di *Escherichia coli* O157:H7 si distinguono da quelle di altri coliformi in quanto assumono un colore viola. Inoltre, un ulteriore beneficio derivante dall'utilizzo di terreni cromogeni è la capacità di riconoscere i ceppi di *E. coli* O157 sorbitolo-fermentanti, che, invece, non possono essere distinti dai ceppi non patogeni di *E. coli* tramite terreni contenenti sorbitolo. Questi ceppi sorbitolo-fermentanti sono stati isolati da pazienti umani in Europa e sporadicamente in Australia (Karch e Bielaszewska, 2001; Bettelheim *et al.*, 2002; Friedrich *et al.*, 2002; Alison, 2003). Uno studio effettuato nel 2006 ha confrontato le *performance* del terreno CT-SMAC con quelle del terreno *CT-Chromagar* (Aminul Islam *et al.*, 2006) su un totale di 1.676 campioni: 1.316 campioni di feci e 360 di carne, di origine bovina. Nel caso dei campioni di feci, sistematicamente è stato trovato un numero maggiore di positività con il terreno *CT-Chromagar*, indipendentemente dal metodo di immunoconcentrazione utilizzato (lo stesso studio, già citato in precedenza in questo lavoro, confrontava, infatti, anche il metodo *Dynabeads anti-E. Coli O157* con il VIDAS ICE). Anche per quanto riguarda i campioni di carne sono stati trovati più risultati positivi con il terreno *CT-Chromagar*, ma la differenza tra i due terreni di coltura è statisticamente significativa solo se si utilizza il metodo *Dynabeads anti-E. Coli O157*, ma non se si utilizza il VIDAS ICE per l'immuno-separazione magnetica. Il terreno CT-SMAC è stato comunque scelto in questo lavoro, oltre che per il costo inferiore rispetto al terreno *CT-Chromagar* e ad altri terreni cromogeni, anche perché è il terreno previsto per l'isolamento di *E. coli* O157:H7 dal metodo standardizzato ISO 16654:2001, in uso presso il Laboratorio di Microbiologia degli Alimenti dell'Università di Padova, per campioni di alimenti (e mangimi) e adattato anche a campioni di feci, in quanto non esiste un protocollo specifico per questa tipologia di campioni.

6.2 – Conclusioni

Le infezioni da *E. coli* produttori di verocitotossine rappresentano un serio problema di sanità pubblica in tutti i paesi industrializzati, in particolare USA, Europa, Giappone, Canada e Australia. L'epidemiologia dell'infezione di questi batteri è caratterizzata da alcuni aspetti: il tratto gastroenterico del bovino e di altri animali rappresenta il serbatoio dell'infezione, la trasmissione può avvenire tramite un'ampia varietà di alimenti e la bassa dose infettante determina alte percentuali d'attacco e la possibile trasmissione interpersonale (Bonardi *et al.*, 2006). Per quanto riguarda la bassa dose infettante, saggi microbiologici condotti su lotti di hamburger congelati, che erano stati causa di un focolaio epidemico negli Stati Uniti, hanno stabilito che la carica di *E. coli* O157 per ciascun hamburger era inferiore a 700 organismi prima del processo di cottura, prevedendo, di conseguenza, livelli nettamente più bassi per il prodotto cotto (Bell *et al.*, 1994). In un altro episodio epidemico, in cui il veicolo dell'infezione era un insaccato misto bovino-suino, la dose infettante calcolata è stata inferiore a 50 ufc (unità formanti colonie). Si ritiene, quindi, che valori inferiori a 50-100 ufc siano sufficienti ad indurre quadri morbosi nell'uomo (Caprioli *et al.*, 2001). Inoltre, Tilden *et al.* (1996) hanno addirittura affermato che in alcuni casi di tossinfezione da *E. coli* O157 la quantità di microorganismi assunti con l'alimento non era superiore a 5 ufc.

L'infezione nell'uomo può presentare diversi quadri sintomatologici, in particolare, colite e diarrea emorragica, sindrome emolitico-uremica (SEU) e porpora trombocitopenica trombotica, ma può decorrere anche in maniera asintomatica oppure causare diarrea non emorragica. Sono maggiormente coinvolti i bambini di età inferiore ai sei anni, ma possono essere colpiti anche gli adulti e, in misura minore, soggetti di età superiore ai sessantacinque anni.

Tuttavia, in questo studio si è dimostrato che la prevalenza di *E. coli* O157:H7 nei bovini da macello è bassa e pari al 2,26%, almeno per quanto riguarda le aziende valutate nell'area presa in esame (49 allevamenti bovini nelle province di Torino, Cuneo, Novara, Vercelli, Biella, Alessandria, Asti e Brescia). Questo dato, come già riportato in questo lavoro, conferma anche i risultati ottenuti in precedenti studi ed evidenzia il fatto che negli allevamenti d'origine è stata applicata una corretta gestione aziendale, limitando così la diffusione del patogeno, comunque presente in alcuni soggetti. Quindi, si mette in risalto il ruolo dell'allevatore quale garante della salute umana, capace di applicare norme igieniche idonee. Le positività riscontrate potrebbero essere riconducibili ad errate pratiche di gestione aziendale. Inoltre, non si può escludere il coinvolgimento di insetti e roditori nella

trasmissione di *E. coli* O157 (Hancock *et al.*, 1998; Cizek *et al.*, 1999; Kobayashi *et al.*, 1999).

Tuttavia, anche se l'incidenza delle infezioni da VTEC in ambito europeo è di gran lunga inferiore a quella di altre malattie a trasmissione alimentare, come la salmonellosi e la campilobatteriosi, esse sono comunque estremamente temibili a causa del decorso severo della patologia e delle possibili complicazioni a lungo termine, in particolare la sindrome emolitico-uremica. In questo studio, è stato nuovamente confermato il ruolo del bovino quale portatore asintomatico dell'infezione da VTEC e questo indica che, anche se la prevalenza del batterio è bassa, il rischio sanitario connesso al consumo di latte crudo non pastorizzato o di carni crude o poco cotte (i trattamenti termici, infatti, come cottura o pastorizzazione, inattivano *E. coli*), soprattutto di origine bovina o di altri ruminanti, nel nostro paese non è trascurabile. In generale, per questi alimenti la contaminazione è di tipo primario e avviene durante i processi di macellazione e mungitura (per tutti gli altri alimenti a rischio, e anche per il latte pastorizzato, la contaminazione è di tipo secondario). Per quanto riguarda il consumo di latte crudo, esso è associato, in particolare, ai distributori automatici per la vendita del latte crudo nelle aree adiacenti a supermercati, scuole, parcheggi, centri commerciali, che hanno reso questo prodotto facilmente disponibile al pubblico. Inoltre, il latte crudo non pastorizzato rappresenta anche l'unico alimento associato ai casi di sindrome emolitico-uremica in Italia (Scavia *et al.*, 2009). Pertanto è necessario continuare ad utilizzare strumenti di riduzione del rischio nell'ambito della produzione primaria (in particolare, l'applicazione delle buone prassi igienico-sanitarie, soprattutto nelle fasi di mungitura, stoccaggio e commercializzazione del latte), di comunicazione del rischio e di educazione del consumatore, che deve essere consapevole dei pericoli connessi al consumo del latte crudo e conoscere le corrette modalità di gestione e consumo del prodotto. Comunque, le normative dell'Unione Europea consentono a ciascun Paese membro di vietare o limitare la vendita del latte crudo non pastorizzato; in Italia, è consentita la cessione diretta dal produttore al consumatore finale, nell'ambito del territorio provinciale nel quale è ubicata l'azienda produttrice e nelle province limitrofe. Inoltre, come stabilito dall'Intesa Governo-Regioni del 25 gennaio 2007 in materia di vendita diretta di latte crudo per l'alimentazione umana, il latte deve rispettare i criteri igienico-sanitari previsti dal Regolamento CE 853/2004.

Quindi, è necessaria l'applicazione di misure atte a eliminare il microorganismo dalla catena alimentare (o a ridurre la carica) nelle varie fasi, dalla produzione al consumo degli alimenti. Infatti, la comparsa e la diffusione di infezioni da *E. coli* hanno coinciso con

i cambiamenti radicali introdotti nell'allevamento intensivo degli animali e nelle tecnologie delle industrie alimentari (in particolare, concentrazione delle macellazioni in grandi impianti, lavorazione di grandi quantità di carne di provenienza diversa, grande distribuzione, affermazione di strutture alimentari industriali, movimentazione di grandi quantità di animali, uso di grossi lotti per tipologie di alimenti come la carne macinata). Per eliminare il microorganismo, quindi, bisogna innanzitutto applicare un sistema di tipo *Hazard Analysis Critical Control Points* (HACCP) per individuare i punti da controllare e su cui è possibile intervenire. Il primo punto critico, per le carni, è rappresentato dalla contaminazione delle carcasse in fase di macellazione, per cui una riduzione della contaminazione può essere ottenuta tramite l'applicazione delle buone pratiche di lavorazione, inclusi la legatura delle estremità del tratto gastroenterico prima della rimozione, la pulizia dei coltelli usati durante la macellazione (per immersione in acqua a 82° C), la pulizia sistematica dell'ambiente e il rispetto della catena del freddo. Un importante punto di controllo critico è l'inattivazione al calore del microorganismo; occorre, poi, evitare anche la successiva ricontaminazione dei prodotti cotti con quelli crudi, che, inoltre, è stata causa di numerosi episodi epidemici (Karch *et al.*, 1999). Questo può essere ottenuto attraverso la separazione delle linee di produzione. La marcata acidotolleranza di *E. coli* rende, invece, questo microorganismo resistente ad altri processi di lavorazione, quali la fermentazione e l'essiccamento, rendendo quindi rischiosi i processi di lavorazione che non prevedono un trattamento termico (Caprioli *et al.*, 2001). Per quanto riguarda le tecniche utilizzate, la separazione immuno-magnetica consente di ottenere risultati soddisfacenti in tempi rapidi relativamente alla presenza/assenza di *E. coli* O157:H7 nelle feci di bovino, dopo aver inoculato il campione così ottenuto in un terreno specifico, come il CT-SMAC (*Cefixime Tellurite Sorbitol MacConkey Agar*, Oxoid), e sottoposto a conferma tramite test biochimici (API20E) e sierologici (*Dryspot E. coli O157 Latex Test*). Questa stessa tecnica è stata utilizzata con buoni risultati anche su altre matrici, come il latte, e in generale è raccomandata per il rilevamento di *E. coli* O157 negli alimenti e nei mangimi (metodo standardizzato ISO 16654:2001). Dopo la ricerca di *E. coli* O157 nel contenuto intestinale di bovino, un'ulteriore applicazione dell'immuno-separazione magnetica, che probabilmente si realizzerà nell'immediato futuro, è la ricerca del batterio sulla cute di bovino. Questo progetto è stato presentato in una relazione scientifica dall'*European Food Safety Authority* (EFSA), emessa il 30 ottobre 2009, nella quale si propone di creare un progetto di indagine che intende calcolare, anche in questo caso presso gli stabilimenti di macellazione, la prevalenza della contaminazione da VTEC O157, principalmente sulla pelle dei giovani

bovini (che, si presume, siano il serbatoio più importante di VTEC) e, secondariamente, sul vello di pecora, in quanto la prevalenza documentata di VTEC su pelle e vello è più alta rispetto a quella dei campioni fecali (Teagasc, 2006). Infatti, attualmente non esistono regole o raccomandazioni specifiche valide su tutto il territorio dell'Unione Europea per il monitoraggio di VTEC nelle popolazioni animali e nelle categorie di alimenti a rischio di contaminazione, sebbene molti Stati membri effettuino un monitoraggio (la tipologia di campione prelevata e i metodi analitici utilizzati variano da paese a paese e, talvolta, anche a seconda dell'indagine). Questa mancanza di armonia non può, quindi, darci un quadro chiaro di ciò che avviene a livello europeo relativamente alle infezioni da VTEC nell'uomo di origine alimentare, infatti lo scopo di questo progetto è quello di ottenere dati comparabili tra loro dai singoli Stati membri. I campioni di cute di bovino e vello di pecora prelevati al macello possono essere indicativi del rischio di contaminazione delle carcasse prima dello scuoiamento e quindi di una contaminazione delle carni durante i processi di macellazione. Anche le capre sono considerate serbatoi di VTEC O157, ma poiché l'allevamento della capra ha un'estensione limitata a livello europeo e non riguarda nemmeno tutti gli Stati membri, questa specie non è inclusa nel progetto.

Inoltre, viene raccomandato a tutti gli Stati membri di effettuare il monitoraggio ad intervalli di almeno tre anni, poiché la prevalenza di *E. coli* verocitotossici in queste popolazioni di animali cambia ad intervalli di 1 o 2 anni, e sarebbe anche preferibile che tutti gli stati conducessero le indagini nello stesso anno. Inizialmente, il monitoraggio dovrebbe concentrarsi su VTEC O157 in quanto è il sierotipo più frequentemente implicato in patologie severe nell'uomo (come la sindrome emolitico-uremica), ma i singoli Stati membri possono estendere il monitoraggio ai sierotipi di VTEC O26, O103, O111 e O145, identificati in alcuni paesi come causa di infezione nell'uomo (di solito, il sierotipo O91 viene, invece, trascurato). Per quanto riguarda gli alimenti, vengono proposte linee guida per condurre indagini specifiche sulle categorie di alimenti che con maggiore probabilità sono fonte di infezione da VTEC O157 e non O157 nell'uomo (si raccomanda il metodo standardizzato ISO 16654:2001 per il rilevamento di *E. coli* O157 negli alimenti). Un metodo derivato dallo stesso ISO viene proposto allo scopo di analizzare i campioni di pelle e vello. Tutti i ceppi isolati di *E. coli* O157 devono, poi, essere confermati come VTEC tramite test che ricercano i geni che codificano per le verocitotossine (*vtx*) e il gene *eae*, che codifica per la proteina intimina. Per quanto riguarda, invece, il rilevamento dei sierotipi O26, O103, O111 e O145, si propone l'uso della bozza dello standard CEN TC275/WG6, attualmente presentata all'ISO per la valutazione, che si basa su un metodo

orizzontale che utilizza la PCR in tempo reale per lo screening seguito da una fase di conferma che serve ad isolare i ceppi di VTEC. Inoltre, viene proposto di utilizzare l'acqua peptonata tamponata senza antibiotici come singolo terreno di arricchimento per i campioni di pelle e vello in modo da usare la stessa coltura di arricchimento per l'isolamento di VTEC O157 e non O157 e per semplificare il protocollo di laboratorio (antibiotici selettivi, come novobiocina o vancomicina, non permettono la crescita dei sierotipi non O157). Inoltre, le metodiche di laboratorio indicate per l'isolamento di VTEC O157 non permettono l'isolamento dei ceppi sorbitolo fermentanti di *E. coli* O157, che sono stati associati a diversi episodi morbosi nell'uomo in vari Stati membri. Si raccomanda anche di aumentare la temperatura di incubazione a 41,5° C da 37° C per migliorare la selettività della fase di arricchimento.

Nella specie bovina, i prelievi dovranno essere effettuati su animali con età compresa tra 3 e 24 mesi, escludendo i vitelli a carne bianca, in quanto la prevalenza di VTEC in questa popolazione è considerata trascurabile. I campionamenti dovrebbero essere effettuati tra l'1 aprile e l'1 ottobre in tutti gli Stati membri. Per quanto riguarda, invece, la specie ovina, l'epidemiologia di *E. coli* verocitotossico è meno conosciuta, ma si presuppone che sia molto simile a quella descritta nel bovino; si ritrova soprattutto in animali giovani e i campionamenti dovranno essere effettuati in soggetti con età compresa tra 4 e 24 mesi. Anche negli ovini si ha un picco di infezione nei mesi estivi, come accade nella specie bovina, ma la macellazione della pecora è stagionale in molti Stati membri, quindi non viene raccomandato un periodo specifico per il campionamento.

Il campione di cute o vello viene raccolto nella regione del petto, dopo il dissanguamento e prima dello scuoiamento in entrambe le specie. Il campionamento dovrà essere sempre effettuato al macello per ovvie ragioni pratiche, ma anche perché in questo ambiente si hanno minori variazioni rispetto ai singoli allevamenti. Viene stabilito anche un numero minimo di campioni da effettuare annualmente in ogni Stato membro che è pari a 254, raccolti casualmente, all'interno di una popolazione potenzialmente infinita, con una prevalenza stimata del 12%, un livello di confidenza del 95% e un'accuratezza del 4% (il numero di campioni può essere comunque adattato, soprattutto negli Stati più piccoli, nei quali la popolazione non è considerata infinita, ogni qualvolta il numero di campioni calcolato supera il 10% nell'intera popolazione). Per quanto riguarda le modalità di prelievo del campione nella specie bovina, si utilizza una spugna pre-umidificata di poliuretano, preventivamente posta all'interno di un sacchetto autoclavabile sigillato con 10 ml di una soluzione sterile di *Maximum Recovery Diluent* (composta per lo 0,1% di peptone e 0,85% di NaCl). Il sacchetto viene posto in autoclave per 15 minuti a 121° C.

La spugna viene strofinata con una pressione costante sulla superficie scelta per il prelievo (400 cm²) nella regione del petto per 10 volte in direzione orizzontale e per 10 volte in direzione verticale (EFSA, 2006). Ogni spugna deve essere, poi, posta in un sacchetto singolo per evitare fenomeni di cross-contaminazione dei campioni. Nella specie ovina, invece, il campione viene raccolto afferrando con il versante interno di un sacchetto sterile una parte del vello nella regione del petto e utilizzando una lama sterile per tagliare circa 10 g di campione. Tutti i campioni dovrebbero essere conservati preferibilmente ad una temperatura compresa tra 2° C e 8° C, al riparo da contaminazioni esterne, e portati il più rapidamente possibile al laboratorio autorizzato.

In definitiva, lo scopo di questo progetto scientifico dell'EFSA è quello di stabilire specifiche tecniche per la segnalazione di informazioni armonizzate sul programma di monitoraggio dei VTEC negli animali e negli alimenti sui risultati delle indagini documentati dagli Stati membri nelle loro relazioni annuali sulle zoonosi (EFSA, 2009).

CAPITOLO 7 - APPENDICE

7.1 - Terreni e supplementi

7.1.1 - CT (*Cefixime Tellurite*): Supporto addizionato al terreno SMAC con dosaggio di 0,25 mg per il Cefixime e 1,25 mg per il Potassio tellurito ogni 500 ml di terreno. Questi due composti incrementano la selettività del terreno. Il supplemento selettivo è preparato in accordo a quanto descritto da Chapman *et al.* (1994) e la sua aggiunta al terreno SMAC sopprime efficacemente la crescita di alcuni generi batterici non fermentanti il sorbitolo (NSF), quali *Proteus spp.*, *Aeromonas spp.*, *E. coli* NSF non appartenenti al sierogruppo O157 e dei ceppi di *E. coli* fermentanti il sorbitolo. Zadik *et al.* (1993) riportano un'inibizione del 67% dei ceppi *E. coli* non O157 saggiati e della maggior parte degli stipiti NSF diversi da *E. coli*.

Il Cefixime è un antibiotico appartenente al gruppo delle cefalosporine di terza generazione, è attivo contro numerosi generi batterici, tra cui *Klebsiella spp.* e *Serratia spp.*

Il tellurito di potassio è il sale potassico dell'acido telluroso; a temperatura ambiente si presenta come un solido bianco inodore. E' un composto nocivo per inalazione, contatto con la pelle e ingestione, è irritante per le vie respiratorie e per la cute e può causare gravi lesioni oculari. Tra i suoi prodotti di decomposizione, quelli pericolosi per la salute umana sono rappresentati dagli ossidi di carbonio (CO, CO₂); presenta, comunque, un basso grado di tossicità acuta. La sua aggiunta al terreno SMAC inibisce la flora Gram-positiva.

7.1.2 - EC BROTH: Terreno liquido per il conteggio dei coliformi fecali e non fecali nelle acque, negli alimenti e in altri campioni.

Tabella 6 - Si indica la composizione dell'EC Broth.

Triptone	20,0	g/L
Lattosio	5,0	g/L
Sali biliari N. 3	1,5	g/L
Potassio fosfato monoacido	4,0	g/L
Potassio fosfato biacido	0,03	g/L
Sodio cloruro	5,0	g/L

pH finale 6.9 +/- 0.2

Istruzioni: sospendere 37,0 g di polvere in 1 litro di acqua distillata. Riscaldare a bagnomaria bollente fino a completa soluzione. Distribuire nei contenitori finali e sterilizzare in autoclave a 121° C per 15 minuti.

Il terreno *EC Broth* è preparato in accordo con la formulazione proposta da Hajna e Perry (Manuale Oxoid, 1993) per la ricerca dei coliformi fecali e non fecali in vari tipi di campioni: acque, latte, molluschi, ecc.

Si aggiungono piccole aliquote (approssimativamente di 1 ml) del campione in esame ad una provetta contenente *EC Broth* a concentrazione singola. Quantità maggiori di campione devono essere addizionate al brodo doppio concentrato, al fine di mantenere una concentrazione normale del terreno.

Il terreno viene incubato per 48 ore a 37° C e/o a 45° C. Dopo incubazione la formazione di gas sia a 37° C che a 45° C indica la presenza di *Escherichia coli* senza escludere la presenza di altri coliformi. La formazione di gas solo a 37° C segnala la presenza di altri coliformi ed esclude la presenza di *E. coli*.

7.1.3 - NOVOBIOCINA: E' un antibiotico attivo contro batteri cocchi Gram-positivi (enterococco, stafilococco e pneumococco). Agisce interferendo con la subunità B della DNA girasi batterica, un enzima necessario per la replicazione del DNA. Questo enzima è formato da due coppie di polipeptidi tra loro uguali, le subunità A e B; le prime tagliano la catena di DNA in siti specifici e ne consentono lo srotolamento, le seconde sono responsabili della spiralizzazione negativa del DNA. Entrambe le subunità sono necessarie per ottenere le modificazioni topografiche indispensabili per la replicazione del DNA. La novobiocina agisce in sincronia con un'altra classe di antibiotici, i chinoloni, che sono attivi, invece, sulla subunità A della girasi con lo stesso meccanismo della novobiocina.

7.1.4 - PBS (*Phosphate Buffered Saline*): Tampone fosfato isotonico a pH 7.4 con NaCl 0,15 M e Tween 20 allo 0,05% (v/v).

Istruzioni: sciogliere 2,7 g di $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ in 1 litro di acqua bidistillata per ottenere una soluzione 0,1 M; sciogliere 1,4 g di $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ in 1 litro di acqua bidistillata per ottenere una soluzione 0,01 M. Immergere l'elettrodo del pHmetro nella soluzione di fosfato bifasico (Na_2HPO_4), agitando la soluzione con un'ancoretta magnetica. Portare il pH della soluzione al valore di 7.4 con il fosfato monofasico (NaH_2PO_4): l'aumento di volume della soluzione non comporta comunque un'alterazione della molarità, essendo entrambi i fosfati 0,01 M. Successivamente prelevare 990 ml della soluzione tampone così ottenuta ed aggiungere 8,8 g di NaCl per ottenere un valore finale di 0,15 M. Preparare poi una soluzione di Tween 20; si tratta di un liquido molto viscoso, difficile da aspirare con la pipetta. Si consiglia, quindi, di pesare 5 g di Tween ed aggiungerli a 95 ml di acqua bidistillata e sciogliere la soluzione a caldo. Dalla soluzione di Tween 20 al 5% prelevare 10 ml ed aggiungerli a 990 ml di Tampone Fosfato/NaCl, miscelando adeguatamente i componenti. Infine sterilizzare la soluzione in autoclave a 121° C per 15 minuti e suddividere in aliquote di 1 ml, in flaconcini sterili, da conservare a 4° C.

Il PBS viene di solito impiegato per la sospensione e la diluizione di microorganismi non esigenti. Contiene cloruro di sodio, che assicura la protezione osmotica delle cellule microbiche, e fosfati, che stabilizzano il pH a valori fisiologici, mantenendo la vitalità cellulare. Le sospensioni di microorganismi in questo liquido non possono essere conservate per più di alcune ore in quanto la vitalità di alcuni può diminuire per mancanza di nutrienti; questo periodo di tempo può variare notevolmente a seconda degli organismi in sospensione.

7.1.5 - SMAC (*Sorbitol MacConkey Agar*): Terreno selettivo e differenziale per la ricerca di *Escherichia coli* O157:H7.

Tabella 7 - Si indica la composizione del terreno SMAC.

Peptone	20.0	g/L
Sorbitolo	10.0	g/L
Sali biliari N. 3	1.5	g/L
Sodio cloruro	5.0	g/L
Rosso neutro	0.03	g/L
Cristal violetto	0.001	g/L
Agar	15.0	g/L

pH finale: 7.1 +/- 0.2

Istruzioni: sospendere 51,1 g di polvere in 1 litro di acqua distillata. Riscaldare a bagnomaria bollente fino a completa soluzione. Sterilizzare in autoclave a 121° C per 15 minuti. Raffreddare a 50° C e distribuire in piastre sterili.

Il *Sorbitol MacConkey Agar* si basa sulla formulazione descritta da Rappaport e Henig (1952) ed è raccomandato per l'isolamento di *Escherichia coli* O157:H7. La composizione è uguale a quella del *MacConkey Agar N. 3* (utilizzato per l'evidenziazione e il conteggio di microorganismi coliformi e per l'isolamento delle specie *Salmonella* e *Shigella*), con l'eccezione del lattosio, che è stato sostituito con il sorbitolo. *E. coli* O157:H7 non fermenta il sorbitolo e di conseguenza produce colonie incolori. Al contrario la maggior parte dei sierotipi di *E. coli* fermenta il sorbitolo e produce colonie rosa. March e Ratnam (1986) hanno riferito che la ricerca di *E. coli* O157:H7 su questo terreno ha una sensibilità del 100% e una specificità dell'85%.

L'inserimento di una frazione particolare di sali biliari in aggiunta al cristal-violetto inibisce totalmente i cocci Gram-positivi.

Sebbene la maggior parte dei ceppi di *E. coli* O157:H7 presenta su questo terreno un aspetto tipico, alcuni ceppi sono atipici. Inoltre, alcuni ceppi non tossigeni non fermentano il sorbitolo e quindi non ci si può basare esclusivamente sulla reazione su *Sorbitol MacConkey Agar* per identificare ceppi VTEC di *E. coli*.

Dopo l'inoculazione del materiale in esame sulla superficie delle piastre, il terreno viene incubato a 35°-37° C per 24 ore, in quanto questa temperatura è quella ottimale per la crescita di *E. coli* O157:H7. Tra 44° C e 45,5° C questo sierotipo non cresce bene nemmeno dopo 48 ore di incubazione.

E' consigliato evitare un ritardo nella lettura delle piastre superiore alle 24 ore, poiché in tal modo si affievolisce l'intensità della colorazione delle colonie fermentanti il sorbitolo,

riducendo il contrasto con le colonie che non lo fermentano.

Altri batteri Gram-negativi, quali *Proteus spp.*, *Pseudomonas spp.*, *Klebsiella spp.*, ecc., sono in grado di crescere bene su questo terreno e vengono differenziati in base alla morfologia delle colonie.

7.1.6 - TSB (*Tryptone Soya Broth*): Terreno d'uso generale altamente nutritivo per batteri e funghi.

Tabella 8 - Si indica la composizione del TSB.

Digerito pancreatico di caseina	17.0	g/L
Digerito papainico di farina di soia	3.0	g/L
Sodio cloruro	5.0	g/L
Potassio fosfato monoacido	2.5	g/L
Destrosio	2.5	g/L

pH finale 7.3+/- 0.2

Istruzioni: sospendere 30 g di polvere in 1 litro di acqua distillata. Mescolare bene e distribuire nei contenitori definitivi. Sterilizzare in autoclave a 121° C per 15 minuti.

Poiché il terreno contiene sia triptone che peptone di soia, esso permette una buona crescita di molti microorganismi esigenti, anche senza aggiunta di siero. E' utile per la coltura di aerobi e anaerobi facoltativi, comprese alcune muffe. Le colture vanno esaminate ad intervalli frequenti perché il massimo della crescita si raggiunge in anticipo rispetto a quella con terreni ad inferiore potere nutritivo e la fase successiva di declino inizia più precocemente.

L'aggiunta di piccole quantità di agar (0,1-0,2 g per ogni 100 ml di brodo ricostituito, prima della sterilizzazione) rende il brodo adatto per la coltura di anaerobi obbligati come *Clostridium spp.* Per questo impiego, il brodo va usato subito dopo la sterilizzazione, oppure riscaldato e raffreddato immediatamente prima dell'inoculo.

Inoltre, l'alta fertilità del *Tryptone Soya Broth* lo rende particolarmente adatto per l'isolamento di microorganismi dal sangue e dalla maggior parte dei liquidi biologici. Gli anticoagulanti, come il polianetosolfonato o il citrato di sodio, si possono aggiungere al brodo prima della sterilizzazione. Si possono, inoltre, aggiungere da 5 a 10 ml di sangue a 50 ml di terreno.

Alcune prove (Oxoid, 1993) hanno dimostrato che il *Tryptone Soya Broth* ha un'alta

capacità di rivitalizzare le spore di *Bacillus stearothermophilus* sottoposte a trattamento termico. Questo terreno è consigliato dalla U.S.P. XXI per il test di vitalità (sterilità) di questo microorganismo, usato nel controllo dei processi di sterilizzazione.

Un risultato positivo è dimostrabile dopo 24-48 ore di incubazione a 55° C da una crescita abbondante dei microorganismi che provocano l'intorbidimento del liquido.

7.2 - Immuno-separazione

7.2.1 - DYNABEADS® ANTI- E. COLI O157: Procedura utilizzata per la ricerca rapida e selettiva di *E. coli* O157 da alimenti, acqua, feci o altri campioni. Prevede il pre-arricchimento del campione per almeno 6-18 ore mediante l'uso di BPW (*Buffered Peptone Water*), TSB (*Tryptone Soya Broth*), BGBB (*Brillant-Green Bile Broth*) o altri brodi di arricchimento.

La concentrazione di *E. coli* O157 viene effettuata direttamente da un'aliquota di campione pre-arricchito mediante l'utilizzo della separazione immuno-magnetica. Il *Dynabeads® anti-E. Coli O157* reagisce con tutti i ceppi di *E. coli* O157, inclusi ceppi patogeni e non patogeni, sorbitolo-fermentanti e non sorbitolo-fermentanti. Gli anticorpi che rivestono le sferette si legano in maniera specifica a questi batteri e il complesso sferetta-batteri viene successivamente separato applicando un campo magnetico. L'intero processo di immuno-separazione (IMS) può essere automatizzato tramite l'utilizzo di uno strumento *BeadRetriever™* o può essere effettuato manualmente.

Il materiale impiegato per questa procedura è rappresentato principalmente dalle *Dynabeads® anti-E. coli O157* che sono microscopiche sferette supermagnetiche di polistirene sulle quali sono adsorbiti anticorpi purificati contro *E. coli* O157, legati covalentemente sulla superficie. Le sferette sono immerse in una sospensione di PBS (*Phosphate Buffered Saline*) a pH 7.4, 0,1% di albumina sierica bovina e 0,02% di sodio azide (NaN₃).

Il protocollo evidenzia la presenza o l'assenza di *E. coli* O157 vitali nel campione, se queste cellule sono in grado di replicarsi e se non vi è competizione con altra flora microbica all'interno del campione. Le *Dynabeads® anti-E. Coli O157* si legano sia a ceppi mobili che immobili e il legame non dipende dalla capacità di produrre tossine *Shiga*. Microorganismi antigenicamente simili, come per esempio *Escherichia hermannii*, *Salmonella* O gruppo N o *Proteus spp.*, possono dare cross-reazione e legarsi anch'essi alle sferette. Inoltre, microorganismi estremamente "adesivi", come *Pseudomonas spp.* o

Serratia liquefaciens, potrebbero legarsi in maniera aspecifica. Comunque, la presenza di un'elevata quantità di flora microbica competitiva nel campione non altera la capacità di legame degli *E. coli* O157.

7.3 - Test biochimici

7.3.1 - API20E: Sistema standardizzato di identificazione delle Enterobacteriaceae e di altri bacilli Gram-negativi non esigenti comprendente 21 test biochimici miniaturizzati, oltre ad una base dati specifica. La galleria API è costituita da 20 microprovette contenenti substrati disidratati. Le microprovette sono inoculate con una sospensione batterica che costituisce i terreni. Le reazioni prodotte durante il periodo di incubazione si traducono in viraggi di colore spontanei o rilevati dall'aggiunta di reattivi. La confezione del test comprende gallerie API20E, vaschette di incubazione, schede per la registrazione dei risultati, una barretta di chiusura e una scheda tecnica. I reattivi necessari per il test, ma che non vengono forniti, sono rappresentati da:

- API NaCl 0.85% Medium da 5 ml
- API Suspension Medium da 5 ml
- Kit di reattivi API20E: TDA, JAMES, VP1 e VP2, Nit 1 e Nit 2
- Reattivo Zn
- Ossidasi
- Olio di paraffina

I materiali necessari per il test, ma che non vengono forniti, sono rappresentati da:

- Pipette
- Proteggi-fiala
- Porta-fiala
- Equipaggiamento generico per laboratorio di batteriologia

Invece, i reattivi complementari sono rappresentati da:

-API OF Medium: test per la determinazione del metabolismo fermentativo e ossidativo del glucosio

-API M Medium: test per la determinazione della motilità dei batteri aero-anaerobi.

L'API20E non deve essere utilizzato direttamente su campioni clinici o di altra natura, ma i microorganismi da identificare devono essere prima isolati su un terreno di coltura idoneo per Enterobacteriaceae o altri bacilli Gram-negativi non esigenti con le normali tecniche batteriologiche. Il test non può essere usato per l'identificazione di microorganismi esigenti che necessitano di particolari precauzioni di manipolazione (ad esempio, *Brucella*

spp. e *Francisella spp.*) e nemmeno per escluderne la presenza. Inoltre, devono essere usate solo colture pure contenenti unicamente un tipo di microorganismo.

Per alcune specie (come *Klebsiella spp.* o *Proteus spp.*), reazioni del test del glucosio inizialmente positive possono talvolta diventare negative (comparsa di una colorazione blu-verde). In questi casi la reazione deve essere considerata negativa.

Nel caso di identificazione di *Salmonella spp.* o *Shigella spp.*, è necessario effettuare un'identificazione sierologica come conferma.

Infine, bacilli Gram-negativi non fermentanti possono generare profili biochimici atipici che possono alterare la loro identificazione.

Performance del test: (Manuale API20E, Biomérieux®)

- Enterobacteriaceae: sono stati testati 5.514 ceppi di diversa origine e ceppi di collezione appartenenti a quelli inclusi nella base dei dati:
 - il 92,80% dei ceppi è stato correttamente identificato (con o senza test complementari);
 - il 4,61% dei ceppi non è stato identificato;
 - il 2,59% dei ceppi non è stato identificato correttamente.
- Altri bacilli Gram-negativi: sono stati testati 2.836 ceppi di diversa origine e ceppi di collezione appartenenti a quelli inclusi nella base dei dati:
 - il 90,32% dei ceppi è stato correttamente identificato (con o senza test complementari);
 - il 6,16% dei ceppi non è stato identificato;
 - il 3,52% dei ceppi non è stato identificato correttamente.

La lettura di queste reazioni viene effettuata servendosi della Tabella di lettura di seguito riportata.

Tabella 9 - Tabella di lettura del test biochimico API20E

TEST	SUBSTRATI	Q.TA' (mg/cupola)	REAZIONI/ENZIMI	RISULTATI NEGATIVI	RISULTATI POSITIVI
ONPG	2nitro-fenil-βD-galattopiranoside	0,223	β-galattosidasi (Ortonitrofenil-βD-Galattopiranosidone)	incolore	giallo(1)
ADH	L-arginina	1,9	Arginina Deidrolasi	giallo	rosso/arancio(2)
LDC	L-lisina	1,9	Lisina Decarbossilasi	giallo	rosso/arancio(2)
ODC	L-ornitina	1,9	Ornitina Decarbossilasi	giallo	rosso/arancio(2)
CIT	Citrato trisodico	0,756	Utilizzazione del citrato	verde chiaro/giallo	blu-verde/blu(3)
H ₂ S	Tiosolfato di sodio	0,075	Produzione di H ₂ S	incolore/grigiastro	deposito nero/orlo sottile
URE	Urea	0,76	Ureasi	giallo	rosso/arancio(2)
TDA	L-triptofano	0,38	Triptofano Deaminasi	giallo	marrone-rossastro
IND	L-triptofano	0,19	Produzione di indolo	incolore verde chiaro /giallo	rosa
VP	Piruvato di sodio	1,9	Produzione di acetoina	incolore	rosa/rosso(5)
GEL	Gelatina (origine bovina)	0,6	Gelatinasi	nessuna diffusione	diffusione del pigmento nero
GLU	D-glucosio	1,9	Fermentazione/ossidazione glucosio(4)	blu/blu-verde	giallo/giallo grigio
MAN	D-mannitolo	1,9	Fermentazione/ossidazione mannitolo(4)	blu/blu-verde	giallo
INO	Inositolo	1,9	Fermentazione/ossidazione inositolo(4)	blu/blu-verde	giallo
SOR	D-sorbitolo	1,9	Fermentazione/ossidazione sorbitolo(4)	blu/blu-verde	giallo
RHA	L-ramnosio	1,9	Fermentazione/ossidazione ramnosio(4)	blu/blu-verde	giallo
SAC	D-saccarosio	1,9	Fermentazione/ossidazione saccarosio(4)	blu/blu-verde	giallo
MEL	D-melibiosio	1,9	Fermentazione/ossidazione melibiosio(4)	blu/blu-verde	giallo
AMY	Amigdalina	0,57	Fermentazione/ossidazione amigdalina(4)	blu/blu-verde	giallo
ARA	L-arabinosio	1,9	Fermentazione/ossidazione arabinosio(4)	blu/blu-verde	giallo
OX	(vedere scheda tecnica)		Citocromo-ossidasi	(vedere scheda tecnica)	

(1) Una leggerissima colorazione gialla è comunque positiva.

(2) Se dopo 36-48 ore di incubazione appare una colorazione arancione, la reazione deve essere considerata negativa.

- (3) Lettura della cupola (zona aerobia).
- (4) La fermentazione comincia nella parte inferiore delle microprovette, mentre l'ossidazione comincia nella cupola.
- (5) Una debole colorazione rosa che appaia dopo 10 minuti deve essere considerata negativa.

Alcune cupole contengono dei componenti di origine animale, in particolare dei peptoni.

Tabella 10 - Test complementari

TEST	SUBSTRATI	Q.TA' (mg/cupola)	REAZIONI/EN ZIMI	RISULTATI NEGATIVI	RISULTATI POSITIVI
Riduzione dei nitrati(provett a GLU)	Nitrato di potassio	0,076	Produzione di NO ₂	giallo	rosso
			Riduzione allo stadio di N ₂	arancio-rosso	giallo
MOB	API M Medium o microscopio		Mobilità		mobile
OF-F	Glucosio (API OF Medium)		Fermentazion e sotto olio		giallo
OF-O	Glucosio (API OF Medium)		Ossidazione all'aria		giallo

7.4 - Test sierologici

7.4.1 - DRY SPOT E. COLI O157 LATEX TEST: Test di agglutinazione al lattice per l'identificazione di *E. coli* sierogruppo O157.

Materiale compreso nel kit:

-Cartoncini di reazione *Dry spot E. coli O157*: particelle di lattice blu sensibilizzate con anticorpo specifico nei confronti dell'antigene del sierogruppo O157 di *E. coli*. Ciascun cartoncino è suddiviso in tre aree per l'esecuzione del test e tre aree per le reazioni di controllo. Il kit consente in totale l'esecuzione di 120 test.

-Strip di controllo positivo (spot rosa): estratto antigenico inattivato di *E. coli* O157, di colore rosa.

-Strip di controllo negativo (spot verdi): estratto antigenico inattivato di *E. coli* O116, di colore verde.

-Bastoncini di miscelazione: non sono sterili; se è necessario si può provvedere a sterilizzarli localmente.

Materiali aggiuntivi richiesti per l'esecuzione del test:

-Soluzione fisiologica (NaCl 0,9%, utilizzare acqua distillata o deionizzata)

-Anse batteriologiche e becco Bunsen

-Cronometro

-Idonea soluzione disinfettante di laboratorio

Lettura e interpretazione dei risultati:

-Risultato positivo: interviene l'agglutinazione delle particelle di lattice entro 1 minuto. Il risultato positivo indica la presenza di *E. coli* sierogruppo O157.

-Risultato negativo: assenza di agglutinazione entro 1 minuto. La colorazione blu di fondo dell'area di reazione rimane invariata ed omogenea.

Eventuali reazioni di agglutinazione tardive (oltre i 60 secondi) devono essere ignorate.

I risultati del test non possono essere interpretati se il reagente di controllo mostra agglutinazione: questa evidenza indica che la coltura causa autoagglutinazione.

Occasionalmente, si possono osservare reazioni granulari o di natura viscosa. I risultati di questo tipo devono essere interpretati usando i seguenti criteri:

-Il risultato è positivo se la reazione con il reagente test mostra una colorazione blu di fondo più chiara rispetto a quella evidenziata dalla reazione con il reagente di controllo.

-Il risultato è negativo se le reazioni con i due reagenti al lattice non mostrano differenze significative della colorazione blu di fondo.

Se la vischiosità è molto forte e pregiudica un'interpretazione corretta, si sospende

un'altra colonia in 0,3 ml di soluzione fisiologica. Si lascia sedimentare la frazione più grossolana e, utilizzando il sovrinatante, si ripete il test.

Se si ottiene una reazione positiva da una colonia appartenente ad una specie non ancora identificata, si raccomanda di eseguire prove biochimiche per confermare l'appartenenza del ceppo alla specie *E. coli*.

Sia il *Sorbitol MacConkey Agar* che il *Dryspot E. coli O157 Latex Test* non possono direttamente confermare che la colonia isolata è un ceppo produttore di tossina. Inoltre è stato dimostrato che altri sierotipi, diversi da O157, sono produttori di verocitotossina.

Ceppi di *Escherichia hermanii* agglutinano con gli antisieri verso *E. coli* O157 e con *Dryspot E. coli O157 Latex Test* per la presenza di un antigene comune con *E. coli* O157 (Borczyk *et al.*, Manuale Oxoid, 1993). *E. hermanii* può essere differenziato da *E. coli* in base alla fermentazione di *E. hermanii* del cellobiosio, in presenza di KCN, alla reazione negativa nel saggio con 4-metilumbelliferil glucoronide (MUG) ed alla pigmentazione gialla, che può apparire in ritardo.

Sono stati identificati anche altri batteri con epitopi che simulano quelli del lipopolisaccaride di *E. coli* O157.

7.5 - Conservazione

7.5.1 - MICROBANK™ : Provetta sterile contenente sferette porose che servono da mezzo di supporto per i microorganismi. E' un sistema meccanico che consente di conservare i microorganismi a basse temperature (-70° C o -80° C) con la minore possibilità di alterazione e che permette un facile accesso al materiale così conservato. Ciascuna provetta *Microbank™* contiene venticinque sferette colorate immerse in un liquido crioconservante. Le sferette sono lavate e sono porose in modo tale da permettere ai microorganismi di aderire rapidamente alla superficie. Quando è necessario disporre di una coltura fresca, si può rimuovere una singola sferetta dalla provetta e usarla direttamente per inoculare il terreno idoneo.

7.5.2 - STANDARD MCFARLAND: E' una preparazione che serve ad aggiustare la torbidità di una sospensione batterica. Ogni flacone è costituito da una quantità predeterminata di sferette di lattice in soluzione. In origine, gli standard erano costituiti da una combinazione di cloruro di bario e acido solforico che generava un flocculato. Questa soluzione presentava problemi di instabilità, di conservazione e di riproducibilità della sospensione

risultante. Al contrario, le particelle di lattice presenti in soluzione non danno origine a questo tipo di problemi. La densità di ogni provetta è determinata mediante uno spettrofotometro alla lunghezza d'onda di 600 o 625 nm. La sospensione batterica, una volta equiparata alla torbidità dello Standard McFarland equivalente, dà origine alla conta batterica attesa.

Tabella 11 - Si mette in relazione lo Standard McFarland e la conta batterica approssimativa ($\times 10^6$ cell.) corrispondente.

Standard McFarland	0,5	1	2	3	4	5
Conta batterica approssimativa($\times 10^6$ cell.)	1,5	3	6	9	12	15

CAPITOLO 8 - RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI E WEBGRAFIA

8.1 - Riferimenti bibliografici

S. Albonetti, M. Trevisan, S. Alonso Alvarez, R. Rosmini, *Ricerca di Escherichia coli sierogrupo O157 in carcasse e feci bovine*. Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Università di Bologna.

L. Alison, *HUS due to a sorbitol-fermenting verotoxigenic E. coli O157 in Scotland*. Eurosurveillance Weekly, 2003, n. 6, pp. 2-3.

M. Aminul Islam, A. E. Heuvelink, K. A. Talukder, E. de Boer, *Immunoconcentration of Shiga Toxin-producing Escherichia coli O157 from animal feces and raw meats by using Dynabeads anti-E. Coli O157 and the VIDAS system*. International Journal of Food Microbiology, 2006, n. 109, pp. 151-159.

API20E, Biomérieux®, 2004/05.

G. L. Armstrong, J. Hollingsworth, J. G. Morris Jr., *Emerging foodborne pathogens: Escherichia coli O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed country*. Epidemiol. Rev., 1996, n. 18, pp. 29-51.

S. Astarita, A. Martucciello, D. Alfano, A. Caprioli, G. Scavia, G. Iovane, G. Galiero, *Escherichia coli O26: una tossinfezione alimentare emergente. Ruolo del bufalo mediterraneo quale reservoir animale del microorganismo*. Large Animal Review, 2007, n. 13, pp. 247-248.

B. P. Bell, M. Goldoft, P. M. Griffin, *A multistate outbreak of Escherichia coli O157:H7-associated bloody diarrhea and hemolytic-uremic syndrome from hamburgers. The Washington experience*, 1994, J.A.M.A., n. 272, p. 1349.

K. A. Bettelheim, M. Whipp, S. P. Djordjevic, V. Ramachandran, *First isolation outside Europe of sorbitol-fermenting verocytotoxigenic Escherichia coli (VTEC) belonging to O group O157*. Journal of Medical Microbiology, 2002, n. 51, pp. 713-714.

S. Bonardi, C. Leccese, *Il ruolo della specie bovina e di altri ruminanti nell'epidemiologia delle infezioni da Escherichia coli verocitotossici*. Ann. Fac. Medic. Vet. di Parma, 2006, Vol. XXVI, pp. 205-218.

S. Bonardi, A. Paris, F. Salmi, C. Bacci, *Indagine sulla presenza di escretori fecali di Escherichia coli O157 verocitotossici tra le bovine da latte nel territorio parmense*. Scienza e Tecnica Lattiero-casearia, 2008, anno 59, n. 5, pp. 443-447.

A. Caprioli, C. Lucangeli, M. Severini, *Escherichia coli O157*. In: G. De Felip, *Recenti sviluppi di igiene e microbiologia degli alimenti, Tecniche nuove*, Milano, 2001, pp. 625-638.

A. Caprioli, I. Luzzi, F. Rosmini, P. Pasquini, R. Cirrincione, A. Gianviti, M. C. Matteucci, G. Rizzoni, *Hemolytic-uremic syndrome and verocytotoxin-producing Escherichia coli infection in Italy*. J. Infect. Dis., 1992, n. 166, pp. 154-158.

A. Caprioli, I. Luzzi, F. Rosmini, C. Resti, A. Edefonti, F. Perfumo, C. Farina, A. Goglio, A. Gianviti, G. Rizzoni, *Community wide outbreak of hemolytic-uremic syndrome associated with non-O157 verocytotoxin-producing Escherichia coli*. J. Infect. Dis., 1994, n. 169, pp. 208-211.

A. Caprioli, F. Minelli, S. Morabito, A. E. Tozzi, *Zoonosi emergenti: le infezioni da Escherichia coli O157 e da altri E. coli verocitotossina-produttori in Italia*. Notiziario dell'Istituto Superiore di Sanità, 1997, 10/11.

A. Caprioli, A. E. Tozzi, *Epidemiology of Shiga-toxin-producing Escherichia coli infections in continental Europe*. In: J. B. Kaper, A. O'Brien, (Eds.), *Escherichia coli O157:H7 and Other Shiga-toxin-producing E. coli*. American Society for Microbiology, Washington, DC, 1998, pp. 38-48.

P. A. Champman, A. T. Cerdan Malo, M. Ellin, R. Ashton, M. A. Harkin, *Escherichia coli O157 in cattle and sheepat slaughter, on beef and lamb carcasses and in raw beef and lamb products in South Yorkshire, UK*. International Journal of Food Microbiology, 2001, pp. 139-150.

P. A. Champman, C. A. Siddons, A. T. Cerdan Malo, M. A. Harkin, *A one year study of Escherichia coli O157 in raw beef and lamb products*. Epidemiol. Infect., 2000, n. 124, pp. 208-211.

P. A. Champan, D. J. Wright, C. A. Siddons, *A comparison of immunomagnetic separation and direct culture for the isolation Of verocytotoxin-producing Escherichia coli O157 from bovine faeces*. Journal of Medical Microbiology, giugno 1994, n. 40, pp. 424-427.

A. Chinen, J. D. Tanaro, E. Miliwebsky, L. H. Lound, G. Chillemi, S. Ledri, A. Baschkier, M. Scarpin, E. Manfredi, M. Rivas, *Isolation and characterization of Escherichia coli O157:H7 from retail meats in Argentina*. J. Food Prot., 2001, n. 64 pp. 1346-1351.

J. E. Coia, Y. Johnston, N. J. Steers, M. F. Hanson, *A survey of the prevalence of Escherichia coli O157 in raw cow's milk and raw milk cheeses in south-east Scotland*. International Journal of Food Microbiology, 2001, n. 66, pp. 63-69.

G. Colavita, M. Paoletti, M. Conter, V. D'Orio, *Isolamento di E. coli O157 da carcasse di vitelli a carne bianca*. A.I.V.I., dicembre 2008, n. 2, pp. 53-56.

G. Conedera, P. Dalvit, M. Martini, G. Galiero, M. Gramaglia, E. Goffredo, G. Loffredo, S. Morabito, D. Ottaviani, F. Paterlini, G. Pezzotti, M. Pisanu, P. Semprini, A. Caprioli, *Verocytotoxin-producing Escherichia coli O157 in minced beef and dairy products in Italy*. International Journal of Food Microbiology, 2004, n. 96, pp. 67-73.

G. Conedera, C. Targhetta, D. Vio, M. Mancin, T. Lombardo, *Indagini su Escherichia coli O157 in liquami bovini di allevamenti del Veneto*. Workshop Nazionale di Epidemiologia Veterinaria, Abano Terme, 13-14 settembre 2007.

L. Decastelli, G. Ru, G. Brizio, D. Gentile, S. Gallina, A. Caprioli, *Presenza di E. coli O157 in suini alimentati con siero di latte*. Il Progresso Veterinario, anno LIX, n. 2, 15 febbraio 2004.

A. W. Friedrich, M. Bielaszewska, W. L. Zhang, M. Pulz, T. Kuczius, A. Ammon, H. Karch,

Escherichia coli harboring *Shiga toxin 2* gene variants: frequency and association with clinical symptoms. *Journal of Infectious Disease*, 2002, n. 185, pp. 74-84.

S. Gallina, A. Barbaro, M. Sommariva, L. Chiavacci, N. Vitale, D. Adriano, *Macchine erogatrici di latte crudo: piano di monitoraggio regione Piemonte*. XIX Convegno Nazionale di Perugia, 24-26 giugno 2009, Facoltà di Medicina Veterinaria.

Dynabeads® anti-E. Coli O157. Invitrogen Dynal AS, Cat. n. 710.03, Rev. n. 010.

EFSA, *Specifiche tecniche per il monitoraggio e la segnalazione dell'Escherichia coli verocitotossico (VTEC) sugli animali e sugli alimenti (indagini sul VTEC negli animali e negli alimenti)*. *EFSA Journal*, 2009.

EFSA, *Report on trends and sources of zoonoses*. *EFSA Journal*, 2008

D. D. Hancock, T. E. Besser, D. H. Rice, *Ecology of Escherichia coli O157:H7 in cattle and impact of management practices*. In: J. B. Kaper, A. O'Brien, (Eds.), *Escherichia coli O157:H7 and Other Shiga-toxin-producing E. coli*. American Society for Microbiology, Washington, DC, 1998, pp. 85.

A. E. Heuvelink, J. T. Zwartkruis-Nahuis, B. R. Beumer, E. de Boer, *Occurrence and survival of verocytotoxin-producing Escherichia coli O157 in meat obtained from retail outlets in the Netherlands*. *J. Food Prot.*, 1999, n. 62, pp. 1115-1122.

H. Karch, M. Bielaszewska, M. Biltzan, H. Schmidt, *Epidemiology and diagnosis of Shiga-toxin-producing Escherichia coli infections*. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 1999, n. 34 p. 229.

M. A. Karmali, *Infection by verocytotoxin-producing Escherichia coli*, *Clin. Microbiol. Rev.* 2, 1989, p. 15.

R. Lindqvist, A. K. Antonsson, B. Norling, I. Persson, A. C. L. Ekstrom, S. Lofdhal, P. Norberg, *The prevalence of verocytotoxin-producing Escherichia coli (VTEC) and Escherichia coli O157:H7 in beef in Sweden determined by PCR assays and an immunomagnetic separation (IMS) method*. *Food Microbiol.*, 1998, n. 15, pp. 591-601.

C. L. Little, J. De Louvois, *The microbiological examination of butchery products and butchers' premises in the United Kingdom*. J. Appl. Microbiol., 1998, n. 85, pp. 177-186.

Manuale Oxoid, Edizione 1993, Unipath S.p.A., pp. 95-239.

P. S. Mead, P. M. Griffin, *Escherichia coli O157:H7*. Lancet 352, 1998, p. 1207.

A.R. Melton Celsa, A. D. O'Brien, *Structure, biology and relative toxicity of Shiga toxin family members for cells and animals*. In: J. B. Kaper, A. O'Brien, (Eds.), *Escherichia coli O157:H7 and Other Shiga-toxin-producing E. coli*. American Society for Microbiology, Washington, DC, 1998, pp. 119.

J. Meng, M. P. Doyle, *Microbiology of Shiga toxin-producing Escherichia coli in foods*. In: J. B. Kaper, A. O'Brien, (Eds.), *Escherichia coli O157:H7 and Other Shiga-toxin-producing E. coli*. American Society for Microbiology, Washington, DC, 1998, p. 92.

S. B. March, S. Ratnam, J. Clin. Microbiol. 23, 1986, pp.869-872.

P. Mutti, E. Pancini, E. Manganelli, C. Dall'Aglio, S. Riccò, S. Barbuti, *Ricerca di Escherichia coli O157:H7 in carne bovina e suina artificialmente contaminata: valutazione di un metodo colturale, uno immunomagnetico e uno immunoenzimatico*. Industria Conserve, 1998, n. 73, pp. 24-29.

P.R. Murray, K.S. Rosenthal, M.A. Pfaller, *Microbiologia medica*, E.M.S.I. Edizioni mediche scientifiche internazionali, 2008, pp. 329-336.

A. Petruzzelli, D. Sola, F. Paolini, S. Baldassarri, N. Oraziotti, M. Foglini, E. Micci, G. Pezzotti, T. Cenci, F. Tonucci, *Vendita diretta di latte crudo: prevalenza di germi patogeni nella matrice latte e feci bovine prelevate in allevamenti della provincia di Pesaro-Urbino*. XIX Convegno Nazionale di Perugia, 24-26 giugno 2009, Facoltà di Medicina Veterinaria.

P.J. Quinn, M.E. Carter, B. Markey, G.R. Carter, *Clinical Veterinary Microbiology*, Mosby, 2000, pp. 209-236.

F. Rappaport, E. Henig, J. Clin. Path., 1952, n. 5, p. 361.

C.V. Rozand, *Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC)*. Current Foodborne Pathogens, pp. 74-91.

G. Scavia, M. Escher, F. Baldinelli, A. Caprioli, *Rischio di infezione da E. coli produttore di verocitotossina e consumo di latte crudo*. VII Workshop Nazionale Enter-net Italia, Sistema di sorveglianza delle infezioni enteriche, Regione Lazio, Roma, 4-5 novembre 2009.

H. R. Smith, B. Rowe, G. Adak, K. Reilly, Shiga toxin (verocytotoxin)-producing *Escherichia coli* in the United Kingdom. In: J. B. Kaper, A. O'Brien, (Eds.), *Escherichia coli O157:H7 and Other Shiga-toxin-producing E. coli*. American Society for Microbiology, Washington, DC, 1998, pp. 49-58.

Teagasc, *E. coli O157:H7 in beef burgers produced in Republic of Ireland: A quantitative microbial risk assessment*. Editors, Duffy G and Butler F, Published by Teagasc, Ashtown Food Research Center, Ashtown, Dublin 15, Ireland, 2006.

J. Tilden Jr., W. Young, A. M. McNamara, C. Custer, B. Boesel, M. A. Lambert Fair, J. Majkowski, D. Vugia, S. B. Werner, J. Hollingsworth, J. G. Morris Jr., A new route of transmission for *Escherichia coli*: infection from dry fermented salami. Am. J. Public Health, 1996, n. 86, p. 1142.

A.E. Tozzi, A. Caprioli, F. Minelli, A. Gianviti, L. De Petris, A. Edefonti, G. Montini, A. Ferretti, T. De Palo, M. Gaido, G. Rizzoni, *Shiga toxin-producing Escherichia coli infections associated with hemolytic uremic syndrome, Italy, 1988-2000*. Emerg Infect Dis. 2003, n. 9, pp. 106-108.

A.E. Tozzi, S. Goriotti, A. Caprioli, *Epidemiology of human infections by Escherichia coli O157 and other verocytotoxin-producing E. coli*. In: G. Duffy, P. Garvey, D. McDowell (Eds.), *Verocytotoxigenic Escherichia coli*. Food & Nutrition Press, Trumbull, Connecticut, USA, 2001, pp. 161-179.

A.E. Tozzi, A. Niccolini, A. Caprioli, I. Luzzi, G. Montini, G. Zacchello, A. Ginaviti, F. Principato, G. Rizzoni, *A community outbreak of hemolytic-uremic syndrome in children occurring in a large area of northern Italy over a period of several months*. Epidemiol. Infect., 1994, n. 113, pp. 209-220.

P. Valentino, *Stephanie, la ventiduenne paralizzata da un hamburger*. Corriere della Sera, 5 ottobre 2009.

Y. Wasteson, J. Lassen, Occurrence of Escherichia coli O157:H7/H- in foods and animals. IVC news 11. Not. Ist. Super. Sanità 11 (Suppl. 2), 1998, pp. 1-2.

P. M. Zadik, P. A. Champan, C. A. Siddons, Use of tellurite for the selection of verocytotoxigenic Escherichia coli O157. Journal of Medical Microbiology, 1993, n. 39, pp. 155-158.

8.2 – Webgrafia

<http://www.bd.com/europe/regulatory,Assets/IFU/HB/CE/IT-BA-257204.pdf>

<http://www.bd.com/resource.aspx?IDX=8944>

<http://www.biolifeit.com/biolife/upload/file/Schede/17PL160B-MICROBANK.pdf>

<http://www.biolifeit.com/biolife/upload/file/Schede/17SD2350.PDF>

<http://www.biolifeit.com/biolife/upload/file/Schede/401516-GIOLITTI%20CANTONI%20STAPH%20BROTH.pdf>

<http://www.biolifeitaliana.it/biolife/upload/file/Schede/401669S-MAC%20CONKEY%20SORBITOL%20AGAR.pdf>

<http://www.biolifeitaliana.it/biolife/upload/file/Schede/402155-TRYPTIC%20SOY%20BROTH.pdf>

<http://www.biomerieux.it/servlet/srt/bio/italy/dynPage>

[_http://www.brighthub.com/science/genetics/articles/38516.aspx](http://www.brighthub.com/science/genetics/articles/38516.aspx)

<http://www.dissapore.com/primo-piano/larticolo-che-ha-vinto-il-pulitzer-2010-si-discute-la-sicurezza-del-processo-di-lavorazione-della-carne/>

<http://www.oxid.com/pdf/msds/IT/SR0030.pdf>

http://topics.nytimes.com/topics/reference/timestopics/people/m/michael_moss/index.html

http://it.wikipedia.org/wiki/Bos_taurus

<http://it.wikipedia.org/wiki/Cefixima>

http://it.wikipedia.org/wiki/Escherichia_coli

<http://it.wikipedia.org/wiki/Novobiocina>

[http://it.wikipedia.org/wiki/Tellurito di potassio](http://it.wikipedia.org/wiki/Tellurito_di_potassio)

Ringraziamenti

Ringrazio innanzitutto il mio relatore, il Prof. Valerio Giaccone, senza il quale non sarebbe stata possibile la stesura di questa tesi. Lo ringrazio anche per la sua infinita pazienza nei miei confronti. Un ringraziamento speciale anche al mio correlatore, il Dott. Leonardo Alberghini, per l'aiuto che mi ha dato in laboratorio e per avermi fornito molti spunti utili.