

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA

Facoltà di Medicina Veterinaria  
Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale  
Servizio di Prova di Igiene e Tecnologie Alimentare

---

DOTTORATO DI RICERCA IN  
“SCIENZE DEGLI ALIMENTI, NUTRIZIONE ANIMALE  
E SICUREZZA ALIMENTARE – SANASA”  
XXIII ciclo - VET/04

SVILUPPO DI METODI PER LA RICERCA DI  
VTEC NON-O157 ED INDAGINI SULLA PREVA-  
LENZA DI *ESCHERICHIA COLI* PRODUTTORI DI  
SHIGA-TOSSINE IN ALLEVAMENTI BOVI-  
NI, CARNI E LATTE

Coordinatore:  
Chiar.mo Prof. ROBERTO ROSMINI

Tesi di Dottorato di:  
Dott. GIUSEPPE DELLE DONNE

Docente Guida:  
Chiar.mo Prof. MARCELLO TREVISANI

---

**Esame finale anno 2011**

<b>Introduzione alla ricerca .....</b>	<b>4</b>
<b>INTRODUZIONE AI VTEC .....</b>	<b>6</b>
<b>ESCHERICHIA COLI E FATTORI DI VIRULENZA .....</b>	<b>7</b>
<b>BATTERIOFAGI.....</b>	<b>18</b>
<b>MATERIALI E METODI PER ISOLAMENTO VTEC.....</b>	<b>21</b>
<b>MODIFICHE AL PROTOCOLLO DI RICERCA .....</b>	<b>23</b>
<b>ISOLAMENTO COLONIE.....</b>	<b>25</b>
<b>PROVE INTERLABORATORIO .....</b>	<b>29</b>
<b>APPLICAZIONE METODOLOGICHE PER LA RICERCA E CARATTERIZZAZIONE DI FAGI STX2 .....</b>	<b>30</b>
<b>Materiali e metodi per ricerca/caratterizzazione fago stx2.....</b>	<b>30</b>
<b>Metodo per isolare i fagi temperati e preparare un lisato fagico:.....</b>	<b>31</b>
<b>Metodo per la produzione di lisogeni partendo da colture recettive e lisato fagico (huèsped test).....</b>	<b>32</b>
<b>Metodo per estrazione e purificazione del DNA fagico.....</b>	<b>32</b>
<b>Metodo di analisi con RFLP e Southern-blot.....</b>	<b>33</b>
<b>MODIFICA E TRASFERIMENTO DEL GENE FAGICO IN CEPPLO TRASPORTATORE .....</b>	<b>34</b>
<b>Modifica Gene fagico .....</b>	<b>34</b>
<b>Trasporto in ceppo carrier .....</b>	<b>35</b>
<b>Prova di lisogenia da fago <math>\phi</math>stx2<math>\Delta</math>Cm .....</b>	<b>37</b>
<b>RISULTATI.....</b>	<b>39</b>
<b>RISULTATI RICERCA CEPPI VTEC.....</b>	<b>39</b>
<b>ANALISI DEI CEPPI PER RICERCA FAGO STX2 .....</b>	<b>42</b>
<b>RISULTATO CEPPI ISOLATI .....</b>	<b>48</b>
<b>PUBBLICAZIONI INERENTI LA RICERCA SU E. COLI:.....</b>	<b>56</b>
<b>QUINOLONE AND BETA-LACTAM-RESITENCE IN ESCHERICHIA COLI FROM DANISH AND ITALIAN BROILER FLOCK. BOTOLAIA V., TREVISANI M., GUARDABASSI L. BRISGAARD M, VENTURI L. DELLE DONNE G. BOJESEN A.M., A.I.V.I. RIVISTA DELL'ASSOCIAZIONE ITALIANA VETERINARI IGIENISTI, VOL 3.1/09, 35-37. ....</b>	<b>56</b>
<b>PREVALENZA DI ESCHERICHIA COLI PRODUTTORI DI VEROCITOTOSSINE IN BOVINI MACELLATI IN EMILIA-ROMAGNA. G. DELLE DONNE, M. TREVISANI. ATTI IV WORKSHOP EPIDEMIOLOGIA VETERINARIA. ROMA DIC. 2008 ISTISAN 08/C12 ISSN 0393-5620 .....</b>	<b>56</b>
<b>PRESENZA DI COLIFAGI-STX2 IN CEPPI DI ESCHERICHIA COLI ISOLATI DA CAMPIONI DI PELLE BOVINA E FILTRI DI LATTE” / “DETECTION OF Stx2 COLIPHAGES IN STRAIN OF ESCHERICHIA COLI ISOLATED FROM BOVINE FLEECE AND MILK FILTERS” DELLE DONNE G., MANCUSI R., TREVISANI M. XX CONVEGNO NAZIONALE A.I.V.I. (ASSOCIAZIONE ITALIANA VETERINARI IGIENISTI). GIUGNO 2010.- IN PUBBLICAZIONE SU RIVISTA AIVI DI LUGLIO 2011. ....</b>	<b>56</b>

“PROVE DI LISOGENIA CON VIRUS BATTERIOFAGI VETTORI DEL GENE *STX2* IN CEPPI ENTEROPATOGENI DI *ESCHERICHIA COLI* ISOLATI DA ALIMENTI” *DELLE DONNE G., MANCUSI R., TREVISANI M. ATTI SIDILV – GENOVA OTTOBRE 2010*. ..... 56

**ALTRE RICERCHE EFFETTUATE..... 57**

**BIBLIOGRAFIA..... 60**

## **Introduzione alla ricerca**

Nell'anno 2007 è stato chiesto un parere scientifico all'EFSA (26) in merito alla identificazione di ceppi e i sierotipi VTEC che sono patogeni per l'uomo. Questa richiesta è stata fatta per dare un'indicazione chiara sui metodi di analisi e di conferma da utilizzare nei paesi dell'Unione Europea per le attività di controllo e, in particolare, per monitorare la prevalenza della contaminazione in campioni animali e di alimenti.. Il gruppo BIOHAZ ha concluso che vi è un'ampia varietà di stipti di *Escherichia coli* produttori di verocitotossine, ma solo una serie limitata di sierotipi (cioè O157, seguito da O26, O103, O91, O145 e O111) sono stati associati a casi o focolai di malattia nell'uomo e, anche sulla base delle conoscenze sui fattori di virulenza, sono stati ritenuti pericolosi per la salute pubblica. I principali fattori di virulenza (a livello genetico) individuati per i VTEC patogeni per l'uomo sono: vtx1, vtx2, vtx2c ed eae.

Non vi è alcun protocollo standard per il conteggio di VTEC O157 o di altri sierotipi di VTEC nei campioni alimentari o ambientali e tali metodi quantitativi dovrebbero essere sviluppati. Infatti il conteggio di VTEC non è generalmente fatto nell'ambito del monitoraggio di routine, anche se dati quantitativi sono essenziali per valutare il rischio. L'isolamento di VTEC e la successiva caratterizzazione del ceppo è necessaria al fine di verificare che i diversi fattori di virulenza (i geni individuati) sono presenti in uno stesso stipte isolato. Nel documento EFSA del 2007 (26) il gruppo di esperti del panel BIOHAZ ha raccomandato che, inizialmente, il monitoraggio si dovrebbe concentrare sul sierotipo VTEC O157 poiché questo è quello più frequentemente associato nell'Unione Europea a gravi complicanze extraintestinali, caratterizzate dalla manifestazione di una sindrome emolitico uremica (SEU). Il monitoraggio dovrebbe poi essere esteso anche ad altri sierotipi (O26, O103, O91, O145 e O111) che sono stati identificati analizzando i dati europei forniti dagli stati membri, i più frequentemente riscontrati quali causa di infezioni umane.

Su queste premesse è continuato un lavoro di ricerca finalizzato alla valutazione della prevalenza dei VTEC nella popolazione bovina e in alimenti da essi ottenuta, seppur regionalizzati alla sola Emilia Romagna. Il progetto di ricerca è stato

sviluppato nel 2006, prima che fossero definiti i sierotipi VTEC di prevalente interesse per la salute pubblica. Volendo raccogliere dati sulla presenza e prevalenza di VTEC O157 e non O157 in campioni animali e matrici alimentari di origine bovina è stato utilizzato uno screening delle colonie isolate ottenute da colture selettive, mediante l'impiego di sonde DNA (5, 9, 16, 17). Oltre alla valutazione della prevalenza effettiva dei VTEC, e non solo del sierotipo O157, si è cercato di ottenere isolati dai campioni positivi allo screening per poi caratterizzarli. Per l'isolamento degli eventuali *stx*-positivi sono state usate metodiche di ibridazione del DNA batterico su membrana per aumentare la possibilità di isolamento.

Nel 2009, l'EFSA ha pubblicato, dopo una serie di consultazioni con esperti, le linee guida per la raccolta di dati concernenti la prevalenza di *Escherichia coli* dal titolo “*Specifiche tecniche per il monitoraggio e la segnalazione dell'Escherichia coli verocitotossico (VTEC) sugli animali e sugli alimenti (indagini sul VTEC negli animali e negli alimenti)*” (27). In seguito alla pubblicazione di questo documento alla applicazione del protocollo ricerca con screening PCR e impiego della tecnica d'ibridazione con sonde DNA specifiche per i geni VT1 e VT2, è stata applicata anche la metodica dell'immunoseparazione magnetica. L'applicazione metodologica dell'immunoseparazione, già validata per la ricerca di *Escherichia coli* O157:H7 in matrici alimentari (34) si è peraltro rivelata necessaria per aumentare la sensibilità della ricerca, poiché una limitazione importante si è rivelata essere la concentrazione relativamente alta delle flora microbica aspecifica (malgrado l'impiego di terreni di arricchimento e d'isolamento selettivi) che richiede una diluizione del campione. Nell'ambito del progetto di ricerca VTEC è stata inoltre valutata la presenza di batteriofagi di tipo lambdoide codificanti il gene *stx2* (45). Questa parte della ricerca è stata fatta in parte presso il Dipartimento di microbiologia dell'Università di Barcellona. L'applicazione di metodi di ricombinazione genica ci ha permesso di valutare la capacità infettiva e patogena (espressione genica) dei ceppi EPEC modificati con l'inserimento del gene VT2 di origine fagica.

## ***Introduzione ai VTEC***

La presenza di *Escherichia coli* produttori di Shiga-tossine negli allevamenti di bovini da carne e da latte è un problema rilevante per la sicurezza alimentare poiché la contaminazione diretta o crociata di prodotti alimentari non sottoposti a trattamenti termici prima del consumo si è dimostrata responsabile di molti casi di grave malattia alimentare (78). Anche in Italia sono stati raccolti dati parziali che dimostrano la presenza di ceppi VTEC, di rilevante significato per la salute umana, in allevamenti di bovini da latte e da carne (3, 10, 20, 21,56). Tra i fattori che hanno influito sull'evoluzione della virulenza di questi batteri si ritiene abbiano un ruolo rilevante i virus batteriofagi di tipo lambda in grado di veicolare geni che codificano la produzione di shigatossina 2 (*Stx2*). I batteriofagi lambda *StxII* possono infettare alcuni ceppi di *Escherichia coli*, inducendo un ciclo lisogeno ed integrando il gene che codifica la produzione di verocitotossina nel genoma del batterio. Se il ceppo ricombinante è un *Escherichia coli* enteropatogeno, che già possiede cioè i geni *eae* o *saa* che codificano le intimine, responsabili dell'adesione batterica ai villi intestinali, l'acquisizione della capacità di produrre verocitotossina rende il ceppo estremamente pericoloso per l'uomo. Fanno eccezione alcune varianti (*Stx2e* ed *Stx2f*) per le quali nella specie umana non ci sono recettori cellulari a livello degli endoteli vascolari e dell'epitelio dei villi intestinali. E' possibile isolare dalla carne e dal latte bovino ceppi enteropatogeni dei sierotipi O157 e O26 che si dimostrano non verocitotossici (20). E' pertanto importante verificare se i ceppi non verocitotossici possano essere infettati dai batteriofagi vettori del gene *Stx2*, poiché la conferma della loro recettività e della stabilità del fago nell'ospite batterico avrebbe una notevole rilevanza per la sanità pubblica. Questo comporta, infatti, che il ceppo acquisirebbe la capacità di produrre verocitotossine. E' anche necessario verificare se l'integrazione del gene *Stx2* nei ceppi lisogeni avviene nella regione prossima al gene *rho*, poiché recenti studi (47, 63) mostrano che solo se integrato in tale regione il gene *Stx2* viene espresso e dà luogo alla produzione della tossina.

## ***Escherichia coli* e fattori di virulenza**

*Escherichia coli* è stato descritto per la prima volta nel 1885 da Theodor Escherich con il nome di *Bacterium coli*. Il microorganismo è un bastoncello gram-negativo, aerobio ed anaerobio facoltativo, non sporigeno. Le sue dimensioni medie sono di 3 x 0,5 micron con lunghezza molto variabile, anche la morfologia varia da forme coccoidi a filamentose. Fa parte della famiglia delle *Enterobacteriaceae* ed è inserito nel gruppo dei coliformi (57).

Secondo la tradizionale classificazione, la specie produce indolo in terreni al triptofano ed è lattosio-fermentante, distinguendosi dai coliformi non termotolleranti per la crescita alla temperatura di 44°C. Cresce con facilità nei terreni di coltura selettivi (agar desossicolato-eltrato, eosina-blu di metilene). Ai fini identificativi possono essere utili i terreni differenziali quali il MacConkey che permette di discriminare i ceppi fermentanti il lattosio da quelli privi di  $\beta$ -galattosidasi (57)

Nell'ambito del gruppo dei coliformi, *Escherichia coli* è ospite abituale ed è in esclusivo rapporto con il tratto gastrointestinale dell'uomo e degli animali a sangue caldo, a differenza dei microrganismi di origine non necessariamente fecale, appartenenti ai generi *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Citrobacter* e alle tante specie di coliformi psicrotrofi, che si caratterizzano per uno spiccato potenziale di ricrescita una volta pervenuti nell'ambiente. La patogenicità degli enterobatteri è strettamente legata alla struttura antigenica della parete cellulare studiata nel 1947 da Kauffman; per la differenziazione dei ceppi di *Escherichia coli* sono studiate le tre categorie principali di antigeni, l'antigene K, di natura polisaccaridica, che circonda il germe; l'antigene somatico O, di natura polisaccaridica, identificabile con l'endotossina la cui parte attiva è di natura lipidica (lipide A); gli antigeni proteici H, flagellari.

Questa classificazione è utile per lo studio della patogenesi di *Escherichia coli* in quanto permette una distinzione tra ceppi patogeni e ceppi innocui; infatti anche se esistono una gran varietà di sierotipi (combinazioni O: H: K) solo alcuni sono stati associati ai ceppi patogeni.

Quando si esegue una distinzione degli *E. coli* solo a livello antigenico occorre ricordare la teoria sull'evoluzione dell'acquisizione della virulenza a partire dal

ceppo O55 al ceppo O157:H7 sorbitolo negativo e VT+ ( 68). Secondo l'autore un ceppo O55:H7 enteropatogeno è il ceppo ancestrale da cui sono originate nell'evoluzione le varinanti antigeniche del ceppo O157:H7, responsabile delle maggior parte dei focolai di malattia alimentare complicati dalla manifestazione della SEU. I ceppi O157:H7 e O55:H7 hanno infatti una correlazione nei locus cromosomici del 95%; la similarità genetica è dimostrata non solo dalla correlazione genetica, ma anche dall'espletamento della stessa azione patogena a livello di colture cellulari. La tesi della correlazione tra la variante O157 e O55 di Whittam ( 68) è dimostrata da un lavoro di Zhou ( 72). Il lavoro, dimostra come all'analisi cromosomale le mutazioni avvenute in ceppi di O157, quali quelli definiti come ceppi di riferimento EDL933 e ceppo Sakai, differiscono minimamente dal ceppo in analisi di O55: H7 (Figura 1) denominato CB9615; oltre all'analisi cromosomale occorre ricordare come la stretta correlazione a livello filogenetico possa far pensare a mutazione di ceppi enteropatogeni in ceppi enteromorragici (Figura 2).

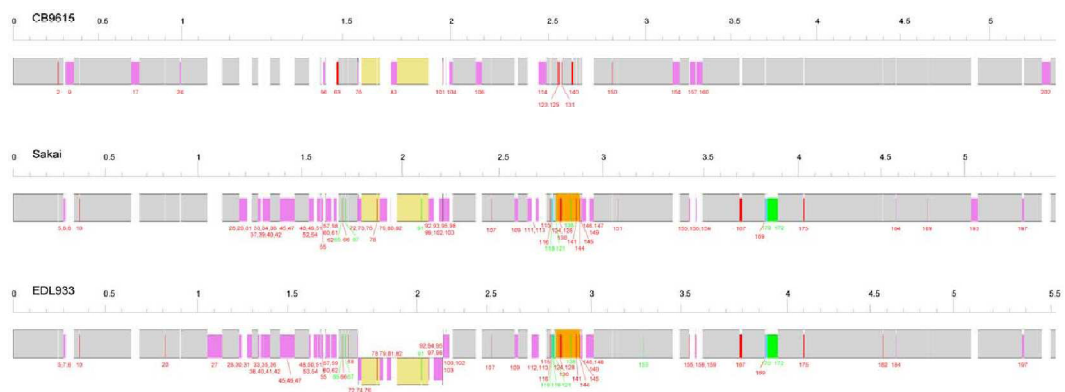


Figura 1 Alignment of the genomes of CB9615, Sakai and EDL933. Scales are Mbp. The grey and yellow shaded regions represent segments present in all strains, with inverted segments shaded in yellow. Purple and cyan boxes within the grey or yellow regions represent the indels of phages or phage-like elements (insertions and deletions respectively). Red and green boxes represent other major indels (insertions and deletions respectively) that involve changes in the gene. The orange boxes indicate the *E. coli* O157:H7 O-antigen segment gained by recombination.

Tratto da doi:10.1371/journal.pone.0008700.g001 (73)



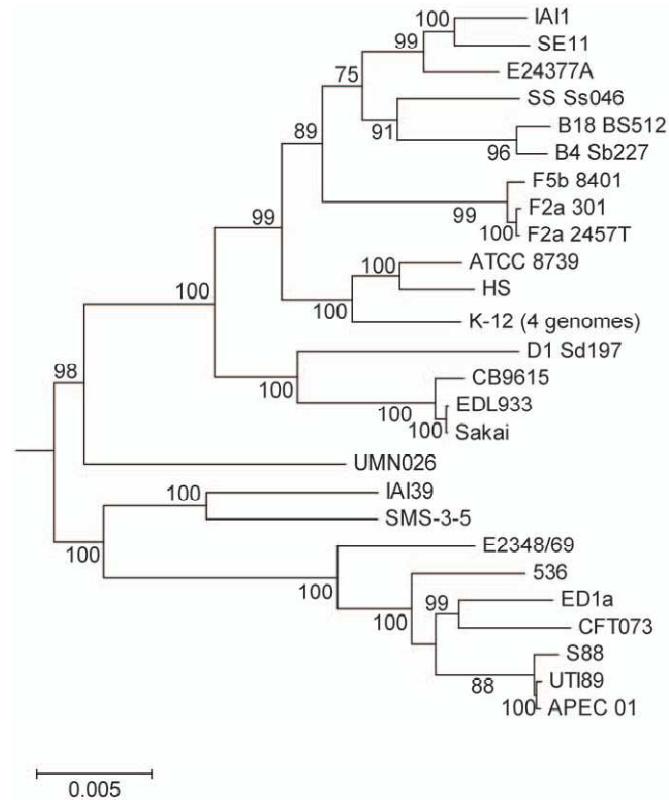


Figura 2 Maximum likelihood phylogenetic tree of 26 *Escherichia coli* and *Shigella* strains. The phylogenetic tree of the *Escherichia* core genome genes was constructed from the concatenated alignments of the 2034 genes in the core genome of the *E. coli*/*Shigella* genomes. The closely related species, *E. fergusonii* (CU928158), was chosen to root the tree.  
 Tratto da doi:10.1371/journal.pone.0008700.g003 (73)

Attualmente si conoscono 173 antigeni O (da O1 a O181), 72 antigeni K (da K1 a K103) e 53 Antigeni H (da H1 a H57). La determinazione degli antigeni O e H è realizzata mediante metodi di agglutinazione, associata anche a metodi di PCR mentre l'antigene K è identificato tramite la fluorescenza.

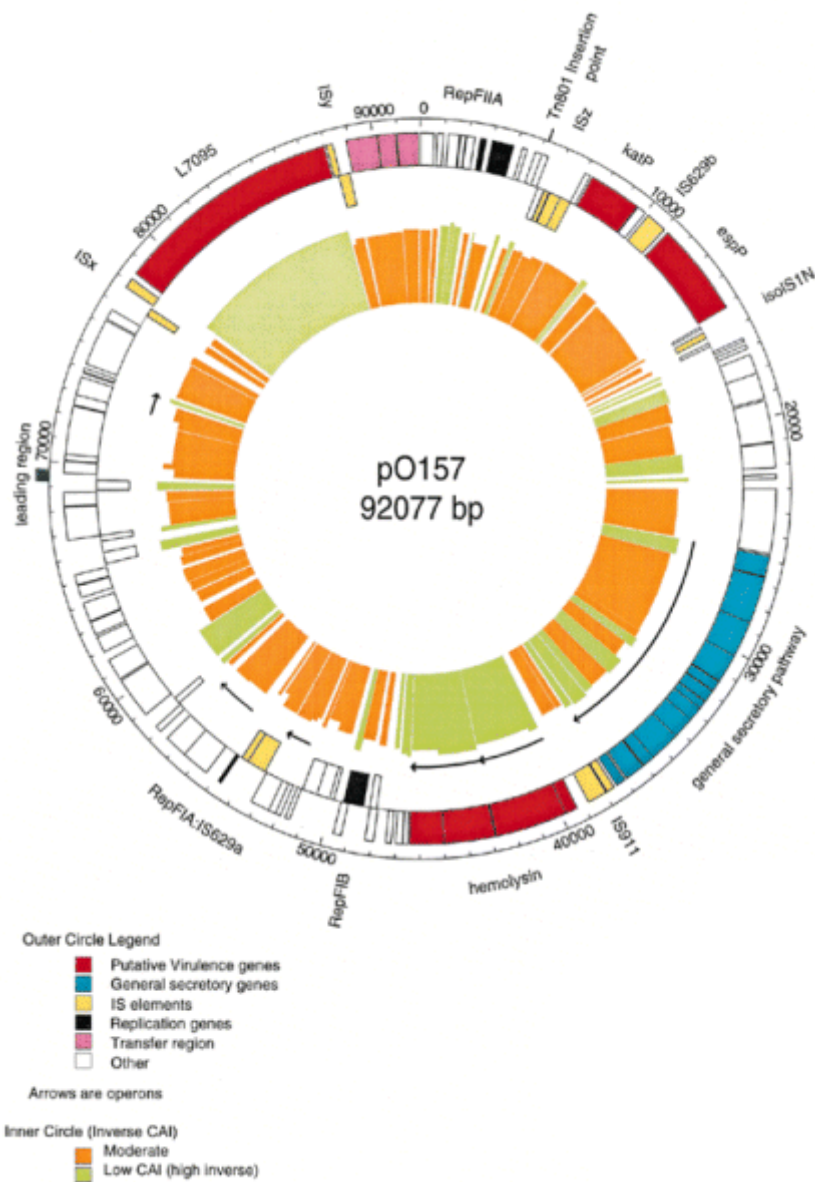
Esistono differenti ceppi di *Escherichia coli* responsabili di diverse manifestazioni cliniche, ovvero d'infezioni del tratto urinario, setticemia/meningite e enteriti. Le malattie di origine alimentare causate da *Escherichia coli* sono correlate alla presenza di particolari ceppi dotati di specifici fattori di virulenza. Le diverse manifestazioni delle infezioni enteriche sono pertanto riferibili alla presenza di ceppi entero-adesivi (EAEC), entero-invasivi (EIEC), entero-patogeni EPEC), entero-tossigenici (ETEC) e entero-emorragici (EHEC) (49) ma di questi hanno particolare rilevanza, in quanto zoonosi, le infezioni dai ceppi entero-emorragici (EHEC) causanti oltre a fenomeni diarroici anche due sindromi generalizzate definite Co-

lite Emorragica (CE, acronimo inglese EH) e Sindrome Emolitico Uremica (SEU, acronimo inglese HUS); i ceppi appartenenti a questa categoria svolgono tale azione patogena in quanto geneticamente presentano fattori di patogenicità codificanti quelle tossine definite verocitotossine o shigatossine (*Vt* o *stx*), pertanto prendono anche il nome di *Escherichia coli verocitotossici* (VTEC o STEC).

Gli *E. coli* enteroemorragici (EHEC) sono produttori di una tossina citotossica simile a quella sintetizzata da microrganismo *Shigella* che inibisce la sintesi proteica. Dopo un'iniziale fase di adesione del germe alla mucosa, la tossina determina una vera e propria colite emorragica non accompagnata da febbre. L'eventuale passaggio in circolo della tossina può determinare la sindrome emolitico-uremica in quanto il target della tossina è l'endotelio vascolare renale con conseguente danno, il più delle volte irreversibile, causa di morte o perdita della funzionalità renale. Il danno organico è determinato dalle verocitotossine (VT1 e VT2) o shiga-like toxins (*Stx1* e *Stx2*) codificate dai profagi (16).

Esistono almeno cento sierotipi di *E. coli* produttori di Shiga tossina (STEC) (49) ma tra questi solo alcuni sierotipi, quali i più noti O157, O26, O103 ed O111, sono stati associati a malattia umana (53) e svariati ceppi di STEC, seppur isolati da bovini e alimenti, non sono stati associati a casi di malattia nell'uomo (34, 62).

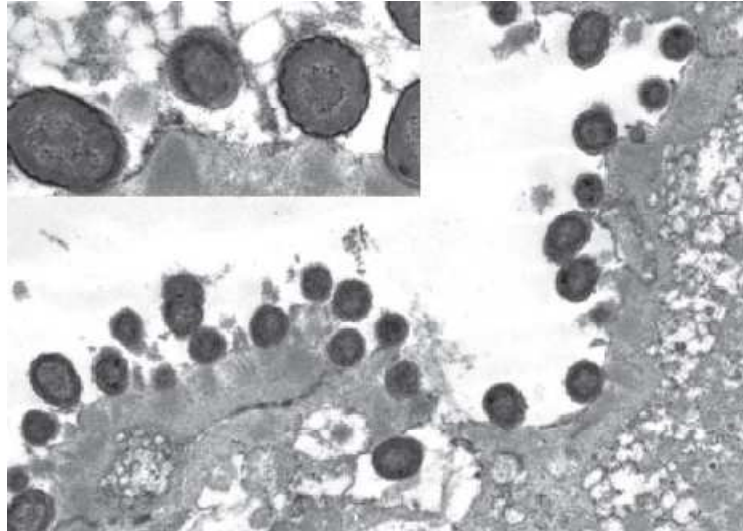
La maggioranza dei ceppi *E. coli* O157, O26 ed O111 isolati in casi di infezioni umane presentano un plasmide, denominato *pO157* di 60 MDa codificante fattori di virulenza (13) come da Figura 3 (67). Alcuni ceppi possono anche contenere un plasmide di 6-7 kb associato al fenotipo produttore colicine (38, 46). Sul plasmide *pO157* si ritrovano geni codificanti *eae*, *tir*, *esp* e *sep* che sono indicatori di patogenicità del ceppo definendo in questo modo un patotipo (39).



**Figura 3** Plasmide pO157 Tratto da (*E. coli* Genome Project Wisconsin-Madison, 2011)

I ceppi VTEC presentano caratteristiche patogenetiche simili a quelle di altri batteri enteropatogeni. La patogenesi consiste in un sistema “multi step”, che prevede la colonizzazione della mucosa, l’evasione delle difese dell’ospite, la moltiplicazione e il danno locale o sistemico. Tutti i ceppi patogeni di *E. coli* colonizzano l’epitelio rimanendo extracellulari, come nella (Figura 4 tratta da Foster 2008 (37), con l’eccezione dei ceppi dei ceppi *E. coli* entero-invasivi (EIEC) che riescono a penetrare e replicare nelle cellule epiteliali e nei macrofagi. I ceppi VTEC non invadono le cellule epiteliali dell’intestino, ma aderiscono intimamente a que-

ste producendo una lesione conosciuta come “attaching and effacing” (A/E). La lesione A/E è dovuta a profondi cambiamenti del citoscheletro ed è caratterizzata da protrusione di microvilli. Questi determinano un’intima aderenza tra il batterio e l’enterocita, con accumulo di F-actina ed altri componenti del citoscheletro( 49). Il complesso meccanismo dell’adesione mediante A/E è modulato geneticamente da un PAI (segmento cromosomico) definito come “Locus Enterocyte Effacement” (LEE); il segmento LEE è diviso in differenti regioni genetiche ( 55). In una estremità del segmento sono presenti i gene definiti *EspA*, *EspB* ed *EspD* che codificano le proteine per la trasduzione del segnale e l’attività potogena dell’ A/E. Nell’altra estremità i segmenti genetici codificanti il TTSS (sistema secretivo di tipo III) che trasporta esternamente le molecole effettrici inclusi prodotti della codifica dei geni *EspA*, *B* e *D* la cui funzione è una parte del TTSS; un terzo segmento contiene i segmenti genetici definiti *eae*, codificante l’intimina ovvero una proteina di membrana, e il *Tir*, “translocated intimin receptor”che viene trasportato nel citoplasma cellulare mediante il TTSS ( 23) e al quale si aggancia l’intimina ( 36).L’intimina, che media l’adesione tra enterocita e cellula batterica, viene codificata da un segmento genetico denominato *eae*. Basandosi su differenze genomiche, ne sono state identificate e classificate diverse, denominate con nomenclatura basata sull’alfabeto greco, in intimina  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\epsilon$  e  $\gamma$  ( 2). L’intimina  $\alpha$  generalmente è trovata negli EPEC, mentre  $\epsilon$  e  $\gamma$  sono generalmente associate agli EHEC: il tipo  $\gamma$  è prodotto dai sierogruppi O157, O111 ed O145, mentre il tipo  $\epsilon$  dai sierogruppi O 103 ed O121. L’intimina  $\beta$  può essere trovata sia negli EPEC che negli EHEC, in particolare questo tipo di intimina  $\beta$  è prodotta degli EHEC del sierogruppo O26 ( 72).



**Figura 4.: *Escherichia coli* adesi a mucosa intestinale che hanno causato lesioni dei villi; tratto da Foster 2008 ( 28)**

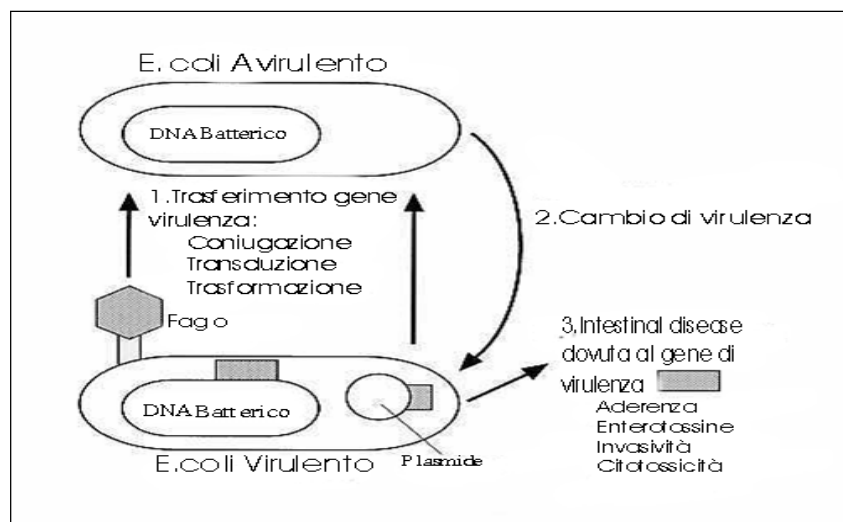
Le verocitotossine o Shiga-like toxin (*Stx*) sono costituite da una subunità enzimatica “A” del peso di 33.000 Dalton, che danneggia l’RNA ribosomiale mediante un’interferenza nel meccanismo di sintesi proteica e da 5/6 subunità “B” del peso di 7.500 Dalton, che è responsabile dell’adesione ai recettori glicoproteici degli enterociti e dell’endotelio vascolare (Gb3 o Gb4) ( 58). Esistono due gruppi di Shiga-like toxin, la *Stx1*, che è omologa antigenicamente e strutturalmente per il 55% alla tossina tipo1 della *S. dysenteriae*, e la *Stx2*. L’informazione genetica per la produzione della *Stx1* e *Stx2* si trova integrato nel cromosoma. Variazioni genomiche determinano differenti varianti di *Stx*, esistono *Stx1c*, *Stx1O48*, *Stx1CB168*, *Stx1OX3* e *Stx2c*, *Stx2d*, *Stx2e*, *Stx2f* e *Stx2g* ( 7, 60).

La *Stx* è prodotta nell’intestino a livello di colon , dopo aver attraversato la parete intestinale, è trasportata dal sangue raggiungendo il rene dove determina un danno all’endotelio inducente occlusione microvascolare. L’effetto è dovuto alla combinazione della tossicità diretta della tossina combinata con la produzione in sede di mediatori, quali citochine e prostaglandine, che determinano necrosi e danno alla funzionalità renale. Il danno si manifesta con la comparsa di una sindrome emolitico uremica (SEU o HUS) caratterizzato da anemia emolitica, trombocitopenia ed insufficienza renale acuta. *Stx* è anche responsabile dei danni locali determinati a

livello di colon, causante una diarrea emorragica, colite emorragica, per un'azione patogena data da necrosi e perforazione intestinale ( 58).

Gli EHEC O157 possiedono un plasmide di 90 Kb nominato pO157, la cui sequenza nucleotidica produce 35 proteine e alcune di queste sono presumibilmente coinvolte nella patogenesi nel caso d'infezione da EHEC ( 13). L'operone *hly* codifica per ORF, necessario per la sintesi e il trasporto dell'enteroemolisina e conferisce agli EHEC il fenotipo enteroemorragici. La presenza dell'operone *hly* è considerata un marker per la presenza del plasmide pO157.

L'analisi del DNA del plasmide *pO157* ha dimostrato che in questo è presente un segmento, omologo a quello di altri batteri, codificante enzima catalasi/perossidasi; il gene *KatP* codifica una proteina di 82-kDa che ha la duplice funzione catalasi-perossidasi ( 11). La funzione dell'enzima nella virulenza dei germi non è tuttavia chiara. Il gene *KatP* è codificato da plasmide, la sua distribuzione nei vari STEC non è omogenea. Buender (12) afferma infatti che è presente solo nel 66% degli *E. coli* O157 isolati, nel 38% dei non-O157 e non è riscontrabile nei ceppi O157 sorbitolo fermentanti. Come per la distribuzione del gene *EspP* anche la distribuzione del *KatP* è in dipendenza del sierotipo ( 60). L'assenza del gene *KatP* nei sierotipo O157 sorbitolo positivo isolato in casi di colite emorragica o sindrome emolitico uremica ( 31) suggerisce che l'enzima catalasi-perossidasi non ha un ruolo fondamentale nella virulenza del ceppo ( 42).



**Figura 5** Esempio di acquisizione/perdita di virulenza modificato da: Medical Microbiology, 4th edition – Capitolo 7, Bacterial Pathogenesis figura 7-2 (66)

## VTEC negli alimenti

Anche se la trasmissione diretta, da persona a persona, è possibile e riveste un ruolo importante nella diffusione dei VTEC, il principale veicolo di trasmissione di questi sono gli alimenti.

Solitamente la contaminazione degli alimenti da parte dei vari ceppi di VTEC è determinata dal contatto con feci contaminate; bisogna tener anche conto della contaminazione fecale delle acque che può diffondere i VTEC.

Il primo caso di tossinfezione provocato da un VTEC O157 avvenne nel 1982 in USA e Canada per il consumo di hamburger poco cotti, successivamente una gran varietà di alimenti, tra cui vegetali, latte non pastorizzato, diversi frutti e succhi sono stati associati a questa infezione (Tabella 1 e 2) (74)

**Tabella 1 Infezioni de *E. coli* O157 (Fonti WHO) (74)**

Finlandia	1997	14 casi	balneazione in lago
Georgia	1998	8 casi	parco acquatico
Inghilterra	1999	>7 casi	festival musicale
Inghilterra	1999	14 casi	balneazione in mare
Washington	1999	32 casi	balneazione in lago
Illinois	1999	329 casi	festa all'aperto
New York	1999	921 casi	fiera (acqua contaminata)
Ontario	1999	125 casi	fiera (contatto con animali)
Washington	2000	5 casi	Zoo (contatto con animali)
Canada	2000	2300 casi	acqua contaminata

**Tabella 2 Epidemie associate a vegetali (Fonte WHO, )(74)**

Giappone	1996	10.000 casi	germogli soia
USA	1996	54 casi	Lattuga
USA	1996	14 casi	succo mela
USA/Canada	1996	70 casi	succo mela
Giappone	1997	96 casi	germogli soia
Michigan	1997	108 casi	germogli soia
Indiana	1998	27 casi	Cavoli
Ohio	1998	30 casi	Cavoli
Oklahoma	1999	7 casi	succo mela
USA	2006	192 casi	spinaci crudi

Con analisi retrospettive, effettuate su alimenti associati a tossinfezioni da VTEC, soprattutto O157, si sono osservati casi di malattia nell'uomo con dosi infettanti basse, minori di 100 UFC. Nella tossinfezione più grave dovuta a consumo di carne macinata bovina, nei lotti sono state contate tra 0,3 e 15 UFC/g di VTEC O157 ( 71).

Principali fonti di contaminazione d'origine animale sono la carne ed il latte bovino non sottoposto a trattamento termico adeguato.

Diversi studi epidemiologici degli ultimi anni mostrano che la maggior parte dei casi di tossinfezione da VTEC O157, si sono avute per consumo di latte crudo ( 18) e per consumo di carni bovine crude o poco cotte. La contaminazione in entrambi i casi si ha nelle fasi di macellazione e in quelle di mungitura. Qualora ciò avvenga, per evitare la tossinfezione, l'unico trattamento utile è il trattamento termico della carne o del latte con temperature al cuore, nel caso della carne, di almeno 68,3°C per più di 40 secondi ( 19).

Dati dimostrano anche che VTEC sopravvive ai processi di fermentazione nella produzione del burro e dello yogurt da latte crudo ( 43).

Oltre la carne bovina ci sono altre segnalazioni di tossinfezioni determinati dal consumo di carni provenienti da selvaggina e contaminate da VTEC ( 22) . Per quanto riguarda le carni ovine, suine, bufaline e di pollame, nonostante il rilevamento di positività in feci e carcasse, non sono mai stati descritti casi d'infezione



determinati dal consumo delle carni di queste specie. Nel 2005 ricercatori italiani ( 30) hanno fatto studi per valutare la prevalenza della contaminazione da VTEC in latte della specie bufalina. Gli autori hanno affermato che il bufalo può essere un reservoir del VTEC con una prevalenza del 14,5% negli animali; hanno affermato che nonostante la prevalenza dei VTEC negli animali, considerando che il latte prodotto dalla specie bufalina è destinato alla caseificazione, che sia il latte bufalino i prodotti derivati non sono a rischio di contaminazione ( 30) .

Oltre ad alimenti d'origine animale sono stati ritenuti causa di casi di malattia anche frutta e ortaggi da consumare crudi. La contaminazione di questi prodotti avviene per contatto con liquami di animali domestici e selvatici nelle diverse fasi colturali, nella raccolta o nella manipolazione. Un ruolo importante nella contaminazione di questi alimenti è svolto dall'acqua d'irrigazione, che facilmente può contaminarsi con feci d'animali portatori o attraverso il contatto con i liquami di aziende zootecniche ( 41). La contaminazione può avvenire anche al momento del consumo, in conseguenza del contatto tra alimenti d'origine animale crudi e alimenti di origine vegetale. Un metodo impiegato per la decontaminazione di verdura e frutta freschi è l'utilizzo di acqua clorata (50-200 ppm) che permette una riduzione di 3 Log della contaminazione superficiale da VTEC ( 8) . Tossinfezioni verificatesi in USA sono state collegate al consumo di germogli di soia ( alfa-alfa sprouts) sviluppati da semi di lotti contaminati ( 22). La contaminazione di queste sementi può essere avvenuta per contatto indiretto con feci di portatori particolarmente nelle fasi di crescita e raccolta della soia. Nella fase di germinazione, l'aumento di temperatura ed umidità necessarie a favorirla, un determinano un incremento considerevole del numero dei batteri.

## ***Batteriofagi***

I batteriofagi o fagi sono dei virus dei batteri e sono stati scoperti da F.W. Twort nel 1915 ( 74) e da F. d'Herelle nel 1917 ( 75) che indipendentemente notarono la dissoluzione di colonie batteriche, la scomparsa della torbidità in brodi di batteri e la formazione di placche di lisi sulle piastre, in quanto molti sono dotati di capacità litica nei confronti degli stessi batteri, anche se la conferma della loro esistenza si è potuta avere solo dopo la scoperta del microscopio elettronico. Sono costituiti da un punto di vista morfologico da una testa, subito sotto la quale è presente il collare, a cui si attacca una coda che presenta alla base una piastra basale con aculei e fibre che sono necessari per l'adesione al batterio. La loro classificazione può essere eseguita seguendo due diversi criteri: uno, classico, tassonomico ed un altro che si basa sul tipo di infezione che il fago provoca. Dal punto di vista tassonomico i fagi sono distinti in virus a:

- dsDNA ( doppio filamento di DNA ) al quale appartengono diverse famiglie: *Myoviridae*, sono gli unici che hanno code contrattili, *Siphoviridae*, *Podoviridae*, Sndv-like viruses, *Lipothrixviridae*, *Corticoviridae*, *Plasmaviridae*, *Tectiviridae*, *Furolloviridae* e *Rudiviridae*. Questi sono virus senza envelope e di questo gruppo fanno parte i fagi più importanti che veicolano i geni per la *stx2*.
- ssDNA ( singolo filamento di DNA ) al quale appartengono le famiglie: *Microviridae*, *Inoviridae*-Plectrovirus ed *Inoviridae*-Inovirus.
- dsRNA ( doppio filamento di RNA ) al quale appartiene una sola famiglia: *Cystoviridae*.
- ssRNA ( singolo filamento di RNA ) al quale appartiene una sola famiglia: *Leviviridae* ( 57, 59).

I geni ed i fattori coinvolti nella infezione fagica di un batterio possono essere classificati in diversi modi: una classificazione funzionale in base a che tipo di prodotti l'espressione del genoma potrà dare; evolucionistica in base alla loro capacità di differenziarsi in molecole; filogenetica che si basa sulla provenienza tassonomica dei geni; metabolica a seconda di come il fago ed i suoi prodotti siano

coinvolti nel metabolismo dell'ospite e genetica in base all'essenzialità delle funzioni codificate dal genoma fagico ( 59).

I batteriofagi provocano : infezioni croniche, pseudo-lisogenia, restrizione ed infezione abortiva, lisi o lisogenia. L'infezione cronica è un ciclo particolare che da origine alla formazione e liberazione di fagi infettanti senza la distruzione della cellula batterica. L'infezione litica è un ciclo produttivo che porta al rilascio di particelle fagiche attraverso la totale distruzione del batterio indotta dal fago stesso. Dopo la replicazione del virus la distruzione avviene attraverso il coinvolgimento di una proteina, l'olina, che fora la parete batterica e consente la fuoriuscita dei virus; esistono anche altri due meccanismi per la fuoriuscita del batteriofago che coinvolgono la produzione di enzimi che inibiscono la sintesi della parete batterica che oppure, conseguentemente all'adesione di più fagi ad un'unica cellula, si ha un indebolimento della parete batterica con conseguente lisi osmotica ( 1). Nell'infezione lisogena c'è la replicazione del genoma virale senza però avere la produzione della progenie. Il batteriofago dopo la penetrazione va ad integrarsi nel genoma batterico e replica ogni qual volta replica il batterio. Il fago integrato prende il nome di profago ed i fagi responsabili di questo fenomeno prendono il nome di fagi temperati. Il tipico fago che presenta questo fenomeno è il fago  $\lambda$  che si inserisce in un punto specifico del genoma batterico grazie a due fasi: il fago individua il punto di inserzione, poi segue una ricombinazione tra le piccole regioni di omologia tra il fago ed il batterio. Anche qui ci sono delle particolarità in quanto è presente un fago  $\mu$  (mu) che si inserisce in qualsiasi punto del genoma batterico provocando delle mutazioni che possono anche esitare nella distruzione del batterio. L'induzione della lisogenia piuttosto che della lisi è legata all'espressione di proteine che inibiscono la trascrizione dei geni codificanti la lisi ed al tempo stesso queste proteine sono in grado di impedire un'ulteriore infezione ad opera di un fago dello stesso tipo (superinfezione) in quanto provocano una modificazione del lipopolisaccaride (LPS) di superficie del batterio facendo sì che il fago non trovi più il suo recettore specifico. La soppressione dell'espressione di queste proteine, attraverso il clivaggio dei siti codificanti, porta all'induzione del ciclo litico e questo in genere avviene nel momento in cui il batterio ha subito un danneggiamento del DNA ed ha attivato il sistema di SOS batterico. A seconda

delle dimensioni del capsid il virus può anche avere la necessità di costruire un'appendice del capsid dove impacchettare il restante genoma. L'*Escherichia coli* può ospitare svariate tipologie di fagi, ma all'interno di questo gruppo hanno particolare importanza i fagi  $\lambda$  che sono temperati e quindi responsabili del ciclo lisogeno e soprattutto del trasporto della *stx2*. Il loro genoma può essere diviso in tre porzioni e di queste, quella al centro è responsabile della lisogenia ed è quella che viene clivata quando si instaura la lisi ( 59). La maggior parte dei fagi che trasportano la *stx2* appartengono alle famiglie *Siphoviridae* e *Myoviridae* e presentano un dsDNA. Il virus, come tutti gli altri, dopo adsorbimento penetra nel batterio, ma non esprime la tossina che viene espressa solo successivamente ( 59). Anche la sensibilità dell'*Escherichia coli* sembra essere fortemente influenzata dalla struttura antigenica batterica perché l'antigene O157 può subire una modifica sulla catena laterale del LPS che non ne consente l'espressione fenotipica, indi individuazione sierologica, aumentando, così, notevolmente, la sensibilità dell'ospite al fago; l'antigene O157 espresso può in definitiva essere considerato come protettivo nei confronti del batteriofago (33).

La *stx2* viene espressa dal batterio quando quest'ultimo attiva il sistema SOS successivamente ad un danno o comunque ad una sofferenza a carico del DNA ( 40, 59, 61, 65). La lesione a carico del DNA batterico può essere causata da diversi fattori stressanti per il batterio, primi fra tutti antibiotici e radiazioni ionizzanti UV, anche se questi ultimi funzionano solo nel 35% dei casi, i principali antibiotici attivatori sono i chinoloni, il trimetoprim e la mitomicina C, mentre il metronidazolo e la rifampicina non attivano la risposta SOS e quindi non danno la produzione della tossina (40, 51)

## **Raccolta dati e campioni per ricerca**

### **Materiali e metodi per isolamento VTEC**

Nel periodo compreso tra il 2007 ed il 2010 sono stati raccolti svariati campioni provenienti carcasce bovine, latte crudo bovino, filtri di impianti di mungitura e ambienti di stabulazione.

Sono stati analizzati 125 campioni di pelle bovina (100 cm<sup>2</sup>), 107 campioni di carcassa bovina (400 cm<sup>2</sup>), 55 filtri di latte di mungitrice e relativi 61 campioni di latte crudo destinato alla libera vendita tramite distributori automatici aziendali.

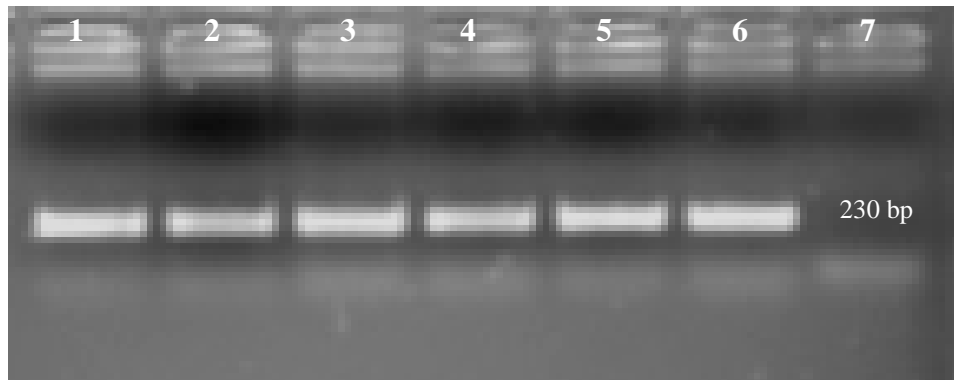
La ricerca ha previsto uno screening iniziale dei campioni per definire i positivi mediante PCR; pertanto una diluizione 1:10 dei campioni in terreno EC broth addizionato di 16 mg/L di novobiocina è incubato a 37°C per 24 ore.

Per l'estrazione del DNA, dopo incubazione, 1 mL di campione è stato centrifugato a 10.000 g per 5 minuti, il pellet è stato risospeso in 300 µL di Chelex ® ed incubato a 56°C per 30 minuti.

Dopo il trattamento chelante gli ioni bivalenti, l'estrazione del DNA è terminata con la bollitura del campione a 100°C per 8 minuti seguita da un immediato raffreddamento in bagno di ghiaccio per 2 minuti. Il campione è stato centrifugato a 10.000 g per 10 minuti per allontanare i residui cellulari ed il surnatante è stato utilizzato per la reazione PCR.

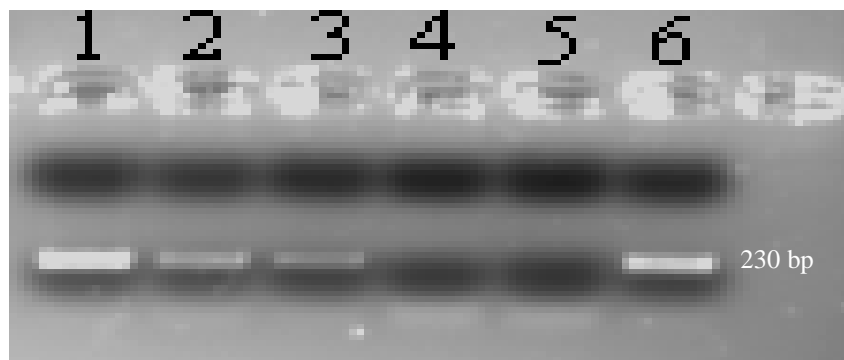
La procedura analitica prevedeva un iniziale screening PCR per l'individuazione dei campioni positivi che è stato eseguito tramite l'uso di una coppia di primer universali amplificanti sia la VT1 che la VT2, ovvero la coppia di primer MK1 (TTTACGATAGACTTCTCGAC) e MK2 (CACATATAAATTATTTGCTC) (37) ottenendo amplificati del peso di 230 bp. La scelta di questi primer è stata mirata in quanto, essendo primer degenerati, riescono ad amplificare tutte le varianti patogene delle shigatossine sia di tipo 1 che di tipo 2 di differenti ceppi (Figura 7) e nel contempo hanno una buona sensibilità, pari a 200 UFC/mL nell'arricchimento come da test effettuati (Figura 8); la sensibilità della metodica in arricchimento è riferibile a valori inferiori a 1 UFC/mL nel campione prearricchito (24); il valore di sensibilità della metodica PCR è paragonabile alla

sensibilità del metodo ISO 16654:2001 che utilizza l'immunoseparazione magnetica e valori sperimentali (4)



**Figura 7 Test MK1-MK2 su ceppi di referenza**

Riferimenti :1:O103:H n.d.(ISS,Roma), 2:O157:H7 (INR,Lugo - Spagna), 3: O103:H- (INR, Lugo Spagna),4: O145:H n.d.(ISS,Roma),5: O26:H (ISS, Roma),6: O157:H7(ISS, Roma),7: O157:H7 VT- (NCTC 12900-Oxoid)



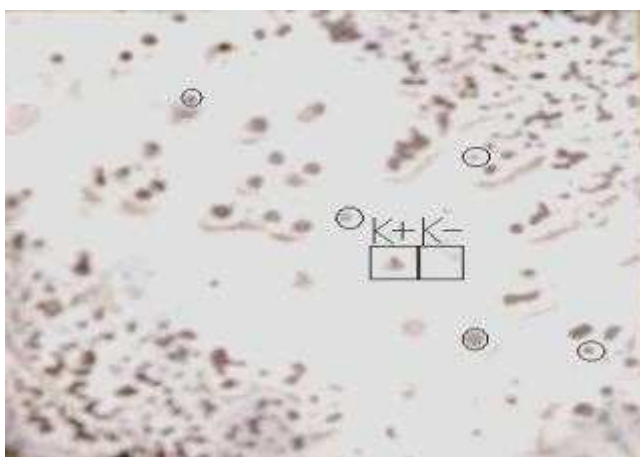
**Figura 8 Prove sensibilità con ceppo referenza EDL 142**

Corrispondenze:1) EDL 142 a  $2 \times 10^4$  UFC/ ml, 2)EDL 142  $2 \times 10^3$  UFC/ ml, 3) EDL 142 200 UFC/ ml 4) EDL 142 20 UFC/ ml, 5) NCTC 12900 (Oxoid) 6) Ceppo referenza EDL 933

Successivamente allo screening, nei campioni risultati positivi, l'identificazione delle colonie batteriche è stata fatta mediante ibridazione con sonde DNA marcate con digossigenina prodotte da ampliconi complementari alle sequenze genetiche VT1 e VT2 utilizzando il kit DIG high prime DNA labeling and Detection starter Kit I (Roche®). Le sonde DNA marcate mediante 'random prime labeling' sono state derivate via PCR da ceppi *E. coli* O157:H7 e O145:H n.d. utilizzando i seguenti primers: *stx1*-F (bp 77 to 102 of Sakai-VT1; 5'-

CCTTAGACTTCTCGACTGCAAAGACG-3'), *stx1*-R (bp 894 to 913 of Sakai-VT1; 5'-CCAGAGTGGATGAATCCCAC-3'), *stx2*-LP43 (bp 57 to 78 of EDL933; 5'-ATCCTATTCCCGGGAGTTTACG-3'), and *stx2*-LP44 (bp 622 to 643 of EDL933; 5'-GCGTCATCGTATACACAGGAGC-3'.

A tal fine, sulle colture positive precedentemente diluite e seminate su piastre di MacConkey agar sono state poste membrane Nylon per Colony e Plaque Hybridization (Roche ®); il DNA presente nel materiale batterico trattenuto dalle membrane è stato estratto mediante trattamenti con soluzioni denaturante e neutralizzante, fissato, purificato e quindi ibridato con le sonde marcate utilizzando DIG Easy Hyb (Roche®). Le colonie corrispondenti a quelle marcate, individuate sulle piastre MacConkey (Figura 9) sono state isolate e analizzate per la conferma di specie con test biochimici utilizzando e per evidenziare alcune caratteristiche di virulenza impiegando una metodica PCR-multiplex ( 53)



**Figura 9 Blotting colonie da campioni positivi.** Sulla membrana Hybridon-N+ dopo blotting delle colonie, sono stati applicati controlli negativo (NCTC 12900 VT-) [K-] e positivo (ceppo referenza EDL 142).[K+] Indi processate. Dopo ibridazione sono selezionate le colonie positive (indicate dai cerchi).

## **Modifiche al protocollo di ricerca**

Nel corso della ricerca, dopo la pubblicazione delle linee guida tecniche dell'EFSA ( 27) per l'armonizzazione dei metodi di ricerca dei VTEC negli stati membri dell'Unione Europea, le metodiche di arricchimento e di screening sono state adeguate e modificate. Si è infatti passati dalla semplice PCR di screening

che avevamo messo a punto sulla base del protocollo EU Food PCR Project PL QLRT-1999-00226, *ad hoc* ad una real.time PCR (rtq-PCR) con l'impiego di primer e sonde specifiche per ogni gene di virulenza indagato.

Per la ricerca di VTEC, secondo il protocollo EFSA, occorre utilizzare, per gli arricchimenti, terreni differenti in dipendenza del campione e del VTEC che si tratti di O157 o non-O157

Lo screening dei campioni sono stati utilizzati i primer e le sonde disegnati da Perelle ( 54) e Nielsen ( 50) per la verifica della presenza delle verocitotossine e del gene *eae* (Tabella 3).

Sono stati anche definiti i primer e le sonde per la definizione dell'antigene somatico 'O' dei VTEC; nel nostro progetto abbiamo limitato la ricerca ai sierogruppi O157 ed O26 utilizzando i primer studiati da Perelle ( 54) (Tabella 4).

Nel protocollo EFSA non vengono specificate le caratteristiche dei cicli di amplificazione PCR, ma si fa riferimento a prove sperimentali che devono essere eseguite come test per valutare la sensibilità dello strumento e della metodica.

E' stato dunque creato uno standard di DNA come controllo interno di laboratorio, utilizzando un ceppo di *E.coli O157:H7* (ceppo ATCC 35150 Oxoid) e un ceppo *E. coli O26* ( FV4028). Sono stati prodotti arricchimenti in TSB (a 37°C per 24 ore) e da questi, avendo stimato la concentrazione batterica mediante lettura spettrofotometrica (diluizioni con una trasmittanza del 40% a 540 nm corrispondono a circa  $1,5 \times 10^8$  ufc/mL) sono state fatte delle diluizioni decimali con concentrazione nell'intervallo tra  $10^5$  e  $10^2$  ufc/mL (i valori precisi sono stati determinati con la tecnica del conteggio delle unità formanti colonia).

Gli estratti DNA a concentrazione nota sono stati utilizzati per la creazione della curva di calibrazione standard a quattro punti ( da  $10^5$  ufc/mL a  $10^2$  ufc/mL).

La rtq-PCR dei campioni è stata eseguita su strumento MiniOpticon™ Two-Color Real-Time PCR Detection System (BioRad®) e reagente iQ™ Supermix (BioRad®).

Il protocollo termico che ha dato risultati migliori, ovvero anche con basse concentrazioni di DNA ( corrispondente a  $10^2$  ufc/mL di batteri), eseguita con una ripetizione di 35 cicli,:



- 1: 95,0°C per 3 minuti
  - 2: 95,0°C per 15 secondi
  - 3: 63,0°C per 45 secondi
- Ripetizioni del ciclo n°35

## **Isolamento colonie**

Per l'isolamento delle colonie in campioni positivi per O157 o O26, come definito dal protocollo EFSA è stata utilizzata la tecnica di immunoseparazione magnetica utilizzando delle microbead ricoperte da anticorpi specifici. Per campioni allo screening positivi per almeno una verocitotossina ed il gene *eae*, ma negativi per O157 e O26, l'isolamento delle colonie è stato effettuato tramite ibridazione su membrane con sonde specifiche a DNA verso i geni *stx1* e *stx2*.

Per l'applicazione della tecnica dell'immunoseparazione, a 1 mL di brodo di arricchimento contenente i VTEC di interesse sono aggiunti 20 µl di beads. Dopo agitazione lenta per 30 minuti si inserisce il magnete e si lascia in agitazione per altri tre minuti. Si elimina quindi il brodo di arricchimento utilizzando una pipetta sterile e si aggiunge 1 mL di tampone di lavaggio ( 0,15 M NaCl, 0,01 M Fosfato di sodio, 0,05% Tween 20 a pH 7,4) nel quale si risospendono le microbeads e si mettono in agitazione lenta per 3 minuti. Quindi nuovamente si catturano magneticamente le beads (inserendo il magnete e lasciando in agitazione per 2 minuti) poi si scarta il tampone. Le operazioni che portano alla formazione d'immunocomplessi tra le cellule batteriche specifiche e le micorbeads, la separazione magnetica degli immunocomplessi ed il lavaggio è stato ripetuto per 4 volte al fine di ottenere un grado adeguato di allontanamento, con il lavaggio, delle cellule batteriche non specifiche. Dopo aver risospeso in 100µL di tampone le immunobeads, 20 µL di tampone contenenti le beads ( diluiti 1:5 in tampone) sono stati seminati in doppio su piastre di terreni selettivi appropriati per la differenziazione dei ceppi (sorbitolo/ramnosio negativi). Per la ricerca dei VTEC O157 i terreni utilizzati sono stati il CT-SMAC ( terreno MacConkey con sorbitolo e 0,05 mg/L Cefixime e 2,5 mg/L di Tellurite di potassio) e il terreno SD-39 agar (Acu-

media). Per l'isolamento del siero gruppo O26 è stato utilizzato il terreno CT-RMAC (terreno MacConkey contenente ramnosio e 0,05 mg/L Cefixime e 2,5 mg/L di Tellurito di potassio) e CT-SMAC. Le colonie sospette sono state prelevate (fino ad un massimo di 50 colonie) effettuando un massimo di 5 pools di 10 colonie per ogni piastra ed analizzate mediante rtq-PCR, per la ricerca dei geni specifici. In caso di conferma di positività dai pools si procede con test sulle singole colonie per confermare l'isolamento di un ceppo patogeno. Una volta isolato il ceppo la conferma definitiva di positività è stata fatta, come indicato nelle linee guida EFSA, mediante multiplex PCR ( 53) .

Gli arricchimenti positivi per una o entrambe le verocitotossine e per il gene *eae*, ma non positive per i geni del sierogruppo O157 o O26, sono filtrati dopo opportuna diluizione su membrane ISO-GRID, poste su terreno MacConkey agar e incubati a 37°C per 24 ore. Le membrane sono replicate su membrane Nylon per Colony e Plaque Hybridization (Roche) e dopo trattamento con soluzione denaturante e neutralizzante sono ibridate con sonde a DNA verso i geni *stx1* e *stx2* in accordo con il protocollo DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I (Roche®)

Tutti gli isolati sospetti, sono testati per la conferma dei geni di virulenza con i primer descritti in Tabella 5 .

Tutti gli isolati sono stati anche analizzati per la definizione del profilo di virulenza OI-122 analizzando alcune sequenze del segmento genetico LEE, tramite PCR, i geni *pagC*, *sen*, *efa1* ed *efa2* (Tabella 6) (39).

**Tabella 3 Primer e Probe degenerati per la ricerca dei geni di virulenza**

<b>Gene (rif.bibliografico)</b>	<b>Target Primer Forward, Primer reverse e sequenza probe<sup>(a)</sup></b>	<b>Peso amplicone (bp)</b>
<i>Vtx</i> <sup>[54]</sup>	TTTGTYACTGTSACAGCWGAAGCYTTACG CCCCAGTTCARWGTRAGRTCMACRTC Probe-CTGGATGATCTCAGTGGGCGTTCTTATGTAA	131
<i>vt2</i> <sup>[54]</sup>	TTTGTYACTGTSACAGCWGAAGCYTTACG CCCCAGTTCARWGTRAGRTCMACRTC Probe-TCGTCAGGCACTGTCTGAAACTGCTCC	128
<i>eae</i> <sup>[50]</sup>	CAT TGA TCA GGA TTT TTC TGG TGA TA CTC ATG CGG AAA TAG CCG TTA Probe-ATAGTCTCGCCAGTATTCGCCACCAATACC	102

<sup>(a)</sup>Nelle sequenze Y è (C, T), S è (C, G), W è (A, T), R è (A, G), M è (A, C)

**Tabella 4 Primer e probe per amplificazione dell'antigene somatico specifico O**

<b>Gene Target [rif bibliografico]</b>	<b>Primer Forward, Primer reverse e sequenza probe</b>	<b>Peso amplicone (bp)</b>
<i>rfbE (O157)</i> <sup>[46]</sup>	TTTCACACTTATTGGATGGTCTCAA CGATGAGTTTATCTGCAAGGTGAT Probe- AGGACCGCAGAGGAAAGAGAGGAATTAAGG	88
<i>wzx (O26)</i> <sup>[46]</sup>	CGCGACGGCAGAGAAAATT AGCAGGCTTTTATATTCTCCAAC TTT Probe- CCCCGTAAATCAATACTATTTACGAGGTTGA	135

**Tabella 5 - Primer per conferma fattori di patogenicità VTEC**

<b>Gene Target [rif. bibliografico]</b>	<b>Primer Forward, Primer reverse e sequenza probe<sup>(a)</sup></b>	<b>Peso amplicone (bp)</b>
<i>eae</i> [ <sup>53</sup> ]	<i>eaeAF</i> GACCCGGCACAAGCATAAGC	384
	<i>eaeAR</i> CCACCTGCAGCAACAAGAGG	
<i>vt1</i> [ <sup>53</sup> ]	<i>stx1F</i> ATAAATCGCCATTCGTTGACTAC	180
	<i>stx1R</i> AGAACGCCCACTGAGATCATC	
<i>vtx2 (group)</i> [ <sup>53</sup> ]	<i>stx2F</i> GGCCTGTCTGAAACTGCTCC	255
	<i>stx2R</i> TCGCCAGTTATCTGACATTCTG	

)

**Tabella 6 - Primer per analisi isola di patogenicità O 122 ( 39)**

<b>Denominazione Primer</b>	<b>Sequenza (5'-to-3' direction)</b>	<b>Target gene</b>	<b>Grandezza amplicone(bp)</b>
<i>pagC-F</i>	ATGAGTGGTTCAAGACTGG	<i>pagC</i>	521
<i>pagC-R</i>	CCAACTCCAACAGTAAATCC		
<i>sen-F</i>	GGATGGAACCATACCTGG	<i>sen</i>	551
<i>sen-R</i>	CGCAATCAATTGCTAATGC		
<i>efa1a-F</i>	CTCCAGAGATAATTTTGAGG	<i>efa1</i>	504
<i>efa1a-R</i>	CAACTGTATGCGAATAGTACTC		
<i>efa1b-F</i>	CTGTCAGACGATGACATTGG	<i>efa1</i>	547
<i>efa1b-R</i>	GAAGGATGGGCATTGTGTC		

## **Prove interlaboratorio**

Nel corso della ricerca e dell'acquisizione dei campioni è stato condotto un test interlaboratorio per definire la sensibilità e riproducibilità del test di screening impiegando matrici alimentari (latte, tamponi di carcasse) e campioni animali (pelli, filtri di mungitura) naturalmente contaminati. Il protocollo impiegato prevedeva l'analisi nei diversi laboratori di campioni di arricchimento mantenuti allo stato congelato. A tal fine un millilitro dei campioni positivi e di alcuni campioni negativi era centrifugato a 1500 rpm per 2 minuti ed il pellet lavato era risospeso in brodo glicerolo (20%) e congelato con descritto dal lavoro di Artur (5). Il test interlaboratorio ha riguardato solo il metodo PCR di screening, mentre per l'isolamento sono state utilizzate metodiche differenti per ogni laboratorio..

## **Applicazione metodologiche per la ricerca e caratterizzazione di fagi *stx2***

### **Materiali e metodi per ricerca/caratterizzazione fago *stx2***

Per lo studio in esame sono state messe a punto e utilizzate i metodi sviluppati dal gruppo di ricerca dell'Università di Barcellona ( 45). Per la conferma dell'isolamento di un fago di tipo *stx2* sono state utilizzate delle metodiche PCR varie descritte da differenti autori utilizzando primer che hanno come target il gene produttore la *stx* e in particolare la *stx2* ( 64)-

Materiali utilizzati sono:

- Colture di *Escherichia coli* DM1187 (rif+), C600, DH5 $\alpha$  e ceppo di *S. sonnei*;
- Colture isolate in campo VT2 positive e VT1 variabile, *eae+* ed *eae-*. Le colture provengono da campioni animali ed ambientali già presenti in laboratorio in quanto derivanti dai due anni di precedenti indagini. Uno screening preliminare ha riguardato 16 isolati *Stx2* positivi provenienti da campioni di pelli bovine prelevate al macello e di filtri degli impianti di mungitura.
- Ceppi di *Escherichia coli stx2* negativi, testati precedentemente con una PCR multiplex per valutare la presenza dei vari geni di virulenza con primer per *hlyA*, *eaeA*, *stx1* e *stx2* (53), per sperimentare la possibilità di integrazione dl fago *stx2* ( ciclo lisogeno).
- Luria Bertani (LB) broth, LB agar e LB top agar;
- Low Protein-binding polyether sulfone (PES) membranes (Millex-GP Millipore, US);
- Cloroformio;
- Fenolo
- Mitomicina C (Sigma-Aldrich);

### **Metodo per isolare i fagi temperati e preparare un lisato fagico:**

La metodica prevede l'uso della tecnica dell'agar overlay che permette la produzione di uno strato omogeneo di batteri sensibili in un film sottile di agar sulla superficie di una piastra, in modo da poter valutare l'eventuale effetto litico di estratti virali depositi in punti circoscritti della piastra. La fase iniziale prevede una rivitalizzazione delle colonie batteriche *stx2* positive su LB agar per 24 ore a 37°C e successivo arricchimento in LB broth per 24 ore a 37°C in agitazione

L'arricchimento overnight viene diluito 1:20 in LB broth e messo a 37°C in agitazione sino a quando il valore dell'assorbanza allo spettrofotometro con  $\lambda=600$  nm è compresa tra 0,3 e 0,5. Vengono eseguite due aliquote campionarie, in una viene aggiunta una quantità di 0,5  $\mu\text{g/ml}$  di Mitomicina C mentre l'altra è utilizzata quale controllo di crescita. Entrambe le aliquote sono messe a 37°C, in agitazione, per 18 ore. Viene valutato l'accrescimento e l'induzione del fago mediante lettura allo spettrofotometro ( O.D= 600 nm ) a tempo zero, a un'ora, tre ore e 18 ore dall'aggiunta di Mitomicina C.

Dopo l'arricchimento l'eventuale fago lisato è recuperato mediante una fase di centrifugazione a 10000g per 10 minuti per eliminare i residui batterici e i batteri stessi dal lisato e successivamente una processo di filtrazione mediante membrane filtranti di tipo Millex-GP.

Il lisato fagico ottenuto viene testato su colture sensibili (di *Escherichia coli* DM1187 (rif+), C600, DH5 $\alpha$  e ceppo di *S. sonnei*) per valutare l'effetto litico o lisogeno. A tal fine le colture sensibili sono incubate a 37°C in LB broth e quando ad  $\text{Ass}= 600\text{nm}$  la O.D è compresa tra 0,5 e 0,7 si diluiscono 0,5 ml di coltura in 3 ml di LB top agar a 45°C ripartendoli su una piastra di LB agar. Lasciata solidificare si esegue lo spot-test applicando 5  $\mu\text{l}$  di estratto fagico. Si incuba il tutto a 37°C per 24 ore. Si valuta dopo questo tempo la presenza/assenza di alone di lisi e si valuta altresì la presenza di colonie nell'alone di lisi.

### **Metodo per la produzione di lisogeni partendo da colture recettive e lisato fagico (huésped test).**

Per la verifica e la produzione di eventuali lisogeni sempre secondo il metodo Muniesa (45) vengono utilizzati 500 µl di lisato contenente batteriofagi che vengono incubati con 100 µl di coltura batterica sensibile VT-negativa e 100 µl CaCl<sub>2</sub> 0,1 M. Il brodo fagico contenente batteri sensibili viene incubato per 30 minuti a 37°C. Dopo incubazione la coltura viene miscelata a 3ml di LB top agar a 45°C nei quali sono stati aggiunti 100 µl di CaCl<sub>2</sub>, piastrati su LB agar ed incubati per 24 ore a 37°C. Le colonie formatesi vengono selezionate, clonate su una nuova piastra e ibridate con sonde specifiche a DNA marcate con digossigenina prodotte da ampliconi complementari alle sequenze genetiche VT2. Le sonde DNA marcate sono state realizzate random prime labeling con i primer *UP378* e *LP 378* (45).

### ***Metodo per estrazione e purificazione del DNA fagico.***

Dopo un arricchimento di 18 ore a 37°C in agitazione con aggiunta di mitomicina C, il brodo arricchito viene centrifugato a 6000 x g per 45 minuti. Viene eseguita filtrazione con Millipore Express PES Membrane.

A filtrato viene aggiunta una quantità del 10% (p/v) di PEG (PEG 8000). La soluzione è incubata in ghiaccio per 1 ora.

Centrifugare per 45 min a 10.000 g viene scartato il surnatante e conservato il pellet a -20°C per 18 ore.

Il pellet è risospeso in 2 ml di soluzione madre

Alla soluzione ottenuta si aggiunge in rapporto 1:1 una soluzione di fenol-cloroformio (1:1), centrifugato a 12.000 g per 5 minuti, si recupera il surnatante; l'operazione di lavaggio con fenol-cloroformio è ripetuta per almeno 3 volte.

La fase acquosa (surnatante) viene recuperata in un tubo di vetro e vi si aggiunge un rapporto 1/10 (v/v) di Acetato di sodio 3M e due volumi di etanolo assoluto.

Si agita delicatamente fino all'osservazione di un precipitato bianco-piumoso nel fondo del tubo; si recupera il tutto centrifugando a 13.000 g per 15 minuti. Si elimina il surnatante e si eseguono due lavaggi, uno con 200 µl di etanolo assoluto ed uno con 200 µl di etanolo 70%, centrifugando a 13.000 g per 10 min.



Si scarta il surnatante e si lascia asciugare il pellet per 1-2 ore in cappa aspirante o mediante speed vacuum.

Il pellet di DNA fagico è risospeso con una quantità di 50 µl di acqua ultrapura sterile.

### **Metodo di analisi con RFLP e Southern-blot.**

Questo tipo di esame viene fatto per caratterizzare il fago-*stx* e per confermare la presenza del fago *stx2* nel ceppo di VTEC lisogeno. Gli enzimi di restrizione scelti sono il *EcoRI* ed il *Clal* in quanto è stato dimostrato (dati non pubblicati) che non hanno attività di restrizione all'interno della sequenza genetica *stx2*.

Dopo l'ottenimento del campione di DNA fagico (come descritto in precedenza), viene creata una mix di reazione, per un volume finale di 30 µl, contenente: 3µl soluzione di buffer enzimatico, 1,5 µl di enzima ed una quantità di DNA pari 15-30 µg; la soluzione è incubata a 37°C per 3 ore. Il prodotto della restrizione si visualizza, mediante colorazione con bromuro di etidio, in un gel di agarosio allo 0,8% dopo una corsa elettroforetica a 25V per 16 ore.

Per trasferire in Southern-blot il gel viene trattato prima con soluzione denaturante (0,5 M NaOH, 1,5 M NaCl) in agitazione per trenta minuti e poi con soluzione neutralizzante (1 M TrisHCl, 1,5 M NaCl a pH 7,4) per un'ora.

Viene montata la cassetta per southern-blot; utilizzando un tampone 10x SSC il trasferimento avviene per contatto su membrana hybridon-N+ sfruttando il principio della capillarità. Dopo trasferimento il DNA è fissato mediante lampada UV. La membrana viene sottoposta a ibridazione con sonda corrispondente alla *stx2*, utilizzando la stessa metodica per ibridazione di colonie o placche di lisi fagica.

## Modifica e trasferimento del gene fagico in ceppo trasportatore

### Modifica Gene fagico

La modifica effettuata sul fago isolato permette di creare un batterio trasportatore dello stesso gene fagico associato ad altri geni di resistenza correlati. Nel caso di modifica del fago  $\phi stx2$  viene aggiunto a questo, in posizione centrale un gene di resistenza all'antibiotico cloramfenicolo (CAF) che non interferisce assolutamente con l'attività svolta da fago e per la produzione della shigatossina.

Per ottenere questa modificazione genetica si procede con l'amplificazione di frammenti genetici distinti partendo dal fago isolato e confermato come  $\phi stx2$  seguendo in tutti i casi una miscela di reagenti del tipo:

- 1x Buffer pcr
  - 50  $\mu$ M di MgCl
  - 10  $\mu$ M di dNTP
  - 30  $\mu$ M di ogni primer
  - 5 $\mu$ l di estratto di DNA o 2,5 $\mu$ l degli ampliconi ottenuti
  - 1 U di Taq
  - H<sub>2</sub>O fino a volume di 25  $\mu$ l
1. Viene prodotto un frammento genetico di resistenza al cloramfenicolo mediante l'ausilio della coppia di primer Cm5 e Cm3 ( 64). Con un programma del tipo: denaturazione 94°C per 5 minuti, 25 cicli a 94°C per 45 secondi, 51°C per 60 secondi ,72°C per 90 secondi, un'estensione finale a 72°C per 7 minuti.
  2. Vengono prodotti anche due frammenti genetici uno che abbia come estremo la sub-A della *stx2*, mediante la coppia di primer *StxA-Up* con Cm5-*stx* e una come target la sub-B della *stx2* con i primer Cm3-*stx* e *StxB-Lp* ( 64). Programma ciclico: denaturazione 94°C per 5 minuti, 25 cicli a 94°C per 45 secondi, 41°C per 45 secondi ,72°C per 45 secondi, un'estensione finale a 72°C per 7 minuti.

Creati i frammenti genetici questi vengono assemblati in un'unica PCR con una coppia di primer amplificante tutto il fago *stx2* ovvero con i due primer *StxA-Up* e *StxB-Lp* come schematizzato (Figura 10)

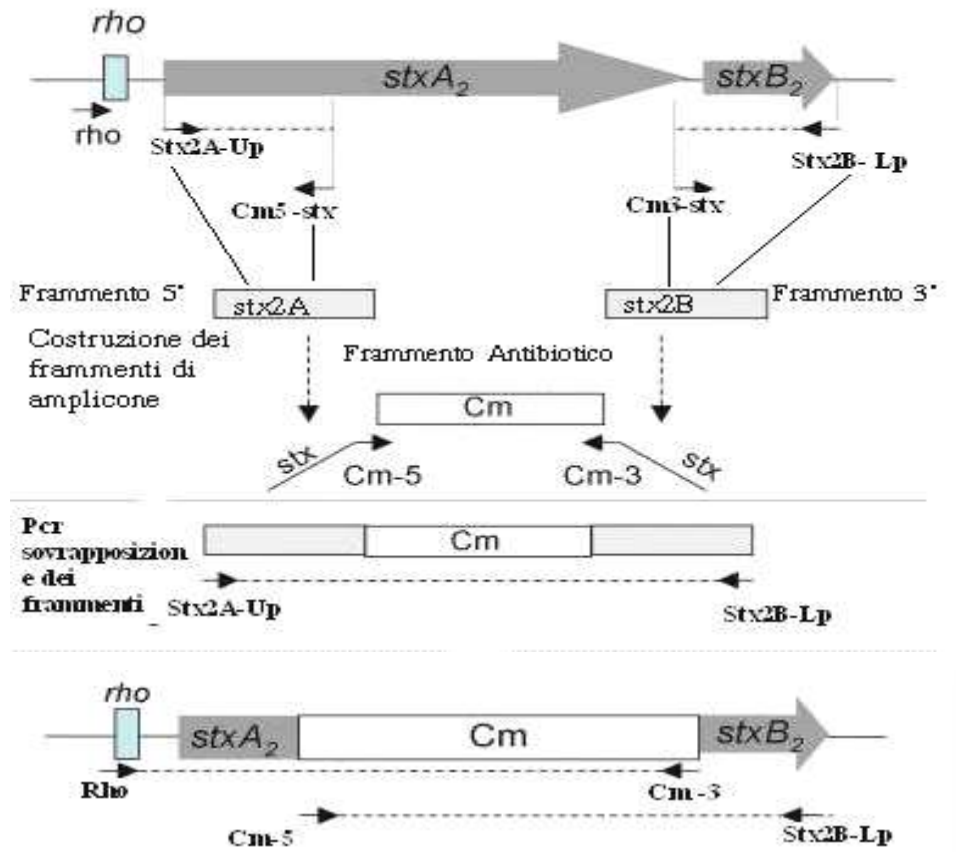


Figura 10 Schema produzione fago modificato  $\phi stx2\Delta Cm$  tratto e modificato da Serra-Moreno ( 64)

### Trasporto in ceppo carrier

Per ottenere il trasporto del fago  $\phi stx2\Delta Cm$  in un ceppo carrier stabile, esempio di *E. coli* C600, viene utilizzata la reazione della red-recombinase presente in alcuni plasmidi, come descritto da Serra-Moreno ( 64).

Si esegue utilizzando un ceppo in cui è inserito in maniera stabile il fago di interesse (nel nostro caso il  $\phi stx2$ ) tramite fenomeno di lisogenia, nello stesso ceppo si esegue l'inserzione di un plasmide, nel caso specifico il plasmide pKD46 contiene il gene della red-recombinase che permette, nelle fasi di replicazione cellulare,

di far ricombinare nell'ospite un plasmide geneticamente simile a quello già presente nella cellula; in seguito si inserisce un plasmide creato con un fago  $\phi stx2$  modificato contenente un gene di resistenza a fattori selettivi, nel nostro caso il gene di resistenza al cloramfenicolo ( $\phi stx2\Delta Cm$ ).

Per fare questo si esegue l'estrazione del plasmide da un ceppo carrier; il ceppo contenente il plasmide pKD46 viene messo in coltura in LB broth con 100 $\mu$ g/mL di Ampicillina ed incubato per 24 ore a 30°C. Il brodo ottenuto è centrifugato a 4000g per 10 minuti a 4°C

Il pellet batterico come definito dal kit commerciale Plasmid DNA Purification/Quiagen Plasmid Midi Kit viene processato per l'estrazione del plasmide.

La valutazione dell'integrità del plasmide è fatta mediante corsa elettroforetica.

Ottenuto il plasmide integro e non degenerato viene trasportato nell'ospite lisogenico per il fago *stx2*.

Il trasporto del plasmide all'interno del ceppo ospite di referenza viene eseguito mediante reazione di competenza chimica. Il cui protocollo prevede:

- Arricchimento di un ceppo fresco di *E. coli* recettivo, in questo caso del ceppo *E. coli* C600 contenente il fago  $\phi stx2$ , in 30 ml di LB broth a 37°C in agitazione.
- Al raggiungimento di O.D =0,5-0,7 con Ass 600 $\lambda$  la coltura è incubata in bagno di ghiaccio per 10 minuti.
- Centrifugazione a 4000 rpm per 10 min a 4°C
- Il pellet batterico risospeso in 10 ml di CaCl<sub>2</sub> 0,1 M freddo ed incubato in ghiaccio per 30 minuti.
- Centrifugato a 3500 rpm per 10 min a 4°C ed il pellet risospeso in 2 ml di CaCl<sub>2</sub> 0,1 M freddo. Vengono create aliquote di 200  $\mu$ l che possono essere conservate a -80°C per un anno.
- Un'aliquota di 200 $\mu$ l viene addizionata con 10 $\mu$ l di estratto plasmidico pKD46 ed incubata 30 minuti in ghiaccio.
- Incubata a 42°C per 1 minuto e 30 secondi
- Incubata 1 minuto e 30 secondi nuovamente in ghiaccio
- Miscelare le cellule trattate con 3 ml di LB broth e incubarle in agitazione a 30°C per 3 ore

- Dopo preincubazione 100  $\mu$ l di miscela sono seminate per spatolamento su piastra di LB agar contenete 100 $\mu$ g/mL di ampicillina ed incubato a 30°C per 48 ore.
- Le colonie presenti, indi resistenti all'ampicillina, sono selezionate e testate con pcr per verificare l'effettiva presenza del plasmide integrato.con la coppia di primer RR46-LP ed RR46-Up (64)

Ottenute le colonie contenenti il plasmide pKD46, utilizzando sempre la metodica dell'affinità chimica, viene inserito il fago modificato  $\phi$ stx2 $\Delta$ Cm contenente il gene di resistenza sempre secondo la metodica descritta. In questo caso per differenziare le colonie che hanno acquisito il frammento genico trasportato dal fago viene utilizzato un terreno LB agar contenete 5 $\mu$ g/ml di Cloramfenicolo.

Le colonie, in accordo con la metodica, sono analizzate mediante pcr con la copia di primer *Rho* con *Cm3* e *Cm5* con *StxB-Lp* ( 64) per verificare l'integrazione del  $\phi$ stx2 $\Delta$ Cm nella posizione seguente l'operone genetico indipendente *Rho* marcatore dell'escissione del profago dalla cellula.

### **Prova di lisogenia da fago $\phi$ stx2 $\Delta$ Cm**

Nello studio di lisogenia è stato utilizzato un fago *Stx2* isolato in precedenza da un campione di pelle bovina mediante la procedura descritta da Muniesa (47) e sua modificazione in fago modificato con resistenza al cloramfenicolo ( 64) e come ceppi ospiti stipiti di *Escherichia coli* isolati da filtri di due diversi impianti di mungitura del latte.

I ceppi in questione sono del sierotipo O157 e del sierotipo O26. Sono stati utilizzati ceppi in cui era stata riscontrata la presenza del gene codificante *stx2*, oltre che dell'intimina (*eae*), ma nei successivi passaggi colturali mostravano di aver perso il gene *stx2*. I ceppi in questione sono analizzati anche per evidenziare la presenza dei geni caratterizzanti dell'isola di patogenicità OI-122 ( 39) come definito in precedenza La lisogenia è studiata applicando la procedura descritta da

Muniesa ( 45) , il riconoscimento dei ceppi *stx2* lisogeni viene fatto mediante isolamento su un terreno contenente cloramfenicolo mediante il fago ricombinante  $\phi stx2-\Delta Cm$ . Le colonie lisogene, oltre ad integrare il gene *Stx2*, presentano resistenza all'antibiotico e possono essere facilmente isolate su terreni selettivi, senza ricorrere a tecniche d'ibridazione. Cinque colonie cloramfenicolo-resistenti per ciascun ceppo lisogeno devono essere confermate mediante PCR impiegando la coppia di primer *stx2A-Up* e *Cm3* in modo da identificare la presenza del gene *Stx2*. Quindi, amplificando con PCR la regione del genoma definita dalla coppia dei primer *rho* e *Cm3*, si verifica che l'inserzione di questo gene sia avvenuta in prossimità del gene *rho* batterico. Si verifica infine che la lisogenia si mantenga nel tempo, ripetendo per tre volte il trapianto delle colonie cloramfenicolo-resistenti su terreno LB agar contenente cloramfenicolo ( $10 \mu\text{g L}^{-1}$ ). Oltre alla verifica PCR si esegue anche una verifica di produzione della shigatossina mediante metodica ELISA mediante il kit commerciale Premier EHEC (Meridian Diagnostic).

## RISULTATI

### RISULTATI RICERCA CEPPI VTEC

Dal 2007 al dicembre 2009 si hanno 50 pelli bovine positive su 119 ( 42%) per la metodica di screening con MK1-MK2, 4 carcasse bovine positive per MK1-MK2 su 83 (4,8%) ; dal dicembre 2009, con l'applicazione della rtq-PCR sono risultate positive 2 pelli bovine su 6 (pelli denominate P75 e P196), quindi un totale di 52 positivi su 125 campioni analizzati ( 41,6%); i dati quantitativi sugli arricchimenti, avendo applicato la rtq-PCR sulle due ultime pelli ha mostrato che entrambe erano positive per il gene *eae*, una positiva per *stx1*, *stx2* e *O26*, mentre l'altra, con valori bassi di positività per i geni *O26*, *O157* e valori lievemente superiori per *stx2* ( $10^2$ ).

Per quanto riguarda i filtri di latte risultano positivi all'analisi con Mk1-Mk2 27 campioni su 44 (61%) mentre per il latte crudo 23 campioni su 49 (46%). Successivamente con rtq-PCR sono stati analizzati 11 filtri di latte e 12 campioni di latte crudo, in questo caso solo un campione di filtro presentava positività per gene *O157* ( valore  $10^6$  ufc/mL) e gene *stx2* ( valore  $10^5$  ufc/mL). Il totale dei filtri analizzati è stato di 55 con 28 positivi ( 50,9%) per il latte crudo sono stati analizzati in totale 61 campioni con 23 positivi ( 37,7%)

Sono stati isolati nella prima fase sperimentale, attuando la metodica di blotting, ceppi di VTEC solo ed esclusivamente da pelli bovine e da il filtro latte mungitrice con caratteristiche variabili, valori di isolamento del 10,9 % ( 13 su 119) per le pelli e per il 22,7% (10 su 44) nei filtri dell'impianto di mungitura (Tabella 7) Dal campione F18 è stato isolato un ceppo di VTEC O26 positivo per il gene *eae* ma negativo per le verocitotossine, il ceppo è stato caratterizzato con prove biochimiche e con il Test Api20E

Successivamente è stata effettuata anche una verifica per la presenza dei geni di virulenza non solo con la pcr multiplex ( 53), ma anche con le successive analisi di rtq-PCR mediante l'utilizzo dei primer descritti nella metodica EFSA( 27).

**Tabella 7 Ceppi VTEC isolati dopo Blotting**

Isolato	Geni virulenza (1)			
	<i>Hly</i>	<i>eaeA</i>	<i>VT2</i>	<i>VT1</i>
P55-B	+	-	+	-
P65-C	-	-	+	-
P18-C	+	+	+	+
P7 C	+	-	+	+
P63	-	-	-	+
P67	-	-	-	+
P64	-	-	-	+
P1486	-	-	+	+
P71	+	-	+	+
P1427	+	-	+	-
P1827	-	-	+	+
P658	+	-	+	+
P1476	+	-	+	-
F20-2	-	-	+	+
F17-4	-	+	+	+
F17-5	-	-	+	+
F14-4	-	-	+	+
F20-3	-	-	+	-
F20-16	-	+	-	+
F7-3 <sub>18</sub>	-	-	+	-
F14-1	-	-	+	-

(1) Test PCR eseguito con metodica Multiplex PCR ( 55)

Nella seconda fase di test, utilizzando rtq-PCR si hanno i risultati riassunti nella Tabella 8, i valori inferiori a  $10^2$  ufc/mL devono essere considerati negativi in quanto indicano amplificazione di ceppi disvitali. In questo caso l'isolamento c'è stato solo per il campione F61 che risulta essere un *O157*, positivo per il gene *eae* ma negativo per la verocitotossina seppur nell'arricchimento iniziale era presente



il gene codificante *stx*. Sono stati anche isolati i ceppi denominati P75 e P169 nel luglio 2010 che all'analisi PCR risultano essere positivi per O157, *stx* ed *eae*

**Tabella 8 Rtq-PCR su arricchimenti dei campioni dal dicembre 2009**

CAMPIONE	STX1 <sup>(1)</sup>	STX2 <sup>(1)</sup>	eae <sup>(1)</sup>	O157 <sup>(1)</sup>	O26 <sup>(1)</sup>
F24	-	+ (10 <sup>3</sup> )	+ (10 <sup>5</sup> )	-	-
F26	+ (10 <sup>4</sup> )	+ (10 <sup>3</sup> )	+ (10 <sup>3</sup> )	-	-
F28	-	-(10 <sup>2</sup> )	+ (10 <sup>4</sup> )	-	-
F29	-	- (10 <sup>2</sup> )	- (10 <sup>1</sup> )	-	-
F30	-	-	+ (10 <sup>4</sup> )	-	-
L30	-	-	+ (10 <sup>5</sup> )	-	-
L31	-	-	+ (10 <sup>4</sup> )	-	-
F F36F36	-	-	+ (10 <sup>4</sup> )	-	-
F37	- (10 <sup>2</sup> )	- (10 <sup>2</sup> )	- (10 <sup>1</sup> )	-	-
L56	- (10 <sup>2</sup> )	+ (10 <sup>3</sup> )	- (10 <sup>2</sup> )	-	-
F59	- (10 <sup>2</sup> )	- (10 <sup>2</sup> )	+ (10 <sup>3</sup> )	-	-
F60	+ (10 <sup>2</sup> )	-	+ (10 <sup>2</sup> )	-	-
F61	-	+ (10 <sup>3</sup> )	+ (10 <sup>3</sup> )	+ (10 <sup>4</sup> )	-
Pelle 162	+ (10 <sup>5</sup> )	+ (10 <sup>4</sup> )	+ (10 <sup>6</sup> )	+ (10 <sup>6</sup> )	-
Pelle 173	-	- (10 <sup>2</sup> )	-	-	-

<sup>(1)</sup>Valore riferito a la quantità stimata in ufc/mL basandosi sulla curva standard di taratura.

## ANALISI DEI CEPPI PER RICERCA FAGO STX2

I 16 ceppi positivi alla *stx2* ( indicati in tab. 9), analizzati in questa fase sperimentale, dopo induzione con mitomicina C e dopo spot test dei fagi estratti sui ceppi di referenza *E. coli* C600, DH5 $\alpha$  e DMrif+ hanno dato valori di assorbanza variabili per quanto riguarda l'induzione valutata nello scorrere del tempo della prova (Tabella 9). I fenomeni di lisi (Tabella 10) hanno evidenziato differenza tra i vari ceppi, infatti hanno dato lisi in tutti i ceppi di referenza i ceppi F7-3<sub>18</sub>, P1476-1, P1846-1. P65C e P18C, non hanno dato lisi in nessun caso ceppi F17-4, F17-3, P658, F14-4, P7C-c e P55-B, i restanti ceppi di VTEC hanno dato comportamenti variabili nei ceppi di riferimento.

**Tabella 9 Risultati letture assorbanza a tempi variabili**

Ceppo	Pre mit C	Prima lettura		Seconda lettura		Lettura 18 ore	
		test	Con- trollo	Test	Controllo	Test	Controllo
F 20-2	0,511	0,702	0,940	0,735	0,886	0,712	1,103
F 17-5	0,405	0,900	1,090	0,804	1,003	0,740	1,260
F 17-4	0,560	0,927	1,042	0,875	1,095	0,827	1,264
F 17-3	0,375	0,705	1,015	0,594	1,017	0,502	1,273
F 14-1	0,300	0,903	1,008	0,787	0,997	0,418	1,205
P 658	0,301	0,678	0,940	0,694	0,950	0,541	1,190
F 14-4	0,298	0,375	0,605	0,441	0,848	0,375	1,279
F 20-3	0,359	0,900	1,160	0,896	1,063	0,892	1,231
F 7- 3 <sub>18</sub>	0,448	0,812	1,037	0,758	1,053	0,627	1,438
P 7C-C	0,340	0,938	1,295	0,927	1,168	0,902	1,651
P 55 b	0,277	0,435	0,480	0,475	0,520	0,445	1,022
P 1476-1	0,407	0,793	1,087	0,778	1,049	0,588	1,348
P 1846-1	0,214	0,764	0,889	0,655	0,940	0,422	1,208
F 20- 1	0,430	0,912	0,960	0,854	0,981	0,762	1,252
P 65C	0,530	0,891	1,202	0,899	1,174	0,850	1,374
P 18 C	0,518	0,959	1,130	0,897	1,148	0,781	1,374

**Tabella 10 Valutazione lisi dopo spot test in ceppi di referenza**

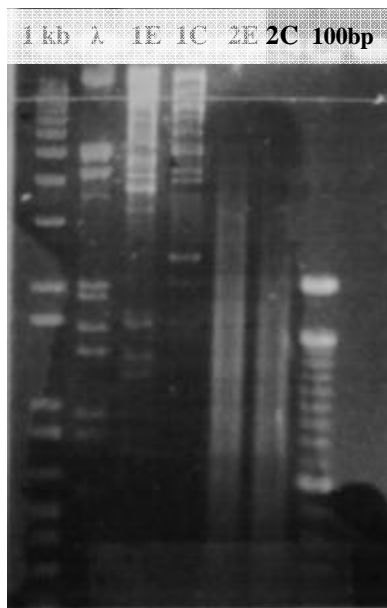
Campione	Ceppo DH5 $\alpha$	Ceppo C600	Ceppo DM rif+
F 20-2	No lisi	Lisi	No lisi
F 17-5	Lisi	No lisi	Lisi
F 17-4	No lisi	No lisi	No lisi
F 17-3	No lisi	No lisi	No lisi
F 14-1	No lisi	Lisi	Lisi
P 658	No lisi	No lisi	No lisi
F 14-4	No lisi	No lisi	No lisi
F 20-3	No lisi	No lisi	Lisi
F 7- 3 <sub>18</sub>	Lisi	Lisi	Lisi
P 7C-C	No lisi	No lisi	No lisi
P 55 b	No lisi	No lisi	No lisi
P 1476-1	Lisi	Lisi	Lisi
P 1846-1	Lisi	Lisi	Lisi
F 20- 1	No lisi	Lisi	No lisi
P 65C	Lisi	Lisi	Lisi
P 18 C	Lisi	Lisi	Lisi

Nonostante i differenti comportamenti a livelli litico, tutti le piastre sono state sottoposte ad ibridazione con sonde marcate per la ricerca del gene *stx2* mediante sonde prodotte con i primer precedentemente descritti. Degli spot fagici testati sui ceppi di controllo, all'ibridazione, solo il fago P 65C ha dato segnale di positività su tutte le membrane di ibridazione dei differenti ceppi di controllo.

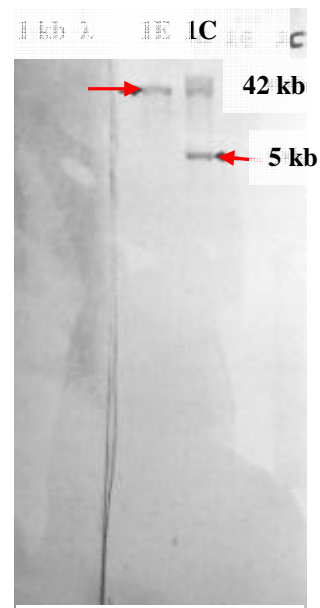
È stata dunque eseguita un'analisi approfondita del gene *stx2* associato al ceppo P65, utilizzando i primer *StxA-Up* e *StxB-Lp* è stato eseguito un sequenziamento genetico del gene. Il gene sequenziato è stato inserito nel database BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) ( 32) con il seguente risultato:

AP005154.1 *Stx2* converting phage II DNA, complete genome  
con un'identificazione di 1053 su 1087 basi ( 97%).

Pertanto il fago contenuto nel ceppo P65C è un  $\phi_{stx2}$ ; ulteriore conferma della presenza del fago nel ceppo è data dall'estrazione del DNA fagico e della restrizione enzimatica eseguita con gli enzimi *EcoRI* e *ClaI*, visualizzazione della corsa elettroforetica con colorazione con in bromuro di etidio (Figura 11) e seguente ibridazione della membrana dopo il southern-blot con sonde *stx2* specifiche (Figura 12)

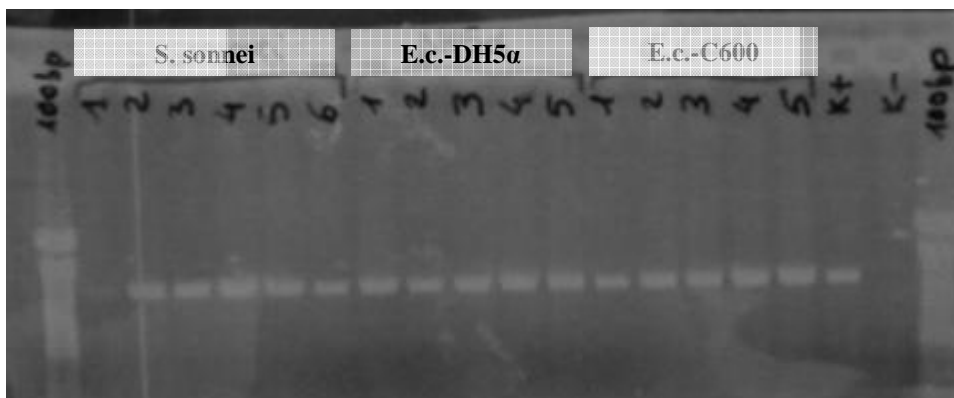


? del DNA  
, in doppia  
razione 1



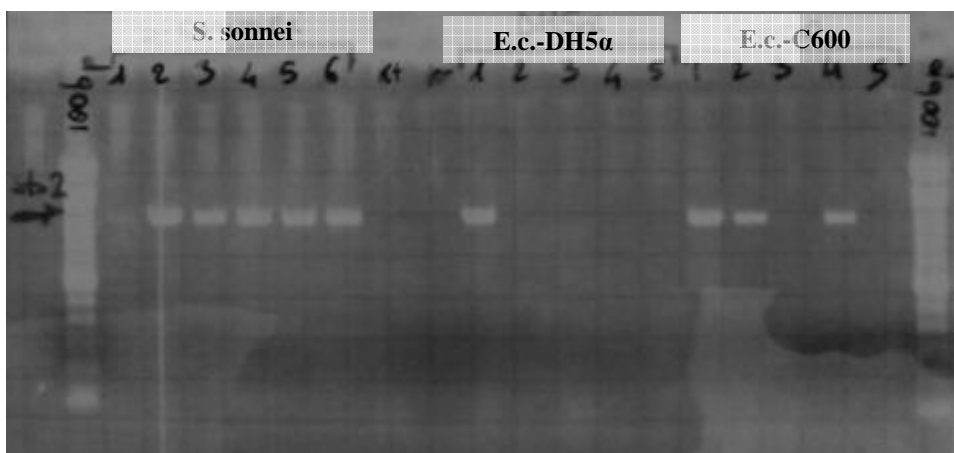
ction gene  
hern-blot.  
a indica il  
ico detec-

Il fago analizzato, confermato quindi come  $\phi_{stx2}$  carrier, è stato testato anche con per valutare l'effettiva lisogenia (metodica huésped) in ceppi di referenza di *S. sonnei*, *E. coli DH5 $\alpha$*  ed *E. coli C600*. Dopo l'ibridazione e la selezione di almeno cinque colonie per ceppo tutte risultate positive per la presenza di  $\phi_{stx2}$  proveniente da P65C.(Figura 13).



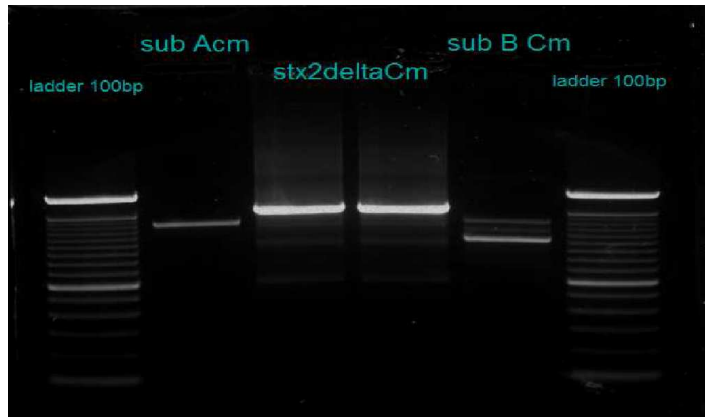
**Figura 13** PCR con primer per *stx2* da ceppi lisogeni dal fago derivato da P65C

Al terzo passaggio su LB agar delle 6 colonie di *S. sonnei* tutte risultavano infettate stabilmente dal fago ( 6 su 6 pari al 100%), nel ceppo di *E. coli DH5α* solo una colonia su 5 era rimasta infettata stabilmente dal fago ( pari al 20%) mentre sul ceppo di *E. coli C600* erano rimaste infettate stabilmente dal fago 3 colonie su 5(Figura 14).



**Figura 14** Ceppi lisogeni da fago *stx2* di P65C

Su una delle colonie del ceppo *E. coli C600* è stato inserito il plasmide pKD46 e in seguito il fago  $\phi stx2\Delta Cm$  derivante dal fago isolato dal ceppo P65C ottenendo un ceppo di *E. coli* contenente *P65 $\phi stx2\Delta Cm$*  ( Figura 15); saranno necessari ulteriori approfondimenti per eseguire quale test sperimentali di lisogenia, per valutare se ceppi di *E. coli* enteropatogeni o *E. coli* che hanno perso il fago *stx2* possono riacquisirlo.



**Figura 15** Integrazione in *E.coli C600* contenente il fago  $\phi$ P65 del fago modificato  $\phi$ stx2 $\Delta$ Cm ottenuto da P65

### **Risultati prove lisogenia sui ceppi EPEC**

Da entrambi i ceppi ospite di *Escherichia coli* F18 ed F61 isolati dai filtri di latte è stato possibile ottenere lisogeni *Stx2* positivi, ma delle 5 colonie analizzate per ciascun ceppo solo una (20%) ha mantenuto questo gene in modo stabile, dopo i tre passaggi colturali. In entrambe i ceppi lisogeni stabili è stato confermato che l'integrazione era avvenuta, ma non nella regione prossima al gene *rho*. La PCR ha infatti mostrato il fenomeno di frammentazione del prodotto, cosiddetto 'smear', che deve far ritenere la reazione negativa. Nella Tabella 11 sono riportati i risultati dell'amplificazione dei geni *sen*, *pagC*, *efa1a* ed *efa1b* caratterizzanti l'isola di patogenicità OI-122, che dimostrano che il ceppo O157 aveva un profilo di virulenza completo, mentre il ceppo O26 non mostrava la presenza dei due geni *efa*

**Tabella 11 Analisi PCR dell'isola di patogenicità OI-122 secondo Karmali et al. 2003**

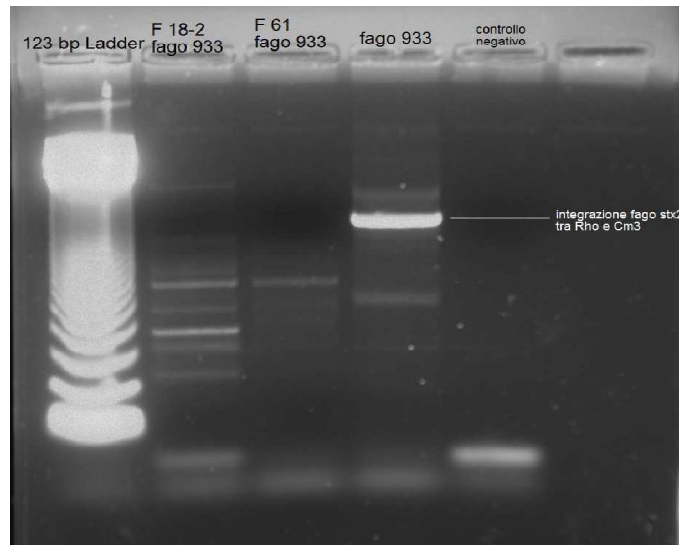
Analisi pcr					
Ceppo	Sierotipo	Gene <i>Sen</i>	Gene <i>pagC</i>	Gene <i>efa1a</i>	Gene <i>efa1b</i>
F 61	O157	presente	presente	presente	presente
F 18-2	O26	presente	presente	assente	assente

La prova di integrazione fagica ha dimostrato che i ceppi da noi isolati dai filtri di mungitura sono altamente recettivi al fago *Stx2* e l'integrazione del fago ' $\phi$ *stx2-ΔCm*' può essere stabile, in quanto presentano resistenza all'antibiotico utilizzato (Figura 16).



**Figura 16 *E. coli* F61 resistenti su terreno contenente cloramfenicolo**

L'integrazione del gene fagico non è avvenuta però in prossimità del segmento genico *rho* dei batteri ospiti (Figura 17).



**Figura 17** Corsa elettroforetica per verifica integrazione fago  $\phi stx2\Delta Cm$  in prossimità di *Rho*

Recenti studi riferiscono che l'integrazione del gene *Stx2* in posizioni differenti da questa è possibile, ma un'integrazione tale non permetterebbe l'espressione del gene *Stx2* e quindi la produzione di verocitotossina (44, 64) questo è stato verificato mediante la prova ELISA per la verifica della produzione delle verocitotossine, entrambi i ceppi che hanno assunto il fago  $\phi stx2\Delta Cm$  non producono la stessa. I nostri risultati mostrano che anche nei ceppi O157 ed O26 da noi utilizzati, che peraltro presentano in modo completo o incompleto i geni caratterizzanti l'isola di patogenicità OI-122, l'integrazione del fago è instabile, come evidenziato dal fatto che la positività PCR al gene *Stx2* era stata persa nel corso dei passaggi prima dello studio di lisogenia, o comunque un'integrazione stabile non si ha in prossimità del gene *rho*.

### **Risultato ceppi isolati**

I ceppi isolati durante il trial interlaboratorio, che possono essere considerati veri VTEC in quanto aventi il gene *eae* e almeno un gene codificante la verocitotossina, all'analisi PCR hanno le caratteristiche mostrate in Tabella 12; la particolarità del ceppo P75 c è ha dato positività per entrambi i geni del sierotipo indagati utilizzando il protocollo descritto dall'EFSA (27) nonostante sullo stesso si affermi che i primer utilizzati e le rispettive sonde siano altamente specifiche. Il ceppo



P75 presentava anche la caratteristica di essere sia ramnosio che sorbitolo negativo. Tutti i ceppi isolati, testati per la sensibilità agli antibiotici, risultano tutti sensibili.

I ceppi geneticamente positivi per la *stx2*, ovvero: Mi F80-1, Col 11 Pd, PR 44F-1, F 20-3, F 17-4, F 14-4, P75C sono stati testati per verificare se la verocitotossina di tipo due può essere di origine fagica.

Dopo induzione fagica con mitomicina C hanno dato i valori riassunti in mentre allo spot test hanno dato risultati negativi in tutti i ceppi di *E.coli* di controllo utilizzati (Tabella 14).

Sugli stessi campioni isolati, dopo estrazione del DNA fagico, è stata eseguita un'analisi PCR con la coppia di primer *Stx2AUp* e *Stx2BLp* che hanno come target la sequenza genetica corrispondente alle sub unità A e subunità B della shigatossina

È stato eseguito un test rtq-PCR con SYBR green ( Biorad®) per valutare se gli estratti di DNA ottenuti dai ceppi isolati potessero essere di origine fagica; all'analisi per si sono avuti picchi per i campioni :

- F 14-4
- F 17-4 (picco difforme e basso)
- P75C
- Mi F80-2
- Col 11Pd

Nella seguente corsa elettroforetica degli ampliconi (Figura 18), risulta che i ceppi denominati F14-4, P75C, Mi F80-2, Col 11Pd Sono fagi veicolanti la *stx2*

Tabella 12 - Profilo di virulenza dei ceppi isolati

Ceppo	RT-PCR <sup>(1)</sup>					Analisi patotipo plasmide OI-122 <sup>(2)</sup>			
	geni virulenza			Sierotipo					
	Stx1	Stx2	eae	O157	O26	sen	efa1a	efa1b	pagC
F17-4	+	+	+	-	+	+	-	-	+
P75C	-	+	+	+ <sup>(3)</sup>	-	-	-	+	+
P169	-	+	+	+	-	+	+	+	+
F18-2	-	-	+	-	+	+	-	-	+
F61	-	-	+	+	-	+	+	+	+
SS VT32	-	+	+	-	-	+	+	+	+
SS VT109	-	+	+	-	-	+	+	+	+
SS VT123	+	-	+	-	-	+	-	-	+
Col 11Pd	-	+	+	+	-	+	+	+	+
Mi 80-1	-	+	+	-	+	+	+	+	+
Pr 44F-1	+	+	+	-	+	+	+	+	-
F20-3	+	+	-	-	-	-	-	-	-
F14-4	-	+	-	-	-	non eseguito			

<sup>(1)</sup>= RT-PCR secondo protocollo EFSA

<sup>(2)</sup>= PCR secondo metodica descritta da Karmali et al 2003 [ "Association of Genomic O Island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli* Seropathotypes That Are Linked to Epidemic and/or Serious Disease"]

<sup>(3)</sup> = ramnosio negativo e sorbitolo negativo, ceppo isolato sia con IMS O157 che IMS O26. Da sempre risposta al gene O157

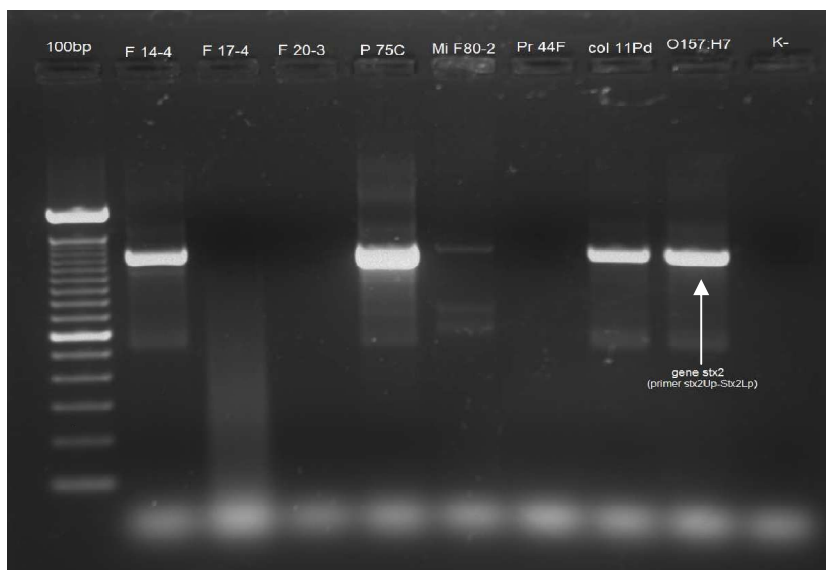
**Tabella 13 – Valori di assorbanza di colture batteriche dopo induzione dei fagi con mitomicina C**

Campione	Controllo (*)	Indotto (*)	Rapporto induzione (controllo/indotto)
Mi F80-1	2,088 ±0,002	0,906 ±0,001	2.30
Col 11 PD	2,133 ±0,019	0,861 ±0,003	2.48
PR 44F-1	2,109 ±0,001	0,614 ±0,003	3.43
F 20-3	2,038 ±0,003	0,792 ±0,002	2.57
F 17-4	2,042 ±0,002	0,339 ±0,001	6.02
F 14-4	1,995 ±0,001	0,404 ±0,004	4.93
P75C	2,066 ±0,002	0,651 ±0,003	3.17

(\*) media di tre letture con deviazione standard

**Tabella 14 - Risultati spot Test su ceppi di riferimento**

		Mi 80-1	Col 11 PD	PR 44 F-1	F 20-3	F 17-4	F 14-4	P75C
Ceppo								
Referenza	DH5α	No lisi	No lisi	No lisi	No lisi	No lisi	No lisi	No lisi
	C600	No lisi	No lisi	No lisi	No lisi	No lisi	No lisi	No lisi
	DM 1187	No lisi	No lisi	No lisi	No lisi	No lisi	No lisi	No lisi
ceppi lab	EDL 933	No lisi	No lisi	No lisi	No lisi	No lisi	No lisi	No lisi
	FV 4933	No lisi	No lisi	No lisi	No lisi	No lisi	No lisi	No lisi
	FV 4028	No lisi	No lisi	No lisi	No lisi	No lisi	No lisi	No lisi
	FV 4996	No lisi	No lisi	No lisi	No lisi	No lisi	No lisi	No lisi



**Figura 18** Corsa PCR da estratti fagici dei campioni isolati

## Discussione

Dai dati emersi dalla ricerca effettuata nel corso degli anni si evince che esiste, un problema per quanto riguarda gli *E. coli* enteroemorragici (VTEC); il problema non è solo ascrivibile al ceppo O157:H7, primo ceppo isolato e più frequentemente correlato con la patologia umana, ma anche a tutti quegli altri germi, che hanno caratteristiche fenotipiche praticamente identiche ad altri *E. coli*, ma che nel genoma presentano i fattori di patogenicità codificanti le verocitotossine e l'adesina, quindi difficilmente identificabili in terreni di coltura generale.

Si sono infatti isolati nella prima fase 21 ceppi di *E. coli* nei quali era presente la verocitotossina, ma di questi solo 2 presentavano la concomitanza con il gene *eae*. Successivamente con il susseguirsi delle analisi sono stati isolati altri 3 ceppi nei quali è verificata la concomitante presenza dei geni *eae* e verocitotossine. Sono stati altresì isolati dai campioni positivi provenienti dai test interlaboratorio altri 6 campioni considerabili VTEC.

Considerando il numero effettivo degli isolati ottenuti, pari a 5 ceppi, su un numero di campioni pari a 324, si può definire che l'incidenza di isolamento dei VTEC, nel nostro caso, è pari al 1,54%. Gli isolati ottenuti provengono due da campioni di pelle bovina (1,26%) e tre da filtri di latte dell'impianto di mungitura (5,5%). Questi dati di prevalenza sono in linea con quelli riscontrati da altri autori (6,11, 15, 28).

L'isolamento di ceppi del sierotipo O157:H7 o O26, è più facile per le caratteristiche biochimiche peculiari dei ceppi stessi, in quanto il primo è identificabile in terreni culturali contenenti sorbitolo e non è reattivo della  $\beta$ -glucuronidasi, mentre la maggior parte dei ceppi patogeni O26, secondo alcuni autori (76, 77), non fermenta il ramnosio e può perciò essere discriminato in terreni selettivi contenenti questo zucchero.

E' stata verificata la presenza del fago nel campione P65, ovvero un ceppo isolato che all'analisi genotipica presentava solo ed esclusivamente la positività per la *stx2*, dallo stesso ceppo è stato isolato e caratterizzato il fago e si è riusciti anche a modificarlo per eseguire prove di lisogenia su altri ceppi di *E. coli*.

La verifica della presenza del fago in ceppi isolati è stata riscontrata in altri 4 ceppi oltre al ceppo P65; questi ultimi fagi isolati sono ancora in fase di analisi.

Ne risulta che dei 23 campioni *stx2* positivi, con variabilità per *eae*, si ha presenza del fago nel 21% (5 su 23) dei campioni analizzati, valore in accordo con dati riportati da Muniesa (45) il cui valore è pari al 18%.

Seppur, come indicato dall'EFSA (27) che la presenza della verocitossina, non è condizione necessaria e sufficiente per definire un *E. coli* enteroemorragico, ma è necessaria la presenza del gene codificante l'intimina (gene *eae*), occorre tener presente che dalle nostre prove sperimentali e dalle nostre esperienze di laboratorio la shigatossina di tipo 2, soprattutto se veicolata da fago, può essere facilmente persa come avvenuta nel caso del ceppo F61. La perdita della verocitossina, però non è un qualcosa di stabile, si è dimostrato infatti che in ceppi di *E. coli* definiti enteropatogeni per la sola presenza di *eae*, ovvero F18 e F61, questa possa essere stata reinserita mediante un ciclo lisogeno anche con un ceppo artificialmente modificato, ma che questo reintegro non sempre avviene in prossimità del locus genetico corrispondente all'operone *Rho*. Occorre tenere presente che il ciclo lisogeno riprodotto in laboratorio, mediante l'ausilio di Mitomicina C, è un processo che naturalmente, in condizioni favorevoli ai fagi e ai batteri, può avvenire spontaneamente. Si può pertanto affermare che la concomitanza di *E. coli* enteropatogeni in microambienti contenenti batteri veicolanti il fago può dar luogo a ricombinazioni genetiche che potrebbero far nascere nuovi ceppi batterici patogeni. E' dunque necessario poter controllare i liquami in cui questo fenomeno può avvenire per la presenza di molteplici fattori di umidità, quantità di batteri presenti nell'ambiente e dai fattori stressanti che implicano il ciclo litico/lisogeno.

Bisogna altresì considerare che nella rtq-PCR dopo arricchimento del campione si sono riscontrati valori di amplificazione pari o inferiori a  $10^2$  UFC/mL; questi valori possono essere indicativi di presenza di ceppi VTEC disvitali.

Si può concludere che il problema VTEC è presente nei prodotti d'origine animale, soprattutto quelli d'origine bovina come carcasse e latte crudo, che la prevalenza degli stessi sia bassa se viene a considerarsi come patogeno solo il ceppo che presenta l'adesina e almeno una verocitotossina.

Si può altresì concludere che la presenza del fago veicolante la verocitotossina è da verificare nei ceppi isolati e da indagare per valutare la movimentazione gene-

tica tra ceppi valutando anche i fenomeni di ricombinazione che possono avvenire tra i ceppi stessi.

***Pubblicazioni inerenti la ricerca su E. coli:***

QUINOLONE AND BETA-LACTAM-RESISTENCE IN *Escherichia coli* FROM DANISH AND ITALIAN BROILER FLOCK. Botolaia V., Trevisani M., Guardabassi L. Brisgaard M, Venturi L. Delle Donne G. Bojesen A.M., A.I.V.I. Rivista dell'Associazione Italiana Veterinari Igienisti, vol 3.1/09, 35-37.

Prevalenza di *Escherichia coli* produttori di verocitotossine in bovini macellati in Emilia-Romagna. G. Delle Donne, M. Trevisani. Atti IV workshop epidemiologia veterinaria. Roma dic. 2008 Istisan 08/C12 ISSN 0393-5620

Presenza di colifagi-*stx2* in ceppi di *Escherichia coli* isolati da campioni di pelle bovina e filtri di latte” / “Detection of *Stx2* coliphages in strain of *Escherichia coli* Isolated from bovine fleece and milk filters” Delle Donne G., Mancusi R., Trevisani M. XX Convegno Nazionale A.I.V.I. (Associazione Italiana Veterinari Igienisti). Giugno 2010.- in pubblicazione su rivista AIVI di luglio 2011.

“Prove di lisogenia con virus batteriofagi vettori del gene *stx2* in ceppi enteropatogeni di *Escherichia coli* isolati da alimenti” Delle Donne G., Mancusi R. , Trevisani M. Atti SIDiLV – Genova ottobre 2010.



## **Altre ricerche effettuate**

Durante il periodo di dottorato sono state eseguite altre ricerche sempre in ambito del controllo degli alimenti, il filo conduttore è sempre stato quello di unire tecniche di ricerca classica, metodologie di tipo convenzionale e microbiologia classica alle metodologie innovativa di ricerca tramite PCR sia tradizionale che con RT-PCR.

- Ricerca della contaminazione determinate da *Listeria monocytogenes* in *prosciutti di Parma* durante la fase di disosso e caratterizzazione dei ceppi isoalti in base alla capacità di formare biofilm.
- Analisi del rischio riguardo *Clostridium botulinum* in Salami prodotti senza gli additivi nitrati/nitriti
- Ricerca e caratterizzazione di ceppi patogeni di *Yersinia enterocolitica* nel latte crudo destinato al consumo umano.
- Valutazione della quantità di istamina prodotta in prodotti ittici freschi e ricerca dei batteri istamino produttori

## Indice Figure e tabelle

- Figura 1 Alignment of the genomes of CB9615, Sakai and EDL933. Scales are Mbp. The grey and yellow shaded regions represent segments present in all strains, with inverted segments shaded in yellow. Purple and cyan boxes within the grey or yellow regions represent the indels of phages or phage-like elements (insertions and deletions respectively) defined in Table S9. Red and green boxes represent other major indels (insertions and deletions respectively) that involve the changes of the gene numbers in Table S10, with the indel numbers also shown as defined in Table S9. The orange boxes indicate the *E. coli* O157:H7 O-antigen segment gained by recombination. Figure S1 is a greatly expanded version of this figure showing individual genes..... 8
- Figura 2 Maximum likelihood phylogenetic tree of 26 *Escherichia coli* and Shigella strains. The phylogenetic tree of the *Escherichia* core genome genes was constructed from the concatenated alignments of the 2034 genes in the core genome of the *E. coli*/Shigella genomes. The closely related species, *E. fergusonii* (CU928158), was chosen to root the tree..... 9
- Figura 3 Plasmide pO157 Tratto da (*E. coli* Genome Project Wisconsin-Madison, 2011) ..... 11
- Figura 4.: *Escherichia coli* adesivi a mucosa intestinale che hanno causato lesioni dei villi; tratto da Foster et al (Foster, 2008)..... 13
- Figura 5 Esempio di acquisizione/perdita di virulenza modificato da: Medical Microbiology, 4th edition – Capitolo 7, Bacterial Pathogenesis figura 7-2..... 14
- Figura 7 Test primer Mk1-MK2 su ceppi referenziali. **Errore. Il segnalibro non è definito.** 21
- Figura 8 Prove di sensibilità con ceppo referenziale EDL 142..... 22
- Figura 9 Blotting di colonie da campioni positivi..... 23
- Figura 10 Schema di produzione di fago modificato  $\phi$ stx2 $\Delta$ Cm..... 35
- Figura 11 Analisi RFLP del DNA fagico estratto da P65C, in doppia estrazione del DNA estrazione 1 ed estrazione 2..... 44

- Figura 12 Detection gene *stx2* dopo southern-blot. La freccia rossa indica il segmento genetico detectato per *stx2*..... 44
- Figura 13 PCR con primer per *stx2* da ceppi lisogeni dal fago derivato da P65C..... 45
- Figura 14 Ceppi lisogeni da fago *stx2* di P65C..... 45
- Figura 15 Integrazione in *E.coli* C600 contenente il fago  $\phi$ P65 del fago modificato  $\phi$ *stx2* $\Delta$ Cm ottenuto da P65 ..... 46
- Figura 16 *E. coli* F61 resistenti su terreno contenente cloramfenicolo..... 47
- Figura 17 Corsa elettroforetica per verifica integrazione fago  $\phi$ *stx2* $\Delta$ Cm in prossimità di *Rho* ..... 48
- Figura 18 Corsa PCR da estratti fagici dei campioni isolati ..... 52
  
- Tabella 1 Infezioni de *E. coli* O157 (Fonti WHO)..... 15
- Tabella 2 Epidemie associate a vegetali (Fonti WHO)..... 16
- Tabella 3 Primer e Probe degenerati per la ricerca dei geni di virulenza . 27
- Tabella 4 Primer e probe per amplificazione dell'antigene somatico specifico O ..... 27
- Tabella 5 Primer per conferma fattori di patogenicità VTEC..... 28
- Tabella 6 Primer per analisi isola di patogenicità O 122 ..... 28
- Tabella 7 Ceppi VTEC isolati dopo Blotting..... 40
- Tabella 8 Rtg-PCR su arricchimenti dei campioni dal dicembre 2009..... 41
- Tabella 9 Risultati letture assorbanza a tempi variabili ..... 42
- Tabella 10 Valutazione lisi dopo spot test in ceppi di referenza ..... 43
- Tabella 11 Analisi PCR dell'isola di patogenicità OI-122 secondo Karmali et l. 2003..... 47
- Tabella 12 Analisi Ceppi isolati nel periodo di ricerca..... 50
- Tabella 13 Induzione dei fagi mediante mitomicina C ..... 51
- Tabella 14 Risultati spot Test su ceppi di riferimento ..... 51

## Bibliografia

1. Abedon, S.T. 2008 Bacteriophage ecology: population growth, evolution and impact of bacterial viruses. Cambridge: Cambridge university press.,
2. Adu-Bobie J., Frankel G., Bain C., Goncalves A.G., Trabulsi L.R., Douce G., Knutton S. & Dougan G..1998 «Detection of intimins a, b, g, and d, four intimin derivatives expressed by attaching and effacing microbial pathogens.» J Clin Microbiol, 36: 662–668.
3. Alonso S., Mora A., Blanco M., Blanco J.E., Dahbi G., Ferreiro M.T., López C., Alberghini L., Albonetti S., Echeita A., Trevisani M., 2007. «Faecal carriage of *Escherichia coli* O157:H7 and carcass contamination in cattle at slaughter in northern Italy.» J. Int Microbiol. Jun;10(2),: 109-16.
4. Aminul Islam, M., A. E. Heuvelink, K. A. Talukder, E. de Boer 2006 «Immunoconcentration of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* O157 from animal feaces and raw meats by using Dynabeads anti-*E. coli* O157 and the VIDAS system.» International Journal of Food Microbiology, 109: 151-159.
5. Arthur T. M., Barkocy-Gallagh G. A., Rivera-Betancourt M. and Koochmaraie M. 2002«Prevalence and Characterization of Non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* on Carcasses in Commercial Beef Cattle Processing Plants.» Applied and Enviromental Microbiology, Vol 68, No 10: 4847- 4852.
6. Bardiau M., Muylaert A., Duprez J.N., Labruzzo S., Mainil J.G. 2010 «Prevalence, molecular typing and antibiotic sensivity of enteropathogenic, enterohaemorrhagic, and verotoxigenic *Escherichia coli* isolated from veal calves.» Tijdschr Diergeneeskd 135 (14-15), 544.548.
7. Bastian S. N., Carle I. and Grimont F.1998 «Comparison of 14 PCR systems for the detection and subtyping of *stx* genes in Shiga-toxin-producing *Escherichia coli*.» Res. Microbiol. 1998, 149,: 457-472.
8. Beuchat L.R., Taormina P.J.1999 «Comparison of chemical treatments to eliminate enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 on alfalfa seed.» J. Food Prod. 62, : 318-324.

9. Blanco J., Blanco M., Blanco J.E., Mora A., Gonzalez E.A., Bernardez M.I., Alonso M.P., Coira A., Rodriguez A., Rey J., Alonso J.M., Usera M.A.2003. «Verotoxin-producing *Escherichia coli* in Spain: prevalence, serotypes, and virulence genes of O157:H7 and non-O157 VTEC in ruminants, raw beef products, and humans.» *Experimental biology and medicine*, : 228(4):345-351.
10. Bonardi S., Foni E., Brindani F., Bacci C., Chiapponi C., Cavallini P.. 2004. «Detection and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (vtec) O157 and non-O157 in cattle at slaughter.» *New Microbiol.*;27 (3),: 255-261.
11. Bresum S.O., Boel J. 2010.«Prevalence of *Escherichia coli* O157 and verocytotoxin producing *E. coli* (VTEC) on Danish beef carcasses.» *Int J Food Microbiol* 30; 141 (1-2),: 90-96.
12. Brunder W., Schmidt H. and Karch, H.1996 «Katp, a novel catalase-peroxidase encoded by the large plasmid of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7.» *Microbiology*, : 142: 3305-3315.
13. Brunder W., Schmidt H., Frosch, M. and Karch, H.1999. «The large plasmids of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) are highly variable genetic elements.» *Microbiology*, 145: 1005-1014.
14. Burland V., Shao Y., Perna N.T., Plunkett G., Sofia H.J., Blattner F.R. 1998. «The complete DNA sequence and analysis of the large virulence plasmid of *Escherichia coli* O157:H7.» *Nucleic Acids Res.* 1998 Sep 15;26(18),: 4196-4204.
15. Cadirci O., Siriken B., Inat G., Keven T.O. 2010. «The prevalence of *Escherichia coli* O157 and O157:H7 in ground beef and raw meatball by immunomagnetic separation and the detection of virulence genes using multiplex PCR» *Meat Sci.*84 (3): 553-556.
16. Caprioli A., Luzzi I., Rosmini F., Resti C., Edefonti A., Perfumo F, Farina C., Goglio A., Gianviti A., Rizzoni G. 1994 «Communitywide outbreak of hemolytic-uremic syndrome associated with non-O157 verocytotoxin-producing *Escherichia coli*.» *Journal of Infectious Diseases*, 169: 208-211.

17. Caprioli A., Morabito S., Grugere H., Oswald E. 2005 «Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and models of transmission» Vet. Res. 36 (2005), 289-311.
18. CDC, Centers for Disease Control and Prevention. 2008. «*Escherichia coli* O157:H7 infections in children associated with raw milk and raw colostrum from cows--California, 2006.» MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2008 Jun 13;57(23), 625-628.
19. Clavero M.R.S., Beuchat L.R., Doyle M.P. 1998 «Thermal inactivation of *Escherichia coli* O157:H7 isolated from ground beef and bovine feces, and suitability of media enumeration.» Journal Food Prod. 61: 285-289.
20. Conedera G., Dalvit P., Martini M., Galiero G., Gramaglia M., Goffredo E., Loffredo G., Morabito S., Ottaviani D., Paterlini F., Pezzotti G., Pisanu M., Semprini P., Caprioli A. 2004. «Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in minced beef and dairy products in Italy.» Int J Food Microbiol. 2004 Oct 196(1): 67-73.
21. Dambrosio A., Lorusso V., Quaglia N.C., Parisi A., La Salandra G., Virgilio S, Mula G, Lucifora G, Celano GV, Normanno G. 2007 «*Escherichia coli* O26 in minced beef: prevalence, characterization and antimicrobial resistance pattern.» Int J Food Microbiol. Sep 15;118(2) Epub 2007 Aug 1, 218-22.
22. De Boer E., Heuvelink A.E. 2001. «Foods and vehicles of VTEC infection. EN: Verocytotoxigenic *E. coli*.» Food and Nutrition Press. USA Eds. Duffy Garvey & McDowell: 181-200.
23. Delahay R.M., Frankel G., Knutton S. 2001 «Intimate interactions of enteropathogenic *Escherichia coli* at the host cell surface.» .
24. Delle Donne G., Trevisani M. 2008. «Prevalenza di *Escherichia coli* produttori di verocitotossine in bovini macellati in Emilia Romagna.» IV Workshop Nazionale Epidemiologia Veterinaria. Roma: ISTISAN, 2008. 90.
25. Dynabeads® anti-*E. coli* O157. Invitrogen Dynal AS, Cat. n. 710.03, Rev. n. 010.

26. EFSA 2007 «Monitoring of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) and identification of human pathogenic VTEC types.» The EFSA Journal 2007 579, n. 1 (2007): 1-61.
27. EFSA 2009. «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; 7(11):1366, 2009: 1-43.
28. Fernandez D., Irino K., Sanz M.E., Padola N.L., Parma A.E.. 2010. «Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from dairy cows in Argentina.» Lett Appl Microbiol, Oct 2010 51 (4), 377-382.
29. Foster, A.P , A. Otter, A. M. Barlow,R. Pearson, M. J. Woodward,R. J. Higgins. 2008.«Naturally occurring intestinal lesions in three alpacas (*Vicugna pacos*) caused by attaching and effacing *Escherichia coli*.» The Veterinary Record, 162:318-320.
30. Galiero G., Morena C., Conedera G., Caprioli A. 2005. «Indagine sulla presenza di *Escherichia coli* O:157 in mozzarella di bufala campana.» Ind Alim 2005 , 448-633.
31. Gunzer, F., Bohm, H., Russmann, H., Bitzan, M., Aleksic, S. and Karch, H. 1992. «Molecular detection of sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157 in patients with hemolytic-uremic syndrome.» Journal of Clinical Microbiology, 30: 1807-1810.
32. National Center for Biotechnology Information <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>.
33. Iguchi A., Iyoda S., Watanabe H., Osawa R. 2007. «O side deficiency enhance sensitivity of *Escherichia coli* to shiga-toxin2-converting bacteriophages.» Current Microbiology; Vol 54: 14-19.
34. International Organization for Standardization 2001 "Horizontal method for the detection of *Escherichia coli* O157" ISO 16654 :2001
35. Johnson, R.P., R.C., Clarke J.B, Wilson S.C, Read K., Rhan A.LI, Renwick S.A. 1996 .«Growing concerns and recent outbreaks involving non O157:H7 serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli*.» Journal of Food Protection, 59: 1112-1121.

36. Kaper J.B., Elliott S., Sperandio V., Perna N.T. and Mayhew, G.F. 1998. «Attaching-and-effacing intestinal histopathology and the locus of enterocyte eplacement. In *Escherichia coli* O157:H7 and.» American Society for Microbiology. Washington,DC: ed Kaper, J.B. and O'Brien, A.D. pp.163-182.
37. Karch H., Meyer T. 1989 «Single primer pair for amplifying segment of distinct Shiga.like toxin gene by polimerase chain reaction.» J. Clin.Microbiol. 27: 2751-2757.
38. Karch, H., Schmidt, H. and Brunder,W. 1998. «Plasmid-encoded determinants of *Escherichia coli* O157:H7.» In *Escherichia coli* O157:H7 and Other Shiga-Toxin-Producing *E. coli* Strains, di J.B. and O'Brien, Kaper, A.D. pp. 183-194. Washington, DC: American Society for Microbiology
39. Karmali M.A., Mascarenhas M., Shen S., Ziebell K., Johnson S., Reid-Smith R., Isaac-Renton J., Clark C., Rahn K., Kaper J.B. 2003.. «Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease.» J Clin Microbiol. 2003 Nov;41(11): 4930-40.
40. Kimmit P. T., Herwood C. R., Barer M.R. 2000. «Toxin gene expression by shiga-toxin-producing *Escherichia coli*:the role of antibiotics and the bacterial SOS response.» Emerging infectious disease vol 6,n°5 sept-oct 2000: 453-465.
41. Kudva I. T., Blanch K. and Hovde C. J. 1998 «Analysis of *Escherichia coli* O157:H7 Survival in Ovine or Bovine Manure an Manure Slurry.» Applied and Environmental Microbiology, 1998 Vol 64, No 9,: 3166-3174.
42. Law, D. 2000. «Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other Shigatoxin-producing *E. coli*.» Journal of Applied Microbiology, 88: 729-745.



43. Morgan D.C, Newmann C.P., Hutchinson D.N., Walker A.M., Rowe, Majid F. 1993 «Verotoxin producing *Escherichia coli* O157 infection associated with the consumption of yoghurt.» *Epidemiol. Infect.* 111: 181-187.
44. Muniesa M., Jofre J. 1998 «Abundance in sewage of bacteriophages that infect *Escherichia coli* O157:H7 and that carry the Shiga toxin 2 gene.» *Appl Environ Microbiol.* Jul;64(7): 2443-8.
45. Muniesa M., Blanco J.E., de Simon M., Serra-Moreno R., Blanch A.R., Jofre J. 2004. «Diversity of *stx2* converting bacteriophages induced from Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from cattle.» *Microbiology*, 150: 2959–2971.
46. Muniesa M., Mocè-Llivina L., Katayama H., Jofre J. 2003. «Bacterial host stains that support replication of somatic coliphages.» *Antonie van Leeuwenhoek* 83: 305-315.
47. Muniesa M., Serra-Moreno R., Jofre J. 2004. «Free shiga-toxin bacteriophages isolated from sewage showed diversity although the *stx* gene appeared conserved.» *Environmental microbiology* (2004) 6(7): 716-725.
48. Nataro J.P. Kaper J. B., Mellis J.L. 1998. « Pathogenicity islands and other mobile genetic elements of diarrheagenetic *Escherichia coli*. En: Pathogenicity islands and other mobile virulence elements» Eds. Kaper & Hacker. ASM, Washington, D.C, 1998: 33.35.
49. Nataro, J.P., e J.B Kaper 1998 . «Diarrheagenic *Escherichia coli*.» *Clinical Microbiology Rewiws*: 11: 142-201.
50. Nielsen M.T., Andersen E.M. 2003. «Detection and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* by automated 5' nuclease PCR assay.» *Journal of Clinical Microbiology* 41: 2884-2893.
51. Ochoa T.J., Chen J., Walker C.M., Gonzales E., Cleary T.G. 2007. «Rifamixin does not induce toxin production or phage-mediated lysis of shiga-toxin-producing *Escherichia coli*» *Antimicrobial agents and chemotherapy*; Aug 2007: 2837-2841.

52. Paton J.C, Paton A.W. 1998a «Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection.» *Clinical Microbiology Reviews*, 11: 450-479.
53. Paton A.W., Paton J.C. 1998b «Detection and characterization of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, Enterohemorrhagic *E.coli* *hlyA*, *rfbO111* and *rfbO157*;.» *J Clin Microbiol.* 1998 Feb;36(2): 598-602.
54. Perelle S, Dilasser F, Grout J, Fach P. 2004. «Detection by 5'-nuclease PCR of Shiga-toxin producing *Escherichia coli* O26, O55, O91, O103, O111, O113, O145 and O157:H7, associated with the world's most frequent clinical cases.» *Molecular and Cellular Probes* 18, 185-192.
55. Perna N.T., Mayhew G.F., Posfai G., Elliott S., Sonnenberg M.S., Kaper J.B., Blattner F.R. 1998. «Molecular evolution of a pathogenicity island from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7.» *Infection and Immunity* , 66: 3810-3817
56. Picozzi C., Foschino R., Heuvelink A., Beumer. 2005 « Phenotypic and genotypic characterization of sorbitol-negative or slow-fermenting (suspected O157) *Escherichia coli* isolated from milk samples in Lombardy region.» *Lett Appl Microbiol.*;40(6): 491-496.
57. Poli G., Cocilovo A.1996 *Microbiologia ed immunologia veterinaria*. UTET.
58. Sandvig K. and van Deurs, B. 1996. «Endocytosis, intracellular transport, and cytotoxic action of Shiga toxin and ricin.» *Physiological Reviews*, 76: 949-966.
59. Schaechte M. 2009. *Encyclopedia of microbiology*. AP Elsevier,
60. Schmidt H., Geitz C., Tarr P. I., Frosch M. and Karch H.1998 . «Non-O157:H7 Pathogenic Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli*: Phenotypic and Genetic Profiling of Virulence Traits and Evidence for Clonality.» *The Journal of Infectious Disease* 115-123.
61. Schmidt, H. 2001. «Shiga-toxin-producing bacteriophages.» *Res Microbiol* 152: 687-695.

62. Schmitt, C.K., McKee M.L. and O'Brein A.D. 1991 «Two copies of Shiga-like toxin II-related genes common in enterohemorrhagic *Escherichia coli* strain are responsible for the antigenic heterogeneity of O157:H- strain E32511.» *Infection and Immunity*, 59, 1065-1073.
63. Serra-Moreno R., Jofre J., and Muniesa M. 2007. «Insertion Site Occupancy by *stx2* Bacteriophages Depends on the Locus Availability of the Host Strain Chromosome.» *Journal Of Bacteriology*, Sept. 2007,,: 6645–6654.
64. Serra-Moreno R., S. Acosta, J. P. Hernalsteens, J. Jofre and M. Muniesa 2006. “Use of the lambda Red recombinase system to produce recombinant prophages carrying antibiotic resistance genes.” *BMC Molecular Biology*, september 2006: 7:31.
65. Sutton M. D., Smith B.T., Godoy V. G., Walker G.C. 2000 «The SOS response: recent insights into umuDC-dependent mutagenesis and DNA damage tolerance.» *Annu. Rev. Genet.* 34: 479-497.
66. University of Texas Medical Branch at Galveston. *Medical Microbiology*. Galveston - Texas: ed. Samuel Baron, 1996.
67. University of Wisconsin-Madison,. [www.genome.wisc.edu](http://www.genome.wisc.edu). . <http://www.genome.wisc.edu/plasmid/po157map.gif> (consultato il giorno 04 01, 2011).
68. Whittam T. S., Marie L. Wolfe, I. Kaye Wachsmuth, Frist Orskov. 1993. «Clonal Relationships among *Escherichia coli* Strains That Cause Hemorrhagic Colitis and Infantile Diarrhea.» *Infection and Immunity*, 1993: may p. 1619-1629.
69. Zhang WL, Kohler B, Oswald E, Beutin L, Karch H, Morabito S, Caprioli A, Suerbaum S, Schmidt H. 2002 «Genetic diversity of intimin genes of attaching and effacing *Escherichia coli* strains.» *J Clin Microbiol.* 40: 4486-4492.
70. Zhao T., Doyle M.P., Shere J., Garber L. 1995. « Prevalence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in a survey of dairy herd.» *Appl. Environ. Microbiol.* 61:1995:1290-1293.

71. Zhou Z., Xiaomin Li, Bin Liu, Lothar Beutin, Jianguo Xu, Yan Ren, Lu Feng, Ruiting Lan. 2010. «Derivation of *Escherichia coli* O157:H7 from Its O55:H7 Precursor.» PLoS ONE [www.plosone.org](http://www.plosone.org) (PLoS ONE | [www.plosone.org](http://www.plosone.org) ), 2010: January, Volume 5, Issue 1.
72. Zhou Z. doi:10.1371/journal.pone.0008700.g001. 04 January 2010. doi:10.1371/journal.pone.0008700.g001 (consultato il giorno January 2010)
73. World Health Organization <http://www.who.int/en>
74. Tort, F.W. 1915. "An Investigation on the Nature of the Ultra-microscopic Viruses".Lancet, ii. 1241.
75. D'Herelle, F. 1917. "Sur un Microbe invisible antagoniste des Bacilles dysenteriques". Compt. rend. Acad. Sc. CLXV. 373.
76. Reiji H., Masakado M., Yoshio M., Yasumoto S., Makoto S. and Yutaka M..2002 "Characterization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O26 Strains and Establishment of Selective Isolation Media for These Strains". Journal of Clinical Microbiology, Mar. 2002, p. 922–925. Vol. 40, No. 3.
77. Y. Hara-Kudo, M. Ikedo, O. Komatsu, S. Yamamoto, S. Kumagai. 2002. "Evaluation of a chromogenic agar medium for isolation of *Escherichia coli* O26". Food Control 13 (2002) 377–379
78. EFSA 2011 "The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009" EFSA Journal 2011;9(3):2090 [378 pp.].

## **RINGRAZIAMENTI**

Vorrei ringraziare tutte le persone che in questi anni hanno permesso di sviluppare la ricerca, in particolar modo il Prof. Marcello Trevisani che oltre ad essere un ottimo tutor è stata una persona che mi ha sempre spronato ad andare avanti, andare sempre oltre le apparenze e fare sempre più.

Ringraziamento particolare va alla dr.ssa Maite Muniesa e il prof. Juan Jofre che mi hanno accolto nel Dipartimento di Microbiologia dell'Università di Barcellona, che mi hanno indirizzato, insegnato e aiutato nell'applicazione di metodiche "innovative" per il campo veterinario.

Un ringraziamento deve andare anche a due persone che mi hanno affiancato e aiutato molto in questi anni, il dr. Rocco Mancusi e la dr.ssa Claudia Costanza.

Non dimenticherò anche il prezioso aiuto della dr.ssa Silvia Alonso Alvarez che ho affiancato all'inizio del mio percorso di ricerca.

Ringraziamento al tutto il personale docente, ricercatore e tecnico del Laboratorio di Prova di Igiene e Tecnologia degli alimenti, in particolar modo al Prof. Rosmini e Loretta.

Ringrazio tutti quelli che ho conosciuto in questi anni, persone che anche solo casualmente sono transitate nei corridoi del laboratori.

Ultimo ma non per importanza è il ringraziamento ai miei genitori, che mi hanno aiutato in ogni momento e difficoltà, che mi hanno sostenuto e ai quali dedico tutto il lavoro che ho svolto!!!