

Alma Mater Studiorum – Università di Bologna

Facoltà di Medicina Veterinaria

Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie
Servizio di Prova di Igiene e Tecnologie Alimentare

DOTTORATO DI RICERCA IN:

**SCIENZE DEGLI ALIMENTI, NUTRIZIONE
ANIMALE E SICUREZZA ALIMENTARE (SANASA)**

XXV ciclo

Settore Concorsuale di afferenza: 07/H2

Settore Scientifico disciplinare: VET 04

**Ricerca di *Escherichia coli* produttori di
verocitotossine e definizione di obiettivi
di performance nella produzione
primaria di alimenti di origine animale**

Relatore: chiar.mo prof. Marcello Trevisani

PRESENTATA DA : dott. ROCCO MANCUSI

Coordinatore dottorato: chiar.mo prof. Roberto Rosmini

Esame finale anno 2013

INDICE

INTRODUZIONE	3
CARATTERIZZAZIONE GENOTIPICA E PATOGENICITA' DEGLI STIPITI DI <i>Escherichia coli</i> PRODUTTORI DI VEROCITOTOSSINE.....	8
RUOLO DEI BATTERIOFAGI VETTORI DI GENI CODIFICANTI PER LE SHIGATOSSINE	13
METODI DI RICERCA DI <i>Escherichia coli</i> PRODUTTORI DI VEROCITOTOSSINE	18
PARTE SPERIMENTALE	27
PRESENZA DI BATTERIOFAGI-STX2 IN <i>Escherichia coli</i> ISOLATI DA PELLI E FILTRI DI LATTE BOVINO E PROVE DI LISOGENIA IN CEPPI EPEC ISOLATI DA ALIMENTI	28
PRESENZA DI <i>Escherichia coli</i> PRODUTTORI DI VEROCITOTOSSINE IN STALLE DI BOVINI DA LATTE ALLEVATI IN EMILIA E LOMBARDIA.....	35
RICERCA, QUANTIFICAZIONE E DISTRIBUZIONE DI <i>Escherichia coli</i> PRODUTTORI DI VEROCITOTOSSINE NEL LATTE CRUDO ALIMENTARE.....	48
UTILIZZO DI UN PROTOCOLLO qPCR PER LA DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DEI VTEC NEL LATTE	57
COMPORTAMENTO E RISISTENZA AL CALORE DEI VTEC NELLA MOZZARELLA DI BUFALA.....	63
BIBLIOGRAFIA.....	72
PUBBLICAZIONI	81
Quantitative detection of Verocytotoxin-producing and enteropathogenic <i>Escherichia coli</i> serotypes O157 and O26 in bulk raw milk.....	81
Detection of verocytotoxigenic <i>Escherichia coli</i> in bovine dairy herds in Northern Italy.....	92
Prove di lisogenia con virus batteriofagi vettori del gene <i>stx2</i> in ceppi Enteropatogeni di <i>Escherichia coli</i> isolati da alimenti	113
PUBBLICAZIONI INERENTI AD ALTRE ATTIVITA' DI RICERCA.....	116
Presenza d'istamina nei prodotti ittici in commercio / Occurrence of histamine in fish products on market.....	117
Histamine-forming bacteria on fish.Evaluation and identification of histamine – forming bacteria on fish products of middle Adriatic Sea / Rilievo ed identificazione di batteri produttori d'istamina in prodotti della pesca del medio Adriatico.....	124

INTRODUZIONE

La presenza di *Escherichia coli* produttori di verocitotossine (VTEC o STEC) rappresenta una tra le più importanti cause di malattia alimentare attualmente presenti in Europa. La sua presenza negli allevamenti di animali destinati alla produzione di alimenti rappresenta un importante rischio per la salute del consumatore. In conseguenza di comuni contaminazioni che si realizzano nel corso della macellazione, della mungitura i VTEC possono essere presenti nelle carni e nel latte e rappresentano un grave rischio se la preparazione per il consumo o i processi di lavorazione non comportano trattamenti in grado d'inattivarli (es. carni crude o poco cotte, latte non pastorizzato, formaggi freschi a latte crudo). La contaminazione dei campi coltivati conseguente alla dispersione di letame o attraverso acque contaminate può veicolare questi stipiti che sono normalmente albergati nell'intestino di ruminanti (domestici e selvatici) e anche prodotti vegetali consumati crudi, succhi e perfino sementi sono stati implicati in gravi episodi di malattia con gravi manifestazioni enteriche e complicazioni in grado di causare quadri patologici gravi e anche la morte. Stipiti di VTEC patogeni ingeriti con gli alimenti possono causare sintomi gastroenterici, con diarrea acquosa o emorragica (nel 50% dei casi), crampi addominali, febbre lieve e in una percentuale più bassa nausea e vomito. In alcuni casi (circa 5-10%) l'infezione gastroenterica si complica con manifestazioni tossiemiche caratterizzate da Sindrome Emolitico Uremica (SEU o HUS) con anemia emolitica, insufficienza renale grave e coinvolgimento neurologico o con una porpora trombotica trombocitopenica. Questi quadri patologici richiedono cure mediche complesse, può rendersi necessaria la dialisi di pazienti colpiti e talvolta si rende necessario il trapianto di rene. Il tasso di mortalità dei pazienti che presentano l'infezione da *E. coli* è inferiore all'1%. Questo valore può raggiungere circa il 20% dei pazienti che presentano la HUS come evoluzione dell'infezione iniziale.

ANNO	N° CASI CONFERMATI	N° CASI HUS	SIEROTIPI COINVOLTI	N° CASI/ 100000 ABITANTI
2006	3458	126	O157: 46,5% non-O157: 53,5%	0,74
2007	2945	103	O157: 57% non-O157: 43%	0,61
2008	3210	146	O157: 53% non-O157: 47%	0,66
2009	3689	242	O157: 52% non-O157: 48%	0,84
2010	4000	222	O157: 41,1% non-O157: 58,9%	0.83
Tabella 1: Andamento infezione da VTEC in Europa (dati ECDC-EFSA)				

I dati forniti dall'ECDC sulle infezioni alimentari nel periodo 2006-2010 hanno evidenziato un trend in leggero aumento del numero di infezioni a partire dal 2007 (figura 1). Il numero dei casi confermati nel 2010 è stato di circa 4000 negli stati membri dell'Unione Europea. Paesi del nord Europa come Gran Bretagna, Germania, Irlanda, Norvegia e Repubblica Ceca rappresentano in media oltre il 70% delle notifiche sul totale. La fascia di età maggiormente soggetta all'infezione da VTEC è compresa tra 0-4 anni con oltre il 60% delle notifiche seguita poi dalla fascia immediatamente successiva compresa tra 5-15 anni. Questi dati fanno focalizzare l'attenzione soprattutto su soggetti in età pediatrica che presentano un rischio significativamente maggiore di sviluppare la malattia. All'interno dei casi confermati il sierotipo maggiormente coinvolto nell'insorgenza della malattia è O157:H7 con oltre il 40% dei casi, seguito da sierotipi non tipizzabili poi da altri principali sierotipi come O26, O91, O103, O111, O145 che sono perciò considerati di particolare interesse per la salute pubblica. La prevalenza della HUS oscilla intorno al 5-7% dei casi totali di infezioni da VTEC (Tabella 1). I casi notificati di HUS mostrano lo stesso trend della malattia e i soggetti maggiormente coinvolti sono quelli in età pediatrica con fasce di età comprese rispettivamente tra 0-4 anni e 5-15 anni. Il sierotipo maggiormente isolato in casi di HUS è O157:H7 con oltre il 50% di isolamenti seguito poi da altri sierotipi di interesse alimentare come O26, O111, O103, O145 ed altri (Figura 2). I dati epidemiologici mostrano una stagionalità dell'infezione, che si manifesta con maggiore frequenza nei mesi caldi dell'anno, che vanno da maggio fino ad ottobre (Figura 3). Un andamento stagionale era stato evidenziato già in studi precedenti (Perry et al.,2000; Rivero et al., 2011).

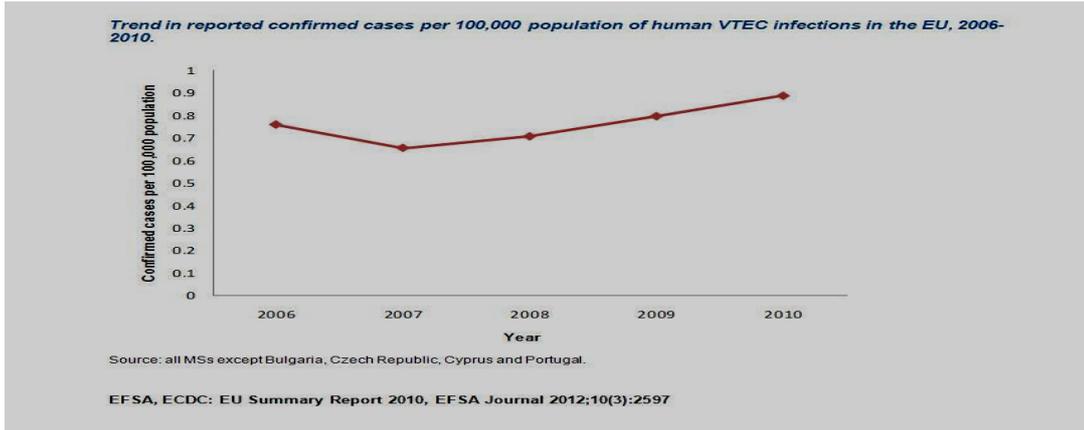
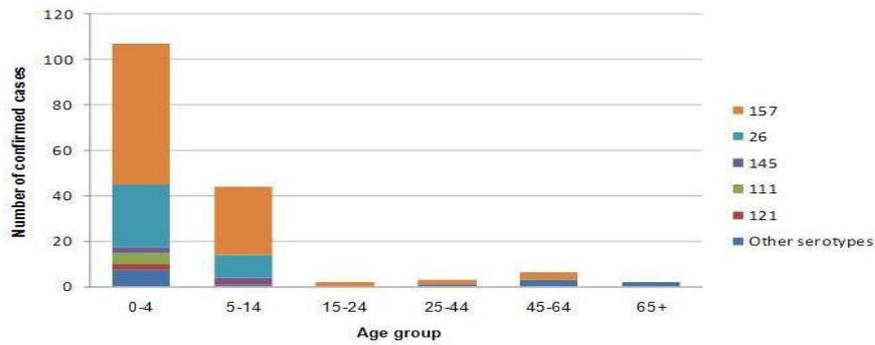


Figura 1: Trend infezioni VTEC nel periodo 2006-2010 (ECDC-EFSA 2012)

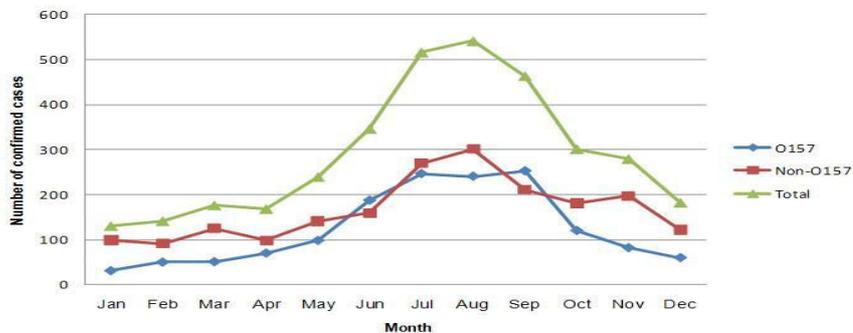
Haemolytic Uraemic Syndrome (HUS) by age and serogroup in reporting Member States, 2010



1. Source: Austria, Belgium, Denmark, France, Germany, Italy, Ireland, Netherlands, Poland, Slovenia, Sweden and United Kingdom (N=222).
EFSA, ECDC: EU Summary Report 2010, EFSA Journal 2012;10(3):2597

Figura 2: Incidenza sierotipi VTEC in HUS per fasce di età nel 2010 (ECDC-EFSA 2012)

Number of reported confirmed cases of VTEC infection in humans by month, TESSy data for reporting Member States, 2010



Source: Austria, Belgium, Denmark, Estonia, Finland, France, Germany, Greece, Hungary, Ireland, Italy, Lithuania, Luxembourg, Malta, Netherlands, Poland, Slovakia, Slovenia, Spain, Sweden and United Kingdom (N=3,553).
EFSA, ECDC: EU Summary Report 2010, EFSA Journal 2012;10(3):2597

Figura 3: Andamento stagionale infezioni VTEC nel 2010 (ECDC-EFSA 2012)

La stagionalità della malattia nell'uomo appare in contrasto con i dati che riguardano l'escrezione di VTEC da parte degli animali infetti, che non mostrano differenze significative nel corso delle stagioni, anche se d'estate sembra ci sia una maggiore concentrazione di *Escherichia coli* nei liquami. Questi dati sono sicuramente influenzati dal tipologia di clima della regione in cui sono stati effettuati gli studi, i quali possono favorire o limitare la crescita del microrganismo (Rhoades et al., 2009). In contrasto con questa ipotesi, Alam et al. (2006) ed Odgen et al. (2004) hanno evidenziato una eliminazione del patogeno costante durante tutte le stagioni con un picco durante la stagione fredda. Sulla base dei dati raccolti il picco di infezioni durante i mesi caldi dell'anno è sicuramente da attribuire ad una modifica delle abitudini alimentari che comportano un aumento notevole del consumo di alimenti di origine animale crudi o poco cotti, il maggiore consumo di ortaggi ed un maggiore contatto con la natura e gli animali (Alam et al., 2006). Nel maggio 2011 si è verificato in Germania un focolaio di infezione da VTEC O104:H4 che ha provocato circa 3778 casi e di questi 750, circa il 25%, complicati dalla HUS con la morte di 44 persone di cui 28 presentavano la HUS (ECDC 2011-b). Questo rappresenta il più importante focolaio di infezione da VTEC verificatosi in Europa e dovuto ad un ceppo che non aveva mai provocato malattia. Il sierotipo O104:H4 presentava anche delle particolarità riguardo ai fattori di virulenza essendo *stx2* positivo ed anche positivo ai fattori di virulenza tipici del *Escherichia coli* enteroaggregativo, mentre si presentava *stx1*, *eae* ed *hly* negativo (EFSA 2011; Bielaszewska M. et al., 2011).

In Italia esiste un sistema di sorveglianza, dal 1988, sulla base di segnalazioni volontarie riguardante le infezioni da VTEC seguita da HUS che vede la collaborazione delle unità di nefrologia pediatrica di diversi ospedali sul territorio nazionale e l'Istituto Superiore di Sanità. I dati raccolti nell'arco temporale compreso tra il 1988 ed il 2010 evidenziano una totale 721 casi registrati ed una incidenza della patologia con una media di circa 35 casi annui ogni 100000 abitanti. La provenienza geografica dei nuovi casi che vede le regioni di Lombardia, Veneto e Campania come quelle che in assoluto hanno notificato il numero maggiore di infezioni. I tassi di incidenza sono maggiori nelle regioni del nord Italia con valori su ogni 100000 abitanti di 1,06 in Valle d'Aosta, 0,57 in Veneto, 0,55 in Piemonte e 0,52 in Lombardia, mentre al centro-sud l'incidenza maggiore si è riscontrata in Campania con 0,39. In questo periodo sono stati individuati focolai epidemici, tra cui uno nel 1992, con 9 casi in Lombardia, uno nel 1993 nel triveneto ed Emilia-Romagna con 15 casi, uno nel 1997 a Napoli con 3 casi ed uno nel 2005 in provincia di Salerno con 3 casi. Nel periodo 1988-2010 ci sono stati anche 17 cluster familiari di infezioni da VTEC. I sintomi prodromici presenti nei pazienti cui è stata poi diagnosticata la HUS erano diarrea emorragica nel 45%

dei casi e diarrea acquosa nel 36% dei casi mentre il 19% dei soggetti non presentavano diarrea. Tra i 721 casi di sindrome emolitico-uremica notificati il sierotipo maggiormente isolato come responsabile della patologia è O157:H7 seguito da altri sierotipi di interesse umano come O26, O111, O103 ed O145. Nel periodo a partire dal 1997 fino al 2006 il sierotipo O26 che è stato isolato con maggiore frequenza rispetto al sierotipo O157:H7. I valori assoluti di isolamento del sierotipo O157 sono stati di nuovo maggiori negli anni 2007 e 2008, mentre si è assistito ad una nuova inversione di questo rapporto di prevalenza nel 2009 e 2010. La sintomatologia principale è data dalla sindrome emolitico-uremica (HUS) nel 75% dei casi circa. Nel 25% di pazienti che non presentavano HUS, il sintomo principale era la diarrea acquosa (40% circa) o diarrea emorragica (33% circa). Nell'ambito di questi studi epidemiologici è stata evidenziata la presenza di *Escherichia coli* produttori di verocitotossine anche in pazienti che non presentavano sintomi clinici. La maggior parte delle notifiche, l'80% circa, riguardava pazienti pediatrici con una età compresa tra 0 e 6 anni di vita (età mediana di 25 mesi) mentre l'incidenza cala tendenzialmente fino ai 15 anni di età per poi calare ulteriormente con il progredire dell'età. E' presente inoltre una leggera prevalenza di soggetti di sesso maschile (52%) rispetto al sesso femminile (48%). Anche in questi dati, in accordo con i dati EFSA e di altri autori, si evince una certa stagionalità dell'incidenza di nuovi casi con picchi che si riscontrano nei mesi caldi ed una decremento di nuove infezioni nei mesi freddi.

CARATTERIZZAZIONE GENOTIPICA E PATOGENICITA' DEGLI STIPITI DI *Escherichia coli* PRODUTTORI DI VEROCITOTOSSINE

L'*Escherichia coli* è un batterio gram-negativo della famiglia delle *Enterobacteriaceae*. Dal punto di vista biochimico presenta la capacità di fermentare il lattosio ed è positivo al test per l'indolo. Gli *Escherichia coli* possono essere classificati in 5 diverse tipologie in base al tipo di comportamento assunto all'interno dell'organismo ospite: *Escherichia coli* enterotossigeni (ETEC), *Escherichia coli* enteroaggregativi (EAEC), *Escherichia coli* enteroinvasivi (EIEC), *Escherichia coli* enteropatogeno (EPEC) e *Escherichia coli* enteroemorragici (EHEC) (Poli et al., 1996; Nataro et al., 1998).

L'importanza di questo batterio nella produzione primaria degli alimenti di origine alimentare è data dalla sua capacità di generare una tossinfezione alimentare causata dalla produzione delle tossine shiga-like (dotate di attività citotossica sulle colture cellulari VERO) (STEC o VTEC) durante la replicazione nell'organismo umano. Questo microrganismo è in grado di produrre due tipi di tossina: *stx1* ed *stx2*. Le due tossine hanno tra loro una omologia di circa il 40%. La *stx1* si presenta altamente conservata risultando del tutto identica alla tossina *Shigella dysenteriae I*, mentre la *stx2* è caratterizzata da una notevole variabilità genetica. Di quest'ultima tossina sono state evidenziate diverse varietà chiamate: *stx2*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2v*, *stx2v_{ha}*, *stx2v_{hb}*, *stx2v_{OX392}*, *stx2v_{OX393}*, *stx2v_{O111}*, *stx2e*, *stx2ev*. Le varietà maggiormente coinvolte in patologia umana sono la *stx2*, *stx2c* e *stx2d*. Le due tossine dal punto di vista genetico originano entrambe da batteriofagi, dei quali i più importanti sono i fagi λ , che si inseriscono all'interno del genoma e conferiscono la capacità al batterio di esprimere e produrre la tossina. L'espressione e la produzione delle due tossine richiede delle condizioni differenti in quanto la *stx1* presenta la necessità, come condizione ottimale, di basse concentrazioni di ferro, mentre per la *stx2* le basse concentrazioni di ferro portano ad una diminuzione dell'espressione genetica e quindi della produzione della tossina. La penetrazione della mucosa intestinale dell'ospite ad opera del batterio avviene grazie ad una serie di fattori di virulenza che ne favoriscono l'attecchimento e la penetrazione. Nell'isola di patogenicità chiamata locus of enterocyte effacement (LEE) viene codificata l'intimina *eae*: una proteina di membrana che favorisce la penetrazione del batterio e causando il fenomeno conosciuto come "adesione ed elisione batterica" (A/E). Ci sono però dei ceppi di VTEC che non presentano l'*eae* e sono comunque in grado di penetrare nella mucosa intestinale dell'ospite attraverso un diversi fattori di aderenze come fimbrie, proteine di membrana

esterne (OMPs) e lipopolisaccaride (LPS). Esistono inoltre altri fattori di virulenza come l'adesina auto agglutinante dello STEC (*saa*) che presenta un'origine genetica di tipo plasmidico e codificata anch'essa nel LEE. Un altro fattore di virulenza molto importante e che sembra favorire l'insorgenza della HUS è l'emolisina codificata dal gene *hly gene* presente all'interno del plasmide pO157. L'*Escherichia coli* presenta oltre 200 sierotipi classificati sulla base della combinazione tra antigene somatico O ed antigene flagellare H. I sierotipi maggiormente coinvolti nella insorgenza di malattie alimentari vengono suddivisi in 2 grosse classi: VTEC O157 e VTEC non-O157. Il batterio causa una patologia gastroenterica associata ad una sindrome emolitico-uremica (HUS) con una sintomatologia che presenta diarrea e colite emorragica, anemia emolitica, porpore trombocitopeniche ed una insufficienza renale. I sintomi sono causati dal tropismo della tossina per il recettore GB₃ di cui sono particolarmente ricche le cellule endoteliali del colon, dei vasi ematici e della corticale del rene. Un importante ruolo nel meccanismo d'azione delle tossine lo rivestono delle citochine pro-infiammatorie come il tumor necrosis factor alpha (TNF- α), l'interleuchina 6 (IL-6), l'interleuchina 1 (IL-1) e l'interleuchina 8 (IL-8) che vengono stimulate dall'attività delle stesse *stx1e stx2* e che aumentano a loro volta l'espressione dei recettori GB₃ sulle cellule bersaglio. Questo meccanismo porta ad esacerbare il danno cellulare e vascolare a livello dei diversi tessuti ed organi. La *stx2e*, legata alla malattia degli edemi del suino, presenta però un tropismo per il recettore GB₄ e sembra pertanto non essere coinvolta in casi di patologia umana. Il meccanismo d'azione della tossina, seppur presentando un bersaglio differente rispetto a tutte le altre varietà, è lo stesso. Uno studio condotto da Keusch *et al.* (1995) ha però evidenziato che la tossina *stx2e* in assenza di recettori GB₄ può comunque legarsi a recettori GB₃. Questa ipotesi è stata poi confermata da uno studio effettuato da Muniesa *et al.*, (2000) che ha isolato in pazienti umani affetti da diarrea il batteriofago codificante per la *stx2e* e che presenta i geni codificanti la tossina in una posizione analoga a quelli presenti negli altri fagi che codificano per le altre varianti della *stx*. La dose infettante necessaria affinché si sviluppi la malattia è molto bassa, nell'ordine di 100 CFU/ml (Calderwood *et al.*, 1996; Nataro *et al.*, 1998; Paton *et al.*, 1998; Farfan *et al.*, 2012; Karch *et al.*, 1999; Paton *et al.*, 2001, Baylis *et al.*, 2008-b).

Il bovino rappresenta il principale serbatoio della patologia in natura in quanto è in grado di albergare il patogeno nel suo intestino in modo del tutto asintomatico. L'infezione da *Escherichia coli* VTEC provoca in questa specie una diarrea transitoria della durata di circa un mese oppure una infezione sub-clinica e successivamente l'animale si presenta clinicamente guarito continuando ad albergare ed eliminare il batterio. Il microorganismo

La ricerca dei VTEC può essere effettuata su diverse tipologie di matrici alimentari sulla base dello scopo della ricerca. Per effettuare uno studio sulla situazione epidemiologica all'interno degli allevamenti possiamo ricercare il patogeno direttamente da tamponi rettali che hanno dato positività con valori compresi tra 0,3-19,7% negli animali stabulati e tra 0,7-27,3% negli animali al pascolo per O157 e valori compresi tra 4,6-55,9 per gli animali stabulati e 4,7-44,8% per gli animali al pascolo per i sierotipi non-O157. Questi dati danno un'idea frequenza di escrezione del patogeno in allevamento (Hussein, 2007). Gli *Escherichia coli* VTEC possono anche essere cercati attraverso tamponi effettuati al livello delle pelli al macello. La cute del bovino imbrattata di feci rappresenta una importante fonte di contaminazione per le carcasse. La prevalenza della contaminazione sulle pelli presentava valori fino al 60% circa sia per il sierotipo O157 che per i sierotipo non-O157 anche se non è stata effettuata una tipizzazione specifica di questi ultimi. La percentuale di positività è più alta sulle pelli che nei tamponi rettali e questo è legato alla tipologia di allevamento che comporta la presenza di deiezioni di diversi animali in uno stesso ambiente in modo tale che più animali, anche non eliminatori, possano venire a contatto con i VTEC eliminati da un animale positivo. Diversi studi hanno dimostrato una stretta correlazione tra la positività delle pelli e la positività delle carcasse e quindi nelle carni provocando così la presenza del patogeno negli alimenti di origine animale e con un conseguente rischio per la salute del consumatore. La percentuale di positività per VTEC sulle carcasse raggiunge valori intorno al 27% per O157 e valori del 55% per i sierotipi non-O157 (Barkocy-Gallagher et al., 2003; Elder et al., 1999). Questi dati sono in accordo con quanto evidenziato da Alonso et al., (2007) in Emilia Romagna riguardo la prevalenza di VTEC O157:H7 su campioni di feci e di carcasse bovine con valori rispettivamente del 24% e dell'11%. Studi effettuati da autori italiani hanno evidenziato valori di positività del 17% per il sierotipo O157 e del 3,5% per sierotipi non-O157 su campioni di feci prelevati dopo la macellazione da animali provenienti dal nord Italia, mentre hanno individuato una prevalenza del 12% per i sierotipi O157 sulle carcasse (Bonardi et al., 2001; Bonardi et al., 2005). Nella carne tritata i valori di isolamento sono per il sierotipo O157 compresi tra 0,1-52,4% e per i sierotipi non-O157 valori 2,5-30% (Hussein, 2007). In Italia gli studi che sono stati eseguiti hanno presentato dei valori di prevalenza del 9% per non-O157 (Parisi et al., 2010), dello 0,43% per O157 (Conedera et al., 2004). La corretta esecuzione delle GMP previste per le operazioni di scuoiamento e di eviscerazione al macello e di preparazione e soprattutto cottura dei prodotti carnei rappresentano la base su cui operare per evitare le contaminazioni e le infezioni. I VTEC

possono rappresentare una importante contaminazione anche del latte e dei prodotti a base di latte crudo. Anche in questo caso l'esecuzione in modo corretto delle GMP durante la routine di mungitura rappresenta il più importante mezzo di prevenzione della contaminazione del latte. La ricerca del patogeno può essere effettuata su diverse matrici a partire dal filtro di latte, dal latte crudo o direttamente sul formaggio. La prevalenza di isolamenti dal batterio nel latte crudo bovino e bufalino secondo Farrokh et al. (2012) presenta una percentuale che oscilla lo 0% ed il 4% con le percentuali più alte che riguardano l'isolamento di sierotipi non-O157, mentre Baylis (2009) riscontra percentuali di isolamento leggermente superiori con valori che raggiungono il 9% per O157 ed il 20% circa per i sierotipi non-O157. Nel latte di pecora e capra in Spagna sono state evidenziate prevalenze di isolamento del 10% circa per i sierotipi non-O157 nel latte da tank di raccolta e valori inferiori all'1% per il sierotipo O157:H7 (Rey et al., 2006). Per quanto riguarda i formaggi la prevalenza dell'isolamento si presenta in linea con i valori del latte crudo con un valore massimo del 13% circa di VTEC non-O157 e valori massimi del 7% circa per O157 (Farrokh et al., 2012; Baylis, 2009). Fach et al. (2001) in Francia nel formaggio prodotto a partire dal latte crudo non pastorizzato ha ottenuto un valore di prevalenza all'isolamento del 30% di VTEC sierotipi non-O157. Lorusso et al. (2009) in Italia hanno ottenuto una prevalenza dello 0,6% su formaggi di bufala a latte crudo isolando un solo VTEC O26 su 160 campioni.

I dati ufficiali circa la contaminazione di diverse matrici alimentari riportati dall'EFSA nel periodo 2006-2010 sono sintetizzati in Tabella 2.

Anche da questi dati si evince che negli alimenti esaminati i sierotipi non-O157 hanno un'incidenza maggiore rispetto al sierotipo O157.

ANNO	CARNE BOVINA	LATTE CRUDO BOVINO	PRODOTTI LATTIERO CASEARI	CARNE ALTRE SPECIE	ALTRI PRODOTTI ALIMENTARI
2006	1,4% su 7058 (0,3 % O157)	0,7% su 2269 (<0,1% O157)	1,1% su 1064 (0,6% O157)	1,5% su 6854 (0,16% O157)	0,7% su 1991 (0% O157)
2007	0,3% su 14115 (0,1% O157)	0,5% su 1079 (0% O157)	0,9% su 2289 (0% O157)	0,4% su 6374 (0,1% O157)	1,7% su 290 (0% O157)
2008	0,3% su 14815 (0,1% O157)	1,7% su 1439 (<0,1% O157)	1,1% su 1138 (0% O157)	0,7% su 6660 (<0,1% O157)	8,2% su 61 (0% O157)
2009	2,3% su 9285 (0,7% O157)	1,2% su 1683 (0% O157)	0,4% su 5628 (<0,1% O157)	3,4% su 55557 (<0,1% O157)	3,2% su 248 (0% O157)
2010	0,5% su 8566 (0,1% O157)	3,3% su 1683 (0% O157)	0,3% su 2704 (0% O157)	0,6% su 5800 (<0,1% O157)	7,4% su 390 (0% O157)

Tabella 2: Valori di VTEC isolati in percentuale sulla base del tipo di prodotto e al numero di campioni. Tra parentesi la percentuale di VTEC O157 rispetto al totale dei VTEC (DATI EFSA 2006-2010).

RUOLO DEI BATTERIOFAGI VETTORI DI GENI CODIFICANTI PER LE SHIGATOSSINE

I batteriofagi o fagi sono dei virus specifici dei batteri chiamati così perché considerati dei “mangiatori” di batteri. I primi studiosi che ipotizzarono la loro esistenza furono F.W. Twort nel 1915 e da F. d'Herelle nel 1917 che notarono delle modificazioni a carico di colture batteriche in brodo o su piastra come la scomparsa della torbidità dei brodi di arricchimento batterici, la dissoluzione di colonie batteriche e la formazione di placche di lisi su piastre batteriche. Questa ipotesi fu poi confermata agli inizi degli anni '40 con l'avvento del microscopio elettronico. Come tutti gli altri organismi viventi possono essere classificati in modo diverso in base a:

- caratteristiche morfologiche;
- caratteristiche genetiche;
- tipo di infezione causata al batterio ospite.

Da un punto di vista morfologico i fagi sono costituiti da una testa sotto la quale è presente un collo e cui è legata la coda caratterizzata dalla presenza di una base con fimbrie ed aculei necessari all'adesione al batterio. Sono presenti 5 gruppi di batteriofagi classificati su base morfologica: i fagi caudati con forma icosaedrica, i fagi con coda contrattile, i fagi con coda non contrattile, i fagi filamentosi ed i fagi provvisti di envelope. Di questi il gruppo maggiormente complesso è composto dal gruppo dei fagi con coda contrattile.

Geneticamente possiamo classificare i batteriofagi in base alle caratteristiche del loro patrimonio genetico:

- doppio filamento di DNA lineare (ds DNA): a questo gruppo appartengono le famiglie *Myoviridae*, sono gli unici che hanno code contrattili, *Siphoviridae*, *Podoviridae*, *Sndv-like viruses*, *Lipothrixviridae*, *Corticoviridae*, *Plasmaviridae*, *Tectiviridae*, *Furolloviridae* e *Rudiviridae*. A questo gruppo fanno capo la maggior parte di batteriofagi vettori delle STX2;
- singolo filamento di DNA circolare (ss DNA): a questo gruppo appartengono le famiglie *Microviridae*, *Inoviridae-Plectrovirus* ed *Inoviridae-Inovirus*;
- doppio filamento di RNA (ds RNA): a cui appartiene la famiglia *Cystoviridae* caratterizzata dalla presenza dell'envelope;
- singolo filamento di RNA (SS RNA): a cui appartiene la famiglia *Leviviridae*.

La genetica dei batteriofagi dà luogo anche ad una classificazione degli stessi geni virali sulla base di diversi punti di vista attraverso cui viene valutato il patrimonio genetico virale e può

essere: funzionale in base al fatto che i geni possono dar luogo un espressione prettamente batterica o ad una espressione di fattori prodotti durante l'infezione fagica o ad una espressioni di geni tipicamente fagica; evolucionistica basata sulla capacità dei geni di co-evolvere insieme alle loro molecole; filogenetica basata sulla provenienza stessa dei geni che possono essere una evoluzione del genoma fagico o derivare da tratti di genoma batterico in seguito a clivaggi genici o essere il prodotto di ricombinazioni geniche; metabolica in base a come il fago si integra o modifica le caratteristiche metaboliche dell'ospite e genetica in base quanto i geni codificati dal genoma fagico risultano essenziali per la vita dello stesso virus.

Il batteriofago una volta penetrato nel batterio ospite può dar luogo a 6 diverse tipologie di infezioni:

- lisi: in cui vi è la replicazione del genoma fagico che esita nella liberazione di nuovi batteriofagi in seguito alla distruzione, e quindi alla morte, del batterio ospite;
- cronica: in cui è presente sia la replicazione del genoma fagico che la replicazione del genoma batterico e che vede come risultato finale le liberazione di particelle fagiche senza la distruzione del batterio ospite;
- lisogenia: in cui è presente la replicazione sia del genoma fagico sia del genoma batterico ma senza la liberazione di particelle fagiche vitali e con la sopravvivenza di entrambi gli organismi viventi;
- pseudo-lisogenia: in cui è presente la replicazione del solo genoma batterico me che è caratterizzata dalla sopravvivenza del fago;
- ristretta: in cui il batteriofago viene ucciso da sistemi batterici diretti o indiretti con sopravvivenza del solo batterio;
- abortiva: in cui vi è la morte di entrambi gli organismi (Poli et al., 1996; Schaechter, 2009; Prescott et al., 2002; Abedon 2008).

Tra questi sei tipi di infezione le due più studiate sono il ciclo litico ed il ciclo lisogeno. Il ciclo litico ha la finalità di rilasciare nell'ambiente esterno il maggior numero possibile di particelle fagiche che andranno in un secondo momento ad infettare altri batteri ospiti con l'effetto della completa distruzione dell'ospite. Questo meccanismo si instaura nel momento in cui il fago individua l'assenza di sostanze nutritive nel'ambiente esterno oppure in seguito al rilascio da particolari molecole da parte dell'ospite che possono modificare l'ambiente esterno. Il meccanismo di lisi prevede l'attività di due proteine: l'olina che ha una funzione di controllo e di modulazione della lisi e l'endolisina o liozima che in un primo momento di accumula all'interno del citoplasma batterico e successivamente al contatto con la parete

batterica buca la parete stessa consentendo la fuoriuscita dei fagi. Esistono anche altri due meccanismi di lisi cellulare: il primo dato dalla produzione di una proteina virale che inibisce la sintesi della parete batterica con conseguente lisi osmotica e da un altro meccanismo, invece, legato all'infezione contemporanea adsorbimento di più fagi su uno stesso batterio che indebolisce la parete cellulare dell'ospite provocandone la lisi. Questo tipo di ciclo è tipico di batteriofagi altamente virulenti. Il ciclo lisogeno, invece, ha come finalità quella di consentire la sopravvivenza del fago all'interno del batterio senza la liberazione di particelle fagiche nell'ambiente esterno. Il ciclo si instaura in seguito all'adsorbimento della piastra basale del fago sulla parete cellulare dell'ospite in corrispondenza di specifici recettori di membrana formando un legame irreversibile. L'inoculazione del genoma in forma circolare all'interno dell'ospite è il punto di partenza della lisogenia. L'integrazione genomica avviene in punti specifici del DNA batterico all'interno di uno specifico cromosoma grazie all'azione di enzimi fagici di integrazione che operano un clivaggio dei geni dell'ospite per consentire l'inserzione mentre degli enzimi di escissione consentono al genoma fagico di staccarsi dai punti di inserzione. I batteriofagi che sono caratterizzati da questo tipo di ciclo prendono il nome di fagi temperato ed il batterio ospite prende il nome di batterio lisogeno. Quando il fago si presenta integrato all'interno del genoma dell'ospite e replica grazie alla duplicazione del dna di quest'ultimo prende il nome di profago. Al fine di perseverare nello stato di lisogenia il batteriofago produce una serie di proteine che inibiscono la trascrizione dei geni che sintetizzano le proteine responsabile dell'instaurarsi di un ciclo litico. Inoltre queste proteine sono responsabili di modificazioni a carico degli antigeni di superficie ed in seguito a queste modifiche diventa impossibile per altri fagi dello stesso tipo integrarsi all'interno del genoma del lisogeno bloccando di fatto il fenomeno della superinfezione fagica. I fagi λ sono tipicamente dei fagi temperati e sono i più importanti vettori della *stx2*. Esistono poi altri fagi detti "fagi Mu" che si inseriscono, invece, in un punto casuale del genoma batterico provocando delle mutazione all'ospite che hanno come conseguenza la morte dello stesso ospite in seguito ad una alterazione cromosomica che rende impossibile la sopravvivenza (Prescott et al., 2002; Schaechter, 2009; Abedon 2008).

Il passaggio da ciclo lisogeno a ciclo litico si ha nel momento in cui si attiva il sistema di SOS batterico. Questo sistema si attiva in risposta ad un danno al DNA batterico ed ha come scopo quello di riparare il danno genomico. Il meccanismo è regolato dall'attività di geni che codifica per due importanti proteine: *recA* che ha una funzione di attivatore del sistema e *lexA* che invece ha una funzione di repressione. In seguito al danno cellulare *recA* forma un legame con il ssDNA danneggiato e questo legame porta al clivaggio dei geni codificanti per *lexA*,

attraverso un altro gene il *dinI*, con conseguente disattivazione del sistema di repressione regolato da questo gene. Nel sistema di repressione un'altra proteina molto importante è la *cI*. Nei ceppi di *Escherichia coli* infettati dai fagi l'attivazione del gene *cI* porta all'attivazione dell'espressione delle parti silenti del genoma fagico con conseguente espressione della *stx* e con induzione del ciclo litico. Pertanto fino a quando la proteina *recA* resta attiva vi è l'espressione e la produzione delle *stx2*. E' stato inoltre dimostrato che una mutazione a carico del gene *recA* porta alla perdita della virulenza di ceppi VTEC in quanto non sono in grado di produrre la tossina (Butala et al., 2009; Kimmitt et al., 2000; Schmidt, 2001; Sutton et al., 2000; Schaechter, 2009). Kimmit al el. (2000) hanno inoltre correlato in modo direttamente proporzionale l'espressione della *stx2* con l'attività dell'enzima β -galattosidasi. Il danno al DNA può essere causato dall'azione di antibiotici come chinoloni, trimethoprim o mitomicina C o da altre pressioni o da UV. Sembra inoltre che ci sia un aumento della sintomatologia clinica in pazienti infetti da VTEC trattati con antibiotici rispetto a pazienti che invece non vengono sottoposti a trattamento con antibiotici. Altri antibiotici come la rifampicina e il metronidazolo, invece, sembra non inducano il sistema SOS batterico e non conducono alla produzione delle *stx* (Ochoa et al., 2007; Kimmitt et al., 2000).

Il sistema di penetrazione e replicazione all'interno dei batteri seguiti dalla successiva fuoriuscita dei batteriofagi dai batteri ospiti prevede una serie di 4 passaggi che avvengono in sequenza ben definita: l'adsorbimento, la replicazione del genoma fagico, l'assemblaggio della struttura del fago e infine, la fuoriuscita del fago all'esterno. L'adsorbimento avviene grazie all'interazione specifica tra la base del fago e le strutture antigeniche presenti sulla membrana cellulare del batterio. Pili, fimbrie, proteine o lipopolisaccaridi possono essere utilizzati come antigeni ed il legame con queste strutture è mediato da modificazioni biochimiche che coinvolgono gli ioni Ca^{2+} e Mg^{2+} . Una volta avvenuto il legame irreversibile la coda rilascia delle sostanze che favoriscono la formazione di un buco nella parete batterica ed in seguito vi è una contrazione della coda stessa, nei virus che presentano coda contrattile, che consente il rilascio del genoma fagico dalla testa all'interno del citoplasma batterico. A questo punto il fago provoca una serie di modificazioni biochimiche che portano alla replicazione del genoma virale piuttosto che del genoma batterico. In seguito alla replicazione del genoma virale ed a partire da quest'ultimo inizia la fase di sintesi delle diverse strutture virali che avviene in parallelo. La prima struttura sintetizzata è la base alla quale viene poi aggiunta la coda. In contemporanea viene sintetizzato il pro-capside virale all'interno del quale viene impacchettato il genoma del fago e in seguito a questo fenomeno si ha la maturazione in capsidi. Il capsido viene poi unito alla coda attraverso strutture proteiche che

vanno a formare il colletto. Soltanto alla fine vengono uniti alla base della coda le fimbrie del fago. Una volta che il virus risulta essere strutturalmente completo il virus induce il ciclo litico che consente la fuoriuscita delle particelle fagiche nell'ambiente esterno.

METODI DI RICERCA DI *Escherichia coli* PRODUTTORI DI VEROCITOTOSSINE

La presenza di *Escherichia coli* produttori di verocitotossine può essere individuata con diverse metodologie di laboratorio. E' necessario considerare la presenza di fattori confondenti connessi al tipo di matrice e il limite di sensibilità della procedura che, nel caso dei VTEC richiede criteri di conferma basati sulla dimostrazione dei fattori di virulenza e la caratterizzazione del sierotipo e del genotipo (Conedera et al.,2004; Vimont et al., 2006; Baylis, 2009), poiché ci sono alcuni genotipi/patotipi che sono prevalentemente implicati nei casi di malattia dell'uomo (ECDC/EFSA2012; Tozzi et al.,2003; Nataro et al.,1998). La ricerca dei VTEC d'interesse prevalente per la salute pubblica è perciò mirata all'evidenziazione di questi. La prima cosa da fare è individuare il tipo di matrice per poi passare alla scelta della metodologia che si presenta maggiormente appropriata. I metodi utilizzati nelle procedure analitiche comprendono metodi colturali, sierologici e metodi biomolecolari per la caratterizzazione del genotipo/patotipo e dell'espressione genetica, compresa l'individuazione della verocitotossina con tecniche colturali o immunologiche. Le diverse tecniche possono focalizzarsi sulla ricerca diretta dei batteri o sulla ricerca della tossina. Il report EFSA "Technical specifications for the monitoring and reporting of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) on animals and food (VTEC surveys on animals and food)" (2009-b) ha come finalità quella di armonizzare i metodi di ricerca del VTEC negli stati membri dell'Unione Europea. La ricerca del VTEC si focalizza su due grosse categorie di matrici: le pelli degli animali/le feci ed i prodotti alimentari. Per le principali tipologie di campioni sono date le linee guida per la ricerca di *E. coli* verocitotossici del sierotipo O157 e dei sierotipi non-O157. Alla data della emanazione delle linee guida EFSA, solo per il sierotipo O157 era già disponibile un metodo analitico validato (ISO 16654:2001) per la ricerca negli alimenti di origine animale. Per la ricerca dei *Escherichia coli* non-O157 è consigliato l'utilizzo di m-TSB+16 mg/l di novobiocina oppure per i prodotti lattiero-caseari è consigliato il BPW+12 mg/l di acri flavina mentre per il prodotti congelati è consigliato il solo BPW incubati a 37°C per 18 ore (Figura 5). Per quanto riguarda la ricerca del VTEC su campioni di pelle (o vello) vi è solo la modifica del brodo di arricchimento dove viene proposto il BPW sia per il sierotipo O157 che per i sierotipi non-O157 e per questi ultimi anche la modifica del protocollo successivo (Figura 6). L'isolamento da alimenti di origine

animale prevede due diversi protocolli a seconda che si voglia individuare il ceppo O157 o i ceppi non-O157. Per il sierotipo O157 dopo un arricchimento a 41,5°C per 6h e 18h in mTSB+novobiocina 20mg/l (mTSB+N 20mg/l) è prevista l'immuno-separazione magnetica (IMS) e la successiva semina su CT-SMAC e un secondo terreno cromogeno. Dopo incubazione per 18h a 37°C le colonie tipiche (ma anche quelle atipiche sorbitolo positive) sono saggiate per la conferma del sierotipo e la caratterizzazione genetica per l'individuazione delle sequenze geniche specifiche *stx1*, *stx2* ed *eae*. Per i sierotipi non-O157 l'arricchimento è fatto a temperature più basse (37°C per 18h) poiché studi precedenti avevano dimostrato che queste sono le condizioni ottimali di crescita e molti stipiti sono inibiti da temperature prossime a 41,5-44°C. La scelta dei brodi d'arricchimento indicati varia in funzione della matrice campionaria (Figura 6). In particolare è indicato l'uso di un arricchimento selettivo in mTSB con novobiocina a concentrazione pari a 16 mg/l per i campioni di pelle che presentano una maggiore concentrazione di enterobatteri potenzialmente interferenti con l'isolamento dei ceppi E. coli d'interesse, mentre per le matrici alimentari meno contaminate da batteri enterici e ricche di batteri lattici (latte e alimenti a base di latte) è indicato l'uso di fattori selettivi quali l'acriflavina in un terreno di arricchimento BPW. Al fine di raggiungere una sensibilità adeguata, anche per i sierotipi non O157 la ricerca richiede l'uso di tecniche d'immunoseparazione per concentrare e selezionare i batteri d'interesse, ma per evitare un impegno non necessario di risorse è consigliato uno screening PCR per la ricerca dei geni *stx1*, *stx2* ed *eae*. In caso di positività si procede ad un secondo screening per la ricerca dei geni specifici per i sierotipi di maggiore importanza dal punto di vista epidemiologico e quindi alle procedure d'immunoseparazione (IMS) specifica. Le immunobeads sono quindi seminate su terreni selettivi e differenziali per l'isolamento di *Escherichia coli* (Nielsen et al., 2003; Perelle et al., 2004; Perelle et al., 2005; Karch et al., 1996; Verstaete et al., 2012;).

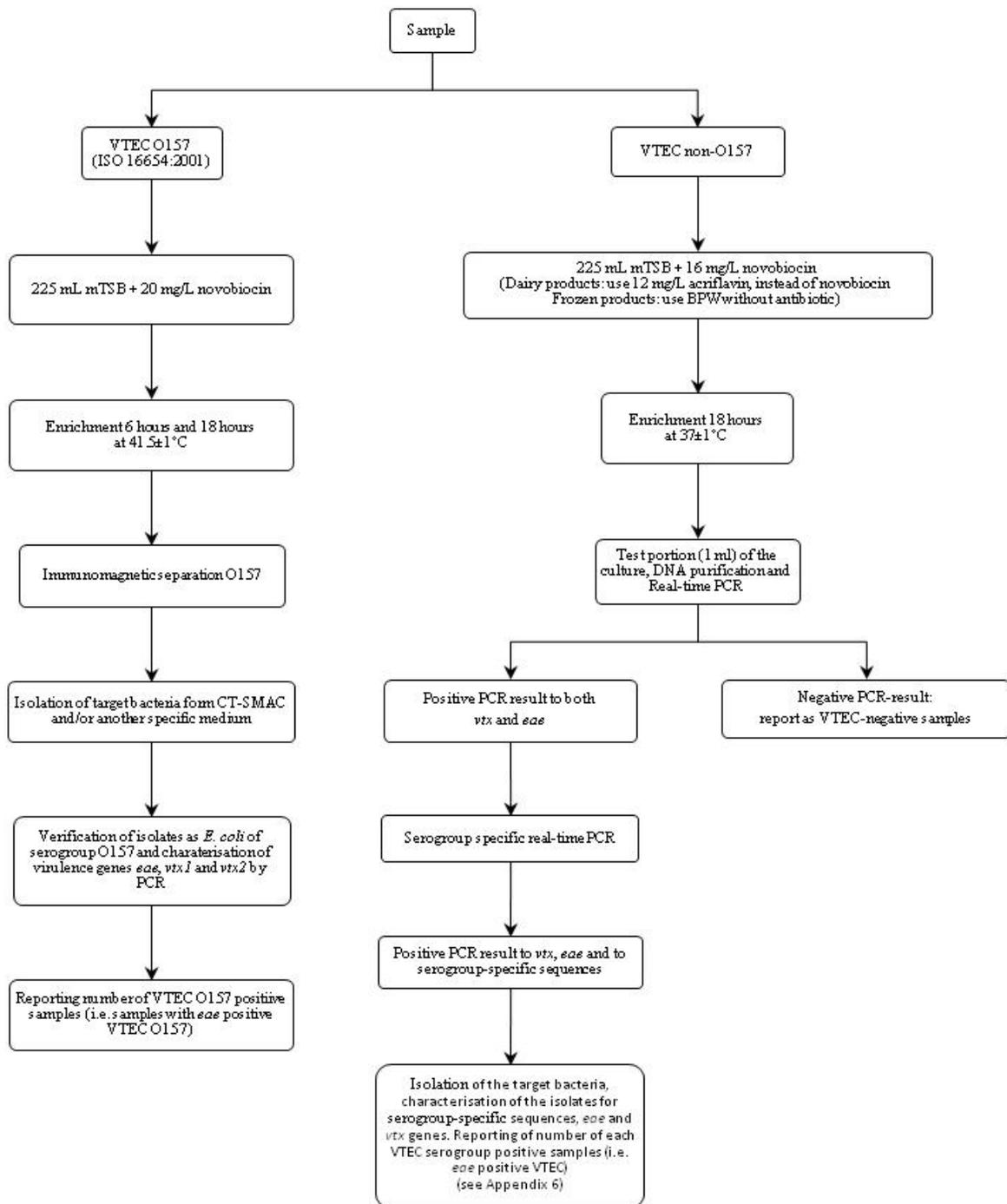


FIGURA 5: Schema di isolamento di VTEC da matrici alimentari (EFSA 2009-b)

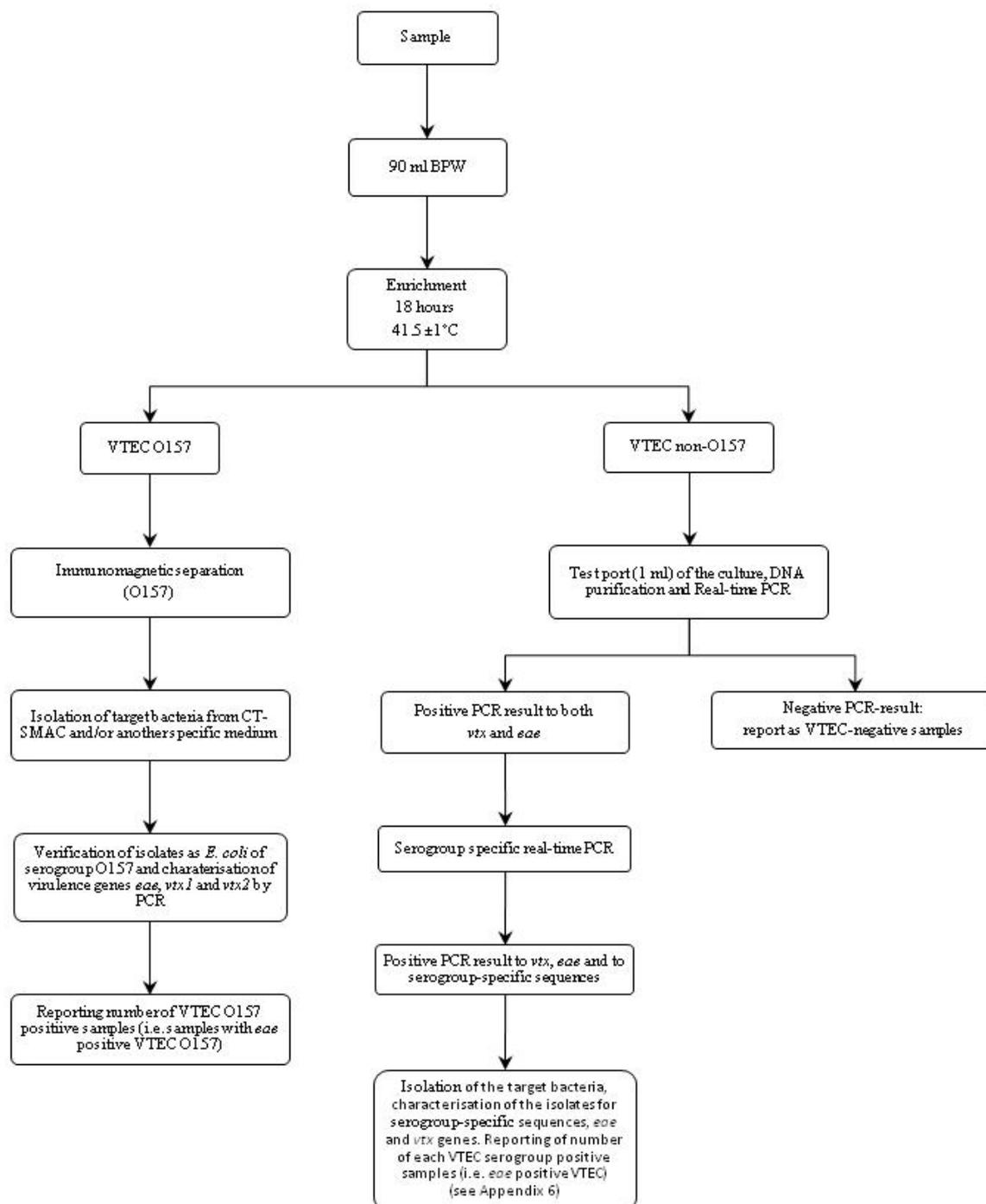


FIGURA 6: Schema di isolamento di VTEC da pelli e velli animali (EFSA 2009-b)

La sensibilità dei diversi ceppi VTEC ai fattori selettivi impiegati nei terreni di arricchimento è stata studiata da diversi ricercatori. In particolare è stata riconosciuta la necessità di utilizzare terreni selettivi contenenti sali biliari con una concentrazione più bassa (1,12 g/l) di quella comunemente utilizzata nel terreno EC broth (Szabo et al. 1986). La presenza di antibiotici (in particolare novobiocina) nella formulazione del terreno ha la finalità di limitare lo sviluppo della flora interferente e di favorire il massimo accrescimento dei VTEC (Baylis, 2008-a). Diversi studi hanno però evidenziato che la presenza di antibiotici può avere un effetto inibitorio, rendendo meno probabile l'isolamento. Sono perciò consigliabili (eventualmente in parallelo) procedure che utilizzano terreni di arricchimento non selettivi o provatamente non selettivi per gli stipiti d'interesse, quali TSB, mTSB, BPW, ECb che non presentano antibiotici. Un fattore fondamentale è anche lo stato fisiologico dei VTEC nella matrice. In seguito a stress differenti, quali esposizione ad acidi organici, trattamenti termici subletali, *E. coli* produttori di verocitotossine potrebbero non essere in grado di moltiplicare in presenza di alcuni fattori selettivi artificiali presenti nei terreni colturali e richiederebbero una fase di pre-arricchimento. Sulla base di diversi studi la scelta di quale brodo di arricchimento deve essere accurata valutando a fondo la possibilità o meno di quale e quanto antibiotico utilizzare al fine di evitare una alterazione del risultato finale che esita in falsi negativi. In casi di campioni provenienti da condizioni particolarmente stressanti è più opportuna la scelta di brodi di coltura privi di antibiotici che possono essere più o meno ricchi di sostanze nutritive (Jasson et al., 2007; Jasson et al., 2009; Vimont et al., 2006; Vimont et al., 2007). In seguito alla IMS le beads vengono seminati su piastre e la tipologia di terreno utilizzato rappresenta un importante aiuto nel discriminare le colonie di *Escherichia coli* presunti VTEC dalla flora contaminante grazie ad alcune particolari proprietà biochimiche proprie di particolari sierotipi come O157 ed O26. La maggior parte dei VTEC O157 presenta due importanti peculiarità che lo differenziano notevolmente dagli altri *Escherichia coli*: è β -glucuronidasi (GUD) negativo ed è incapace di fermentare il sorbitolo su sorbitol MacConkey agar (SMAC). La mancanza di attività dell'enzima β -glucuronidasi è legata ad una mutazione del gene *gusA* (Monday et al., 2001) sebbene sono stati segnalati casi di isolamento di VTEC O157 GUD positivi negli Stati Uniti ed in Giappone (Hayes et al., 1995; Nagano et al., 2002). L'incapacità di fermentare il sorbitolo in seguito ad una incubazione overnight sullo SMAC è una caratteristica del 60% dei VTEC correlati con la patologia umana. L'utilizzo di questo terreno facilita la ricerca del patogeno ma non conferisce la certezza assoluta del riconoscimento in quanto il 40% dei O157 risultano essere sorbitolo fermentanti (SF O157) oltre che GUD positivi. Questi SF O157 non sono mobili (H negativi),

sono caratterizzati dalla presenza della sola *stx2* e sono sensibili all'attività della tellurite (Karch et al., 2001). Stipiti VTEC O26 isolati dalla maggior parte dei casi clinici hanno come caratteristica l'incapacità di fermentare il ramnosio e perciò la loro individuazione è favorita dall'impiego di terreni che sono in grado di differenziare gli isolati in base a questa caratteristica, ad esempio il rhamnose MacConkey agar (RMAC). A differenza del O157 questa caratteristica biochimica è propria di oltre il 90% di VTEC O26 e si può procedere con una maggiore probabilità al riconoscimento del patogeno dopo semina su RMAC (Hiramatsu et al., 2002; Evans et al., 2008). Sia al terreno SMAC che all' RMAC possono essere aggiunti supplementi selettivi per favorire lo sviluppo selettivo del VTEC come il cefixime ed il potassio-tellurite (CT supplement) ad una concentrazione di 0,05mg/l e di 2,5 mg/l rispettivamente dando luogo alla formazione del CT-SMAC e CT-RMAC.

Anche in questo caso l'utilizzo di antibiotici può rappresentare un rischio di risultati falsi negativi. E' stato dimostrato che la resistenza all'attività del potassio-tellurite sia legata all'attività del gene *ter* che codifica per la resistenza nei confronti di questo antibiotico (Orth et al., 2007).

Per gli altri sierotipi non-O157 e per aumentare la sensibilità della metodica esistono altri terreni che sono in grado di discriminare con buona probabilità gli *Escherichia coli* da altri come il MacConkey agar (MAC) che consente di differenziarli in base alla loro capacità di fermentare il lattosio formando delle colonie rosse ed il tryptone bile X-glucuronide (TBX) che presenta gli *E. coli* GUD positivi di colore verde-blu dopo incubazione. Entrambi questi terreni presentano una concentrazione di 1,5 g/l di sali biliari che hanno un effetto inibitore sullo sviluppo di batteri Gram-positivi.

Il metodo attualmente più utilizzato per la concentrazione dei batteri è la immuno-separazione magnetica (IMS) che consiste nell'utilizzare della beads magnetiche rivestite dai anticorpi in grado di complessarsi agli antigeni somatici di membrana di sierogruppi specifici. L'utilizzo di questa metodica consente l'isolamento di VTEC fino ad una concentrazione di 10^2 con la presenza di una flora interferente di 10^7 (Karch et al., 1996). In realtà bisogna considerare il fatto che le beads legano in modo aspecifico anche altri batteri contaminanti e sono perciò necessari lavaggi per cercare di ripulire, il più possibile, le beads dai batteri interferenti, senza causare il distacco (e la riduzione del recupero) dei batteri target. Reazioni sierologiche crociate sono state descritte con altri batteri come *Citrobacter freundii*, *Citrobacter sedlakii*, *Escherichia hermannii*, *Salmonella* del gruppo N legate alla somiglianza tra la struttura del LPS del VTEC O157 ed il LPS di queste specie (Rice et al. 1992; Bettelheim et al. 1993; Vinogradov et al. 2000). Questo potrebbe dare luogo a legami aspecifici con altri batteri che

non sono quello target. In seguito a questi non sempre i lavaggi previsti consentono l'eliminazione completa dei batteri interferenti, che nel caso di matrici fortemente contaminate riducono la possibilità di isolamento. E' necessario in seguito alla immunoseparazione fare una semina su terreni che consentono la differenziazione degli *Escherichia coli* dagli altri batteri e lo screening con metodi di agglutinazione sierospecifica o analisi del genotipo (sequenze specifiche per il sierogruppo) in modo tale da poterli riconoscere i batteri target.

La ricerca dei geni dei VTEC è perciò consigliata sia come screening che per la conferma degli isolati. Un metodo convenientemente utilizzato si basa sulla individuazione del genotipo specifico del sierogruppo mediante polimerase chain reaction. La procedura può essere attuata anche come screening su pool di colonie, considerata la estrema sensibilità e specificità.-Gli isolati confermati devono successivamente essere caratterizzati per la presenza di fattori di virulenza quali *stx*, *eae* ed *hly* Sono stati studiati diversi primers che amplificano sequenze genetiche di punti differenti del genoma dei VTEC sulla base delle diverse esigenze (Karch e Mayer, 1989; Paton e Paton, 1998; Perelle et al., 2004). La PCR classica da una risposta solamente di tipo qualitativo consentendo di verificare la presenza o assenza di una determinata sequenza genetica all'interno del nostro campione. Inoltre rispetto ad altre metodiche colturali consente di ottenere un risultato di positività o negatività in tempi molto più rapidi. Come metodo presenta però alcuni piccoli svantaggi la moltiplicazione di genoma viene effettuata senza distinguere se proviene da cellule vive e vitali oppure se proveniente da cellule morte. In aggiunta per poter leggere il risultato c'è bisogno di effettuare una corsa elettroforetica dell'amplicone in agarosio. Necessita quindi di tempi di esecuzione piuttosto lunghi se paragonati a quelli necessari per altri tipi di PCR come la real-time PCR (PCR-rt) in quanto i suoi prodotti amplificano sequenze molto lunghe di DNA (Powledge, 2004).

La real-time PCR ha rispetto alla PCR tradizionale dei vantaggi molto importanti e che danno alcune informazioni aggiuntive. Il primo di questi è sicuramente il fatto che la PCR-rt da una risposta di tipo sia qualitativa che quantitativa. La quantificazione consente di conoscere, basandosi su delle precedenti misurazione di VTEC usati come standard, anche la concentrazione dei VTEC all'interno del nostro campione.

Durante la fase di screening, conoscere la quantità del batterio che si vuole isolare è molto importante perché consente, tra le altre cose, di valutare la capacità di moltiplicazione dei batteri target e quindi la loro vitalità. Infatti è possibile che l'amplificazione del DNA sia dovuta alla presenza di cellule non vitali, ma in tal caso la reazione PCR che utilizza come template gli estratti DNA delle colture d'arricchimento darebbe positività (superamento del

valore soglia del segnale) dopo un numero di cicli molto alto (35-40). Queste positività molto basse potrebbero essere un indice del fatto che il batterio non è cresciuto durante l'arricchimento perché morto o non vitale. Non deve essere trascurata tuttavia la presenza di fattori in grado d'inibire la PCR. I fattori inibenti la PCR possono essere molteplici e possiamo classificarli in fattori che abbassano la sensibilità della ricerca del DNA, fattori legati ad una condizione non ottimale di reazione e in fattori contaminanti. Questi ultimi possono essere considerati endogeni (legati ai componenti della reazione) o esogeni (contaminanti, polveri o polline). Il meccanismo dell'inibizione può essere legato ad una mancanza della lisi batterica durante l'estrazione che inibisce la replicazione del DNA target, ad una degradazione enzimatica del DNA batterico o ad un legame con di quest'ultimo con sostanze inibenti oppure una inibizione della polimerasi. Le matrici alimentari possono veicolare diverse sostanze inibenti che possono direttamente originare dalla loro struttura molecolare (componenti organici e fenolici, Ca^{++} , glicogeno e grassi) o che possono originare dall'ambiente esterno (componenti fenolici, acido umico e metalli pesanti) (Wilson, 1997). Un vantaggio della real-time PCR sta nel fatto che consente di visualizzare il risultato in tempo reale senza la necessità di separare e individuare gli ampliconi mediante elettroforesi in gel di agarosio e marcatura del DNA. I primers utilizzati per la real-time PCR devono essere tuttavia più corti di quelli impiegati per la PCR convenzionale e la specificità dell'amplicone deve essere riconosciuta attraverso tecniche quali l'ibridazione con sonde marcate (es. TAQMAN) o attraverso analisi della melting curve (profilo della temperatura di dissociazione degli ampliconi prodotti). Al fine di escludere la presenza di risultati positivi in presenza di VTEC non vitali (Kubista et al., 2006; Valasek, 2005; Wilhelm et al., 2003) è indicato il ricorso a metodi molecolari di espressione genica. La produzione di sequenze mRNA di geni espressi solo in fase di moltiplicazione batterica può essere riconosciuta mediante la tecnica reverse-transcriptase PCR (RT-PCR). La metodica di estrazione dell'm-RNA si presenta però molto più lunga e complessa rispetto a quella necessaria per il DNA. Inoltre l'RNA è facilmente degradato da enzimi comunemente presenti negli estratti dei campioni e la procedura deve perciò prevedere una attenta purificazione. La RT-PCR richiede la produzione di DNA complementare (cDNA) all'mRNA, che successivamente può essere amplificato come già descritto per la real-time PCR. Il passaggio di trascrizione dell'RNA può essere fatto in un passaggio che precede la PCR (/tecnica a due step) oppure nel corso di reazioni successive in una mix precostituita (single step) (Bustin, 2002; Di, 2008; Sheridan et al, 1998).

La ricerca del DNA o del RNA potrebbe essere effettuata anche utilizzando tecniche di blotting. Con queste tecniche il genoma batterico può essere fissato a membrane specifiche

(es. mediante colony lift) e successivamente sonde DNA marcate possono essere fatte reagire attraverso tecniche d'ibridazione. La tecnica colony-lift DNA hybridization ha il vantaggio di permettere il riconoscimento di colonie isolate cresciute nelle colture selettive, ma ha lo svantaggio di essere poco efficiente in presenza di campioni fortemente contaminati da specie interferenti (in grado di mascherare la presenza dei batteri target). Nel corso di studi da noi fatti (Trevisani et al., under revision) abbiamo evidenziato la difficoltà di rilevare la presenza di VTEC in campioni di filtro di latte. Teoricamente in funzione delle dimensioni delle piastre di agar il numero complessivo di batteri che possono essere isolati non deve essere superiore a 300-1000 UFC e deve esserci la presenza nell'aliquota di semina del campione di almeno 1 UFC dei batteri target (es. VTEC). In genere questo tipo di ricerca si focalizza sui geni che codificano per la tossina (Olive et al.,1999; Tayburn, 1996; Kimmitt et al.,1999; Kimmitt et al.,2000; Karch et al., 1986).

La presenza di VTEC nei campioni analitici può essere rilevata anche attraverso la dimostrazione di un effetto citopatico specifico utilizzando colture di cellule VeRo. L'utilizzo di specifici antisieri verso la *stx1*, la *stx2* e le sue varianti permette di neutralizzare l'effetto citopatico (Baylis et al., 2008-b).

Altre metodiche sono state messe a punto per la ricerca del VTEC come la ricerca diretta della verocitotossina libera direttamente nelle feci (Karmali et al., 1987) oppure metodiche sierologiche ELISA per la ricerca della *stx1* e *stx2* sia per la ricerca del sierotipo O157 (Baylis et al., 2008-b). Inoltre diversi metodi sierologici sono comunemente utilizzati per la conferma del sierotipo e sulla base di questi sono presenti in commercio diversi kit (Baylis et al., 2008-b).

PARTE SPERIMENTALE

PREMESSA

Lo studio condotto nel corso del dottorato di ricerca ci ha portati ad approfondire essenzialmente tematiche inerenti gli *Escherichia coli* produttori di verocitotossine (VTEC).

Lo studio dell'analisi del rischio legata ai VTEC all'interno delle matrici alimentari ed animali e la necessità dei dati che questa richiede ci ha spinto a focalizzare l'attenzione su diverse tipologie di studi che presentano tutti come filo conduttore quello di comprendere sia presenza e concentrazione dei VTEC sia il suo comportamento.

Per questo fine si sono susseguiti nel tempo diversi studi che troverete spiegati ed approfonditi in questo capitolo ognuno dei quali aveva uno scopo iniziale ben definito e si presentano tutti interconnessi tra loro.

La necessità di capire se e come i batteriofagi presenti nel nostro laboratorio sono in grado di indurre un ciclo litico o lisogeno negli *Escherichia coli* è stata il punto di partenza per il primo studio.

Il bisogno della raccolta dei dati relativi alla prevalenza dei VTEC all'interno di aziende produttrici di latte ed in seguito l'approfondimento dei valori di prevalenza e concentrazione nel latte crudo di massa e di come i VTEC sono distribuiti all'interno del latte stesso hanno rappresentato gli spunti per il secondo e terzo studio.

In seguito la necessità di approfondire il comportamento dei VTEC all'interno di matrici alimentari prodotte a partire da latte crudo in seguito a fattori stressanti di tipo fisico come il calore ci ha fornito l'idea del quarto studio.

Infine la necessità di modellizzare la crescita dei VTEC all'interno del latte crudo con lo scopo di migliorare sia i protocolli di isolamento sia la conoscenza sul suo comportamento durante l'arricchimento ci ha permesso di attuare il quinto studio.

PRESENZA DI BATTERIOFAGI-STX2 IN *Escherichia coli* ISOLATI DA PELLI E FILTRI DI LATTE BOVINO E PROVE DI LISOGENIA IN CEPPI EPEC ISOLATI DA ALIMENTI

INTRODUZIONE

Gli *Escherichia coli* produttori di verocitotossine (VTEC) rappresentano un importante problema nella sicurezza alimentare. La sua presenza è stata evidenziata in diverse matrici alimentari di origine bovina e che i liquami spesso risultano essere positivi (Dambrosio et al., 2004; Bonardi et al., 2007; Bonardi et al., 2005; Alonso et al., 2007; Conedera et al., 2004; Caprioli et al., 2005). La tossina Shiga-like 2 (*stx2*) è veicolata da un batteriofago che si inserisce all'interno del genoma batterico portando all'instaurarsi di un ciclo lisogeno e persistere all'interno del batterio. La presenza di altri fattori di virulenza come *eae*, *saa*, *hly* nel genoma del batterio ricombinante può portare alla presenza di un nuovo patogeno in seguito all'inserzione della tossina. La presenza di alcuni tipi di antibiotici o la somministrazione di raggi UV portano all'instaurarsi del ciclo litico con la fuoriuscita del batteriofago dall'ospite con conseguente possibile inserzione all'interno di un altro ospite.

Lo scopo di questo lavoro è quello di valutare l'attività litica e lisogena dei nostri ceppi in collezione in modo particolare focalizzandoci sull'instaurarsi del ciclo lisogeno in batteri di campo provenienti da diverse matrici alimentari ed animali. La ricombinazione genetica che può avvenire all'interno di queste matrici va approfondita e soprattutto un adeguato trattamento principalmente dei liquami ed anche delle matrici alimentari si rende necessario al fine rendere innocua l'attività sia dei VTEC sia dei batteriofagi presenti al loro interno.

MATERIALI E METODI

La presenza di colifagi veicolanti la verocitotossina è stata effettuata in 10 ceppi VTEC positivi alla *stx2* isolati a partire da pelli e filtri di latte di bovini presenti nella nostra collezione. I ceppi sono stati arricchiti in Luria Bertani broth a 37°C per 24 ore fino a raggiungere la fase di crescita esponenziale. In seguito 4 aliquote degli arricchimenti vengono portati ad un valore di assorbanza di 0,3 a 600nm di lunghezza d'onda e 3 di questi sono stati inoculati con Mitomicina C ad una concentrazione di 0,5µg/ml in modo da indurre un ciclo litico mentre la quarta viene utilizzata come controllo ed incubati a 37°C per 24 ore in agitazione costante. Dopo l'incubazione viene effettuata una nuova lettura allo spettrofotometro a 600nm di lunghezza d'onda per valutare l'avvenuto ciclo litico (media delle letture delle 3 aliquote indotte) confrontando il valore con l'aliquota non indotta. In

seguito abbiamo proceduto con la purificazione del fago mediante filtrazione in filtri Millipore® (Sigma-Aldrich, Germany) con diametro di 0,22 µm in modo da trattenere i batteri come descritto da Muniesa et al. (2004). Come substrato per la valutazione delle placche di lisi sono stati utilizzati 2 ceppi di *Escherichia coli* di riferimento (DM1187 e WG5) e 5 ceppi *stx2* negativi ma *eae/saa* positivi isolati a partire da pelli bovine (FV4033, FV4996, FV4028) oppure ceppi di riferimento (EDL 933, ED73). Per valutare la presenza di lisogenia abbiamo effettuato in parallelo due prove. La prima aveva lo scopo di valutare se l'estratto fagico una volta messo a contatto con ceppi sensibili fosse in grado di provocare la formazione di placche di lisi. A tal fine 500 µl di coltura dei ceppi da testare sono stati miscelati a 3 ml di Luria Bertani Agar (LBA) preriscaldato a 45°C addizionate di 100 µl di CaCl₂ e seminati su una piastra di LBA e lasciati solidificare. In seguito vengono inoculati mediante spot con 15 µl di estratto fagico proveniente dalle colture indotte con Mitomicina C. La piastra viene poi incubata a 37°C per 24 ore ed in seguito valutata la presenza di placche di lisi. La seconda prova ha lo scopo di produzione di lisogeni partendo da ceppi di *Escherichia coli* recettivi. Per fare questi 500 µl di coltura indotta sono stati miscelati a 100 µl di coltura recettiva *sxt2* negativa in fase di crescita esponenziale ed incubati a 37°C per 30 minuti. In seguito sono stati miscelati a 3 ml di LBA fuso e mantenuto ad una temperatura di 45°C ed a 100 µl di CaCl₂. Sono poi stati seminati su LBA ed lasciati solidificare ed incubati a 37°C per 24 ore. La patina ottenuta è stata prelevata in 1 ml di tampone SM e sottoposta a diluizioni seriali in base 10 e seminata su piastre di LBA al fine di ottenere piastre contenenti 100-150 UFC/piastra. La presenza di *stx2* nelle placche di lisi e nelle colonie presunte lisogene è stata confermata mediante sonde di ibridazione. A tale scopo le colonie o le placche sono state trasferite su membrane di nylon disgregate da soluzioni ipertoniche di NaCl e le proteine vengono fatte precipitare in presenza di NaOH e lavaggi successivi ne tamponano l'alcalinità favorendo il fissaggio del materiale alla membrana mediante raggi UV. Le membrane sono poi state saggiate mediante ibridazione con sonde *stx2* marcate con digossigenina. Per produrre le sonde è stata impiegata la procedura Dig Hig Prime Synthesis Kit II (Roche®) ed i primer *stx2*-LP43 (bp 57 to 78 of EDL933; 5'-ATCCTATTCCCGGGAGTTTACG-3'), and *stx2*-LP44 (bp 622 to 643 of EDL933; 5'-GCGTCATCGTATAACACAGGAGC-3'). Le placche marcate sono state prelevate e sospese in 0,2 ml di diluente SM. Nel prelievo sono incluse anche le colonie batteriche cresciute alla periferia o all'interno delle placche. Questa sospensione è stata utilizzata in parte per estrarre il DNA fagico da analizzare mediante PCR (Patone et al., 1998-b) e in parte per prove di lisogenia con le colture *eae/saa* positive. Per purificare il DNA una parte della soluzione SM è stata trattata con cloroformio e sottoposta a

centrifugazione per inattivare i batteri e recuperare il surnatante contenente la sospensione di fagi come descritto da Muniesa et al. (2004).

Successivamente altri due ceppi *stx2* negativi ed *eae* positivi isolati da filtri di latte bovino uno O157 (F61) ed uno O26 (F18-2) caratterizzati per i geni di patogenicità dell'OI-122 come descritto da Karmali et al. (2003) sono stati utilizzati per altre prove di lisogenia. In questo caso le prove di lisogenia sono state effettuate come descritte da Muniesa et al. (2004) ma utilizzando il fago ricombinato con il gene di resistenza al cloramfenicolo come descritto da Serra Moreno et al. (2006). In particolare il fago *stx2* è stato ricombinato mediante inserimento del gene di resistenza al cloramfenicolo (fago ϕ *stx2-ΔCm*). In tal modo le colonie lisogene sono resistenti all'antibiotico e possono essere isolate su terreni selettivi, senza ricorrere a tecniche d'ibridazione oltre ad aver integrato il fago all'interno del loro genoma. Di ciascun ceppo lisogeno vengono testate 5 colonie prelevate dopo incubazione mediante PCR utilizzando i primers *stx2A-Up* (Muniesa et al., 2003) e *Cm3* (Serra Moreno et al., 2006). In seguito viene amplificata la mediante qPCR real-time la sequenza genica in prossimità del gene *rho* mediante i primers *rho* e *Cm3* (Serra Moreno et al., 2006) per verificare che l'inserzione fagica sia avvenuta in prossimità del gene *rho*. Il programma qPCR real-time viene eseguito come descritto da Serra Moreno et al. (2006) mediante l'utilizzo di SYBR-GREEN® (BioRad) e seguito da una curva di melting per valutare le specificità dei prodotti. Il trapianto dei ceppi ricombinati con cloramfenicolo vengono ripetute 3 volte nel tempo passandoli su LBA addizionato di 10mg/l di cloramfenicolo. Abbiamo infine valutato la capacità di produrre la shiga-tossina mediante kit ELISA Premier EHEC® (Meridian Bioscience).

RISULTATI

I risultati delle prove eseguite sui primi 7 ceppi *stx2* negativi come substrato utilizzando i 10 ceppi VTEC *stx2* positivi presenti nella nostra collezione sono schematizzati in tabella 1. Possiamo notare che abbiamo ottenuto la formazione di placche di lisi derivanti da 8 ceppi su 10 testati in almeno un substrato colturale. Solamente il fago indotto a partire dal VTEC P65 ed inoculato sul ceppo DM1187 ha mostrato positività all'ibridazione effettuata sulle placche di lisi. Questa positività è stata successivamente confermata mediante PCR (Figura 1). Da notare che le placche di lisi prodotte da dal fago sul ceppo sono poco evidenti se confrontate con altre placche prodotte da altri batteriofagi. In seguito al prelievo ed all'analisi PCR delle colonie circostanti la placca di lisi *stx2* positiva abbiamo notato che queste producevano degli

ampliconi non specifici aventi un numero di bp differenti a quello target della tossina (Figura 2).

I risultati delle prove sui ceppi ricombinati con il cloramfenicolo hanno prodotto su entrambi la presenza della *stx2* anche se su 5 colonie testate per ogni ceppo dopo 3 passaggi solamente 1 (20%) ha mantenuto al suo interno la tossina. La conferma dell'avvenuta inserzione della tossina è stata ottenuta mediante qPCR real-time (Figura 3). L'analisi genetica mediante PCR del sito di integrazione del gene veicolante la *stx2* ha determinato che l'inserzione non è avvenuta in prossimità del gene *rho* (Figura 4).

Tabella 1: Risultati ottenuti da induzione fagica. (*) valore medio di tre letture a λ 600 nm. (**) Indicazione della lisi secondo scala di visibilità ad occhio nudo (+)= poco visibile/distinguibile, (++)= parzialmente visibile (+++)= visibile e netta rispetto alla crescita circostante

CEPPO	Induzione		Spot test ceppi referenza (**)		Spot Test su VTEC <i>stx2</i> neg. (**)					Ibrid. Sonde <i>stx2</i>	Conferma PCR
	Mit C(*)	Controllo	E.coli DM 1187	E. coli WG5	FV 4033	FV 4996	FV 4028	EDL 933	ED 73		
P7C	0,52	2,043	-	-	-	-	++	-	-	-	
P65	0,497	1,56	+	++	-	-	-	-	-	+	+
P18C	0,519	0,84	++	++	-	+	+++	-	-	-	
P1846	0,581	0,88	+++	+++	-	++	+++	-	-	-	
F 14-1	0,466	1,439	-	-	-	-	-	-	-	-	
F 14-4	0,547	0,7	-	-	-	+++	+++	-	-	-	
F 7-3.18	0,455	0,653	+++	+++	-	+++	-	-	-	-	
P1476	0,604	0,803	+++	+++	-	++	++	-	-	-	
P55	0,348	0,978	-	-	-	++	+	-	-	-	
P658	0,477	0,695	-	-	-	+	++	-	-	-	

Figura 1: PCR DNA fagico ricavato da placca di lisi su coltura DM1187

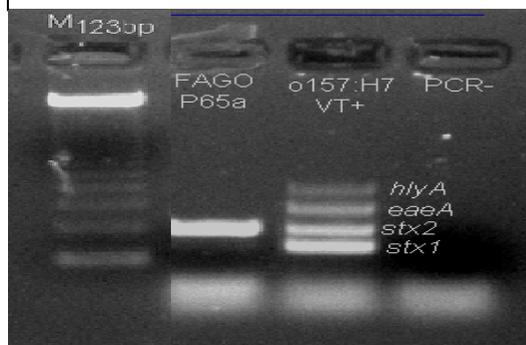


Figura 2: PCR da colonie lisogene *stx2* del ceppo DM1187 infettate con fago P65



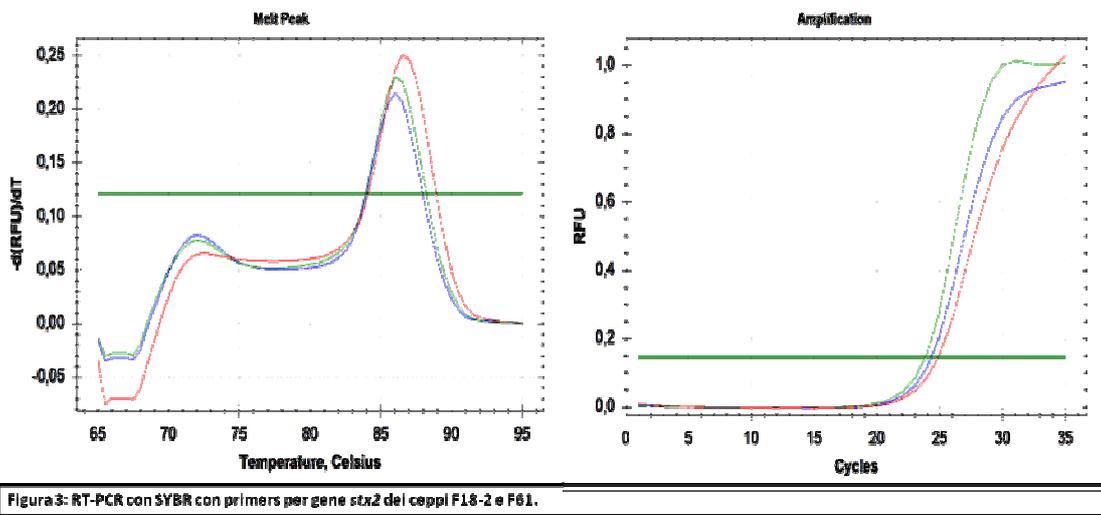


Figura 3: RT-PCR con SYBR con primers per gene *stx2* dei ceppi F18-2 e F61.

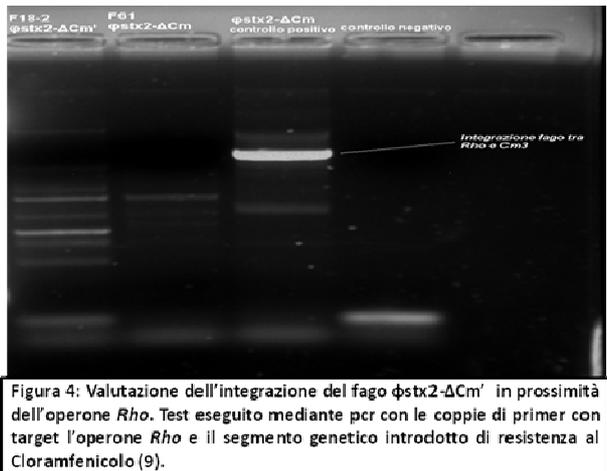


Figura 4: Valutazione dell'integrazione del fago ϕ stx2- Δ Cm' in prossimità dell'operone *Rho*. Test eseguito mediante pcr con le coppie di primer con target l'operone *Rho* e il segmento genetico introdotto di resistenza al Cloramfenicolo (9).

DISCUSSIONE

I risultati ottenuti dimostrano la presenza di 8 batteriofagi litici su 10 ceppi VTEC sottoposti alla sperimentazione evidenziata dalla presenza di placche di lisi (Tabella 1). Bisogna però considerare che non tutti i batteriofagi indotti producono la stessa intensità di placche di lisi su tutti i ceppi e che alcuni non sono in grado di crearle affatto probabilmente perché danno luogo alla formazione di lisogeni piuttosto che di cicli litici. In alcuni casi la presenza fagica può non essere rilevabile ad occhio nudo ma necessita di tecniche maggiormente sensibili come l'ibridazione. I ceppi maggiormente sensibili all'attività litica del batteriofago sono i ceppi di *Escherichia coli* DM1187 e K12. Questa spiccata sensibilità è dovuta ad una mutazione del gene *recA* che inibisce l'istaurarsi del ciclo lisogeno nel batterio provocando

quindi la lisi del batterio e la conseguente formazione delle placche (Serra Moreno et al. 2007). Un altro ceppo molto sensibile alla lisi è *Escherichia coli* WG5 che viene consigliato dalla ISO 10705-2:2000 per il controllo della qualità delle acque. Questi ceppi non hanno mostrato sensibilità a tutti i fagi indotti provenienti dai nostri 10 VTEC testati. Infatti abbiamo osservato che alcuni batteriofagi provocavano la formazione di placche di lisi solo su ceppi di *E.coli* provenienti dal nostro laboratorio caratterizzati dalla presenza dei geni *eae/saa*, *hly* o *stx1* ma si presentavano privi della *stx2*. Questo è il caso dei fagi F14-4, P55-b e P658 che hanno dato lisi più o meno evidente con il ceppo FV4996 e dei fagi P7C-c, F14-4, P55-b e P658 che hanno dato lisi sul ceppo FV4028. Il fago del ceppo P65 è stato l'unico a dare un risultato positivo all'ibridazione con sonde per la ricerca del gene codificante per la *stx2* sul ceppo di *Escherichia coli* DM1187. Da notare che la lisi indotta da questo fago sul ceppo era minima e che quindi ha indotto piuttosto un ciclo lisogeno che un ciclo litico. Questa evenienza si è abbastanza particolare in quanto proprio il ceppo DM1187 è uno di quelli maggiormente sensibili all'attività litica dei fagi in quanto possiede una mutazione del gene *recA*. Bisogna considerare che la lisi indotta dai fagi in questo tipo di ceppi è stato dimostrato essere legata ai fagi λ . Possiamo quindi avanzare 2 ipotesi sul perché il fago *stx2* del VTEC P65 ha dato lisogenia: la prima è che il fago non è di tipo λ e la seconda è che il P65 fosse infettato da più batteriofagi in quanto è stato dimostrato che la presenza l'infezione di nuovi batteriofagi in batteri già infetti è possibile ma altera i meccanismi della lisi batterica (Serra Moreno et al., 2007; García-Aljaro et al., 2009). Il fago P65 ha confermato mediante ibridazione la presenza della tossina anche se le colonie del ceppo DM1187 prelevate in prossimità della placca di lisi non hanno confermato l'avvenuta lisogenia in quanto il risultato della PCR mostrava dei risultati aspecifici all'amplificazione dei geni codificanti la tossina. Il totale di fagi *stx2* positivi in rapporto al totale dei ceppi infettati dal fago ed indotti è stata pari al 12,5% e si presenta in accordo con i dati riportati in letteratura che danno dei valori del 18% (Muniesa et al., 2004-b): questi valori però possono in realtà sottostimare il valore reale in quanto affinché si manifesti la presenza dei fagi *stx2* positivi questi ultimi devono essere in concentrazioni sufficienti da poter instaurare un ciclo litico e che il ceppo bersaglio sia sensibile all'attività fagica. Studi recenti hanno dimostrato che un legame troppo stretto tra fago e batterio ospite può alterare la capacità di sopravvivenza di quest'ultimo all'esterno dell'ospite anche per periodi molto brevi. Inoltre in seguito all'induzione di un ciclo litico è possibile osservare un notevole calo della capacità di infezione fagica in seguito ad una ricombinazione genetica che alterano la capacità di clivaggio in seguito all'instaurarsi del sistema di SOS batterico (James et al., 2001; Muniesa et al., 2004-c).

A partire dal fago P65 non siamo riusciti ad ottenere la lisogenia nei ceppi testati seguendo il protocollo di Muniesa et al. (2004). Questo conferma l'ipotesi che batteriofagi isolati a partire dai ceppi di campo si hanno delle maggiori difficoltà ad instaurare un ciclo lisogeno in altri ceppi di selvaggi come evidenziato da diversi lavori (Muniesa et al.,2004; Muniesa et al.,1999). Utilizzando invece il fago ricombinato *φstx2-ΔCm* siamo riusciti ad ottenere l'integrazione all'interno dei due ceppi di campo F61 ed F18-2 derivanti da filtri di latte bovino. L'integrazione è stata evidenziata dalla positività alla qPCR real-time (Figura 3). L'analisi del sito di integrazione non ha però confermato l'inserzione in prossimità del gene *rho* (Figura 4). Lavori recenti sostengono che solamente l'integrazione in prossimità di questo gene rende successivamente possibile l'espressione dei geni codificanti per la *stx2* e quindi la sua produzione (Serra Moreno et al., 2007). Inoltre abbiamo evidenziato che il ciclo lisogeno nei due ceppi di campo si presentava instabile e che solo il 20% (1/5) delle colonie manteneva al suo interno il fago codificante la tossina dopo 3 passaggi. Il fatto però che l'inserzione del fago avvenga anche all'interno di ceppi di campo dovrebbe indurre una riflessione più approfondita circa le possibili ricombinazione genetiche che possono avvenire in seguito ad uno stretto contatto tra batteri e batteriofagi.

In definitiva è necessaria un maggiore approfondimento circa la stabilità dell'inserzione fagica all'interno di VTEC per meglio comprendere quanto le matrici alimentari e soprattutto le matrici animali possano essere veicolo di VTEC nel caso in cui al loro interno siano presenti *Escherichia coli* eventualmente capaci di "subire" l'inserzione fagica.

PRESENZA DI *Escherichia coli* PRODUTTORI DI VEROCITOTOSSINE IN STALLE DI BOVINI DA LATTE ALLEVATI IN EMILIA E LOMBARDIA

PREMESSA

Un'indagine volta a valutare la presenza di *E. coli* produttori di verocitotossine è stata svolta nell'ambito di un progetto di ricerca cofinanziato dal Ministero dell'Università e della Ricerca nell'ambito del PRIN 2007. Il progetto di ricerca è stato coordinato dal Prof. Trevisani e ha coinvolto il gruppo di ricerca dell'Università di Parma (referente Prof. Silvia Bonardi) e limitatamente al round test di validazione del metodo PCR di screening anche delle Università di Sassari (referente dott. Rina Mazzette) e Milano (referente dott. Claudia Picozzi). Il lavoro è stato inviato per la pubblicazione a *Zoonose and Public Health journal* nel settembre 2012.

INTRODUZIONE

Il consumo di latte crudo e di prodotti lattiero caseari a base di latte crudo è sempre maggiore in Italia. La presenza degli *Escherichia coli* verocitotossici (VTEC) in questi prodotti alimentari è stato segnalato da diversi studi (Langer et al., 2012; Vernozy-Rozand et al., 2005; Farrokh et al., 2012; EFSA 2012). Diversi sierotipi coinvolti nell'insorgenza della malattia come O157, O26, O103, O145 sono stati isolati dall'intestino di ruminanti sani clinicamente sani come bovini, ovini, caprini e bufali (EFSA 2011). La legislazione italiana in materia di latte crudo obbliga le aziende produttrici di latte crudo ad attuare dei piani di autocontrollo al fine di escludere la presenza del ceppo VTEC O157 (Regione Lombardia, 2007; Regione Emilia-Romagna 2008). Questo obbligo è stato esteso anche ad altri sierotipi isolati in focolai di malattia alimentare come O26, O103, O111, O145. I report epidemiologici di diversi paesi europei circa l'infezione da VTEC indica che i sierotipi O157 ed O26 sono i principali responsabili delle patologie umane nel 2010 e nel 2009 con una incidenza del 41,1% e del 51,7% per O157 e del 7% e del 5,4% per O26 nei due rispettivi anni. Negli stessi anni l'infezione ad opera di sierotipi non tipizzabili sono state del 33,7% e del 28,2% rispettivamente seguiti dai sierotipi O103, O111 ed O145 con una incidenza del 5,3% e del 4,3% (EFSA/ECDC 2012).

Lo scopo di questo lavoro è quello di valutare i livelli di prevalenza del VTEC nel latte e nei filtri di latte in aziende del nord Italia con l'intento di valutare anche le differenze che occorrono tra le diverse aziende. Sono stati analizzati anche i profili di virulenza e la resistenza agli antibiotici dei ceppi isolati. I dati possono essere anche utilizzati per una più attenta analisi del rischio riguardante i VTEC sia nel latte crudo sia in prodotti lattiero caseari prodotti a partire da latte crudo (come il Parmigiano Reggiano ed il Grana Padano). Nello studio sono stati coinvolti 4 laboratori che hanno adottato uno screening PCR comune per la ricerca del gene VT ed i risultati analitici ottenuti danno degli importanti spunti al fine di ottimizzare il protocollo per la ricerca e l'isolamento del VTEC.

MATERIALI E METODI

I campioni sono stati prelevati in Lombardia ed Emilia Romagna tra aprile 2009 e maggio 2010. Sono stati analizzati un totale di 251 campioni di latte crudo e 192 filtri di latte da un totale di 192 aziende agricole. Tra queste aziende 31 vendevano il latte crudo mediante distributori automatici, 116 producevano latte destinato alla produzione di Parmigiano Reggiano o Grana Padano e 41 vendevano il latte all'industria alimentare per la pastorizzazione. In 30 delle 31 aziende produttrici di latte crudo i campioni sono stati prelevati 2 volte l'anno durante il periodo del lavoro mentre una ha smesso la sua attività nello stesso periodo.

Prima di procedere all'analisi dei campioni i filtri di latte sono stati tagliati in due parti uguali utilizzando forbici sterili. Al fine di individuare VTEC O157 sia una metà del filtro sia 25 ml di latte crudo sono stati diluiti in 225ml di modified Tryptone Soya Broth (mTSB, Oxoid, Basingstoke, UK) supplementato con 20mg/l di novobiocina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) ed incubato a $41,5\pm 1^{\circ}\text{C}$ per 18 ore. Per il VTEC non-O157 l'altra metà del filtro e 25ml di latte crudo sono stati diluiti in 225ml di mTSB con 12mg/l di acri flavina (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) ed incubato a $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ per 18 ore.

In seguito all'incubazione dai campioni è stato estratto il DNA mediante Chelex 100® (Bio-Rad, Munich, Germany) (Walsh et al., 1991) per la ricerca dei geni *stx1* ed *stx2* come screening con una analisi PCR. 5 µl dell'estratto sono stati utilizzati come template all'interno di una mix PCR complessiva di 20µl composta da: 0,4 µM di ogni primers (Karch and Meyer, 1989), 0,2 µM di dNTPs mix, 1,5 mM di Mg_2Cl , 2,5 µl di PCR buffer 10X (Platinum Taq, Invitrogen) e 1U di Taq (Platinum, Invitrogen). L'assenza di inibizioni è stata valutata ripetendo la reazione PCR che aveva dato esito negativo utilizzando un estratto di DNA di

ATCC35150 O157:H7 oppure di FV4028 O26:H11 come controllo positivo con una concentrazione nota compresa tra 100 e 300 UFC/ml oppure utilizzando un controllo interno utilizzando i primers ricombinanti MK1-pUC19 MK2-pUC19 e 2pg/μl di pUC19 (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) che producevano un amplicone di 224 e 227 pb e un controllo interno di 630pb (Wieczorek and Osek, 2004). Il programma di amplificazione era il seguente: 94°C per 1 min. seguito da 30 cicli a 94°C per 1min., 48°C per 1 min. e 72°C per 1min. ed una estensione finale a 72°C per 10 min. Il prodotto PCR è stato poi analizzato mediante elettroforesi su gel di agarosio al 2% (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) in tris-acetato-EDTA (TAE buffer) a 100V per 40 minuti. Le bande di DNA sono state analizzate utilizzando come contrasto il bromuro di etidio (3μl/ml) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) sotto luce ultravioletta (300nm) e fotografato utilizzando Geldoc Imagins System (UVP, UK). Le tossine *stx1* ed *stx2* avevano rispettivamente una lunghezza di 224 pb e 227 pb ed il controllo interno aveva una lunghezza di 630 pb.

In seguito a positività ai geni *stx1* ed *stx2* i campioni sono stati sottoposti ad uno screening per verificare la positività ai sierotipi O157 ed O26 mediante qPCR real-time per quanto riguarda i campioni prelevati in aziende produttrici di latte crudo oppure mediante VIDAS® UP E.coli O157 (BioMerieux, France) per i campioni prelevati presso aziende produttrici di latte destinato alla produzione di formaggio e di latte pastorizzato. La qPCR-real-time è stata effettuata come descritta nelle linee guida EFSA (2009-b). L'utilizzo di un controllo interno non è stato previsto in quanto veniva utilizzato lo stesso estratto che precedentemente aveva dato esito positivo. I primers utilizzati per la ricerca dei geni *rfbE* O157 e *wzx* O26 sono stati quelli indicati da Perelle et al. (2004) ad una concentrazione finale di 500nM per ogni primers e di 200nM per la sonda ed utilizzando una master mix preformulata (IQ Supermix, Bio-Rad ®). Il protocollo di amplificazione prevedeva: 3 min. 95°C, seguiti da 40 cicli con 10 sec. a 95°C e tre steps a 64°C, 62°C e 60°C ognuno per 20 s con un calo della temperatura di 10°C/s. utilizzando un termociclatore Bio-Rad MiniOpticon ®. Gli standards utilizzati per la quantificazione PCR sono stati ottenuti mediante delle diluizioni seriali di un arricchimento in fase esponenziale (range 2-5 Log CFU/ml) di ceppi di riferimento (ATCC 35150 O157:H7 e FV4028 O26:H11). Le diluizioni sono state utilizzate per contaminare del latte crudo e filtri di latte precedentemente negativi alla PCR ed in seguito estratti mediante Chelex 100 ® (Walsh et al., 1991). Il numero delle CFU/ml dei ceppi di referenza sono state contate mediante spatolamento di 100μl su TSA ed incubati a 37°C per 18 ore. In questo modo abbiamo ottenuto una curva standard per ogni sierotipo di referenza. L'efficienza della reazione (E) è stata calcolata mediante lo slope della curva standard ($E = 10^{-1/\text{slope}}$) era

compresa tra 90-110%. I risultati si presentavano lineari con un coefficiente di correlazione $R \geq 0,990$. Il DNA totale misurato nella PCR real-time (ng/ μ l) è stato convertito in CFU/ml. Per ogni reazione è stata inclusa acqua distillata e chelex di estrazione come controllo negativo. Per il VIDAS®UP E.coli testing 1 ml di mTSB incubato a $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ è stato prelevato e trasferito in provetta, bollito per 5 minuti ed in seguito raffreddato. Seguendo le istruzioni del produttore (BioMerieux, France) un'aliquota di 500 μ l è stata utilizzata per l'analisi. I campioni che presentavano un valore di fluorescenza relativa >150 sono stati considerati positivi.

I campioni positivi allo screening real-time PCR O157 ed O26 ed i campioni positivi VIDAS UP O157 ed i campioni prelevati presso aziende produttrici di latte destinato alla produzione di formaggio o di latte pastorizzato che risultavano positivi alla PCR *stx1* ed *sxt2* sono stati sottoposti alla concentrazione mediante IMS (Dynabeads® EPEC/VTEC O26 e O157, Invitrogen, D) seguendo le istruzioni del produttore e poi seminate su CT-SMAC per O157 e su CT-RMAC per O26 e su MacConkey Agar ed incubati per 18h a 37°C (Hiramatsu et al., 2002; ISO 2001). Le colonie con morfologia tipica sono state prelevate e testate per verificare la produzione dell'indolo. Le colonie indolo positive sono state sottoposte a siero-agglutinazione mediante *E.coli* Latex test kit (Oxoid) e *E.coli* antisiero (Denka Seiken, Tokyo, Giappone). Le colonie positive all'agglutinazione sono state confermate come *Escherichia coli* mediante il test API 20E® (BioMerieux).

La ricerca nei campioni negativi allo screening O157 ed O26 è stata eseguita mediante metodo di ibridazione colony lift DNA. Gli arricchimenti positivi *stx1* ed *stx2* sono stati diluiti in una soluzione di Buffer e filtrati attraverso una membrana ISO-GRID (Neogen, Acumedia, USA) e posto su una piastra di MacConkey agar in modo da consentire la crescita di un numero di colonie compreso tra 300 e 100° ed incubato a 37°C per 24 ore. Le colonie sono state poi passate su membrane di nylon per ibridazione (Nylon+ membrans, Roche, Mannheim, Germany) ed ibridate a 44°C con 90ng delle sonde *stx1* ed *stx2* in 50 ml di buffer di ibridazione. Le sonde per ibridazione derivano dalla PCR del ceppo ATCC35150 utilizzando i primers di Arthur et al. (2002). Per evidenziare la positività alla reazione delle sonde è stato utilizzato il DIG High Prime DNA Labelling and Detection Starter Kit I (Roche, Mannheim, Germany) seguendo le istruzioni del produttore. In seguito a positività al blotting le colonie positive sono state prelevate e passate su MacConkey agar per la purificazione ed isolamento.

La ricerca dei fattori di virulenza dei sierotipi O157, O26 e degli altri isolati *stx* positivi è stata eseguita mediante una multiplex pCR per i geni codificanti le verocitossine (*vtx1* e *vtx2*),

l'intimina (*eae*) e l'entroemolisina (*hly*). Il DNA è stato estratto dalle colonie pure mediante bollitura in 50µl di acqua distillata per 5 minuti ed in seguito raffreddato su ghiaccio fondente. 2µl di estratto DNA è stato utilizzato come template in 25µl di reazione totale composti da 10mM Tris-HCl pH 8,3, 50mM KCl, 2mM di Mg₂Cl, 0,2 mM per ogni dNTPs, 1U di AmpliTaq Gold DNA Polymerase (Applied Biosystem, Foster City, USA) e 0,5µM per ogni primers come previsto da Paton e Paton (1998-b). I campioni sono stati sottoposti ad un protocollo di amplificazione con touch-down: un primo step a 95°C per 10 min, seguito da 35 cicli con 95°C per 1 min, a 65°C per 1 min che diminuivano di 0,5°C per ogni ciclo per i primi 10 cicli fino a raggiungere i 60°C per 1 min mantenuti nei rimanenti 25 cicli e 72°C per 1,5 min seguiti da una estensione finale a 72°C per 7 min. Il prodotto PCR è stato poi analizzato mediante elettroforesi su gel di agarosio al 1,5% (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) in tris-acetato-EDTA (TAE buffer) a 100V per 40 minuti. Le bande di DNA sono state analizzate utilizzando come contrasto il bromuro di etidio (3µl/ml) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) sotto luce ultravioletta (300nm) e fotografato utilizzando Geldoc Imagins System (UVP, UK). I VTEC sono stati successivamente confermati dall'Istituto Europeo di referenza per *Escherichia coli* (Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italy) sia per il sierogruppo che per i fattori di virulenza. Inoltre i ceppi isolati a partire dai campioni provenienti da aziende produttrici di latte crudo sono stati sottoposti a tipizzazione dell'isola di patogenicità OI-122 per i geni *pagC*, *senA*, *efa1* ed *efa2* come descritto da Karmali et al. (2003).

Tutti i ceppi isolati positivi ai geni codificanti la tossina e/o ai geni codificanti per O157 ed O26 sono stati testati per la loro resistenza agli antibiotici mediante l'utilizzo di dischi imbevuti di antibiotici seguendo le istruzioni del Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI, 2006a; CLSI 2006b). Per il test sono stati utilizzati l'Iso-Sensitest Agar (OXOID) e 17 dischi in commercio contenenti antibiotici (OXOID) sulla base del loro utilizzo come antimicrobici. Sono state utilizzate le seguenti molecole: ampicillina (A, 10µg), amoxicillina ed acido clavulanico (Amc, 30µg), cefotaxime (Ctx, 30µg), ciprofloxacina (Cip, 5µg), cefalotina (Cf, 30µg), ceftazidime (Caz, 30µg), cloramfenicolo (C, 30µg), colistina (Col, 10µg), enrofloxacin (En 5µg), gentamicina (Cm, 10µg), kanamicina (K, 30µg), acido nalidixico (Nx, 30µg), neomicina (N, 30µg), streptomina (S, 10µg), sulfonamide (Su, 300 µg), tetraciclina (T,30µg), e trimethoprim/sulfametazolo (Stx, 1,25/23,75µg).

I quattro laboratori coinvolti nello studio hanno effettuato delle prove inter-laboratorio. Sia gli arricchimenti positivi che gli arricchimenti negativi allo screening sono stati congelati in TSB+20% di glicerolo ed inviati agli altri laboratori partner. 24 campioni arricchiti in totale

(18 filtri di latte e 6 latte) sono stati scambiati durante il periodo di ricerca. L'estrazione del DNA e la PCR sono stati effettuati con i metodi descritti in precedenza. In caso di risultati negativi gli estratti sono stati testati in seguito ad una contaminazione con concentrazioni note (100-300 CFU/ml) di DNA estratto dai ceppi di riferimento per valutare la sensibilità del metodo. Il rapporto di convergenza sui risultati tra i diversi laboratori è stato calcolato con il metodo kappa di Fleiss utilizzando il software statistico R (the R foundation for statistical computing) con il pacchetto "irr" (Gamer, 2010). I campioni sono stati analizzati anche mediante la qPCR real-time per la ricerca dei geni *stx* utilizzando primers e probe descritti da Perelle (2004) con il protocollo descritto in precedenza per lo screening dei sierotipi O157 ed O26. La sensibilità e specificità raggiunte in ogni laboratorio sono state definite come il rapporto tra i campioni positivi (presenza dei geni *stx*) ed i campioni negativi (assenza dei geni *stx*) che sono stati identificati in modo specifico ed utilizzando i risultati della qPCR real-time come gold standard. Per quantificare il DNA è stata costruita una curva standard con le stesse modalità descritte per lo screening dei sierotipi O157 ed O26.

RISULTATI

I risultati del test PCR di screening indicano 28 positivi su 251 campioni di latte e 68 positivi su 214 campioni di filtro di latte per un valore di positività del 15% e del 32% rispettivamente. Tra i campioni di aziende produttrici di latte crudo abbiamo trovato lavori di prevalenza più bassi con il 5% di positivi (4/74) nel latte crudo ed il 28% (17/72) nei filtri di latte (Tabella 1). Abbiamo osservato un solo campione che ha dato un falso negativo come risultato dovuto a fattori inibenti presenti nella mix PCR mentre in tutte le altre reazioni si è sempre evidenziato il pUC19 oppure la positività mediante il DNA estratto dal controllo positivo.

Tra i campioni positivi allo screening per *stx* provenienti da aziende produttrici di latte trasformato 4 su 34 (12%) tra i campioni di latte e 21 su 51 (41%) tra i filtri di latte risultavano positivi al siero gruppo O157 mediante VIDAS®UP. Tra i campioni provenienti da aziende produttrici di latte crudo abbiamo ottenuto 2 filtri su 17 (12%) positivi O157 e 3 filtri su 17 (18%) positivi O26 alla qPCR real-time. Inoltre 1 campione di latte su 4 (25%) proveniente sempre da aziende produttrici di latte crudo era positivo al sierotipo O26 mediante real-time PCR (tabella 1).

In questo studio abbiamo ottenuto l'isolamento di VTEC solamente a partire da filtri di latte e nessun VTEC è stato isolato a partire da campioni di latte di tutte le aziende selezionate. Il

sierotipo VTEC O157 è stato isolato in 2 filtri su 142 (prevalenza di 1,4%) provenienti da aziende che producevano latte destinato alla trasformazione, mentre il sierotipo VTEC O26 è stato isolato in 1 filtro su 72 (prevalenza 1,4%) in un filtro proveniente da un'azienda produttrice di latte crudo. Inoltre sono stati isolati, sempre a partire dal filtro di latte anche dei VTEC con sierotipo non tipizzabile in 3/72 (prevalenza 4,2%) filtri di aziende produttrici di latte crudo ed in 1/142 (prevalenza 0,7%) filtro di aziende produttrici di latte destinato alla trasformazione (tabella 1 e 2). I ceppi EPEC sono stati invece isolati sia a partire da campioni di latte che da filtri di latte con le seguenti prevalenze differenziate per tipologia di azienda produttrice: EPEC O157: 0% nel latte destinato ad essere venduto crudo; 1,4% (1/72) nei filtri di latte da aziende produttrici di latte crudo; 0,6% (1/177) nel latte di aziende che lo destinavano alla trasformazione; 1,4% (2/142) nei filtri di latte delle aziende produttrici di latte da trasformare; EPEC O26: 1,4% (1/74) nel latte di aziende che lo vendevano come crudo; 1,4% (2/142) nei filtri di latte di aziende produttrici di latte crudo; 1,1% (2/177) nel latte di aziende che lo destinavano alla trasformazione e 1,4% (2/142) nei filtri di latte di aziende che destinavano il latte alla trasformazione. Il rapporto di isolamento nei sierotipi O157 ed O26 è alto confrontandolo con il numero di campioni positivi alla real-time PCR (tabella 1). Tra i campioni prelevati in aziende produttrici di latte crudo sono stati confermati 3/4 campioni O26 (75%) con l'isolamento di 1 VTEC a partire da filtro di latte e 2 EPEC a partire uno da latte e l'altro da filtro e 1/4 campioni O157 (25%) con l'isolamento di un ceppo EPEC a partire da un filtro di latte. Effettuando lo stesso tipo di confronto nei campioni risultati positivi al test VIDAS®UP O157 otteniamo un rapporto di isolamento un pochino più basso per i campioni di filtri di latte provenienti da aziende che destinavano il latte alla trasformazione con la conferma di 4/21 (19%) con 2 ceppi VTEC e 2 ceppi EPEC, mentre abbiamo isolato 1 ceppo EPEC su 4 (25%) partendo da campioni di latte proveniente dallo stesso tipo di aziende (tabella 1). L'analisi del profilo della virulenza dei ceppi isolati è schematizzata in tabella 2. Tra i ceppi VTEC O157 uno era positivo alla presenza dei geni *stx1*, *stx2*, *eae*, *hly* mentre l'altro era *stx2* ed *eae* positivi. Tutti e tre i ceppi mostravano un profilo OI-122 completo. Il ceppo VTEC O26 era *stx1*, *eae* ed *hly* positivo e possedeva un profilo OI-122 incompleto in quanto mancante del gene *pagC*. Tra i VTEC non tipizzabili abbiamo ottenuto due ceppi positivi *stx2* e negativi per tutti i geni dell'OI-122, un ceppo positivo *stx1*, *stx2* ed *eae* con un OI-122 incompleto (mancante dei geni *efalA* ed *efalB*) ed un ceppo positivo *stx1*, *eae* ed *hly* e negativo per tutti i geni dell'OI-122. Tra i ceppi EPEC abbiamo ottenuto un profilo completo per OI-112 nel sierotipo O157 e due profili incompleti per il sierotipo O26 (tabella 2).

I risultati relativi alla sensibilità agli antibiotici hanno evidenziato che tutti i ceppi VTEC isolati sono sensibili a tutti e 17 gli antibiotici testati. Tra i ceppi EPEC isolati abbiamo ottenuto il 20% dei ceppi resistenti alla streptomina ed alla tetraciclina ed il 10% di resistenti alla cefalotina. Nello specifico 2 dei 4 EPEC O26 isolati si presentavano resistenti sia alla tetraciclina che alla streptomina ed un EPEC O157 era resistente alla cefalotina. Nessun isolato presentava una resistenza a più di due antibiotici testati.

I risultati dei test inter-laboratorio sono schematizzati in tabella 3. Nel caso in cui i valori di $C_T < 35$ alla qPCR real-time abbiamo ottenuto un falso positivo e valori simili li abbiamo ottenuto testando arricchimenti di filtri o di latte con concentrazioni di 100CFU/ml di VTEC. Nel caso di campioni di latte o di filtri di latte contaminati artificialmente con valori approssimativi compresi tra 1-10 CFU/ml o g ed arricchiti per 24 ore abbiamo ottenuto valori di $C_T < 20$. La sensibilità e specificità raggiunta dai singoli laboratori nei test sui filtri di latte sono state comprese tra 91,6-100% e 83,3-100% rispettivamente. La specificità di un laboratorio nell'analisi del latte crudo è stata dell'83,3% e la mancanza di campioni di latte crudo positivi non ha permesso di calcolare le sensibilità.

Tabella 1: risultati dei test di screening e dei test di conferma per la ricerca di campioni VTEC positivi nel latte crudo di massa e nei filtri di latte								
	Test screening positivo			Isolati confermati				VTEC altri sierogruppi
	PCR	RT-PCR		O157		O26		
	VT	O157	O26	VTEC	EPEC	VTEC	EPEC	
Aziende produttrici di latte crudo								
Latte (N=74)	4/74 (5%)	ND	1/4 (25%)	ND	ND	ND	1	ND
Filtri (N=72)	17/72 (28%)	2/17 (12%)	3/17 (18%)	ND	1	1	1	3
Aziende che processano il latte prodotto								
	VT	VIDAS® O157						
Latte (N=177)	34/177 (19%)	4/34 (12%)		ND	1	ND	2	ND
Filtri (N=142)	51/142 (36%)	21/51 (41%)		2	2	ND	2	1

Tabella 2: fattori di virulenza degli isolati di <i>Escherichia coli</i> .										
Origine campione	Codice	Siero gruppo	stx1	stx2	eae	hlyA	OI-122			
							senA	pagC	efalA	efalB
Aziende produttrici di latte crudo										
Filtro di latte	P44	O26 rha-	+	-	+	+	+	-	+	+
	B18	O26 rha-	-	-	+	-	+	+	-	-
	B61	O157 sor+	-	-	+	-	+	+	+	+
	B14	NA	-	+	-	-	-	-	-	-
	B17	NA	+	+	+	-	+	+	-	-
	B20	NA	-	+	-	-	-	-	-	-
Latte crudo	B36	O26rha-	-	-	-	+	+	-	+	+
Aziende che rivendono il latte all'industria										
Filtro di latte	P99	O157 sor-	-	+	+	-	+	+	+	+
	P108	O157 sor-	+	+	+	+	+	+	+	+
	P141	O157 sor-	-	-	+	+	+	+	+	+
	P105	NA	+	-	+	+	-	-	-	-
Latte crudo	P141	O157 sor-	-	-	+	+	+	+	+	+

Tabella 3: risultati dei test interlaboratorio per la validazione della PCR di screening.							
Materiale	Real-time PCR		falsi negativi	Falsi positivi	Inter-laboratorio (Fleiss-Kappa)	Range sensibilità	Range specificità
	Positivi/positivi in tutti i laboratori	Negativi/negativi in tutti i laboratori					
Filtri (N=18)	11/10	7/5	1	2	K=0,822; z=8,54; p=0	91-100%	86-100%
Latte (N=6)	0	6/3	ND	3	K=0; z=0; p=0	NE	83%

DISCUSSIONE

L'infezione da *Escherichia coli* produttore di verocitotossine può portare all'insorgenza di diarrea acquosa o sanguinolenta che può, nel 5-10% dei casi, complicarsi nella HUS (Tozzi ed al., 2003; Beutin et al., 2004; Nataro et al., 1998). I bovini rappresentano il serbatoio più importante per questo patogeno e l'isolamento a partire da feci bovine dei sierotipi VTEC O157, O26, O103 e O145 in diversi paesi europei può rappresentare un rischio per la salute umana in quanto questi stessi sierotipi sono stati coinvolti nell'insorgenza della patologia (Blanco et al., 2003; Pearce et al., 2006; Bonardi et al., 2007; Lynch et al., 2012). La presenza di VTEC nelle feci di bovini in lattazione può portare a contaminazione delle mammelle e delle tettarelle con conseguente contaminazione del latte come evidenziato da Fremaux et al. (2006). Nella nostra ricerca abbiamo invece analizzato la presenza di VTEC in filtri di latte e

nel latte con lo scopo di valutare la prevalenza del patogeno in diverse aziende produttrici di latte.

I risultati da noi ottenuti sono in accordo con i valori di prevalenza individuati dall'EFSA nel 2009 come risultato della sorveglianza nel nostro paese (EFSA 2011). Nessun isolato VTEC è stato ottenuto a partire dal latte crudo mentre abbiamo isolato 1 ceppo EPEC O26 su 74 campioni di latte (1,3%) destinati ad essere venduto crudo e 1/177 EPEC O157 (0,5%) e 2/177 EPEC O26 (1,1%) a partire la latte crudo destinato alla trasformazione. Questi bassi valori di isolamento sono in accordo con i dati riportati da Conedera et al. (2004) che su campioni di formaggio a base di latte crudo non ha individuato nessun VTEC O157 e lo 0,1% di prevalenza di EPEC O157. I valori di positività allo screening PCR per la positività ai geni *stx1* e *stx2* sono stati del 15,1% (38/251) per il latte e del 31,8% (68/214) per i filtri di latte sono in accordo con i valori di positività allo screening ottenuti da Fremaux et al. (2006) che riporta inoltre valori di positività PCR compresi tra il 23-28% per le mammelle e le tette delle vacche in lattazione. Lynch et al (2012) hanno ottenuto, invece, positività più marcate PCR per *stx1* ed *stx2* più alti a partire da filtri di latte e da latte di massa con valori del 73% e del 36% rispettivamente con prevalenze relative maggiori nel periodo compreso tra marzo ed ottobre rispetto al periodo compreso tra novembre e febbraio. Van Kessel et al. (2011) riporta prevalenze alla PCR di screening per *stx1* ed *stx2* in accordo con il nostro lavoro per quanto riguarda il latte di massa mentre riporta prevalenze in accordo con Lynch et al. (2012) per quanto riguarda la positività dei filtri di latte con valori del 15,2% e del 51% rispettivamente. Nonostante la prevalenza del 15,1% di positività allo screening PCR non è stato possibile isolare VTEC a partire dai campioni di latte mentre l'isolamento di 7 ceppi VTEC è stato possibile a partire dal filtro di latte che presentava una prevalenza del 31,8% allo screening. Tra questi 7 ceppi VTEC 4/17 sono stati isolati nei filtri di latte di aziende che destinavano il latte alla vendita come crudo con un rapporto di isolamento del 17% mentre 3/51 sono stati isoalati da filtri di aziende che destinavano il latte alla trasformazione con un rapporto di isolamento del 6%. Nel valutare questi valori di isolamento bisogna però considerare il fatto che gli screening e le metodiche di concentrazione come l'immuno-separazione magnetica (IMS) sono stati effettuati solo per i sierotipi O157 ed O26 che sono i principali responsabili dell'insorgenza della patologia in Italia (EFSA/ECDC, 2012). Il fatto che il rapporto di isolamento sia basso in proporzione al valore dello screening PCR può essere in parte giustificato anche dal fatto che lo screening può individuare anche il genoma di cellule batteriche morte o poco vitali e che quindi non crescono durante l'arricchimento o che

comunque non raggiungono concentrazioni tali da permettere l'isolamento soprattutto se non associato all'IMS.

L'utilizzo della qPCR real-time potrebbe essere un buon screening per consentire una prima distinzione tra cellule vitali e cellule non vitali in modo da ridurre significativamente il numero di campioni fasi positivi. I dati ottenuti in questo lavoro suggerirebbero che valori di $C_T < 30$ con un ordine di grandezza di 10^4 CFU/ml dove essere analizzato per l'isolamento batterico dei sierotipi O157 ed O26. Inoltre sono state evidenziate differenze significative tra i metodi di screening come il VIDAS® UP O157 e l'utilizzo della qPCR real-time. Infatti a partire dal primo metodo abbiamo ottenuto 4 isolamenti a partendo da 22 arricchimenti di filtri di latte positivi al VIDAS® con un rapporto di isolamento del 18% ed un rapporto di isolamento del 25% partendo dal latte positivo al VIDAS®, mentre il rapporto di isolamento di presenta più alto quando lo screening del sierotipo è stato effettuato mediante qPCR real-time con rapporto di isolamento del 50% per gli O157 (1 EPEC su 2 positivi allo screening) e del 66% (1 VTEC ed 1 EPEC su 3 positivi allo screening) per il filtro di latte ed il 100% per O26 nel latte crudo. Inoltre l'utilizzo di metodiche di concentrazione come IMS è un importante aiuto per l'isolamento anche se bisogna considerare che il batterio target dovrebbe raggiungere concentrazioni idonee all'isolamento che in questo lavoro sembrano essere nell'ordine di 10^4 CFU/ml con un valore di $C_T < 30$. Bisogna infatti tenere in considerazione che la presenza della flora interferente costituisce un notevole disturbo alla concentrazione batterica e che questa flora è molto abbondante all'interno dei filtri di latte e che la il rapporto tra la concentrazione relativa dei VTEC e della flora è molto importante (Tomoyasu, 1998). Karch et al. (1996) sostengono che i VTEC per poter essere isolati mediante IMS all'interno di una flora interferente di circa 10^7 CFU/ml devono raggiungere un minimo di 10^2 CFU/ml. L'utilizzo di sonde di ibridazione per i geni VT potrebbe consentire di aumentare l'isolamento dei ceppi VTEC quando siamo in presenza di sierotipi non tipizzabili o diversi da quelli maggiormente ricercati in modo da evidenziare in modo altamente specifico la presenza dei geni codificanti per la tossina. Il problema relativo a questa metodica è che, per poter ottenere una buona distinzione tra le colonie, è necessario che il loro numero non sia superiore a 800-1000 CFU per piastra quando si utilizzano i filtri ISO-GRID che consentono una netta separazione tra le colonie. In seguito all'arricchimento sia del latte che del filtro di latte vengono raggiunti ordini di grandezza di tra 10^5 e 10^7 CFU/ml che e necessitano quindi di almeno 4 o 5 diluizioni seriali decimali. Questo presuppone che per poter isolare i VTEC questi ultimi raggiungano, in seguito all'arricchimento, valori di almeno 10^6 CFU/ml. Per evitare questa crescita eccessiva della flora interferente si potrebbe optare per l'utilizzo di

terreni di arricchimento selettivi addizionati di antibiotici. Questo però è sconsigliato da diversi lavori (Vimont et al.,2006; Vimont et al.,2007; Jasson et al.,2007; Jasson et al., 2009) che hanno dimostrato che l'utilizzo di antibiotici durante la fase di arricchimento possono inibire lo sviluppo di batteri che sono stati sottoposti a fenomeni stressanti. In alternativa si possono utilizzare degli agar arricchiti di fattori selettivi come il cefixime ed il potassio-tellurite (CT supplement) per il VTEC in modo da limitare lo sviluppo della flora interferente direttamente sulla piastra. In questo caso, oltre a quanto detto sopra circa la diluizione appropriata, è necessario che gli ipotetici ceppi VTEC siano resistenti al CT supplement come dimostrato da Orth et al. (2007).

L'analisi del profilo OI-122 è stata associata alla presenza di ceppi fortemente virulenti ed epidemici (Karmail et al., 2003) ed è risultata essere completa anche in ceppi EPEC O157. Per questo motivo la presenza di ceppi EPEC all'interno del latte crudo non deve essere sottovalutata. La perdita del gene codificante per la stx2 è stata evidenziata in seguito a subcolture di isolati (Karch et al., 1992) e che addirittura il 5% di pazienti affetti da HUS non eliminavano più ceppi VTEC nelle feci in seguito a perdita del gene codificante la stx2 all'interno dello stesso paziente (Bialczewska et al.,2007). Bugarel et al. (2011) hanno dimostrato che ceppi O26 VTEC-like che hanno perso la verocitotossina possono essere individuati mediante l'analisi di alcuni geni che permette la loro distinzione dai ceppi EPEC.

In questo studio tutti i VTEC isolati sono risultati positivi a tutti i 17 antibiotici testati. Resistenze sono state riscontrate solamente nei ceppi EPEC isolati a partire da filtri con una percentuale del 20% per la tetraciclina e la streptomina.. Uno studio molto importante è stato condotto in Spagna da Mora et al. (2005) su 141 VTEC O157:H7 e 581 VTEC non-O157 ha individuato le seguenti percentuali di resistenza: 39% sulfisoxazolo, 32% tetraciclina, 29% streptomina, 10% ampicillina, 8% trimetoprim, 8% cotromoxazolo, 7% cloramfenicolo, 7% kanamicina, 6% piperacillina, e 5% neomicina. Sono stati inoltre individuati dei pattern di resistenza multipla nel 7% dei VTEC O157 e nel 12% dei VTEC non-O157. I nostri dati, seppur in scala molto ridotta e per questo poco confrontabili con quelli ottenuti da Mora et al.(2005), sono sicuramente incoraggianti circa la resistenza dei ceppi di *Escherichia coli* circolanti nei nostri allevamenti.

In conclusione possiamo in seguito al nostro studio possiamo confermare che combinando l'utilizzo di metodi culturali e molecolari per l'isolamento di VTEC otteniamo un miglioramento dei rapporti di isolamento ma bisogna comunque confermare quali sono le loro sensibilità e specificità. Inoltre la presenza di ceppi VTEC ed EPEC sia nei filtri di latte che nel latte sia crudo che destinato alla produzione di formaggi a base di latte crudo rappresenta

comunque un rischio per il consumatore in quanto da queste tipologie di prodotti alimentari il VTEC è stato più volte isolato (Gillispie et al., 2003; Langer et al., 2012; Vernozy-Rozand et al., 2005; Farrokh et al.,2012). I nostri risultati suggeriscono anche che la presenza di VTEC ed EPEC all'interno del latte è bassa se le condizioni igienico-sanitarie dell'allevamento sono buone e se le buone pratiche igieniche vengono regolarmente messe in atto a tutela di un buon prodotto e della salute del consumatore.

RICERCA, QUANTIFICAZIONE E DISTRIBUZIONE DI *Escherichia coli* PRODUTTORI DI VEROCITOTOSSINE NEL LATTE CRUDO ALIMENTARE

INTRODUZIONE

Il latte crudo è utilizzato per la produzione di formaggi anche per la vendita diretta al consumatore finale. Per quanto riguarda la produzione casearia il rischio connesso all'impiego di latte crudo deve essere controllato attraverso fasi del processo e la selezione della materia prima. Questi due elementi devono essere commisurati all'efficacia dei trattamenti che assicurano la eliminazione/riduzione del numero dei microrganismi patogeni potenzialmente presenti e tra questi gli *Escherichia coli* produttori di verocitotossine (VTEC o STEC). Per quanto riguarda la vendita del latte crudo, in mancanza di garanzie assolute sull'assenza di animali infetti in allevamento, è necessario assicurare l'assenza della presenza di questi microrganismi che si sono rilevati capaci di causare malattia anche a concentrazioni molto basse (nell'ordine di 10-100 UFC). La tolleranza 'zero' è necessaria perché non è possibile fare affidamento certo sui trattamenti termici attuati dal consumatore finale. Al fine di rendere accettabile il rischio connesso con l'utilizzo del latte crudo necessarie delle misure igienico sanitarie presso gli allevamenti produttori di latte crudo e la verifica di obiettivi di performance appropriati. Attualmente in Italia è previsto un monitoraggio sulla presenza di taluni patogeni nel latte crudo e tra questi va i ceppi O157 e non O157 più comunemente implicati nei casi di malattia alimentare. Le regioni che hanno competenza sulla materia hanno emanato delle determinazioni regionali in cui specificano la frequenza del campionamento e definiscono come limite l'assenza di VTEC in 25 g (Regione Emilia Romagna, 2008; Regione Lombardia, 2007). Tuttavia il piano campionario, inizialmente definito nell'ambito dell'accordo stato regioni che prevedeva un numero di unità campionarie pari a 5 (n=5) è stato ridotto a 1, stimando una distribuzione uniforme dei patogeni nella matrice 'latte'. Tuttavia la frequenza transitoria dell'escrezione e la quantità di batteri presenti nelle feci dipende dalla presenza di animali vettori e in modo particolare di capi 'forti escretori'. Questa condizione non è prevedibile, può essere solo riscontrata occasionalmente. Inoltre la distribuzione uniforme dei batteri nel latte non ha una base scientifica. L'uso di una unica unità campionaria dopo accurata miscelazione o di un pool di aliquote esaminate insieme, può essere una scelta di gestione che mira a contenere i costi per i produttori. Ci sono però dei fattori di variabilità e incertezza che dovrebbero essere analizzati. Ad esempio la bassa

concentrazione e la presenza sporadica fa sì che il prelievo di un'unica aliquota sul latte di massa difficilmente possa portare a falsi negativi in conseguenza di una diluizione nella massa (nel caso di campioni aggregati si avrebbe un effetto diluizione con concentrazioni inferiori alla soglia di sensibilità dei metodi di analisi). Non ci sono ad oggi metodi quantitativi specifici di conteggio per i VTEC e la metodologia analitica prevede l'impiego di tecniche colturali, d'immunoconcentrazione e caratterizzazione fenotipica e genotipica che rendono complessa la messa a punto di tali metodi. Ogni tecnica impone dei limiti di sensibilità che comportano una incertezza in merito alla presenza di falsi negativi, in sostanza l'incertezza dipende dalla sommatoria dei diversi fattori utilizzati nella procedura. Questa situazione rende necessario dei maggiori sforzi per meglio conoscere la reale prevalenza del VTEC nel latte crudo e la messa a punto di metodiche che consentano di migliorare la sensibilità della ricerca (Jackson et al., 2012; Baylis et al., 2009). Diversi studi precedenti hanno focalizzato la loro attenzione sulla messa a punto di metodiche per la ricerca, isolamento e quantificazione del batterio nel latte e nei prodotti lattiero caseari tralasciando la sua distribuzione all'interno della matrice (Jackson et al., 2012; Baylis et al., 2009; Lynch et al., 2012; EFSA 2012).

Lo scopo di questo studio è stato quello di valutare la distribuzione e la concentrazione del VTEC all'interno dei tanks di trasporto del latte crudo per meglio comprendere se si presenta in modo uniforme all'interno di lotti di latte crudo provenienti da produttori dell'Emilia Romagna e suddivisi a loro volta in 5 aliquote campionarie. Sono stati indagati i sierotipi O157 ed O26 che rappresentano quelli maggiormente coinvolti nell'insorgenza della patologia in Italia e che rappresentano circa il 70% dei casi totali (Scavia et al., 2012; EFSA/ECDC 2010).

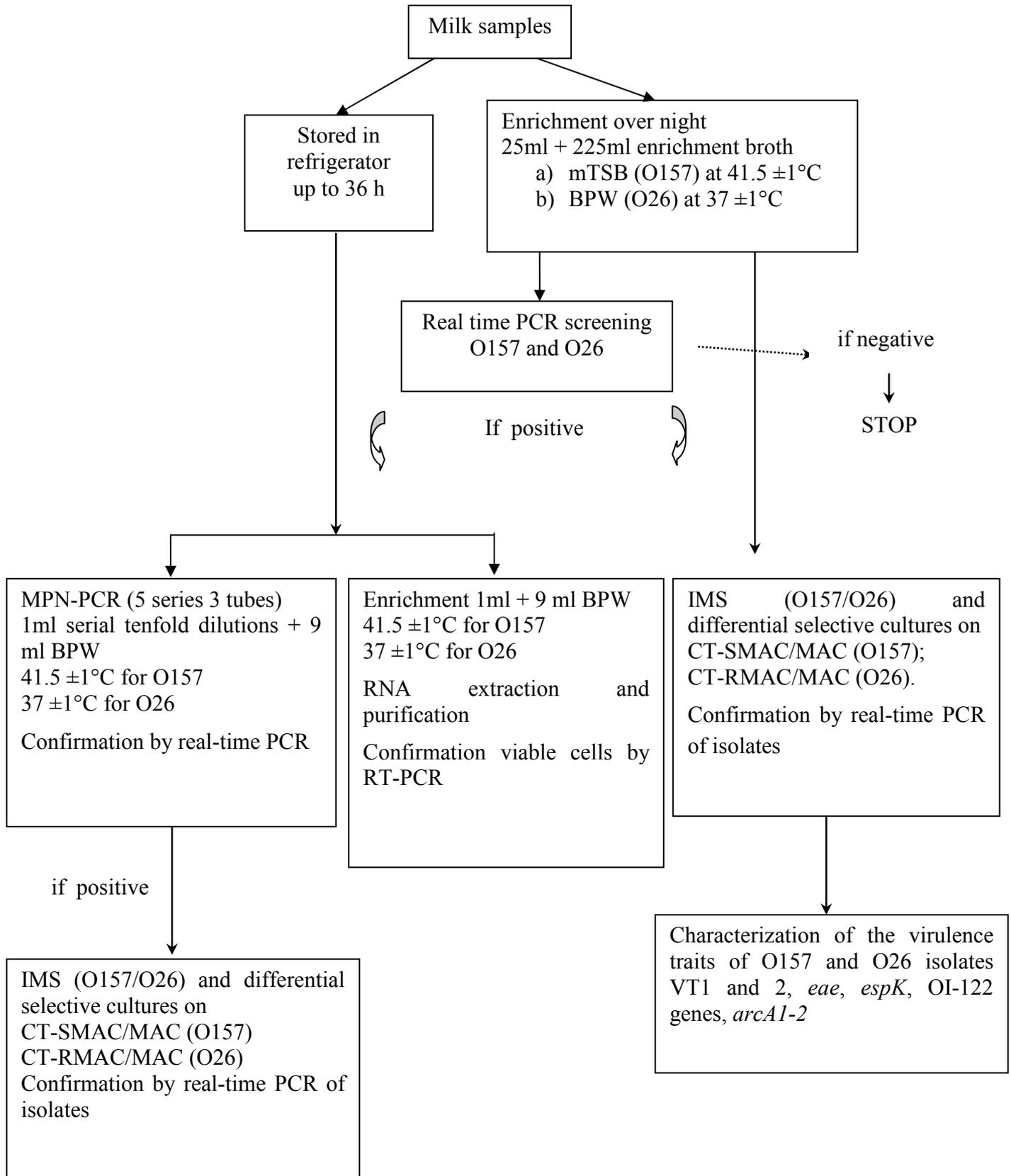
MATERIALI E METODI

I campioni sono stati effettuati presso un'azienda che raccoglie e processa circa 400 tonnellate di latte al giorno. Per il prelievo di un totale di 40 lotti di campioni è stato utilizzato un auto-campionatore tarato in modo tale da prelevare 5 aliquote campionarie da 70 ml di latte ciascuna durante lo scarico delle autobotti che raccoglievano il latte direttamente dai produttori. Al fine di evitare delle contaminazioni crociate l'auto-campionatore veniva sterilizzato dopo il prelievo di ogni singola aliquota. I campioni sono stati trasportati in

contenitori sterili in plastica a temperatura controllata e processati entro due ore dal prelievo.

Il protocollo è schematizzato in figura 1.

Figura 1: schema del protocollo analitico per la ricerca di VTEC O157 ed O26



Per la ricerca del sierotipo O157 un'aliquota di 25ml è stata diluita in 225ml di mTSB (m-TSB, OXOID, Basingstone, UK) ed arricchita a $41,5\pm 1^\circ\text{C}$ overnight e per la ricerca del sierotipo O26 un'aliquota di 25 ml è stata diluita in 225 ml di BPW (BPW, OXOID, Basingstone, UK) ed arricchita a $37\pm 1^\circ\text{C}$ overnight. Gli arricchimenti sono stati poi sottoposti ad una qPCR real time di screening per individuare per la ricerca dei geni *rfbEO157* e *wzxO26* in seguito all'estrazione del DNA con il metodo CHELEX 100® (Walsh et al., 1991). La qPCR real time è stata eseguita con una master mix preformulata (IQ Supermix, Bio-Rad ®) utilizzando primers e probes specifici per *rfbEO157* e *wzxO26* (Perelle et al., 2004). Il protocollo di amplificazione prevedeva: 1min a 50°C , 3 min. 95°C , seguiti da 40 cicli con 10 sec. A 90°C e 45 sec. a 63°C utilizzando un termociclatore Bio-Rad MiniOpticon ®. L'assenza di inibenti è stata valutata mediante l'utilizzo delle sequenze del pUC19 e di specifici primers e probes come controllo interno (Fricker et al., 2007). La quantificazione del risultato è stata effettuata mediante la costruzione di una curva standard ottenuta mediante delle diluizioni seriali dei ceppi VTEC O157 ed O26 (nostra collezione) in seguito ad arricchimento in BPW e titolazione con semina in doppio di 100 µl di diluizioni su TSA, incubato overnight a 37°C ed in seguito contato. Il valore del C_T del campione ottenuto alla qPCR veniva confrontato con i valori ottenuti da concentrazioni note per valutare la quantità di sierotipo presente nell'arricchimento.

I campioni sono poi stati stoccati in frigo a 2°C per circa 24 ore e quelli positivi allo screening sono stati successivamente analizzati mediante il metodo MPN-PCR. Con questo scopo 1 ml di campione è stato sottoposto a delle diluizioni seriali (10^0 , 10^1 , 10^2 , 10^3) in BPW ed incubato per 24 ore a $41,5\pm 1^\circ\text{C}$ per gli O157 e a $37\pm 1^\circ\text{C}$ per gli O26 al fine di consentire la crescita dei batteri stressati. In seguito all'estrazione del DNA mediante CHELEX 100® come descritto sopra sono stati eseguiti i conteggi MPN come descritto da Budget (2004).

Inoltre i campioni positivi sono stati sottoposti alla concentrazione mediante IMS (Dynabeads® EPEC/VTEC O26 e O157, Invitrogen, D) seguendo le istruzioni del produttore e poi seminate su CT-SMAC per O157 e su CT-RMAC per O26 ed incubati per 18h a 37°C (Hiramatsu et al., 2002; ISO 2001). Le colonie con morfologia tipica sono state prelevate in pools da 10 colonie fino ad un massimo di 5 pools e testati con una PCR. Gli isolati sono poi stati sottoposti ad una PCR di conferma dei fattori di virulenza come descritto da Paton e Paton (1998-b). Anche la presenza di altri geni markers di fattori di virulenza sono stati testati come il profilo dell'isola di patogenicità OI-122 per i geni *sen*, *pagC*, *efa1* e *efa2* (Karmali et

al., 2003) e i geni *espK* e i due differenti alleli del gene *arcA* (Bugarel et al., 2011). Sono stati caratterizzati anche gli antigeni flagellari dei ceppi isolati .

Per confermare la vitalità dei campioni positivi allo screening è stata eseguita la RT-PCR per individuazione del mRNA (Sheridan et al., 1998). L'unità campionaria positiva è stata sottoposta alla RT-PCR. L'arricchimento è stato prima titolato ad una trasmittanza del 40% con una lunghezza d'onda di 540nm (circa 10^8 batteri totali) ed seguito poi dall'estrazione e purificazione mediante Aurum Total RNA Mini Kit (Bio-Rad®) seguendo le istruzioni del produttore. L'estratto è stato sottoposto ad una RT-PCR one-step con il seguente protocollo: 10 min. a 50°C per la sintesi del cDNA seguiti da 40 cicli con 10 sec. a 90°C e da 45 sec. a 63°C. Sono stati utilizzati gli stessi primers e probes descritti sopra per la ricerca del *rfbEO157* e del *wzxO26* (Perelle et al., 2004).

Le medie delle prevalenze e gli intervalli di confidenza sono stati calcolati con lo score-test "Wilson" usando il *biconf* test presente nel pacchetto statistico 'Hmisc' e il software statistico .

RISULTATI

Dei quaranta lotti analizzati quindici (37,5%) hanno evidenziato positività PCR in almeno una unità campionaria per i geni *rfbEO157* e *wzxO26*. Tra queste abbiamo riscontrato positività per O157 in quattro unità campionarie derivanti da tre lotti diversi e per O26 da trenta unità campionarie derivanti da tredici lotti (34/200) con rapporto complessivo di positività allo screening qPCR real-time del 17%. Due lotti presentavano positività sia per O157 che per O26 in differenti unità campionarie. All'interno di questi lotti positivi sono state riscontrate delle difformità in quanto non tutte le unità campionarie risultavano positive a testimonianza del fatto che la distribuzione del patogeno non è uniforme all'interno del lotto della matrice alimentare. In particolare abbiamo ottenuto 1 campione positivo in tutte e cinque le aliquote, 2 campioni con 4 aliquote positive, 3 campioni con 3 aliquote positive, 3 campioni con 2 aliquote positive e 6 campioni con 1 aliquota positiva. In tutte queste aliquote il valore di CT ottenuto e confrontandolo con la curva standard come riportato in materiali e metodi ha dato luogo a valori compresi tra 10^5 e 10^1 CFU/ml sull'arricchimento finale con valori differenti anche tra le aliquote positive di uno stesso campione (dati non mostrati). Il rapporto di positività tra le unità positive ed il totale delle unità dei lotti positivi è 0,27 (CI95% 0,11-0,52) per i lotti positivi O157 (4/15) e 0,43 (CI95% 0,32-0,54) per i lotti positivi O26 (30/70). La

qPCR di screening non ha evidenziato la presenza di inibenti perché tutte le unità campionarie analizzate hanno dato positività al controllo interno pUC19.

I risultati della RT-PCR hanno confermato la presenza di cellule vitali in 13 lotti con 27/34 campionarie positive per la ricerca di O157 ed O26. Nonostante la conferma della presenza di cellule batteriche vive e vitali abbiamo ottenuto l'isolamento da 3 unità campionarie derivanti da 2 lotti diversi per O157 e da 9 unità campionarie derivanti da 3 lotti diversi per O26 per un totale di 12 isolati derivanti da 5 lotti. Questo dà luogo ad un rapporto di conferma del 35,3% confrontando le positività alla qPCR real-time (12/34). Il rapporto aumenta fino ad un valore del 44,4% se invece effettuiamo il rapporto prendendo in considerazione gli isolati e le conferme di positività in RT-PCR (12/27). Eseguendo il rapporto di isolamento per ogni singolo sierotipo confrontando il numero di isolati con le positività allo screening qPCR real-time iniziale otteniamo il 30% (9/30) per O26 ed il 75% (3/4) per O157.

Tra gli isolati abbiamo ottenuto tre O157 sorbitolo positivi, β -glucuronidasi positivi e negativi per tutti i fattori di virulenza *stx1-stx2* ed *eae*. Sono risultati negativi anche per tutti gli altri fattori di virulenza legati all'isola di patogenicità OI-122 e per *espK*. Tra i nove isolati O26 abbiamo ottenuto cinque isolati provenienti dalle 5 unità campionarie di un unico lotto che sono risultati ramnosio negativi ed *stx1* ed *eae* positivi. Questi isolati inoltre erano positivi per *espK* e possedevano l'allele 2 del gene *arcA* (*arcA2*). Gli altri quattro isolati provenienti da 2 lotti differenti erano tutti ramnosio positivi ed *eae* positivi, mentre si presentavano *stx1* ed *stx2* negativi. Come gli altri isolati O26 sono risultati positivi al gene *espK* ma a differenza di questi ultimi possedevano l'allele 1 del gene *arcA* (*arcA1*). Tutti gli isolati O26 hanno confermato la presenza della variante β della porzione terminale del gene *eae* e sono stati tutti caratterizzati come appartenenti al sierotipo :H11 (O26:H11). Sono risultati inoltre tutti incompleti circa i fattori di virulenza dell'isola di patogenicità OI-122 con la presenza di positività per i geni *sen*, *efa1* ed *efa2* e tutti negativi per il gene *pagC*.

I risultati del MPN-PCR sui campioni di latte risultati positivi al primo arricchimento hanno evidenziato delle basse concentrazioni di batteri patogeni per ml di latte con valori minori di $0,3 \text{ ml}^{-1}$ (CI_{95%} 0-0,95) ad eccezione di due campioni che hanno dato un valore di $1,4 \text{ ml}^{-1}$ (CI_{95%} 0,36-4,2).

DISCUSSIONE

I risultati ottenuti nella nostra ricerca evidenziano un valore di positività del 2,5% di VTEC nel latte crudo e si presentano in accordo con i dati relativi alla presenza del patogeno

all'interno della matrice alimentare in cui le concentrazioni che oscillano tra 0-4% per i non-O157 secondo Farrokh (2012) mentre secondo Baylis (2009) si possono raggiungere anche percentuali del 9% per O157 ed il 20% per i non-O157. Sicuramente i risultati ottenuti, seppur in numero limitato, danno delle indicazioni sia sullo stato igienico-sanitario delle mandrie sia sulla corretta esecuzione delle GMP legate alla mungitura. Bisogna però considerare che il metodo di campionamento utilizzato può fortemente influenzare gli stessi risultati ottenuti. La percentuale di isolamento ottenuta è del 35,3% confrontando il totale degli isolati con il numero di unità campionarie positive all'arricchimento e questo rapporto risulta essere il 44,4% se confrontiamo gli isolati con la positività alla RT-PCR che indica la presenza di cellule in vive in attiva replicazione (Sheridan et al.,1998) in quanto i geni *rfbEO157* e *wzxO26* sono entrambi coinvolti nella sintesi della parete cellulare che risulta indispensabile alle vita cellulare. Il rapporto di isolamento nel nostro lavoro si presenta superiore a quello ottenuto da Lynch et al. (2012) che ha ottenuto valori di isolamento complessivi pari al 15% confrontando il numero di campioni positivi alla real-time PCR ed il numero di isolati. Inoltre Lynch et al. (2012) effettuano un rapporto di isolamento anche all'interno dei singoli sierogruppi con valori compresi del 31% del sierotipo O26 e del 51% del sierotipo O157. I nostri dati di isolamento considerando i sierotipi sono in linea con quelli di Lynch et al. (2012) per quanto riguarda il sierotipo O26 con un valore del 30% e sono invece maggiori per quanto riguarda il sierotipo O157 con il 75%. Il fatto che abbiamo ottenuto mediante IMS 12 isolamenti su 34 campioni positivi alla PCR di screening può essere solo in parte attribuito alla mancanza di vitalità del batterio all'interno dell'estratto di DNA, che può essere valido sicuramente per le 7 aliquote non confermate con il metodo RT-PCR. Tutti i campioni dai quali sono stati isolati i batteri presentavano un valore di $C_T < 33$ alla RT-PCR con una valore quantitativo di circa 10^3 CFU/ml. Riteniamo che, probabilmente, la concentrazione batterica all'interno dell'arricchimento fosse troppo bassa per poter consentire l'isolamento batterico mediante IMS. Questi dati sono in accordo con quanto evidenziato da Karch et al. (1996). Inoltre la conferma mediante RT-PCR della vitalità del batterio non consente la determinazione precisa delle caratteristiche di virulenza di ogni singolo patogeno all'interno dell'arricchimento analizzato.

Nel nostro studi abbiamo ottenuto l'isolamento a partire da 3 lotti diversi del sierotipo O26. Di questi 2 (il 5% dei campioni) si presentavano negativi per la *stx1* e *stx2* ma positivi per *eae*. Successive verifiche hanno evidenziato l'incompleta presenza dei geni presenti nell'isola di patogenicità OI-122, la positività per la variante *eae-β*, mentre sono risultati negativi per *espK* e l'allele *arcA2*. Questi ultimi due geni, associati alla presenza dell'*eae-β* sono

considerati come discriminanti dei ceppi O26 VTEC o VTEC-like (Bugarel et al., 2011). Sulla base di queste considerazioni la negatività PCR nei confronti dei geni *stx1* ed *stx2* non dovrebbe portare a disinteressarsi del campione in quanto si possono perdere importanti dati epidemiologici circa la presenza di *Escherichia coli* all'interno delle matrici alimentari alla luce del fatto che ci sono stati diversi studi che dimostrano la perdita dei geni codificanti per la verocitotossina in seguito a passaggi di laboratorio o anche in pazienti affetti da HUS che però eliminavano ceppi *stx* negativi.

L'utilizzo dell'MPN-PCR ha consentito di ottenere una quantificazione dei batteri presenti all'interno del latte con valori di positività molto bassi e compresi tra 0,3 e 1,4 CFU ml⁻¹ con un valore massimo in un CI_{95%} di 4,2 CFU ml⁻¹. Questi dati si presentano in accordo con studi effettuati riguardanti la concentrazione dei VTEC nel latte all'interno di silos presso le aziende di trattamento e che presentavano valori tra 0,0055 e 1,1 CFU ml⁻¹ (Jackson et al. 2012). L'analisi MPN-PCR è un metodo che presenta una buona sensibilità in quanto combina una fase di arricchimento all'interno di un terreno non selettivo seguito da una analisi PCR quantitativa. L'arricchimento all'interno di terreni non selettivi consente sicuramente la crescita anche dei batteri che risultano maggiormente stressati dalle basse temperature o dalla presenza di interferenti, cosa che potrebbe non accadere nel caso in cui si sceglissero dei terreni selettivi con presenza di antibiotici o di sali biliari come agenti selettivi (Jasson et al., 2007; Jasson et al., 2009; Vimont et al., 2006; Vimont et al., 2007).

La presenza di concentrazioni molto basse all'interno del latte crudo non lo rende però completamente privo di rischi soprattutto perché la bassa dose infettante dei VTEC (meno di 100 UFC) che li rende un importante pericolo per la sicurezza del consumatore (Betts, 2000; Delignette-Muller M. L, 2008; Nataro et al., 1998). Pertanto risulta essere molto importante la comprensione del comportamento del batterio sottoposto a trattamenti termici più o meno intensi al fine di determinare con esattezza i valori D e Z per meglio garantire la sicurezza del consumatore per quanto riguarda i prodotti lattiero-caseari cosiddetti minimally-processed.

I risultati ottenuti rapportando il numero di aliquote positive all'interno di uno stesso lotto di prodotto evidenziano il fatto che la distribuzione del patogeno all'interno del latte non è omogenea. Notiamo infatti che un solo campione ha dato, in seguito all'arricchimento, positività in tutte le aliquote campionarie dando luogo a dei risultati differenti tra le singole aliquote con dei valori compresi tra 10³ e 10⁵ CFU/ml riportando il valore di C_T in CFU/ml come descritto in materiali e metodi. Altri campioni hanno invece evidenziato un numero di aliquote positive compreso tra 1 e 4 ed i valori di ottenuti di CFU/ml oscillavano tra 10¹ e 10⁴. Questo a conferma del fatto che il VTEC all'interno del latte non è distribuito in modo

omogeneo e che la quantità iniziale di patogeno nel campione influenza il valore di C_T ottenuto in seguito all'arricchimento. In aggiunta a questo aspetto dobbiamo considerare che la concentrazione del patogeno è molto bassa all'interno della matrice alimentare e che le omogeneizzazione del campione porta ad ottenere una ulteriore diluizione all'interno della massa di latte in quanto le concentrazioni sono sicuramente più alte nel latte proveniente da allevamenti con animali eliminatori attivi ed in cui le GMP di corretta mungitura possono non essere eseguite correttamente. La legislazione di diverse regioni italiane riguardante la distribuzione e vendita di latte crudo alimentare prevede dei campionamenti ufficiali eseguiti con un singolo campione nel latte di massa suddiviso poi in diverse aliquote campionarie. I nostri risultati evidenziano che l'aspetto del campionamento è molto critico e che un singolo prelievo all'interno del latte di massa potrebbe non essere sufficiente ad individuare delle positività e che l'analisi in pool delle aliquote campionarie ridurrebbe in modo rilevante la probabilità di avere campioni positivi. Il singolo campionamento potrebbe risultare utile solo nel caso in cui si voglia mettere in evidenza il risultato come un obiettivo di performance (concentrazione media non superiore alla soglia di sensibilità definita in base ai metodi di analisi). Non può essere invece un metodo per valutare l'assenza del patogeno all'interno dell'allevamento. Nel nostro lavoro abbiamo utilizzato un auto campionatore che periodicamente preleva una piccola aliquota che concorre a formare l'aliquota complessiva prelevata durante lo scarico del latte nei tanks di raccolta. Il fatto che l'autocampionatore prelevi tante piccole aliquote di campione può essere di notevole aiuto per meglio comprendere l'effettiva distribuzione del patogeno all'interno del latte di massa sia nel caso in cui si volesse valutare la presenza di VTEC all'interno di un singolo frigo di stoccaggio in azienda sia se si volesse monitorare la presenza di VTEC all'interno dei tanks di raccolta del latte crudo in attesa di avviarlo alla trasformazione.

UTILIZZO DI UN PROTOCOLLO qPCR PER LA DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DEI VTEC NEL LATTE

INTRODUZIONE

La presenza degli *Escherichia coli* produttori di verocitotossine (VTEC o STEC) all'interno latte crudo rappresentano attualmente un pericolo emergente per la sicurezza alimentare. I metodi di ricerca quantitativi attualmente sono alla base di una corretta analisi del rischio alimentare.

L'utilizzo della real-time PCR consente di ottenere una serie di vantaggi in termini di limiti di individuazione, costi e soprattutto tempi. L'associazione di questo metodo di screening con IMS aumenta notevolmente la possibilità di isolamento dei VTEC dall'arricchimento iniziale. La presenza di batteri interferenti, insieme all'utilizzo di antibiotici, possono limitare lo sviluppo del batterio che può non raggiungere una soglia minima di necessaria all'isolamento necessaria all'IMS (Karch et al., 1996). Studi condotti da Hein et al. (2006) hanno dimostrato una significativa differenza dello sviluppo del batterico target dopo arricchimento in terreno non selettivo in differenti matrici alimentari. La verifica che, in seguito a fattori stressanti, vengano raggiunte le soglie minime di concentrazione batterica di VTEC indicate da Karch et al. (1996) rappresenta una necessità per ottimizzare le metodiche di isolamento soprattutto alla luce delle basse concentrazioni del patogeno all'interno del latte crudo (Jackson et al., 2012; Trevisani et al., under revision-a). La real-time PCR necessita però di una fase di arricchimento prima di poter procedere all'individuazione che deve essere sufficientemente lungo da consentire un adeguato sviluppo del patogeno nel brodo ed al contempo non deve inibire lo sviluppo di batteri precedentemente sottoposti a stress. Il comportamento e lo sviluppo di modelli di curve di crescita del VTEC all'interno di brodi di arricchimento in seguito a fattori stressanti sono di fondamentali per poter ottenere dei risultati di isolamento che corrispondono ad effettivi valori di prevalenza all'interno della matrice alimentare. Uno studio recente condotto da Kramer et al. (2011) ha confrontato la capacità di sviluppo di diversi sierotipi di Salmonella all'interno di una matrice alimentare confrontando il valore di inoculo iniziale con il risultato della qPCR real-time in seguito ad arricchimento in terreni non selettivi. La correlazione tra i valori di contaminazione iniziale ed il valore di C_T ottenuto dopo un arricchimento meritano pertanto di essere approfonditi per una più attenta valutazione delle dinamiche di sviluppo batterico. La comprensione di quanto i batteri lattici

presenti nel latte crudo possano influenzare la crescita e lo sviluppo del VTEC rappresenta un importante punto di partenza per migliorare i protocolli di isolamento attualmente utilizzati. Lo scopo di questo lavoro è quello di comprendere la dinamica di crescita del VTEC all'interno di latte crudo artificialmente contaminato e sottoposto a refrigerazione per 24h al fine di individuare le condizioni ed i tempi ottimali di crescita per giungere all'isolamento. Sono stati indagati ed ottimizzati i tempi di arricchimento ed il valore di C_T della real-time PCR è stato confrontato tra i ceppi presi in esame e modellizzati. La messa a punto di curve di crescita di diversi ceppi di uno stesso sierotipo con lo scopo di confrontarne il loro comportamento rappresenta un auspicabile punto di partenza per metter a punto una standardizzazione dello sviluppo batterico.

MATERIALI E METODI

I ceppi utilizzati derivano dalla nostra collezione in Tryptone Soya Agar (TSA) semi-solido presente nel nostro laboratorio e sono tutti caratterizzati dalla presenza della verocitotossina (vedi Tabella 1). I ceppi sono stati arricchiti in Tryptone Soya Broth (TSB, OXOID, Basingstone, UK) a 37°C per 18 ore al fine di raggiungere la fase di crescita esponenziale. Successivamente sono stati titolati ad una trasmittanza di circa il 40% ad una lunghezza d'onda di 540nm ($T_{540nm} \sim 40\%$) che corrisponde ad una concentrazione batterica $\sim 10^8$ CFU/ml. Questa soluzione è stata sottoposta a diluizioni seriali in diluente e queste diluizioni sono state utilizzate per contaminare la matrice. 100µl in doppio delle diluizioni contenenti $\sim 10^2$ e $\sim 10^1$ CFU/ml sono stati seminati per spatolamento su Tryptic Soy Agar (TSA, OXOID, Basingstone, UK) ed incubati a 37°C per 24 ore per effettuare il conteggio del ceppo.

Sono stati prelevati campioni da 500 ml di latte crudo bovino appena munto non contaminato da VTEC presso una locale stalla. I campioni di latte sono stati trasportati in laboratorio e utilizzati entro 1 ora dalla raccolta. Dal campione di latte sono state prelevate 5 aliquote di 9 ml ciascuna e messi in un sacco da Stomacher sterile. Le aliquote sono state contaminate con 1 ml di una diluizione seriale del ceppo VTEC contenente rispettivamente 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 che sono stati pertanto diluiti nel latte con una diluizione 1:10. Il latte contaminato è stato mantenuto in frigorifero per 24 ore ad una temperatura compresa tra 0-4°C al fine di simulare le condizioni di stoccaggio del latte all'interno del tank presente nelle aziende. Dopo lo stoccaggio del latte contaminato questo è stato sospeso in 90 ml di Buffered Peptone Water (BPW, OXOID, Basingstone, UK) per il sierotipo O157.

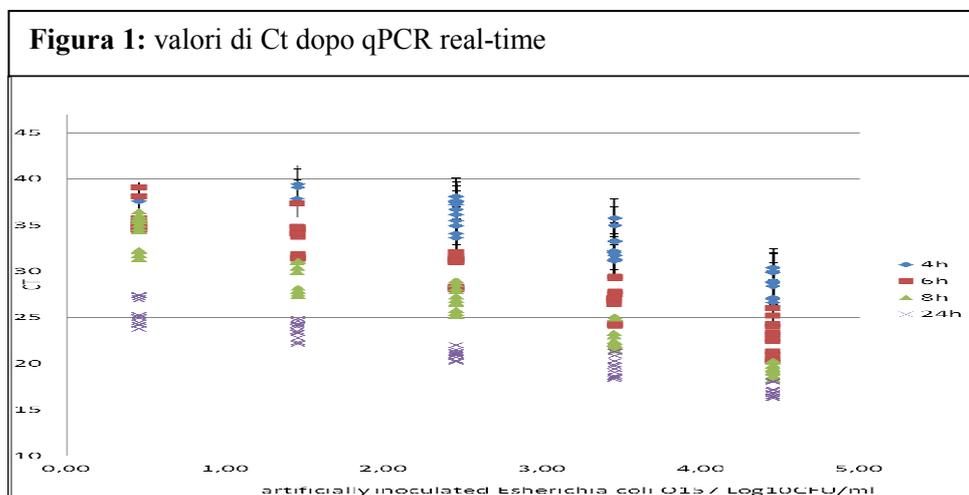
Questi brodi sono poi stati arricchiti a 37°C al fine di consentirgli la crescita. Dopo 4,6,8 e 24 ore di arricchimento sono stati prelevati in doppio 1 ml di brodo da ogni diluizione di ceppo ed estratti mediante CHELEX 100® come previsto da Walsh et al (1991). Gli estratti sono stati sottoposti a qPCR real time eseguita con una master mix preformulata (IQ Supermix, Bio-Rad®) utilizzando primers e probes specifici per *rfbEO157* (Perelle et al., 2004) (Tabella 2). Il protocollo di amplificazione prevedeva: 3 min. 95°C, seguiti da 40 cicli con 10 sec. a 90°C e 45 sec. a 63°C utilizzando un termociclatore Bio-Rad MiniOpticon®.

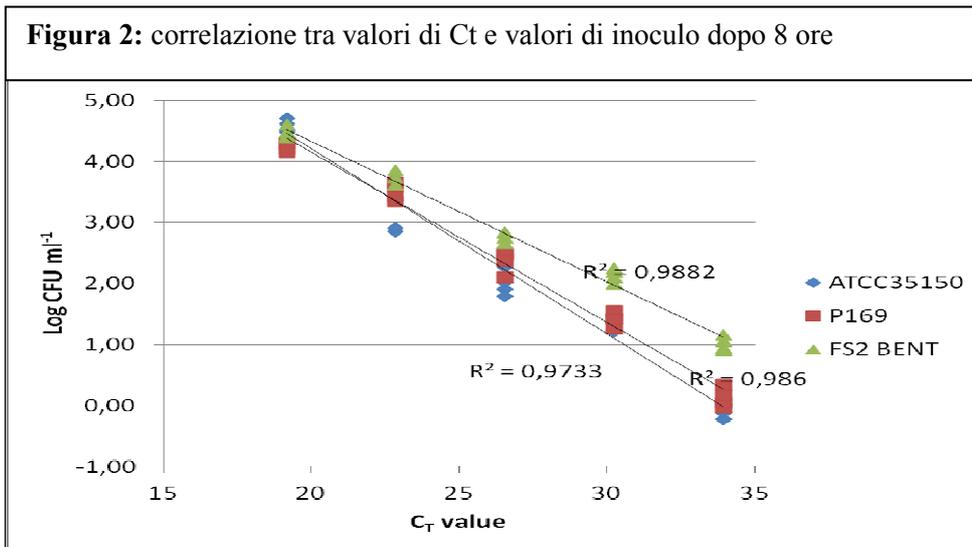
Come ulteriore conferma della quantità di ceppo inoculato e per verificare la mancanza di crescita durante la refrigerazione sono stati prelevati 10 ml da ogni brodo e per ogni diluizione, prima dell'arricchimento, per effettuare il conteggio mediante MPN-PCR come indicato da Blodgett (2004). Questi 10 ml prelevati sono stati diluiti in modo da ottenere delle diluizioni contabili ed incubati in BPW a 37°C per 24 ore. Dopo l'incubazione il DNA estratto mediante CHELEX 100® (Walsh et al., 1991) e sottoposti ad analisi qPCR real-time come descritto sopra.

Tabella 1: caratteristiche dei ceppi O157 utilizzati		
NOME CEPPPO	FONTE	CARATTERISTICHE
ATCC 35150	CEPPO REFERENZA	O157; STX1;STX2; eae; hly
FS2BENT	FILTRO LATTE	O157; STX1; STX2; eae; hly
P169	PELLE BOVINA	O157; STX2; eae; hly

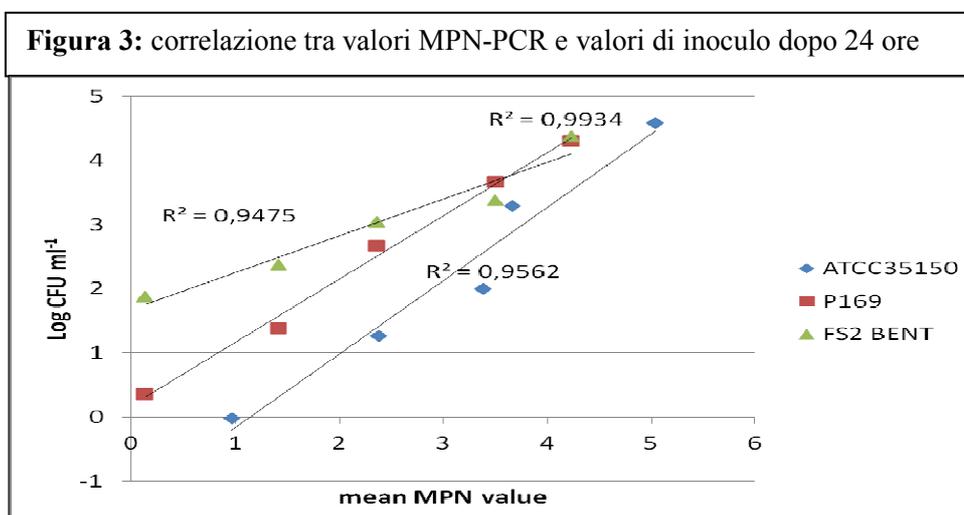
RISULTATI

I risultati sono schematizzati nelle figure 1-3.





I valori di C_T ottenuti dopo 4 ore di incubazione per i valori di contaminazione fino a 10^2 sono compresi tra il ciclo 35 ed il ciclo 40. Questi valori di C_T sono già dopo 4 ore intorno al ciclo 33 per la contaminazione di 10^3 ed intorno al 30 per la contaminazione 10^4 . Aumentando il tempo di incubazione progressivamente il valore di C_T decresce (Figura 1) fino a raggiungere i minimi che dopo un arricchimento per 24 ore sono in un intervallo compreso tra C_T 25 (inoculo iniziale 10^0) e C_T 16 per il 10^4 . Analizzando i dati dei valori di C_T registrati dopo 8 ore di arricchimento in relazione alle concentrazioni iniziali, abbiamo osservato valori di correlazione compresi tra 0,97 e 0,98 (Figura 2). La correlazione misurata nel corso degli stessi esperimenti, ma utilizzando per la quantificazione il metodo di calcolo MPN-PCR e un arricchimento di 24 ore mostrano valori di correlazione compresi tra 0,95 e 0,99 (Figura 3).



DISCUSSIONE

I risultati ottenuti mostrano che impiegando un terreno non selettivo di arricchimento, quale il BPW, i diversi ceppi *E. coli* O157 produttori di verocitotossine sono in grado di sviluppare e nell'arco delle 24 ore (a 37°C) anche i campioni con i valori d'inoculo più bassi hanno mostrato crescita, tuttavia non è possibile valutare una correlazione significativa tra valori C_T e concentrazione degli inoculi. Una migliore correlazione si è osservata con tempi d'incubazione di 6-8 ore. Per poter quantificare il numero di *E. coli* presenti inizialmente nell'inoculo attraverso una stima basata sulla misurazione dei valori C_T è fondamentale che vi sia un rapporto ben definito tra questi parametri.

La correlazione tra la concentrazione degli inoculi di tutti i ceppi al tempo zero e i valori di C_T misurati mediante qPCR dopo 8 ore d'incubazione, mostrano la correlazione migliore ($R^2=0,938$) e un coefficiente di regression (slope) pari a -3,6886 ci confermano che la crescita ed il recupero mediante PCR real-time non solo è presente in tutti i ceppi ed arricchimenti ma è anche costante e mantiene delle buone proporzioni. Questo rilievo testimonia il fatto che tutti i ceppi utilizzati nello studio hanno una durata simile della fase stazionaria della curva di crescita con conseguente presenza dell'instaurarsi della fase di crescita esponenziale che comporta l'aumento numerico del patogeno con conseguente maggiore possibilità di isolamento. I nostri risultati concordano con quelli ottenuti da Kramer et al., (2011) dopo un arricchimento della durata di 8 ore in un terreno non selettivo. .

Effettuando invece la comparazione tra il valore dell'inoculo iniziale ed il valore del C_T in seguito alla PCR dopo 8 ore otteniamo i valori di $R^2=0,9733$ per ATCC35150, $R^2=0,986$ per P169 e $R^2=0,9882$ per FS2BENT ad ulteriore conferma del buon recupero ottenuto e del rapporto costante tra inoculo ed accrescimento.

La numerazione dei batteri nell'inoculo è stata effettuata attraverso la conta 100 μ l di semina per spatolamento su TSA in seguito a delle diluizioni seriali ed incubato a 37°C per 24 ore. Dopo la refrigerazione e la diluizione con brodo di arricchimento il conteggio è stato rieseguito al fine di verificare la mancanza di crescita dei VTEC nel latte durante lo stoccaggio in frigo e per ulteriore conferma del numero di VTEC inoculati nel latte crudo. Il conteggio è stato eseguito mediante MPN come indicato da Blodget et al., (2004) in seguito ai risultati ottenuti con PCR real-time come descritto in materiali e metodi.. Il metodo MPN-PCR è stato precedentemente confermato come molto sensibile e specifico anche per il sierotipo O157 (Jamshidi et al., 2011). I valori evidenziati in seguito al conteggio confermano i livelli di inoculo confermando l'accuratezza della metodica. Confrontando il

valore ottenuto con il conteggio MPN in seguito a qPCR confrontato con il valore di inoculo iniziale per ogni ceppo otteniamo dei valori di R^2 che oscillano tra 0,9475 del FS2BENT ed il 0,9934 del P169 che consentono di valutare positivamente questa correlazione a conferma del fatto che la crescita è costante nel tempo nei diversi ceppi testati per questo sierotipo.

Il comportamento del VTEC durante l'arricchimento ha permesso di attribuire alle 8 ore il valore minimo ottimale per raggiungere una concentrazione tale che consente l'individuazione mediante PCR real-time. Dopo 8 ore risultano ottimali anche i rapporti di crescita tra i diversi ceppi in proporzione all'inoculo iniziale. Un prolungamento dell'arricchimento fino a 24 ore non consente, invece, di mantenere queste proporzioni costanti soprattutto in caso di confronto tra gli inoculi iniziali più alti (10^3 e 10^4 UFC/ml) che risultano in prossimità della fase stazionaria di crescita già dopo 8 ore. Il prolungamento può essere auspicabile in caso si voglia procedere all'isolamento batterico per avere maggiori possibilità in quanto anche concentrazioni più basse possono raggiungere livelli finali di 10^5 UFC/ml con un aumento notevole delle possibilità di isolamento. I risultati ottenuti da Hein et al. (2006) confermano il fatto che dopo un arricchimento prolungato (16 ore) anche in terreni non selettivi o universali non è più possibile effettuare un paragone tra inoculi e valori di C_T in quanto i patogeni hanno raggiunto la fase di crescita esponenziale. Pertanto 8 ore di arricchimento rappresentano, almeno per il VTEC O157, una durata ottimale per poter correlare il valore di C_T ottenuto dopo qPCR real-time ad un valore di CFU/ml inizialmente presente nella matrice.

Questo studio fornisce delle importanti indicazioni sul comportamento di crescita del VTEC O157 all'interno del latte crudo in presenza di un arricchimento non selettivo quale i BPW. La conferma del fatto che anche concentrazioni nell'ordine di 10^0 CFU/ml di VTEC O157 possano essere facilmente riscontrate dopo un arricchimento è un importante punto di partenza per la modellizzazione delle curva di crescita del patogeno. Vanno sicuramente approfonditi anche i comportamenti di altri sierotipi isolati dal latte crudo o da alimenti da esso originati coinvolti nell'insorgenza di focolai di malattie alimentari per poter ottenere una più accurata analisi del rischio ed una più accurata valutazione del comportamento dei VTEC.

COMPORTAMENTO E RISISTENZA AL CALORE DEI VTEC NELLA MOZZARELLA DI BUFALA

INTRODUZIONE

L'infezione umana provocata dagli *Escherichia coli* produttori di verocitotossine (VTEC o STEC) rappresenta una delle principali infezioni alimentari presenti in Europa (EFSA 2010). La presenza degli *Escherichia coli* verocitotossici negli alimenti rappresenta un grave pericolo per la salute dei consumatori. Il suo riscontro nei campioni animali e ambientali nella fase di produzione primaria è relativamente frequente (Trevisani et al., under revision-a; Trevisani et al., under revision-b; Jackson et al., 2012; Bonardi et al., 2005; Bonardi et al., 2007; Conedera et al., 2004; Hussein et al., 2005; Caprioli et al., 2005). . La contaminazione fecale diretta o mediata (con acqua, attrezzature, operatori) è all'origine della presenza di VTEC nella carne, nel latte e nei prodotti vegetali.. La fonte primaria, ospite abituale di VTEC sono i ruminanti domestici e selvatici e tra questi anche il bufalo è stato confermato come eliminatore dei VTEC O157 ed O26 (Galiero et al., 2005; Lorusso et al., 2009). Il consumo umano di prodotti crudi o poco cotti contaminati rappresenta la causa principale di questa infezione alimentare (Karmali et al., 2010; Hussein et al., 2007; Farrokh et al., 2012, Baylis 2009; Langer et al., 2012; Caprioli et al., 2005; Galiero et al., 2005). La presenza di VTEC sia O157 che non-O157 nel latte alimentare è stata evidenziata in diversi lavori che evidenziano in modo particolare il rischio legato al consumo di prodotti crudi o poco cotti (Langer et al., 2012; Farrokh et al., 2012; Keene et al., 1997). Dati italiani indicano che negli ultimi anni l'incidenza della malattia causata da O26 risulta essere maggiore rispetto a quella da O157 (Scavia et al., 2010).

La resistenza del VTEC all'interno dei formaggi freschi prodotti con latte crudo come ad esempio la mozzarella di bufala campana DOP può rappresentare un pericolo e in Italia è stato segnalato un focolaio con tre casi di SEU nei bambini nel quale il consumo di mozzarella di bufala prodotta nella provincia di Salerno è stato riconosciuto come causa dell'infezione (Scavia et al., 2005). La presenza negli allevamenti dei ceppi VTEC di rilevante interesse per la salute pubblica deve essere attentamente valutata e devono per questo motivo essere definite dai piani di autocontrollo gli obiettivi di performance appropriati. La frequenza e il livello di contaminazione del latte devono essere 'irrilevanti' e compatibili con la sicurezza del prodotto in rapporto all'utilizzo del latte, quindi, nel caso della mozzarella, con il

trattamento termico che è attuato nella fase di filatura. Il trattamento termico è definito sulla base di una valutazione 'empirica' la prova di filatura. Studi condotti da alcuni ricercatori italiani (Spano et al., 2003) avrebbero evidenziato l'importanza dell'utilizzo di acqua ad una temperatura di 80° per ottenere l'inattivazione di *E. coli* O157:H7 che non sarebbe invece garantita da una temperatura dell'acqua di 70°C . Tuttavia questo studio non valuta il raggiungimento della temperatura a cuore del prodotto e che l'utilizzo di acqua calda ad 80°C in cagliate di grandi dimensioni potrebbe non avere lo stesso effetto termico sul VTEC O157:H7. Nel corso delle attività di ricerca abbiamo voluto valutare la resistenza di VTEC O157 e O26 nella cagliata utilizzando diverse combinazioni di tempo e temperatura al fine di sviluppare un modello d'inattivazione termica. Per ovviare ai problemi di conteggio di batteri vitali, ma non coltivabili in presenza di fattori selettivi, il conteggio del VTEC è stato eseguito in seguito a qPCR real-time impiegando il per il conteggio il metodo MPN (Bludget et al., 2004) associato con la conferma colturale delle unità campionarie positive.

MATERIALI E METODI

Due ceppi di *Escherichia coli* produttori di sono stati utilizzati in questo studio presenti nella nostra collezione: VTEC O157:H7 FSBENT e VTEC O26:H11 L5N1 (Tabella 1). I due ceppi sono stati arricchiti per 18 ore a 37°C in Tryptic Soy Broth (TSB, OXOID, Basingstone, UK) per raggiungere la fase esponenziale di crescita. Successivamente sono stati titolati ad una trasmittanza del 40% ad una lunghezza d'onda di 540nm ($T_{540nm} \sim 40\%$) corrispondente ad una concentrazione batterica di $\sim 10^8$ CFU/ml. Questa concentrazione è stata sottoposta a diluizioni seriali e 100µl delle concentrazioni contenenti $\sim 10^2$ e $\sim 10^1$ CFU/ml sono state seminate su Tryptic Soy Agar (TSA, OXOID, Basingstone, UK) per spatolamento ed incubate a 37°C per 24 ore per effettuare il conteggio batterico.

Circa 200 grammi di cagliata di mozzarella sono stati prelevati in un caseificio locale e stoccati fino al raggiungimento di un valore di pH compresi tra 5,1 e 5,3. 1 grammo è stato pesato in tredici provette Eppendorf® , in doppio per sei tempi di prova e sono stati posti in un termo blocco (Thermostat Plus, Eppendorf, Germany). Una provetta è stata utilizzata per misurare la temperatura attraverso l'utilizzo di un termometro MIG. Le prove sono state eseguite alla temperatura di 68°C, 70°C, 73°C, 78°C ed 80°C. Al raggiungimento della temperatura nella provetta in cui questa veniva misurata i campioni sono stati contaminati al centro con 100µ della diluizioni contenente $\sim 10^8$ CFU/ml, mentre una serie di provette è stata contaminata e posta immediatamente in ghiaccio fondente ed utilizzata come indicatore del

tempo 0 e le altre mantenute in termo blocco al calore per 2, 3, 5, 7 e 10 minuti rispettivamente. Dopo il trattamento termico il contenuto delle Eppendorf è stato posto in un sacchetto da stomacher e sottoposto a 30 minuti di trattamento con 1 ml papaina (Isogrid, Acumedia, USA) a temperatura ambiente con la finalità di eliminare tutti i coaguli presenti nella cagliata. Dopo il trattamento con una soluzione di papaina il campione è stato diluito con 48ml di Buffered Peptone Water (BPW, OXOID, Basingstone, UK), diluizione 2:50 ed omogeneizzato in stomacher per 3 minuti. Successivamente 10 ml per ogni campione sono stati prelevati ed a partire da questi sottoposti a diluizioni seriali in BPW (10-1-0,1-0,01-0,001 etc..) in triplicato per la conta delle cellule batteriche vitali mediante il metodo MPN (Bodgett et al., 2004) e messe ad incubare a 37°C per 24 ore. Il DNA è stato estratto mediante Chelex 100 ® come descritto da Walsh et al. (1991).

La crescita e quantificazione batterica sono state valutate attraverso l'esecuzione della qPCR-real time mediante primers e probe specifici per *rfbEO157* e *wzxO26* descritti da Perelle et al. (2004) (Tabella 2) eseguita utilizzando una master mix preformulata (IQ Supermix, Bio-Rad ®). Il protocollo di amplificazione prevedeva: 3 min. 95°C, seguiti da 40 cicli con 10 sec. a 90°C e 45 sec. a 63°C utilizzando un termociclatore Bio-Rad MiniOpticon ®. A conferma della crescita batterica 10µl della provetta incubata sono stati seminati su CT-SMAC e CT-RMAC e le colonie con morfologia tipica (sorbitolo negativi O157 e ramnosio negative O26) sono state sottoposte a siero-agglutinazione rapida (dry SPOT *E. coli* O157 / dry SPOT serocheck O26 – OXOID ®).

Tabella 1: caratteristiche dei ceppi O157ed O26 utilizzati		
NOME CEPPO	FONTE	CARATTERISTICHE
FS2BENT	FILTRO LATTE	O157; STX1; STX2; eae; hly
L5N1	LATTE BOVINO	O26; STX1; eae; hly

Tabella 2: sequenza dei primers e probe utilizzate per la qPCR real-time		
GENE	SEQUENZA	LAVORO
<i>rfbE</i> (O157)	F- TTTCACACTTATTGGATGGTCTCAA R- CGATGAGTTTATCTGCAAGGTGAT PROBE- AGGACCGCAGAGGAAAGAGAGGAATTAAGG	Perelle et al.,2004
<i>wzx</i> (O26)	F- CGCGACGGCAGAGAAAATT R- AGCAGGCTTTTATATTCTCCAACCTT PROBE- CCCGTAAATCAATACTATTTACGAGGTTGA	

RISULTATI

Il comportamento dei due ceppi sperimentati non si presenta molto differente. Possiamo però notare che sia alle temperature più alte di 77°C ed 80°C che alle temperature un più basse di 68°C, 70°C e 73°C a partire dai 5 minuti sia L5N1 (O26) che FS2BENT (O157) siano già presenti delle riduzioni della concentrazione batterica nell'ordine di 5-6 Log. Prolungando ulteriormente i tempi di somministrazione fino a 7 e 10 minuti possiamo notare che il calore provoca la morte di tutti i batteri nel caso del sierotipo O26 e di quasi tutti i batteri nel caso del sierotipo O157 che raggiunge valori nell'ordine di grandezza di 10⁰ cfu/g. La riduzione complessiva è nell'ordine di 6-7 Log sia se guardiamo i dati relativi al valore medio sia se facciamo riferimento ai dati relativi ai valori massimi all'interno dell'intervallo di confidenza. Se invece andiamo ad analizzare il comportamento dei due sierotipi considerando i risultati della MPN-qPCR real-time alle temperature progressivamente minori come 73°C, 70°C e 68°C possiamo notare che il tasso di mortalità batterica si attesta intorno ad un valore di 5-6 Log sia per i valori medi che per i valori più alti all'interno dell'intervallo di confidenza per il sierotipo O157, mentre per aumento riguarda il sierotipo O26 si parte da una riduzione nell'ordine di 5 Log per le temperature di 73°C e 70°C sia nei valori medi che nei valori massimi per poi dar luogo ad una riduzione nell'ordine di 4 Log per i 68°C di temperatura. Questi valori medi di riduzione per entrambi i sierotipi alle temperature più basse vengono già raggiunti dopo 5 minuti di somministrazione di calore (Tabella 3 e 4). La decrescita dei VTEC non si manifesta in modo costante nell'arco del periodo di somministrazione del calore. Possiamo infatti notare un importante calo della concentrazione del patogeno dopo 2-3 minuti. Questo porta in alcuni casi anche al dimezzamento dell'ordine di grandezza della concentrazione che però non sempre viene seguito da una graduale ulteriore diminuzione fino a portare alla scomparsa del patogeno che avviene solamente per le temperature di 77°C ed 80°C dopo 7 e 10 minuti.

Complessivamente possiamo notare che a temperature alte (77°C ed 80°C) entrambi i sierotipi subiscono un notevole calo della concentrazione mentre al diminuire della temperatura (73°C, 70°C e 68°C) sembra che il sierotipo O26 sia leggermente più resistente al calore rispetto al sierotipo O157.

Figura 1: decrescita del ceppo FS2BENT O157 nel tempo

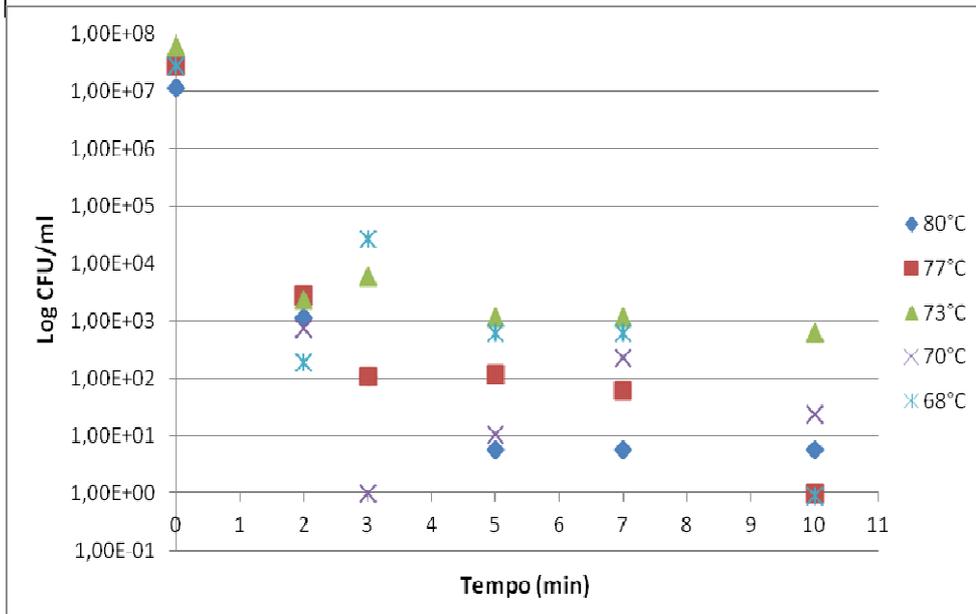


Figura 2: decrescita del ceppo L5N1 O26 nel tempo

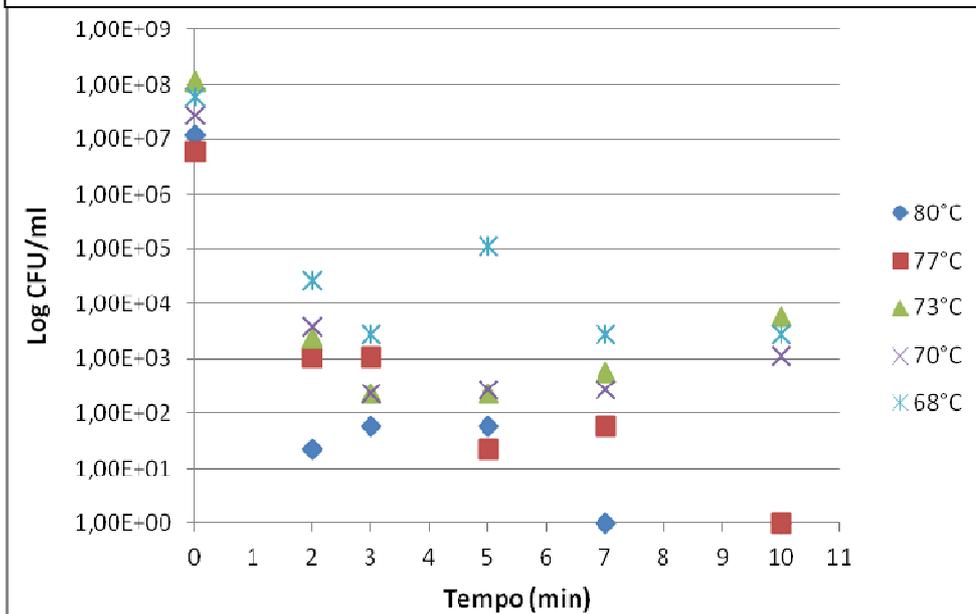


Tabella 3: Risultati MPN-qPCR real-time ceppo FS2BENT O157

Strain inoculated	Temperature (°C)	Time (min)	MPN	mean MPN/g	upper Cl _{95%} /g
FS2BENT (O157/vt1+/vt2+/eae+/hly+)	80°C	0	3/3/1	1,15E+07	5,00E+07
FS2BENT (O157/vt1+/vt2+/eae+/hly+)	80°C	2	3/3/1	1,15E+03	5,00E+03
FS2BENT (O157/vt1+/vt2+/eae+/hly+)	80°C	3	3/1/0	1,08E+02	4,50E+02
FS2BENT (O157/vt1+/vt2+/eae+/hly+)	80°C	5	3/0/0	5,75E+00	2,35E+01
FS2BENT (O157/vt1+/vt2+/eae+/hly+)	80°C	7	3/0/0	5,75E+00	2,35E+01
FS2BENT (O157/vt1+/vt2+/eae+/hly+)	80°C	10	3/0/0	5,75E+00	2,35E+01
FS2BENT (O157/vt1+/vt2+/eae+/hly+)	77°C	0	3/3/2	2,75E+07	1,03E+08
FS2BENT (O157/vt1+/vt2+/eae+/hly+)	77°C	2	3/3/2	2,75E+03	1,03E+04
FS2BENT (O157/vt1+/vt2+/eae+/hly+)	77°C	3	3/1/0	1,08E+02	4,50E+02
FS2BENT (O157/vt1+/vt2+/eae+/hly+)	77°C	5	3/3/1	1,15E+02	5,00E+02
FS2BENT (O157/vt1+/vt2+/eae+/hly+)	77°C	7	3/3/0	6,00E+01	2,50E+02
FS2BENT (O157/vt1+/vt2+/eae+/hly+)	77°C	10	0/0/0	<0,3	<0,3
FS2BENT (O157/vt1+/vt2+/eae+/hly+)	73°C	0	3/3/0	6,00E+07	2,50E+08
FS2BENT (O157/vt1+/vt2+/eae+/hly+)	73°C	2	3/2/0	2,33E+03	1,05E+04
FS2BENT (O157/vt1+/vt2+/eae+/hly+)	73°C	3	3/3/0	6,00E+03	2,50E+04
FS2BENT (O157/vt1+/vt2+/eae+/hly+)	73°C	5	3/3/1	1,15E+03	5,00E+03
FS2BENT (O157/vt1+/vt2+/eae+/hly+)	73°C	7	3/3/1	1,15E+03	5,00E+03
FS2BENT (O157/vt1+/vt2+/eae+/hly+)	73°C	10	3/3/0	6,00E+02	2,50E+03
FS2BENT (O157/vt1+/vt2+/eae+/hly+)	70°C	0	3/3/2	2,75E+07	1,03E+08
FS2BENT (O157/vt1+/vt2+/eae+/hly+)	70°C	2	2/3/0	7,25E+02	2,35E+03
FS2BENT (O157/vt1+/vt2+/eae+/hly+)	70°C	3	0/0/0	<0,3	<0,3
FS2BENT (O157/vt1+/vt2+/eae+/hly+)	70°C	5	3/1/0	1,08E+01	4,50E+01
FS2BENT (O157/vt1+/vt2+/eae+/hly+)	70°C	7	3/2/0	2,33E+02	1,08E+03
FS2BENT (O157/vt1+/vt2+/eae+/hly+)	70°C	10	3/2/0	2,33E+01	1,08E+02
FS2BENT (O157/vt1+/vt2+/eae+/hly+)	68°C	0	3/3/2	2,75E+07	1,03E+08
FS2BENT (O157/vt1+/vt2+/eae+/hly+)	68°C	2	3/1/1	1,88E+02	5,00E+02
FS2BENT (O157/vt1+/vt2+/eae+/hly+)	68°C	3	3/3/2	2,75E+04	1,03E+05
FS2BENT (O157/vt1+/vt2+/eae+/hly+)	68°C	5	3/3/0	6,00E+02	2,50E+03
FS2BENT (O157/vt1+/vt2+/eae+/hly+)	68°C	7	3/3/0	6,00E+02	2,50E+03
FS2BENT (O157/vt1+/vt2+/eae+/hly+)	68°C	10	1/0/0	9,00E-01	4,50E+00

Tabella 4: Risultati MPN-qPCR real-time ceppo L5N1 O26

Strain inoculated	Temperature (°C)	Time (min)	MPN	mean MPN/g	upper CI _{95%} /g
L5N1 (O26/vt1+/eae+hly+)	80°C	0	3/3/1	1,15E+07	5,00E+07
L5N1 (O26/vt1+/eae+hly+)	80°C	2	2/0/0	2,30E+01	9,50E+01
L5N1 (O26/vt1+/eae+hly+)	80°C	3	3/0/0	5,75E+01	2,35E+02
L5N1 (O26/vt1+/eae+hly+)	80°C	5	3/3/0	6,00E+01	2,50E+02
L5N1 (O26/vt1+/eae+hly+)	80°C	7	0/0/0	1,00E+00	0,00E+00
L5N1 (O26/vt1+/eae+hly+)	80°C	10	0/0/0	1,00E+00	0,00E+00
L5N1 (O26/vt1+/eae+hly+)	77°C	0	3/3/0	6,00E+06	2,50E+07
L5N1 (O26/vt1+/eae+hly+)	77°C	2	3/1/0	1,08E+03	4,50E+03
L5N1 (O26/vt1+/eae+hly+)	77°C	3	3/1/0	1,08E+03	4,50E+03
L5N1 (O26/vt1+/eae+hly+)	77°C	5	2/0/0	2,30E+01	9,50E+01
L5N1 (O26/vt1+/eae+hly+)	77°C	7	3/0/0	5,75E+01	2,35E+02
L5N1 (O26/vt1+/eae+hly+)	77°C	10	0/0/0	1,00E+00	0,00E+00
L5N1 (O26/vt1+/eae+hly+)	73°C	0	3/3/1	1,15E+08	5,00E+08
L5N1 (O26/vt1+/eae+hly+)	73°C	2	3/2/0	2,33E+03	1,05E+04
L5N1 (O26/vt1+/eae+hly+)	73°C	3	2/0/0	2,30E+02	9,50E+02
L5N1 (O26/vt1+/eae+hly+)	73°C	5	3/2/0	2,33E+02	1,05E+03
L5N1 (O26/vt1+/eae+hly+)	73°C	7	3/0/0	5,75E+02	2,35E+03
L5N1 (O26/vt1+/eae+hly+)	73°C	10	3/0/0	5,75E+03	2,35E+04
L5N1 (O26/vt1+/eae+hly+)	70°C	0	3/3/2	2,75E+07	1,03E+08
L5N1 (O26/vt1+/eae+hly+)	70°C	2	3/2/1	3,75E+03	1,05E+04
L5N1 (O26/vt1+/eae+hly+)	70°C	3	3/2/0	2,33E+02	1,05E+03
L5N1 (O26/vt1+/eae+hly+)	70°C	5	3/3/2	2,75E+02	1,03E+03
L5N1 (O26/vt1+/eae+hly+)	70°C	7	3/3/2	2,75E+02	1,03E+03
L5N1 (O26/vt1+/eae+hly+)	70°C	10	3/3/1	1,15E+03	5,00E+03
L5N1 (O26/vt1+/eae+hly+)	68°C	0	3/3/0	6,00E+07	2,50E+08
L5N1 (O26/vt1+/eae+hly+)	68°C	2	3/3/2	2,75E+04	1,03E+05
L5N1 (O26/vt1+/eae+hly+)	68°C	3	3/3/2	2,75E+03	1,03E+04
L5N1 (O26/vt1+/eae+hly+)	68°C	5	3/3/1	1,15E+05	5,00E+05
L5N1 (O26/vt1+/eae+hly+)	68°C	7	3/3/2	2,75E+03	1,03E+04
L5N1 (O26/vt1+/eae+hly+)	68°C	10	3/3/2	2,75E+03	1,03E+04

DISCUSSIONE

I risultati ottenuti nei due diversi sierotipi sono indicativi del comportamento in seguito a somministrazioni di calore differenti e per tempi differenti. Il fatto che sia il sierotipo O157 che il sierotipo O26 non vengano distrutti dalle temperature di 68°C, 70°C e 73°C ma che subiscano solo una diminuzione al massimo di 5 Log è indicativo del fatto che la somministrazione di calore che avviene per questi tempi e queste temperature non sono sufficienti a distruggere completamente il patogeno. La presenza di flora interferente e di altre molecole come grasso e proteine sicuramente ha un effetto protettivo sul patogeno. Da notare che in presenza di temperature più alte come 77°C ed 80°C osserviamo una diminuzione più marcata della concentrazione batterica nei primi 3-5 minuti o una completa morte per il sierotipo O26 o una riduzione fino all'ordine di grandezza di 10⁰ CFU/ml per O157 dopo 7-

10. L'*Escherichia coli* non è considerato sicuramente un batterio particolarmente resistente al calore infatti il suo valore $D_{60^{\circ}\text{C}}=0,30$ in caso di colture pure con un valore che aumenta in presenza di grasso all'interno della matrice alimentare come nel caso degli hamburger in cui è $D_{60^{\circ}\text{C}}=0,45$ (Jay et al.,2009). Questi valori sono in parziale disaccordo con altri autori come Dlusskaya et al. (2011) che riportano valori $D_{60^{\circ}\text{C}}$ compresi tra 0,15 e 71 a seconda dei ceppi di *Escherichia coli* che vengono presi in considerazione. Nella mozzarella di bufala siamo in presenza di una cagliata particolarmente ricca di batteri lattici e di grasso che hanno un effetto protettivo nei confronti del patogeno, mentre allo stesso tempo il valore del pH leggermente acido e compreso tra 5,1 e 5,3 dovrebbe diminuire la resistenza al calore (Jay et al., 2009) oltre che ad uno stato fisico del prodotto che sicuramente facilita la persistenza del batterio al suo interno andando a costituire delle "nicchie" che consentono la sopravvivenza dei due sierotipi almeno fino alla temperatura di 73°C . Dai dati ottenuti non siamo però in grado di confermare con certezza se il motivo principale della persistenza dei VTEC all'interno della cagliata alle temperature più basse è la struttura chimico-fisica della cagliata una volta raggiunta la temperatura dell'esperimento oppure se esistono ceppi con differenti capacità di resistenza al calore. Le temperature di 77°C e di 80°C per tempi lunghi sono anche in grado di abbattere anche la protezione offerta al patogeno ad opera della cagliata. Il metodo MPN-qPCR real-time utilizzato consente una numerazione dei batteri presenti in seguito ad una diluizione e l'arricchimento in BPW a 37°C per 24 ore si è confermato molto efficace nel consentire lo sviluppo anche a batteri sottoposti ad importanti stress da calore fisico.

Una blanda somministrazione di calore può rappresentare un importante rischio per la salute del consumatore in quanto consente la persistenza del VTEC all'interno della cagliata. L'operazione di filatura della mozzarella prevede il riscaldamento della massa di cagliata mediante aggiunta di acqua riscaldata a circa $85-90^{\circ}\text{C}$. La lavorazione con l'acqua calda consente alla cagliata matura (con un pH intorno al 5,2-5,3) di allungarsi e filare, permettendo di essere lavorata manualmente o con impastatrici meccaniche, per produrre la mozzarella. Il mantenimento della temperatura dell'acqua è critico per consentire il proseguimento della filatura e rappresenterebbe, alla luce dei nostri dati, un ottimo metodo per ottenere un abbassamento delle concentrazioni batteriche della cagliata. La temperatura di $77-80^{\circ}\text{C}$ però dovrebbe essere raggiunta anche a cuore nella cagliata dove sicuramente ci sono maggiori difficoltà legate alla struttura fisica del prodotto ed agli scambi termici che avvengono e questo potrebbe essere una difficoltà soprattutto nella lavorazione di cagliate di notevoli dimensioni. In alternativa un altro fattore che dovrebbe essere considerato è la possibilità di mettere a contatto con l'acqua calda a rotazione tutte le parti della cagliata durante

l'operazione di filatura in modo da consentire un aumento della temperatura maggiormente uniforme. La presenza di VTEC nel prodotto deve essere ridotta a 'zero'. La presenza di concentrazioni basse, nell'ordine di grandezza di 10^1 - 10^2 CFU/g, non garantisce la sicurezza del prodotto in quanto il VTEC si è dimostrato capace di causare infezione anche in presenza di 50-100 CFU (Calderwood et al., 1996; Nataro et al., 1998; Delignette-Muller M. L., 2008). Con lo scopo eliminare questo pericolo si rende necessaria perciò una corretta esecuzione dell'operazione di filatura che dovrebbe garantire temperature a cuore superiori ai 77-80°C all'interno della cagliata per almeno 5-7-10 minuti. Solo rispettando questi limiti per i parametri di tempo e temperatura si può garantire che il trattamento di filatura della mozzarella abbia un effetto di riduzione della concentrazione di VTEC equivalente a quello ottenuto con la pastorizzazione del latte (6-7 Log). Il trattamento termico potrebbe essere commisurato agli obiettivi di performance ottenuti nella fase di produzione della materia prima, il latte. Non è possibile garantire che la contaminazione sia uniforme nel latte. Nostri studi recenti (Trevisani et al., under revision-a) mostrerebbero che nel latte vaccino i valori di concentrazione batterica più alti sono nell'ordine di 10^0 CFU/ml (valore medio di 1,4 CFU/ml ed CI95% massimo di 4,2 CFU/ml). Questi dato sono suffragati da osservazioni di altri autori (Jackson et al., 2012) che hanno rilevato nel latte di massa, stoccato in silos di grosse dimensioni, valori simili (10^0 CFU/ml – fino a <1,1 CFU/ml.). Non sono però fornite indicazioni in merito al piano di campionamento e pertanto i valori indicati potrebbero essere indice di un dato medio.

Sulla base delle nostre osservazioni risulta necessaria una corretta attuazione delle buone pratiche d'igiene in allevamento e durante la mungitura, perché solo in questo modo è possibile prevenire una contaminazione notevole del latte. L'inattivazione termica del VTEC all'interno dei prodotti lattiero caseari a pasta filata è ancora poco studiata. La comprensione del suo comportamento è necessaria per standardizzare meglio la produzione rendendola completamente sicura da un punto di vista igienico-sanitario. Un ulteriore approfondimento riguardo il comportamento del patogeno durante la produzione potrebbe essere il tentativo di produrre mozzarella scandendo al meglio sia i tempi che le temperature di filatura all'interno di un caseificio cercando di coniugare la necessità di sicurezza alimentare con la genuinità di un prodotto che l'esperienza e la manualità lo rendono unico.

BIBLIOGRAFIA

1. Abedon S.T.;2008; Bacteriophage ecology: population growth, evolution and impact of bacterial viruses; Cambridge: Cambridge university press;
2. Alam M. J. and Zurek L.; 2006;Seasonal Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in Beef Cattle Feces; J. Food Prot. Vol. 69, No. 12, p.3018–3020;
3. Alonso, S., Mora, A., Blanco, M., Blanco, J.E., Dahbi, G., Ferreiro, M.T., Lopez, C., Alberghini, L., Albonetti, S., Echeita, A., Trevisani, M., Blanco, J.; 2007; Fecal carriage of *Escherichia coli* O157:H7 and carcass contamination in cattle at slaughter in northern Italy; Int. Microbiol. 10, p.109–116;
4. Arthur M. T., Barkocy-Gallagher G. A., Rivera-Betancourt M., Koohmaraie M.; 2002; Prevalence and characterization of non-O157 Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* on carcasses in commercial beef cattle processing plants; Applied and environmental microbiology, p. 4847–4852;
5. Bardiau M., Gregoire F., Muylaert A., Nahayo A., Duprez J.N., Mainil J., Linden A.;2012; Enteropathogenic (EPEC), enterohaemorrhagic (EHEC) and verotoxigenic (VTEC) *Escherichia coli* in wild cervids; Journal of Applied Microbiology 109, p.2214–2222;
6. Barkocy-Gallagher, G. A., Arthur T.M., Rivera-Betancourt M., Nou X., Shackelford S. D., Wheeler T. L., Koohmaraie M.; 2003;Seasonal prevalence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, including O157:H7 and non-O157:H7 serotypes, and Salmonella in commercial beef processing plants; J. Food Prot 66, p.1978–1986;
7. Baylis C.;2008-a; Growth of pure cultures of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* in a range of enrichment media; Journal of Applied Microbiology 105, p.1259–1265;
8. Baylis C.; Smith H., Bolton E., O’Brien S.; 2008-b;Review of past and current research on Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in relation to public health protection; issue date 23 June 2008, FSA Project No. B11010, Report No: MB/REP/106304;
9. Baylis C.; 2009; Raw milk and raw milk cheeses as vehicles for infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*; Int. J. Dairy Technol. 62, p.293–307;
10. Bettelheim K. A., Evangelidis H., Pearce J. L., Sowers E., Strockbine N. A.;1993; Isolation of a *Citrobacter freundii* strain which carries the *Escherichia coli* O157 antigen; Journal of Clinical Microbiology 31 p.760-761;
11. Betts C.D.; 2000; Controlling *E. coli* O157:H7; Nutrition and Food Science 30, p.183–186;
12. Beutin L., Krause G., Zimmermann S., Kaulfuss S., Gleier K.;2004; Characterization of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-Year Period; Jouranl of Clinical Microbiology, p. 1099–1108;
13. Bielaszewska M., Käch R., Friedrich A. W., von Eiff C., Zimmerhackl L. B., Karch H., Mellmann A.; 2007;Shiga Toxin-mediated hemolytic uremic syndrome: time to change the diagnostic paradigm? PLoS ONE, October 10, e1024;
14. Bielaszewska M., Mellmann A., Zhang W., Köck R., Fruth A., Bauwens A., Peters G., Karch H.; 2011; Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study; Lancet Infect Dis.; 11,p.671–76
15. Blanco J., Blanco M., Blanco J. E., Mora A., González E. A., Bernárdez M. I., Alonso M. P., Coira A., Rodríguez 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, p.345-351;

16. Blodget R.;2004; Most Probable Number from Serial Dilutions; In: Bacteriological Analytical Manual, Appendix 2 (2004); Available at: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm109656.htm>;
17. Bonardi S., Chiapponi C., Bacci C., Paris A., Salsi A.; 2005; Non-O157 verocytotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from cattle at slaughter in northern Italy; Ann. Fac. Medic. Vet. di Parma, Vol. XXV, (2005) pag. 181 - pag. 190;
18. Bonardi S., Foni E., Chiapponi C., Salsi A., Brindani F.;2007; Detection of Verocytotoxin-Producing *Escherichia coli* Serogroups O157 and O26 in the Cecal Content and Lymphatic Tissue of Cattle at Slaughter in Italy; Journal of Food Protection, Vol. 70, No. 6, p. 1493–1497;
19. Bonardi S., Maggi E., Pizzin G., Morabito S., Caprioli A.; 2001; Faecal carriage of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 and carcass contamination in cattle at slaughter in northern Italy; International Journal of Food Microbiology 66, p.47–53;
20. Bugarel M., Beutin L., Scheutz F., Loukiadis E., Fach P.;2011; Identification of Genetic Markers for Differentiation of Shiga Toxin-Producing, Enteropathogenic, and Avirulent Strains of *Escherichia coli* O26 Appl. Environ. Microbiol., 77: 2275;
21. Bustin S. A.;2002; Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems; Journal of Molecular Endocrinology, 29, p.23–39;
22. Butala M., Zugur-Bertok D., Busby S.J.W.; 2009;The bacterial LexA transcriptional repressor; Cell. Mol. Life Sci. 66, p.82 – 93;
23. Byrne C.M., O'Kiely P., Bolton D.J., Sheridan J.J., McDowell D.A., Blair L.S.;2002; Fate of *Escherichia coli* during silage fermentation; J. Food Prot 65,p.1854-1860;
24. Calderwood, S.B.,D.K. Acheson, G.T. Keusch, T.J. Barret, P.M. Griffin, N.A. Strokbine, B. Swaminathan, J.B. Kaper, M.M. Levine, B.S. Kaplan, H. Karch, A.D. O'Brien, T.G. Obrig, Y. Takeda, P.I. Tarr, I.K. Wachsmuth; 1996; Proposed new nomenclature for SLT (VT) family; ASM news 62 1996; p 118-119
25. Caprioli A., Morabito S., Grugere H., Oswald E.; 2005; Enterohaemorrhagic *Escherichia Coli*: emerging issues on virulence and models of trasmission; Vet. Res. 36, p. 289-311;
26. CLSI-a; 2006; Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 16th international supplement, M100-S15; Waive PA: CLSI 2006;
27. CLSI-b;2006; Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals, tentative guideline M31-A3; 3rd edition; Waive PA: CLSI 2006;
28. 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; International Journal of Food Microbiology 96, p.67– 73;
29. Dambrosio A., Lorusso V., Quaglia N.C., Parisi A., La Salandra G., Virgilio S., Mula G., Lucifora G., Celano G.V., Normanno G.; 2004; *Escherichia coli* O26 in minced beef: prevalence, characterization and antimicrobial resistance pattern; Int J Food Microbiol.,118(2)p.218-222;
30. Delignette-Muller M. L., Cornu M., the AFSSA STEC Study Group;2008; Quantitative risk assessment for *Escherichia coli* O157:H7 in frozen ground beef patties consumed by young children in French households; International Journal of Food Microbiology 128, p.158–164;
31. Di R., Tumer N. E.; 2010; Real –time reverse transcription PCR detection of viable shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 in food; Journal of Food Safety 30, p51–66;
32. Dlusskaya E. A., McMullen L. M., Ganzle M. G.; 2011; Characterization of an extremely heat-resistant *Escherichia coli* obtained from a beef processing facility; Journal of Applied Microbiology 110, 840–849;
33. ECDC 2007; Annual Epidemiological Report on Communicable Diseases in Europe; European Centre for Disease Prevention and Control, 2007; ISBN 978-92-9193-062-3;
34. ECDC 2008; Annual Epidemiological Report on Communicable Diseases in Europe; European Centre for Disease Prevention and Control 2008; ISBN 978-92-9193-137-8;

35. ECDC 2009; Annual epidemiological report on communicable diseases 2009; European Centre for Disease Prevention and Control 2009; ISBN 978-92-9193-196-5;
36. ECDC 2010; Annual epidemiological report on communicable diseases 2010; European Centre for Disease Prevention and Control 2010; ISBN 978-92-9193-222-1;
37. ECDC 2011; Annual epidemiological report Reporting on 2009 surveillance data and 2010 epidemic intelligence data; European Centre for Disease Prevention and Control 2011; ISBN 978-92-9193-321-1;
38. ECDC 2011; Outbreak of Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) O104:H4 2011 in the EU 8 July 2011 (updated from 29 June); Stockholm, July 2011; European Centre for Disease Prevention and Control, 2011.
39. EFSA 2007; The Community Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents, Antimicrobial Resistance and Foodborne Outbreaks in the European Union in 2006; The EFSA Journal 2007 – 130, 3-352;
40. EFSA 2009-a; Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents in the European Union in 2007; The EFSA Journal 2009 – 223 3/320;
41. EFSA 2009-b; Technical specifications for the monitoring and reporting of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) on animals and food (VTEC surveys on animals and food); SCIENTIFIC REPORT OF EFSA; EFSA Journal 2009; 7(11):1366
42. EFSA 2011; The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009; SCIENTIFIC REPORT OF EFSA AND ECDC; EFSA Journal 2011;9(3):2090; EFSA 2012; The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010; SCIENTIFIC REPORT OF EFSA AND ECDC; EFSA Journal ,10(3):2597, (2012)
43. Elder, R. O., Keen J. E., Siragusa G. R., Barkocy-Gallagher G. A., Koohmaraie M., Laegreid W. W.; 2000; Correlation of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157 prevalence in feces, hides and carcasses of beef cattle during processing. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97:2999–3003;
44. Evans J., Knight H., McKendrick I. J., Stevenson H., Barbudo A. V., Gunn G. J., Low J. C.; 2011; Prevalence of *Escherichia coli* O157 :H7 and serogroups O26, O103, O111 and O145 in sheep presented for slaughter in Scotland; Journal of Medical Microbiology 60, p.653–660;
45. Fach P., Perelle S., Dilasser F., Grout J., 2001; Comparison between a PCR-ELISA and the vero cell assay for detecting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in dairy products and characterization of virulence traits of the isolated strains, Journal of Applied Microbiology 90, p.809–818.
46. Farfan M.J., Torres A.G.; 2012; Molecular Mechanisms That Mediate Colonization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Strains; Infect. Immun., 80(3):903;
47. Farrokh C., Jordan K., Auvray F., Glass K., Oppegaard H., Raynaud S., Thevenot D., Condron R., De Reu K., Govaris A., Heggum K., Heyndrickx M., Hummerjohann J., Lindsay D., Miszczycha S., Moussiegt S., Verstraete K., Cerf O., 2012; Review of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and their significance in dairy production, International Journal of Food Microbiology (2012) in press;
48. Franco A., Lovari S., Cordaro G., Di Matteo P., Sorbara L., Iurescia M., Donati V., Buccella C., Battisti A.; 2009; Prevalence and Concentration of Verotoxigenic *Escherichia coli* O157:H7 in Adult Sheep at Slaughter from Italy, Zoonoses Public Health., 56 p.215–220;
49. Fremaux B., Raynaud S., Beutin L., Vernozy Rozand C.; 2006 Dissemination and persistence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains on French dairy farms; Veterinary Microbiology, 117 p. 180–191,;
50. Fricker M., Messelhaüßer U., Busch U., Scherer S., Ehling-Schulz M.; 2007; Diagnostic Real-Time PCR assays for the detection of emetic *Bacillus cereus* strains in foods and recent food-borne outbreaks; Appl. Environ. Microbiol., 73, 1892;
51. Galiero, G., Conedera G., Alfano D. and Caprioli A.; 2005; Isolation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in southern Italy; Vet. Rec., 19: p.382–383;

52. Gamer M.; Various coefficient of interrater reliability and agreement. Package “irr”;
53. García-Aljaro C., Muniesa M., Jofre J., and Blanch R. A.;2009; Genotypic and Phenotypic Diversity among Induced, *stx2*-Carrying Bacteriophages from Environmental *Escherichia coli* Strains; Applied and environmental microbiology, p. 329–336;
54. Gillespie I. A., Adak G. K., O’Brien S. J., Bolton F. J.;2003; Milkborne general outbreaks of infectious intestinal disease, England and Wales, 1992–2000; Epidemiol. Infect., 130, p461–468;
55. Gyles C. L.; 2007; Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview; J. Anim. Sci. 85 (E. Suppl.):E45–E62;
56. Hayes P. S., Blom K., Feng P., Lewis J., Strockbine N. A., Swaminathan B.; 1995; Isolation and characterization of a β -D-glucuronidase-producing strain of *Escherichia coli* serotype O157: H7 in the United States; Journal of Clinical Microbiology 33 p.3347-3348;
57. Hein I., Flekna G., Krassnig M., Wagner M.; 2006; Real-time PCR for the detection of *Salmonella* spp. in food: An alternative approach to a conventional PCR system suggested by the FOOD-PCR project; Journal of Microbiological Methods, 66 p.538–547;
58. Hiramatsu R., Matsumoto M., Miwa Y., Suzuki Y., Saito M., Miyazaki Y.; 2002; Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 Strains and Establishment of selective isolation media for these strains; Journal of Clinical Microbiology, p.922–925;
59. Hungerford J. M.; 2010; Scombroid poisoning: a review; *Toxicon*, vol. 56, pp. 231-243;
60. ISO (International for Standardisation);2000; Water quality. Detection and enumeration of bacteriophages –part2: Enumeration of somatic coliphages; 10705-2/2000;
61. ISO (International Organization for Standardization), 2001; Microbiology of food and animal feedingstuffs - Horizontal method for the detection of *Escherichia coli* O157. ISO 16654/2001;
62. ISS, ENTERNET VTEC: archivio dati, available to: <http://www.iss.it/evte/arch/index.php?lang=1&tipo=3&anno=2012>;
63. Jackson E. E., Erten E. S., Maddi N., Graham T. E., Larkin J. W., Blodgett R. J., Schlessner J. E., Reddy R. M.; 2012; Detection and Enumeration of Four Foodborne Pathogens in Raw Commingled Silo Milk in the United States; Journal of Food Protection, Vol. 75, No. 8, p.1382–1393;
64. James C. E., Stanley K. N., Allison H. E., Flint H. J., Stewart C. S., Sharp R. J., Saunders J. R., McCarthy S. J.;2001; Lytic and Lysogenic Infection of Diverse *Escherichia coli* and *Shigella* Strains with a Verocytotoxigenic Bacteriophage; Applied and environmental microbiology, p. 4335–4337;
65. Jamshidi A., Mohammadi S., Mohammadi A.; 2011; Quantification of *Escherichia coli* O157:H7 in milk by most probable number –polymerase chain reaction (MPN-PCR) method; African Journal of Microbiology Research Vol. 5(26), p.4588-4591;
66. Jasson V., Uyttendaele M., Rajkovic A., Debevere J.; 2007; Establishment of procedures provoking sub-lethal injury of *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli* O157 to serve method performance testing; International Journal of Food Microbiology 118 p.241–249;
67. Jasson V., Rajkovic A., Baert L., Debevere J., Uyttendaele M.; 2009; Comparison of Enrichment Conditions for Rapid Detection of Low Numbers of Sublethally Injured *Escherichia coli* O157 in Food; Journal of Food Protection, Vol. 72, No. 9, p.1862–1868;
68. Jay M.T., Cooley M., Carychao D., Wiscomb G.W., Sweitzer R. A., Crawford-Miksza L., Farrar J.A., Lau D.K., O’Connell J., Millington A., Asmundson R.V., Atwill E.R., Mandrell R.E.; 2007; *Escherichia coli* O157:H7 in Feral Swine near Spinach Fields and Cattle, Central California Coast, Emerging Infectious Diseases, vol. 13 N° 2 p.1908-1911;
69. Jay M.T., Loessner M.J., Golden D.A., Modern food microbiology (2005), SPRINGER, ISBN: 0-387-23180-3;
70. Karch H., Stockbine N. A., O’Brien A. D.; 1986; Growth of *Escherichia coli* in the presence of trimethoprim-sulfamethoxazole facilitates detection of shiga-like toxin producing strains by colony blot assay; FEMS Microbiology Letters 35, p.141-145;

71. Karch H., Meyer T.; 1989; Single primer pair for amplifying segments of distinct Shiga-Like-Toxin genes by polymerase chain reaction; *Journal of Clinical Microbiology*, p. 2751-2757;
72. Karch H., Meyer T., Rüssmann H., Heesemann J.; 1992; Frequent loss of Shiga-like toxin genes in clinical isolates of *Escherichia coli* upon subcultivation; *Infect. Immun.*, 60, 3464;
73. Karch H., Janetzki-Mittmann C., Aleksic S., Datz M.; 1996; Isolation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 strains from patients with hemolytic-uremic syndrome by using immunomagnetic separation, DNA-based methods, and direct culture; *Journal of Clinical Microbiology*, 34, p.516-519;
74. Karch H., Bielaszewska M., Bitzan M., Schmidt H.; 1999; Epidemiology and diagnosis of shiga-toxin-producing *Escherichia coli* infections; *Diagn Microbiol Infect Dis* 1999; 34: p.229-243;
75. Karch H., Bielaszewska M.; 2001; Sorbitol-fermenting shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157: H(-) strains: epidemiology, phenotypic and molecular characteristics, and microbiological diagnosis." *Journal of Clinical Microbiology*, 39 p.2043-2049;
76. Karmali M. A.; 1987; Laboratory diagnosis of verotoxin-producing *Escherichia coli* infections; *Clinical Microbiology Newsletter* 9, p.65-70;
77. 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* serotypes that are linked to epidemic and/or serious disease; *J. Clin. Microb.*, Nov. 41(11) p.4930–4940;
78. Karmali M. A., Gannon V., Sargeant J. M.; 2010; Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC), *Veterinary Microbiology* 140, p.360–370;
79. Keene W.E., Hedberg K., Herriott D. E., Hancock D. D., McKay W., Barrett T. J., Fleming D. W.1997; A prolonged outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections caused by commercially distributed raw milk; *Infect. Dis.*, 176, 815;
80. Keusch G. T., Jacewicz M., Acheson D. W. K., Donohue-Rolfe A., Kane A. V. and McCluer R. H.;1995; Globotriaosylceramide, Gb3, is an alternative functional receptor for shiga-like toxin 2e; *Infection and Immunity* 63,p.1138-1141;
81. 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, p.453-465;
82. Krämer N., Löfström C., Vigre H., Hoorfar J.,Bunge C., Malorny B.; 2011; A novel strategy to obtain quantitative data for modelling: Combined enrichment and real-time PCR for enumeration of salmonellae from pig carcasses; *International Journal of Food Microbiology*, 145,p-S86–S95;
83. Kubista M., Andrade J. M., Bengtsson M., Forootan A., Jonàk J., Lind K., Sindelka R., Sjoback R., Sjogreen B., Strombom L., Stahlberg A., Zoric N.; 2006; The real-time polymerase chain reaction; *Molecular Aspects of Medicine* 27, p.95–125;
84. Langer A. J., Ayers T., Grass J., Lynch M., Angulo F. J., Mahon B. E.; 2012; Nonpasteurized dairy products, disease outbreaks, and State Laws—United States, 1993–2006; *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 18, No. 3, March 2012;
85. Lehane L., Olley J.; 2000; Histamine fish poisoning revisited; *Int. J. Food Microbiol.*, n. 58, pp. 1–37;
86. Lorusso, V., Dambrosio, A., Quaglia, N. C., Parisi, A., La Salandra, G., Lucifora, G., Mula G., Virgilio S., Carosielli L., Rella A., Dario M., Normanno G.; 2009; Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O26 in raw water buffalo (*Bubalus bubalis*) milk products in Italy. *Journal of Food Protection*, 72, p.1705–1708;
87. Lynch M. J., Fox E. M., L. O'Connor L., Jordan K., Murphy H.;2012; Surveillance of Verocytotoxigenic *Escherichia coli* in Irish bovine dairy herds; *Zoonoses and Public Health*, 59, p.264–271;
88. Ministero delle Politiche Agricole e Forestali; 2003; Disciplina di produzione della Denominazione di Origine Protetta “Mozzarella di Bufala Campana”. Allegato al D.M. 18.09.2003 (G.U. n. 258 del 6.11.2003);

89. Monday S. R., Whittam T. S., Feng, P. C.; 2001; Genetic and evolutionary analysis of mutations in the *gusA* gene that cause the absence of β -glucuronidase activity in *Escherichia coli* O157: H7; *Journal of Infectious Diseases* 184, p.918-921;
90. Mora A., Blanco J. E., Blanco M., Pilar Alonso M., Dhabi G., Echeita A., González E. A., Bernárdez M. I., Blanco J.; 2005; Antimicrobial resistance of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157 strains isolated from humans, cattle, sheep and food in Spain; *Research in Microbiology*, 156, p.793–806;
91. Muniesa M., Lucena F., Jofre J.; 1999; Study of potential relationship between the morphology of infectious somatic coliphages and their persistence in the environment; 1999; *Journal of applied Microbiology*; 87,p.402-409;
92. Muniesa M., Recktenwald J., Bielaszewska M., Karch H., Schmidt H.; 2000; Characterisation of a Shiga toxin 2e-converting bacteriophage from *Escherichia coli* strain of human origin, *Infection and Immunity*, 68 p.4850-4855;
93. Muniesa M., de Simon M., Prats G., Ferrer D., Panella H., Jofre J.; 2003; Shiga Toxin 2-converting Bacteriophages associated with clonal variability in *Escherichia coli* O157:H7 strains of human origin isolated from a single outbreak; *Infection and Immunity*, p. 4554–4562;
94. Muniesa M., Blanco J.E., de Simon M., Serra-Moreno R., Blanch A.R., Jofre J.; 2004-a; Diversity of *stx2* converting bacteriophages induced from Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from cattle; *Microbiology*, 150, p.2959–2971;
95. Muniesa M., Jofre J.; 2004-b; Factors influencing the replication of somatic coliphages in the water environment; *Antonie van Leeuwenhoek*, 86,p.65–76;
96. Muniesa M., Serra-Moreno R., Jofre J.; 2004-c; Free shiga-toxin bacteriophages isolated from sewage showed diversity although the *stx* gene appeared conserved; *Environmental microbiology* 6(7), p 716-725;
97. Nagano H., Okui T., Fujiwara O., Uchiyama Y., Tamate N., Kumada H., Morimoto Y, Yano S.; 2002; Clonal structure of Shiga toxin (Stx)-producing and β -D-glucuronidase-positive *Escherichia coli* O157: H7 strains isolated from outbreaks and sporadic cases in Hokkaido, Japan." *Journal of Medical Microbiology* 51,p.405-416;
98. Nataro J.P., Kaper J.B.; 1998; Diarrheagenic *Escherichia coli*, *Clin. Microbiol. Rev.* 11:142–210;
99. Nielsen E. M., Andersen M. T.; 2003; Detection and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* by automated 5' nuclease PCR assay; *Journal of Clinical Microbiology* 41, p. 2884-2893;
100. 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*, p.2837-2841;
101. Ogden I.D., MacRae M., Strachan N.J.C.; 2004; Is the prevalence and shedding concentrations of *E. coli* O157 in beef cattle in Scotland seasonal?, *FEMS Microbiology Letters* 233 p.297–300;
102. Olive D. M., Bean P.; 1999; Principles and applications of methods for DNA-based typing of microbial organisms; *Journal of Clinical Microbiology*, p. 1661–1669;
103. Orth D., Grif K., Dierich M. P., Wurznner R.; 2007; Variability in tellurite resistance and the *ter* gene cluster among Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from humans, animals and food; *Research in Microbiology* 158 p.105-111;
104. Parisi A., Miccolupo A., Santagada G., Pedarra C., Dambrosio A., Normanno G.; 2010; Detection of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in minced beef and raw milk by colony blot hybridization; *Food Control* 21 p.770–773;
105. Parry S. M., Palmer S. R.; 2000; The public health significance of VTEC O157. *J. Appl. Microbiol. Symp. Suppl.* 88:1S–9S;
106. Paton J.C., Paton A.W.; 1998-a; Pathogenesis and diagnosis of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection., *Clin. Microbiol. Rev.*, 11:450–479;

107. Paton A. W. , Patone J. C.; 1998-b; Detection and characterization of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for stx1, stx2, eaeA, Enterohemorrhagic *E. coli* hlyA, rfbO111, and rfbO157; *Journal of Clinical Microbiology*, p. 598–602;
108. Paton A. W., Srimanote P., Woodrow M. C. and Paton J. C.;2001; Characterization of Saa, a novel autoagglutinating adhesin produced by locus of enterocyte effacement-negative Shiga-toxigenic *Escherichia coli* strains that are virulent for humans, *Infection and Immunity* 69 p.6999-7009;
109. Pearce M. C., Evans J., McKendrick I. J., Smith A. W., Knight H. I., Mellor D. J., Woolhouse M. E. J., Gunn G. J., Low J. C.; 2006; Prevalence and Virulence Factors of *Escherichia coli* Serogroups O26, O103, O111, and O145 Shed by Cattle in Scotland; *Applied and Environmental Microbiology*, p. 653–659;
110. Perelle S., Dilasser F., Grout J., Fach P.; 2004; Detection by 50-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 p.185–192;
111. Perelle S., Dilasser F., Grout J., Fach P.; 2005; Detection of *Escherichia coli* serogroup O103 by realtime polymerase chain reaction; *Journal of Applied Microbiology* 98, p. 1162-1168;
112. Poli G. e Cocilovo A.; 2006; *Microbiologia e immunologia veterinaria*; UTET, ISBN: 8802070342;
113. Powledge T. M.; 2004; The polymerase chain reaction; *Adv Physiol Educ* 28: p.44–50.;
114. Prescott, Harley, Klei; 2002; *Microbiology*; McGraw-Hill Companies 2002; ISBN 0-07-282905-2;
115. Pritchard G. C., Smith R., Ellis-Iversen J., Cheasty T., Willshaw G.A.; 2009; Verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157 in animals on public amenity premises in England and Wales, 1997 to 2007, *Veterinary Record*, 164, p.545-549;
116. Regione Emilia Romagna (2008), Decisione della giunta regionale dell’Emilia Romagna n° 4418 del 21 aprile 2008 sulla vendita diretta al consumatore di latte crudo vaccino, ovi-caprimo, bufalino ed asinino dell’azienda di produzione, BURER n° 58 del 7 maggio 2008;
117. Regione Lombardia (2007), Circolare 13/SAN del 13 aprile 2007 “Vendita diretta al consumatore di latte crudo vaccino, ovi-caprino e bufalino nell’azienda agricola di produzione – Modifiche ed integrazioni alle circolari n° 39/SAN del 17 novembre 2004 e n° 20/SAN del 20 maggio 2005”, BURL n°28 del 9 luglio 2007;
118. Regolamento CE 1441/2007 del 5 Dicembre 2007 “che modifica il Regolamento CE 2073/2005 sui criteri microbiologici applicati ai prodotti alimentari”, *Gazzetta Ufficiale dell’Unione Europea* numero 322 del 07/12/2007;
119. Rey, J., Sanche, S., Blanco, J.E., De Mendoza, J.H., De Mendoza, M.H., Garcia, A., Gil, C., Tejero, N., Rubio, R., Alonso, J.M.; 2006; Prevalence, serotypes and virulence genes of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from ovine and caprine milk and other dairy products in Spain. *International Journal of Food Microbiology* 107, 212–217;
120. Rhoades J.R., Duffy G. , Koutsoumanis K.; 2009; Prevalence and concentration of verocytotoxigenic *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* and *Listeria monocytogenes* in the beef production chain: A review, *Food Microbiology* 26 p.357–376;
121. Rice E. W., Sowers E. G., Johnson C. H., Dunnigan M. E., Strockbine N. A., Edberg S. C.;1992; Serological cross-reactions between *Escherichia coli* O157 and other species of the genus *Escherichia*; *Journal of Clinical Microbiology* 30, p.1315-1316;
122. Rivero M., Passucci J., Rodriguez E., Parma A.; 2011; Seasonal variation of HUS occurrence and VTEC infection in children with acute diarrhoea from Argentina, *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, pp 1–5;
123. Sánchez S., García-Sánchez A., Martínez R., Blanco J., Blanco J.E., Blanco M., Dahbi G., Mora A., Hermoso de Mendoza J., Alonso J.M., Rey J.; 2009; Detection and characterisation of

- Shiga toxin-producing *Escherichia coli* other than *Escherichia coli* O157:H7 in wild ruminants, *The Veterinary Journal* 180 p.384–388;
124. Scavia G., Botta A., Ciofi Degli Atti M. L., Di Fluri G., Ferretti A., Galiero G., Marziano M. L., Merola R., Minelli F., Montini G. B., Pecoraro C., Pizzuti R., Tozzi A. E., Traini A. M. and Caprioli A.; 2005; Episodio epidemico di sindrome emolitico uremica (SEU) associata a infezione da *E. coli* O26, in provincia di Salerno; Available at: <http://dspace.iss.it/dspace/handle/2198/92404>;
 125. Scavia G., Caprioli A.; 2010; Sorveglianza della Sindrome Emolitico Uremica pediatrica e delle infezioni da *E. coli* produttore di verocitotossina, in Italia (1988-2010); available on: <http://www.iss.it/binary/seur/cont/SEUItalia2010.pdf>;
 126. Scavia G., Edefonti A., Vidal E., Emma F., Pecoraro C., Amore A., Brigotti M., Caprioli A., Verrina E.; On behalf of the Italian HUS Register; 2012; Surveillance of pediatric hemolytic uremic syndrome (HUS) in Italy 1988-2011; 8th International symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin) producing *Escherichia coli* infections, Amsterdam NL, 6-9 May 2012;
 127. Schaechter Moselio; *Encyclopedia of microbiology*; AP Elsevier 2009,;
 128. Schmidt H.; 2001; Shiga-toxing-conveting bacteriophages, *Res Microbio.*, 152 p. 687-695;
 129. Serra-Moreno R., Acosta S., Hernalsteens J.P., Jofre J., Muniesa M.; 2006; Use of the lambda red recombinase system to produce recombinant prophages carrying antibiotic resistance genes; *BMC Mol Biol.*, 19; p.7-31;
 130. Serra-Moreno R., Jofre J., Muniesa M.; 2007; Insertion Site Occupancy by *stx2* Bacteriophages Depends on the Locus Availability of the Host Strain Chromosome; *J Bacteriol.*, 189(18),p.6645–6654;
 131. Sheridan G. E. C., Masters C. I., Shallcross J. A., Mackey B. M.; 1998; Detection of mRNA by Reverse Transcription-PCR as an indicator of viability in *Escherichia coli* cells; *Applied and Environmental Microbiology*, p. 1313–1318;
 132. Spano G., Goffredo E., Beneduce L., Tarantino D., Dupuy A., Massa S.; 2003; Fate of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture of Mozzarella cheese ; *Letters in Applied Microbiology*, 36, 73–76;
 133. 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 p479-497;
 134. Szabo R., Todd E., André J.; 1986; Method to isolate *Escherichia coli* O157: H7 from food; *Journal of Food Protection* 49, 768-772;
 135. Taylor S. L.; 1986; Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects; *Crit. Rev. Toxicol.*, n. 17, p. 91–128;
 136. Tomoyasu T.; 1998; Improvement of the immunomagnetic separation method selective for *Escherichia coli* O157 strains; *Applied and Environmental Microbiology*, p. 376–382;
 137. Tozzi A. E., Caprioli A., Minelli F., Gianviti A., De Petris L., Edefonti A., Montini G., Alfonso Ferretti A., De Palo T., Gaido M., Rizzoni G., and the Hemolytic Uremic Syndrome Study Group; 2003; Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* infections associated with hemolytic uremic syndrome, Italy, 1988–2000; *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 9, No. 1;
 138. Trayhurn P.; 1996; Northern blotting; *Proceedings of the Nutrition Society*, 55, 583-589;
 139. Trevisani M., Mancusi R., Riu R., Serraino, A.; Quantitative detection of Verocytotoxin-producing and enteropathogenic *Escherichia coli* serotypes O157 and O26 in bulk raw milk; under revision-a;
 140. Trevisani M., Mancusi R., Delle Donne G., Picozzi C., Mazzette R., Bacci C., Bonardi S.; Detection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in bovine dairy herds in Northern Italy; under revision-b;
 141. Valasek M., Repa J. J.; 2005; The power of real-time PCR; *Adv Physiol Educ* 29, p. 151–159;
 142. Van Kessel J. A. S., Karns J. S., Lombard J. E., Koprak C. A.; 2011; Prevalence of *Salmonella enterica*, *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* virulence factors in bulk tank milk and in-line filters from U.S. dairies; *Journal of Food Protection*, Vol. 74, No. 5, p. 759–768;

143. Vernozy-Rozand C., Montet M. P., Berardin M., Bavai C., Beutin L.; 2005; Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains from raw milk cheeses in France; *Letters in Applied Microbiology* , 41, p. 35–241;
144. Verstraete K., Robyn J., Del-Favero J., De Rijk P., Joris M. A., Herman L., Heyndrickx M., De Zutter L., De Reu K.; 2012; Evaluation of a multiplex-PCR detection in combination with an isolation method for STEC O26, O103, O111, O145 and sorbitol fermenting O157 in food; *Food Microbiology* 29, p.49-55;
145. Vimont A., Vernozy-Rozand C., Montet M.P., Lazizzera C., Bavai C., Delignette-Muller M. L.; 2006; Modeling and Predicting the Simultaneous Growth of *Escherichia coli* O157:H7 and Ground Beef Background Microflora for Various Enrichment Protocols O157:H7 and Ground Beef Background Microflora for Various Enrichment Protocols; *Applied and Environmental Microbiology* p.261–268;
146. Vimont A , Delignette-Muller M. L., Vernozy-Rozand C.; 2007; Supplementation of enrichment broths by novobiocin for detecting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from food: a controversial use; *Letters in Applied Microbiology* 44 p.326–331;
147. Vinogradov E., Conlan J. W.; Perry M. B.; 2002; Serological cross-reaction between the lipopolysaccharide O-polysaccharaide antigens of *Escherichia coli* O157: H7 and strains of *Citrobacter freundii* and *Citrobacter sedlakii*; *FEMS Microbiology Letters* 190,p.157-161;
148. Walsh P. S. , Metzger D. A. , Higuchi R.; 1991; Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material; *Bio.Techn.*, 10, 506;
149. Wiczorek K., Osek J.; 2004; Development of a PCR internal amplification control for the detection of Shiga Toxin-producing *Escherichia coli*; *Bull Vet Inst Pulawy* 48, 397-401;
150. Wilhelm J., Pingoud A.; 2003; Real-Time Polymerase Chain Reaction; *ChemBioChem*, 4, p.1120-1128;
151. Wilson I. G.; 1997; Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification; *Applied and Environmental Microbiology*; vol 63, n°10, p. 3741–3751;

PUBBLICAZIONI

Articolo inviato al “Food Analytical Methods” journal: under review

Quantitative detection of Verocytotoxin-producing and enteropathogenic *Escherichia coli* serotypes O157 and O26 in bulk raw milk

Trevisani, Marcello*; Mancusi, Rocco; Riu, Raffaella; Serraino, Andrea

Department of Veterinary Medical Sciences, University of Bologna, via Tolara di Sopra 50, 40064, Ozzano dell' Emilia, Italy;

*Corresponding author: Tel.: +390512097330; Fax: +390512097346; E-mail address: marcello.trevisani@unibo.it; address: Department of Veterinary Medical Sciences, University of Bologna, via Tolara di Sopra 50, 40064, Ozzano dell'Emilia, Italy.

Abstract

Aim of this study was to evaluate the number and distribution of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) in raw milk. Forty transport tankers were sampled in a dairy factory located in North Italy and five sample units for each batch were tested for *Escherichia coli* O157 and O26 (overall two hundred samples). Fifteen batches (37.5%) were found positive (at least one sample unit) with three of them positive for the gene *rfbE*O157 and 14 for the gene *wzx*O26. The average proportions of positive sample units was 0.27 (CI_{95%} 0.11-0.52) for the O157 positive batches (4 sample units out of 15) and 0.43 (CI_{95%} 0.32-0.54) for those positive to O26 (30 sample units out of 70). Although the viability of the target bacteria was confirmed by RT-PCR (gene expression) in 80% of the positive sample units, selective immunoconcentration and cultural methods allowed the detection of isolates only in 3 sample units positive for *E. coli* O157 and 9 sample units positive for *E. coli* O26 (35.3% confirmation rate). An MPN-PCR method was used to quantify these target bacteria in samples that tested positive to the PCR screening and the milk samples showed MPN values below 0.3·ml⁻¹ (CI_{95%} 0 – 0.95) in all except two samples that had a value equal to 1.4·ml⁻¹ (CI_{95%} 0.36-4.2). The low confirmation rate can be due to the low contamination level. All O157 isolates were sorbitol positive and lack virulence traits (namely intimin, verocytotoxin encoding genes) whereas all O26 isolates showed the gene encoding beta-intimin and five of them (all from one sample) also the genes VT1 and *espK*, which confirm their virulence. This study showed that concentration of VTEC and pathogenic *E. coli* (EPEC) was very low and their distribution in bulk milk was not uniform. These facts should be considered in developing appropriate monitoring plans.

Keywords: milk, VTEC, sampling, detection, MPN-PCR

Introduction

Escherichia coli strains that produce Shiga-like toxin, also known as verocytotoxin (VTEC/STEC) and intestinal pathogenic *E. coli* can be found in the faeces of lactating cows and contamination of milk can occur. Raw milk and associated dairy products are regarded as a possible vehicle for human infection^{1;2} and sporadically VTEC has been associated with cases of haemorrhagic colitis and haemolytic uremic syndrome in individuals who have drunk unpasteurized milk^{3;4;5}.

Nevertheless, some farmers have an economic interest of to sell the milk directly to consumers and some of them have shown to appreciate the unpasteurized fresh milk produced in farms nearby. Unpasteurized milk is also employed for production of fresh cheeses in order to preserve their typical characteristics and enhance flavour, but adequate controls at farm (i.e. assessment of the Performance Objective) and efficient treatments to reduce the number of pathogens that can occur in milk should be ensured. In order to avoid health risks to consumers Health Authorities demand that farmers has a routine for own-check, which aim at detecting the presence of zoonotic pathogens in the herds and prove they are maintaining high standards of hygiene. The presence of VTEC can be investigated by sampling the faeces, in-line milk filters and bulk raw milk, but it is difficult to define appropriate sampling strategies at farm level due to the low prevalence, the transient presence of excretory carriers in the herds and the occasional contamination of milk. Thus routine checks are needed, but there are constrains given by the economic sustainability of analyses. Experts estimate that even low numbers of VTEC in milk represent a serious hazard. Therefore, data concerning the number of VTEC in raw milk are needed in order to assess the validity of lethal processing steps dairy farms use for producing fresh cheese made with raw milk. Major efforts have been done to develop analytical methods with an high sensitivity, but only a few studies have concerned the quantitative detection of VTEC in bulk milk⁶. They did not focus however on the distribution of VTEC in bulk milk, whereas this aspect is fundamental for the development of appropriate sampling strategies. VTEC detection methods are currently based on a modular approach that combines molecular and cultural methods. The analytical approach normally include a preliminary screening for the presence of verocytotoxin encoding genes and a subsequent PCR test to detect serogroup specific genetic markers in order to address further analyses by using selective immunoconcentration and differential media. The second PCR test should concern all the serogroups that are of major interest for public health (i.e. O157, O26, O111, O145, and O103).

The aim of this study was to evaluate the distribution (percentage of positive sample units) and number of VTEC in bulk milk, therefore, the attention of this study was focused on the detection of the serogroups O26 and O157 that are those most commonly isolated in Italy and involved in 60-70% of human cases^{7;8}.

Material and Methods

Sampling was performed in an industrial processing plant that collects about 400 Ton of milk per day, which is produced in the Emilia Romagna Region. Forty samples were collected from milk tankers by using automatic samplers. These were calibrated in order to collect 5 sample units of 70 ml during the transfer of the entire mass of milk to the collection silos. The samplers were washed and sanitized after each use to avoid cross contamination. The milk aliquots were transported in plastic bottles to the laboratory and analysed within two hours to detect and count *E. coli* serogroups O157 and O26. The analytical procedure is summarized in the Figure 1.

For detection of *E. coli* O157 a 25 ml-aliquot of each sample unit was suspended in 225 ml of modified Tryptone Soya Broth (m-TSB, Oxoid, Basingstoke, UK) and enriched overnight at $41.5 \pm 1^\circ\text{C}$, whereas for detection of O26 another aliquot was suspended in 225 ml Buffered Peptone Water (Oxoid, Basingstoke, UK) and incubated at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ overnight. Analytical samples were then screened with a real time PCR test to detect the specific sequences of *rfbEO157* (perosamine synthetase) or *wzxO26* (O-unit flippase) enzymes involved in the *E. coli* O antigen biosynthesis¹³. To this aim the bacterial DNA was extracted from 1ml of the cultures with a Chelex 100® extraction method⁹.

For the real-time PCR a pre-formulated master mixes (IQ Supermix, Bio-Rad) with *rfbEO157* or *wzxO26* specific primers and probes was used^{10;11}. The absence of PCR interferences was evaluated by using pUC19 sequence as an internal amplification control and specific primers and probes for the PCR^{10;12}. The amplification and detection of the target genetic sequences was carried out using a Bio-Rad MiniOpticon® thermocycler and the following protocol for PCR: 1 min at 50°C ; 3 min at 95°C then 40 cycles with 10 sec at 90°C and 45 sec at 63°C . A standard curve was used to enumerate the target bacteria in the enriched samples. This was generated by analysis of a dilution series of O157/O26 VTEC cells (our collection of milk isolates) spiked in BPW. The amount of DNA measured in the samples by real-time PCR was converted to equivalent cell numbers by plotting the C_T values against CFU of the standard curves.

Meanwhile the milk samples were stored at 2°C for approximately 24 hours. Those had produced a positive results with real-time PCR screening test were further analysed with an MPN-PCR method. To this aim samples were serially diluted in BPW and four series of three tubes were inoculated with 1 ml of each dilution (10^0 , 10^1 , 10^2 and 10^3) and the cultures enriched for 24 hours at 37°C (O26) or 41.5°C (O157). DNA extracts were then analysed with the real-time PCR protocol described above. The MPN calculations were performed as described by Bodget¹³.

The cultures that showed PCR positive results were analysed by selective cultural methods. The target bacteria were captured using antibody coated paramagnetic beads (Dynabeads® EPEC/VTEC O26 and O157, Invitrogen, D) and cultured on MacConkey and on Sorbitol-MacConkey agar or Rhamnose-MacConkey agar supplemented with cefixime ($0.05 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$) and tellurite ($2.5 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$)^{14;15}. Colonies showing the characteristic morphology were analysed using the same PCR method described above. Up to 5 pools of ten colonies and then isolated

colonies were tested. Those identified as O157 or O26 *E. coli* were characterized for their virulence traits (i.e. *eae* and VT genes) using the PCR method described by Paton and Paton¹⁶.

Other genetic markers such as the OI-122 putative virulence genes (*pagC*, *sen*, *efa1* and *efa2*)¹⁷ and the gene *espK* associated with the type III secretion system were investigated. In addition, allelic discrimination of the *arcA* (aerobic respiratory control protein A) gene and intimin genotype were assessed for the differentiation of Shiga Toxin-Producing, enteropathogenic and avirulent strains of *Escherichia coli* O26¹⁸. Flagellar antigen of the virulent isolates was also characterized.

mRNA detection by reverse transcription-PCR was used for monitoring the viability of O157 and O26 *E. coli* in the samples that were positive to the preliminary screening test¹⁹. One sample unit for each milk batch that gave PCR positive results was tested. When more than one was positive, those showing the lowest C_T value at the PCR screening test were assessed. The microbial cell density in enrichment broth was standardized in order to have an OD₅₄₀ nm value, approximately equal to 40% (~10⁸ cell·ml⁻¹) and RNA was extracted and purified by using the Aurum Total RNA Mini Kit (BIORAD®). A one-step protocol was used for RT-PCR, with cDNA synthesis at 50°C for 10 min and then amplification in a two steps PCR for 40 cycles (10 sec at 90°C and 45 sec at 63°C). The same primers and probe for *rfbEO157* and *wzxO26* genes described above¹¹ were used for amplification after the reverse transcription reaction.

Mean prevalence and confidence intervals for proportions of positive sample units within the positive batches (at least one sample units positive for O157 or O26 genes) were calculated with "Wilson" score-test-based interval using the 'binconf' test available in the 'Hmisc' statistical package and *R statistics* software.

Results

Results are summarized in Table 1. Fifteen batches (37.5%) were found positive, showing at least one sample unit positive for the genes *rfbEO157* or *wzxO26*. In detail four sample units (from three batches) were positive for the gene O157 and thirty sample units (from fourteen batches) were positive for the gene O26. Two batches were therefore positive for both serogroups. Within the samples, the relative number of positive sample units varied between 0 and 5 (Figure 2) thus showing that distribution of O157/O26 *E. coli* is not uniform in bulk milk. More precisely, the average proportions of positive sample units was 0.27 (CI_{95%} 0.11-0.52) for the O157 positive batches (4/15 sample units) and 0.43 (CI_{95%} 0.32-0.54) for those positive to O26 (30/70 sample units). The Internal Amplification Control showed that there were no PCR inhibitors (no false negative).

Expression of the target genes (*wzxO26* or *rfbEO157*) was shown by RT-PCR in twelve out of fifteen batches (27/34 sample units) that were positive at the PCR screening test (Table 2). Nevertheless, the cultural detection methods allowed the detection of target bacteria only in 3 sample units positive for *E. coli* O157 (from 2 batches) and 9 sample units positive for *E. coli*

O26 (from 3 batches). Overall 12 sample units out of 34 positive at the real-time PCR screening test were confirmed by cultural methods (confirmation rate 35.3%). The ratio was slightly higher (44.4%) if this was calculated on the number positives to RT-PCR (sample units with presumptive viable *E. coli* O157/O26).

The MPN-PCR method showed that contamination level in milk was below $0.3 \cdot \text{ml}^{-1}$ ($\text{CI}_{95\%}$ 0-0.95) in all except two samples that had a value equal to $1.4 \cdot \text{ml}^{-1}$ ($\text{CI}_{95\%}$ 0.36-4.2). The three O157 isolates were sorbitol fermenting and β -glucuronidase positive, which lack virulence traits (namely intimin and verocytotoxin encoding genes, *espK* and the OI-122 putative virulence genes). The nine O26 isolates had an OI-122 incomplete profile (presence of genes *sen*, *efa1* and *efa2*) were of H11 serotype and the beta-intimin genotype. Five of them (all from one sample) also showed the gene VT1, the genes *espK* and shared the *arcA* allelic type 2 and did not ferment rhamnose. Isolates lacking the VT1 gene were instead rhamnose fermenting and shared the *arcA* allelic type 1. Therefore the prevalence rate of verocytotoxin-producing *E. coli* observed in this study appears to be 2.5% (one out of forty batches).

Discussion

Studies concerning cow raw milk sampled at farm reported that the incidence of verocytotoxin-producing *E. coli* appears to be low, between 0 and 4.3%^{20;21;22}. These results are indicative of the epidemiological status of herds and hygienic practices in milking operations and farm management, but sampling plan and sensitivity of analytical methods have a strong influence on these results. Our limited survey showed similar prevalence data, with one out of forty milk tankers (2.5%) positive for O26:H11 VTEC. We observed however that the detection rate achieved by immunoconcentration and selective/differential culturing of O157 and O26 *E. coli* was approximately 35% of the samples positive to PCR screening. This finding could reveal the presence of non-viable bacteria, but in our study 27 out of the 34 sample units positive at the real-time PCR test were confirmed positive by using RT-PCR method (79.4%). Detection of mRNA sequences of the genes *rfbEO157* and *wzxO26* involved in O antigen biosynthesis is indicative of the presence of viable bacteria¹⁹. Therefore, the reason of a partial confirmation obtained by using IMS and cultural methods (e.g. 12 out of 27 sample units) might be due to the low concentration of the O157/O26 *E. coli* in milk. The PCR results that are not confirmed by the detection of isolates should not be considered as 'false positive', but detection by molecular methods without the isolates does not allow confirmation of the virulence traits.

In our study *E. coli* O26:H11 lacking the VT genes were detected in two batches (5%). They shared virulence markers such as beta-intimin and three of the four putative genes of OI-122 (namely *sen*, *efa1* and *efa2*) but did not share the *espK* gene and allelic genotype *arcA2*. Because the latter genetic markers are considered discriminatory for the VTEC-like strains of the serogroup O26⁹, isolates have not to be considered highly pathogenic. Nevertheless, we should observe that the analytical protocol that exclude the samples testing negative for VT genes could involve loss of data concerning strains that have lost these genes (VTEC/STEC-like) which are important for diagnostic and epidemiologic purposes^{24;25}.

The estimated concentration of *E. coli* serogroups O26 or O157 in the positive samples was in a range between <0.3 and $1.4 \cdot \text{MPN ml}^{-1}$ (upper value of the 95% confidence interval equal to $4.2 \text{ MPN} \cdot \text{ml}^{-1}$). This number was measured by using MPN-PCR method, by combining an enrichment step in BPW, detection of target genetic sequences in DNA extracts and confirmation by cultural methods and antigenic typing. This approach should exclude false negative due to the presence of stressed cells, which could not grow in presence of antibiotics or bile salts. The enrichment step and the use of PCR for detection enhance the sensitivity of this quantitative method thus allowing the same level of sensitivity of the current detection protocols. All the samples showing countable number of *E. coli* O157/O26 by MPN-PCR, allowed their detection by cultural methods.

We also observed that the confirmation rate obtained with cultural methods was consistent with the real-time PCR data. All isolates were detected indeed when DNA extracts from samples showed C_T value below 33 and similar values were observed in artificially spiked standards containing *E. coli* O157 or O26 in concentration approximately equal to $10^3 \text{ CFU} \cdot \text{ml}^{-1}$. This number should therefore be reached after enrichment in order to have the chance of having isolates from raw milk.

The quantitative data we had are in agreement with the results of other recent studies relative to commingled milk stored in silos at the processing plant, showing that VTEC concentration was in a range between less than 0.0055 and $1.1 \text{ CFU} \cdot \text{ml}^{-1}$ ⁶.

Although the exact infectious dose for VTEC is unknown, it is thought to be as low as less than 100 organisms, although with higher number the estimated attack rate increases ^{26,27}. An appropriate estimation of the mean concentration of the pathogenic bacteria and the upper confidence interval has to be estimated with the aim of validating the effectiveness of mild lethal treatments used for milk processing.

In order to assess the performance objective of dairy farms or for epidemiological surveys, bulk raw milk samples may be taken at farm (soon after milking or until two days of storage) or after transportation at the processing plants. Our study showed that the distribution of pathogens in bulk/commingled milk is not uniform.

Low prevalence and number of VTEC in bulk milk should be expected in herds with a number of active shredders (animal excreting high number of VTEC with faeces) unless relevant contamination at milking occurs. Therefore it is almost useless to take single sample unit with the aim of assessing the health status of herds. Mixing can only have the effect of reducing the chance of detecting the pathogens by lowering their concentration below the analytical detection. Multiple sample units should be taken to have representative samples and the use of automatic milk samplers for sampling the milk in transport tankers or stored in silos is advisable.

Acknowledgments:

The research leading to these results has received funding from the European Union Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) under grant agreement n° 222738. Project

BASELINE (Selection and improving of fit-for-purpose sampling procedures for specific foods and risks)

Compliance with Ethics Requirements

The authors, declare that the design, conduct, and reporting of research which was funded under the European Union Seventh Framework Programme (FP7/2007-2013) grants is free from bias resulting from investigators financial conflicts of interest. There are not financial relationship with other institutions or private industry has influenced the results of this study.

Trevisani Marcello declares that he has no conflict of interest.

Mancusi Rocco declares that he has no conflict of interest

Riu Raffaella declares that he has no conflict of interest

Serraino Andrea declares that he has no conflict of interest

This article does not contain any studies with human or animal subjects.

REFERENCES

1. F.L. Bryan, Epidemiology of milk-borne diseases, *J. Food Protect.*, 46, 637 (1983).
2. R.L. Buchanan and M.P. Doyle, Foodborne Disease Significance of *Escherichia coli* O157:H7 and Other Enterohemorrhagic *E. coli*, *Food Technol.*, 51(10), 69 (1997).
3. A.E. Heuvelink, B. Bleumink, F.L. Biggelaar, M.C. Te Giffel, R.R. Beumer, E. De Boer, Occurrence and survival of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in raw cow's milk in The Netherlands, *J. Food Protect.*, 61, 1597 (1998).
4. W.E. Keene, K. Hedberg, D.E. Herriott, et al., A Prolonged Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 Infections Caused by Commercially Distributed Raw Milk, *Infect. Dis.*, 176, 815 (1997). Eurosurveillance Editorial team 2004. Outbreak of Verocytotoxin-producing *E. Coli* O157 linked to milk in Denmark. *Euro Surveill.*, 9(2), (2004). (Available online: <http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=2465>).
5. L. Lighton, A. Mellanby, S. O'Brien, H. Smith, Outbreaks of VTEC O157 infection linked to consumption of unpasteurised milk. *Euro Surveill.*, 4(23), 1590 (2000).
6. E.E. Jackson, E.S. Erten, N. Maddi, et al., Detection and Enumeration of Four Foodborne Pathogens in Raw Commingled Silo Milk in the United States, *J. Food Protect.* 75(8), 1382 (2012).
7. G. Scavia, A. Edefonti, E. Vidal, et al., On behalf of the Italian HUS Register, Surveillance of pediatric hemolytic uremic syndrome (HUS) in Italy 1988-2011, 8th International symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin) producing *Escherichia coli* infections, Amsterdam NL, 6-9 May 2012.
8. EFSA/ECDC, The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010, *EFSA Journal* ,10(3):2597, (2012)
9. P.S. Walsh, D.A. Metzger, R. Higuchi, Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material, *Bio. Techn.*, 10, 506 (1991).
10. EFSA, Technical specifications for the monitoring and reporting of VTEC on animals and food. *EFSA Journal* 7(11), 1366 (2009).

11. S. Perelle, F. Dilasser, J. Grout, P. Fach, 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, *Mol. Cell. Probes*, 18, 185 (2004).
12. M. Fricker, U. Messelhaüßer, U. Busch, S. Scherer, M. Ehling-Schulz, Diagnostic Real-Time PCR Assays for the Detection of Emetic *Bacillus cereus* Strains in Foods and Recent Food-Borne Outbreaks, *Appl. Environ. Microbiol.*, 73, 1892 (2007).
13. R. Bodget, Most Probable Number from Serial Dilutions. In: *Bacteriological Analytical Manual*, Appendix 2 (2004). Available at: <http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacteriologicalAnalyticalManualBAM/ucm109656.htm>. Accessed 2 October 2012.
14. ISO (International Organization for Standardization), 2001. Microbiology of food and animal feedingstuffs - Horizontal method for the detection of *Escherichia coli* O157. ISO 16654/2001.
15. R. Hiramatsu, M. Matsumoto, Y. Miwa, Y. Suzuki, M. Saito, Y. Miyazaki, Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 strains and establishment of selective isolation media for these strains, *J. Clin. Microbiol.*, 40, 922 (2002).
16. A.W. Paton and J.C. Paton, Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohaemorrhagic *E. coli* *hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*, *J. Clin. Microbiol.*, 36, 598 (1998).
17. M. A. Karmali, M. Mascarenhas, S. Shen, et al., 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. Microb.*, 41(11) 4930 (2003).
18. M. Bugarel, L. Beutin, F. Scheutz, E. Loukiadis, P. Fach, Identification of Genetic Markers for Differentiation of Shiga Toxin-Producing, Enteropathogenic, and Avirulent Strains of *Escherichia coli* O26, *Appl. Environ. Microbiol.*, 77: 2275 (2011).
19. G.E. Sheridan, C.I. Masters, J.A. Shallcross, B.M. MacKey, Detection of mRNA by reverse transcription-PCR as an indicator of viability in *Escherichia coli* cells, *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 1313 (1998).
20. S. Massa, E. Goffredo, C. Altieri, K. Natola, Fate of *Escherichia coli* O157:H7 in unpasteurized milk stored at 8°C, *Lett. Appl. Microbiol.*, 28, 89 (1999).
21. S.E. Murinda, L.T., Nguyen, S.J. Ivey, S.J., et al., Prevalence and molecular characterization of *Escherichia coli* O157:H7 in bulk tank milk and fecal samples from cull cows: a 12-month survey of dairy farms in east Tennessee, *J. Food Protect.*, 65, 752 (2002).
22. J.G. Wells, L.D. Shipman, K.D. Greene, et al., Isolation of *Escherichia coli* serotype O157:H7 and other Shiga-like-toxin producing *E. coli* from dairy cattle. *J. Clin. Microbiol.* 29, 985 (1991).
23. H. Karch, T. Meyer, H. Rüssmann, J. Heesemann, Frequent loss of Shiga-like toxin genes in clinical isolates of *Escherichia coli* upon subcultivation, *Infect. Immun.*, 60, 3464 (1992).
24. M. Bielaszewska, R. Käch, A.W. Friedrich, et al., Shiga Toxin-Mediated Hemolytic Uremic Syndrome: Time to Change the Diagnostic Paradigm? *PLoS ONE*, October 10, e1024 (2007) (accessed at www.plosone.org).

25. K. N. Norman, N. A. Strockbine, J. L. Bono, Association of Nucleotide Polymorphisms within the O-Antigen Gene Cluster of *Escherichia coli* O26, O45, O103, O111, O121, and O145 with Serogroups and Genetic Subtypes, *Appl. Environ. Microbiol.*, 78(18):6689, (2012).
26. G. Duffy, E. Cummins, P. Nally, S. O'Brien, F. Butler, A review of quantitative microbial risk assessment in the management of *Escherichia coli* O157:H7 on beef, *Meat Sci.*, 74, 76 (2006).
27. N.J.C. Strachan, M.P. Doyle, F. Kasuga, O. Rotariu, I.D. Ogden, Dose response modelling of *Escherichia coli* O157 incorporating data from foodborne and environmental outbreaks, *Int. J. Food Microb.*, 103, 35 (2005).

Figure 1 - Analytical protocol for detection and quantification of verocytotoxin-producing and enteropathogen *E. coli* serogroups O157 and

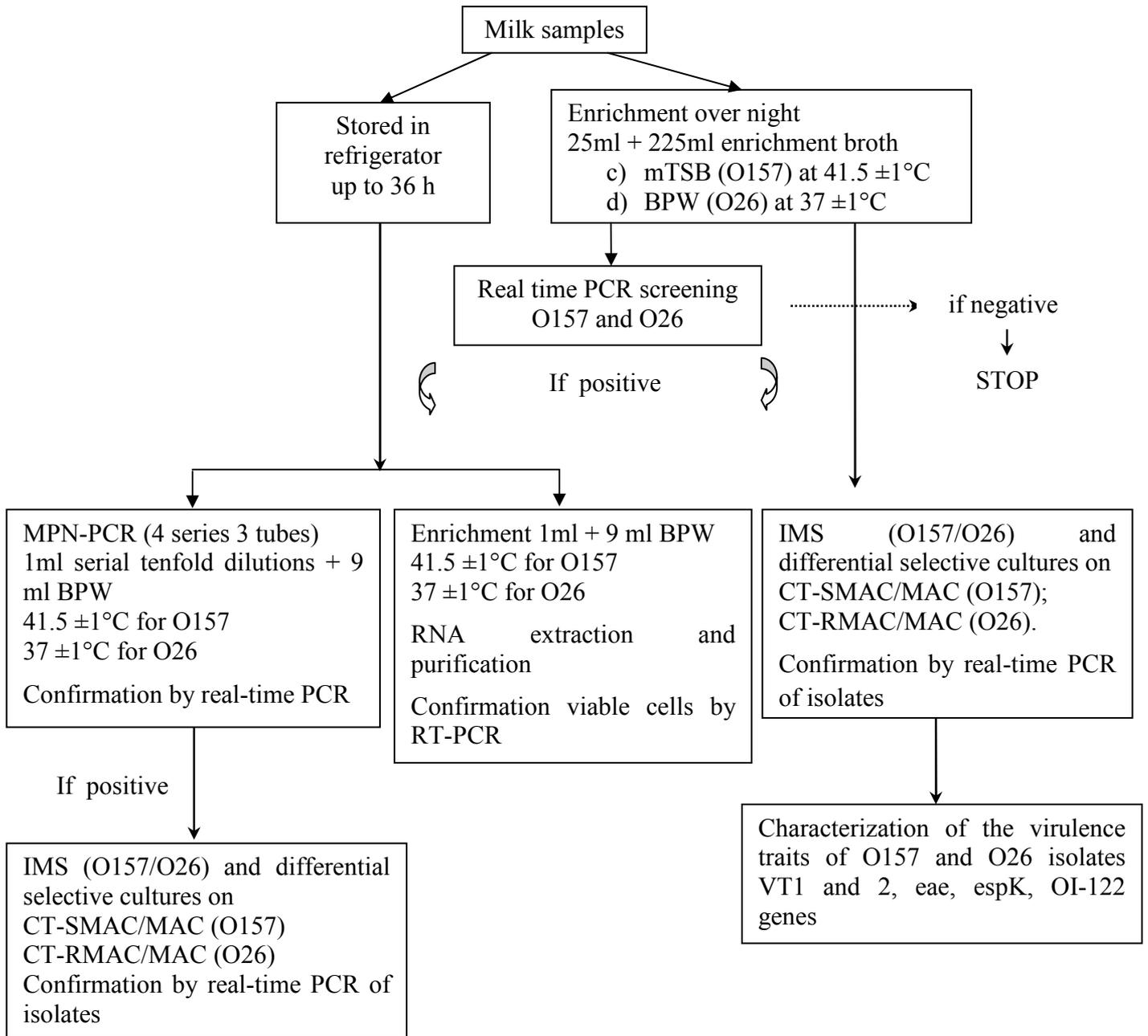


Figure 2. Percentage sample units positive for O157/O26 *E. coli* in batches of bulk raw milk

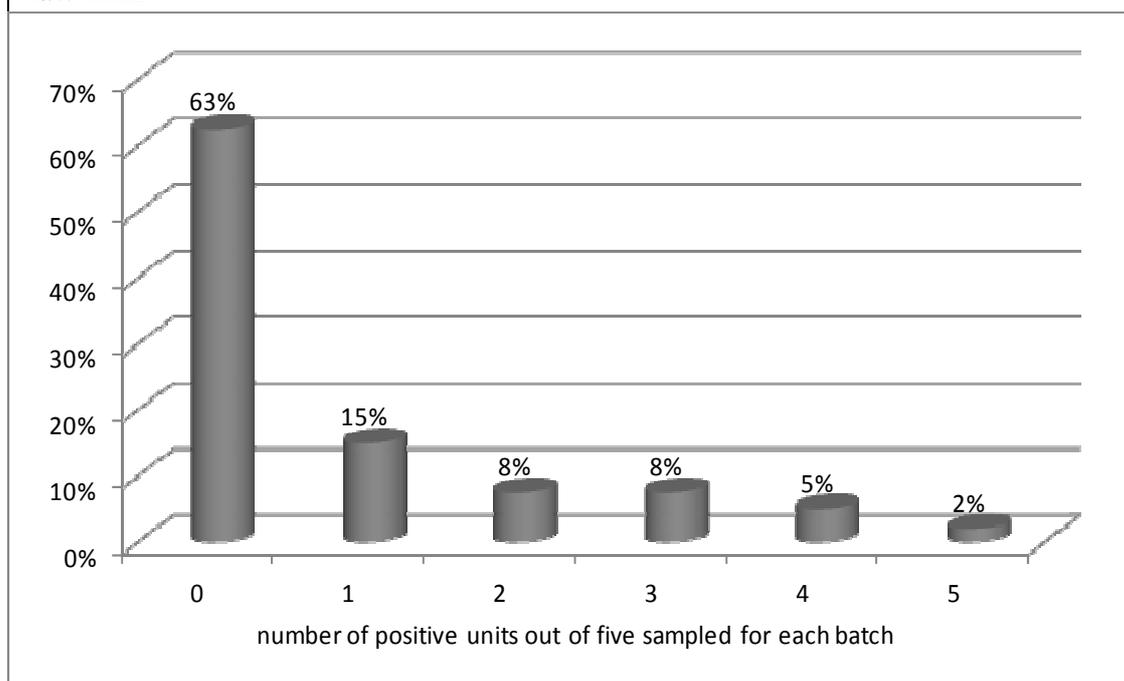


Table 1 - Detection of Escherichia coli serogroups O157 and O26 in milk batches by molecular and cultural methods

	POSITIVE qPCR	POSITIVE RT-PCR (viable cells)	ISOLATION RATE
Overall results	15/40 (37.5%)	12*/40 (30.0%)	5/40 (12.5%)
Serogroup O26	14/40 (35.0%)	11/40 (27.5%)	3/40 (7.5%)
Serogroup O157	3/40 (7.5%)	2/40 (5.0%)	2/40 (5.0%)

* one batch positive for both serogroups

Table 2 – Confirmation rate of Escherichia coli serogroups O157 and O26 in milk sample units by molecular and cultural methods

	POSITIVE qPCR	qPCR CONFIRMED by RT-PCR	CONFIRMATION RATE
Overall results	34/200 (17.0%)	27/34 (79.4%)	12/34 (35.3%)
Serogroup O26	30/200 (15.0%)	24/30 (80.0%)	9/30 (30.0%)
Serogroup O157	4/200 (2.0%)	3/4 (75.0%)	3/4 (75.0%)

Detection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in bovine dairy herds in Northern Italy

M. Trevisani^{a*}, R. Mancusi^a, G. Delle Donne^a, C. Picozzi^b, R. Mazzette^c, C. Bacci^d, L. Bassi^d, S. Bonardi^d

^a Department of Veterinary Medical Sciences, University of Bologna, via Tolara di Sopra 50, 40064, Ozzano dell’Emilia, Italy; ^b Department of Food Science and Technology, University of Milano, via Celoria2, 20133 Milano, Italy; ^c Department of Animal Biology, University of Sassari, via Vienna 2, 07100 Sassari, Italy; ^d Department of Veterinary Science, University of Parma, via Del Taglio10, 43126 Parma, Italy

*Corresponding author: Tel.: +390512097330; Fax: +390512097346; E-mail address: marcello.trevisani@unibo.it; address: Department of Veterinary Medical Sciences, University of Bologna, via Tolara di Sopra 50, 40064, Ozzano dell’Emilia, Italy.

Abstract- Verocytotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) are known hazards for human health. VTEC prevalence was assessed in 192 bovine dairy farms located in Northern Italy, including 31 farms selling raw milk to consumers. Using PCR bulk-milk samples and milk filters were screened for the presence of verocytotoxin (VT) genes. Positive samples were then analyzed with real-time PCR to detect O157 and O26 serogroups and VIDAS[®] UP *E. coli* O157 to address further analyses. Samples negative for these serogroups were subjected to colony lift/hybridization with DIG labeled probes to detect VT isolates others than O157 and O26. Thirty-eight of the 251 bulk milk samples (15%) and 68 of the 251 milk filters (32%) were positive for VT genes by PCR and 10% of milk and 34% of filter samples were also positive for the O157 serogroup. Among the 68 VT-positive milk filters, seven allowed the detection of VT-positive isolates: two O157 (0.9%), one O26 (0.5%) and four not typeable with O157, O26, O103, O111 and O145 antisera strains. VTEC isolates were never detected in milk, but four milk samples (1.6%) were positive for EPEC O26 (3 samples) and EPEC O157 (1 sample). Virulence characterization showed that all O157 isolates have a complete OI-122 profile, including the three O157 EPEC isolates. An incomplete OI-122 profile was observed in the O26 isolates. VTEC O26, EPEC O157 and EPEC O26 isolates were detected in milk filters collected from dairy farms selling raw milk to consumers, One EPEC O26 was also isolated from one milk sample collected in a farm selling raw milk.

In order to ensure safety of milk, monitoring plans should be undertaken either to detect VTEC-positive farms and to support farmers in reducing prevalence and dissemination in the environment of the strains of major interest for human health.

Highlights:

- Milk samples and milk filters were collected in 192 dairy farms, including 31 farms selling raw milk to consumers.
- One third of all milk filters gave positive results to PCR screening test for verocytotoxin genes.
- VTEC O157 and O26 were detected in 1.4% of milk filters, including one farm selling raw milk to consumers.
- Molecular and cultural methods had different specificity and sensitivity.
- A complete OI-122 profile occurred only in three O157 *Escherichia coli* isolates lacking VT genes.

Keywords: *Escherichia coli*; verocytotoxin; bovine milk; Italian dairy farms; detection methods; OI-122 profile

Introduction

Verocytotoxigenic *Escherichia coli*(VTEC) are known hazards for human health and several strains can be detected from animal samples, their manure and from surfaces that come in contact with the gut content of infected animals who are active shedders. Contamination carried by animal fleeces, tainted udders or surfaces that come in contact with foods intended for human consumption during the primary production steps, like in slaughtering or milking and also in growing vegetables, need to be investigated using appropriate analytical methods (Todd et al., 1999; Fremaux et al., 2006).

Ruminants are important reservoir of VTEC strains that represent a significant risk to public health. In the gastrointestinal tract of healthy cattle, sheep, goats and water buffalos a large number of verocytotoxin-producing *E. coli* serogroups can be detected, including O157, O26, O103 and other VTEC serogroups associated with human infections (Orden et al., 2008; EFSA, 2011).

However, several studies have shown that many of the verocytotoxigenic *E. coli* strains detected in food are not commonly observed in human outbreaks neither in the investigated cases with haemorrhagic colitis and/or haemolytic uremic syndrome (Karmali et al., 2003; Bielaszewska et al., 2007a). These observations lead the laboratories involved in surveillance on foodborne zoonoses and foodborne microbiologists to improve sensitivity of the analytical methods, using as target several characteristics that make the isolates 'of interest for human health' (EFSA, 2009).

The use of selective enrichment (immunomagnetic separation/selective media) followed by identification of virulent isolates by PCR (Paton and Paton, 1998) is at present the most used analytical method to detect VTEC isolates since it allows the detection of target bacteria at low levels even in presence of outgrowing interfering bacteria. Anyway, internal controls are needed to exclude false negatives due to PCR inhibitory compounds (Hoorfar et al., 2003; EFSA, 2009).

In order to confirm VTEC detection and characterize the isolates, the analytical procedure entail the use of selective enrichment and selective/differential cultures. As some strains proved to be sensitive to tellurite (Orth et al., 2007) and other were inhibited by antimicrobials, adaptation of methods are needed to isolate different strains (Posse et al., 2008, EFSA, 2009). If detection is not addressed to specific serogroups and immunomagnetic separation is not available, colony-lift DNA hybridization can be used to detect VTEC isolates. However, as the relative ratio of target to confounding bacteria should be at least 1:100 -1:1000, depending on the dimension of the agar plates used for isolating colonies and/or the use of ISO-grid filters, sensitivity is reduced (Todd et al., 1999; Arthur et al., 2002;Bouvet et al., 2002).

Italian legislation issued the controls to be actuated at dairy farms (CSR, 2007) and obligation to put on the vending machines a label stating that raw milk must be boiled before consumption (OMH, 2010). Regional legislations (e.g. RER, 2008) oblige farmers to actuate sampling plans for assessing sanitary status of their herds concerning VTEC O157 infection. This mandatory control was extended to other serotypes of major human health relevance in 2012, i.e O26, O103; O111; O145. In EU countries, epidemiological reports have shown that serogroups O157 and O26 were detected in 41.1-51.7 and 7.0-5.4 % of the confirmed human cases in 2010 and 2009. In the same period 33.7-28.2% of cases were due to untyped/untypable serotypes, 5.3-4.3% to serogroups O103, O145 and O111, and 13-11% to other serotypes (EFSA/ECDC, 2012). In 2009-2010 2,681 raw cows' milk samples were analysed in four EU Member States and only for Germany it was clearly indicated that 266 out of 603 samples concerned raw milk intended for direct human consumption and 88 were sold at farm with the recommendation for heating. In 2009 6.8% of the raw milk samples sold

in Germany to consumers was positive for VTEC isolates, but no VTEC O157 was found among positive samples. In the previous two years (2007-2008) only Austria, Czech Republic, Germany, Italy and Latvia reported on the occurrence of VTEC in raw milk sold directly to consumers..

This paper reports the results of VTEC prevalence in bulk milk samples and milk filters collected in cow dairy farms in Northern Italy and analyse the virulence profile of verocytotoxigenic and enteropathogenic *Escherichia coli* isolates. Data obtained from an inter-laboratory trial involving four laboratories that have adopted a common PCR screening test for VT1 and VT2 genes for the detection of presumptive positive samples is also reported and analytical results are evaluated to get an insight of use of currently used analytical methods.

Materials and methods

A total of 251 bulk milk samples and 214 milk filters were collected at 192 dairy farms located in Northern Italy (Emilia Romagna and Lombardy regions) from April 2009 to May 2010. Thirty one farms used to sell raw milk to consumers through automatic dispensers (RMFs: raw milk farms), 116 farms used milk for the production of Parmesan (Parma-district) and Grana cheese (Mantua-district) (CFs: cheese farms) while 41 of them sold milk to industry for pasteurized milk production (PMFs: pasteurized milk farms). In each farm bulk-tank milk samples and disposable milking machine filters were collected. In 30 out of 31 RMFs, samples of milk and milk filters were collected two-four times a year, except for a farm that stopped its activity during the sampling period.

Sample preparation and enrichment

Before testing, milk filters were cut into two equal parts by using sterile scissors. In order to detect *E. coli* O157 half milk filters and 25 ml-aliquots of raw milk were suspended in 225 ml of modified Tryptone Soy Broth (m-TSB, Oxoid, Basingstoke, UK) supplemented with novobiocin 20 mg/l (Sigma-Aldrich, Steinheim, Germany) and enriched overnight at $41.5 \pm 1^\circ\text{C}$. For detection of non-O157 isolates, half milk filters and 25 ml-aliquots of raw milk were suspended in 225 ml of m-TSB with 12 mg/L acriflavin. Broths were incubated at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ overnight.

Preliminary screening to detect verocytotoxin genes

After overnight incubation, all the cultures were tested by PCR for detection of specific VT1 and VT2 toxin genes. DNA extracts were obtained with thermal cell lysis using Chelex 100 (Bio-Rad, Munich, Germany). An aliquot (5 μl) of supernatant was used as template for PCR analysis. The 20 μl PCR mixture consisted of 0.4 μM each of MK1 and MK2 primers (Karch and Meyer, 1989) 0.2 μM dNTPs mix, 1.5 mM Mg_2Cl_1 , 2.5 μl 10x PCR buffer (Platinum Taq, Invitrogen) 1 U Taq (Platinum, Invitrogen). The absence of inhibitors in sample extract was assessed by repeating the amplification in case of negative results after spiking the samples with DNA extracts of ATCC 35150 O157:H7 or FV4028 O26:H11 VTEC cultures (100-300 UFC/ml) or by using an internal amplification control based on the use of recombinant primers MK1-pUC19 (5-GCGCGCTTTACGATAGACTTCTCGGGTGTGGCGGGTGTC-3) and MK2 pUC19 (5-CACATATAAATTATTTTCGCTCGAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGC-3) and 2 $\text{pg}/\mu\text{l}$ pUC19 (Sigma Aldrich) producing amplicon of 224 and 227 bp and an Internal Amplification Control of 630 bp (Wieczorek and Osek, 2004). The amplification program was: 94°C for 1

min, followed by 30 cycles at 94°C for 60 s, 48°C for 60 s and 72°C for 60 s and a final extension step of 10 min at 72°C. The analysis of the amplified products was performed in 2% agarose (Sigma) in Tris-Acetate–EDTA (TAE) buffer at 100 V. The DNA bands were visualized by staining with ethidium bromide (3µg/ml), analysed under UV light (300 nm) and photographed using the Geldoc-it imaging system (UVP, UK). Verocytotoxin (*vtx*) genes gave fragments 224 base pairs (bp) (*vtx1*) and 227 bp (*vtx2*) long, whereas IAC (pUC19) gave a fragment 630 bp long.

Preliminary screening for detection of O157 and O26 serogroups

Samples positive for VT genes by the preliminary screening test, were subsequently screened by using: *i*) a real-time PCR assay for the detection of O157 and O26 antigen specific genes (samples collected at farms selling milk directly to the consumers - RMFs); *ii*) the VIDAS® UP *E. coli* O157 (ECPT) (bioMérieux) for the presumptive detection of *E. coli* O157 (samples collected at processing milk dairy farms – CFs and PMFs).

For the real-time PCR assay, the DNA extracts of enriched broth obtained with thermal cell lysis using Chelex 100 were analysed using a 5' nuclease PCR assay as described in the EFSA technical guideline (EFSA, 2009). The use of an internal amplification control was not considered since all the extracts had already shown positivity in the preliminary PCR assay for detection of VT genes. The set of primers and probes *rfbE* (O157) and *wzx* (O26) were used (Perelle et al., 2004). A final concentration of 500 nM of each primer and 200 nM of each probes were used. RT-PCR was performed with a MiniOpticon thermocycler using iQSupermix, manufacturer's protocol, and iQ5 Optical System Software, Version 2.1 (Bio-Rad, Hercules, CA). The amplification conditions were 95°C for 3 min, followed by 40 cycles at 95°C for 10 sec and three steps at 64°, 62° and 60°C for 20 s with a temperature transition rate of 10°C/s. DNA standards for real-time PCR quantification were constructed using bacterial DNA extracted from a selected reference strain of target bacteria for each primer set (namely the VTEC strains ATCC 35150 O157:H7 and FV4028 O26:H11). Five 10-fold dilutions of the cultures in exponential growth phase (range 2-5 Log CFU/ml) were used to spike enriched milk or filter samples that were verified to be O157 and O26 negative by PCR. The CFU number of bacteria in the spikes was determined using standard plate counting method. Spiked enrichments were subjected to DNA extraction using the same procedure used for the other samples. Standard curves were generated for each of the two *Escherichia coli* strains. The reaction efficiency (E), calculated using the slope of the standard curve ($E = 10^{-1/\text{slope}}$) was between 90-110% for all PCR assays. The results were found to be linear over the range of bacterial concentrations tested, with a correlation coefficients (R) ≥ 0.990 . The amount of DNA measured by real-time PCR (ng/µl) was converted to CFU/ml. Controls of extraction efficiency (milk/filter samples inoculated with approx. 10^3 CFU /ml) and negative controls (extraction and no template control) were included in each amplification assay.

For the VIDAS® UP *E. coli* O157 testing, 1 ml of m-TSB incubated at $41.5 \pm 1^\circ\text{C}$ was transferred to a capped tube, boiled for 5 min and chilled. Aliquots of 500 microliters were used for the analysis according to the manufacturer's instructions. Samples that exhibited relative fluorescence values (RFVs) of 150 were considered positive.

Immunomagnetic separation technique – slide agglutination for VTEC O157 and O26

All samples of milk and milk filters that gave positive results to VIDAS® UP *E. coli* O157 or real-time PCR for O157 or O26 serogroups were subjected to the immunomagnetic-separation technique (IMS), followed by isolation on specific selective/differential media and slide-

agglutination with specific antisera. All samples collected at CFs and PMFs, positive by the preliminary screening PCR but not screened for O26 serogroup, were tested by IMS technique for the detection of O26 *E. coli*. The ISO 16654:2001 method was followed for *E. coli* O157 detection. After static incubation at 41.5 °C ± 1°C overnight, 1 ml of the cultures was added to 20 µl of O157 serogroup specific IMS beads (Dynabeads® anti- *E. coli* O157, Dynal, Oslo, Norway) in sterile micro-centrifuge tubes. Samples for detection of VTEC O26 were incubated at 37 ± 1 °C overnight. IMS was performed by using Dynabeads® EPEC/VTEC O26 following the manufacturer's instructions. For VTEC O157 detection, beads-bacteria complexes were plated onto CT-SMAC (Oxoid) (Zadiket al., 1993) and MacConkey Agar (Oxoid). For VTEC O26 isolation, Cefixime-Tellurite Rhamnose MacConkey Agar (CT-RMAC, Lab M, Bury, UK) (Hiramatsuet al., 2002) and MacConkey Agar (Evans et al., 2008) were used. Plates were incubated at 37° C ± 1°C for 18-24 h. Up to ten sorbitol non-fermenting, colourless colonies grown on CT-SMAC, or pink colonies grown on MacConkey Agar, or rhamnose non-fermenting, colourless colonies grown on CT-RMAC were selected and tested for indole production. Indole-positive cultures were subjected to slide agglutination with *E. coli* O157 Latex test kit (Oxoid) and *E. coli* O26 antiserum (Denka Seiken, Tokyo, Japan). Agglutinating cultures were confirmed biochemically as *E. coli* by using API 20 E® system (bioMérieux).

Colony lift – VT DIG labelled probes hybridization

Detection of non-O157 or non-O26 *E. coli* was performed using a colony lift DNA hybridization method. Enrichments of *vtx1* or *vtx2* PCR-positive samples, but negative for O157 or O26 specific sequences, were diluted with Buffer Saline solution and filtered through ISO-Grid (Neogen - Acumedia, USA) membranes, then put on MacConkey agar plates in order to allow growth of 300-1000 colonies per filter. These were blotted to Nylon+ membranes (Roche, Mannheim, Germany) and hybridization (44°C) and detection steps were carried out using the DIG High Prime DNA Labelling and Detection Starter Kit I (Roche) following the manufacturer's instructions. The membranes were hybridized with 90 ng of both *vtx1* and *vtx2* probes in 50 ml of hybridization buffer. The DNA probes for random prime labelling were derived via PCR from *E. coli* O157 strain ATCC 35150 by using the following primers: *vtx1*-F (bp 77 to 102 of Sakai-VT1; 5-CCTTAGACTTCTCGACTGCAAAGACG-3), *vtx1*-R (bp 894 to 913 of Sakai-VT1; 5-CCAGAGTGGATGAATCCCAC-3), *vtx2*-LP43 (bp 57 to 78 of EDL933; 5-ATCCTATTCCCGGGAGTTTACG-3), and *vtx2*-LP44 (bp 622 to 643 of EDL933; 5-GCGTCATCGTATACACAGGAGC-3) (Arthur et al., 2002). The developed films from the colony blots were aligned with the original plates and up to five suspect colonies per sample were streaked for isolation on MacConkey agar.

Virulence genes detection by multiplex-PCR

E. coli O157, O26 and other VT-putative isolates were subjected to multiplex PCR (mPCR) for the detection of the genes coding for verocytotoxins (*vtx1*, *vtx2*), intimin (*eae*) and enterohaemolysin (*hlyA*). Crude DNA extracts were prepared from *E. coli* isolates by boiling one colony for 5 min in 50µl of distilled water. Two microliters of each extract were placed in 25µl reaction mixtures containing 10mM Tris-HCl pH 8.3, 50mM KCl, 2mM MgCl₂, 0.2mM of each dNTPs, 1 unit of AmpliTaq Gold™ DNA Polymerase (Applied Biosystems, Foster City, USA), 0.5µM of each primer (Paton and Paton, 1998). Samples were amplified with a touch-down protocol: initial step at 95°C for 10 min, then 35 amplification cycles of denaturation at 95°C for 60 s, primer annealing at 65°C for 60 s decreasing 0.5°C every cycle

for the first 10 cycles, primer annealing at 60°C for 60 s for the remaining 25 cycles, extension at 72°C for 90 s, followed by final cycle at 72°C for 7 min. PCR reactions were electrophoresed on 1.5% agarose gels and stained with ethidium bromide.

VTEC strains were tested by the EU *Escherichia coli* Reference Laboratory (Istituto Superiore di Sanità, Rome, Italy) for serogroup identification and virulence genes confirmation. Virulence traits of the isolates from RMF were further characterized by testing for pathogenic island OI-122 sequences, namely those of genes *pagC*, *sen*, *efa1* and *efa2* (Karmali et al., 2003) The 20 µl PCR reaction mixture consisted of 25 pM each of the primers Z4321, Z4326, Z4332 and Z 4333 (Karmali et al. 2003), dNTPs mix (0.25 µM each) 1 mM Mg2Cl, 2.5 µl 10x PCR buffer (Platinum Taq, Invitrogen) 1 U Taq (Platinum, Invitrogen). Cycling conditions for all OI-122 genes consisted of an initial denaturation step at 94°C for 5 min, followed by 30 cycles, each consisting of denaturation at 94°C for 30 s, annealing at 56°C for 1 min, and elongation at 72°C for 2.5 min.

Antimicrobial resistance test

E. coli isolates that were found positive to VT genes and/or O157 or O26 serogroups were tested for antimicrobial resistance by the disc-diffusion method according to the recommendations of the Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2006a; CLSI 2006b). Iso-Sensitest Agar (Oxoid) and commercial antimicrobial susceptibility disks (Oxoid) were used. The following 17 antimicrobial agents were selected, with regard of their clinical use: ampicillin (A, 10 µg), amoxicillin and clavulanic acid 2:1 (Amc, 30 µg), cefotaxime (Ctx, 30 µg), ciprofloxacin (Cip, 5 µg), cephalothin (Cf, 30 µg), ceftazidime (Caz, 30 µg), chloramphenicol (C, 30 µg), colistine (Col, 10 µg), enrofloxacin (En, 5 µg), gentamicin (Cm, 10 µg), kanamycin (K, 30 µg), nalidixic acid (Nx, 30 µg), neomycin (N, 30 µg), streptomycin (S, 10 µg), sulphonamide (Su, 300 µg), tetracycline (T, 30 µg), and trimethoprim/sulphamethoxazole (Sxt, 1.25/23.75 µg). Results were categorized as susceptible, intermediate or resistant according to Clinical and Laboratory Standards Institute guidelines (CLSI, 2006a). Outcomes were dichotomized after aggregating the resistant and intermediate resistance categories together according to the European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST).

Ring trial for the detection of presumptive VTEC using the PCR screening method

Four laboratories involved in the study received frozen overnight enrichments (bacterial pellets re-suspended in TSB + 20% glycerol) that gave both positive and negative results. Altogether, 24 enriched samples (18 from filters and 6 from milk samples) were exchanged in four different times. All labs performed the resin based DNA extraction and used the same protocol for the PCR assay with primers MK for detection of VT genes described above. In case of negative results the DNA extracts were spiked with known amount of DNA from reference standard cultures (approximately 100-300 CFU/ml) to verify the method sensitivity. Inter-laboratory agreement (chance of finding the same result, positive or negative, from identical samples in different laboratories under predefined repeatability conditions) was calculated with the Fleiss's kappa method using R statistical software (The R Foundation for statistical computing, 2010) with package 'irr' (Gamer, 2010). Samples were also analysed by using the quantitative real-time qPCR assay for VT genes with the set of primers and labelled probes VT1 and VT2 described by Perelle et al. (2004) and the amplification conditions and reagents described above for the screening of O157 and O26 genes. The diagnostic sensitivity and specificity achieved in each laboratory were defined as the ratio of positive samples (presence of VT genes) and those of negative samples (absence of VT genes) that were

properly identified, using the results of qPCR as a gold standard. In order to quantify DNA, standards for real-time PCR quantification were constructed using bacterial DNA extracted from a pure culture of a selected reference strain of target bacteria for each primer set (namely the VTEC strains ATCC 35150 O157:H7 and FV4028 O26:H11) as it was already described for the O157/O26 RT-PCR screening test.

Results

Preliminary screening test

According to the preliminary PCR screening test, 28 out of 251 (15%) bulk milk samples and 68 out of 214 (32%) milk filters were positive for VT genes. The prevalence was lower among the samples collected at RMFs, with four out of 74 (5%) milk samples and 17 out of 72 (28%) milk filters being positive (Table 1). Any false negative result was observed due to PCR inhibitors, since the internal amplification control (pUC19) was always detected or the VT negative enriched samples showed amplification after spiking DNA extracts of VTEC reference strains (100-300 UFC/ml).

Screening for O157 and O26 serogroups

Among samples taken at CFs and PMFs, which tested positive for VT genes at the screening PCR, four out of 34 milk samples (12%) and 21 out of 51 filters (41%) were positive for O157 serogroup by VIDAS UP *E. coli* O157. Among samples taken at RMFs, which tested positive for VT genes at the screening PCR, two filters out of 17 (12%) were positive for O157 serogroup and three filters out of 17 (18%) for O26 serogroup by using real time-PCR. In addition, one milk sample out of four (25%) was positive for serogroup O26.

Isolation of VTEC and EPEC strains

The proportion of VTEC O157 contaminated filters was 1.4% (2/142) in the farms selling milk for further processing (CFs and PMFs). Prevalence of VTEC O26-positive filters was 1.4% (1/72) even in the farms selling raw milk directly to consumers (RMFs). No VTEC O157 and O26 isolates were detected from milk samples in any of the selected farms.

EPEC O157 and O26 were isolated either from raw milk or milk filters. Prevalence were the following : *i*) EPEC O157 : 0.0% in raw milk of RMFs; 1.4% (1/72) in milk filters of RMFs; 0.6% (1/177) in raw milk of CFs and PMFs; 1.4 % (2/142) in milk filters of CFs and PMFs. *ii*) EPEC O26: 1.4% (1/74) in raw milk of RMFs; 1.4% (1/72) in milk filters of RMFs; 1.1% (2/177) in raw milk of CFs and PMFs; 1.4% (2/142) in milk filters of CFs and PMFs. Non-typeable VTEC isolates were found in milk filters only, respectively in 4.2% (3/72) of milk filters of RMFs and 0.7% (1/142) of milk filter collected at CFs and PMFs.

The isolation rate of target bacteria among the samples giving positive results to the real-time PCR for O157 and O26 serotypes, was high (Table 1). Among samples collected at RMFs three out of four O26 positive samples were confirmed by detection of one VTEC isolate from a filter sample and two EPEC isolates (one from milk and the other from filter). Furthermore, one of two O157 positive filter samples was confirmed by detection of an EPEC strain. Among samples taken from CFs and PMFs only four out of 21 (19%) milk filters that tested positive for O157 serogroup by VIDAS® UP *E. coli* O157 were confirmed by the detection of O157 isolates (two VTEC and two EPEC strains). The confirmation rate was one out of four (25%) among milk samples (one EPEC strain).

The analysis of the virulence profile of isolates is shown in Table 2. One of the VTEC O157 strain possessed the *vtx1*, *vtx2*, *hlyA* and *eae* genes, the other had *vtx2* and *eae* genes. Both these isolates showed a complete OI-122 profile. The VTEC O26 isolate was positive for *vtx1*, *hlyA* and *eae* genes and showed an incomplete OI-122 profile (lacking the gene sequences for *pagC*). Two untypeable VTEC isolates possessed *vtx1* and *eae* genes, another isolate was positive for *vtx1*, *vtx2* and *eae* genes. One isolate possessed the *vtx1* sequence only. One of the untypeable strains showed an incomplete OI-122 profile, lacking *efa1* and *efa2* genes. A complete profile of the OI-122 was observed in the three EPEC O157 isolates, whereas it was incomplete in the two EPEC O26 isolates.

Antimicrobial resistance

All VTEC strains were susceptible to the 17 antimicrobials tested. Among the 10 EPEC isolates, drug-resistance frequencies of 20% for streptomycin and tetracycline (R-type: STE) and of 10% for cephalothin were found. In particular, two out of four EPEC O26 isolates showed resistance against both tetracycline and streptomycin, and one EPEC O157 was resistant to cephalothin. No isolate was resistant to more than two antimicrobial agents.

Ring trial for the validation of the preliminary PCR screening test to detect verocytotoxin genes

The results of the inter-laboratory ring test are shown in Table 3. When filter or milk samples presented C_T values higher than 35 at the qPCR, false positive results were reported. Similar values were shown testing filter or milk samples spiked after enrichment with approximately 100 CFU/ml VTEC (*i.e.* to verify absence of PCR inhibitory substances). On the contrary, C_T values below 20 were recorded after 24 hours enrichment with artificially contaminated raw milk or milk filters spiked with approximately 1-10 CFU/ml or g. The diagnostic sensitivity and specificity achieved in individual laboratories in testing milk filters were in the range 91.6-100% and 83.3-100%, respectively. The diagnostic specificity obtained analysing milk samples was 83.3% in individual laboratories, as five out of six negative samples were detected. The lack of milk positive samples (tested by the reference real-time PCR method) did not allowed the definition of diagnostic sensitivity.

Discussion

Prevalence of VTEC in milk and milk filters

As known, VTEC serogroups O157 and O26 are responsible for human infections complicated by HUS (Mead and Griffin, 1998; Tozzi et al., 2003; Beutin et al., 2004). Cattle are important reservoirs of VTEC strains that represent a significant risk to public health. In cattle faeces, VTEC O157, O26, O103 and O145 have been isolated in several European countries (Chapman et al., 1997; Blanco et al., 2003; Pearce et al., 2006; Stephens et al., 2007; Bonardi et al., 2007; Thomas et al., 2012). In lactating animals *E. coli* faecal shedding is of concern, as it can lead to contamination of teats and udders and consequently of milk (Fremaux et al., 2006). In this study, we did not test animal faeces to evaluate the prevalence of shedders at dairy farms, but we collected milk samples and milk disposable filters only, in order to compare the prevalence of VTEC contamination among different dairy farms (raw milk selling farms: RMFs; cheese making farms: CFs; pasteurizing milk farms: PMFs). In our study, VTEC strains were never detected in cow milk samples. However, one out of 74 milk samples to be commercialised raw was positive for EPEC O26 (1.3%). In cow milk

samples collected at CFs and PMFs proportions of EPEC O157/O26 strains were low, ranging from 1/177 (0.5%) to 2/177 (1.1%) respectively. Our data are in accordance with the Italian surveillance cow milk data reported by the European Food Safety Authority in 2009 (EFSA, 2011). Similarly, a nationwide survey carried out in Italy found no verocytotoxin-producing *E. coli* and only a very low proportion of VT-negative, *eae*-positive *E. coli* O157 strains (0.1%) in raw milk cheeses with less than 60 days of ripening (Conedera et al., 2004). Our data showed that 38 out of 251 (15.1%) cow milk samples and 68 out of 214 (31.8%) cow milk filter samples proved to be *vtx*-positive by screening PCR. Similar proportions were found in milk filters by Fremaux et al. (2006) who reported on the high contamination rate (23-38%) of cow's teats and udders detectable by PCR. Although a high prevalence of VT-positive milk (5-19%) and filter samples (28-36%) has been observed, only milk filters allowed detection of VTEC isolates, namely four out of 17 (23%) from samples collected at RMFs and three out of 51 (6%) from those collected at CFs and PMFs. It must be underlined that target screening and specific immunomagnetic separation was carried out only for O157 and O26 serogroups, which are responsible for the majority of confirmed human cases reported in Italy (EFSA/ECDC, 2012).

In our study, PCR screening faint positive results could be attributable to the presence of not viable or very low numbers of VTEC that cannot be detected by cultural methods, particularly if they are not associated with specific immunoenrichment.

However, quantitative PCR screening test could discriminate between samples contaminated by viable and not viable VTEC or EPEC (O157/O26), thus reducing the number of false positive samples that do not allow detection of specific isolates. Our data suggest that values below C_T 30 (more than 10^4 CFU/ml *E. coli* O157/O26 in enriched filter samples) worth to be further analysed. Significant differences were observed between results of molecular screening and conventional detection methods even using O157 or O26 real-time PCR or VIDAS®UP *E. coli* O157. As a matter of fact, only two VTEC and two EPEC strains O157 were isolated among the 22 positive samples detected by VIDAS®UP in milk filters. VT probes hybridization allowed discrimination of target colonies among the outgrowing and interfering bacteria, but milk filter enriched samples had to be diluted (*i.e.* 10^5 fold) to have 500-1000 isolated colonies per plate using ISO-grid membranes. Therefore, the theoretical sensitivity is limited to more than 10^5 CFU/ml in enrichment broths, unless inhibitory supplements in agar media could be helpful in limiting the outgrowth of interfering *Enterobacteriaceae*. On the other side, inhibitory substances also can interfere with the detection of some VTEC strains. The use of selective separation methods (*i.e.* antibody coated magnetic micro-beads) allowed higher detection rates. Nevertheless, in our study this was achievable only in presence of enriched samples showing at real-time PCR C_T values below 30 (approx. 10^4 CFU/ml) in milk filter enrichment broths spiked with known numbers of reference strains bacteria. However, many bacteria that are present in milk filters stuck to the immunomagnetic beads and the chance of detecting target colonies depends on their relative concentration (Tomoyasu, 1998). Characterization of the virulence profile showed that a complete OI-122 profile occurred in all the *E. coli* O157 isolates lacking VT genes. The loss of VT2 gene after subculturing of isolates (in our experience also with reference strains) sometimes occurs (Karch et al., 1992) and it has also been reported that at the time of microbiological analysis, approximately 5% of HUS patients shed no longer the causative EHEC, but do excrete *vtx*-negative derivatives of EHEC that lost genes during infection (Bielaszewska et al., 2007a). Therefore the presence in milk filters of EPEC O157 or VTEC strains presenting a complete OI-122 profile should not be neglected, because the pathogenicity island OI-122 has been related to the most virulent and epidemic seropathotypes (Karmali et al., 2003; Bielaszewska et al., 2007b).

Antimicrobial resistance

In this study, all VTEC O157 and O26 isolates detected in milk filters were susceptible to the 17 antimicrobials tested. Resistances were found in EPEC isolates only. Resistance rate to tetracycline and streptomycin was 20% in O26 EPEC isolates found in milk filters.

Even if we tested only a small number of isolates, and therefore cannot compare our results with large scale studies, the sensitivity of VTEC isolates to several antimicrobials is a positive findings. An important study was performed in Spain, where antimicrobial resistance in 141 VTEC O157:H7 and 581 VTEC non-O157 isolates detected from humans, cattle, sheep and foodstuffs against 26 antimicrobial drugs was tested (Mora *et al.*, 2005). Resistances above all against sulfisoxazole (39%), followed by tetracycline (32%), streptomycin (29%), ampicillin (10%), thrimethoprim (8%), cotrimoxazole (8%), chloramphenicol (7%), kanamycin (7%), piperacillin (6%), and neomycin (5%) were found. In the Spanish study multiple resistance patterns were observed, with 7% of VTEC O157 and 12% of VTEC non-O157 isolates resistant to five or more antimicrobial agents. In this study, multiple resistant patterns were not observed and only 20% of EPEC isolates were resistant to two antimicrobials.

Conclusion

This study allowed us to shed some light in the interpretation of apparently conflicting results in assessing the prevalence of VTEC in cow milk and milk filters. Different molecular and cultural methods are commonly used in combination for detection of verocytotoxin-producing *Escherichia coli*, but their results have to be evaluated taking into account the different discriminating capability and sensitivity they have. The accuracy of results due to the confirmation steps is high, but overall uncertainty of results in the prevalence studies has to be accounted for the context of risk analysis.

In this study, VTEC isolates were detected in 3.2% of cow milk filters, but not in bulk tank milk. Higher filth and bacteria concentration are retained on filters that can be of use for evaluating the prevalence of VTEC, whereas bacterial concentration in milk might be too low to be detected. Apart from hard ripened cheeses, as Parmigiano-Reggiano and Grana-cheeses, semi-hard ripened cheeses and pasteurised-milk cheeses, dairy products made from raw milk represent a potential threat to human health. Raw milk is still considered an important vehicle through which VTEC and other zoonotic microorganisms can be transmitted to humans (Murphy *et al.*, 2007). Our results demonstrate that VTEC milk contamination can be low (below detection level), if hygienic conditions of milking, collection and storage of milk are implemented, and if disposable milk filters are employed, even if these tools may not guarantee the whole safety of raw milk.

Acknowledgements

This study was funded by the Italian Ministry of the University and Scientific Research (PRIN 2007 programme).

References

Allerberger, F., Wagner, M., Schweiger, P., Rammer, H.P., Resch, M.P., Dierich, M.P., Friedrich, A.W., Karch, H., 2001. *Escherichia coli* O157 infections and unpasteurised milk. Euro Surveillance 6, 147-151.

- Arthur, T. M., Barkocy-Gallagher, G.A., Rivera-Betancourt, M., Koohmaraie, M., 2002. Prevalence and characterization of non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* on carcasses in commercial beefcattle processing plants. *Applied and Environmental Microbiology* 68, 4847-4852.
- Beutin, L., Krause, G., Zimmermann, S., Kaulfuss, S., Gleier, K., 2004. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from human patients in Germany over a 3-year period. *Journal of Clinical Microbiology* 42, 1099-1108.
- Bielaszewska, M., Käch, R., Friedrich, A.W., von Eiff, C., Zimmerhackl, L.B., Karch, H., Mellmann A., 2007a. Shiga Toxin-Mediated Hemolytic Uremic Syndrome: Time to Change the Diagnostic Paradigm? *PLoS ONE* October 2007, Issue 10, e1024 (accessed at www.plosone.org).
- Bielaszewska, M., Sonntag, A.K., Schmid, M.A., Karch, H., 2007b. Presence of virulence and fitness gene modules of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in atypical enteropathogenic *Escherichia coli* O26. *Microbes and Infection* 9, 891-897.
- 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, 345-351.
- Bonardi, S., Foni, E., Chiapponi, C., Salsi, A., Brindani, F., 2007. Detection of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* serogroups O157 and O26 in the caecal content and lymphatic tissue of cattle at slaughter in Italy. *International Journal of Food Protection* 70, 1493-1497.
- Bouvet, J., Montet, M.P., Rossel, R., Le Roux, A., Bavai, C., Ray-Gueniot, S., Mazuy, C., Atrache, V., Vernozy-Rozand, C., 2002. Effects of slaughter processes on pig carcass contamination by verotoxin-producing *Escherichia coli* and *E. coli* O157:H7. *International Journal of Food Microbiology* 77, 99-108.
- Chapman, P.A., Siddons, C.A., Gerdan Malo, A.T., Harkin, M.A., 1997. A 1-year study of *Escherichia coli* O157 in cattle, sheep, pigs and poultry. *Epidemiology and Infection* 119, 245-250.
- CLSI, 2006a. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; 16th informational supplement, M100-S15. Wayne, PA: CLSI, 2006.
- CLSI, 2006b. Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals, tentative guideline, M31-A3, 3rd edn. Wayne, PA: CLSI, 2006.
- 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. *International Journal of Food Microbiology* 96, 67-73.
- CSR, 2007. [State-Regions Conference agreement of the 25 January 2007 on the direct selling of raw milk for human consumption] Intesa tra il Governo, le Regioni e le Province autonome di Trento e di Bolzano in materia di vendita diretta di latte crudo per l'alimentazione umana. Punto 3/B - Repertorio Atti n. 5/CSR del 25 gennaio 2007
- EFSA, 2009. Technical specifications for the monitoring and reporting of VTEC on animals and food. *The EFSA Journal* 7 (11), 1366.
- EFSA, 2011. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2009. *EFSA Journal* 9, 2090 [378 pp.]
- EFSA/ECDC, 2012. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. *EFSA Journal* 2012, 10(3), 2597.

- Evans, J., Knight, H.I., Smith, A.W., Pearce, M.C., Hall, M., Foster, G., Low, J.C., Gunn, G.J., 2008. Cefixime-tellurite-rhamnose-MacConkey agar for isolation of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* serogroup O26 from Scottish cattle and sheep faeces. *Letters in Applied Microbiology* 47, 148-152.
- Fremaux, B., Raynaud, S., Beutin, L. and Vernozy-Rozand, C., 2006. Dissemination and persistence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) strains on French dairy farms. *Vet microbiol* 117, 180–191.
- Gamer, M., 2010. Various Coefficients of Interrater Reliability and Agreement. Package ‘irr’. Accessed at ‘<http://cran.r-project.org/web/packages/irr/index.html>’ on September 20th, 2011.
- Hiramatsu, R., Matsumoto, M., Miwa, Y., Suzuki, Y., Saito, M., Miyazaki, Y., 2002. Characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26 strains and establishment of selective isolation media for these strains. *Journal of Clinical Microbiology* 40, 922-925.
- Hoorfar, J., Cook, N., Malorny, B., Wagner, M., De Medici, D., Abdulmawjood, A., Fach, P., 2003. Making internal amplification control mandatory for diagnostic PCR. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 5835.
- Karch, H., Meyer, T., Rüssmann, H., Heesemann, J., 1992. Frequent loss of Shiga-like toxin genes in clinical isolates of *Escherichia coli* upon subcultivation. *Infection and Immunity* 60, 3464–3467.
- 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* serotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 4930–4940.
- Mead, P.S., Griffin, P.M., 1998. *Escherichia coli* O157:H7. *Lancet* 352, 1207-1212.
- Mora, A., Blanco, J.E., Blanco, M., Alonso, M.P., Dhahi, G., Echeita, A., González, E.A., Bernárdez, E.I., Blanco, J., 2005. Antimicrobial resistance of Shiga toxin (verotoxin)-producing *Escherichia coli* O157 and non-O157 strains isolated from humans, cattle, sheep and food in Spain. *Research in Microbiology* 156, 793-806.
- Muehlherr, J.E., Zweifel, C., Corti, S., Blanco, J.E., Stephan, R., 2003. Microbiological quality of raw goat’s and ewe’s bulk-tank milk in Switzerland. *Journal of Dairy Science* 86, 3849-3856.
- Murphy, B.P., Murphy, M., Buckley, J.F., Gilroy, D., Rowe, T.M., McCleery, D., Fanning, S., 2005. In-line milk filter analysis: *Escherichia coli* O157 surveillance of milk production holdings. *International Journal of Hygiene and Environmental Health* 208, 407-413.
- Nielsen, E.M., Andersen, M.T., 2003. Detection and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* by automated 5’ nuclease PCR assay. *Journal of Clinical Microbiology* 41, 2884-2893.
- OMH, 2010 [Decree of the Ministry of Health on urgent measures on the production, distribution and retail of raw milk for human consumption] Proroga dell’ordinanza del Ministro del lavoro, della salute e delle politiche sociali 10 dicembre 2008, concernente: «Misure urgenti in materia di produzione, commercializzazione e vendita diretta di latte crudo per l’alimentazione umana» e integrazioni per la produzione di gelati in imprese registrate ai sensi del Regolamento (CE) n 852/2004. *Gazzetta Ufficiale* N. 11 del 15 Gennaio 2011.
- Orden, J.A., Cortés, C., Horcajo, P., De la Fuente, R., Blanco, J.E., Mora, A., Lopez C., Blanco, J., Contreras, A., Sanchez, A., Corrales, J.C., Dominguez-Bernal, G., 2008. A longitudinal study of verotoxin-producing *Escherichia coli* in two dairy goat herds. *Veterinary Microbiology* 132, 428-434.
- Orth, D., Grif, K., Dierich, M.P., Würzner, R., 2007. Variability in tellurite resistance and the *ter* gene cluster among Shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolated from humans, animals and food. *Research in microbiology* 158, 105-111.

- Paton, A.W., Paton, J.C., 1998. Detection and characterization of Shiga toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, enterohaemorrhagic *E. coli* *hlyA*, *rfbO111*, and *rfbO157*. *Journal of Clinical Microbiology* 36, 598-602.
- Pearce, M.C., Evans, J., McKendrick, I.J., Smith, A.W., Knight, H.I., Mellor, D.J., Woolhouse, M.E.J., Gunn, G.J., Low, J.C., 2006. Prevalence and virulence factors of *Escherichia coli* serogroup O26, O103, O111, and O145 shed by cattle in Scotland. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 653-659.
- 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.
- Posse, B., De Zutter, L., Heyndrickx, M., Herman, L., 2008. Quantitative isolation efficiency of O26, O103, O111, O145 and O157 STEC serotypes from artificially contaminated food and cattle faeces samples using a new isolation protocol. *Journal of Applied Microbiology* 105, 227-235.
- RER, 2008. Regione Emilia-Romagna. [Order of Regional Veterinary Public Health Authority concerning direct selling of raw milk from farmers to consumers] Determinazione del Responsabile del Servizio Veterinario e Igiene degli Alimenti 21 aprile 2008, n. 4418. Vendita diretta al consumatore di latte crudo vaccino, ovi-caprino, bufalino e asinino dell'azienda di produzione. Bollettino Ufficiale della Regione Emilia-Romagna numero 74 anno 2008
- Schroeder, C.M., Meng, J., Zhao, S., Deb Roy, C., Torcolini, J., Zhao, C., McDermott, P.F., Wagner, D.D., Walker, R.D., White, D.G., 2002. Antimicrobial resistance of *Escherichia coli* O26, O103, O111, O128, and O145 from animals and humans. *Emerging Infectious Diseases* 8, 1409-1414.
- Stephens, T.P., Loneragan, G.H., Thompson, T.W., Sridhara, A., Branham, L.A., Pitchiah, S., Brashears, M.M., 2007. Distribution of *Escherichia coli* O157 and *Salmonella* on hide surface, the oral cavity, and in feces of feedlot cattle. *Journal of Food Protection* 70, 1346-1349.
- Thomas, K.M., McCann, M.S., Collery, M.M., Logan, A., Whyte, P., McDowell, D.A., Duffy, G., 2012. Tracking verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157, O26, O111, O103 and O145 in Irish cattle. *International Journal of Food Microbiology* 153, 288-296.
- Todd, E. C. D., Szabo, R.A., MacKenzie, J. M., Martin, A., Rahn, K., Gyles, C., Gao, A., Alves, D., Yee, A. J., 1999. Application of a DNA hybridization-hydrophobic-grid membrane filter method for detection and isolation of Verotoxigenic *Escherichia coli*. *Applied and Environmental Microbiology* 65, 4775-4780.
- Tomoyasu, T. 1998. Improvement of the immunomagnetic separation method selective for *Escherichia coli* O157 strains. *Applied and Environmental Microbiology* 64, 376-382.
- Tozzi, A.E., Caprioli, A., Minelli, F., Gianviti, A., De Petris, L., Edefonti, A., Montini, G., Ferretti, A., De Palo, T., Gaido, M., Rizzoni, G. and the Hemolytic Uremic Syndrome Study Group, 2003. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections associated with hemolytic uremic syndrome, Italy, 1988-2000. *Emerging Infectious Diseases* 9, 106-108.
- Wieczorek, K., Osek, J., 2004. Development of a PCR internal amplification control for the detection of shiga toxin-producing *Escherichia coli*. *Bulletin Veterinary Institute Pulawy* 48, 397-401.
- Zadik, P.M., Chapman, P.A., Siddons, C.A., 1993. Use of tellurite for the selection of Verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157. *Journal of Medical Microbiology* 39, 155-158.

Table 1 - Results of screening an confirmatory tests to detect presumptive VTEC positive samples in raw bulk milk and milk filters

	Positive screening tests			Isolates confirmed				
	PCR	RT-PCR		O157		O26		VTEC other sero-groups
	VT	O157	O26	VTEC	EPEC ^a	VTEC	EPEC ^a	
Farms selling raw milk directly to consumers (N=31)								
Milk (N=74)	4/74(5%)	ND	1/4(25%) ^b	ND	ND	ND	1	ND
Filters (N=72)	17/72 (28%)	2/17 (12%) ^d	3/17 (18%) ^b	ND	1	1	1	3
Farms processing milk (N=161)								
	VT	VIDAS [®] O157						
Milk(N=177)	34/177(19%)	4/34(12%) ^b		ND	1	ND	2	ND
Filters (N=142)	51/142(36%)	21/51(41%) ^b		2	2	ND	2	1

^a*Escherichia coli* strains showing specific sequences of 'eae' gene;

^b percentages correspond to ratios between O157 or O26 and VT positive samples;

ND=not detected

Table 2 - Virulence of VTEC isolates

Origin of samples	Sample code	Sero-group	vtx1	vtx2	eae	hlyA	OI-122 ^a			
							sen	pagC	efalA	efalB
Farms selling raw milk directly to consumers										
Cow milk filters	P44	O26rha-	+	-	+	+	+	-	+	+
	B18	O26rha-	-	-	+	-	+	+	-	-
	B61	O157sor+	-	-	+	-	+	+	+	+
	B17	NA	+	+	+	-	+	+	-	-
	B20	NA	+	-	+	-	-	-	-	-
	B14	NA	-	+	-	-	-	-	-	-
Cow milk	B36	O26rha-	-	-	-	+	+	-	+	+
Farms selling raw milk to industry										
Cow milk filters	P108	O157sor-	+	+	+	+	+	+	+	+
	P99	O157sor-	-	+	+	-	+	+	+	+
	P141	O157sor-	-	-	+	+	+	+	+	+
	P105	NA	+	-	+	+	-	-	-	-
Cow milk	P141	O157 sor-	-	-	+	+	+	+	+	+

NA =not agglutinating

^a only isolates from farms selling raw milk directly to consumers were tested

Table 3 – Results of inter-laboratory ring test for validation of the PCR screening assay to detect verocytotoxin genes

Material Bacterial pellets from enrichment broths	real-time PCR		false negatives ^a	false positives ^a	Inter-laboratory agreement (Fleiss Kappa)	Range of diagnostic sensitivity	Range of diagnostic specificity
	Positives/positives in all labs	Negatives/negatives in all labs					
Filters (N=18)	11 ^b /10	7 ^c / 5	1 ^b	2 ^c	K=0.822; z=8.54; p=0	91-100%	86-100%
Milk (N=6)	0 ^d	6/ 3	ND ^d	3 ^c	K=0; z=0; p=1	NE ^d	83%

^a results that were not in agreement with qPCR gold standard test

^b one faint positive result showing Cycle threshold (C_T) between 33 and 35

^c two faint positive results showing $C_T > 35$

^d NE: Not Estimated. No positive sample detected by the reference method (qPCR)

“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.

*Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale- Alma Mater Studiorum
Università di Bologna*

* e-mail: giuseppe.delledonne2@unibo.it

SUMMARY: Lambda(λ)-phage vectors of gene codifying for synthesis of Shiga-toxins are suspected to be involved in the virulence evolution of Vero-Toxin producing *Escherichia coli*(VTEC). Herds of domestic or wild ruminants are reservoirs of these bacteria, but excretion with faeces is more frequent in groups of heifers and feeder calves. Studies have shown that slurries produced by infected herds are often positive for VTEC and that *Stx2* carrying lambda coliphages can be isolated. These viruses can induce lysogenic cycles only in some strain of *Escherichia coli* and the *Stx* gene is then integrated in the bacterial chromosome. When these bacteria also possess other virulence traits, like those responsible for the intimate attachment to the enteric mucosal cells (*eae* or *saa*) the recombinant strains might become pathogen for humans. Our research was aimed at detecting the coliphages from ten *Stx2* positive strains isolated in our previous studies. We have included strains, possessing or not the ‘*eae*’ genes. In addition we have used other isolates originating from slaughterhouses, with the aim of evaluating their susceptibility to the isolated λ -phages. Following induction of a lytic cycle with mitomycin C, the strains were screened by hybridization of plaque blots with *Stx2* probes. The purified extracts of eight of the ten strains produced plaque/halos of lysis in cultures of susceptible strains, thus showing these strains were infected by inducible phages, but only one proved to be *Stx2* carrier. Attempt to obtain new lysogens using the purified *Stx2* phage with other strains ‘*eae*’ positive and *STx* negative isolated from slaughterhouses were unsuccessful. *Stx2* lysogens were obtained only using the reference strains DM1187.

KEY WORDS: *Escherichia coli* Shiga-toxins producing (STEC), lambda(λ)-phage, Shiga-toxin type 2 (*stx2*).

INTRODUZIONE - La presenza di *Escherichia coli* produttori di Shiga-tossine è un problema emergente di sicurezza alimentare. Dati nazionali mostrano che l’infezione è presente in modo diffuso negli allevamenti di bovini da carne e da latte [1,2,3,4,5,6,7] e che i liquami degli allevamenti sono frequentemente positivi [8,9,10,11, 12]. Tra i fattori che hanno influito sull’evoluzione della virulenza 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*). Questi virus possono infettare alcuni ceppi di *Escherichia coli* inducendo un ciclo lisogeno ed integrando il gene *Stx2* nel genoma del batterio infettato. Se il ceppo ricombinante già possiede altri fattori di virulenza, tra cui alcuni geni responsabili dell’adesione batterica ai villi intestinali (geni *eae* o *saa*) questo accresce la sua virulenza ed il ceppo può divenire patogeno per l’uomo. L’impiego di taluni antibiotici, come pure l’esposizione a radiazioni UV è in grado d’indurre un ciclo litico con il rilascio di virus batteriofagi infettanti da parte di ceppi lisogeni. In campo il fenomeno della ricombinazione

genetica tra i diversi ceppi di *Escherichia coli* merita perciò attenzione in relazione alla necessità di trattare opportunamente i liquami, in modo da inattivare i batteriofagi, oltre che i ceppi virulenti di *Escherichia coli*.

MATERIALI E METODI - La presenza di colifagi è stata ricercata in 10 isolati *E. coli* *Stx2*-positivi provenienti da pelli di origine bovina e filtri di impianti di mungitura. A tal fine colture di arricchimento in Lauria Bertani broth in fase di crescita esponenziale sono state addizionate con Mitomicina C, incubate per 24 ore a 37°C in modo da indurre un ciclo litico. La purificazione del fago è stata fatta mediante passaggio su filtri con porosità di 0,22 µm, seguendo la procedura descritta da Muniesa [13,14]. La presenza di fagi è stata valutata mediante spot-test. Come substrato per valutare la lisi o la lisogenia sono stati impiegati due ceppi di riferimento (*Escherichia coli* DM1187 e WG5) e 5 ceppi *Stx2* negativi, ma *eae/saa* positivi isolati da campioni di pelle bovina.

Per confermare la presenza di *Stx2* nelle placche di lisi queste sono state trasferite mediante blotting su membrane di nylon e il DNA sottoposto ad estrazione alcalina è stato saggiato mediante ibridazione con sonde *Stx2* marcate con digossigenina. Per produrre le sonde è stata impiegata la procedura Dig Hig Prime Synthesis Kit II (Roche®) ed i primer *stx2*-LP43 (bp 57 to 78 of EDL933; 5'-ATCCTATTCCCGGGAGTTTACG-3'), and *stx2*-LP44 (bp 622 to 643 of EDL933; 5'-GCGTCATCGTATACACAGGAGC-3'). Le placche marcate sono state prelevate e sospese in 0,2 ml di diluente SM. Nel prelievo sono incluse anche le colonie batteriche cresciute alla periferia o all'interno delle placche. Questa sospensione è stata utilizzata in parte per estrarre il DNA fagico da analizzare mediante PCR [15] e in parte per prove di lisogenia con le colture *eae/saa* positive. Per purificare il DNA una parte della soluzione SM è stata trattata con cloroformio e sottoposta a centrifugazione per inattivare i batteri e recuperare il surnatante contenente la sospensione di fagi. Per le prove di lisogenia sono state utilizzate due procedure. La prima era volta a verificare se le colonie cresciute all'interno di placche di lisi erano lisogene. A tal fine parte della soluzione SM è stata seminata su piastra ed incubata a 37°C per 24 ore, quindi le colonie sono state saggiate mediante ibridazione. La seconda procedura era volta a valutare la capacità dei fagi provenienti dalle colture indotte con Mitomicina C di formare lisogeni se messi a contatto con altre colture suscettibili. A tal fine è stato utilizzato l'estratto fagico proveniente dal filtrato delle colture batteriche indotte e utilizzate diverse colture batteriche VT2 negative. Cinque erano *eae/saa* positive e di queste tre provenivano da ceppi isolati in campo (FV4028, FV4033, FV4996) due da ceppi di riferimento *Stx2* negativi (ED73 ed EDL 933). Sono stati impiegati anche altri due stipiti (*E. coli* DM1187 e *E. coli* WG5) suscettibili ad infezioni fagiche indicati nella procedura ISO10705-2 [16]. Le colture sono state messe a contatto con l'estratto fagico additivato con CaCl₂ ed incubate per 30 minuti a 37°C, seminate in superficie su LB agar ed incubate a 37°C per 24 ore. La patina batterica ottenuta è stata raccolta in 1 ml di tampone SM, sono state fatte diluizioni in base 10 e seminate in superficie su LB agar per avere piastre contenenti circa 100-150 UFC. Il riconoscimento delle colonie presunte lisogeni è valutata mediante la tecnica dell'ibridazione con sonde *stx2*. Le colonie presunte lisogene, per positività all'ibridazione, sono testate singolarmente mediante PCR [15].

RISULTATI - I risultati delle diverse prove sono riportati in tabella 1. Dei 10 ceppi *Stx2* positivi analizzati 8 hanno mostrato formazione di placche di lisi in almeno uno dei substrati culturali utilizzati. Solo un campione ha invece mostrato la formazione di placche positive al test d'ibridazione con le sonde *Stx2* (fago isolato dallo stipite P65). Le placche di lisi indotte da questo fago, peraltro, appaiono poco marcate ed evidenti. Solo a contatto con il ceppo DM1187 è stato possibile evidenziare la formazione di placche *Stx2* positive. Conferma della presenza del gene *Stx2* nell'estratto proveniente dalle placche di lisi è stata ottenuta mediante PCR (Figura 1). Le colonie batteriche presenti nelle aree di lisi, tuttavia, mostravano

all'analisi PCR risultati differenti, producendo un amplificato con frammenti di diverso peso rispetto al target *Stx2* (Figura 2). Risultati negativi sono stati ottenuti impiegando i 5 ceppi batterici *eae/saa* positivi.

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI - I risultati ottenuti dimostrano la presenza di batteriofagi litici in 8 dei 10 isolati *Stx2*-positivi analizzati. Questa positività è documentata dalla formazione di placche di lisi utilizzando diverse colture batteriche. Le differenze osservate nei diversi substrati colturali sono riconducibili al fatto che alcune infezioni fagiche creano lisogeni e non danno luogo ad un'infezione litica e che i diversi fagi non sono capaci d'infettare tutti i diversi substrati. La presenza del fago, inoltre, può non essere rilevata mediante osservazione di placche di lisi, ma richiedere l'osservazione di placche di lisogenia con colture sensibili, mediante test d'ibridazione. Ceppi che più facilmente permettono di osservare lisi sono quelli che hanno subito una mutazione del gene *recA* (*E. coli* K12 e DM1187). La mutazione *RecA* comporta l'inattivazione del sistema batterico di repressione del fago, per cui in seguito ad infezione fagica si attiva il ciclo litico con produzione di placche visibili [20]. Un altro ceppo molto sensibile all'infezione da colifagi è *Escherichia coli* WG5 che, è attualmente consigliato anche dal metodo ISO 10705-2, per il controllo di qualità delle acque [16]. Nel corso del nostro studio abbiamo potuto osservare che alcuni estratti fagici hanno prodotto placche di lisi con spot test soltanto su colonie di *Escherichia coli* collezionati in laboratorio e che presentavano fattori di virulenza quali il gene *eaeA*, *hlyA* o *stx1*, ma erano privi del gene *Stx2*, ma non nei ceppi di riferimento WG5 e DM1187. In particolare i fagi F 14-4, P55-b e P658 che hanno dato lisi, più o meno evidente con il ceppo FV4996 ed il fago P7C-c, F14-4, P55-b e P658 che ha dato lisi sul ceppo FV4028. Non tutti i fagi evidenziati mediante spot test sui nostri isolati hanno peraltro mostrato lisi sulle colture di riferimento DM1187 e WG5 o hanno mostrato una diversa intensità della lisi. L'unico fago che si è dimostrato veicolare la *Stx2* è quello proveniente dal ceppo *Escherichia coli* P65. E' da notare inoltre che il fago P65 ha prodotto una zona di lisi poco evidente in presenza del ceppo DM1187, ma chiaramente riconoscibile mediante blotting ed ibridazione. E' stato un risultato imprevedibile che tale fago abbia mostrato lisogenia proprio con un ceppo *recA*-mutante in quanto l'infezione fagica avrebbe dovuto attivare l'induzione di un ciclo litico. Il meccanismo attraverso cui i ceppi *recA*-mutanti attivano il ciclo litico sembra però dipendere dall'infezione di fagi λ [17,18]. L'induzione di un ciclo lisogeno nel nostro caso può essere spiegata perciò con due diversi meccanismi: il fatto che il P65 non sia una fago di tipo λ o la copresenza di più fagi all'interno del ceppo P65. Studi di alcuni autori hanno infatti dimostrato che l'integrazione di un nuovo fago in una coltura già infetta da altri fagi è possibile e questa potrebbe avvenire in punti del genoma in modo da non attivare i meccanismi di induzione del ciclo litico [19,20]. I lisogeni su DM 1187 con fago P65 da noi isolato sono risultati positivi al blotting con sonde, ma diversamente dal fago isolato le colonie presentavano amplificazione della sequenza genetica *stx2* difforme dal target e con frammentazione (Figura 2), dovuto ad integrazione fagica in un sito difforme da quello deputato [19,20].

Il fago P65 che con le tecniche utilizzate non si è dimostrato infettivo per i ceppi di campo e non ha perciò indotto lisogeni dotati di accresciuta virulenza. Questo fenomeno è in accordo con i risultati ottenuti in diversi lavori che dimostrano che batteriofagi isolati da ceppi di campo, in grado di provocare ciclo litico sui ceppi sensibili di laboratorio, non sempre sono in grado d'infettare ceppi selvaggi [13,14]. Che la ricombinazione genica non sia facilmente riproducibile è stato evidenziato in diversi lavori [20,21] i quali dimostrano che diversi stipiti di *Escherichia coli* hanno una differente sensibilità all'infezione ed all'induzione della lisogenia.

La percentuale di fagi *Stx2* positivi sul totale dei ceppi infettati da fagi è risultata pari al 12,5% (1/8) è in accordo con valori riportati in letteratura in cui il valore era pari al 18% [22]. Il valore rilevato può sottostimare il dato reale perché l'induzione di un ciclo litico richiede che vi sia una concentrazione sufficiente di fagi infettanti e che i ceppi utilizzati siano sensibili nei confronti del fago. E' stato osservato anche che, successivamente ad un ciclo litico, ci può essere un decadimento notevole dell'infettività del fago dovuta a ricombinazioni che provocano la perdita della capacità di clivaggio quando si attiva il sistema dell'SOS batterico, oppure ad un'integrazione molto forte con l'ospite che non consente al fago di sopravvivere all'esterno di questo anche per brevi periodi [23,24]. In conclusione, il nostro studio ci ha permesso di evidenziare la presenza di un fago lisogeno vettore del gene *Stx2*.

Tabella 2 Risultati ottenuti da induzione fagica. (*) valore medio di tre letture a λ 600 nm. () Indicazione della lisi secondo scala di visibilità ad occhio nudo (+)=poco visibile/distinguibile , (++)= parzialmente visibile (+++)= visibile e netta rispetto alla crescita circostante**

CEPPO	Induzione		Spot test ceppi referenza (**)		Spot Test su VTEC stx2 neg. (**)					Ibrid. Sonde stx2	Conferma PCR
	Mit C(*)	Controllo	E.coli DM 1187	E. coli WG5	FV 4033	FV 4996	FV 4028	EDL 933	ED 73		
P7C	0,52	2,043	-	-	-	-	++	-	-	-	
P65	0,497	1,56	+	++	-	-	-	-	-	+	+
P18C	0,519	0,84	++	++	-	+	+++	-	-	-	
P1846	0,581	0,88	+++	+++	-	++	+++	-	-	-	
F 14-1	0,466	1,439	-	-	-	-	-	-	-	-	
F 14-4	0,547	0,7	-	-	-	+++	+++	-	-	-	
F 7-3.18	0,455	0,653	+++	+++	-	+++	-	-	-	-	
P1476	0,604	0,803	+++	+++	-	++	++	-	-	-	
P55	0,348	0,978	-	-	-	++	+	-	-	-	
P658	0,477	0,695	-	-	-	+	++	-	-	-	

Figura 2 PCR DNA fagico ricavato da placca di lisi su coltura DM1187

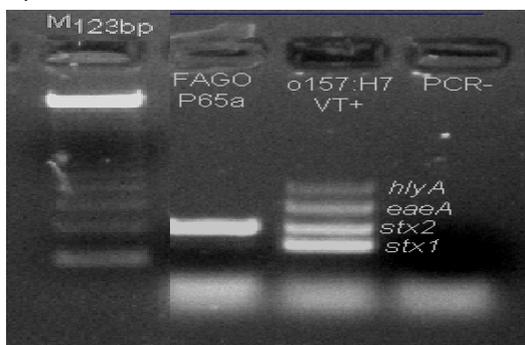


Figura 2: PCR da colonie lisogene stx2 del ceppo DM1187 infettate con fago P65



BIBLIOGRAFIA

- 1) Dambrosio A, Lorusso V, Quaglia NC, 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):218-22. Epub 2007 Aug 1
- 2) Alonso S, Mora A, Blanco M, Blanco JE, Dahbi G, Ferreira MT, López C, Alberghini L, Albonetti S, Echeita A, Trevisani M, Blanco (2007) Fecal carriage of *Escherichia coli* O157:H7 and carcass contamination in cattle at slaughter in northern Italy. *J. Int Microbiol.* Jun;10(2):109-16.
- 3) Bonardi S, Foni E, Chiapponi C, Salsi A, Brindani (2007) Detection of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* serogroups O157 and O26 in the cecal content and lymphatic tissue of cattle at slaughter in Italy. *F. J Food Prot.* 2007 Jun;70(6):1493-7.
- 4) 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):255-61.
- 5) 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. *R Lett Appl Microbiol.*;40(6):491-6.
- 6) Sisti M, Benedetti C, Lonzi A, Schiavano GF, Pianetti A, Romanini I, Bruscolini F. (2004) Isolation of *Escherichia coli* O157 from human and bovine faeces in the Urbino area, Italy. *Int J Hyg Environ Health.* ;207(6):577-83.
- 7) 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 1;96(1):67-73.
- 8) Czajkowska D, Boszczyk-Maleszak H, Sikorska IR, Sochaj A. (2008) Studies on the survival of enterohemorrhagic and environmental *Escherichia coli* strains in wastewater and in activated sludges from dairy sewage treatment plants. *Pol J Microbiol.*;57(2):165-71.
- 9) Selma MV, Allende A, López-Gálvez F, Elizaquível P, Aznar R, Gil MI (2007) Potential microbial risk factors related to soil amendments and irrigation water of potato crops. *J Appl Microbiol.*;103(6):2542-9
- 10) Williams AP, Avery LM, Killham K, Jones DL. (2007) Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in the rhizosphere of maize grown in waste-amended soil. *J Appl Microbiol.*;102(2):319-26.
- 11) Muniesa M, Jofre J, García-Aljaro C, Blanch AR. (2006) Occurrence of *Escherichia coli* O157:H7 and other enterohemorrhagic *Escherichia coli* in the environment. *Environ Sci Technol.*;40(23):7141-9. Review.
- 12) Burckhardt F, Heissenhuber A, Morlock G, Busch U, Schindler P, Fruth A, Ammon A, Wildner M. (2005) Risk factors for abundance of shiga toxin producing *Escherichia coli* in sewage water *Gesundheitswesen.*;67(12):858-61. German.
- 13) 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; 2004; *Microbiology*, 150, 2959–2971
- 14) Muniesa M., Lucena F., Jofre J.; (1999) Study of potential relationship between the morphology of infectious somatic coliphages and their persistence in the environment; 1999; *Journal of applied Microbiology*; 87,p.402-409
- 15) Paton A.W., Paton J.C. ; (1998) Detection and characterization of Shiga Toxigenic *Escherichia coli* by using multiplex PCR assays for *stx1*, *stx2*, *eaeA*, Enterohemorrhagic *E.coli hlyA*, *rfb_{O111}* and *rfb_{O157}*; 1998; *Journal of Clinical Microbiology*, feb. 1998 , p. 598-602
- 16) Anonymus (2000);ISO10705-2: Water quality. Detection and enumeration of bacteriophages –part2: Enumeration of somatic coliphages;International for Standardisation; Geneva
- 17) Mount D W. (1977) A mutant of *Escherichia coli* showing constitutive expression of the lysogenic induction and error-prone DNA repair pathways. *Proc Natl Acad Sci USA.*;74:300–304
- 18) Chloe E. James, Karen N. Stanley, Heather E. Allison, Harry J. Flint, Colin S. Stewart, Richard J. Sharp, Jon R. Saunders, and Alan J. McCarthy (2001) Lytic and Lysogenic

- Infection of Diverse *Escherichia coli* and *Shigella* Strains with a Verocytotoxigenic Bacteriophage Appl Environ Microbiol. 2001 September; 67(9): 4335–4337
- 19) García-Aljaro C., Muniesa M., Jofre J., and Blanch R. A.;(2009) Genotypic and Phenotypic Diversity among Induced, *stx2*-Carrying Bacteriophages from Environmental *Escherichia coli* Strains; Applied and environmental microbiology, p. 329–336
- 20) Serra-Moreno R., Jofre J., Muniesa M.; (2007) Insertion Site Occupancy by *stx2* Bacteriophages Depends on the Locus Availability of the Host Strain Chromosome, J Bacteriol.; 189(18): 6645–6654.
- 21) Muniesa M., Mocè-Llivina L., Katayama H., Jofre J.; (2003) Bacterial host stains that support replication of somatic coliphages; 2003; Antonie van Leeuwenhoek 83: p.305-315
- 22) Muniesa M., Jofre J.;(2004) Factors influencing the replication of somatic coliphages in the water environment; Antonie van Leeuwenhoek 86:p.65–76, 2004.
- 23) James C. E., Stanley K. N., Allison H. E., Flint H. J., Stewart C. S., Sharp R. J., Saunders J. R., McCarthy S. J.;(2001) Lytic and Lysogenic Infection of Diverse *Escherichia coli* and *Shigella* Strains with a Verocytotoxigenic Bacteriophage; 2001; Applied and environmental microbiology, p. 4335–4337
- 24) Muniesa M., Serra-Moreno R., Jofre J.;(2004) Free shiga-toxin bacteriophages isolated from sewage showed diversity although the *stx* gene appeared conserved; 2004; Environmental microbiology 6(7), p 716-725

Prove di lisogenia con virus batteriofagi vettori del gene *stx2* in ceppi Enteropatogeni di *Escherichia coli* isolati da alimenti

Delle Donne Giuseppe , Mancusi Rocco , Trevisani Marcello
Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale
Alma Mater Studiorum Università di Bologna
e-mail: giuseppe.delledonne2@unibo.it; rocco.mancusi2@unibo.it

Key words: *Escherichia coli* produttori di verocitotossine (VTEC), fago-lambda (λ), Shiga-tossina tipo 2 (*Stx2*).

Summary: Lambda(λ)-phages can be vector of gene codifying for synthesis of Shiga-toxins and are suspected to be involved in the virulence evolution of Vero-Toxin producing *Escherichia coli*. They can induce lysogenic cycles only in few strain of *Escherichia coli* that allow integration of sequences of phages in proximity of the *rho* bacterial gene. The integration of *Stx2* gene in enteropathogenic strains of *Escherichia coli*, which also have genes for the production of adhesion factors, give rise to new recombinant strains that can be pathogenic to humans. Our research was aimed at verify if enteropathogenic strains of *Escherichia coli* O157 or O26 isolated from milk, who were *eae* positive, but *Stx* negative, can be lysogenized by *Stx2* phages.

Introduzione: La presenza di *Escherichia coli* produttori di Shiga-tossine è un problema emergente di sicurezza alimentare. Dati nazionali mostrano che l'infezione è presente in modo diffuso negli allevamenti di bovini da carne e da latte (1,2,3,4,5). 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 infatti infettare alcuni ceppi di *Escherichia coli*, inducendo un ciclo lisogeno ed integrando il gene che codifica la produzione di verocitotossina nel genoma. Se il ceppo ricombinante è un *Escherichia coli* enteropatogeno, cioè già possiede i geni *eae* o *saa* che codificano le intimitine responsabili dell'adesione batterica ai villi intestinali, l'acquisizione della capacità di produrre verocitotossina rende il ceppo estremamente pericoloso per l'uomo, con l'eccezione di alcune varianti (*Stx2e* ed *Stx2f*) per le quali nella specie umana non ci sono i recettori cellulari. E' possibile isolare dalla carne e dal latte bovino ceppi enteropatogeni dei sierotipi O157 e O26 che si dimostrano non verocitotossici (5). La presente ricerca mira a verificare se questi ceppi non verocitotossici possono 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 se questo comporta che il ceppo acquisisce la capacità di produrre verocitotossine. A questo fine lo studio mira la verificare se l'integrazione del gene *Stx2* nei ceppi lisogeni avviene nella regione prossima al gene *rho*, poiché recenti studi (6, 10) mostrano che solo se integrato in tale regione il gene *Stx2* viene espresso e dà luogo alla produzione della tossina.

Materiali e metodi: 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 (6) e come ceppi ospiti stipiti di *Escherichia coli* isolati da filtri di due diversi impianti di mungitura del latte. I ceppi erano stati isolati impiegando le procedure definite dalle linee guida EFSA (7) e risultavano essere del sierotipo O157 e del sierotipo O26 (Tabella 1). In entrambe i ceppi era stata riscontrata la presenza del gene codificante *Stx2*, oltre che dell'intimina (*eae*), ma nei successivi passaggi le colonie mostravano di aver perso il gene *Stx2*. I ceppi sono stati analizzati per evidenziare la presenza dei geni caratterizzanti dell'isola di patogenicità O1-122 (8). La lisogenia è stata studiata applicando la procedura descritta da Muniesa et al. (6) ma il riconoscimento dei ceppi *Stx2* lisogeni è stata fatta mediante isolamento su un terreno contenente cloramfenicolo dopo aver ricombinato il fago come descritto da Serra Moreno et al. (9) e in particolare ricombinando il fago *Stx2* mediante inserimento del gene di resistenza al cloramfenicolo (fago ϕ *stx2-ΔCm*). In tal modo le colonie lisogene, oltre ad integrare il gene *Stx2*, sono resistenti all'antibiotico e possono essere facilmente isolate su terreni selettivi, senza ricorrere a tecniche d'ibridazione. Cinque colonie cloramfenicolo-resistenti per ciascun ceppo lisogeno sono poi state 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. Infine si verifica che la lisogenia si mantenga nel tempo, ripetendo per tre volte il trapianto delle colonie cloramfenicolo-resistenti su terreno LB agar contenente cloramfenicolo ($10 \mu\text{g L}^{-1}$). Viene valutata la capacità di produzione della Shigatossina mediante l'utilizzo del kit ELISA Premier EHEC (Meridian Bioscience).

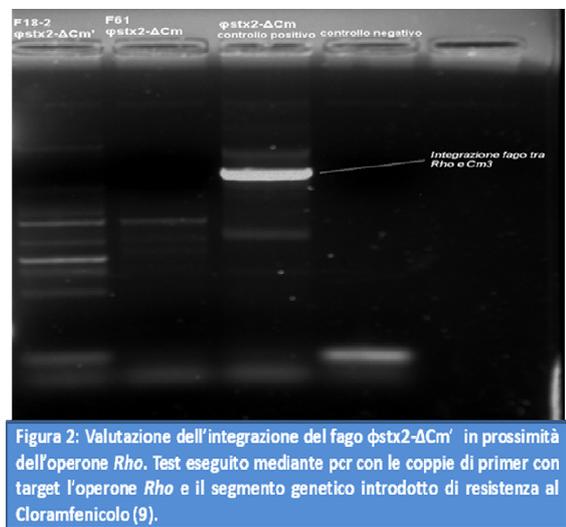
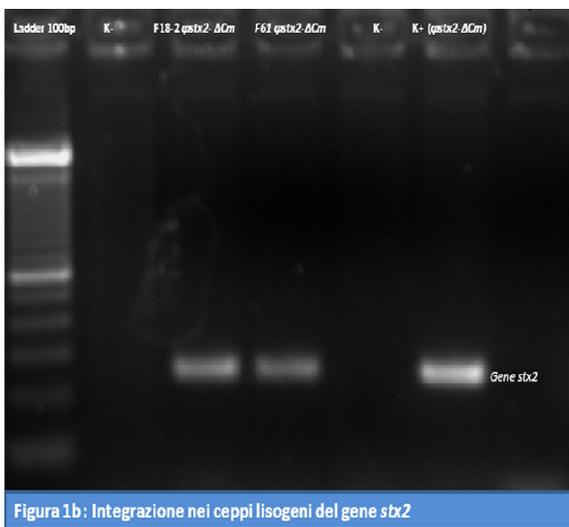
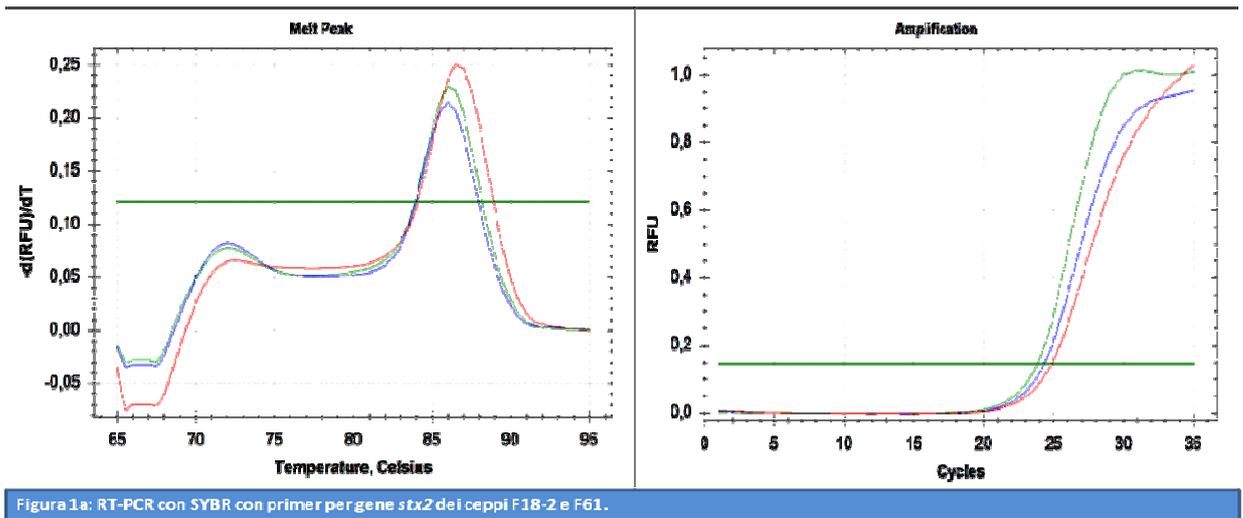
Risultati: Da entrambi i ceppi ospite di *Escherichia coli* isolati dai filtri di latte è stato possibile ottenere lisogeni *Stx2* positivi, ma delle 5 colonie analizzate per ciascun ceppo solo una (20%) ha mantenuto questo gene in modo stabile, dopo i tre passaggi culturali. In entrambe i ceppi lisogeni stabili è stato confermato che l'integrazione era avvenuta (figura 1a e 1b), 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 (figura 2). Entrambi i ceppi analizzati sono risultati negativi al test ELISA per la produzione della shigatossina. Nella Tabella 1 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*.

Discussione: 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 ' ϕ *stx2-ΔCm*' può essere stabile. L'integrazione del gene fagico non è avvenuta però in prossimità del segmento genico *rho* dei batteri ospiti. 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 (10).

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*. E' questo un aspetto su cui indagare ed è di fondamentale importanza confermare che il ceppo *Stx2* positivo ricombinante sia effettivamente in grado di produrre verocitotossina, mentre per quanto riguarda le analisi delle matrici animali ed alimentari è importante verificare che i ceppi VTEC isolati mantengono in modo stabile il gene *Stx2*.

Bibliografia :

1. Dambrosio A, Lorusso V, Quaglia NC, 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):218-22. Epub 2007 Aug 1
2. Alonso S, Mora A, Blanco M, Blanco JE, Dahbi G, Ferreira MT, López C, Alberghini L, Albonetti S, Echeita A, Trevisani M, Blanco (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.
3. 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):255-61.
4. 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. R Lett Appl Microbiol.;40(6):491-6.
5. 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 1;96(1):67-73.
6. 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; 2004;Microbiology, 150, 2959–2971
7. EFSA 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
8. Karmali MA, Mascarenhas M, Shen S, Ziebell K, Johnson S, Reid-Smith R, Isaac-Renton J, Clark C, Rahn K, Kaper JB. (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.
9. Serra-Moreno R, Acosta S, Hernalsteens JP, Jofre J, Muniesa M. (2006) Use of the lambda Red recombinase system to produce recombinant prophages carrying antibiotic resistance genes BMC Mol Biol. 2006 Sep 19;7:31.
10. Ruth Serra-Moreno, Juan Jofre, and Maite Muniesa (2007) Insertion Site Occupancy by *stx2* Bacteriophages Depends on the Locus Availability of the Host Strain Chromosome Journal Of Bacteriology, Sept.2007,p.6645–6654



NOME CEPPO	ANALISI PCR				
	Sierotipo	Gene <i>Sen</i>	Gene <i>PagC</i>	Gene <i>efalA</i>	Gene <i>efalB</i>
F61	O157	presente	presente	presente	presente
F18-2	O26	presente	presente	assente	assente

Tabella 1: Analisi PCR dell'isola di patogenicità OI-122 secondo Karmali et al. 2003

PUBBLICAZIONI INERENTI AD ALTRE ATTIVITA' DI RICERCA

La presenza di istamina all'interno dei prodotti di origine ittica rappresenta un problema per la salute del consumatore. L'istamina è una amina biogena prodotta mediante decarbossilazione a partire dall'istidina, di cui alcuni pesci sono particolarmente ricchi, mediante una decarbossilasi. L'attività dell'enzima è favorita dalle alte temperature a cui i pesci che subiscono un abuso termico possono essere sottoposti. Diversi pesci sono stati coinvolti nell'insorgenza di focolai alimentari provocati da istamina come sarde, acciughe, pesce spada, sgombri e tonni. I sintomi principali insorgono nell'arco di tempo compreso tra 10 minuti ed 1 ora dopo l'assunzione dell'alimento contaminato e sono caratterizzati da: sapore metallico, torpore, mal di testa, arrossamento, vertigini, difficoltà alla deglutizione e altri sintomi meno specifici come nausea, vomito, crampi addominali e diarrea (Hungerford, 2010; Lehane et al., 2000; Taylor, 1986).

Il legislatore prevede dei limiti precisi circa la presenza di istamina nei prodotti ittici e segnala particolari famiglie di pesci quelle principalmente a rischio da contaminazioni da istamina (Reg. UE 1441/2007).

I principali batteri responsabili della decarbossilazione dell'istidina nel pesce appartengono alla famiglie delle *Enterobacteriaceae* ed al genere *Photobacterium* (famiglia *Vibrionaceae*) (Lehane et al., 2000).

La valutazione della presenza di istamina e soprattutto la comprensione di quali specie batteriche sono presenti nei pesci pescati nell'adriatico ci ha spinti ad approfondire questa tematica. Al fine di ottenere dati che facessero maggiore una maggiore luce per effettuare una approfondita analisi del rischio relativa a questa problematica abbiamo affrontato anche questa tematica.

Presenza d'istamina nei prodotti ittici in commercio / Occurrence of histamine in fish products on market

Mancusi R., Bini R.M., Cecchini M., Delle Donne G., Rosmini R., Trevisani M.

Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie - Università di Bologna

SUMMARY - Histamine fish poisoning is quite common and occur in consequence of microbial decarboxylase whose activity begin early in the post-mortem but are triggered in consequence of abuse in the shelf life of fish products. In this study forty-eight samples of tuna, mackerel, anchovies, sardines, fresh or processed were sampled from fish shops and supermarkets in the City of Bologna in the period from January to July 2010. Concentration of histamine was assessed using ELISA quantitative test and presence of psicrotrophic histamine forming bacteria was searched using a modified Niven agar medium which allow detection of suspect colonies that were confirmed by PCR for detecting the presence of the histidine decarboxylase genes in their DNA. The positive colonies were then identified on the basis of their morphology, Gram reaction and biochemical characteristics with API20E. The differential capability of the Niven agar was found to be low and approximately one fifth of the suspect colonies were confirmed by the PCR test, which however included both strong and weak histamine producing strains. The presence of *Morganella morganii* was associated with concentration of histamine $460 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ above the allowed limit in a sample of tuna sampled from a fish shop. The same bacterium was found in samples of Atlantic horse mackerel (*Trachurus trachurus*). High histamine concentration (between 258 and $> 300 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) were observed in salted European pilchard and European anchovy ($228 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) sold loose in supermarkets. Because temperature abuse could occur when Tuna (fresh/defrozen) are hold on chopping board to sell fresh cuts and during shelf life of salted pilchard and pickled anchovies held in opened cans in chilled display cabinets for extended period, which might results in very high histamine concentration, controls on time and temperature at the retail, in addition to those done during the harvest and processing are needed. The studies aiming at quantitatively assess the prevalence and number of histamine producing bacteria in fish products that were not involved in histamine poisoning cases and/or do not show high level of histamine are rather complex, requiring many tests for confirming the histamine forming ability of the suspect isolated strains and further studies are needed to develop techniques for enumerating the histamine producing bacteria.

KEY WORDS: histamine, histidine decarboxylase, fish poisoning, shelf life, *Morganella morganii*

INTRODUZIONE - L'intossicazione da istamina è una malattia di origine alimentare che si manifesta con eruzioni cutanee, arrossamenti, sudorazione, sensazione di bruciore in bocca, talvolta con nausea, vomito, diarrea, bruciore di stomaco, mal di testa, formicolio, gonfiore, giramenti di testa e più raramente con sintomi nervosi e shock anafilattico. Le manifestazioni sono correlate alla elevata concentrazione d'istamina che si accumula quando le carni sono contaminate da batteri produttori di istidino-decarbossilasi, raggiungendo concentrazioni tossiche rilevanti in alcune specie ittiche nelle cui carni la concentrazione d'istidina libera è maggiore (1,2,3). La quantità tossica dipende dalla sensibilità individuale dei consumatori ed è favorita dalla presenza di altre amine (putrescina, cadaverina, spermina e spermidina)

prodotte in conseguenza di fenomeni alterativi. La sensibilità dei consumatori è maggiore e la sindrome si manifesta a concentrazioni più basse d'istamina quando l'attività delle amino-ossidasi epatica ed intestinale è inibita in conseguenza dell'assunzione di taluni farmaci (es. antidepressivi) o c'è un sovraccarico di questi meccanismi di detossificazione in conseguenza di eccessiva assunzione di bevande alcoliche (1,2,4). I principali batteri capaci di decarbossilare l'istidina in prodotti ittici sono Gram negativi delle famiglie *Enterobacteriaceae* e i batteri del genere *Photobacterium* (Famiglia *Vibrionaceae*) (2). Nei pesci e in crostacei pescati in acque medio-profonde e superficiali sono predominanti le *Enterobacteriaceae* psicrotrofe, capaci di sviluppare a temperature di refrigerazione, mentre in pesci di specie bentoniche sono particolarmente importanti i batteri del genere *Photobacterium*. L'istamina si accumula nelle carni un quantità tossiche prima che si manifestino alterazioni e l'accumulo è favorito dalle temperature più alte (2). La cottura del pesce non la inattiva e neppure la sterilizzazione utilizzata per la produzione di conserve ittiche. Se i pesci sono sottoposti a maturazione enzimatica in salamoia lo sviluppo di alcune specie produttrici istidino-decarbossilasi non è inibito e si può osservare un maggiore accumulo d'istamina, che è anche favorito dall'azione delle catepsine muscolari del pesce che portano alla formazione di aminoacidi liberi, tra cui l'istidina, che viene degradata dalle decarbossilasi batteriche (5). La quantità massima ammessa nei prodotti ittici, i metodi di analisi ed i piani di campionamento sono definiti dal regolamento (CE) 1441/2007(6). I limiti, m (i valori inferiori sono giudicati soddisfacenti) ed M (i valori superiori sono giudicati inaccettabili) sono applicabili ai prodotti ittici immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità, perciò l'attuazione della norma dovrebbe prevedere una valutazione del rischio relativo all'accumulo d'istamina durante le fasi della distribuzione e vendita, quando il prodotto non è sotto il diretto controllo del produttore. Come previsto dal legislatore, il rischio riguarda in modo particolare i pesci delle famiglie *Scombridae*, *Clupeidae*, *Engraulidae*, *Coryfenidae*, *Pomatomidae*, *Scombresosidae* e nel caso di prodotti in salamoia, che hanno subito un 'trattamento di maturazione enzimatica' i limiti ammissibili d'istamina sono raddoppiati (6). Il presente lavoro ha avuto lo scopo d'indagare sui livelli di contaminazione di pesci e semiconserve ittiche presenti sul mercato e in una seconda fase caratterizzare, in alcuni campioni, la flora microbica responsabile della produzione d'istamina.

MATERIALI E METODI - Nel periodo gennaio-luglio 2010 sono stati acquistati sul mercato pesci e prodotti ittici rappresentativi di tipologie considerate 'a rischio' e in modo particolare prodotti venduti a trancio e conserve sotto sale vendute sfuse perché maggiormente esposte ad abusi di temperatura. Complessivamente sono stati presi 46 campioni da 6 supermercati, 5 pescherie, 2 spacci alimentari e 1 mensa. Questi sono stati trasportati in laboratorio in borse frigorifero e processati nel giro di 6 ore al massimo dall'acquisto. Tutti e 46 i campioni sono stati sottoposti al saggio immunoenzimatico ELISA e 17 di questi, prelevati nel periodo estivo, sono stati sottoposti ad analisi microbiologiche per l'individuazione di batteri istamino-produttori (Tabella 1). Le analisi sono state fatte utilizzando un saggio enzimatico quantitativo di tipo competitivo (Histamine Elisa Kit, Tecna®, Trieste) seguendo le istruzioni del produttore. I campioni in tranci o filetti ed i pesci freschi di piccole dimensioni, decapitati ed eviscerati, sono stati analizzati interamente, di quelli più dimensioni più grandi (sgombri, suri, aringhe affumicate) è stata presa per le analisi la parte mediale prossima alla cavità addominale. I campioni prelevati in modo asettico sono stati finemente sminuzzati ed omogeneizzati. Due grammi di omogenato sono stati diluiti con 18 ml di acido tricloroacetico (TCA) 10% e l'estrazione dell'istamina in soluzione TCA è stata fatta agitando la sospensione su vortex. Gli estratti filtrati sono stati quindi congelati in attesa di completare le analisi. Per eseguire il test immunoenzimatico gli estratti devono essere diluiti con HCl 0,1 M in funzione della concentrazione attesa d'istamina, stimando una concentrazione compresa tra 10 e 300 mg·kg⁻¹ (ppm) è stata utilizzata una diluizione 1:250.

Per le analisi microbiologiche sono stati prelevati in modo asettico dalla superficie dei tranci di tonno e dai pesci freschi (sgombro e suri) 20 cm² di tessuto muscolare. I campioni di sgombro e suro fresco sono stati perciò prima spellati. Da filetti di pesce e pesci di piccole dimensioni (alici e sardine) parti superficiali dei campioni di sgombro, suro, aringhe e tranci di tonno sono stati prelevati 10 g di prodotto. Dopo aver pesato ed omogeneizzato i campioni in PBS (diluizione 1:10) sono state fatte diluizioni seriali, per poi seminarne 1 ml, per inclusione, in terreno di Niven modificato (7,8) ed incubato a 32°C. Laddove presenti, fino ad un massimo di 5 colonie isolate tipiche per ciascun campione, di color violaceo sono state prelevate e strisciate su TSA. Il DNA delle colonie in purezza è stato estratto mediante ebollizione (per 5 minuti) in 1 ml di acqua sterile priva di DNasi. La per la ricerca del gene HDC (istidina-decarbossilasi) è stata fatta impiegando 20 microlitri di miscela di reazione SSOFastTM EvaGreen^R Supermix (BioRad, Hercules CA, US) contenente 10 ng di template DNA ed i primers 106 (5'-AAYTCNTTYGAYTTYGARAARGARG) e 107 (5'-ATNGGNGANCCDATCATYTTRTGNC) che amplificano un frammento del gene *hdc* con dimensione di 534-bp comune a batteri Gram negativi, compresi i generi *Raoultella*, *Morganella*, *Pseudomonas* e *Photobacterium* (9). I cicli di amplificazione sono stati fatti a : 95°C per 30 sec, 52°C per 30 sec e 72°C per 2 min per 30 cicli, preceduti da uno step iniziale a 95°C per 10 min e seguiti da uno step finale di estensione a 72°C per 10 min. I prodotti di amplificazione sono stati esaminati con elettroforesi in gel di agarosio 1,5% dopo colorazione con etidio bromuro. Le colonie positive allo screening PCR sono poi sottoposte ad API 20E (Biomérieux[®]) per il riconoscimento di specie.

RISULTATI - I risultati riguardanti il test ELISA, la specie e la provenienza del prodotto sono schematizzati in Tabella 1.

Tabella 1: Tipologia e luogo di acquisto dei prodotti ittici campionati e risultati del test immunoenzimatico per la quantificazione dell'istamina (ELISA)

SPECIE	TIPO PRODOTTO	LUOGO ACQUISTO	N	M	ISTAMINA (mg·kg ⁻¹)
Tonno rosso <i>Thunnus thynnus</i>	trancio congelato	supermercato	1		33
	sashimi decongelato	supermercato	1		<10
Tonno a pinne gialle <i>Thunnus albacares</i>	trancio fresco	supermercati	3		da <10 a 46
	trancio fresco	pescherie	4	2	da 12 a 460
	trancio congelato	supermercato	1		<10
	sott'olio sfuso	supermercati	3	2	da <10 a 32
	insalata di tonno	mensa	2	1	da <10 a 23
Tonno alletterato <i>Euthynnus alletteratus</i>	trancio fresco	supermercato	1		19
Sgombro <i>Scomber scombrus</i>	fresco	supermercato	1		<10
	fresco	pescherie	4	3	da <10 a 12
	filetti freschi	supermercato	1		<10
	filetti sottolio sfusi	supermercato	1		28
	filetti grigliati sfusi	supermercato	1	1	11
	filetti marinati sfusi	supermercati	2		<10
Acciuga/alice <i>Engraulis encrasicolus</i>	sottosale sfuse	supermercati	2		da 11 a 30
	sottosale sfuse	alimentari	1		<10
	salsa verde sfuse	supermercato	1	1	26
	salate piccanti sfuse	supermercato	1		<10
	salate piccanti sfuse	supermercato	1		156
	filetti marinati sfusi	supermercati	2	1	da 21 a 228
	fresche	supermercato	1		29
fresche	pescheria	1	1	15	
Aringhe <i>Clupea harengus</i>	filetti freschi	supermercati	2		<10
	filetti marinati sfusi	supermercati	2	2	da 16 a 20
	intera affumicata	supermercato	1		58
Sardina <i>Sardina pilchardus</i>	sottosale sfuse	supermercato	1		>300
	sottosale sfuse	alimentari	1		258
	fresche	pescheria	1	1	<10
	fresche	supermercato	1	1	11
Suro <i>Trachurus trachurus</i>	fresco	pescheria	1	1	13
	fresco	supermercato	1		<10
Totale			47	17	

Legenda: N= numero campioni; M= esaminati microbiologicamente

In un solo campione, tonno fresco venduto in tranci presso un mercato rionale, è stato raggiunto un valore pari 460 mg·kg⁻¹ superiore al limite di legge 'M', in un altro campione di tonno fresco è stato rilevato un valore pari a 117 mg·kg⁻¹. Valori rilevanti, compresi tra 200 e 400 mg·kg⁻¹ sono stati osservati in sardine sotto sale vendute sfuse. In un caso il valore non è stato definito (> 300 mg·kg⁻¹) in quanto non è stato possibile ripetere l'analisi con una maggiore diluizione. Anche nei filetti di acciughe marinate, per le quali, in vero, il processo di maturazione enzimatica è più limitato, sono stati rilevati valori pari a 228 mg·kg⁻¹. Di questi campioni con valori d'istamina elevati, solo il primo è stato preso nel periodo estivo e pertanto sottoposto agli esami microbiologici. In questo caso è stata individuata la presenza di

colonie istidino-decarbossilasi positive (test PCR) ascrivibili alla specie *Morganella morganii*.

Gli esami microbiologici mostrano che da 9 campioni dei 17 analizzati (Tabella 1) state colonie sospette sul terreno di Niven ma solo in tre è stata confermata la presenza di colonie positive al test PCR per il gene HDC (responsabile della produzione di istidino-decarbossilasi). In questi tre campioni è stata evidenziata la presenza di *Morganella morganii* in due casi e di *Pseudomonas fluorescens* in un caso. Due colonie positive al test PCR isolate da un campione di tonno non sono state identificabili con il kit API20E.

Tabella 2: Risultati esami microbiologici colturali (positività terreno Niven), molecolari (presenza HDC) e identificazione biochimica di specie

Prodotto	Campioni con colonie sospette	Campioni positivi test PCR	Specie API20E
Trancio tonno fresco (P)	2	1	<i>Morganella morganii</i> (8 colonie) non identificate (2 colonie)
Sardine fresche (P)	1	1	<i>Pseudomonas fluorescens</i>
Suro fresco (P)	1	1	<i>Morganella morganii</i>
Sgombro fresco (P)	3	0	n.e.
Insalata di tonno (M)	1	0	n.e.
Acciughe fresche (P)	1	0	n.e.

Leggenda: NE = non eseguita; P=acquistato in pescheria; M= prelevato i mensa

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI - I risultati indicano che un solo prodotto su 47 presentava valori di istamina superiori al limite di accettabilità (M). Il campione era un trancio di tonno fresco (*Thunnus albacares*) venduto come taglio fresco presso una pescheria. Questo tipo di vendita è fatto mantenendo a lungo il pesce su un tagliere e non in frigo, con periodi di abuso termico e soprattutto se il prodotto è tenuto in vendita per diversi giorni l'accumulo d'istamina può aumentare, particolarmente in presenza di specie HDC quali *Morganella morganii*. Altri tre campioni, due di sardine sottosale ed uno di alici marinate, venduti sfusi al banco (pescheria o supermercato) presentavano valori compresi tra 200 mg·kg⁻¹ e 400 mg·kg⁻¹. Trattandosi di prodotti sottoposti ad un periodo di maturazione enzimatica nel corso del processo produttivo, tali valori rientrano nell'intervallo 'm' ed 'M' definito dal Regolamento 1441/2007 (6). In un caso non siamo sicuri che il valore fosse effettivamente inferiore ad 'M' poiché il valore è stato superiore al limite di determinazione (300 mg·kg⁻¹) rilevabile impiegando la diluizione 1:250. Si tratta di livelli d'istamina elevati che, seppure in un numero limitato di campioni, indicano a nostro giudizio che è alta la frequenza con la quale sardine e alici sotto sale o marinate, vendute sfuse presentavano valori che rientrano in una classe marginale di accettabilità. Va specificato che non è possibile attribuire un giudizio di merito sul lotto (le scatole erano già aperte ed il campionamento non prevedeva il prelievo di 9 unità campionarie) e quindi sulle cause, ma non possiamo non considerare l'importanza della valutazione del termine di commercializzazione e del controllo della temperatura nella fase di esposizione per la vendita di semiconservate per la vendita frazionata. Per quanto riguarda l'isolamento di colonie di ceppi istamino-produttori abbiamo rilevato che il terreno colturale di Niven ha una bassa specificità e solo in 3 dei campioni con colonie sospette è stato possibile individuare la presenza del gene HDC e la presenza di numerose colonie sospette

non è necessariamente indicativa della presenza di specie produttrici d'istamina, come peraltro è stato riferito da altri autori (10,11). che indicano un tasso di falsi positivi molto alto oltre il 50%, come anche noi abbiamo riscontrato. La bassa capacità discriminante è dovuta al fatto che il riconoscimento delle colonie è connesso alla alcalinizzazione del terreno causata della decarbossilazione dell'istidina, che i batteri HDC utilizzano come fonte di energia in un terreno privo di carboidrati, ma anche altre specie possono causare, nell'arco di 48 ore, il viraggio di colore del terreno conseguente alla produzione di composti basici quali l'ammoniaca. Seppur con numeri limitati questa ricerca ha permesso l'isolamento in prodotti in commercio di specie batteriche, quali *Morganella morganii*, considerate tra i principali produttori di istamina nel pesce (2). Mentre in un caso (campione di tonno in trancio) la presenza di *Morganella* era concomitante con la presenza di valori molto alti d'istamina (460 mg·kg⁻¹) in un altro (suro) il campione aveva livelli di istamina molto bassi. La gestione della catena del freddo, è più complessa per pesci di grandi dimensioni venduti con taglio fresco. Una valutazione quantitativa dei batteri produttori d'istamina non può essere fatta mediante il conteggio delle colonie sospette su terreno di Niven ed anche il ricorso alla PCR per il saggio delle colonie sospette non discrimina immediatamente i ceppi forti produttori d'istamina per cui sono in atto studi finalizzati a individuare test e marker più specifici. Vanno discriminate ad esempio specie HDC positive, quali *Pseudomonas fluorescens*, attraverso l'impiego di terreni selettivi e test biochimici. Non va trascurato a tal riguardo che batteri Gram- non identificabili con il kit API20E, quali *Photobacterium phosphoreum*, sono stati implicati in focolai d'intossicazione da istamina e dovrebbero essere ricercati, particolarmente nelle specie ittiche bentoniche con le quali sarebbero maggiormente associate.

BIBLIOGRAFIA

1. Hungerford J. M. , “Scombroid poisoning: a review”, *Toxicon*, vol. 56, agosto 2010, pp. 231-243.
2. Lehane L. , Olley J. , “Histamine fish poisoning revisited”, *Int. J. Food Microbiol.*, n. 58, 2000, pp. 1–37.
3. Ijomah P. , Clifford M. N. , Walker R. , Wright J. , Hardy R. , Murray C. K. , “Further volunteer studies on scombrototoxicosis” In: *Burt, J.R., Hardy, R., Whittle, K.J. (Eds.), Pelagic Fish: The Resource and its Exploitation. Fishing News Books, Oxford, 1992, pp. 194–199.*
4. Taylor S. L. , “Histamine food poisoning: toxicology and clinical aspects”, *Crit. Rev. Toxicol.*, n. 17, 1986, pp. 91–128.
5. Giuffrida A. , Panebianco A. , “Prodotti ittici e istamina”, *Igiene e tecnologie degli alimenti di origine animale*, a cura di Colavita G. , Le Point Vétérinaire Italie, Milano, cap. 8, par.8.2.4, 2008, pp. 280-281
6. Regolamento CE 1441/2007 del 5 Dicembre 2007 “che modifica il Regolamento CE 2073/2005 sui criteri microbiologici applicati ai prodotti alimentari”, Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea numero 322 del 07/12/2007
7. Mavromatis P. , Quantick P. C. , “Modification of Niven’s medium for the enumeration of histamine-forming bacteria and discussion of the parameters associated with its use”, *J. Food Prot.*, n. 65, 2002, pp. 546–551.
8. Niven C.F. Jr, Jeffrey M.B., Corlett D.A. Jr, “Differential plating medium for quantitative detection of histamine-producing bacteria”, *Appl Environ Microbiol.*, n. 41, gennaio 1981, pp. 321–322.

9. De las Rivas B. , Marcobal A. , Muñoz R. 2005. “Improved multiplex-PCR method for the simultaneous detection of food bacteria producing biogenic amines”, *FEMS Microbiol. Lett.*, n.244, 2005, pp. 367-372.
10. Lopez-Sabater E. I. , Rodriguez-Jerez J. J. , Hernandez-Herrero M. , Mora-Ventura M. A. T., “Evaluation of histidine decarboxylase activity of bacteria isolated from sardine (*Sardina pilchardus*) by an enzymatic method”, *Lett. Appl. Microbiol.* n. 19, 1994, pp. 70–75.
11. Tsai Y. , Kung H. , Lee T. , Lin G. , Hwank D. , “Histamine-Related Hygienic Qualities and Bacteria Found in Popular Commercial Scombroid Fish Fillets in Taiwan”, Department of Food Science and Technology, Tajen Institute of Technology, Pingtung, Taiwan, Republic of China; and 2Department of Food Science, National Taiwan Ocean University, Keelung, Taiwan, Republic of China, February 2003.

Histamine-forming bacteria on fish. Evaluation and identification of histamine – forming bacteria on fish products of middle Adriatic Sea / Rilievo ed identificazione di batteri produttori d'istamina in prodotti della pesca del medio Adriatico

Costanza Claudia¹, Cecchini Matilde¹, Mancusi Rocco¹, Mosso Alcide², Giani Gabriele³,
Rosmini Roberto¹, Trevisani Marcello^{1*}

*Corresponding author. Tel.: (+39) 51 2097330; Fax.: (+39) 51 2097346.

E-mail: marcello.trevisani@unibo.it

¹Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università degli Studi di Bologna, Alma Mater Studiorum, via Tolara di Sopra 50, 40064 Ozzano Emilia, Italia

²Veterinario dirigente, Dipartimento di Sanità Pubblica AUSL Ferrara, Servizio Veterinario, via Borgoleoni, 128, Ferrara, Italia.

³Veterinario dirigente, Dipartimento di Sanità Pubblica AUSL Imola, Servizio Veterinario, Viale Amendola, 8, Imola, Italia.

Abstract

Regulation EU 2073/2005 defines the parameters of acceptable concentration of histamine in fishery products, defining the limits, set at 100 mg / kg 'm' with a tolerance of up to 200 mg / kg 'M' in no more than 2 sampling units (N = 9) in fresh products. To meet these criteria manufacturers must define performance objectives, such as the maximum tolerable concentration at relevant stages of production. In order to fulfill these criteria, they have to define maximum allowed prevalence and number/activity of histamine-producing bacteria. Histamine production is correlated also to temperature, time of bacteria penetration in muscle tissues and free histidine concentration in muscles (fish species). In order to assess the presence and enzyme activity (histidine decarboxylase) of contaminant bacteria we examined 51 samples of blue fish caught and processed in Emilia Romagna. From every batch we collected 50 gr of fish (skin and gills or the entire product) from 10 sample units. The pooled samples were subsequently cultured in Trypticase Soy Broth containing histidine and pyridoxal HCl. In order to assess histidine decarboxylase activity of mesophilic and psychrotolerant bacterial, histamine was measured with an electrochemical biosensor after incubation at 37°C for 24 hours and at 18-22°C for 48 hours. Enrichments that showed relevant enzymatic activity were seeded on Niven differential medium to isolate suspected colonies. The DNA extracts from these bacteria were examined by PCR for the detection of specific sequences of the gene encoding the pyridoxal dependent histidine decarboxylase (HDC) peculiar of Gram-negative bacteria producing histamine. Overall, 29.4% samples showed relevant production of histamine in broth cultures (above a cut-off value of 250 ng/ml, 50ng/g) and 53.3% of them (8 out of 15 samples) allowed detection of HDC positive strains. On the basis of phenotypic and biochemical characteristics they were typed as *Morganella*, which appears to be the most common one in fishes caught in the middle Adriatic sea. It was observed that six out of eight cultured HDC bacteria (75%) showed higher decarboxylase activity at 18-22°C than at 37°C, suggesting the presence of psychrotolerant strains. In addition the prevalence of histamine-producing bacteria was higher at retail than at production level, probably as a consequence of manipulations and cross-contamination. The risk correlated to development of histamine-producing psychrotolerant bacteria cannot be controlled only with storage temperature and food business operators have to evaluate specific Performance Objectives in order to ensure their compliance with microbiological criteria fixed by Regulation 2073/2005, until the end of the commercial life of the products on the

market. They have therefore to the microbiological quality of fish they are processing/marketing.

Riassunto

Il Regolamento CE 2073/2005 definisce criteri di accettabilità sulla concentrazione d'istamina presente nei prodotti della pesca fissandone i limiti a 100 mg/kg 'm' con una tolleranza fino a 200 mg/kg 'M' in non più di due unità campionarie (N=9) sul prodotto fresco. Per soddisfare tali criteri i produttori devono definire degli obiettivi di performance, quali la prevalenza e l'attività dei batteri produttori d'istamina in fasi rilevanti della filiera produttiva. La produzione d'istamina dipende anche dalla temperatura, dalla velocità di penetrazione dei batteri nel tessuto muscolare del pesce e dalla concentrazione d'istidina libera (specie ittica). Allo scopo di valutare la presenza e l'attività enzimatica (istidina decarbossilasi) della microflora contaminante, sono stati esaminati 51 campioni di pesce azzurro pescati e lavorati sulla costa dell'Emilia Romagna. Da ciascun lotto è stato prelevato un campione costituito da 10 unità campionarie (pesci o da 10 unità di prodotto lavorato). Dalle diverse unità campionarie sono state prelevate aliquote di prodotto per costituire un campione analitico del peso di 50 grammi. Nel caso dei pesci interi sono state prelevate frazioni di cute e branchie. I campioni analitici sono stati coltivati in brodocolture contenenti istidina e piridoxal HCl; l'istamina prodotta in tali arricchimenti è stata determinata quantitativamente mediante un biosensore elettrochimico, previa incubazione a + 37°C per 24 ore e a + 18- 22°C per 48 ore, al fine determinare l'attività istaminogena di batteri sia mesofili sia psicrotolleranti. Gli arricchimenti che mostravano attività istidino – decarbossilasica rilevante sono stati seminati su terreno differenziale di Niven per isolare le colonie sospette, le quali sono state poi esaminate mediante PCR per l'individuazione di sequenze genetiche specifiche codificanti l'enzima istidina decarbossilasi (HDC) piridoxal dipendente, peculiare dei batteri Gram negativi produttori d'istamina. Il 29,4% dei campioni sono stati positivi allo screening sulle brodocolture d'arricchimento (valore di cut-off pari a 250 ng/ml, 50ng/g di tessuto) e dal 53,3% di questi (otto campioni su 15) è stato possibile isolare ceppi appartenenti HDC al genere *Morganella*, che appare perciò essere quello di maggior rilevanza nei pesci del medio Adriatico. E' da notare che il 75% degli isolati (sei campioni su otto) ha mostrato una maggiore attività istaminogena a temperatura ambiente, facendo supporre che i ceppi isolati siano psicrotolleranti. E' stato altresì rilevato che la prevalenza dei batteri produttori d'istamina aumenta nelle fasi di commercializzazione, come probabile conseguenza delle manipolazioni effettuate dagli operatori. Il rischio correlato allo sviluppo di batteri psicrotolleranti rende insufficiente il solo mantenimento della catena del freddo per il controllo del pericolo istamina, richiedendo agli operatori anche un'attenta valutazione di obiettivi di performance dei prodotti, i quali variano a seconda della qualità microbiologica degli stessi e dei processi di lavorazione cui andranno incontro. La definizione di tali parametri potrebbe essere utile per qualificare i fornitori e garantire il soddisfacimento dei criteri microbiologici dettati dal Regolamento CE 2073/2005, fino al termine della vita commerciale dei prodotti posti sul mercato.

Keywords: *Morganella morganii*, *Morganella psychrotolerans*, histidine decarboxylase, histamine, shelf life, fish poisoning.

Introduzione

L'intossicazione da istamina si manifesta in conseguenza dell'assunzione di prodotti ittici nei quali l'ammina biogena si accumula, per effetto dell'attività di batteri che utilizzano l'istidina libera, presente in concentrazione rilevante in talune specie ittiche descritte nel Regolamento

853/2004. Il Regolamento CE 2073/2005 definisce criteri di accettabilità sulla concentrazione d'istamina presente nei prodotti della pesca fissandone i limiti a 100 mg/kg 'm' con una tolleranza fino a 200 mg/kg 'M' in non più di due unità campionarie (N=9) sul prodotto fresco. Per soddisfare tali criteri i produttori devono definire degli obiettivi di performance, quali la prevalenza e l'attività dei batteri produttori d'istamina in fasi rilevanti della filiera produttiva. I prodotti ittici a rischio sono perciò oggetto di controlli da parte delle Autorità Sanitarie e gli operatori del settore ittico devono essere a conoscenza della qualità microbiologica dei prodotti lavorati e posti da loro in commercio. I batteri istaminogeni sono stati classificati, in base all'attività enzimatica, in deboli, medi e forti produttori (Bjornsdottir and Jones, 2010); questi ultimi sono capaci di produrre quantità d'istamina superiori a 1000 ng/ml in brodocoltura. La maggior parte dei batteri forti produttori che si osservano nel pesce fresco e nei prodotti ittici appartengono alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* (*Morganella*, *Raoultella*, *Erwinia*, *Proteus* e altri) (Cantoni, 2008). Anche i batteri del genere *Photobacterium* (*P. damsealae* e *P. phosphoreum*) mostrano forte attività istaminogena e sono stati spesso implicati in casi clinici d'intossicazione (Emborg e Dalgaard, 2006; Landete *et al.*, 2008). Poiché i prodotti ittici sono normalmente conservati a temperature prossime a + 0°C, assumono un maggior significato le specie e i biotipi psicotolleranti. Obiettivo di questo studio è stato quello di valutare la prevalenza e l'attività dei batteri produttori d'istamina in pesci e prodotti ittici di specie a rischio, catturati e lavorati nel medio Adriatico, seguendone l'evoluzione nel corso della filiera, dalla fase di sbarco fino alla commercializzazione al dettaglio.

Materiali e metodi

Nel periodo Novembre 2011-Aprile 2012 sono stati analizzati 51 campioni provenienti da pescherecci, impianti di lavorazione e pescherie. Le specie oggetto di campionamento sono state alici (17 campioni) sarde (9 campioni), sgombri (9 campioni), tonno (8 campioni) aringhe (2 campioni), lanzardi, alacce e palamite (1 campione), ripetendo il campionamento due volte presso ciascun operatore (Tabella 1). Il prodotto fresco prelevato allo sbarco e in pescheria era di origine nazionale e faceva parte della stessa filiera ittica, mentre la materia prima dei prodotti trasformati seguiva percorsi differenti e aveva origini sia nazionale sia internazionale (Irlanda del Nord, Atlantico, Atlantico centro – orientale e oceano Pacifico). In parallelo al campionamento è stata condotta un'indagine per raccogliere dati sulle condizioni igieniche delle attività produttive e distributive e sui processi di lavorazione. I campioni refrigerati sono stati trasportati in laboratorio in condizioni di refrigerazione e, nel caso dei pesci freschi, analizzati entro sei ore dal prelievo.

Da ogni campione, formato da 10 unità di prodotto, sono stati prelevati 50 grammi di materiale (branchie e cute per i prodotti freschi); questi sono stati diluiti in proporzione di 1:5 in PBS e poi passati in Stomacher® per 3 minuti. Un millilitro dell'omogenato è stato diluito in 9 ml di brodo di arricchimento TSB contenente istidina (1%) e piridoxal HCl (0,0005%). Per tutti i campioni è stato fatto un arricchimento a 37°C per 24 ore. Al fine di rilevare anche l'attività decarbossilasica dei batteri Gram negativi psicotolleranti e alofili, nel secondo campionamento (campioni da 24 a 51) è stata utilizzata anche una formulazione modificata del terreno contenente 2% NaCl con incubazione a 18-22°C per 48 ore. Gli arricchimenti sono stati poi analizzati mediante un biosensore elettrochimico per misurare la quantità d'istamina prodotta in coltura. Tale strumento misura la corrente prodotta dall'ossidazione del perossido d'idrogeno prodotto da un sistema bi-enzimatico (diaminossidasi e perossidasi) immobilizzato sulla superficie di un elettrodo (Trevisani, comunicazione personale). È stato predefinito un valore di cut-off pari a 250 ng/ml di arricchimento (50 ng/g di tessuto) e tutti i campioni che mostravano attività enzimatica superiore sono stati seminati su terreno di Niven modificato (Mavromatis and Quantick, 2002) e incubati a temperatura ambiente fino a un massimo di

quattro giorni. Da ogni piastra di Niven sospetta per la presenza di batteri produttori d'istamina, ovvero con la presenza di colonie contornate da aloni viola, sono state prelevate fino a 50 colonie per il test PCR, atto a rilevare la presenza nel genoma batterico di sequenze specifiche del gene istidina decarbossilasi (HDC) piridoxal dipendente (Landete *et al.*, 2008). A tal fine sono stati utilizzati il protocollo e i primers (HIS2F e HIS2R) individuati da De Las Rivas *et al.* (2006), in grado di generare un prodotto di amplificazione di 531 bp anche da diversi batteri, tra cui quelli dei generi *Morganella* e *Photobacterium*. Le colonie che mostravano prodotti di amplificazione specifici sono state sottoposte a caratterizzazione biochimica tramite test API20E.

Risultati

Quindici dei 51 campioni analizzati (29,4%) hanno mostrato la presenza di batteri produttori d'istamina in coltura (Tabella 1). L'attività enzimatica batterica è stata rilevata anche in altri 12 campioni (23,5%) ma con valori < 250 ng/ml e valore sotto al quale non è mai stata rilevata la presenza di colonie sospette sul terreno di Niven. Dodici dei 15 campioni positivi (> 250 ng/ml istamina prodotta in brodocoltura) hanno dato colonie sospette sul terreno di Niven e 8 sono stati confermati tramite test PCR come HDC positivi e identificati in base al test API20E come appartenenti al genere *Morganella* (Tabella 2).

Discussione e conclusioni

La presenza di flora batterica in grado di sintetizzare istamina è stata rilevata nel 29,4% dei campioni analizzati, con una prevalenza del 20-50% in alici e sarde campionate allo sbarco e del 71-80% nelle stesse specie campionate in pescheria (Tabella 2). In altre specie con un minor numero di campioni eseguiti sono da annotare la positività di palamite e aringhe prelevate in pescheria e la negatività di lanzardi e sgombri prelevati allo sbarco. Le brodocolture di arricchimento dei prodotti in fase di lavorazione (sgombri e tranci di tonno congelati, sgombri e alici marinate e sott'olio, tonno sterilizzato, pasta di alici, alici salate, tonno affumicato e sughi di tonno) non hanno mai rilevato presenza d'istamina. Dei campioni positivi incubati sia a + 37°C che a temperatura ambiente, i secondi hanno rivelato un'attività istamino-decarbossilasica sempre presente e quasi sempre maggiore rispetto ai primi. Ciò farebbe supporre la natura psicotollerante della flora microbica istaminogena presente sui prodotti ittici campionati. Non è stato possibile ottenere isolati positivi al test PCR da tutti i campioni che hanno mostrato un'attività istaminogena rilevante (> 250 ng/ml) nelle brodocolture di arricchimento. Anche se in 12 dei 15 campioni positivi è stato possibile individuare colonie sospette su terreno di Niven, solo in 8 casi su 12 (67%) è stata individuata la presenza di sequenze specifiche del gene HDC piridoxal dipendente e in tutti questi casi la caratterizzazione morfologica e biochimica ha permesso il riconoscimento del genere *Morganella* (bastoncini Gram-negativi, fermentanti il glucosio, mobili, ossidasi negativi e catalasi positivi, fenilalanina deaminasi positivi, gelatinasi negativi, ureasi positivi, indolo positivi e citrati negativi). Riteniamo che la discrepanza tra le positività rilevate tramite il rilievo dell'attività istidino - decarbossilasica nelle brodocolture di arricchimento, la presenza di colonie sospette sul terreno di Niven e la conferma PCR degli isolati sia dipesa dal fatto che sullo stesso terreno possano assumere colorazione viola anche colonie appartenenti a specie non produttrici d'istamina (Lopez – Sabater *et al.*, 1996; Fletcher *et al.*, 1998; Bjornsdottir *et al.*, 2009) e dalla differente capacità delle specie microbiche istaminogene di sviluppare sul terreno di Niven (falsi negativi). Bjornsdottir *et al.* (2010) ritengono che falsi negativi derivino dall'acidità del terreno di Niven (pH 5,3), la quale può inibire lo sviluppo di alcuni ceppi batterici produttori d'istamina. E' anche da annotare che basse concentrazioni d'istamina nelle brodocolture di arricchimento possono essere rilevate anche in assenza di batteri produttori a causa dell'attività enzimatica residua di batteri non più vitali (Kanki *et al.*,

2007) o ad attività di altre decarbossilasi non specifiche (Bjornsdottir *et al.*, 2010). Il fatto che nel nostro studio sia stata evidenziata la prevalenza assoluta del genere *Morganellafa* supporre che questa sia la specie forte produttrice d'istamina maggiormente presente nel medio Adriatico; non si può però escludere che l'impiego del terreno differenziale di Niven abbia limitato la sensibilità del metodo e la possibilità d'isolamento. Ad avvalorare questa ipotesi è stata la presenza di un campione di alici positivo al test PCR su pool di colonie che ha perso vitalità nei successivi passaggi di purificazione. Pur mostrando un'alta percentuale di falsi positivi il Niven rimane un terreno vantaggioso poiché è l'unico che permette una discriminazione dei batteri sulla base della capacità di alcalinizzare il substrato liberando istamina nello stesso.

Il rilievo di una maggiore attività istaminogena negli arricchimenti a temperatura ambiente (11/12 campioni tra quelli esaminati sia a + 37°C che a + 18-22°C) è indicativa della presenza di batteri psicrotolleranti. Emborg *et al.* (2006) hanno riconosciuto l'esistenza di una specie distinta nell'ambito del genere *Morganella*, da loro denominata *M. psychrotolerans*, la cui capacità di moltiplicare e produrre forti quantità d'istamina nel muscolo di pesce conservato a condizioni di refrigerazione la rende particolarmente pericolosa, in modo particolare per i prodotti ittici refrigerati a conservazione prolungata e stabilizzati sottovuoto o per mezzo di atmosfere modificate. La prevalenza della flora istaminogena nei lotti di alici è passata dal 20% nei prodotti campionati allo sbarco al 71% in quelli prelevati in pescheria, provenienti dalla stessa filiera, mentre in quelli di sarde dal 50% all'83%. Le operazioni di trasferimento, cernita e aggiunta di ghiaccio, osservate durante l'indagine eseguita in parallelo ai campionamenti, possono comportare un aumento della prevalenza delle contaminazioni, come rilevato anche da altri autori che ritengono di conseguenza di fondamentale importanza la cura dell'igiene personale, delle lavorazioni e le operazioni di sanificazione delle attrezzature e dell'ambiente, al fine di limitare lo sviluppo dei batteri produttori d'istamina (Kimata 1961, Yoshinaga and Frank, 1982). Anche le manipolazioni e il metodo di pesca rivestono un ruolo importante nei confronti del pericolo istamina, come affermano gli autori delle linee guida FDA (2011): tutto ciò che provoca lesioni al pesce azzurro può favorire il passaggio di batteri all'interno delle masse muscolari di quest'ultimo, portando a contatto flora microbica e istidina libera e facilitando quindi la produzione d'istamina. In conclusione, dobbiamo rilevare che l'alta prevalenza di batteri forti produttori d'istamina già allo sbarco rende auspicabile un controllo per definire la qualità della materia prima di deciderne la destinazione d'uso e la durata della vita commerciale, nel rispetto dei criteri microbiologici imposti dalla normativa vigente.

Bibliografia

- Bjornsdottir B.K., Bolton G.E., Jaykus L.A., Green P. D.M., Green D. P. 2010. Development of molecular – based methods for determination of high histamine producing bacteria in fish. *IntJ Food Microbiol* 139:161-167.
- Bjornsdottir B.K., Gregory E. Bolton, Patricia D. McClellan-Green, Lee-Ann Jaykus and David P. Green. 2009. Detection of Gram-Negative Histamine - Producing Bacteria in Fish: A Comparative Study. *JFood Prot* 72 (9):1987-1991.
- Cantoni C. 2008. Sistematica dei batteri produttori di istamina nelle carni di pesce. *Il pesce*. 6:115- 119.
- De Las Rivas B., Macrobal A., Carrascosa A.V., Munoz R. 2006. PCR detection of Foodborne Bacteria Producing the Biogenic Amines Histamine, Tyramine, Putrescine, and Cadaverine. *J Food Prot* 69:367- 272.
- Emborg J. e Dalgaard P. 2006. Formation of Histamine and Biogenic Amines in Cold-Smoked Tuna: An Investigation of Psychrotolerant Bacteria from Samples Implicated in Cases of Histamine Fish Poisoning. *JFood Prot* 69: 897-906.
- Emborg J., Dalgaard P., Ahrens P. 2006. *Morganella psychrotolerans* sp. nov., a histamine-producing bacterium isolated from various seafood. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 56:2473-

2479.

FDA. 2011. Fish and Fishery Products Hazards and Controls Guidance. Chapter 7: Scombrototoxin(histamine)formation.

Fletcher G.C., Summers G., Van Veghel P.W.C. 1998. Levels of histamine and histamine-producing bacteria in smoked fish from New Zealand markets. *J Food Prot* 61:1064-1070.

Kaneko J. J., Bell J. W., Hawn D. R. 2004. Verification of a HACCP-based Strategy for the Control of Histamine for the Fresh Tuna Industry. A report by PacMar Inc. pursuant to National Oceanographic and Atmospheric Administration Award No. NA16FD2472 PacMar Inc. 3615 Harding Avenue, Suite 409 Honolulu, Hawaii 96816.

Kanki M., Yoda T., Tsukamoto T., Baba E. (2007). Histidine Decarboxylases and Their Role in Accumulation of Histamine in Tuna and Dried Saury. *Appl Env Microbiol* 73:1467–1473

Kimata M. 1961. The histamine problem. In: Borgstrom, G. (Ed.). *Fish and Food: Production, Biochemistry and Microbiology*, Academic press, New York. Vol. 1:329 – 352.

Landete J.M., De Las Rivas B., Marcobal A, Munoz R. 2008. Updated Molecular Knowledge about Histamine Biosynthesis by Bacteria. *Crc Cr Rev food Nutr* 48:697-714.

Lopez-Sabater E.I., Rodriguez-Jerez J.J., Hernandez-Herrero M., Mora-Ventura M.T. 1996. Incidence of histamine-forming bacteria and histamine content in scombroid fish species from retail markets in the Barcelona area. *Int J Food Microbiol* 28:411-418.

Mavromatis P., Quantick P.C. 2002 Modification of Niven's medium for the enumeration of histamine-forming bacteria and discussion of the parameters associated with its use. *J Food Prot* 65:546-551.

Regolamento (CE) n. 2073/2005 della Commissione del 15 novembre 2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari. Gazzetta ufficiale dell'Unione europea, 22.12.2005, L338/1.

Takahashi H., Sato M., Kimura B., Ishikawa T., Fujii T. 2007. Evaluation of PCR-Single-Strand Conformational Polymorphism Analysis for Identification of Gram-Negative Histamine-Producing Bacteria Isolated from Fish. *J Food Prot* 70 (5):1200–1205.

Takahashi H., Kimura B., Yoshikawa M., Fujii T. 2003. Cloning and sequencing of the histidine decarboxylase genes of gram-negative, histamine-producing bacteria and their application in detection and identification of these organisms in fish. *Appl Environ Micro.* 69:2568–2579.

Yoshinaga D. H. e Frank H. A. 1982. Histamine – producing bacteria in decomposing skipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). *Appl Environ Microb* 44:447-452.

Tabella 1. Prevalenza e attività dei batteri produttori d'istamina in diverse fasi e tipologie di prodotti ittici

Fase	N° campioni	Tipologia	Specie	Batteri produttori d'istamina negli arricchimenti(ng/ml)	
				Prevalenza (%)	Attività (istamina ng /ml)
Sbarco	11	Fresco	Sarda	2/4 (50%)	381-5736
			Alice	1/5 (20%)	9943
			Lanzardo	0/1 (0%)	<250
			Sgombro	0/1 (0%)	<250
Pescheria	17	Fresco	Sarda	5/6 (83%)	281-5097
			Alice	5/7 (71%)	444-5097
			Aringa	1/2 (50%)	3691
			Palamita	1/1 (100%)	302
Lavorazione	23	Congelato	Sgombro	0/3 (0%)	NR
			Tonno	0/2 (0%)	NR
		Sotto sale	Alice	0/2 (0%)	NR
		Pasta	Alice	0/3 (0%)	NR
		Marinato	Sgombro	0/1 (0%)	NR
			Alice	0/2 (0%)	NR
		Sott'olio	Sgombro	0/4 (0%)	NR
		Sterilizzato	Tonno	0/1 (0%)	NR
		Affumicato a freddo	Tonno	0/2 (0%)	NR
		Sugo pastorizzato	Tonno	0/2 (0%)	NR
Sugo non pastorizzato	Tonno	0/1 (0%)	NR		

NR = non rilevabile

Tabella 2. Attività dei batteri produttori d'istamina nei campioni positivi e concentrazione d'istamina rilevata a differenti temperature d'incubazione.

Fase	Specie	Concentrazione istamina arricchimento (ng/ml)	
		37°C	18-22°C
Sbarco	Sarda(<i>Clupeis pilchardus</i>)	381	ND
		5736	2196
Pescheria	Sarda (<i>Clupeis pilchardus</i>)	281	ND
		NR	5097
		<250	1174
		<250	1809
		<250	2628
	Palamita (<i>Sarda sarda</i>)	302	ND
	Aringa (<i>Clupea harengus</i>)	<250	3691
	Alice (<i>Engraulis encrasicolus</i>)	NR	5097
		<250	3019
		NR	835
NR		444	
		NR	752

NR = non rilevabile; ND = non determinato