



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

Detection of Verocytotoxin/Shiga-toxin producing
Escherichia coli (VTEC/STEC): application of UNI CEN
ISO/TS 13136:2013 method on two different food
matrices and critical comparison of the results obtained

RELATORE

Prof./Dott Sara Agata Caterina SCUTERA

CORRELATORE

Prof./Dott Maria Francesca BORNEY

CANDIDATA

Alessandra TERMINE

Anno Accademico 2018-2019

INDICE

| | |
|--|-----------|
| 1. Introduzione | 5 |
| 1.1. Tossinfezioni alimentari (<i>foodborne diseases</i>) | 5 |
| 1.1.1. Epidemiologia delle <i>foodborne diseases</i> (FBD) nel mondo | 6 |
| 1.2. <i>Enterobacteriaceae</i> : generalità | 10 |
| 1.2.1. <i>Enterobacteriaceae</i> : fisiologia e struttura | 11 |
| 1.3. <i>Escherichia coli</i> : generalità | 12 |
| 1.3.1. <i>Escherichia coli</i> : fisiologia e struttura | 13 |
| 1.3.2. Ceppi di <i>E. coli</i> | 14 |
| 1.4. <i>Escherichia coli</i> STEC/VTEC | 16 |
| 1.5. Batteriofagi λ | 19 |
| 1.5.1. Risposta SOS ed induzione del profago λ | 23 |
| 1.6. Tossinfezione da <i>E. coli</i> STEC/VTEC | 25 |
| 1.6.1. Modalità di trasmissione e processo patogenetico | 26 |
| 1.7. Passaggio dei plasmidi di virulenza e della tossina | 30 |
| 1.8. Focolai in Germania e Francia nel 2011 | 31 |
| 1.8.1. Emergenza in campo alimentare | 32 |
| 2. Scopo della tesi | 33 |
| 3. Materiali e metodi | 35 |
| 3.1. Scelta delle matrici | 35 |
| 3.2. Materiali | 36 |
| 3.2.1. Attrezzature ed apparecchiature | 36 |
| 3.2.2. Reagenti, reattivi e materiali di riferimento | 36 |
| 3.3. Metodi | 38 |
| 3.3.1. Metodo A: PCR real time (UNI CEN ISO/TS 13136:2013) .. | 38 |
| 3.3.1.1. Principio | 38 |
| 3.3.1.2. Procedimento | 40 |
| 3.3.2. Metodo B: colturale | 51 |

| | |
|--|-----------|
| 4. Risultati | 52 |
| 4.1. Germogli | 52 |
| 4.2. Formaggi | 53 |
| 4.2.1. Risultati del metodo A | 53 |
| 4.2.2. Risultati del metodo B | 58 |
| 4.2.2.1. Conteggi riferiti agli <i>Escherichia coli</i> totali sui formaggi | 58 |
| 4.2.3. Riassunto finale dei conteggi di <i>Escherichia coli</i> | 63 |
| 4.2.3. Riassunto finale della PCR real time | 65 |
| 5. Discussione e conclusioni | 68 |
| 6. Bibliografia e sitografia | 75 |
| 7. Ringraziamenti | 85 |

1. Introduzione

1.1. Tossinfezioni alimentari (*foodborne diseases*)

Oggi le tossinfezioni alimentari vengono definite come malattie di origine alimentare (in inglese *foodborne diseases*), in quanto rappresentano una qualsiasi malattia, di origine alimentare o tossica, causata dal consumo di alimenti contaminati (WHO, *World Health Organization*, 2008) (1).

Le malattie di origine alimentare si dividono in (2):

- Infezione alimentare ovvero ingestione di microrganismi vivi che successivamente si moltiplicano ed invadono l'ospite (per esempio *Listeria monocytogenes*).
- Intossicazione alimentare ovvero ingestione di una tossina preformata da parte di microrganismi che si sono moltiplicati nell'alimento precedentemente al consumo. Affinché si manifesti la malattia è indispensabile la presenza della tossina, anche in assenza del batterio che l'ha prodotta (per esempio le tossine del *Clostridium botulinum* e dello *Staphylococcus aureus*).
- Tossinfezione alimentare “*in sensu strictu*” ovvero ingestione di alimenti contenenti contemporaneamente il batterio patogeno e la propria tossina (per esempio *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* e *Salmonella*).

Molti degli agenti patogeni trasmessi tramite gli alimenti derivano dagli animali, quindi oltre a tossinfezioni alimentari è necessario parlare di:

- zoonosi ovvero infezioni o malattie che possono essere trasmesse direttamente o indirettamente dagli animali all'uomo, ad esempio attraverso il contatto con animali infetti;
- zoonosi di origine alimentare ovvero malattie provocate dal consumo di alimenti o acqua potabile contaminati da microrganismi patogeni, tra cui batteri e relative tossine, virus e parassiti provenienti da

animali. Le infezioni più frequenti sono quelle causate dai batteri *Campylobacter*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Escherichia coli* e *Listeria* (3).

1.1.1. **Epidemiologia delle *foodborne diseases* (FBD) nel mondo**

Le tossinfezioni alimentari sono un problema universale, rappresentano una delle cause più importanti di morbilità e mortalità nel mondo, e costituiscono anche un significativo impedimento dello sviluppo socioeconomico a livello mondiale.

Esistono oggi più di 250 tossinfezioni alimentari, che si manifestano con differenti sintomi e sono causate da diversi agenti patogeni, perlopiù batteri, virus e parassiti. Negli anni '80 e '90 si è assistito ad importanti cambiamenti nello scenario delle infezioni trasmesse da alimenti con la comparsa di nuovi agenti patogeni (i cosiddetti patogeni emergenti, come *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, etc), alcuni dei quali si sono diffusi in seguito all'aumento degli scambi commerciali, al ricorso alla ristorazione collettiva, alla presenza di grandi allevamenti intensivi e all'aumento di viaggi effettuati (4).

L'incidenza globale è difficile da stimare. Nel 2010, FERG (*Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group*) fornì le prime stime globali e regionali relative all'incidenza, alla mortalità e al peso (*burden*), in termini di DALYs (*Disability-Adjusted Life Years*), delle malattie di origine alimentare. Il report venne pubblicato nel 2015 da WHO (5, 6). Si identificarono 31 agenti pericolosi di origine alimentare (agenti microbiologici tra cui virus, protozoi e batteri, agenti chimici e tossici) che causarono 600 milioni di casi di malattia alimentare (95% uncertainty interval [UI] 420–960), e 420.000 casi di morte (95% [UI] 310.000-600.000), di cui 230.000 causate da agenti provocanti malattie diarroiche.

Queste ultime, infatti, sono le malattie più frequenti (550 milioni di casi), in particolare dovute a norovirus (125 milioni casi di malattia) e *Campylobacter* spp. (96 milioni casi di malattia) (tabella 1).

| HAZARD | FOODBORNE ILLNESSES | FOODBORNE DEATHS | FOODBORNE DALYs |
|---|---|---------------------------------------|--|
| TOTAL | 600,652,361 (417,646,804– 962,834,044) | 418,608 (305,128– 598,419) | 32,841,428 (24,809,085– 46,274,735) |
| Diarrheal disease agents | 548,595,679 (369,976,912– 888,528,014) | 230,111 (160,039– 322,359) | 17,659,226 (12,458,675– 24,516,338) |
| <u>Viruses</u> | 124,803,946 (70,311,254– 251,352,877) | 34,929 (15,916– 79,620) | 2,496,078 (1,175,658– 5,511,092) |
| <u>Norovirus</u> | 124,803,946 (70,311,254– 251,352,877) | 34,929 (15,916– 79,620) | 2,496,078 (1,175,658– 5,511,092) |
| <u>Bacteria</u> | 349,405,380 (223,127,469– 590,002,559) | 187,285 (131,742– 254,037) | 14,490,808 (10,303,551– 19,681,271) |
| <u>Campylobacter spp.</u> | 95,613,970 (51,731,379– 177,239,714) | 21,374 (14,604– 32,584) | 2,141,926 (1,535,985– 3,137,980) |
| Enteropathogenic <i>E. coli</i> | 23,797,284 (10,750,919– 62,931,604) | 37,077 (19,957– 61,262) | 2,938,407 (1,587,757– 4,865,590) |
| Enterotoxigenic <i>E. coli</i> | 86,502,735 (49,136,952– 151,776,173) | 26,170 (14,887– 43,523) | 2,084,229 (1,190,704– 3,494,201) |
| <u>Shiga toxin-producing <i>E. coli</i></u> | 1,176,854 (754,108– 2,523,007) | 128 (55–374) | 12,953 (5,951–33,664) |
| Non-typhoidal <i>S. enterica</i> ¹ | 78,707,591 (31,843,647– 211,154,682) | 59,153 (36,341– 89,045) | 4,067,929 (2,486,092– 6,271,290) |
| <i>Shigella</i> spp. | 51,014,050 (20,405,214– 118,927,631) | 15,156 (6,839– 30,072) | 1,237,103 (554,204– 2,520,126) |
| <i>Vibrio cholerae</i> | 763,451 (310,910– 1,567,682) | 24,649 (10,304– 50,042) | 1,722,312 (720,029– 3,491,997) |
| <u>Protozoa</u> | 67,182,645 (35,794,977– 120,556,797) | 5,558 (2,593– 11,958) | 492,354 (239,400– 1,034,790) |
| <i>Cryptosporidium</i> spp. | 8,584,805 (3,897,252– 18,531,196) | 3,759 (1,520– 9,115) | 296,156 (119,456– 724,660) |
| <i>Entamoeba histolytica</i> | 28,023,571 (10,261,254– 68,567,590) | 1,470 (453–5,554) | 138,863 (47,339– 503,775) |
| <i>Giardia</i> spp. | 28,236,123 (12,945,655– 56,996,454) | 0 (0–0) | 26,270 (11,462– 53,577) |

Tabella 1 - Media globale del numero di malattie a trasmissione alimentare, morti e anni di vita corretti per la disabilità (DALYs), con intervallo di confidenza al 95%, 2010 (parte di tabella tratta da Havelaar *et al.*, 2015) (6)

Inoltre, il peso globale, causato dai 31 agenti di origine alimentare, è di circa 33 milioni di DALYs, di cui il 40% riguarda bambini di età inferiore a

5 anni. Per quanto concerne gli STEC, FERG ha stimato 2.5 milioni di nuovi casi (di origini diverse, non solo di tipo alimentare) con 3.330 casi di sindrome emolitico-uremica, 200 casi di ESRD (*End-Stage Renal Disease*), 269 casi di morte e 27.000 di DALYs (7). Dei nuovi casi insorti si stima che circa la metà (1,2 milioni di casi) comprende eventi di malattie a trasmissione alimentare con 128 decessi e circa 13.000 di DALYs in tutto il mondo (tabella 1 e 2). Anche in questo caso i soggetti maggiormente colpiti sono i bambini sotto i 5 anni (7).

| PATHOGEN | ILLNESSES (95% UI) | DEATHS (95% UI) | DALYs (95% UI) | PROPORTION FOODBORNE (95% UI) | FOODBORNE ILLNESSES (95% UI) | FOODBORNE DEATHS (95% UI) | FOODBORNE DALYs (95% UI) |
|--------------------------------------|------------------------------------|-----------------|------------------------|-------------------------------|----------------------------------|---------------------------|--------------------------|
| 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) | 0.48 (0.33–0.60) | 1,176,854 (754,108–2,523,007) | 128 (55–374) | 12,953 (5,951–33,664) |

Tabella 2 - Numero medio di malattie di origine alimentare, decessi e anni di vita corretti per la disabilità (DALYs), con intervallo di incertezza al 95%, 2010 (parte di tabella tratta da Kirk *et al.*, 2015) (7)

Esiste, però, una considerevole differenza del peso delle FBD tra le diverse regioni geografiche (grafico 1). La maggior incidenza (DALYs per 100.000 abitanti) si osserva in 2 sottoregioni africane (AFR D e AFR E), seguite dal Sud Est asiatico (SEAR B e SEAR D) e dalle sottoregioni del Mediterraneo orientale (EMR). L'incidenza minore, invece, risulta nel Nord America seguito dalle tre regioni europee (EUR) e dalle sottoregioni del Pacifico occidentale (WPR). Nella maggior parte dei casi le FBD sono causate da agenti responsabili di malattie diarroiche (6).

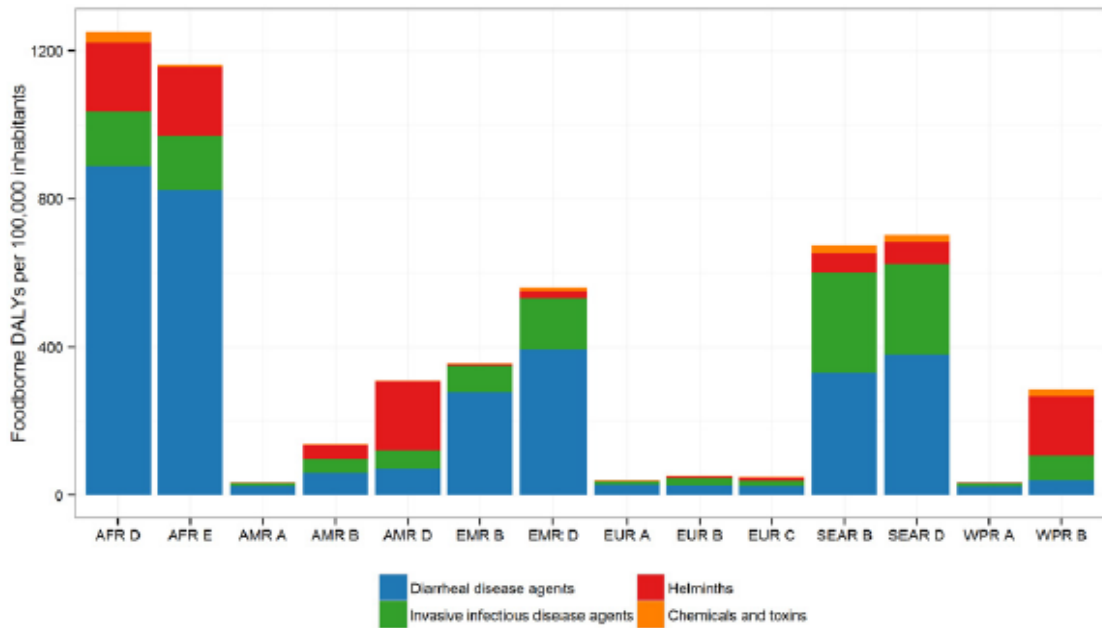


Grafico 1 – Peso globale delle FBD in termini di DALYs/100.000 abitanti (6)

Per quanto riguarda la tossinfezione da *E. coli* STEC, invece, ad oggi, il carico di malattia più elevato si è verificato nella regione del Sud-Est asiatico, seguito dalle regioni europee ed americane (8).

1.2. *Enterobacteriaceae*: generalità

La famiglia delle *Enterobacteriaceae* comprende batteri Gram-negativi di forma bastoncellare. Sono stati individuati 32 generi e più di 130 specie, che sono state classificate in base alle diverse strutture antigeniche e alle proprietà biochimiche. Le *Enterobacteriaceae* sono microrganismi ubiquitari: si trovano nel suolo, nell'acqua, nella vegetazione e fanno parte della flora intestinale della maggior parte degli animali compreso l'uomo. Questi batteri causano una vasta gamma di malattie umane, fra cui il 30-35% delle setticemie, più del 70% delle infezioni delle vie urinarie (infezioni extraintestinali) e molte infezioni intestinali. Si suddividono in:

- patogeni obbligati, ovvero batteri che sono sempre associati a malattia come *Salmonella typhi*, *Shigella* spp e *Yersinia pestis*;

- patogeni facoltativi, ovvero batteri che fanno parte della normale flora intestinale e causano malattia solo in alcuni ospiti, e in alcune condizioni come *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Citrobacter*, *Proteus mirabilis*, *Enterobacter* e *Serratia* (9).

1.2.1. *Enterobacteriaceae*: fisiologia e struttura

I membri di questa famiglia sono bacilli di modeste dimensioni, un diametro compreso tra 0,5 e 1,5 micrometri, e una lunghezza compresa tra 2 e 4 micrometri. Sono microrganismi asporigeni sia immobili che mobili, con flagelli peritrichi. Tutti i membri possono crescere rapidamente in aerobiosi e in anaerobiosi, ovvero sia in presenza che in assenza di ossigeno, in una notevole varietà di terreni di coltura selettivi e differenziali, tra cui l'Agar MacConkey. Per questo motivo vengono definiti anaerobi facoltativi.

Le *Enterobacteriaceae* hanno esigenze nutrizionali semplici, tutti fermentano il glucosio, riducono i nitriti a nitrati, sono ossidasi-negativi e catalasi-positivi. Le diverse caratteristiche biochimiche hanno permesso di identificare i diversi membri della famiglia delle *Enterobacteriaceae*. I criteri di classificazione sono:

1. capacità di utilizzare particolari substrati come unica fonte di carbonio;
2. presenza di particolari enzimi;
3. produzione di specifici prodotti metabolici;
4. capacità di fermentare particolari zuccheri.

Ad esempio, la capacità di fermentare il lattosio è stata utilizzata per identificare i batteri lattosio fermentanti (*Escherichia*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* e *Serratia* spp.), dai batteri lattosio non fermentanti (*Proteus*, *Salmonella*, *Shigella* e *Yersinia* spp.). La resistenza ai

sali biliari mostrata in alcuni terreni selettivi, invece, ha permesso di discriminare i batteri enterici (i più importanti: *Salmonella* e *Shigella*) dai microrganismi commensali, i quali sono inibiti dai sali biliari (per esempio i batteri Gram-positivi).

La componente antigenica è costituita per la maggior parte dal lipopolisaccaride (LPS) presente nel foglietto esterno della membrana parietale. Il LPS è formato da tre componenti:

- antigene O (antigene somatico) ovvero la porzione polisaccaridica esterna;
- core polisaccaridico che è comune a tutte le *Enterobacteriaceae* (antigene comune);
- lipide A ovvero la porzione glicolipidica interna, chiamata anche 'endotossina' in quanto rappresenta il fattore tossico dei batteri Gram negativi (9, 10).

1.3. *Escherichia coli*: generalità

Il Genere *Escherichia* comprende diverse specie batteriche. *Escherichia coli* (figura 1), identificato nel 1855 da Theodor Escherich come *Bacterium coli*, fa parte della famiglia delle *Enterobacteriaceae* ed è incluso nel gruppo dei coliformi.

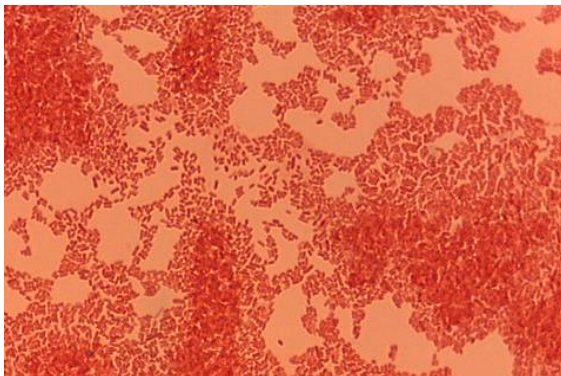


Figura 1 – *Escherichia coli*, Gram negativo di forma bastoncellare

Rappresenta la specie più comune e clinicamente più importante. Questo microrganismo è un commensale del tratto intestinale umano e animale, normalmente patogeno opportunista. La sua presenza in acqua e in matrici alimentari rappresenta un'indicazione di contaminazione fecale.

In caso di indebolimento delle difese immunitarie dell'ospite, in particolare nei bambini e negli anziani, un'infezione da parte di questi batteri può causare malattie intestinali, quali gastroenteriti (esogene), ma anche malattie extraintestinali (endogene), quali infezioni delle vie urinarie, peritoniti, meningiti neonatali e sepsi (11, 12).

1.3.1. *Escherichia coli*: fisiologia e struttura

E. coli, oltre alle caratteristiche comuni a tutte le *Enterobacteriaceae*, è un batterio mobile ed è dotato di capsula, pili o fimbrie. Questo gli permette di aderire alla superficie della mucosa intestinale dell'ospite.



Figura 2 – Profilo biochimico identificativo del batterio *Escherichia coli*

Inoltre è un microrganismo in grado di fermentare il lattosio (Lac +), di produrre indolo a partire dal triptofano (figura 2), di produrre gas ed acidi durante la fermentazione dei carboidrati, di crescere alla temperatura di 44°C (batteri termotolleranti) e il 98% degli *E. coli* possiede l'enzima β -D-glucuronidasi, con l'eccezione del sierotipo O157:H7. Tale enzima è evidenziabile, su terreni come il T.B.X. (Tryptone Bile X-GLUC), dall'idrolisi dei β -glucuronidi cromogeni o fluorogeni che dà luogo alla formazione di un pigmento blu-verde (13, figura 3).

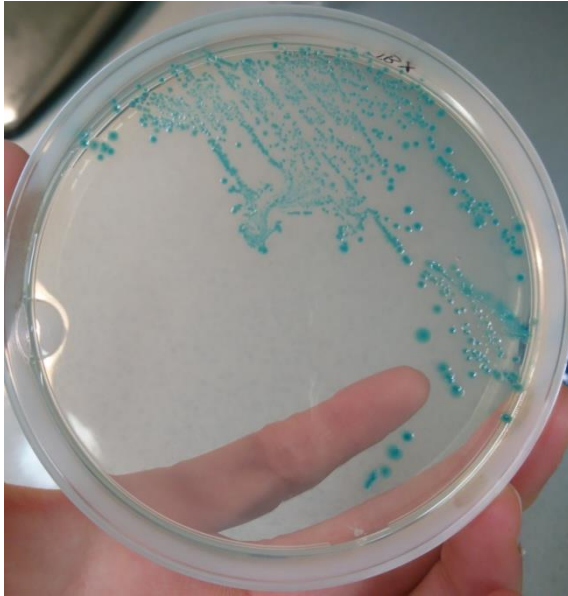


Figura 3 – Colonie di *Escherichia coli* β -D-glucuronidasi positive sul terreno T.B.X.

1.3.2. Ceppi di *E. coli*

Alcuni *E. coli* possiedono caratteristiche di virulenza, quali la produzione di tossine, l'espressione di fattori di virulenza e la capacità di invadere la mucosa intestinale, che giocano un ruolo fondamentale nell'evoluzione dei ceppi patogeni. L'acquisizione di tali caratteristiche è legata, generalmente, alla presenza di elementi genetici mobili come plasmidi di virulenza, batteriofagi e particolari segmenti di DNA cromosomico, chiamati “isole di patogenicità” (14).

Esistono una molteplicità di ceppi che sono stati tipizzati e classificati sulla base dei diversi caratteri antigenici strutturali, in particolare rispetto ai 3 antigeni strutturali: O (antigene somatico), H (antigene flagellare) e K (antigene capsulare). I ceppi che causano gastroenteriti vengono suddivisi in sei gruppi (11, 12):

1. ETEC (*E. coli* enterotossigeni) che si localizzano a livello dell'intestino tenue, causando frequentemente la diarrea del viaggiatore e la diarrea infantile nei paesi in via di sviluppo, una forma di diarrea acquosa accompagnata da crampi addominali, nausea, vomito e febbre lieve. L'attività tossica è determinata dalla

produzione di due enterotossine che stimolano l'ipersecrezione di fluidi ed elettroliti: tossina termostabile (ST, *stable toxin*) e tossina termolabile (LT-I e II, *labile toxin*). La tossina LT-I è molto simile alla tossina del colera.

2. EPEC (*E. coli* enteropatogeni) che si localizzano a livello dell'intestino tenue causando diarrea infantile nei paesi in via di sviluppo, accompagnata da febbre, nausea, vomito e feci non sanguinolente. La malattia è causata dall'adesione del microrganismo alle cellule epiteliali intestinali con conseguente distruzione dei microvilli (istopatologia A/E, *attaching and effacing*), che porta a malassorbimento e diarrea.
3. EAEC (*E. coli* enteroaggreganti) che si localizzano a livello dell'intestino tenue causando diarrea acquosa infantile con vomito, disidratazione e febbre lieve nei paesi in via di sviluppo. Questi aderiscono alla mucosa intestinale, grazie alla presenza di fimbrie aggreganti di aderenza I e II (AAF/I e AAF/II) trasportate da un plasmide, causando l'accorciamento dei microvilli e conseguente diminuzione dell'assorbimento intestinale, infiltrazione mononucleata ed emorragia.
4. DAEC (*E. coli* diffusamente aderenti) che si localizzano a livello dell'intestino tenue e sono associati a diarrea acquosa in bambini di età compresa tra 1 e 5 anni.
5. EIEC (*E. coli* enteroinvasivi) che si localizzano nell'intestino crasso, invadendolo, distruggendo le cellule epiteliali del colon e causando una malattia caratterizzata inizialmente da diarrea acquosa. La distruzione delle cellule con infiltrazione infiammatoria può causare ulcerazione del colon.
6. EHEC (*E. coli* enteroemorragici) che si localizzano a livello dell'intestino crasso causando una malattia che varia, da una lieve

diarrea senza complicazioni, ad una colite emorragica (*haemorrhagic colitis*) con dolori addominali acuti, seguita da diarrea sanguinolenta e febbre bassa o assente. Questa condizione può degenerare in sindrome emolitico-uremica (SEU o *hemolytic-uremic syndrome*-HUS).

Quest'ultimo gruppo di *E. coli* gastroenterici sarà l'oggetto del lavoro svolto in laboratorio.

1.4. *Escherichia coli* STEC/VTEC

I ceppi di *Escherichia coli* patogeni, appartenenti al gruppo degli EHEC, e caratterizzati dalla capacità di liberare una tossina simile a quella prodotta dal genere *Shigella Dysenteriae* di tipo 1, sono definiti come:

- *E. coli* STEC, cioè *E. coli* produttori di Shiga tossina (Stx);
- *E. coli* VTEC, cioè *E. coli* produttori di Verocitotossine, nome derivante dalla loro attività citolitica nei confronti delle “cellule Vero” (15).

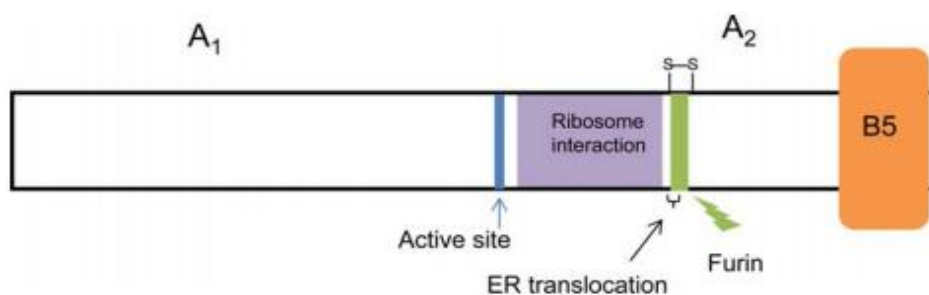


Figura 4 – Rappresentazione della struttura di Stx (15)

La tossina Stx rappresenta una delle più potenti tossine batteriche con capacità enterotossiche e citotossiche. Costituisce, infatti, un importante fattore di virulenza per la patogenesi della malattia causata da questi batteri. Due tipi principali di tossina si differenziano per proprietà antigeniche: Stx1, identica alla tossina prodotta da *Shigella dysenteriae* 1, e

Stx2, tossina maggiormente trasportata dai ceppi STEC (88%) (17) e la più importante nella patologia umana (15). Per quanto riguarda la tossina Stx1 sono state individuate tre varianti (Stx1a, Stx1c e Stx1d), mentre della tossina Stx2 sono note sette varianti (Stx2a, Stx2b, Stx2c, Stx2d, Stx2e, Stx2f e Stx2g) (18). I geni *stx*, che codificano per la tossina Shiga, sono generalmente trasportati dai batteriofagi lisogeni λ inseriti nel cromosoma batterico. Questi codificano per una proteina tossica di 70 kDa, definita AB5 (figura 4), in quanto formata da una subunità A di circa 32 kDa (A_1 e A_2 sono legate da un ponte di disolfuro), dotata di attività enzimatica N-glicosidasi, e un pentamero di 5 subunità B identiche di circa 7.5 kDa, provvisto di attività recettoriale. Le molecole a cui si lega la tossina sono dei recettori glicoproteici, Gb3 (globotriasilceramide), presenti sulla membrana delle cellule eucariote bersaglio. In particolare, si rileva un'alta concentrazione di tale molecola a livello dei villi intestinali e delle cellule endoteliali renali (11, 15). Il meccanismo d'azione della tossina viene definito “*retrograde pathway*” e avviene come segue (figura 5):

- legame recettore (Gb3) - tossina a formare un complesso;
- internalizzazione del complesso tramite endocitosi e fusione delle vescicole endocitiche con i lisosomi;
- trasporto dell'endosoma dal citoplasma all'apparato del Golgi dove avviene, per azione di una proteasi chiamata furina, il taglio della subunità A in A_1 e A_2 ;
- trasporto della tossina clivata dal Golgi al Reticolo Endoplasmatico;
- rilascio della subunità A_1 nel citosol;

- azione citotossica: A₁ raggiunge i ribosomi, si lega alla subunità maggiore (60S) e rimuove un'adenina dalla molecola rRNA 28S, causando il blocco della sintesi proteica e la morte cellulare (apoptosi) (12, 15, 16).

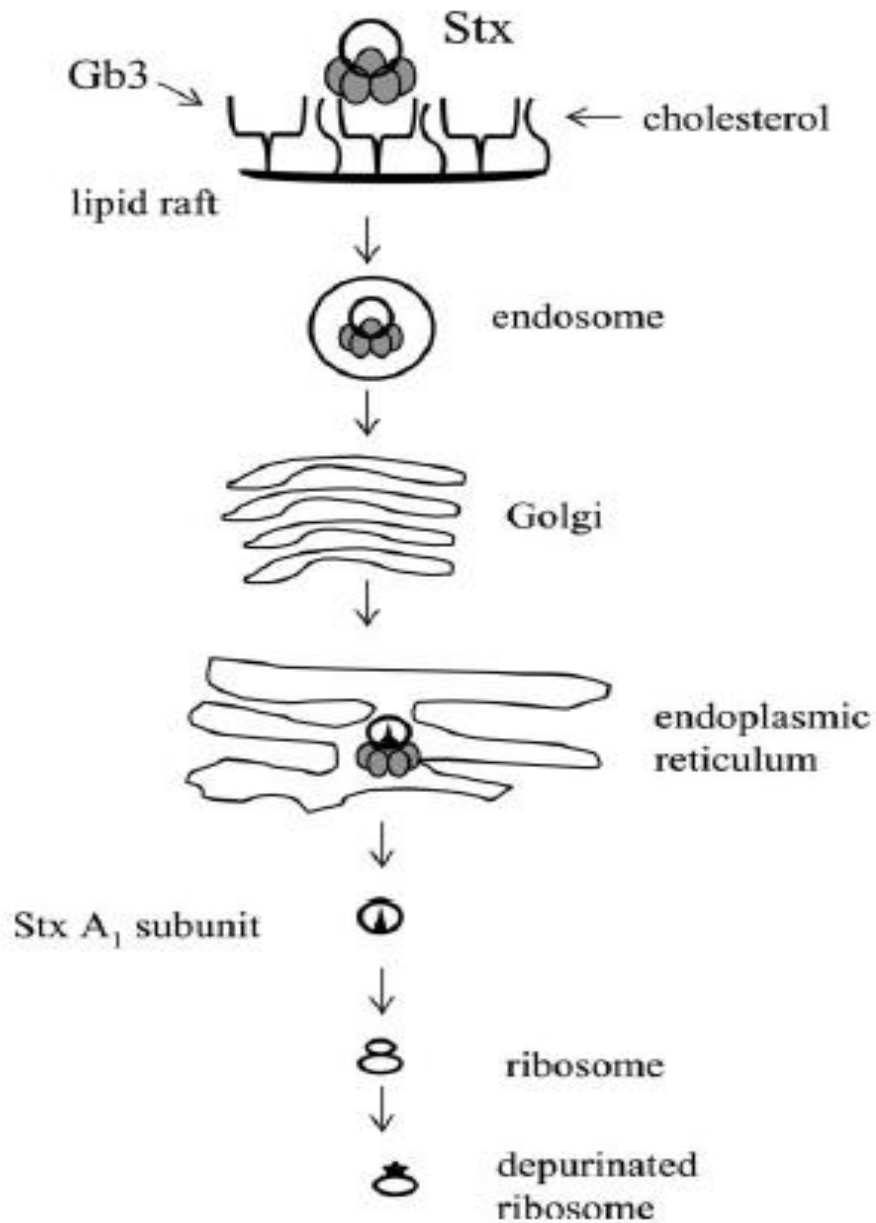


Figura 5 – Meccanismo d'azione della tossina (*retrograde pathway*) (15)

1.5. Batteriofagi λ

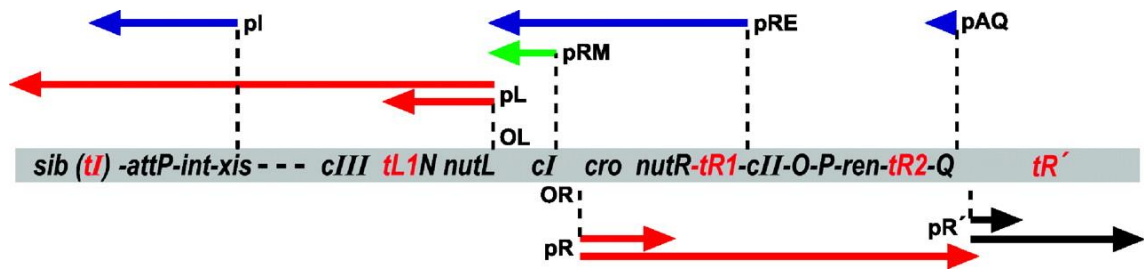


Figura 6 – Mappa del fago λ (19)

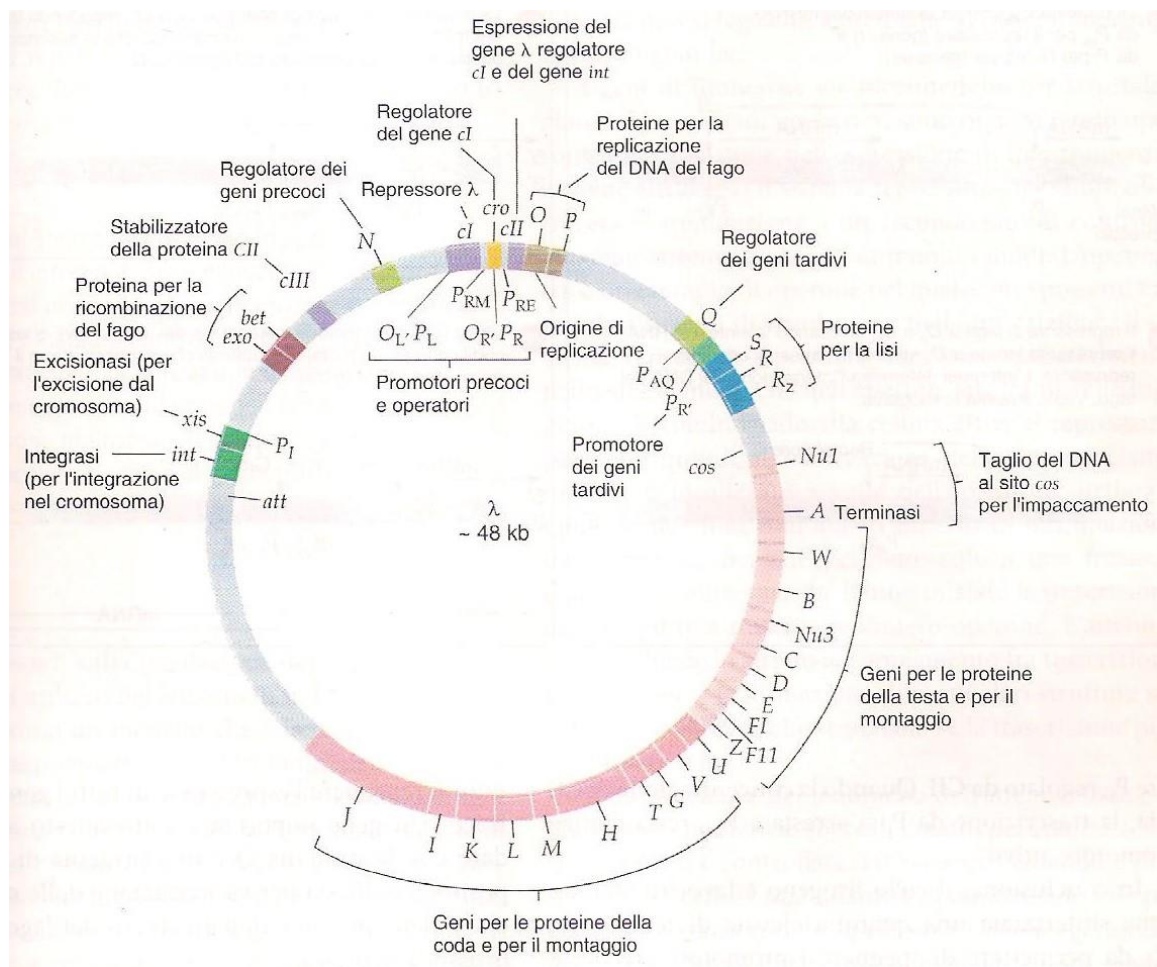


Figura 7 – Mappa del fago λ (20)

Tra i fattori che hanno influito sull'evoluzione della virulenza di questi batteri si ritiene abbiano avuto un ruolo rilevante i batteriofagi trasportanti il gene *stx* (definiti *Shiga toxin-converting phages* or *Stx phages*), appartenenti alla famiglia dei fagi λ (21).

I batteriofagi λ sono fagi temperati, ciò significa che, quando essi infettano i batteri, hanno la possibilità di intraprendere due vie:

- il ciclo litico, che consiste nella replicazione del fago stesso con conseguente lisi della cellula batterica e rilascio di centinaia di particelle fagiche in ambiente extracellulare;
- il ciclo lisogeno, che consiste nell'integrazione del genoma del batteriofago all'interno del cromosoma batterico, con conseguente silenziamento del genoma fagico e perdita della capacità di autoreplicazione. Questo si duplica insieme al DNA dell'ospite e in questo modo il batteriofago si trova in uno stato di quiescenza, definito profago. Quest'ultimo può revertire da tale forma in seguito ad un segnale di induzione (19, 22).

Il cromosoma di questi batteriofagi è costituito da un DNA a doppia elica (23, 24, 25) con estremità a singolo filamento complementari tra loro a formare le estremità coesive, chiamate *cos*. Per tale motivo l'acido nucleico del fago può trovarsi sia in forma lineare, durante la riproduzione del fago, che in forma circolare, assunta subito dopo l'infezione della cellula ospite (23).

Il genoma fagico, una volta libero nella cellula, circolarizza e va incontro ad eventi precoci nella trascrizione che influenzano la scelta di intraprendere il ciclo lisogeno piuttosto che quello litico.

La trascrizione inizia da due promotori precoci (figure 6 e 7): *pL*, che trascrive verso sinistra, e *pR*, che trascrive verso destra.

Partendo da *pR*, il primo gene trascritto è *cro* (*control of repressor and other*) e il suo prodotto è la proteina Cro.

Partendo da *pL*, il primo gene trascritto è *N*. Il prodotto N è una proteina antiterminatore che permette all'enzima RNA polimerasi di procedere oltre ai siti terminatori (*tL1* e *tR1*), situati a sinistra del gene *N* e a destra del gene *cro*, in modo tale da esprimere tutti i geni precoci. Uno di questi è proprio il gene *cII* che codifica per la proteina CII. Quest'ultima attiva:

- il gene *cI*, che codifica per il repressore di λ ;

- i geni *O – P* e *ren*, che codificano per le proteine della replicazione del DNA;
- il gene *Q*, che codifica per un'altra proteina antiterminatore (*Q*), la quale permette la trascrizione fino ai geni tardivi (promotore *pR'*), necessari per il ciclo litico (proteine strutturali e per la lisi della cellula ospite) (19, 26).

Il gene che codifica per la tossina Shiga (gene *stx*) è situato all'interno del cromosoma di questi fagi, in particolare nella regione tardiva tra il gene *Q* antiterminatore e i geni che provocano la lisi cellulare (21, 25).

Agli eventi precoci nella trascrizione seguono o il ciclo lisogeno o il ciclo litico (19, 26).

- Ciclo lisogeno

L'instaurazione dello stato lisogeno richiede i prodotti proteici dei geni *cII* (dall'operone precoce di destra) e *cIII* (dall'operone precoce di sinistra), oltre ad altre due proteine fagiche: Int (integrasi), necessaria all'interazione del genoma fagico, e CI, necessaria per la repressione dei due promotori precoci. La proteina CII, stabilizzata da CIII, attiva: la trascrizione del gene *cI*, a partire dal promotore *pRE* (*promoter for repressor establishment*), la trascrizione del gene *int*, a partire dal promotore *pI*, e la trascrizione del gene *Q*. Una volta trascritto, il repressore di λ si lega a due operatori, *OL* e *OR*, le cui sequenze sono sovrapposte, rispettivamente, ai promotori *pL* e *pR*. Tale legame impedisce all'enzima RNA polimerasi di trascrivere gli operoni precoci. Di conseguenza, la trascrizione dei geni *N* e *cro*, e di tutti i geni regolati dai loro rispettivi prodotti (inclusi i geni *cII* e *cIII*), viene bloccata causando una diminuzione della concentrazione dei prodotti proteici a livello cellulare. In questo modo la sintesi della proteina CI, a partire dal promotore *pRE*, si blocca.

Tuttavia, il repressore legato a *OR* stimola la sintesi di ulteriore mRNA repressore a partire da un diverso promotore, *pRM* (*promoter for repressor*

maintenance), che fa sì che venga mantenuta una certa concentrazione di CI nella cellula. Quindi, se è presente una quantità sufficiente di repressore di λ viene stabilito lo stato lisogeno in seguito all'integrazione del DNA virale, catalizzata dall'integrasi, e alla repressione di tutti i geni del ciclo litico.

- Ciclo litico

Il ciclo litico si attiva in seguito all'induzione del profago che verrà descritta successivamente (paragrafo 1.5.1. Risposta SOS ed induzione del profago λ).

L'assenza del repressore λ , sugli operoni *OR* e *OL*, permette all'enzima RNA polimerasi di legarsi ai promotori precoci e trascrivere i geni *N* e *cro*.

La proteina N, come descritto sopra, permette la trascrizione di altri geni, tra cui il gene *Q*, che consente di procedere con la trascrizione dei geni che codificano per la lisi cellulare e le proteine morfogenetiche del fago.

Tuttavia, la proteina Cro riduce la trascrizione a partire dai promotori *pL* e *pR*, cosicché la sintesi della proteina CII si riduce, indirettamente, per effetto sulla proteina CIII e, direttamente, per effetto sul gene *cII*. La proteina Cro, inoltre, si lega ad una regione degli operatori *OL* e *OR*. Tramite questo meccanismo viene bloccata la sintesi del repressore di λ , sia a partire dal promotore *pRE* che a partire dal promotore *pRM*.

Nonostante ciò, durante il ciclo si è accumulata una quantità sufficiente di proteina Q in grado di stimolare la trascrizione dei geni tardivi, permettendo al batteriofago di andare incontro al ciclo litico ed esprimere il gene della tossina (*stx*), presente nella regione tardiva del genoma fagico come precedentemente citato.

Riassumendo, λ usa un complesso sistema di regolazione per scegliere il ciclo litico o il ciclo lisogeno. La decisione dipende da un sofisticato interruttore genetico che implica la competizione tra i prodotti del gene *cI* (repressore) ed il gene *cro* (proteina Cro). Se predomina il repressore, viene

intrapreso il ciclo lisogeno, se invece domina Cro, viene intrapreso il ciclo litico.

1.5.1. Risposta SOS ed induzione del profago λ

Durante il ciclo lisogeno la maggior parte dei geni del profago, incluso il gene *stx*, sono silenti a causa della sintesi della proteina CI che funge da repressore sui promotori precoci. L'espressione dei geni che consentono la replicazione del fago e la produzione della tossina Stx, perciò, avviene solo in seguito all'induzione del profago. Tale fenomeno è legato al meccanismo di risposta SOS-RecA dipendente del batterio ospite, oppure, può avvenire, più difficilmente, in maniera spontanea (27).

In laboratorio sono state osservate diverse modalità di induzione fagica:

- 1) tramite l'esposizione ai raggi UV (21);
- 2) tramite l'esposizione ad antibiotici che interferiscono con la replicazione del DNA, come mitomicina C, ciprofloxacina, chinoloni ed altri. Per tale ragione l'utilizzo di antibiotici è sconsigliato nel trattamento contro l'infezione da EHEC (21, 25, 27, 28);
- 3) tramite il trattamento con i ROS (specie reattive dell'ossigeno), come H_2O_2 , superossido e NO (21, 25, 27, 29).

Quest'ultima condizione di stress ossidativo può verificarsi naturalmente nell'intestino umano in quanto, in seguito ad infezione batterica, i neutrofili sono le prime cellule delle difese immunitarie che si attivano contro il patogeno. Tali cellule, per combattere i batteri, producono e rilasciano perossido di idrogeno (H_2O_2) causando l'induzione del profago λ , con conseguente rilascio delle particelle fagiche e della tossina Shiga (21, 25, 27, 29, 30).

Tutto ciò avviene a causa dell'attivazione del meccanismo di riparo del DNA presente nei batteri, la risposta SOS, provocata da qualsiasi

condizione che causa un danno al DNA batterico.

Nella risposta SOS batterica vengono coinvolte tre proteine:

- RecA, una proteina che riconosce i singoli filamenti di DNA e normalmente inattiva;
- LexA, il repressore trascrizionale normalmente integro;
- CI, il repressore del fago λ .

Quando il DNA batterico viene danneggiato, a causa di uno stress esterno, si formano dei frammenti di DNA a singolo filamento che vengono riconosciuti dalla proteina RecA, la quale si attiva e causa l'auto-proteolisi dei due repressori: LexA e CI.

In condizioni normali, il repressore LexA, dopo il clivaggio, non si lega più all'operatore e viene così indotta l'espressione di oltre 30 geni, coinvolti nella riparazione del DNA, ed inibita la divisione cellulare (figura 8 (a)).

Negli *E. coli* infettati dai batteriofagi λ , il repressore CI, dopo l'auto-proteolisi, si stacca dai promotori *pL* e *pR* e permette la trascrizione dei geni coinvolti nel ciclo litico del fago λ e del gene *stx*, se presente. In tal modo, il batterio ospite viene lisato e si ha la liberazione delle particelle fagiche (*Stx phages*) e la disseminazione della tossina Shiga (figura 8 (b)) (21, 29).

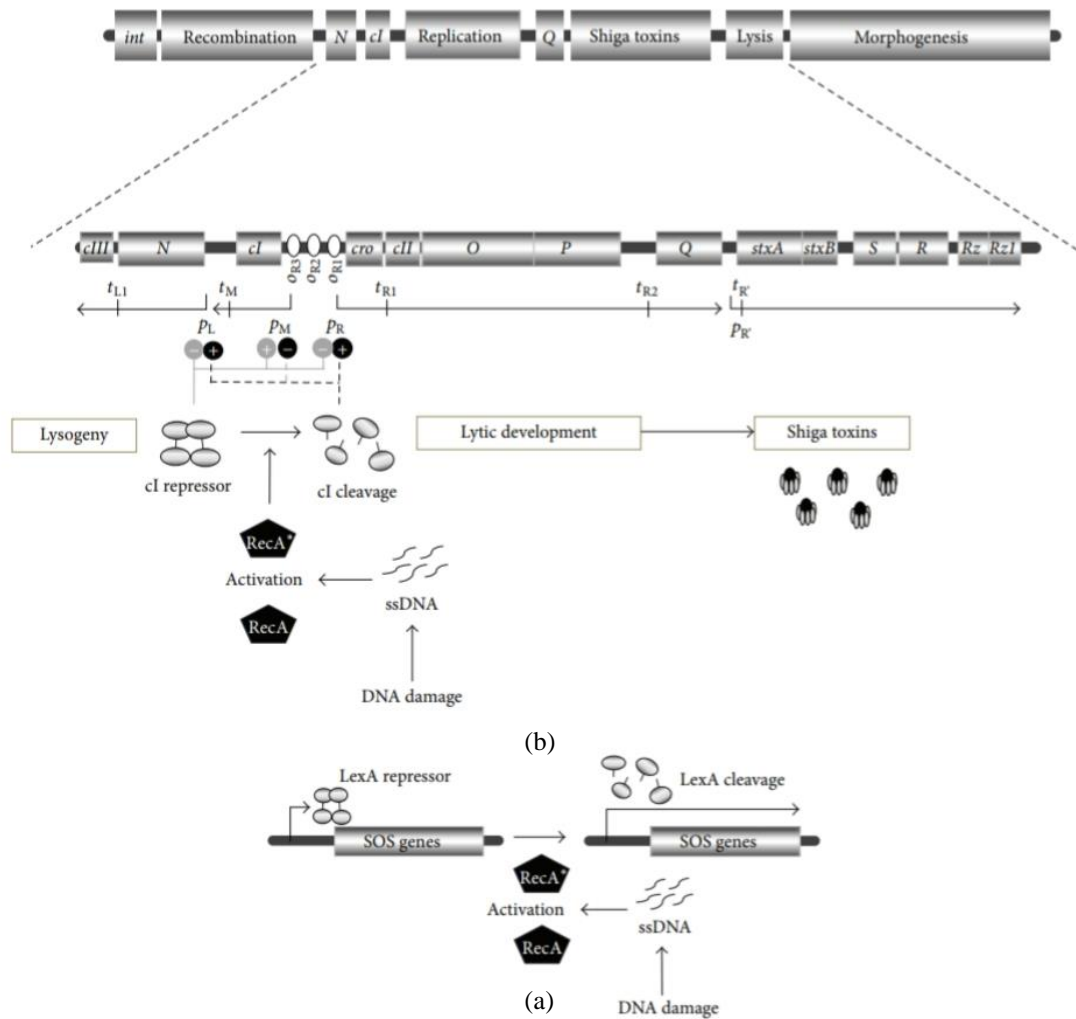


Figura 8 – Rappresentazione del meccanismo SOS batterico in condizioni normali (a) e in seguito ad infezione da parte dei batteriofagi λ (b) (21)

1.6. Tossinfezione da *E. coli* STEC/VTEC

Gli *E. coli* STEC/VTEC sono considerati tra i più importanti patogeni zoonotici a trasmissione alimentare, sia per gli episodi epidemici verificatisi in tutto il mondo, che per la gravità dei quadri clinici associati all'infezione. Sebbene siano stati isolati circa 470 sierotipi di STEC in grado di produrre 12 sottotipi di Stx, solo circa 100 sono associati frequentemente a malattia umana, e le più importanti tossine sono Stx2a, Stx2c e Stx2d (18). Il principale EHEC responsabile di malattia è rappresentato da *E. coli* O157:H7, descritto per la prima volta nel 1982, in

seguito a casi di insolite infezioni gastrointestinali, in Oregon e in Michigan, associate al consumo di hamburger in ristoranti appartenenti alla stessa catena di fast-food (31). Negli anni è stato riportato un incremento di infezioni umane, a trasmissione alimentare, associate ai ceppi STEC O157 e STEC non-O157, includendo *E. coli* STEC O26, O103, O111 e O145, conosciuti anche come i “big 5” nell'Unione Europea (32).

Questi batteri, sprovvisti di potere invasivo, possono causare un'ampia varietà di manifestazioni cliniche che dipendono dal livello di tossiemia. Le informazioni riguardo al meccanismo dose-risposta sono molto limitate (18). Tuttavia, ci sono evidenze scientifiche che riportano che esposizioni a valori di carica microbica inferiori 100 u.f.c. (4, 18, 33) sono sufficienti ad indurre quadri patologici che possono variare, dallo stato di portatore asintomatico, alla presenza di crampi addominali e lievi quadri dissenterici, fino a progredire in colite emorragica (diarrea sanguinolenta). La complicanza più grave è rappresentata dalla sindrome emolitico-uremica (SEU/HUS), e il 25-30% dei pazienti affetti da SEU può essere interessato da complicazioni neurologiche. La SEU è caratterizzata da danno renale acuto, anemia emolitica microangiopatica e trombocitopenia (basso livello di piastrine nel sangue), e si manifesta circa una settimana dopo l'esordio dei sintomi intestinali. Nella maggior parte dei casi, la malattia si risolve in 4-10 giorni ma nei soggetti a rischio, quali bambini di età inferiore ai 10 anni e soggetti anziani, si ha una probabilità del 5-10% che la colite emorragica evolva in SEU (33).

1.6.1. Modalità di trasmissione e processo patogenetico

La tossinfezione da STEC è definita come una zoonosi, in quanto il serbatoio principale di questi batteri è costituito dal tratto gastrointestinale del bovino. Tuttavia, anche altri ruminanti, come ovini, caprini e cervi,

sono considerati importanti *reservoir*. Il microrganismo è stato sporadicamente isolato anche in mammiferi (maiali, cavalli, conigli, cani e gatti) e uccelli. Principalmente la trasmissione nell'uomo avviene tramite il consumo di alimenti, quali carne cruda o poco cotta, latte crudo e derivati, o acque contaminate. Solo occasionalmente ci può essere il passaggio interumano attraverso il circuito oro-fecale in soggetti pediatrici e in individui immunodepressi. Nel tempo sono aumentate le epidemie associate al consumo di frutta e verdura, inclusi i germogli, gli spinaci, la lattuga, il cavolo e l'insalata (33, 34, 35). Un esempio è il focolaio avvenuto in Germania nel 2011 di cui si parlerà successivamente.

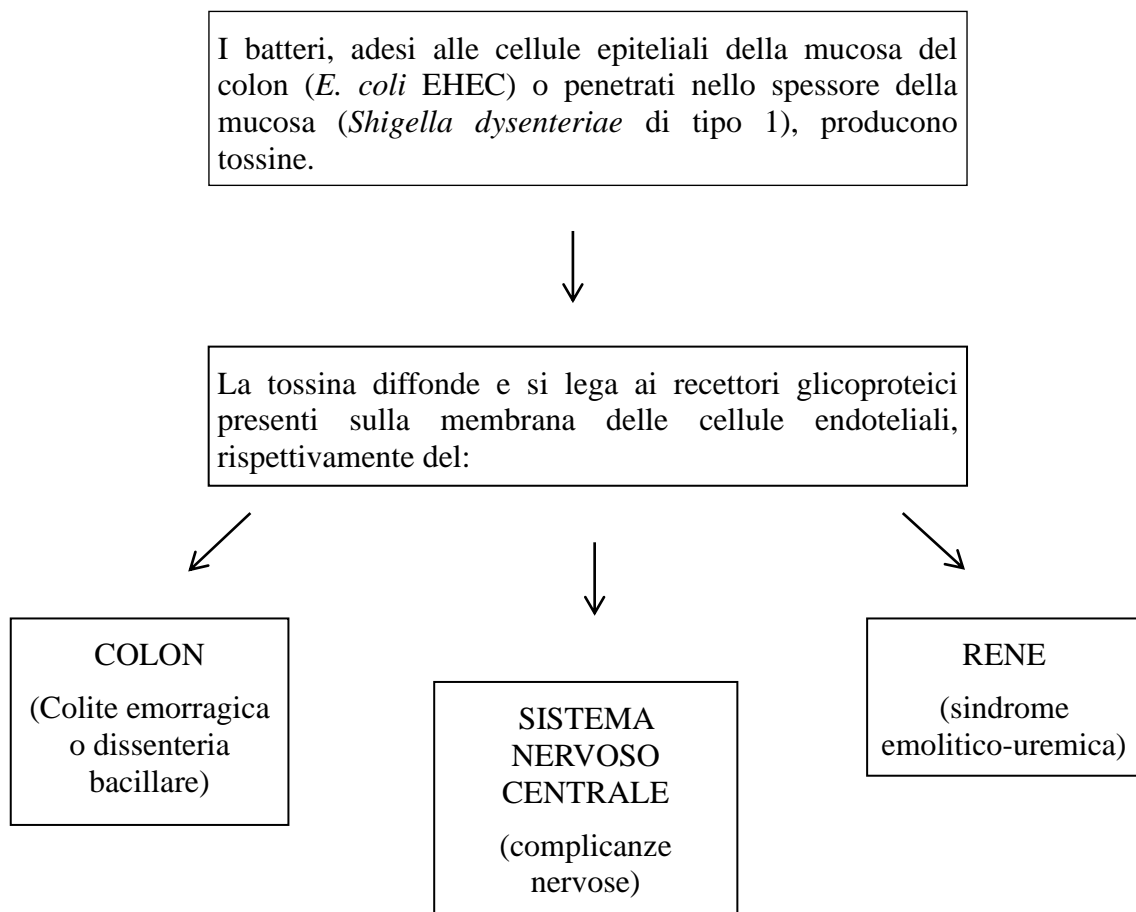


Diagramma di flusso 1 – Rappresentazione del meccanismo patogenetico tratto da (12)

In seguito all'ingestione di alimenti o acqua contaminata, il batterio colonizza la mucosa intestinale aderendo agli enterociti. Solo dopo

l'adesione alle cellule epiteliali il batterio produce la tossina Stx, che diffonde nel torrente circolatorio, danneggia le cellule endoteliali vascolari e raggiunge i tessuti bersaglio (colon, sistema nervoso centrale e rene). Qui si lega ai recettori glicoproteici, presenti sulla membrana cellulare, penetra all'interno della cellula e interrompe il normale funzionamento cellulare provocandone un danno (12, 18).

La patogenesi provocata da STEC è molto complessa. Come dimostrato in diversi articoli (18, 36), il sierotipo non è un fattore di virulenza e affinché ci siano le manifestazioni cliniche è necessaria la contemporanea presenza di due fattori di virulenza:

- la tossina Stx, descritta precedentemente;
- i fattori di adesione.

La produzione di Stx, senza un fattore di adesione, non è sufficiente a causare la malattia severa (diarrea sanguinolenta, colite emorragica e complicazioni annesse: sindrome HUS).

Le proteine necessarie all'adesione sono codificate da geni trasportati da materiale genetico mobile, un plasmide. Il principale fattore di aderenza è costituito dalla proteina intimina codificata dal gene *eae* altamente polimorfico, il quale è situato all'interno dell'isola di patogenicità (PAI) di 35.6 Kb conosciuta come LEE (*Locus of Enterocyte Effacement*) (18, 37). Il regolatore trascrizionale di questo locus è rappresentato dal prodotto genico del gene *ler*, il quale è fondamentale per causare la lesione istologica, chiamata *attaching and effacing* (A/E), provocata dall'intimina alle cellule epiteliali intestinali come conseguenza dell'infezione da EHEC e non solo. Infatti, il gene non è trasportato solo da questi batteri, ma è presente anche in altri microrganismi patogeni, gli EPEC, che provocano la stessa lesione (18). L'intimina permette l'attacco dei batteri alla mucosa intestinale provocando la distruzione dei microvilli e cambiamenti citoscheletrici della cellula, che includono l'accumulo di actina

polimerizzata sotto il sito di adesione (17, 37).

Tuttavia, tra questi microrganismi sono presenti dei ceppi STEC, definiti LEE-negativi, che sono comunque in grado di causare infezione grave. L'effetto è dovuto alla presenza sia della tossina, in particolare Stx2a, che di altri meccanismi di adesione, come fattori codificati dai geni *aggR*, *saa*, *sab*, *paa*, *efal*, *ompA*, *lpfA*, *toxB* e LAA PAI (isola di patogenicità conosciuta come *Locus of Adhesion and Autoaggregation*) (17, 18). Di questi ultimi, due risultano essere molto importanti nella patogenesi di ceppi STEC emergenti LEE-negativi: *aggR* e LAA PAI, in quanto isolati da ceppi causanti colite emorragica e sindrome emolitico-uremica (18, 38). La tossina Stx2a è stata spesso associata agli STEC LEE (*eae*)-positivi, ma anche a STEC *eae*-negativi e *aggR*-positivi, tutti in grado di causare HUS (18).

| Level | Trait (gene) | Potential for: |
|-------|---|-----------------------|
| 1 | <i>stx_{2a}</i> + <i>eae</i> or <i>aggR</i> | D/BD/HUS |
| 2 | <i>stx_{2d}</i> | D/BD/HUS ² |
| 3 | <i>stx_{2c}</i> + <i>eae</i> | D/BD ³ |
| 4 | <i>stx_{1a}</i> + <i>eae</i> | D/BD ³ |
| 5 | Other <i>stx</i> subtypes | D ⁴ |

Tabella 3 – Combinazione dei geni di virulenza e possibili malattie provocate: diarrea (D), diarrea sanguinosa (BD) e sindrome emolitico-uremica (HUS) (8)

Dalla tabella 3 si può intuire come non tutti i sottotipi di tossina possano provocare malattia grave. Inoltre, la patogenicità di un ceppo STEC può, indipendentemente dal sierotipo, dipendere dalla presenza del gene di virulenza (8).

1.7. Passaggio dei plasmidi di virulenza e della tossina

Più volte si è affermato che non tutti i ceppi STEC isolati sono ugualmente aggressivi o causano malattia (paragrafo 1.6. Tossinfezione da *E. coli* STEC/VTEC). La loro patogenicità è dovuta al numero di STEC ingeriti, alla presenza di vari sottotipi di tossina associati a diversi profili di virulenza, alla presenza di geni di virulenza in elementi genici mobili (fagi o plasmidi), che possono essere persi o trasferiti ad altri batteri, e alla suscettibilità dell'ospite colpito. Per tali ragioni ceppi STEC che presentano lo stesso sierotipo possono non portare gli stessi geni di virulenza, o essere associati allo stesso rischio (18).

Il passaggio dei fattori di adesione avviene tramite il trasferimento genico orizzontale del plasmide, mentre il gene *stx* può essere acquisito da altri batteri a causa dei batteriofagi liberi in ambiente, che vanno incontro al ciclo lisogeno all'interno di ceppi non patogeni (25). Questi eventi portano alla comparsa di nuovi ceppi STEC (LEE-negativi) che giocano un ruolo importante nella patologia umana, e costituiscono una vera e propria emergenza (18). Un esempio è il batterio EAEC O104:H4 che, nel 2011, ha causato un grosso focolaio in Germania. Questo evento sarà trattato nel paragrafo che segue.

Inoltre, il batteriofago può infettare e trasferire il gene della tossina in una vasta gamma di cellule batteriche ospiti come, *E. coli* enteropatogeni, enteroinvasivi ed enterotossigeni (29), altre specie enterobatteriche: *Shigella dysenteriae* type 1, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei*, *Citrobacter freundii*, *Escherichia albertii*, *Acinetobacter haemolyticus*, *Aeromonas caviae* e *Enterobacter cloacae* (18), batteri appartenenti al genere *Enterococcus* (39) e infine microrganismi *E. coli* commensali del tratto gastrointestinale (40), i quali contribuiscono ad aumentare la patogenicità durante l'infezione da ceppi EHEC. Gli *E. coli* commensali, infatti, possono

essere infettati da batteriofagi liberi, trasportanti la tossina Stx2, andare incontro al ciclo lisogeno, ed in seguito intraprendere il ciclo litico contribuendo alla produzione di un'elevata quantità di tossina nell'intestino, come rappresentato in figura 9.

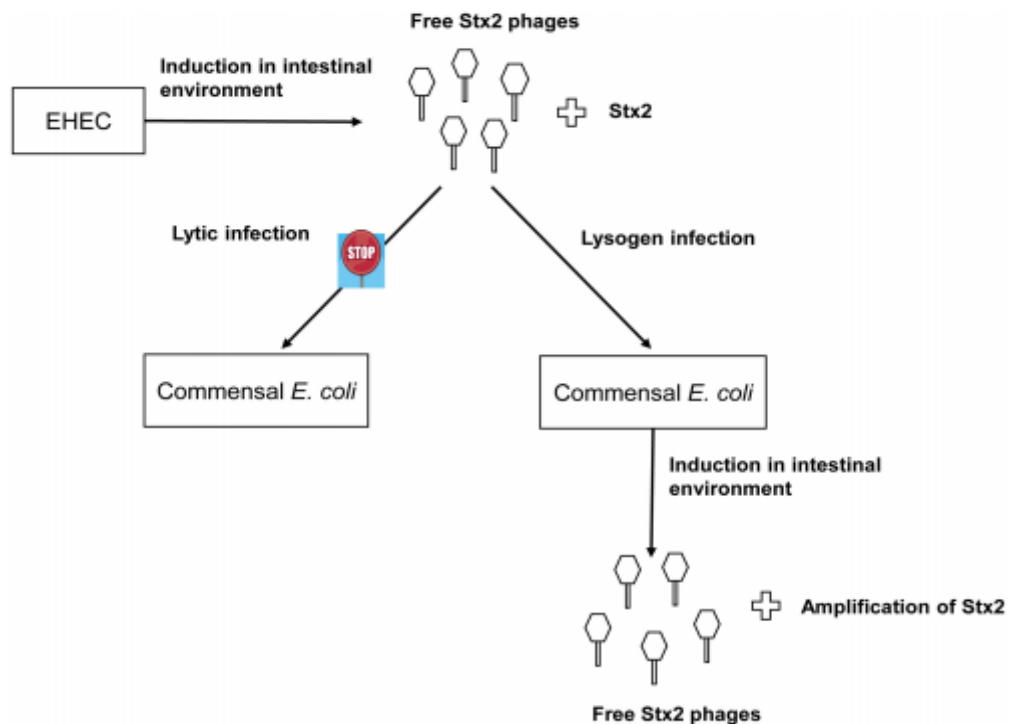


Figura 9 – Contributo degli *E. coli* commensali durante l'infezione da EHEC (40)

1.8. Focolai in Germania e Francia nel 2011

Gli *outbreaks*, associati ai semi germogliati freschi, derivanti da un unico lotto di semi di fieno greco importati dall'Egitto, e verificatisi in Germania e in Francia nel Maggio/Giugno del 2011, sono stati causati da un ceppo batterico definito emergente: *E. coli* O104:H4 appartenente al gruppo degli *E. coli* enteroaggreganti (EAEC). Fino ad allora, tale ceppo era estremamente raro ed identificato solo sporadicamente in Europa e in tutto il mondo (41). I casi di infezione riportati in Germania nel 2011 sono stati 3816, con 54 morti e 845 soggetti (circa il 22%), principalmente adulti di 42 anni, con sindrome emolitico-uremica (42, 43). *E. coli* O104:H4 è un

batterio insolito in quanto presenta un'inusuale combinazione di fattori di virulenza: trasporta il gene *stx2a* ed è privo del gene *eae*, fondamentale per permettere l'adesione degli EHEC alla mucosa intestinale. Tuttavia, presenta un altro gene di adesione, *aggR*, il quale codifica per delle fimbrie aggreganti di adesione (AAF) tipiche degli EAEC. Tale batterio quindi si è evoluto in *E. coli* STEC tramite l'acquisizione del batteriofago codificante la tossina Shiga (17, 18).

1.8.1. Emergenza in campo alimentare

Il grosso focolaio del 2011 ha portato alla consapevolezza che i nuovi ceppi STEC rappresentano una minaccia. Inoltre, i casi verificatisi in Germania hanno portato, a livello europeo, ad un'evoluzione legislativa per quanto riguarda i controlli sui germogli (44, 45), con ripercussioni in materia di Sanità Pubblica e di sicurezza alimentare (35).

Inoltre, i report epidemiologici di diversi paesi europei circa l'infezione da STEC, indicano che O157 è il sierotipo più associato a patologia umana, seguito da O26, O111, O103 e O145. Nel 2017 è stato rilevato il sierogruppo O157 in carni bovine, suine, ovine e caprine, in latte e prodotti lattiero-caseari, compreso il latte crudo. I sierogruppi non-O157 isolati sono stati O103 (principalmente in latte crudo e carne bovina), O26, O145 e O111 (46).

Nel 2009 l'EFSA ha considerato tali sierotipi tra i più importanti nella patologia umana, perciò nel tempo il monitoraggio è stato esteso anche a questi ultimi (32).

2. Scopo della tesi

Il lavoro da me svolto nel laboratorio ARPA VdA si è sviluppato su due fronti diversi, relativamente all'applicazione del metodo UNI CEN ISO/TS 13136:2013: “Metodo basato sulla reazione a catena della polimerasi (PCR) in tempo reale per la ricerca dei microrganismi patogeni degli alimenti. Metodo orizzontale per la ricerca di *Escherichia coli* produttori di Shiga-tossine (STEC), e determinazione dei sierogruppi O157, O111, O26, O103 e O145” (47).

In primo luogo, si è effettuato il monitoraggio della presenza di *E. coli* STEC sui germogli o semi germogliati pronti al consumo (prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservazione), come previsto dal Regolamento CE n. 2073/2005, modificato dal Regolamento CE n. 209/2013 (Capitolo 1: Criteri di sicurezza alimentare) (44, 45, figura 10), in quanto il laboratorio è deputato al controllo ufficiale di questi alimenti, secondo le normative vigenti.

L'allegato I del regolamento (CE) n. 2073/2005 è così modificato:

1) il capitolo 1 è modificato come segue:

- a) la nota 12 è cancellata;
- b) nella riga 1.18 il riferimento alla nota 12 è sostituito dal riferimento alla nota 23;
- c) vengono aggiunte la seguente riga 1.29 e le corrispondenti note 22 e 23:

| | | | | | | |
|--------------------------------|---|---|---|----------------------|----------------------------------|--|
| «1.29 Germogli ⁽²³⁾ | <i>E. coli</i> produttori di tossina Shiga (STEC) O157, O26, O111, O103, O145 e O104:H4 | 5 | 0 | Assente in 25 grammi | CEN/ISO TS 13136 ⁽²²⁾ | Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità |
|--------------------------------|---|---|---|----------------------|----------------------------------|--|

⁽²²⁾ Tenuto conto dell'aggiornamento più recente del laboratorio comunitario di riferimento per l'*Escherichia coli*, nonché per gli *E. coli* produttori di verocitotossine (VTEC), ai fini del rilevamento dello STEC O104:H4;

⁽²³⁾ Esclusi i germogli che hanno ricevuto un trattamento efficace teso a eliminare *Salmonella* spp e STEC.»

Figura 10 – Regolamento CE n. 209/2013 (45)

In secondo luogo, ci si è concentrati su una matrice non prevista dal regolamento, un formaggio a pasta semi dura e a media stagionatura,

nell'ambito di un programma di autocontrollo dell'azienda produttrice.

Diversi studi, nei quali si inocula il latte crudo, utilizzato per la produzione del formaggio, con *E. coli* O157:H7, dimostrano che il processo di maturazione inibisce la sopravvivenza degli STEC ma non è sufficiente ad abatterli completamente. Nel caso di Bellio A. *et al.* (48), la maturazione dei formaggi inibisce la crescita dei batteri di 3 logaritmi rispetto alla contaminazione iniziale ($5 \log_{10} = 100.000$). Anche in altri studi (49, 50, 51) si osserva che tempi di maturazione lunghi sono insufficienti per eliminare completamente le cellule di *E. coli* O157:H7, e quindi il basso numero di STEC nel latte, destinato alla produzione di formaggi a latte crudo, potrebbe costituire comunque un pericolo per il consumatore.

Lo scopo è stato quello di evidenziare la presenza di *E. coli* STEC, valutare il tipo di ceppi eventualmente presenti e il grado di contaminazione da *Escherichia coli* STEC, rispetto a quello iniziale da *E. coli* totali β -glucuronidasi positivi. In tal modo si potrà capire quanti degli *E. coli* presenti nel campione possano effettivamente causare un'infezione.

Inoltre, si è effettuata un'approfondita ricerca bibliografica per cercare di comprendere quale potrebbe essere il rischio effettivo per la salute umana dovuto alla presenza di *E. coli* STEC in tale matrice.

3. Materiali e metodi

3.1. Scelta delle matrici

Il metodo descritto in seguito può essere applicato a:

1. prodotti destinati al consumo umano e il mangime degli animali;
2. campioni ambientali prelevati da aree di produzione e manipolazione degli alimenti;
3. campioni ambientali prelevati nell'area di prima produzione.

La scelta delle matrici analizzate nel laboratorio di microbiologia dell'Arpa ricade su:

- i germogli, in quanto previsto dal Regolamento CE n. 2073/2005, modificato dal Regolamento CE n. 209/2013 (44, 45). In data 20 ottobre 2011, in seguito al focolaio avvenuto in Germania, l'EFSA (*European Food Safety Authority*) ha espresso un parere scientifico sui rischi associati agli *Escherichia coli* produttori di Shiga-tossina e ad altri patogeni presenti nei semi e nei semi germogliati: “[...] *Nel suddetto parere l'EFSA conclude che la contaminazione di semi essiccati con batteri patogeni sia la più probabile origine dei focolai associati ai germogli. Il parere afferma inoltre che, visto il tasso di umidità e la temperatura favorevole durante il processo di germinazione, i batteri patogeni presenti nei semi essiccati si possono moltiplicare e costituire un rischio per la salute pubblica. [...]*” (45);
- un formaggio a pasta semi dura e a media stagionatura di produzione locale, analizzato nell'ambito di un programma di autocontrollo dell'azienda produttrice.

Due metodi sono stati utilizzati per l'analisi dei campioni: il metodo in PCR real time, per la ricerca dei geni di virulenza e di sierogruppo associati agli STEC e il metodo colturale, per il conteggio degli *E. coli* presenti nel

campione prima e dopo la fase di arricchimento.

3.2. Materiali

3.2.1. Attrezzature ed apparecchiature

Utilizzo della normale apparecchiatura da laboratorio (52) ed in particolare:

- miscelatore peristaltico: Stomacher con sacchetti, dotati di filtro, sterili;
- incubatore, termostaticamente controllato a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$;
- incubatore, termostaticamente controllato a $44^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$;
- blocco riscaldante (temperatura $100^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$);
- micro-centrifuga (10.000-12.000 g);
- vortex;
- micro-pipette a volume variabile, da utilizzare in un range da 1 μl a 1000 μl ;
- microtubi da 1,5 ml e da 200 μl o micro-piastre *multi-well* in plastica idonei per la PCR real time (trasparenti alla luce);
- termociclatore: iCycler Thermal Cycler BIO-RAD;
- rilevatore dei prodotti di PCR: iQ5 Optical Module Multicolor Real-Time PCR Detection System BIO-RAD.

3.2.2. Reagenti, reattivi e materiali di riferimento

- piastre Petri da 90mm;
- piastre 3M Petrifilm (AOAC® Official Methods of Analysis SM): per il conteggio degli *E. coli*/coliformi;
- terreno di coltura liquido per l'arricchimento:
 - BPW (*Buffered Peptone Water*), utilizzato anche come diluente;
- terreni di coltura solidi:
 - T.B.X. Agar (*Tryptone Bile X-GLUC Agar*): terreno selettivo e

cromogenico per l'isolamento di *Escherichia coli*;

- NA (*Nutrient Agar*): terreno non selettivo per la crescita di microrganismi non esigenti. Necessario per il reisolamento e il mantenimento delle colonie in attesa della caratterizzazione;
- CT-SMAC (*Cefixime Tellurite Sorbitol MacConkey Agar*): terreno di isolamento per *E. coli* O157.

I terreni di coltura, i supplementi e i reattivi sono acquistati come formulazioni commerciali disidratate, preparati, conservati ed utilizzati secondo le indicazioni della ditta produttrice.

- Reattivi per l'estrazione:
 - Kit iQ-Check STEC VirX contenente il reattivo di lisi.
- Reattivi per la PCR
 - Kit iQ-Check STEC VirX Bio-Rad contenente il reagente con le sonde a doppia elica fluorescenti, la mix di amplificazione già preparata (controllo interno di inibizione della PCR, *primers* e *probes* specifici per il controllo interno ed i geni di virulenza *stx 1/2*, *eae*, DNA polimerasi ed oligonucleotidi), controllo negativo di PCR e controllo positivo di PCR.
 - Kit iQ-Check STEC Ser O Bio-Rad contenente il reagente con le sonde a doppia elica fluorescenti specifiche per i diversi sierogruppi (O157:H7, O111, O26, O103, O145, O45, O121), la mix di amplificazione già preparata, controllo negativo di PCR, controllo positivo di PCR e controllo interno di inibizione della PCR.
- Reattivi per le prove di conferma biochimica:
 - API 20E Biomérieux: galleria di identificazione biochimica miniaturizzata.
- Sistema Dynabeads anti-*E. coli* O157.
- *Washing buffer-PBS Tween* per il lavaggio delle biglie magnetiche.

3.3. Metodi

3.3.1. Metodo A: PCR real time (UNI CEN ISO/TS 13136:2013)

Il Metodo UNI CEN ISO/TS 13136:2013 (47) descrive la rilevazione degli *Escherichia coli* produttori della tossina Shiga (STEC) attraverso la rilevazione dei seguenti geni:

- geni di maggiore virulenza: gene *stx1/stx2* e gene *eae*;
- geni associati ai sierogruppi O157, O111, O26, O103 e O145.

3.3.1.1. Principio

Tale metodo prevede l'utilizzo della PCR real time come tecnologia di riferimento per l'identificazione dei geni precedentemente citati. Alla fine dell'intero processo, le colonie positive vengono sottoposte ad identificazione mediante l'utilizzo di test biochimici.

Il metodo comprende i seguenti passaggi:

- pre-arricchimento microbico;
- estrazione degli acidi nucleici (da brodo di arricchimento, dal *pool* di colonie e da colonie isolate);
- amplificazione e rilevazione del DNA tramite PCR real time per:
 - geni di virulenza (*stx* e *eae*);
 - geni associati al sierogruppo;
- interpretazione dei risultati di PCR;
- isolamento, dai campioni positivi, delle colonie per la loro successiva conferma (presenza dei geni di virulenza, identificazione biochimica e sierologica);
- espressione dei risultati di analisi.

Di seguito è riportato il diagramma di flusso della procedura di screening (47):

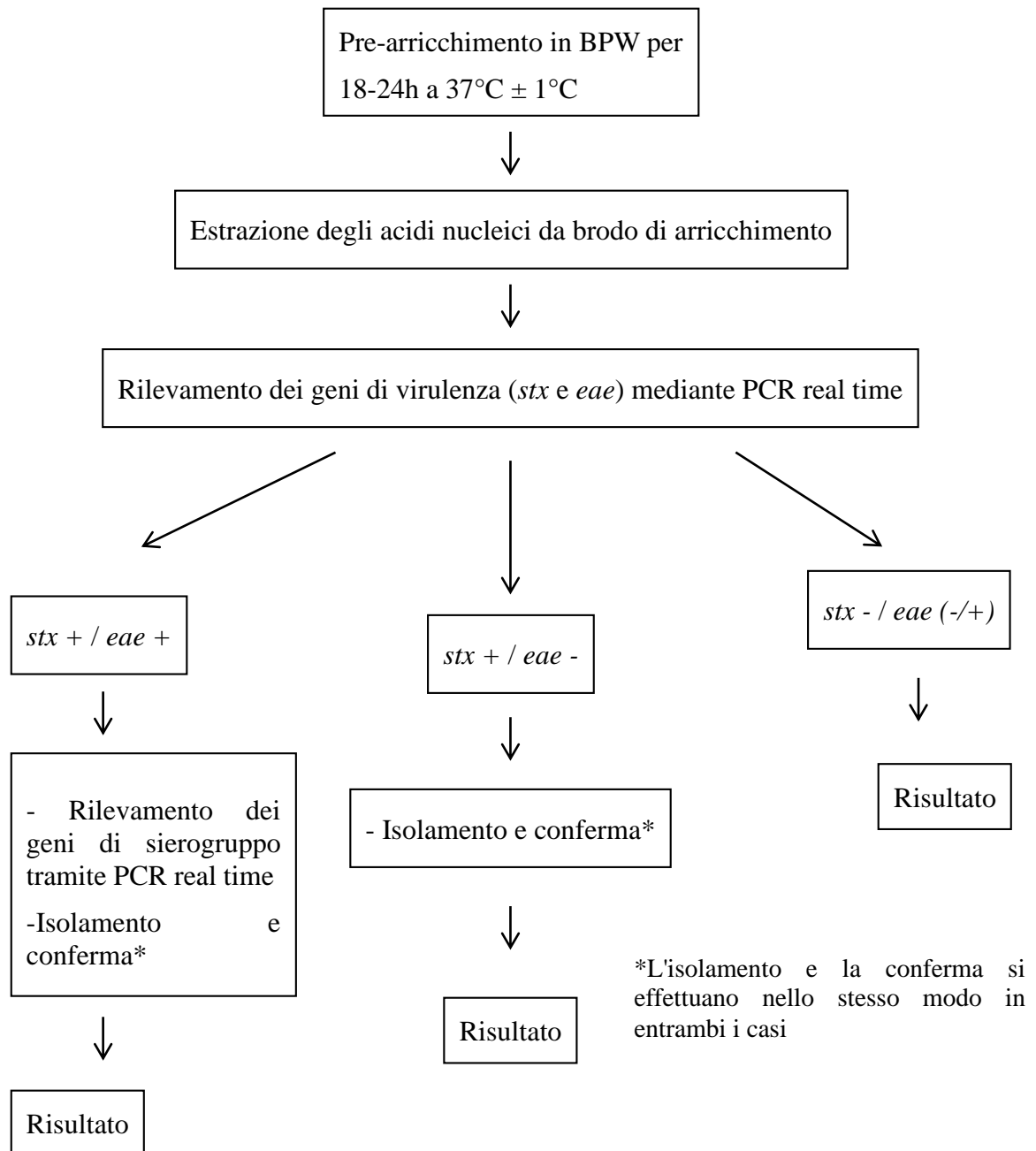


Diagramma di flusso 2 – Schema della ricerca degli *E. coli* STEC

Per poter procedere con la metodica è necessario preparare dei controlli di processo per ogni set di campioni:

- controllo positivo di processo, costituito da una porzione di campione addizionata di una coltura *overnight* di un ceppo *E. coli* STEC, ad un livello di sospensione compreso tra 10 e 100 u.f.c, da

aggiungere alla busta contenente il campione pesato (25 g) addizionato di 225 ml di BPW, prima del passaggio in Stomacher. Tale campione deve seguire l'intero processo analitico;

- controllo negativo di processo, costituito da una porzione di BPW, privo del microrganismo target. Tale campione deve seguire l'intero processo analitico.

3.3.1.2. Procedimento

Due accorgimenti sono necessari prima di procedere con l'analisi:

- 1- in seguito al campionamento, il campione di prodotti freschi deve essere analizzato entro 24 ore dal prelievo, mentre per i prodotti confezionati, quando non sia possibile procedere immediatamente con l'analisi, è possibile ritardare l'inizio di quest'ultima di qualche giorno;
- 2- i campioni in attesa di analisi vengono conservati a 2-3°C.

Di seguito è riportata la descrizione di ciascun passaggio della metodica.

- Pre-arricchimento microbico

L'obiettivo di questa fase è quello di far entrare gli *E. coli* STEC nella fase di crescita esponenziale, in modo tale da aumentare la probabilità di rilevazione del batterio. Di conseguenza viene inoculata una porzione di campione all'interno di un terreno nutritivo liquido non selettivo. La scelta del terreno ricade sul brodo di arricchimento chiamato BPW, in quanto si assume che le matrici analizzate (ad esempio prodotti refrigerati) contengano batteri target stressati dalla presenza di sostanze conservanti (53). Il BPW permette di rivitalizzare tali microrganismi ed inibire la crescita di microrganismi della microflora. Inoltre, si è osservato che la presenza dell'antibiotico novobiocina nel brodo di arricchimento può causare la comparsa di falsi negativi durante la rilevazione dei batteri

STEC negli alimenti (54). Per tale ragione l'antibiotico non viene aggiunto al brodo di arricchimento.

Questo passaggio prevede la diluizione di una porzione di campione nella quantità di BPW necessaria ad ottenere una diluizione 1:10 del campione iniziale con i seguenti passaggi:

- pesare 25 g di campione e trasferirlo all'interno di sacchetti sterili;
 - aggiungere 225 mL di BPW;
 - omogeneizzare il tutto con Stomacher per 1 minuto e 30 secondi a 230 RPM;
 - incubare il campione a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ per 18/24 h.
- Estrazione degli acidi nucleici (da brodo di arricchimento o da *pool* di colonie prelevate da T.B.X.)

L'estrazione si effettua nel seguente modo:

- aliquotare 100 μl del tampone di lisi (ben omogenato) nei test tube;
- aggiungere 100 μl del brodo di arricchimento contenente il campione o del *pool* di colonie;
- mescolare delicatamente per pipettamento;
- incubare nel blocco riscaldante a 95°C - 100°C per 15 minuti (figura 11);



Figura 11 – Blocco riscaldante

- vortexare i tubi di estrazione ad alta velocità per qualche secondo;
- centrifugare a 12.000 g per 5 minuti. Il DNA si trova nel surnatante che verrà utilizzato per effettuare la PCR.

- Amplificazione e rilevazione del DNA tramite PCR real time

Dopo l'estrazione dell'acido nucleico si prosegue effettuando una PCR real time, la quale permette l'amplificazione e la rilevazione del gene target nello stesso momento grazie alla presenza, all'interno della stessa mix di reazione, sia dei primers che delle sonde fluorescenti (*double strand probes*).

Per poter procedere con la reazione di PCR è necessario preparare la mix di reazione, addizionando opportuni volumi dei reattivi del kit, a seconda del numero di campioni da analizzare. In seguito, si allestisce la piastra di reazione (figura 12) nel seguente modo:

- pipettare 20 μ l della mix di reazione in ciascun pozzetto;
- aggiungere, in ciascun pozzetto, 5 μ l di campione (il DNA si trova nel surnatante del tubo di estrazione) o di controllo (positivo o negativo).

In ciascun pozzetto sarà presente un volume di 25 μ l.

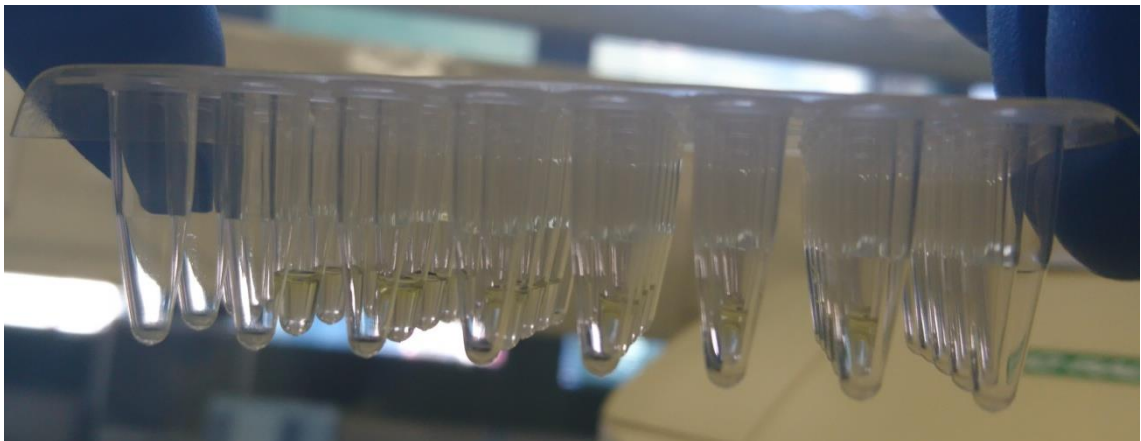


Figura 12 – Piastra di PCR

Il protocollo termico utilizzato è il seguente (47):

| N° cicli | Temperatura e tempo | Azione |
|----------|---------------------|--|
| 1 | 95°C per 10 minuti | Attivazione Taq |
| 50 | 95°C per 15 secondi | Denaturazione |
| | 58°C per 30 secondi | <i>Annealing</i> (cattura del segnale) |
| | 72°C per 30 secondi | Estensione |

Le reazioni di PCR effettuate sono due, la prima per la rilevazione dei geni di virulenza *stx*, senza la discriminazione tra le due varianti (1 e 2), e *eae*, e la seconda per la rilevazione dei geni di sierogruppo. Entrambe si effettuano nello stesso modo, con lo stesso protocollo termico, ma ci sono delle differenze per quanto riguarda le mix. Nella prima, si utilizza un'unica mix di reazione contenente 3 fluorofori diversi, che emettono fluorescenza a lunghezza d'onda diversa, ciascuno dei quali rileva un target specifico (FAM per il gene *stx*, HEX per il controllo interno e Cy5 per il gene *eae*). Questo permette di rilevare tutti e due i geni di virulenza all'interno dello stesso pozzetto di reazione. Per quanto riguarda la seconda PCR, si utilizzano 3 mix di reazione diverse (SerO1, SerO2 e SerO3), ciascuna delle quali contiene 3 fluorofori diversi, analogamente a quanto detto sopra (FAM, HEX per il controllo interno e Cy5). Questo permette di discriminare 6 sierogruppi di *E. coli* STEC in 3 pozzetti diversi, per ciascun campione secondo la tabella 4:

| | FAM | Cy5 | HEX |
|-------|-------------|---------|-------------------|
| SerO1 | O111 | O157:H7 | Controllo interno |
| SerO2 | O103 e O145 | O26 | Controllo interno |
| SerO3 | O45 | O121 | Controllo interno |

Tabella 4 – Interpretazione del segnale di PCR per la rilevazione dei geni di sierogruppo

La PCR per identificare il sierogruppo di appartenenza si effettua in seguito alla PCR di screening dei geni di virulenza, solo nel caso in cui entrambi i geni, *stx* e *eae*, risultino positivi.

- Interpretazione dei risultati di PCR

I risultati della reazione di amplificazione sono interpretati analizzando i valori di Cq (o Ct – *Cycle Threshold*) per ciascun campione e controllo (ciclo al quale la curva di amplificazione incrocia la *threshold*). Per la lettura dei risultati è fondamentale valutare per primi i risultati del controllo positivo e negativo di PCR, in modo tale da capire se l'intero processo analitico, a partire dalla fase di arricchimento, a seguire quelle di estrazione, amplificazione e rilevazione dell'acido nucleico, è avvenuto correttamente. Successivamente si valutano i risultati dei campioni. Per i campioni negativi è fondamentale considerare il controllo interno di PCR. Questo permette di identificare l'eventuale presenza di PCR inibite nei campioni nei quali anche il controllo interno non sia amplificato. In tal caso, il risultato dell'analisi è da scartare.

Affinché un campione sia considerato positivo è necessario verificare che la curva di amplificazione sia tipica (55, figura 13 e 14) e abbia un valore di $Ct \geq 10$, sia per quanto riguarda il segnale emesso dal fluoroforo FAM, che dal fluoroforo Cy5.

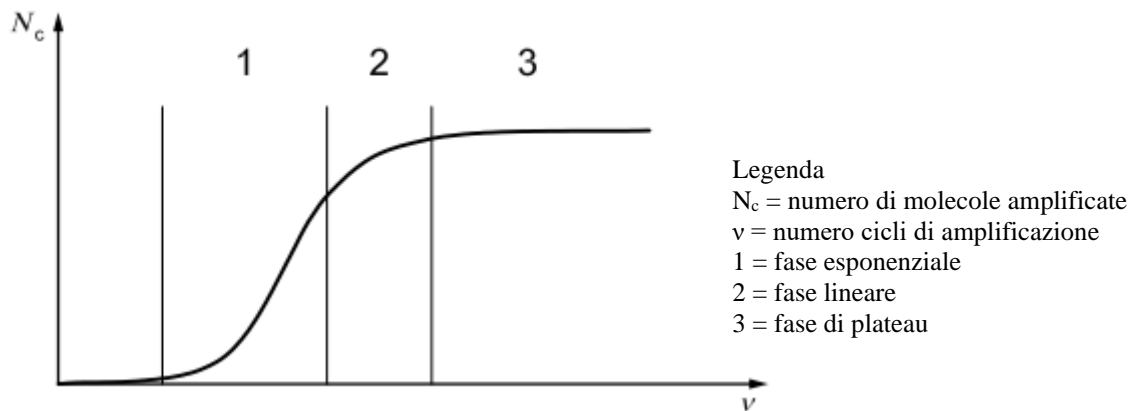


Figura 13 – Curva di amplificazione tipica (55)

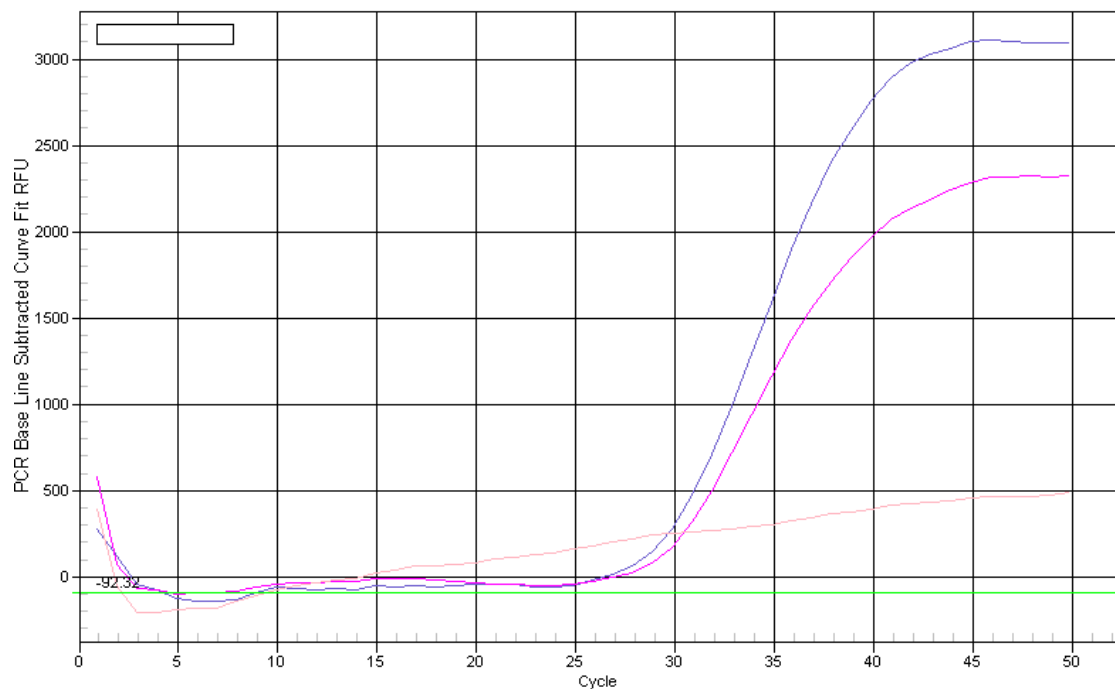


Figura 14 – Esempio delle curve di amplificazione tipiche rilevate durante le analisi in PCR real time

- Isolamento e conferma delle colonie

L'isolamento dei ceppi batterici è richiesto per la conferma che il segnale positivo alla PCR è stato generato da ceppi batterici vitali. I ceppi si isolano in due modi:

- a partire dal brodo di arricchimento strisciando due o più piastre in

successione con la stessa ansa da 10 μ l sul terreno T.B.X.;

- tramite semina superficiale, su terreno T.B.X., di 100 μ l della diluizione 10^{-5} e 100 μ l della diluizione 10^{-6} della sospensione di arricchimento (figura 15).

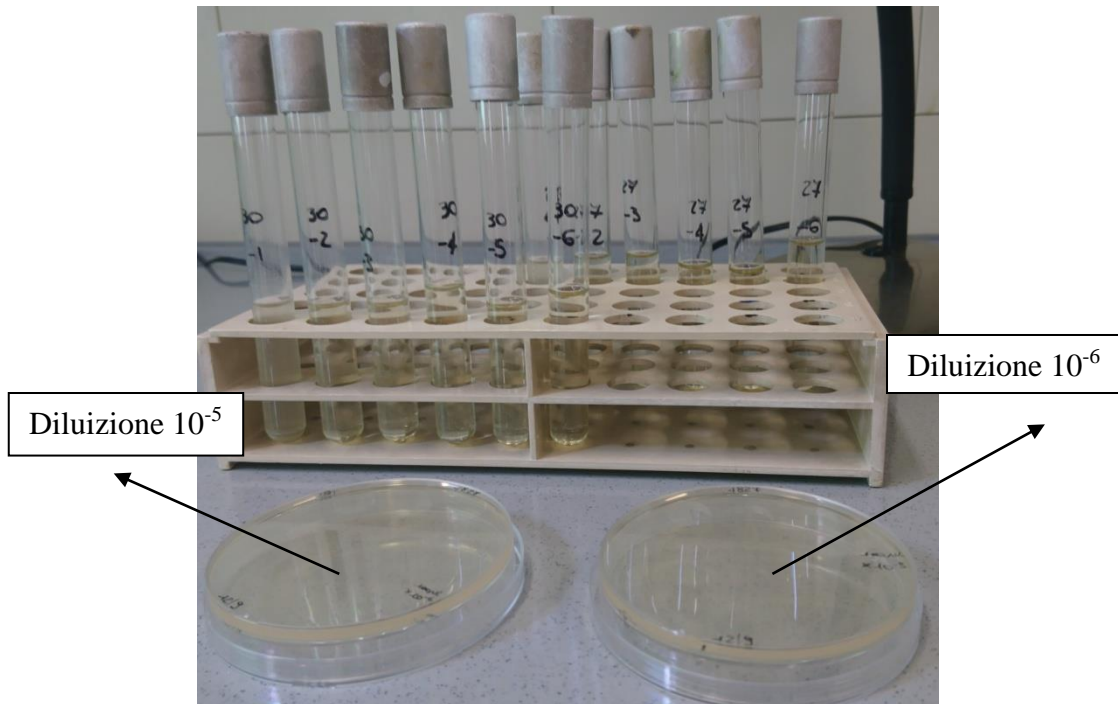


Figura 15 – Semina superficiale di 100 μ l delle diluizioni 10^{-5} e 10^{-6} sul terreno T.B.X.

Dopodiché si incuba a $44^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ per 18-24h. Il giorno seguente si toccano 50 colonie caratteristiche di *E. coli*, le quali risultano di colore blu in quanto β -glucuronidasi positivi (ad eccezione di *E. coli* O157), con anse sterili e si effettuano due passaggi:

- ciascuna colonia toccata si inocula, in maniera puntiforme, su una piastra di terreno chiamato Nutrient Agar (NA), identificandola correttamente con il codice del campione di appartenenza e un numero progressivo, che si riferisce alla singola colonia (figura 16-a). In totale si ottengono 5 piastre per campione, contenenti ciascuna 10 colonie prelevate da T.B.X., che vengono incubate per 18-24 h a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Ogni piastra corrisponde ad un *pool* di 10 colonie (figura 16-b).

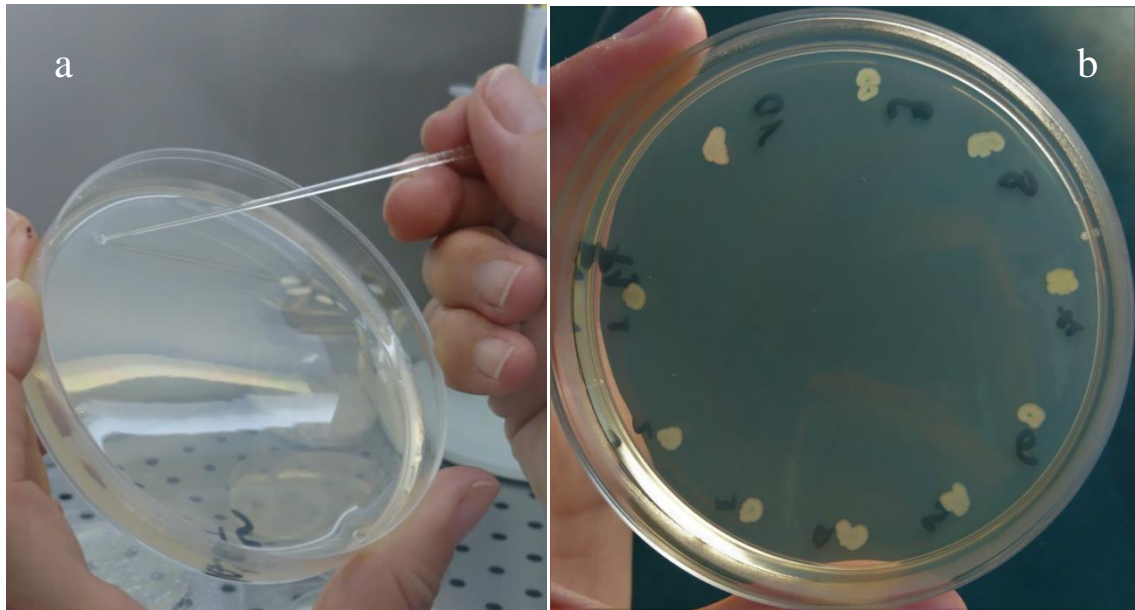


Figura 16 – a-Inoculo delle colonie caratteristiche di *E. coli* sul terreno NA; b-10 singole colonie di *E. coli* dopo incubazione

- Il restante della colonia si stempera all'interno di una provetta, tipo Eppendorf, contenente H₂O DNA free sterile, per un massimo di 10 colonie per provetta (figura 17 a). In questo modo, per ciascun campione si ottengono 5 *pool* di 10 colonie (figura 17 b). A partire da 100 μ l, di ciascun *pool* di colonie, viene estratto il DNA ed effettuata una PCR real time di conferma, per la rilevazione dei geni *stx-eae* all'interno delle cellule.

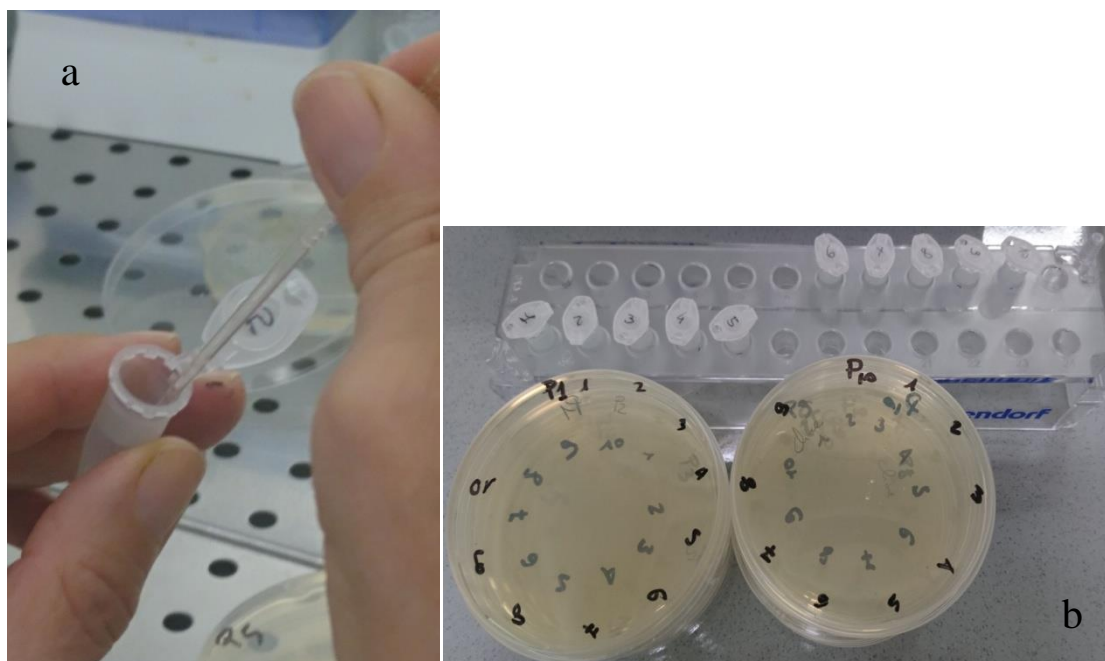


Figura 17 – a-Stemperamento della colonia di *E. coli* in provetta tipo Eppendorf contenente H₂O DNA free sterile; b-5 *pool* di 10 colonie, per ciascun campione, con rispettive piastre di NA

Dal diagramma di flusso, riportato nel metodo UNI CEN ISO/TS 13136:2013, si evince che la caratterizzazione dei geni di sierogruppo viene effettuata solo nel caso sia stato rilevato anche il gene *eae*. In quel caso, una volta che si conosce il sierogruppo di appartenenza, viene effettuato un isolamento idoneo: nel caso sia rilevato il sierogruppo O157 viene eseguito l'isolamento anche su terreno CT-SMAC, che evidenzia gli *E. coli* O157. Se il *pool* risulta positivo alla PCR real time, il giorno seguente si ricerca quale delle singole colonie presenti all'interno del *pool* contiene i geni di virulenza. Per far ciò si esegue l'estrazione degli acidi nucleici direttamente dalla colonia, svolta nello stesso modo descritto sopra, ma stemperando una colonia ben isolata su NA in 200 µl di tampone di lisi, e si effettua un'altra PCR real time.

A questo punto si possono intraprendere due vie:

- se i geni sono rilevati nelle singole colonie, si procede con la conferma tramite l'utilizzo di gallerie API per l'identificazione biochimica;

- se i geni non sono rilevati all'interno delle colonie, si interrompe l'analisi e si esprime il risultato.

Per la conferma degli *E. coli* O157:H7 si utilizza l'arricchimento specifico del sierogruppo tramite immuno-magneto cattura del ceppo (sistema Dynabeads).

Il sistema consiste in una sospensione di microsfere metalliche rivestite di anticorpi specifici per il batterio target. In presenza del target si forma un complesso microsfera-batterio che viene separato tramite l'applicazione di un campo magnetico (figura 18).

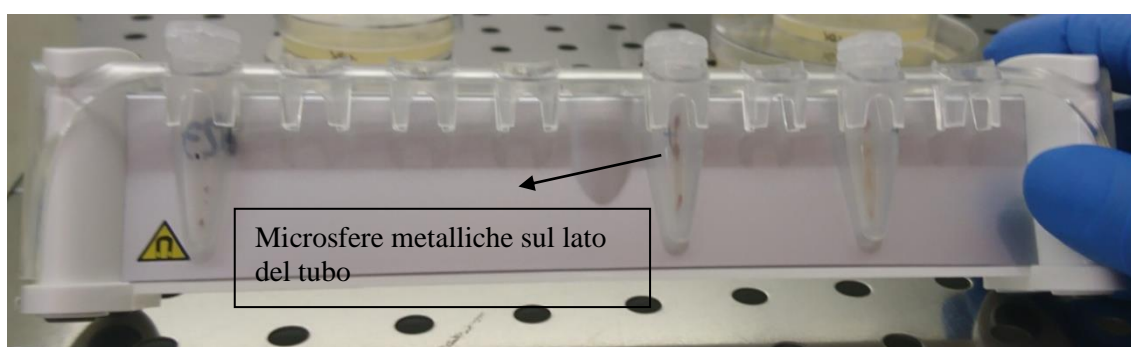


Figura 18 – Separazione immunomagnetica tramite il Sistema Dynabeads

Dopo il periodo di incubazione del brodo di arricchimento, in caso di positività allo screening dei geni di sierogruppo, un'aliquota del brodo stesso viene messa in contatto con la sospensione di microsfere metalliche, in modo da favorire la formazione del complesso e la separazione immunomagnetica del complesso dal resto della matrice.

I passaggi da eseguire sono i seguenti:

- aggiungere 1 ml del brodo di arricchimento a 20 μ l di Dynabeads, in una provetta da microcentrifuga da 1,5 ml;
- invertire 20 volte la sospensione per favorire la formazione del complesso anticorpi-batteri target;
- incubare 10 minuti a temperatura ambiente;
- inserire il rack, contenente le provette con la sospensione, sul

supporto magnetico ed invertire 20 volte per favorire la concentrazione delle microsferette sul lato del tubo;

- lasciare fermo per tre minuti per permettere la massima ricattura delle microsferette;
- aprire i tubi ed asportare il surnatante, avendo cura di non toccare le microsferette concentrate sul lato del tubo attaccato al supporto magnetico;
- togliere il rack dal supporto magnetico ed aggiungere 1 ml di tampone fosfato sterile, per il lavaggio delle microsferette e l'asportazione di eventuali complessi non specifici;
- ripetere altre due volte i passaggi sopraindicati;
- la terza volta le microsferette vengono risospese in 100 μ l di tampone;
- strisciare la sospensione così ottenuta su terreno selettivo (CT-SMAC) tramite un'ansa da 1 μ l (figura 19).



Figura 19 – Piastre di CT-SMAC per l'isolamento degli *E. coli* O157

- incubare per 24 ore a 37°C (le colonie target presenti appaiono di colorazione chiara sul terreno sopracitato);
- procedere ai successivi passaggi di ricerca dei geni di virulenza ed identificazione di *E. coli*.

- Espressione dei risultati di analisi (47, paragrafo 10).

| GENI DI VIRULENZA | RISULTATO |
|--|--|
| 1) SCREENING NEGATIVO | |
| <i>stx-</i> / <i>eae</i> (-/+) | Assenza di STEC in 25 g di campione |
| 2) SCREENING POSITIVO ED ISOLAMENTO DEI CEPPI NON ESEGUITO CON SUCCESSO | |
| <i>stx</i> + / <i>eae</i> – | Presenza presuntiva di STEC in 25 g di campione |
| <i>stx</i> + / <i>eae</i> + | Presenza presuntiva di STEC in grado di causare la lesione A/E in 25 g di campione |
| <i>stx</i> + / <i>eae</i> + / uno o più geni di sierogruppo | Presenza presuntiva di STEC di sierogruppo OXX* in 25 g di campione |
| 3) SCREENING POSITIVO ED ISOLAMENTO DEI CEPPI ESEGUITO CON SUCCESSO | |
| <i>stx</i> + / <i>eae</i> – | Presenza di STEC in 25 g di campione |
| <i>stx</i> + / <i>eae</i> + | Presenza di STEC in grado di causare la lesione A/E in 25 g di campione |
| <i>stx</i> + / <i>eae</i> + / uno o più geni di sierogruppo | Presenza di STEC di sierogruppo OXX* in 25 g di campione |

Tabella 5 – Risultati delle analisi

*OXX rappresenta il sierogruppo che ha dato positività alla PCR

3.3.2. Metodo B: colturale

Per il conteggio degli *E. coli* prima e dopo arricchimento sono stati utilizzati due metodi colturali diversi. Il primo conteggio, prima dell'arricchimento, è stato eseguito dall'Institut Agricole Régional su piastre Petrifilm incubate a 37°C per 24-28 h. Il secondo, dopo arricchimento, invece, è stato eseguito nel laboratorio Arpa per semina superficiale sul terreno T.B.X., in seguito a delle diluizioni seriali (vedi paragrafo 3.3.1.2. Procedimento – “Isolamento e conferma delle colonie”).

4. Risultati

I campioni analizzati e considerati nella tesi, come già anticipato, originano da due matrici diverse ed in particolare:

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

Su entrambe le matrici si è ricercata la presenza di *E. coli* STEC.

I risultati dell'analisi sono espressi come indicato nella UNI CEN ISO/TS 13136:2013, paragrafo 10 (47).

4.1. Germogli

Per quanto riguarda la prima matrice non si è riscontrata nessuna positività come indicato in tabella 6.

| Germogli | <i>stx</i> | <i>eae</i> |
|----------|------------|------------|
| 1 | - | - |
| 2 | - | - |
| 3 | - | - |
| 4 | - | - |
| 5 | - | - |
| 6 | - | - |
| 7 | - | - |
| 8 | - | - |
| 9 | - | - |
| 10 | - | - |
| 11 | - | - |
| 12 | - | - |
| 13 | - | - |
| 14 | - | - |
| 15 | - | - |

Tabella 6 – Risultati dei germogli di soia allo screening dei geni di virulenza tramite PCR real time

Secondo il diagramma di flusso 2 presente nel capitolo 3. Materiali e metodi, l'analisi si conclude qua e si esprime il risultato come “Assenza di STEC in 25 g di campione”.

4.2. Formaggi

4.2.1. Risultati del metodo A

Per quanto riguarda la seconda matrice, invece, la situazione è più complessa.

Come si osserva dalla tabella 7, su 41 campioni sottoposti a PCR, effettuata per il primo screening dei geni di virulenza a partire dal brodo di arricchimento:

- 12 risultano positivi per il gene *stx*;
- 3 risultano positivi per il gene *eae* (uno dei tre è *stx* negativo).

| Campione formaggi | <i>stx</i> | <i>eae</i> | Campione formaggi | <i>stx</i> | <i>eae</i> |
|-------------------|------------|------------|-------------------|------------|------------|
| | | | 21 | - | - |
| 1 | - | - | 22 | + | - |
| 2 | - | + | 23 | + | - |
| 3 | - | - | 24 | + | - |
| 4 | - | - | 25 | + | - |
| 5 | + | - | 26 | - | - |
| 6 | - | - | 27 | + | - |
| 7 | - | - | 28 | - | - |
| 8 | + | - | 29 | - | - |
| 9 | - | - | 30 | - | - |
| 10 | + | - | 31 | - | - |
| 11 | - | - | 32 | + | + |
| 12 | - | - | 33 | - | - |
| 13 | - | - | 34 | - | - |
| 14 | - | - | 35 | - | - |
| 15 | - | - | 36 | - | - |
| 16 | + | - | 37 | - | - |
| 17 | - | - | 38 | + | + |
| 18 | - | - | 39 | - | - |
| 19 | - | - | 40 | - | - |
| 20 | - | - | 41 | + | - |

Tabella 7 - Risultati PCR real time dei formaggi al primo screening dei geni di virulenza, a partire dal brodo di arricchimento

Il campione 2, risultando negativo per il gene della tossina, non è da considerarsi positivo per la ricerca di *E. coli* STEC, l'analisi è perciò conclusa e si esprime il risultato come “Assenza di STEC in 25 g di campione”.

I campioni 32 e 38 (*stx* +/*eae* +) devono invece essere sottoposti ad una seconda PCR per lo screening dei geni di sierogruppo, a partire dal brodo di arricchimento. Inoltre, per questi campioni e per tutti gli altri campioni positivi per il gene *stx*, si effettua l'isolamento delle colonie di *E. coli* e la conferma della presenza del gene *stx* sulle colonie isolate (*E. coli* STEC, vedi nel capitolo 3. Materiali e metodi, paragrafo 3.3.1.2. Procedimento).

Di seguito sono illustrati gli esiti ottenuti dai passaggi successivi.

Nel corso delle analisi si sono rilevati due casi che presentano sia il gene *eae* che il gene *stx*. Tali geni, però, sono stati trovati solo all'interno della matrice (primo screening dei geni di virulenza a partire dal brodo di arricchimento) e non dopo l'isolamento delle colonie (*pool* negativi, tabella 9).

Dallo screening dei geni di sierogruppo, effettuato sui campioni 32 e 38, si è rilevata la presenza di 3 diversi sierogruppi nel campione 32, mentre sul campione 38 non è stato identificato nessun sierogruppo (tabella 8).

| Campione | SerO1 | | SerO2 | | SerO3 | |
|----------|--------|-----------|-------|-----|-------|--------|
| | FAM | Cy5 | FAM | Cy5 | FAM | Cy5 |
| 32 | + | + | - | - | - | + |
| | (O111) | (O157:H7) | | | | (O121) |
| 38 | - | - | - | - | - | - |

Tabella 8 – Risultati PCR real time per i geni di sierogruppo dei campioni 32 e 38

Secondo la tabella 4 riportata nel capitolo 3. Materiali e metodi, la rilevazione del segnale emesso dai fluorofori FAM e Cy5, con la mix SerO1, indica la presenza dei sierogruppi O111 e O157:H7, mentre il segnale emesso dal fluoroforo Cy5, con la mix SerO3, indica la presenza

del sierogruppo O121, che non viene preso in considerazione in quanto non fa parte del campo di applicazione del metodo UNI CEN ISO/TS 13136:2013.

Dal momento che la presenza dei geni di virulenza è stata rilevata solo all'interno della matrice e non dopo l'isolamento delle colonie (*pool* negativi tabella 9), la sua presenza appare presuntiva e viene espressa come:

- “*Presenza presuntiva di STEC di sierogruppo O111 e O157:H7 in 25 g di campione*”, tralasciando il sierogruppo O121 per quanto detto sopra, per quanto riguarda il campione 32;
- “*Presenza presuntiva di STEC in grado di causare la lesione A/E in 25 g di campione*” per il campione 38.

Inoltre, molte delle analisi di PCR real time per la ricerca dei geni di virulenza sui *pool* di colonie, prelevate dal terreno T.B.X. dopo isolamento a partire dal brodo di arricchimento, sono risultate negative, perciò si conclude l'analisi di questi campioni e si esprime il risultato come “*Presenza presuntiva di STEC in 25 g di campione*” (tabella 9).

Il rilevamento dei geni di virulenza nella matrice (primo screening), e non nelle colonie isolate (*pool*), è imputabile a diverse cause come la presenza di cellule batteriche morte, vitali ma non coltivabili, presenti in numero inferiore al limite di rilevabilità del metodo (56), oppure di batteriofagi liberi nella matrice, o infine alla perdita dei geni durante i diversi passaggi analitici. Tale questione verrà analizzata nel capitolo 5. Discussione e conclusioni.

| Campione positivo al I° screening | Pool 1 | | Pool 2 | | Pool 3 | | Pool 4 | | Pool 5 | |
|-----------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | <i>stx</i> | <i>eae</i> | <i>stx</i> | <i>eae</i> | <i>stx</i> | <i>eae</i> | <i>stx</i> | <i>eae</i> | <i>stx</i> | <i>eae</i> |
| 5 | + | - | + | - | + | - | + | - | + | - |
| 8 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 10 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 16 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 22 | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - |
| 23 | - | - | - | - | + | - | - | - | + | - |
| 24 | - | - | - | - | - | - | + | - | + | - |
| 25 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 27 | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - |
| 32 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 38 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 41 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

Tabella 9 - Risultati PCR real time dei *pool* di colonie (dopo isolamento) dei campioni positivi al primo screening

Per quanto concerne i *pool* positivi allo screening del gene *stx*, si procede con la conferma della presenza di *E. coli* STEC, tramite la ricerca dei geni di virulenza nelle singole colonie isolate sul terreno Nutrient Agar: i risultati sono riportati in tabella 10.

| Campione con <i>Pool</i> + | Colonia 1 | | Colonia 2 | | Colonia 3 | | Colonia 4 | | Colonia 5 | |
|-------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
| | <i>stx</i> | <i>eae</i> | <i>stx</i> | <i>eae</i> | <i>stx</i> | <i>eae</i> | <i>stx</i> | <i>eae</i> | <i>stx</i> | <i>eae</i> |
| 5 | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - |
| 22 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 23 | - | - | - | - | - | - | + | - | - | - |
| 24 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 27 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 41 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | Colonia 6 | | Colonia 7 | | Colonia 8 | | Colonia 9 | | Colonia 10 | |
| | <i>stx</i> | <i>eae</i> | <i>stx</i> | <i>eae</i> | <i>stx</i> | <i>eae</i> | <i>stx</i> | <i>eae</i> | <i>stx</i> | <i>eae</i> |
| 5 | + | - | - | - | + | - | + | - | + | - |
| 22 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 23 | - | - | - | - | - | - | - | - | + | - |
| 24 | + | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 27 | - | - | - | - | + | - | - | - | - | - |
| 41 | - | - | + | - | - | - | - | - | - | - |

Tabella 10 - Risultati PCR real time delle singole colonie dei campioni con *pool* positivo

Come si può vedere, non tutte le colonie isolate presentano il gene *stx*: nel campione 5 il gene è stato rilevato in 5 colonie su 10, nel campione 23 in 2 colonie su 10 e nei campioni 24, 27 e 41 solo in 1 colonia su 10.

Nel campione 22, in cui non è stata rilevata la presenza dei geni anche all'interno delle colonie isolate, si esprime il risultato come “*Presenza presuntiva di STEC in 25 g di campione*”. Anche in questo caso l'assenza dei geni nelle colonie isolate può essere imputabile alla perdita degli stessi durante i passaggi analitici. Tale questione verrà discussa successivamente.

Per i campioni con le colonie positive, invece, il risultato finale è “*Presenza di STEC in 25 g di campione*”. Dal momento che non è stato rilevato il gene *eae* (codificante l'intimina), il metodo non richiede di procedere con la ricerca dei geni di sierogruppo (vedi diagramma di flusso 2 nel capitolo 3. Materiali e metodi).

4.2.2. Risultati del metodo B

4.2.2.1. Conteggi riferiti agli *Escherichia coli* totali sui formaggi

In tabella 11, si riportano i conteggi effettuati dall'Institut Agricole Régional (IAR) sui campioni, prima dell'arricchimento, utilizzando piastre Petrifilm.

| Campione | Parametri microbiologici | Conteggio prima dell'arricchimento (u.f.c/g) | Campione | Parametri microbiologici | Conteggio prima dell'arricchimento (u.f.c/g) |
|----------|--------------------------|--|----------|--------------------------|--|
| 1 | <i>E. coli</i> | 600 | 21 | <i>E. coli</i> | <10 |
| | | | 22 | <i>E. coli</i> | 540** |
| 2 | <i>E. coli</i> | 10 | 23 | <i>E. coli</i> | 650* |
| 3 | <i>E. coli</i> | 200 | 24 | <i>E. coli</i> | <10* |
| 4 | <i>E. coli</i> | 50 | 25 | <i>E. coli</i> | 130** |
| 5 | <i>E. coli</i> | 20* | 26 | <i>E. coli</i> | 50 |
| 6 | <i>E. coli</i> | <10 | 27 | <i>E. coli</i> | 310.000* |
| 7 | <i>E. coli</i> | <10 | 28 | <i>E. coli</i> | 20 |
| 8 | <i>E. coli</i> | 500** | 29 | <i>E. coli</i> | <10 |
| 9 | <i>E. coli</i> | <10 | 30 | <i>E. coli</i> | 320 |
| 10 | <i>E. coli</i> | 10** | 31 | <i>E. coli</i> | 190 |
| 11 | <i>E. coli</i> | <10 | 32 | <i>E. coli</i> | <10** |
| 12 | <i>E. coli</i> | 1.100 | 33 | <i>E. coli</i> | 440 |
| 13 | <i>E. coli</i> | <10 | 34 | <i>E. coli</i> | <10 |
| 14 | <i>E. coli</i> | 690 | 35 | <i>E. coli</i> | <10 |
| 15 | <i>E. coli</i> | <10 | 36 | <i>E. coli</i> | 1.200 |
| 16 | <i>E. coli</i> | 3.800** | 37 | <i>E. coli</i> | 120 |
| 17 | <i>E. coli</i> | <10 | 38 | <i>E. coli</i> | <10** |
| 18 | <i>E. coli</i> | <10 | 39 | <i>E. coli</i> | <10 |
| 19 | <i>E. coli</i> | <10 | 40 | <i>E. coli</i> | 80 |
| 20 | <i>E. coli</i> | <10 | 41 | <i>E. coli</i> | 1.600* |

Tabella 11 – Risultati dei conteggi effettuati su piastre Petrifilm dall'Institut Agricole Régional prima dell'arricchimento *Presenza di STEC in 25 g di campione **Presenza presuntiva di STEC in 25 g di campione

In generale il grado di contaminazione iniziale risulta molto basso, in quanto più della metà dei campioni sono negativi (43.90%), ovvero sotto il limite di determinazione del metodo (<10 u.f.c./g), o con una contaminazione compresa tra 10 e 100 u.f.c./g (17.07%) (vedi tabella 12). Il 26.83% dei campioni ha una contaminazione iniziale bassa (100-1.000 u.f.c./g) e il 12.20% risulta avere un grado di contaminazione superiore a 1.000 u.f.c./g.

| Grado di contaminazione | N° campioni | % su totale dei campioni |
|-------------------------|-------------|--------------------------|
| <10 u.f.c./g | 18 | 43,90% |
| 10 – 100 u.f.c./g | 7 | 17,07% |
| 100 – 1000 u.f.c./g | 11 | 26,83% |
| >1000 u.f.c./g | 5 | 12,20% |
| Totale | 41 | |

Tabella 12 – Grado di contaminazione iniziale da *E. coli* β -glucuronidasi positivi

Come si può osservare, per due campioni su cinque in cui è stata rilevata la presenza degli *E. coli* STEC, la contaminazione iniziale da *E. coli* β -glucuronidasi positivi è estremamente bassa (20 u.f.c./g e <10 u.f.c./g, vedi campioni contrassegnati con * in tabella 11). Un campione, invece, ha una contaminazione media (650 u.f.c./g) e in due campioni la contaminazione risulta alta (310.000 u.f.c./g e 1.600 u.f.c./g).

Sui campioni positivi, al primo screening dei geni di virulenza, si è verificato il numero di colonie anche dopo la crescita microbica in brodo di arricchimento per 18-24 h.

| Campione | Conteggio iniziale di <i>E. coli</i> (u.f.c./g) | Conteggio dopo arricchimento di <i>E. coli</i> (volume di inoculo di 0,1 ml) | | | | Risultato (u.f.c./ml) | |
|----------|---|--|-------------------|---|-------------------|-----------------------|-----------------------|
| | | Diluizione 10 ⁻⁵ (u.f.c./ml) | | Diluizione 10 ⁻⁶ (u.f.c./ml) | | | |
| | | Colonie blu* | Colonie bianche** | Colonie blu* | Colonie bianche** | Colonie blu* | Colonie totali |
| 5 | 20 | 120 | 0 | 30 | 0 | 1,4 x 10 ⁸ | 1,4 x 10 ⁸ |
| 8 | 500 | 152 | 8 | 64 | 3 | 2,0 x 10 ⁸ | 2,1 x 10 ⁸ |
| 10 | 1.200 | 5 | 100 | 0 | 27 | 5.000.000 | 1,2 x 10 ⁸ |
| 16 | 3.300 | 93 | 100 | 11 | 16 | 9,5 x 10 ⁷ | 2,0 x 10 ⁸ |
| 22 | 560 | 50 | / | 3 | / | 4,8 x 10 ⁷ | 4,8 x 10 ⁷ |
| 23 | 590 | 50 | / | 5 | / | 5,0 x 10 ⁷ | 5,0 x 10 ⁷ |
| 24 | <10 | 70 | / | 10 | / | 7,3 x 10 ⁷ | 7,3 x 10 ⁷ |
| 25 | 110 | 74 | / | 17 | / | 8,3 x 10 ⁷ | 8,3 x 10 ⁷ |
| 27 | 310.000 | 35 | / | 5 | / | 3,6 x 10 ⁷ | 3,6 x 10 ⁷ |
| 32 | <10 | 115 | / | 22 | / | 1,3 x 10 ⁸ | 1,3 x 10 ⁸ |
| 38 | <10 | 91 | 5 | 10 | 0 | 9,2 x 10 ⁷ | 9,6 x 10 ⁷ |
| 41 | 1.600 | 28 | 0 | 15 | 0 | 3,9 x 10 ⁷ | 3,9 x 10 ⁷ |

Tabella 13 – Conteggi Arpa su T.B.X. dopo arricchimento

*Colonie blu di *E. coli* β-glucuronidasi positivi

**Colonie bianche di batteri interferenti (coliformi ed altre *Enterobacteriaceae*)

Dai valori della tabella 13, in cui il numero finale di colonie (u.f.c./ml) risulta nell'ordine di grandezza di 10⁷-10⁸, è possibile osservare che l'arricchimento è avvenuto con successo. Infatti, questa fase serve proprio a favorire la rilevazione di *E. coli* STEC, aumentando in maniera esponenziale il numero di cellule batteriche di partenza presenti nel campione.

Il risultato può essere molto variabile (ad esempio la crescita degli *E. coli* nel campione 10 appare bassa rispetto alla crescita totale dei batteri): ciò dipende dalla presenza di altri microrganismi nel formaggio che competono con la crescita degli *Escherichia coli* durante l'arricchimento.

La formula utilizzata per il conteggio delle colonie a partire dalle diluizioni 10⁻⁵ e 10⁻⁶ è (57, paragrafo 10):

$$N = \frac{\sum \alpha}{V(n_1 + 0.1 \times n_2) \times d}$$

dove

N = risultato della determinazione (numero di microrganismi confermati presenti nel campione)

$\sum \alpha$ = sommatoria delle colonie confermate

V = volume di inoculo, in ml, per ciascuna piastra

n_1 = numero delle piastre considerate alla prima diluizione

n_2 = numero delle piastre considerate alla seconda diluizione

d = fattore di diluizione applicato alle prime piastre considerate per il conteggio

Infine, si è provato ad eseguire (tabella 14) una proporzione tra il conteggio iniziale, prima dell'arricchimento, e quello finale, dopo l'arricchimento, in base al numero delle colonie reisolate, in modo tale da dare una stima della possibile contaminazione iniziale da *E. coli* STEC.

La metodica prevede di dare un risultato positivo (presenza di STEC) anche se è stata confermata un'unica colonia isolata. Per ottimizzare i costi dei reattivi e i tempi analitici, si può terminare l'analisi nel momento in cui si trovano una o più colonie positive nel primo *pool* analizzato, nel caso di negatività si procede analogamente con gli altri *pool*. In conseguenza di ciò, non in tutti i *pool* positivi si sono ricercati i geni di virulenza all'interno delle singole colonie.

Sulla base di quanto detto, sono stati calcolati due valori limite, minimo e massimo, per stimare il grado di contaminazione iniziale da STEC a partire dal numero di colonie STEC reisolate e dagli *E. coli* presenti prima dell'arricchimento.

Il limite minimo è stato calcolato considerando il numero di colonie positive del *pool* analizzato, aggiungendo 1 colonia positiva per *pool* positivo non analizzato (nel caso in cui ci sia più di un *pool* positivo).

Ad esempio, la proporzione del campione 5 (tabella 14) è:

$$9 : 50 = x : 20,$$

dove

- 9 è dato dalla somma delle 5 colonie di *E. coli* STEC reisolate + 4 colonie, una per ciascun *pool* positivo non analizzato, supponendo che almeno una colonia per *pool* abbia i geni di virulenza (vedi il numero di *pool* positivi in tabella 9);
- 50 sono le colonie totali all'interno dei *pool* (10 colonie x 5 *pool*);
- 20 sono le colonie di *E. coli* cresciute prima dell'arricchimento (vedi tabella 11).

Per quanto riguarda il limite massimo, il calcolo è stato effettuato considerando il numero di colonie positive del *pool* analizzato, aggiungendo tutte e 10 le colonie degli altri *pool* positivi (nel caso in cui ci sia più di un *pool* positivo).

Ad esempio, sempre nel campione 5 (tabella 14) la proporzione è:

$$45 : 50 = x : 20,$$

dove

- 45 è dato dalla somma delle 5 colonie di *E. coli* STEC reisolate + 40 colonie, 10 per ciascun *pool* positivo non analizzato, supponendo che tutte le colonie presenti nel *pool* abbiano i geni di virulenza;
- 50 sono le colonie totali all'interno dei *pool* (10 colonie x 5 *pool*);
- 20 sono le colonie di *E. coli* cresciute prima dell'arricchimento (tabella 11).

| Campione | N° colonie positive dopo reisolamento | Proporzione tra STEC reisolati ed <i>E. coli</i> iniziali | | Risultato: n° minimo e massimo di contaminazione iniziale da STEC | |
|----------|---------------------------------------|---|------------------------|---|---------|
| | | Minimo | Massimo | Minimo | Massimo |
| 5 | 5 su 50 | $9 : 50 = x : 20$ | $45 : 50 = x : 20$ | 4 | 18 |
| 23 | 2 su 50 | $3 : 50 = x : 650$ | $12 : 50 = x : 650$ | 39 | 156 |
| 24 | 1 su 50 | Non calcolabile (numero iniziale di colonie <10) | | <10 | <10 |
| 27 | 1 su 50 | $1 : 50 = x : 310.000$ | $1 : 50 = x : 310.000$ | 6.200 | 6.200 |
| 41 | 1 su 50 | $1 : 50 = x : 1.600$ | $1 : 50 = x : 1.600$ | 32 | 32 |

Tabella 14 – Conteggi della possibile contaminazione iniziale da *E. coli* STEC

E' necessario sottolineare, però, che tale proporzione è solo una stima e non ci indica la reale contaminazione da STEC, in quanto il valore potrebbe essere sovra o sottostimato a causa di vari fattori:

- 1- la competizione per le sostanze nutritive tra tutti i batteri presenti nel campione, che causa la proliferazione di alcuni microrganismi e l'inibizione di altri;
- 2- il diverso stato metabolico dei batteri;
- 3- la temperatura;
- 4- il pH;

4.2.3. Riassunto finale dei conteggi di *Escherichia coli*

La tabella 15 presenta una sintesi dei risultati ottenuti e commentati. Si evince che il grado presunto di contaminazione iniziale da STEC è basso (80% dei campioni con presenza di STEC – tabella 14), vicino o sotto il valore di dose infettante riportato in letteratura (<100 u.f.c./g) (4, 33), ad eccezione di un caso in cui la contaminazione è risultata alta (6.200 u.f.c./g).

| 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 positive dopo reisolamento | Contaminazione iniziale da <i>E. coli</i> STEC | |
|----------|--|---|---------------------------------------|--|---------|
| | | | | Minimo | Massimo |
| 1 | 600 | / | / | / | / |
| 2 | 10 | / | / | / | / |
| 3 | 200 | / | / | / | / |
| 4 | 50 | / | / | / | / |
| 5* | 20 | 1,4 x 10 ⁸ | 5 | 4 | 18 |
| 6 | <10 | / | / | / | / |
| 7* | <10 | / | / | / | / |
| 8 | 500 | 2,0 x 10 ⁸ | / | / | / |
| 9* | <10 | / | / | / | / |
| 10 | 10 | 5.000.000 | / | / | / |
| 11 | <10 | / | / | / | / |
| 12 | 1.100 | / | / | / | / |
| 13 | <10 | / | / | / | / |
| 14 | 690 | / | / | / | / |
| 15 | <10 | / | / | / | / |
| 16 | 3.800 | 9,5 x 10 ⁷ | / | / | / |
| 17 | <10 | / | / | / | / |
| 18 | <10 | / | / | / | / |
| 19 | <10 | / | / | / | / |
| 20 | <10 | / | / | / | / |
| 21 | <10 | / | / | / | / |
| 22 | 540 | 4,8 x 10 ⁷ | / | / | / |
| 23* | 650 | 5,0 x 10 ⁷ | 2 | 39 | 156 |
| 24* | <10 | 7,3 x 10 ⁷ | 1 | <10 | <10 |
| 25* | 130 | 8,3 x 10 ⁷ | / | / | / |
| 26 | 50 | / | / | / | / |
| 27** | 310.000 | 3,6 x 10 ⁷ | 1 | 6.200 | 6.200 |
| 28* | 20 | / | / | / | / |
| 29 | <10 | / | / | / | / |
| 30 | 320 | / | / | / | / |
| 31 | 190 | / | / | / | / |
| 32 | <10 | 1,3 x 10 ⁸ | / | / | / |
| 33 | 440 | / | / | / | / |
| 34 | <10 | / | / | / | / |
| 35 | <10 | / | / | / | / |
| 36 | 1.200 | / | / | / | / |
| 37 | 120 | / | / | / | / |
| 38 | <10 | 9,2 x 10 ⁷ | / | / | / |
| 39 | <10 | / | / | / | / |
| 40** | 80 | / | / | / | / |
| 41** | 1.600 | 3,9 x 10 ⁷ | 1 | 32 | 32 |

Tabella 15 – Riassunto dei conteggi, prima e dopo arricchimento, e contaminazione da STEC

*Formaggi derivanti dalla stessa caldaia del caseificio A

**Formaggi derivanti dalla stessa caldaia del caseificio B

Legenda

- Assenza di STEC in 25 g di campione
- Presenza di STEC in 25 g di campione
- Presenza presuntiva di STEC in 25 g di campione
- Presenza presuntiva di STEC di sierogruppo OXX in 25 g di campione
- Presenza presuntiva di STEC in grado di causare la lesione A/E in 25 g di campione

4.2.4. Riassunto finale della PCR real time

Di seguito viene riportato un riassunto finale dei risultati della PCR real time.

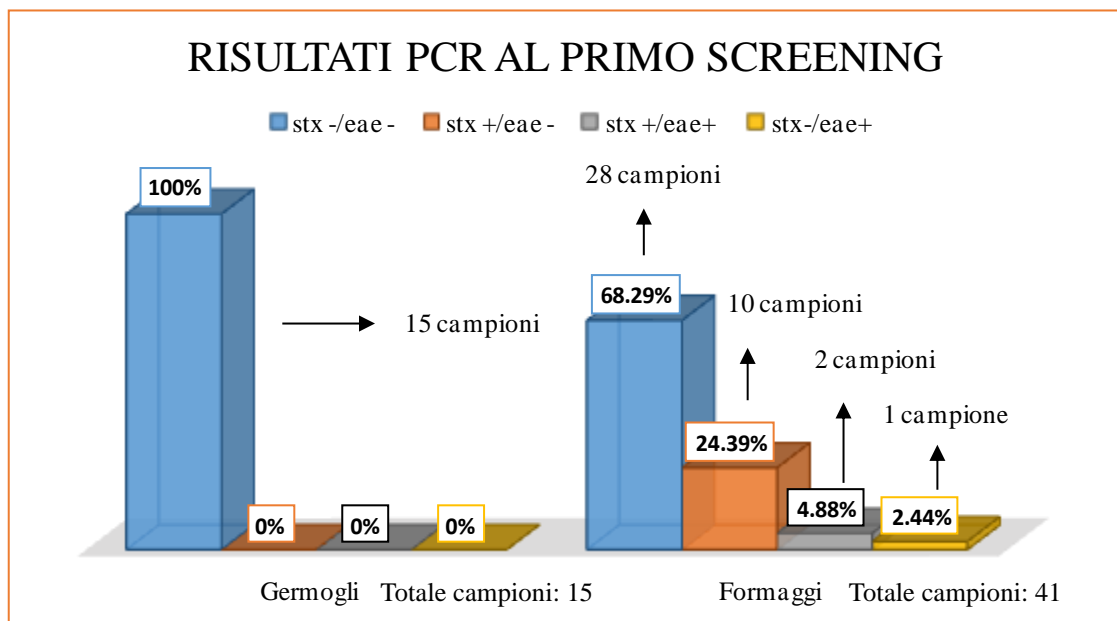


Grafico 2 – Istogramma rappresentante i campioni positivi e negativi al primo screening dei geni di virulenza

Per la matrice germogli (grafico 2), come già detto, tutti i campioni sono risultati negativi, confermando quanto rilevato dal laboratorio Arpa VdA nel corso degli anni precedenti.

Per la matrice formaggio (grafico 2), su 41 campioni, il 68.29% è risultato negativo allo screening per entrambi i geni di virulenza (*stx/eae*), nel

24.39% dei casi è stata rilevata solo la presenza del gene *stx*, e nel 7.32% dei casi l'analisi ha rilevato la presenza del gene *eae*, ma due campioni (4.88%) presentavano anche il gene della tossina e 1 campione (2.44%) era *stx* negativo (vedi anche tabella 7).

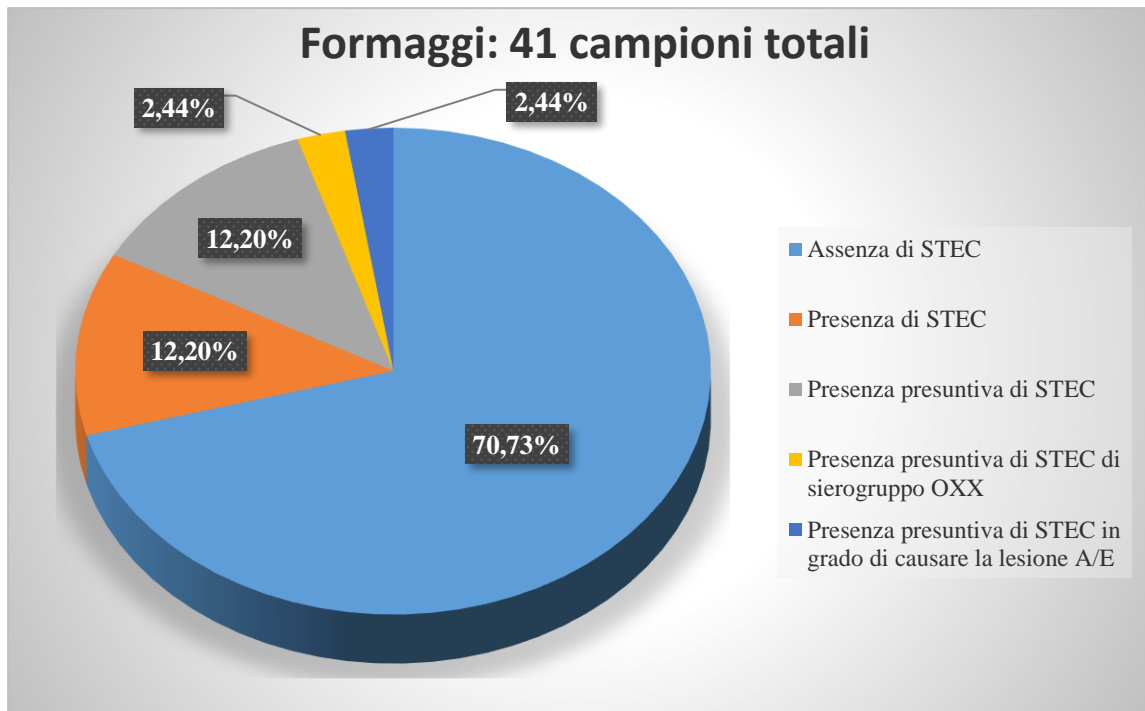


Grafico 3 – Espressione in percentuale dei risultati delle analisi svolte su 41 campioni

Alla fine delle analisi svolte emerge che (grafico 3):

- il 70.73% dei formaggi non presenta i batteri target (Assenza di STEC);
- nel 12.20% dei campioni sono stati isolati gli *E. coli* STEC (Presenza di STEC);
- nel 12.20% dei formaggi non si è giunti all'isolamento delle colonie quindi la presenza di *E. coli* STEC è solo presunta;
- il 2.44% dei formaggi appare come “*Presenza presuntiva di STEC di sierogruppo OXX*”. Tale percentuale comprende solo uno dei due campioni risultati *stx +/eae +* al primo screening dei geni di virulenza, in quanto solo 1 caso è apparso positivo alla PCR per lo

screening dei geni di sierogruppo (tabella 8), ma non si è giunti all'isolamento delle cellule;

- infine, il 2.44% dei campioni viene espresso come “*Presenza presuntiva di STEC in grado di causare la lesione A/E*” in quanto presenta entrambi i geni di virulenza, ma i geni di sierogruppo non sono stati rilevati.

Tuttavia, le percentuali da noi rilevate non sono rappresentative del quadro campionario reale, in quanto, in alcuni casi, le analisi sono state ripetute su più forme di formaggio provenienti dallo stesso caseificio e dalla stessa caldaia di produzione: 6 dal caseificio A e 3 dal caseificio B. Le 2 forme positive, escludendo i campioni ripetuti, derivano unicamente da questi 2 caseifici.

Il grafico quattro sottostante rappresenta le percentuali ricalcolate, dopo aver tolto dal conteggio i campioni ripetuti.

Si può osservare che la percentuale dei campioni negativi si alza (76.47%), mentre quella dei campioni positivi si abbassa (5.88%).

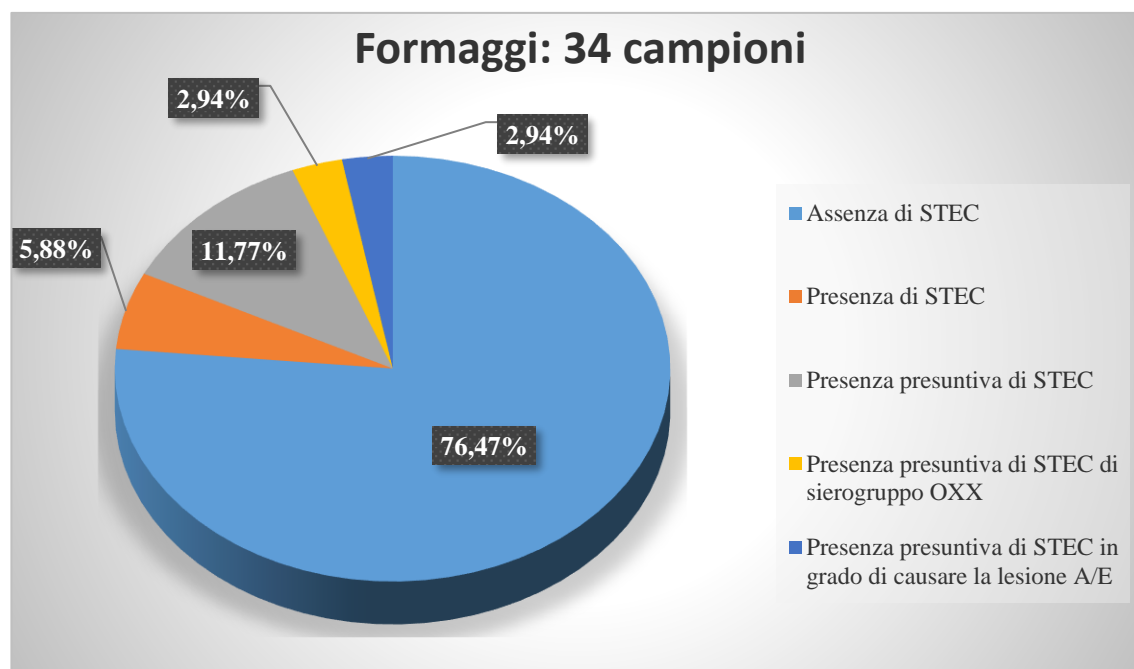


Grafico 4 – Percentuali dei risultati dei formaggi senza contare i campioni derivanti dalla stessa caldaia dei caseifici A e B

5. Discussione e conclusioni

I risultati ottenuti hanno evidenziato interessanti aspetti relativi agli STEC nei prodotti lattiero-caseari.

In primo luogo, in base alle analisi svolte, si è rilevata la presenza di *E. coli* STEC nel 5.88% dei campioni.

In Italia, la presenza di STEC all'interno di latte e prodotti caseari appare più alta di quella rilevata nel laboratorio Arpa. Ad esempio, nel Lazio si rileva la presenza del gene *stx* in *E. coli*, probabilmente ceppi STEC, in formaggi ovini a latte crudo nel 15.1% dei casi (58), mentre nel Nord Italia si riscontra una percentuale del 12.5% di STEC nel latte sfuso (59). Dati simili derivano anche da studi condotti in Egitto e in Iran, dove risulta una presenza di STEC rispettivamente dell'11.29% in campioni di formaggio a latte crudo (60) e del 17.47% in campioni di latte crudo (61). Altri studi, invece, riportano percentuali più basse o simili a quelle ottenute. In Svizzera si è osservata una percentuale del 3.7% nel 2006 e del 6.3% nel 2007 in campioni di formaggio a latte crudo (62), e in Turchia la presenza di *E. coli* O157 è stata determinata nell'1% di campioni di latte crudo e nel 4% in campioni di formaggio (63).

In secondo luogo, nella maggior parte dei campioni analizzati si riscontra la presenza del gene *stx* ma non del gene *eae*. Tuttavia, entrambi i geni sono fondamentali per causare tossinfezione umana (vedi paragrafo 1.6.1. Modalità di trasmissione e processo patogenetico).

Il grafico 5 sottostante, tratto dal Report ISSN 1726-5274 di WHO (8), indica chiaramente il livello potenziale di rischio associato alla presenza dei diversi geni. Come si può notare la presenza del gene *stx₂* viene associata ad un livello di rischio alto, mentre la presenza anche del gene *eae* o *aggR* correla con un livello di rischio molto elevato.

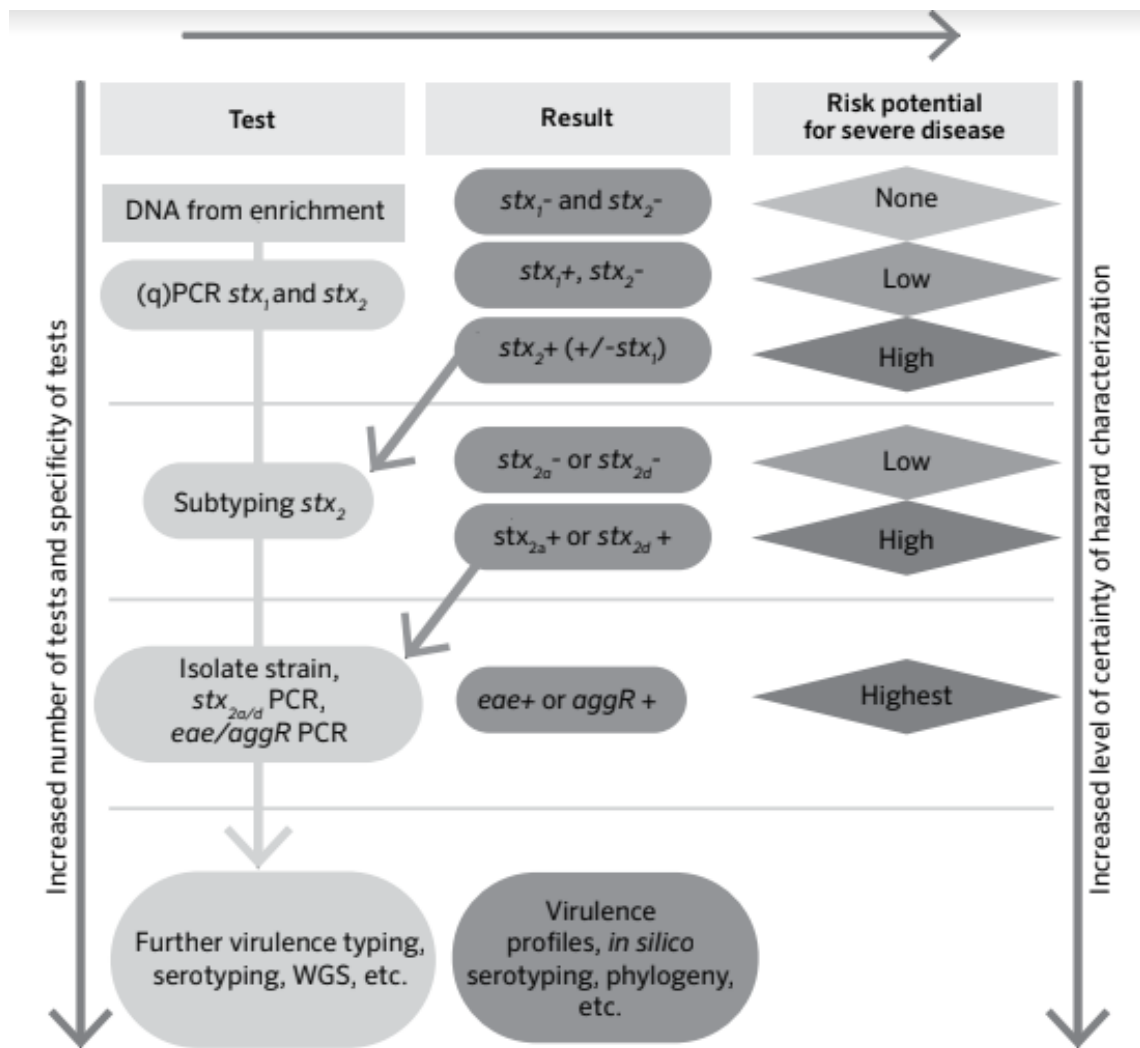


Grafico 5 – Strategia per la rilevazione di STEC e l'individuazione del livello di rischio per la salute umana basato sulla virulenza dei geni (8)

Il metodo utilizzato per il lavoro svolto nel laboratorio Arpa VdA non permette di discriminare fra i geni stx_1 e stx_2 , e rileva solo il gene eae , non il gene $aggR$. Di conseguenza non possiamo sapere con certezza se i ceppi da noi isolati sono patogeni o no, e quindi identificare il livello di rischio per la salute umana. A tal fine, sarebbe interessante poter caratterizzare geneticamente i ceppi.

Le evidenze bibliografiche indicano che non tutti i ceppi STEC sono patogeni per l'uomo. Di 470 sierotipi di STEC identificati solo circa 100 sono patogeni per l'uomo (18). La patogenicità poi è associata a diversi

fattori, quali la suscettibilità dell'ospite, il cocktail genetico dei geni di virulenza, il sottotipo di tossina, ma anche dal tipo di batteriofago. Sia i batteriofagi λ che le tossine possono essere differenti, e di conseguenza causare manifestazioni cliniche diverse. Tale variabilità risulta essere un problema sia nei trattamenti contro l'infezione, sia nella ricerca diagnostica (64).

Dati riportati da Douëllou T. *et al.* (65) affermano che i ceppi isolati dagli umani sono differenti rispetto a quelli isolati dai prodotti lattiero-caseari, inoltre WHO osserva che il 27.9% dei ceppi STEC isolati sono di origine umana, il 52% di origine non umana (animali, alimenti e acqua) e solo il 20.1% degli *E. coli* STEC sono in comune tra le due fonti (figura 20) (8).

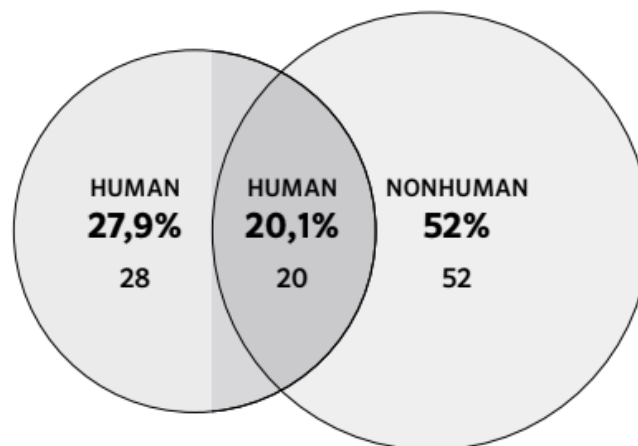


Figura 20 - Diagramma di Venn dei sierotipi STEC presenti nella banca dati di Bettelheim, che mostra le frazioni di sierotipi unici per l'uomo e non (animali, cibo, acqua), ed entrambe le fonti

Non è possibile nel nostro caso determinare se i ceppi isolati appartengano a STEC di origine non umana e quindi non patogeni per l'uomo. Tuttavia, come riportato nella circolare del Ministero della salute (56): “[..]non è possibile allo stato attuale delle conoscenze definire a priori quali STEC siano patogeni per l'uomo e quali invece non rappresentino un pericolo[.]”

A favore dell'ipotesi che i ceppi isolati nei formaggi analizzati non siano

patogeni per l'uomo, vi è anche il fatto che non ci sono evidenze epidemiologiche di tossinfezione da STEC che originino dal tipo di formaggio oggetto di questo studio. Inoltre, la letteratura riporta che i casi di malattia legati all'assunzione di latte, o prodotti lattiero-caseari, sono infrequenti (66). Secondo un report pubblicato da WHO nel 2018 (8) i casi di malattia causati da prodotti di caseificio (*dairy*) in Europa, senza distinzione tra latte crudo, formaggi o altri prodotti, risultano in media del 6.25 % rispetto ai casi totali di malattia da STEC.

Il contributo da parte di questi prodotti alimentari nelle 3 regioni del mondo (America, Europa e Pacifico occidentale), escludendo le epidemie ad origine sconosciuta, risulta rispettivamente del 12%, 16% e 25% (grafico 6). Ciò indica che è necessario approfondire ulteriormente i risultati fin qui ottenuti.

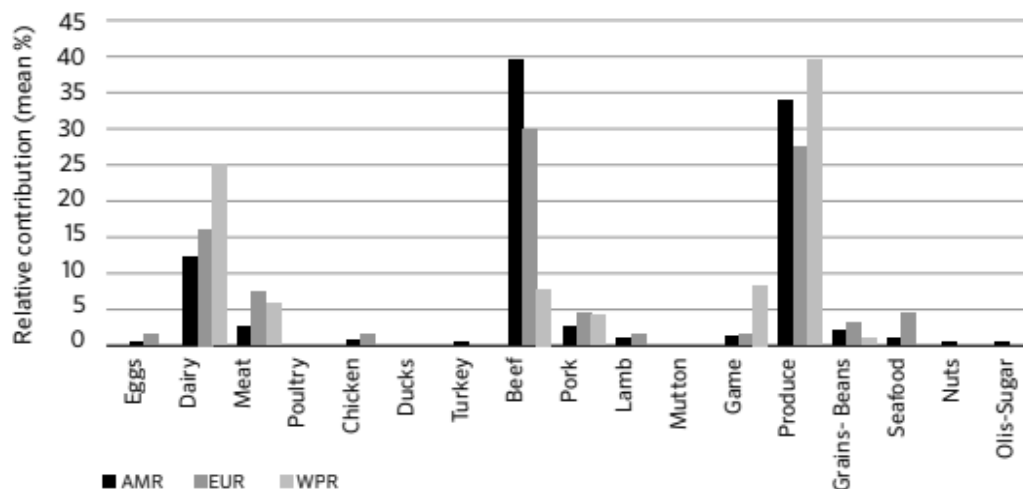


Grafico 6 – Contributo relativo degli alimenti nei casi di STEC nelle Regioni dell'OMS (8)

In terzo luogo, non sono mai state reisolte cellule di *E. coli* STEC appartenenti ai 5 sierogruppi maggiormente associati alle forme di infezioni più gravi: O157, O111, O103, O145, O26 (56) e target del metodo UNI CEN ISO/TS 13136:2013.

Infine, è emerso un altro aspetto interessante: su 12 casi di positività per il gene *stx* allo screening dei geni di virulenza, il 50% (6 casi) è risultato negativo alla PCR svolta sui *pool* di colonie mentre l'altra metà dei campioni (6 casi) mostra una positività dei *pool* dopo isolamento. Tuttavia, in uno di questi ultimi 6 casi non si è riusciti a confermare la presenza di *E. coli* STEC, in quanto non rilevato il gene *stx* nelle singole colonie.

Come accennato precedentemente, l'evento è imputabile a diverse cause.

Innanzitutto, è possibile che all'interno della matrice alimentare siano presenti delle cellule vitali ma non coltivabili, oppure delle cellule morte (56). Il metodo in PCR è in grado di rilevare il DNA batterico anche in assenza di batteri vivi, vitali e coltivabili, indipendentemente quindi dallo stato metabolico delle cellule. Per tale ragione la presenza dei geni di virulenza deve essere confermata tramite isolamento e caratterizzazione dei ceppi (18, 56), analogamente a quanto avviene per la rilevazione di *Listeria* e *Salmonella* negli alimenti.

In aggiunta a questo, il rilevamento del gene *stx* alla PCR nella matrice alimentare e non all'interno delle colonie (*pool* o colonie isolate) può essere causa del trasferimento orizzontale o della perdita degli elementi trasportanti il gene della tossina (fagi). Infatti, fattori ambientali, agenti che causano danni al DNA, ma anche induzioni spontanee, possono causare l'escissione del profago e l'induzione del ciclo litico con conseguente lisi cellulare. Tale azione porta alla liberazione dei fagi in ambiente esterno che possono infettare e passare il gene *stx* ad altre cellule batteriche (18, 24), come gli *E. coli* commensali (40), oppure rimanere liberi nell'ambiente (18, 24, 25, 67). Fagi infettanti e liberi sono stati trovati in campioni fecali provenienti da umani sani, da ambienti contaminati con campioni di feci umane e animali, in alimenti (18) e anche in campioni di acqua con una percentuale del 70% in acque reflue urbane e 94% in acque reflue animali (24). Gli *E. coli* STEC possono co-esistere come STEC (*stx* +) o STEC-

LST (STEC *Lost Shiga Toxin/stx* -) (67) e la presenza di fagi liberi in matrici alimentari può portare alla rilevazione di falsi positivi (18, 67).

L'escissione e la perdita del gene *stx* possono avvenire *in vivo* ma anche durante i passaggi di sottocoltura in laboratorio (67, 68). Nonostante la perdita del gene in laboratorio avvenga con bassa frequenza, l'evento può rappresentare una sfida nelle procedure diagnostiche e di rilevazione degli STEC in laboratorio, ma anche nella determinazione del rischio per la salute umana (18) e nelle indagini epidemiologiche (68).

Un altro fattore scatenante la produzione e la liberazione di fagi, che interferisce con l'analisi sugli alimenti, è il processo di produzione dei formaggi (69).

Per quanto riguarda il livello di contaminazione rilevato (5.88% campioni positivi) è necessario sottolineare che le positività sono state riscontrate unicamente da forme di formaggio derivanti da due caseifici (A e B). Quanto detto può indicare che il problema non è legato ad una presenza diffusa di *E. coli* STEC nella tipologia di formaggio analizzata nella tesi, ma deriva piuttosto da una contaminazione ambientale, localizzata in quei 2 caseifici, oppure da un problema durante la produzione di latte utilizzato per i formaggi, per esempio ad una contaminazione dei filtri della mungitrice. Trevisani *et al.* (59) riportano una percentuale del 30.2% di campioni di filtri del latte positivi al gene *stx*. A tal proposito, sarebbe interessante studiare questo aspetto mediante prelievi ambientali nella stalla, nel caseificio, nella caldaia e prelievi di latte, per verificare a che livello è presente la contaminazione.

Come ulteriore approfondimento dei risultati ottenuti, verrà effettuata, nel laboratorio del Professor Pier Sandro Cocconcelli (DiSTAS – Microbiologia, Università Cattolica del Sacro Cuore, Piacenza) l'analisi del genoma dei ceppi isolati nel laboratorio Arpa, con il fine di identificare la tipologia degli *E. coli* STEC rilevati e, di conseguenza, anche il rischio

reale per la salute umana ad essi associato.

Inizialmente si eseguiranno una RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*) e una REP-PCR (*Repetitive Element Palindromic PCR*) per tipizzare i ceppi. In seguito, se tale analisi darà risultati significativi, si effettuerà, sui singoli ceppi, il sequenziamento che permetterà di conoscere a fondo la struttura del genoma batterico, il sierotipo e le caratteristiche di virulenza (presenza di più geni di virulenza tra cui il locus LEE, di geni deleti, anche parzialmente, o interi).

La caratterizzazione dei ceppi in maniera approfondita permetterà di valutare concretamente l'eventuale rischio di tossinfezioni umane da STEC, in seguito al consumo del formaggio a produzione locale da noi preso in considerazione.

Il lavoro svolto finora sarà approfondito, nei prossimi mesi dal laboratorio Arpa VdA, tramite lo svolgimento delle analisi su nuovi campioni.

6. Bibliografia e sitografia

1. World Health Organization (2008). *Foodborne disease outbreaks: guidelines for investigation and control*. World Health Organization. <http://apps.who.int/iris/handle/10665/43771>.
2. Rondanelli, Elio Guido, Massimo Fabbi, Piero Marone. *Trattato sulle infezioni e tossinfezioni alimentari*. Pavia: Selecta Medica editore, 2005. Capitolo II p.69.
3. European Food Safety Authority, *Foodborne zoonotic diseases*, <<https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/foodborne-zoonotic-diseases>> (data di ultima consultazione: 3 luglio 2019).
4. Istituto Superiore della Sanità, *Tossinfezioni alimentari*, <<https://www.epicentro.iss.it/tossinfezioni/>> (data di ultima consultazione: 3 luglio 2019).
5. World Health Organization. *WHO estimates of the global burden of foodborne diseases: Foodborne diseases burden epidemiology reference group 2007-2015*. Ginevra: World Health Organization, 2015.
6. Havelaar, Arie H., Martyn D. Kirk, Paul R. Torgerson, Herman J. Gibb *et al.* “World Health Organization Global Estimates and Regional Comparisons of the Burden of Foodborne Disease in 2010”. *PLoS Medicine* (2015 Dec) Vol. 12, No. 12: e1001923. doi:10.1371/journal.pmed.1001923.
7. Kirk, Martyn D., Sara M. Pires, Robert E. Black, Marisa Caipo *et al.* “World Health Organization Estimates of the global and regional disease burden of 22 foodborne bacterial, protozoal, and viral diseases, 2010: a data synthesis”. *PLoS Medicine* (2015 Dec) Vol. 12, No. 12: e1001921. doi:10.1371/journal.pmed.1001921.

8. World Health Organization & Food and Agriculture Organization of the United Nations (2018). *Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) and food: attribution, characterization, and monitoring: report*. World Health Organization. <http://apps.who.int/iris/handle/10665/272871>.
9. Murray, Patrick R., Ken S. Rosenthal, George S. Kobayashi and Michael A. Pfaller (2002). *Medical Microbiology* - 4th ed. (trad. It. *Microbiologia* - seconda edizione, Giorgio Palù *et al.* Napoli: EdiSES, 2003). Capitolo 29 “*Enterobacteriaceae*”, pp.273 - 274.
10. La Placa, Michele. *Principi di microbiologia medica*- nona edizione. Bologna: Società Editrice Esculapio s.r.l., 2001. Capitolo 21 “*Enterobatteri*”.
11. Murray, Patrick R., Ken S. Rosenthal, George S. Kobayashi and Michael A. Pfaller (2002). *Medical Microbiology* - 4th ed. (trad. It. *Microbiologia* - seconda edizione, Giorgio Palù *et al.* Napoli: EdiSES, 2003). Capitolo 29 “*Enterobacteriaceae*”, pp. 275-280.
12. La Placa, Michele. *Principi di microbiologia medica*- nona edizione. Bologna: Società Editrice Esculapio s.r.l., 2001. Capitolo 21 “*Enterobatteri, Escherichia*”.
13. Bonadonna, Lucia e Ottaviani Massimo. “Metodi analitici di riferimento per le acque destinate al consumo umano ai sensi del DL.vo 31/2001. Metodi microbiologici” (2007) pp.204. Rapporti ISTISAN 07/5.
14. Rondanelli, Elio Guido, Massimo Fabbi, Piero Marone. *Trattato sulle infezioni e tossinfezioni alimentari*. Pavia: Selecta Medica editore, 2005. Capitolo IV par. 12 p.477.
15. Melton-Celsa, Angela R. “Shiga toxin (Stx) classification, structure; and function”. *Microbiology Spectrum* (2014 Dec) Vol. 2, No. 4: EHEC-0024-2013. doi:10.1128/microbiolspec.EHEC-0024-2013.

16. Karmali, Mohamed A. "Host and pathogen determinants of verocytotoxin-producing *Escherichia coli*-associated hemolytic uremic syndrome". *Kidney International* (2009 Feb) Vol. 75, 122: S4-S7. doi:10.1038/ki.2008.608.
17. Krause, Maïke, Holger Barth and Herbert Schmidt. "Toxins of locus of enterocyte effacement-negative Shiga toxin-producing *Escherichia coli*". *Toxins* (2018 Jun) Vol.10, No. 6: 241. doi:10.3390/toxins10060241.
18. FAO/WHO STEC EXPERT GROUP (2019). "Hazard identification and characterization: criteria for categorizing Shiga toxin-producing *Escherichia coli* on a risk basis". *Journal of Food Protection* (2019 Jan) Vol. 82, No. 1: 7-21. doi:10.4315/0362-028X.JFP-18-291.
19. Court, Donald L., Amos B. Oppenheim and Sankar L. Adhya. "A new look at bacteriophage λ genetic networks". *Journal of Bacteriology* (2007 Jan) Vol. 189, No. 2: 298-304. doi:10.1128/JB.01215-06.
20. Peter J. Russell. *i GENETICA*. Napoli: EdiSES, 2002. Capitolo 16 figura 16.20 p.485.
21. Licznarska, Katarzyna, Bożena Nejman-Faleńczyk, Sylwia Bloch *et al.* "Oxidative Stress in Shiga Toxin Producing by Enterohemorrhagic *Escherichia coli*". *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* (2016). doi:10.1155/2016/3578368
22. Peter J. Russell. *i GENETICA*. Napoli: EdiSES, 2002. Capitolo 3 p.80.
23. Peter J. Russell. *i GENETICA*. Napoli: EdiSES, 2002. Capitolo 2 p.49.
24. Imamovic, Lejla, Elisenda Ballesté, Juan Jofre and Maite Muniesa. "Quantification of Shiga toxin-converting bacteriophages in waste water and in fecal samples by real time quantitative PCR". *Applied and Environmental Microbiology* (2010 Sep) Vol. 76, No. 10: 5693-5701. doi:10.1128/AEM.00107-10.

25. Schmidt, Herbert. "Shiga-toxin-converting bacteriophages". *Research in Microbiology* (2001 Oct) Vol. 152, No. 8: 687-695. doi:10.1016/S0923-2508(01)01249-9.
26. Peter J. Russell. *i GENETICA*. Napoli: EdiSES, 2002. Capitolo 16 pp. 484-487.
27. Mauro, Steven A. and Gerald B. Koudelka. "Shiga toxin: expression, distribution, and its role in the environment". *Toxins* (2011 Jun) Vol. 3, No. 6: 608-625. doi:10.3390/toxins3060608.
28. Kimmitt, Patrick T., Colin R. Harwood and Michael R. Barer. "Toxin gene expression by Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: the role of antibiotics and the bacterial SOS response". *Emerging Infectious Diseases* (2000 Sep-Oct) Vol. 6, No. 5: 458-465. doi:10.3201/eid0605.000503.
29. Fang, Yuan, Ryan G. Mercer, Lynn M. McMullen and Michael G. Gänzle. "Induction of Shiga toxin-encoding prophage by abiotic environmental stress in food". *Applied and Environmental Microbiology* (2017 Oct) Vol. 83, No. 19: e01378-17. doi:10.1128/AEM.01378-17.
30. Wagner, Patrick L., David W. K. Acheson and Matthew K. Waldor. "Human neutrophils and their products induce Shiga toxin producing by Enterohemorrhagic *Escherichia coli*". *Infection and Immunity* (2001 Mar) Vol. 69, No. 3: 1934-1937. doi:10.1128/IAI.69.3.1934-1937.2001.
31. Riley, Lee W., Robert S. Remis, Steven D. Helgerson *et al.* "Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype". *The New England journal of medicine* (1983 Mar) Vol. 308, No. 12: 681-5. doi:10.1056/NEJM198303243081203.
32. European Food Safety Authority. "Technical specifications for the monitoring and reporting of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) on animals and food (VTEC surveys on animals and food)". *EFSA Journal* (2009 Nov) Vol. 7, No. 11. doi:10.2903/j.efsa.2009.1366.

33. Rondanelli, Elio Guido, Massimo Fabbi, Piero Marone. *Trattato sulle infezioni e tossinfezioni alimentari*. Pavia: Selecta Medica editore, 2005. Capitolo IV par. 12 p.479-482.
34. World Health Organization, *E. coli: sources and transmission*, <<https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/e.coli>> (data di ultima consultazione 12 giugno 2019).
35. Marcotrigiano, Vincenzo, Carola Lanzilotti, Osvalda De Giglio, Giuseppina Caggiano *et al.* “Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) ed implicazioni normative in ambito di Sanità Pubblica alla luce degli ultimi eventi epidemici in Europa”. *Igiene e Sanità Pubblica* (2015 Jan) Vol. 71, No. 4: 419-432.
36. Monteiro, Ricardo, Valentin Ageorges, Maricarmen Rojas-Lopez, Herbert Schmidt *et al.* “A secretome view of colonisation factors in Shiga toxin-encoding *Escherichia coli* (STEC): from enterohaemorrhagic *E. coli* (EHEC) to related enteropathotypes”. *FEMS Microbiology Letters* (2016 Aug) Vol. 363, No. 16, fnw179. doi:10.1093/femsle/fnw179.
37. Franzin, Fernanda M. and Marcelo P. Sircili. “Locus of enterocyte effacement: a pathogenicity island involved in the virulence of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* subjected to a complex network of gene regulation”. *Bio Med Research International* (2015 Feb): 534738. doi:10.1155/2015/534738.
38. Montero, David A., Juliana Velasco, Felipe Del Canto, Jose L. Puente *et al.* “Locus of Adhesion and Autoaggregation (LAA), a pathogenicity island present in emerging Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains”. *Scientific Reports* (2017 Aug), Vol. 7. doi:10.1038/s41598-017-06999-y.

39. Casas, Veronica, Gerico Sobrepeña, Beltran Rodriguez-Mueller, Justine AhTye and Stanley R. Maloy. "Bacteriophage-encoded Shiga toxin gene in atypical bacterial host". *Gut Pathogens* (2011 Jul) Vol. 3: 10. doi:10.1186/1757-4749-3-10.
40. Iversen, Hildegunn, Trine M. L'Abée-Lund, Marina Aspholm, Lotte P. S. Arnesen and Toril Lindbäck. "Commensal *E. coli* Stx2 lysogens produce high levels of phages after spontaneous prophage induction". *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology* (2015 Feb) Vol. 5, No. 5. doi:10.3389/fcimb.2015.00005.
41. European Food Safety Authority. "Shiga toxin-producing *E. Coli* (STEC) O104:H4 2011 outbreaks in Europe: Taking Stock". *EFSA Journal* (2011 Oct) Vol. 9, No. 10:2390. doi:10.2903/j.efsa.2011.2390.
42. Frank, Christina, Dirk Werber, Jakob P. Cramer, Mona Askar *et al.* "Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 outbreak in Germany. *The New England journal of medicine* (2011 Nov) Vol. 365: 1771-1780. doi:10.1056/NEJMoa1106483.
43. Messens W., Bolton D., Frankel G. *et al.* "Defining pathogenic verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) from cases of human infection in the European Union, 2007-2010". *Epidemiology and Infection* (2015 Jun) Vol. 143, No. 8: 1652-1661. doi:10.1017/S095026881400137X.
44. Regolamento (CE) n. 2073/2005 della Commissione, del 15 novembre 2005, sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari.
45. Regolamento (UE) n. 209/2013 della Commissione, dell'11 marzo 2013, che modifica il regolamento (CE) n. 2073/2005 per quanto riguarda i criteri microbiologici applicabili ai germogli e le norme di campionamento per le carcasse di pollame e la carne fresca di pollame.

46. European Food Safety Authority/European Centre for Disease Prevention and Control (EFSA/ECDC). “The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017”. *EFSA Journal* (2018) Vol. 16, No.12: 5500. doi:10.2903/j.efsa.2018.5500.
47. UNI CEN ISO/TS 13136:2013 “Microbiology of food and animal feed.- Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens.-Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups.”
48. Bellio, Alberto, Bianchi Daniela Manila, Vitale Nicoletta, Verneti Luca, Gallina Silvia e Decastelli Lucia “Behaviour of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and ripening of Fontina Protected Designation of Origin cheese”. *Journal of Dairy Science* (2018 Jun) Vol. 101, No. 6:4962-4970. doi:10.3168/jds.2017-13458.
49. Vernozy-Rozand, Christine, Mazuy-Cruchaudet C., Bavai C., Montet M. P. *et al.* “Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and ripening of raw goat milk lactic cheeses”. *International Journal of Food Microbiology* (2005 Nov) Vol. 105, No. 1: 83-88. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2005.05.005.
50. D’Amico, Dennis J., Marc J. Druart and Catherine W. Donnelly. “Behavior of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and aging of Gouda and stirred-curd Cheddar cheeses manufactured from raw milk”. *Journal of Food Protection* (2010 Dec) Vol. 73, No. 12: 2217-2224. doi:10.4315/0362-028X-73.12.2217.

51. Schlessner J. E., Gerdes R., Ravishankar S., Madsen K. Et al. “Survival of a five-strain cocktail of *Escherichia coli* O157:H7 during the 60-day aging period of cheddar cheese made from unpasteurized milk”. *Journal of Food Protection* (2006 May) Vol. 69, No. 5: 990-998. doi:10.4315/0362-028X-69.5.990.
52. ISO 7218:2007 “Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations”
53. Istituto Superiore di Sanità/EU Reference Laboratory for *E. coli*. *Report of 12th inter-laboratory study on the detection of VTEC and other pathogenic E. coli in sprout samples – 2013*. http://old.iss.it/binary/vtec/cont/PT12_Report.it
54. Vimont, Antoine, M. -L. Delignette-Muller and C. Vernozy-Rozand. “Supplementation of enrichment broths by novobiocin for detecting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from food: a controversial use”. *Letters in Applied Microbiology* (2006 Nov) Vol. 44. No. 3: 326-331. doi:10.1111/j.1472-765X.2006.02059.x.
55. ISO 22119:2011 “Microbiology of food and animal feeding stuffs. Real-Time polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens. General requirements and definitions”.
56. Ministero della Salute. Circolare DGISAN 0022703-A-31/05/2017. “Linee guida sull’applicazione dell’art. 14 del Regolamento (CE) 178/2002 nel caso di alimenti contaminati da *Escherichia coli*”.
57. ISO 16649-2:2001 “Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of β -glucuronidase-positive *Escherichia coli*. Part 2: Colony-count technique at 44°C using 5-bromo-chloro-3-indolyl β -D-glucuronide”.

58. Marozzi, Selene, Paola De Santis, Sarah Lovari, Roberto Condoleo *et al.* “Prevalence and molecular characterisation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in raw milk cheeses from Lazio region, Italy”. *Italian journal of food safety* (2016 Jan) Vol. 5. No. 1: 4566. doi:10.4081/ijfs.2016.4566.
59. Trevisani, Marcello, Rocco Mancusi, G. Delle Donne, C. Bacci *et al.* “Detection of Shiga toxin (Stx)-producing *Escherichia coli* (STEC) in bovine dairy herds in Northern Italy”. *International Journal of Food Microbiology* (2014 Aug) Vol. 184: 45-49. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2013.12.033.
60. Elhadidy M. and M. A. Mohammed. “Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from raw milk cheese in Egypt: prevalence, molecular characterization and survival to stress conditions”. *Letters in Applied Microbiology* (2013 Feb) Vol. 56, No. 2:120-127. doi:10.1111/lam.12023.
61. Mohammadi, Pantea, Ramin Abiri, Mansour Rezaei and Siavosh Salmanzadeh-Ahrabi. “Isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from raw milk in Kermanshah, Iran”. *Iranian journal of Microbiology* (2013 Sep) Vol.5, No.3:233-238. PMID: PMC3895560.
62. Stephan R., S. Schumacher, S. Corti, G. Krause, J. Danuser and L. Beutin. “Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in Swiss raw milk cheeses collected at producer level”. *Journal of dairy science* (2008 Jul) Vol. 91, No. 7: 2561-2565. doi:10.3168/jds.2008-1055.
63. Ö Öksüz, M. Arici, S. Kurultay and T. Gümüş. “Incidence of *Escherichia coli* O157 in raw milk and white pickled cheese manufactured from raw milk in Turkey”. *Food Control* (2004 Sep) Vol. 15, No. 6: 453-456. doi:10.1016/S0956-7135(03)00121-X.

64. Krüger, Alejandra and Paula M. A. Lucchesi. “Shiga toxins and stx phages: highly diverse entities”. *Microbiology* (2015 Mar) Vol. 161 (Pt 3): 451-462. doi:10.1099/mic.0.000003.
65. Douëllou, Thomas, Sabine Delannoy, Sarah Ganet *et al.* “Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from dairy products – Genetic diversity and virulence gene profiles”. *International Journal of Food Microbiology* (2016 Sep) Vol. 232: 52-62. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.04.032.
66. Farrokh, Choreh, Kieran Jordan, Frederic Auvray, Kathleen Glass *et al.* “Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production” *International Journal of Food Microbiology* (2013 Mar) Vol. 162, No. 2: 190-212. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2012.08.008.
67. Senthakumaran, Thulasika, Lin Torstensen Brandal, Bjørn-Arne Lindstedt *et al.* “Implications of *stx* loss for clinical diagnostics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*”. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* (2018 Sep) Vol.37:2361-2370. doi:10.1007/s10096-018-3384-6.
68. Mellmann, Alexander, Shan Lu, Helge Karch *et al.* “Recycling of Shiga toxin 2 genes in sorbitol-fermenting Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:NM”. *Applied and Environmental Microbiology* (2008 Jan) Vol. 74, No. 1:67-72. doi:10.1128/AEM.01906-07.
69. Bonanno, Ludivine, Benjamin Delubac, Valérie Michel and Frédéric Auvray. “Influence of stress factors related to cheese-making process and to STEC detection procedure on the induction of Stx phages from STEC O26:H11”. *Frontiers in Microbiology* (2017 March) Vol. 8, No. 296. doi:10.3389/fmicb.2017.00296.

7. Ringraziamenti

Innanzitutto, vorrei ringraziare la mia Prof.ssa Sara Agata Caterina Scutera per aver accettato di lavorare alla mia tesi.

Un cordiale ringraziamento va anche alla Dott.ssa Maria Francesca Borney, biologa del laboratorio di Microbiologia dell'Arpa VdA, per avermi permesso di terminare la mia carriera universitaria con questa bellissima esperienza, e per la pazienza e l'appoggio datomi durante il lavoro della tesi. Insieme a lei tutto il personale del laboratorio, in particolar modo Livia Mobili, Daniela De Lorenzi, Joëlle Bryer e Nicole Martinet per gli insegnamenti, la cortesia e la simpatia durante il periodo di tirocinio.

Dopodiché, un caloroso ringraziamento va alle amiche dell'università, Clara, Ilaria, Caterina, Veronica, Diana, Maria, che hanno condiviso con me questi tre anni ed in particolare Serena, amica e compagna di viaggio, con cui si è creato un legame molto speciale.

Grazie di cuore a tutti i miei più cari amici. Per prime Sophie, Eleonora, Chiara ed Erika, che saranno sempre nella mia vita, ed in seguito Anna, Luna, Maya, Cosimo, Andrea e tutti gli altri che non ho nominato ma che ci sono stati in tutto questo periodo.

Un affettuoso ringraziamento a tutta la mia famiglia, mamma e papà, che mi hanno permesso di vivere a pieno questa esperienza, ai miei fratelli Davide ed Edoardo, ai nonni e agli zii che mi sono sempre stati vicini e mi vogliono bene.

Infine, ma non meno importante, un immenso grazie al mio fidanzato Fabio che mi ha sopportata e supportata, con molta pazienza, nei momenti belli e brutti di questi tre anni, sostenendomi sempre.

Alessandra Termine