



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI TORINO**

**SCUOLA DI MEDICINA DI TORINO**

**Corso di Laurea in Tecniche di Laboratorio Biomedico**

**PRESIDENTE: Prof. Maurizio PAROLA**

**TESI DI LAUREA**

***RICERCA DEGLI ESCHERICHIA COLI PRODUTTORI DI VEROCITOTOSSINA/SHIGA-TOSSINA***

***(VTEC/STEC): APPLICAZIONE DEL METODO UNI CEN ISO/TS 13136:2013 SU DUE DIVERSE***

***MATRICI ALIMENTARI E CONFRONTO CRITICO DEI RISULTATI EMERSI***

**CANDIDATA**

***Alessandra TERMINE***

***Anno Accademico 2018-2019***



# MALATTIE DI ORIGINE ALIMENTARE-FOODBORNE DISEASES

## *Definizioni*

- Tossinfezione alimentare: malattia di origine alimentare (*foodborne diseases*) causata dall'ingestione di alimenti contenenti contemporaneamente il batterio patogeno e la propria tossina.
- Esistono più di 250 tossinfezioni alimentari e costituiscono un problema a livello mondiale.
- *Escherichia coli* O157:H7: patogeno emergente appartenente agli *Escherichia coli* STEC (*E. coli* produttori della tossina Shiga).

### **Anno 2010**

<b>PATHOGEN</b>	<b>ILLNESSES (95% UI)</b>	<b>DEATHS (95% UI)</b>	<b>DALYs (95% UI)</b>
Shiga toxin- producing <i>E. coli</i>	2,481,511 (1,594,572– 5,376,503)	269 (111–814)	26,827 (12,089– 72,204)



## TOSSINFEZIONE DA *E. COLI* STEC

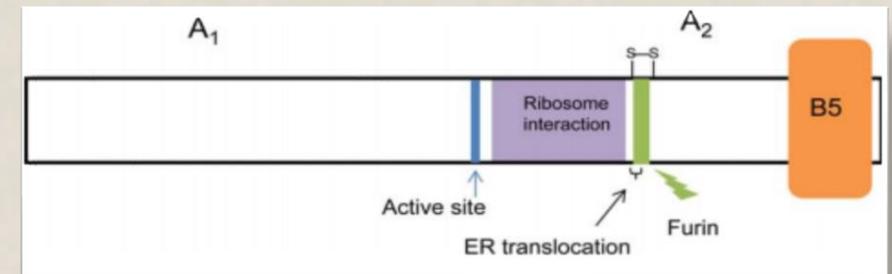
Batteri patogeni della famiglia delle *Enterobacteriaceae*, ed in particolare al gruppo degli *E. coli* enteroemorragici (EHEC).

*2 fattori di virulenza*

Fattore di adesione:

- Proteina intimina (gene *eae*)
- Fimbrie aggreganti di aderenza codificate dal gene *aggR*

Tossina Shiga (Stx1 e Stx2)



*Batteriofagi λ e gene stx*

- Batteriofagi trasportanti il gene della tossina.



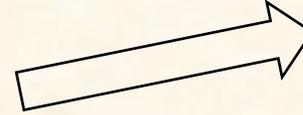
Gene *stx* posizionato tra i geni coinvolti nel ciclo litico



# TOSSINFEZIONE DA *E. COLI* STEC

## *Modalità di trasmissione*

- Principale *reservoir*: tratto gastrointestinale del bovino.
- Consumo di alimenti: carne cruda, latte crudo o derivati, frutta e verdura (germogli, spinaci, insalata e cavolo).



**ZOONOSI A**

**TRASMISSIONE**

**ALIMENTARE**

## *Tossinfezione da STEC*

- 470 sierotipi conosciuti. 100 sono associati a malattia umana → STEC O157, O26, O111, O103 e O145

Colite emorragica  
(diarrea sanguinolenta)

Sindrome  
emolitico-uremica  
(SEU/HUS)

Complicanze nervose



## SCOPO DEL LAVORO

Il lavoro svolto nel laboratorio di microbiologia dell'Arpa in Valle d'Aosta ha permesso di determinare la presenza degli *Escherichia coli* STEC, in particolare O157, O26, O111, O103 e O145, all'interno di due matrici alimentari:

- 15 confezioni di germogli di soia pronte al consumo
- 41 formaggi a pasta semi dura e a media stagionatura di produzione locale

↓  
Analisi ufficiali

↓  
Programma di autocontrollo

### *Obiettivo*

1- Evidenziare la presenza dei ceppi STEC

2- Valutare il grado di contaminazione iniziale da STEC rispetto a quello da *E. coli* totali

3- Comprendere il rischio effettivo per la salute umana



# METODI



## A-METODO UNI CEN ISO/TS 13136:2013



Pre-arricchimento in BPW per 18-24h a  $37^{\circ} \text{C} \pm 1^{\circ} \text{C}$



Estrazione degli acidi nucleici da brodo di arricchimento



Rilevamento dei geni di virulenza (*stx* e *eae*) mediante PCR real time

*stx* + / *eae* +



- Rilevamento dei geni di sierogruppo tramite PCR real time
- Isolamento e conferma\*



Risultato

*stx* + / *eae* -



- Isolamento e conferma\*



Risultato

*stx* - / *eae* (-/+)



Risultato

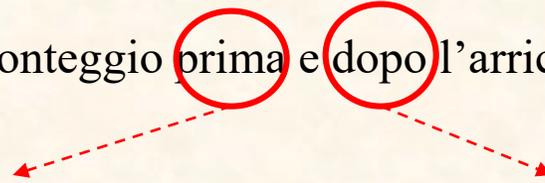
\*L'isolamento e la conferma si effettuano nello stesso modo in entrambi i casi



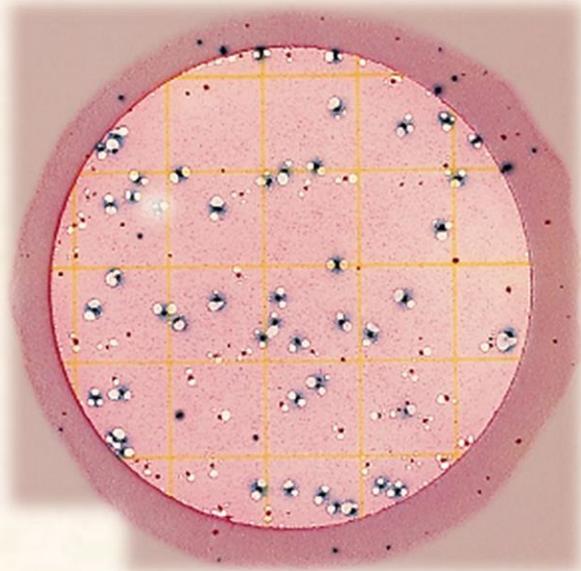
# METODI

## B-METODO CULTURALE

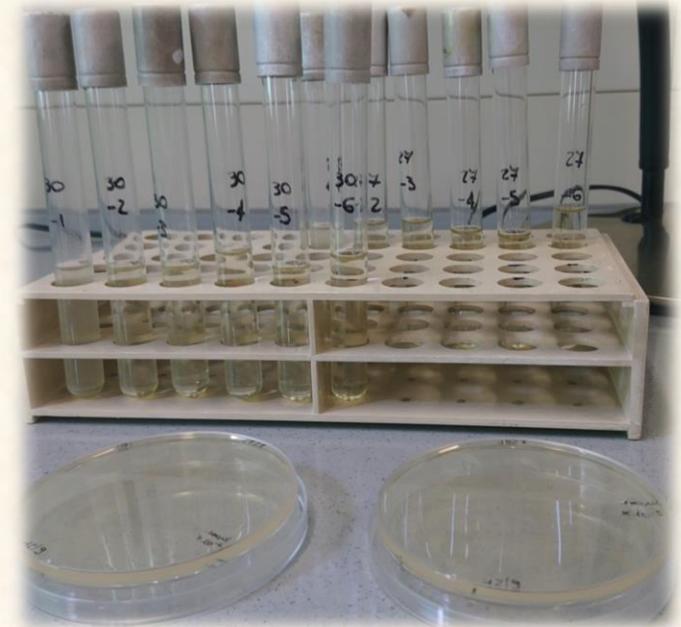
- Semina per il conteggio **prima** e **dopo** l'arricchimento microbico



Piastre Petrifilm (Institut Agricole Régional)



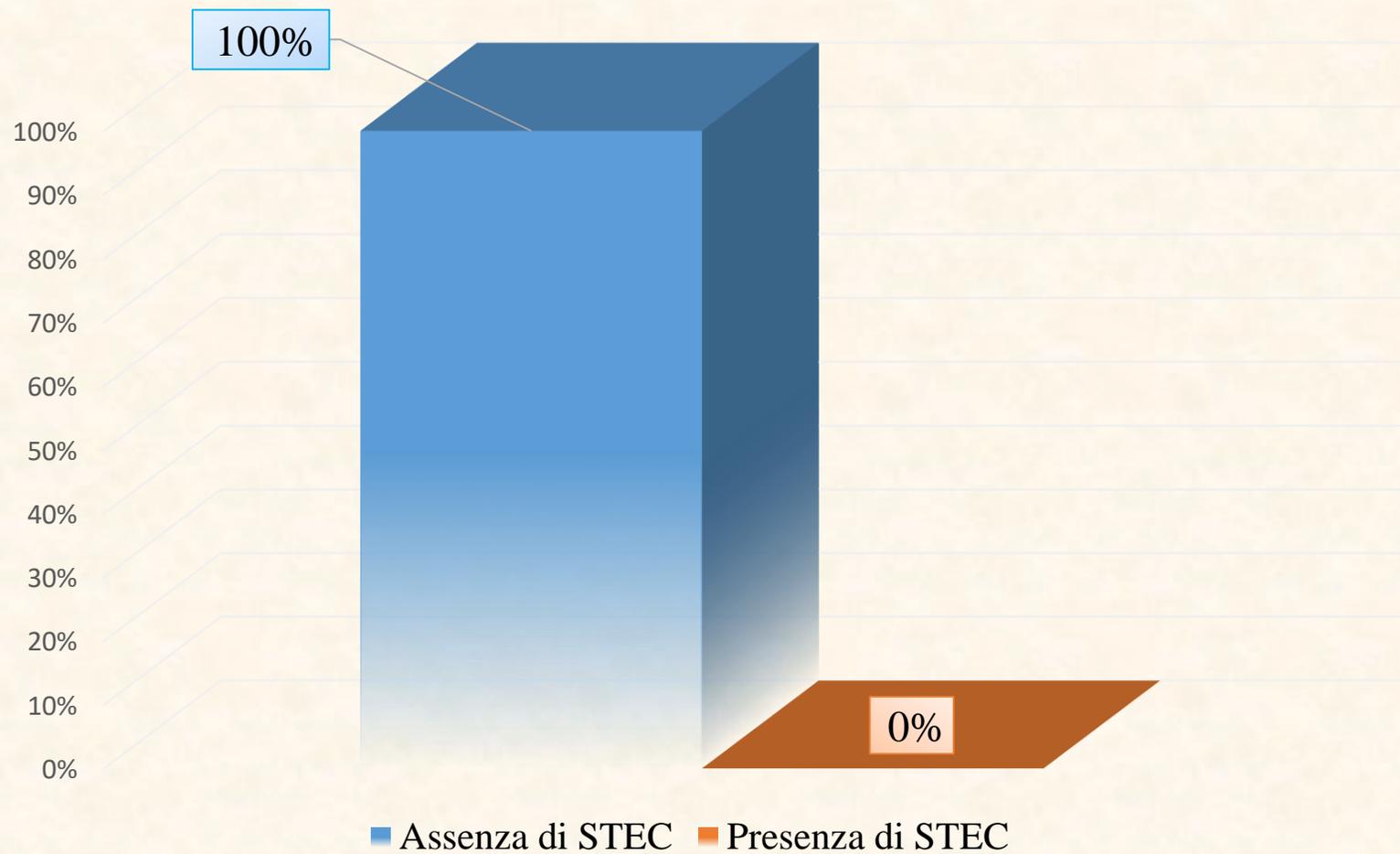
Semina superficiale su T.B.X. delle diluizioni  $10^{-5}$  e  $10^{-6}$  della sospensione di arricchimento (Arpa VdA)





## RISULTATI FINALI PCR REAL TIME

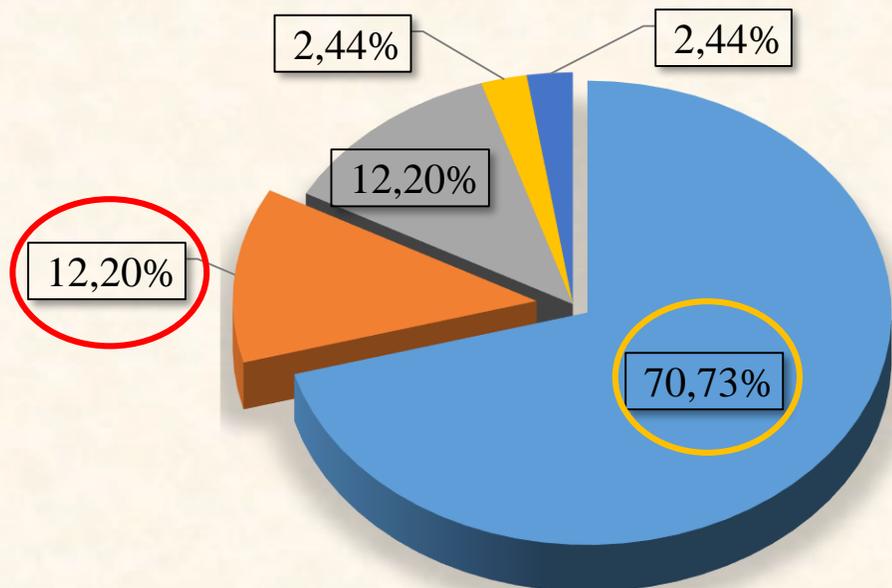
15 Campioni di germogli di soia





## RISULTATI FINALI PCR REAL TIME

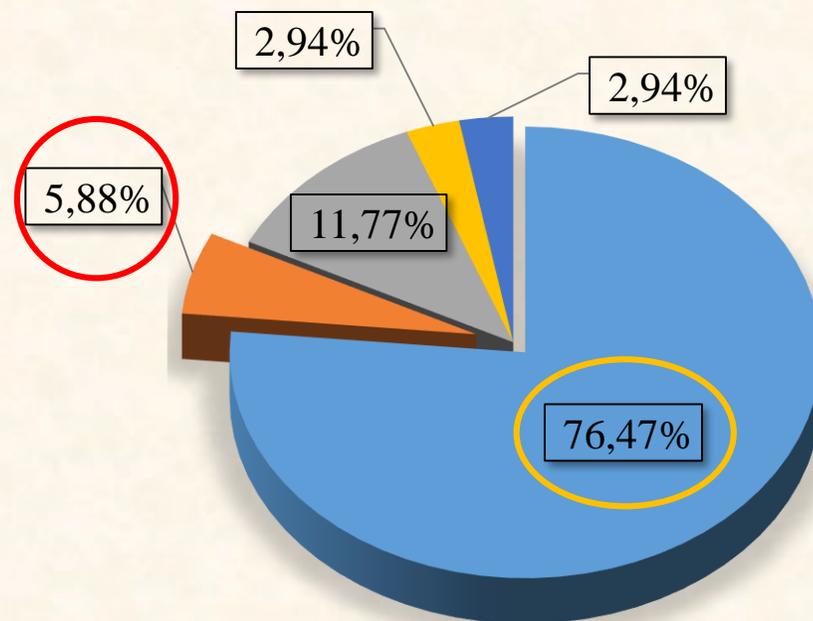
41 campioni di formaggio



- Assenza di STEC
- Presenza di STEC
- Presenza presuntiva di STEC
- Presenza presuntiva di STEC di sierogrupo OXX
- Presenza presuntiva di STEC in grado di causare la lesione A/E

Percentuali ricalcolate escludendo le forme di formaggio su cui si è ripetuta l'analisi

34 campioni di formaggio



## RISULTATI DEL METODO COLTURALE



Campione	Conteggio iniziale, prima dell'arricchimento, di <i>E. coli</i> (u.f.c./g)	Conteggio finale, dopo arricchimento, di <i>E. coli</i> (u.f.c./ml)	N° colonie STEC positive dopo reisolamento	Grado di contaminazione iniziale da <i>E. coli</i> STEC	
				Minimo	Massimo
5*	20	1,4 x 10 <sup>8</sup>	5	4	18
23*	650	5,0 x 10 <sup>7</sup>	2	39	156
24*	<10	7,3 x 10 <sup>7</sup>	1	<10	<10
27**	310.000	3,6 x 10 <sup>7</sup>	1	6.200	6.200
41**	1.600	3,9 x 10 <sup>7</sup>	1	32	32

\*Formaggi derivanti dalla stessa caldaia del caseificio A; \*\*formaggi derivanti dalla stessa caldaia del caseificio B



## CONCLUSIONI

- 5,88% di positività dei campioni di formaggio → Forme di formaggio derivanti da due caseifici.



Contaminazione ambientale del caseificio o del latte?

- Non tutti i ceppi STEC sono patogeni per l'uomo (27,9% STEC di origine umana, 52% STEC di origine non umana e 20,1% in comune tra le due fonti – WHO 2018).
- Non ci sono evidenze epidemiologiche di tossinfezione umana da STEC che derivino dal formaggio da noi analizzato.
- Rischio molto alto per la salute umana in presenza dei geni *stx*<sub>2</sub> + *eae* o *aggR*.

Il metodo da noi utilizzato non permette di distinguere tra i geni *stx*<sub>1</sub> e *stx*<sub>2</sub> e di ricercare il gene *aggR*. Di conseguenza non conosciamo il rischio associato ai ceppi isolati. → Approfondimento presso l'università di Piacenza.



GRAZIE PER L'ATTENZIONE



Torino, 14 novembre 2019  
*Alessandra Termine*