

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI NAPOLI "FEDERICO II"

FACOLTA' DI MEDICINA VETERINARIA

Dipartimento di Scienze Zootecniche e Ispezione degli Alimenti di O. .A.

Sezione Ispezione degli Alimenti

TESI DI DOTTORATO

in

Produzione e Sanità degli Alimenti di Origine Animale

XIX ciclo

STUDIO ED APPLICAZIONE DI TECNICHE BASATE SULL'ANALISI DEL DNA

DI MICRORGANISMI PATOGENI

PER LA VALUTAZIONE DELLA SICUREZZA DEGLI ALIMENTI

Tutor:

Ch.ma Dott.ssa Tiziana Pepe

Candidata:

Dott.ssa Rosaria De Dominicis

Coordinatrice:

Ch.ma Prof.ssa M.L.Cortesi

ANNI ACCADEMICI 2003-2006

INDICE

CAPITOLO I

Prefazione **pag 6**

CAPITOLO II

2.1 Metodiche biomolecolari utilizzate **pag 9**
per la identificazione di patogeni

2.2 Polymerase Chain Reaction (PCR) **pag 11**

CAPITOLO III

Redazione di un protocollo di PCR Multyplex **pag 14**
per l'identificazione di Campylobacter Jejuni
in carcasse di pollo durante la macellazione

3.1 Generalità **pag 15**

3.2 Epidemiologia **pag 16**

3.3 Patogenesi **pag 19**

3.4 Sintomatologia **pag 19**

3.5 Legislazione **pag 20**

3.6 Diagnosi di laboratorio **pag 22**

3.7 Scopo della sperimentazione	pag 24
3.8 Materiale e metodi	pag 25
3.9 Estrazione del DNA batterico	pag 30
3.10 Reazione di amplificazione (PCR Multiplex)	pag 31
3.11 Elettroforesi in gel di agarosio	pag 33
3.12 Risultati e conclusioni	pag 35
 CAPITOLO IV	
Ricerca di Escherichia Coli O157:H7 ed Altri batteri produttori di verocitotossine In Mytilus Galloprovincialis mediante tecnica PCR Multiplex	pag 38
4.1 Generalità	pag 39
4.2 Epidemiologia	pag 49
4.3 Patogenesi e sintomatologia	pag 52
4.4 Metodi di ricerca di Escherichia Coli O157:H7 e di ceppi VTEC	pag 55
4.5 Separazione immunomagnetica	pag 58

4.6 Polymerase Chain Reaction (PCR)	pag 59
4.7 Scopo della sperimentazione	pag 59
4.8 Materiale e metodi	pag 60
4.9 Reazione di amplificazione (PCR Multiplex)	pag 63
4.10 Risultati e conclusioni	pag 64

CAPITOLO V

Ricerca di Listeria Monocytogenes in filetti Di orata di allevamento ed identificazione del patogeno mediante tecnica PCR multiplex	pag 70
5.1 Generalità	pag 71
5.2 Struttura antigene	pag 72
5.3 Epidemiologia	pag 73
5.4 Patogenesi	pag 75
5.5 Sintomatologia	pag 75
5.6 Listeria in prodotti ittici	pag 77
5.7 Materiale e metodi	pag 78
5.8 Analisi microbiologica	pag 79

5.9 Estrazione del DNA	pag 80
5.10 Polymerase Chain Reaction (PCR)	pag 81
5.11 Risultati e conclusioni	pag 82
CAPITOLO VI	
6.1 Considerazioni	pag 84
BIBLIOGRAFIA	pag 87

CAPITOLO I

1.1 PRAFAZIONE

L'aumento degli scambi nazionali ed internazionali di derrate alimentari, la crescente attenzione dei consumatori verso alimenti con elevate caratteristiche organolettiche e igienico-sanitarie hanno reso necessaria una maggiore attenzione verso alcuni microrganismi veicolati dagli alimenti, che rappresentano un serio problema per la salute pubblica.

I microrganismi che si rinengono negli alimenti possono essere il risultato di una contaminazione biologica definita primaria, se essi sono abitualmente presenti nell'alimento, oppure secondaria se provocata da contaminazioni ambientali.

L'ingestione di alimenti nei quali la contaminazione batterica, primaria o secondaria, è in grado di provocare uno stato morboso prende il nome di "*tossinfezione alimentare*". In particolare si parla di infezione alimentare quando lo stato morboso è conseguenza di ingestione di microrganismi vivi e vitali, diversamente, di intossicazione alimentare quando la

patologia è provocata dalla presenza di tossine batteriche.

I metodi tradizionali per la rivelazione di batteri patogeni negli alimenti si basano sulla coltivazione diretta dei microrganismi in terreni selettivi. Tuttavia è importante migliorare la sensibilità delle tecniche di isolamento attraverso l'inserimento di una fase di arricchimento che aumenta il numero di microrganismi disponibili per la crescita in coltura.

Il patogeno ricercato forma sul terreno colonie che presentano morfologia caratteristica, tuttavia i test fenotipici devono essere confermati mediante prove biochimiche e indagini sierologiche.

Le prove biochimiche si basano sulla capacità del microrganismo di reagire con determinati composti oppure di fermentare alcuni glucidi, si utilizzano comunemente i sistemi miniaturizzati Api 20E (bioMérieux), enterotube (Roche) o Microbact 12A (Med Vet) che in poche ore possono portare alla corretta identificazione di specie.

I tradizionali metodi sierologici utilizzano Kit di agglutinazione al lattice, o specifici antisieri per antigeni di

superficie del batterio. Tali prove possono dare luogo a falsi positivi a seguito di cross-reattività fra alcuni antigeni e per la presenza di un'alta percentuale di ceppi non tipizzati.

Negli ultimi tempi è stata posta grande attenzione allo sviluppo di metodi alternativi di analisi degli alimenti. Le tecniche basate sullo studio del DNA sono di recente introduzione nell'ambito del controllo sanitario degli alimenti, esse permettono di identificare numerose specie patogene da differenti matrici alimentari. In particolare l'utilizzo della *Polymerase Chain Reaction (PCR)* è caratterizzata da elevata specificità d'analisi, da sensibilità di rilevamento del patogeno indagato e maggiore rapidità di esecuzione dei tests rispetto ai metodi di microbiologia classica. In questo contesto abbiamo ritenuto opportuno applicare le più moderne tecniche di biologia molecolare fondate sull'utilizzo della *Polymerase Chain Reaction (PCR)*. Lo scopo di questa tesi è stata la messa a punto di tecniche biomolecolari per la ricerca e lo studio dei principali microrganismi patogeni responsabili di tossinfezioni alimentari.

CAPITOLO II

2.1 METODICHE BIOMOLECOLARI UTILIZZATE PER LA IDENTIFICAZIONE DI PATOGENI

Le metodiche tradizionali utilizzate per l'identificazione di patogeni risultano spesso inadeguate per il basso potere discriminante, l'eccessiva laboriosità, i tempi lunghi di esecuzione delle analisi ed il pericolo intrinseco per il personale addetto alla manipolazione di microrganismi vivi e vitali. Negli ultimi anni è stata posta grande attenzione allo sviluppo di nuove metodiche di analisi in grado di dare risultati più precisi riguardo la presenza di microrganismi negli alimenti. A tal proposito, le tecniche basate sull'analisi del DNA hanno rivoluzionato le indagini epidemiologiche in campo alimentare. Infatti esse permettono tempi più rapidi di esecuzione (1-2 giorni a fronte di 5-10 giorni, a seconda del microrganismo ricercato, necessari con le metodiche di isolamento tradizionali), sono in grado di discriminare maggiormente i singoli ceppi patogeni. Si basano sull'analisi di una porzione di genoma batterico e sono utili per l'identificazione sia del genere che della specie del microrganismo

indagato.

Pertanto possono essere applicate più efficacemente alla filiera produttiva per lo studio di strategie di controllo. Inoltre queste metodiche hanno il vantaggio di non essere influenzate dalle condizioni ambientali. Purtroppo ancora oggi le tecniche biomolecolari sono utilizzate per lo più a conferma dei metodi tradizionali e non ancora per le analisi di routine. Le metodiche basate sull'analisi del DNA possono essere distinte in due gruppi:

- 1) metodiche per la ricerca di microrganismi patogeni nell'alimento utili ad effettuare uno *screening* sull'alimento;
- 2) metodiche per la caratterizzazione dei patogeni utili ad effettuare studi epidemiologici sulla trasmissione e distribuzione dei patogeni responsabili di tossinfezione alimentare.

2.2 POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

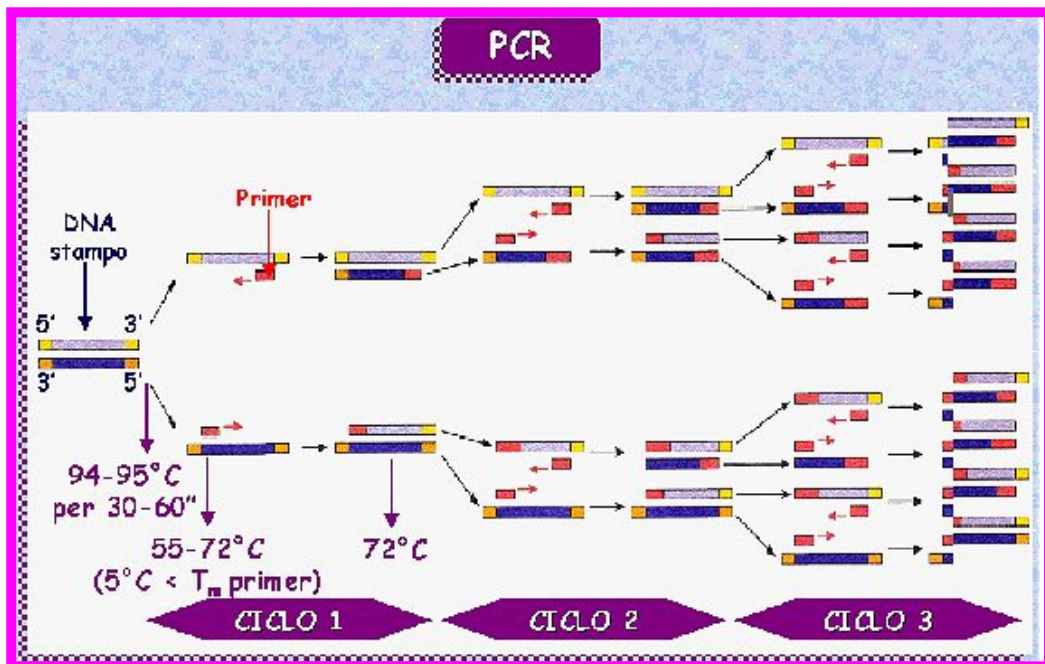
Questa tecnica permette di amplificare una porzione del genoma batterico attraverso la ripetizione ciclica di 3 fasi:

- 1) **denaturazione** della doppia elica di DNA;
- 2) **appaiamento** di *primers* complementari alle estremità del frammento da amplificare;
- 3) **estensione** della catena ad opera dell'enzima Taq polimerasi.

Tale procedimento permette di ottenere numerose copie del DNA target rilevabili mediante elettroforesi su gel di agarosio. Tale tecnica è caratterizzata da tempi di esecuzione brevi (1-2 giorni), da un'elevata specificità e sensibilità, quest'ultima permette il rilevamento di piccole quantità di microrganismi negli alimenti. L'amplificazione può seguire due criteri diversi: può essere eseguita dopo aver isolato il microrganismo con l'utilizzo delle tradizionali tecniche (35) ed in questo caso si analizzano solo le cellule vive e coltivabili. Per tale motivo la sensibilità richiesta alla tecnica di indagine molecolare non è elevata ma si perde la possibilità di stimare quantitativamente il grado di inquinamento dell'alimento; si può procedere direttamente all'analisi

dell'alimento, in questo caso si rilevano anche le cellule non vitali ma è richiesta una sensibilità elevata. Con l'applicazione diretta della PCR si possono rilevare anche patogeni non coltivabili in vitro (14), anche con questa tecnica si possono avere dei problemi durante l'esecuzione delle analisi per la presenza di sostanze inibenti presenti nella matrice alimentare quali grassi, proteine, sali. E' importante quindi effettuare una buona preparazione del campione per evitare la presenza di tali sostanze. Diverse sono le metodiche per l'allontanamento degli inibitori quali diluizione del campione, centrifugazione, filtrazione con sistemi adsorbenti a base di lecitina e l'aggiunta di BSA (1). Nel caso in cui si analizzano microrganismi già isolati si utilizzano in genere altri metodi quali trattamenti con calore che in alcuni casi possono assicurare la rottura della parete cellulare, e trattamenti con detergenti quali SDS, Triton-100. Nel caso in cui si analizzi direttamente l'alimento, la procedura per l'estrazione del DNA è più complessa in quanto si tratta di matrici maggiormente complesse, in questo caso si utilizzano proteasi (proteinasasi K). Una variante della PCR è la PCR *multiplex* in cui vengono

utilizzate più coppie di *primers* contemporaneamente e con tale tecnica si sono avuti buoni risultati nella ricerca di *Listeria* in carni avicole (40, 13, 11). Una limitazione però della PCR è rappresentata dal fatto che nel caso in cui DNA *target* sia costituito dalla sequenza codificante della tossina, il risultato positivo indica solamente il potenziale genetico di produrre la tossina o di esprimere il fattore di virulenza e non fornisce alcuna informazione sulla reale presenza di questa nell'alimento (14).



CAPITOLO III

**REDAZIONE DI UN PROTOCOLLO DI PCR *MULTIPLEX*
PER L'IDENTIFICAZIONE DI *CAMPYLOBACTER JEJUNI*
IN CARCASSE DI POLLO DURANTE LA
MACELLAZIONE**

3.1 GENERALITA'

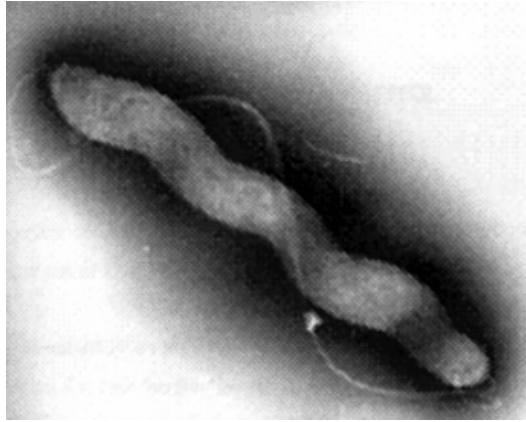
Il genere *Campylobacter* comprende microrganismi responsabili di malattie infettive contagiose, proprie di molte specie di animali domestici, con sintomatologia a carico dell'apparato genitale (aborto, metrite, sterilità), digerente (enterite ed epatite), mammario (mastite) e talvolta trasmissibili all'uomo.

Tali microrganismi si presentano sotto forma di bastoncini sottili, ricurvi (0,2-0,5 μm di diametro) e talvolta spiralati ed in questo caso possono raggiungere 8 μm di lunghezza.

Sono asporigeni, Gram negativi e mobili, sono microaerofili e richiedono una concentrazione di ossigeno variabile dal 3 al 15% e di anidride carbonica dal 3 al 5%. Non fermentano e non ossidano carboidrati, come fonte di energia non utilizzano i carboidrati ma gli amminoacidi o i composti dei cicli intermedi dell'acido tricarbossilico.

I batteri del genere *Campylobacter* sono di solito sensibili a molti antibiotici di uso comune come cloramfenicolo, streptomicina, tetraciline e scarsamente sensibili alla penicillina. La scelta dell'antibiotico a scopo terapeutico deve essere subordinata alla

scelta dell'antibiogramma.



3.2 EPIDEMIOLOGIA

I batteri del genere *Campylobacter* (*C. jejuni* in particolare) sono ampiamente diffusi in natura anche se il principale serbatoio è rappresentato da tratto intestinale di un' ampia varietà di animali a sangue caldo. *Campylobacter* è un microrganismo commensale di diverse specie di uccelli sia selvatici che d'allevamento. Di qui l'inevitabile contaminazione ambientale, la trasmissione e la conseguente infezione, anche sintomatica, di numerosi mammiferi, quali bovini, ovini, suini, cani e gatti (7). L'acqua svolge un ruolo importante nell'ecologia del *Campylobacter*, che può essere isolato con elevata frequenza da acque dolci soprattutto nei mesi invernali, per la più alta capacità di sopravvivenza del microrganismo alle basse temperature, è quindi

possibile la contaminazione di acque per uso domestico ed epidemie da consumo di acqua contaminata sono state descritte in Paesi del Nord Europa ed in Usa (37). Nell'acqua ed in altri ambienti sub-ottimali, il *Campylobacter* si può trasformare in uno stato “*vitale non coltivabile*” la cui importanza nella trasmissione agli animali e all'uomo è ancora oggetto di dibattito. Non è infatti del tutto chiaro se il microrganismo nella forma non coltivabile resti virulento o se si trasformi nuovamente in uno stato coltivabile virulento solo dopo il passaggio in un ospite animale .

Da ricerche effettuate nel nostro paese emerge che circa il 48% del pollame presenta feci positive per il *Campylobacter*, i casi di completa negatività, riscontrati in polli di allevamento intensivo, sono stati interpretati come conseguenza dell'utilizzo di tetracicline nel mangime somministrato. Dal momento che gli animali, soprattutto le specie avicole, rappresentano il principale serbatoio di *Campylobacter*, la carne viene contaminata dal contenuto fecale durante la macellazione e l'eviscerazione (2-23).

I passaggi in cui la contaminazione crociata è maggiore sono le operazioni di spennatura, eviscerazione e raffreddamento con

acqua. I microrganismi presenti nell'acqua aderiscono alla cute portando alla formazione di un biofilm, difficilmente rimovibile, per cui *Campylobacter* permane a livello cutaneo, tra le pliche della pelle ed in particolare a livello dei follicoli (6). Il consumo o la manipolazione di carne avicola poco cotta sono i maggiori responsabili della trasmissione dell'infezione di *Campylobacter* all'uomo. Infatti i momenti a rischio sono considerati l'uso di *barbecues*, le sagre paesane, i campeggi, gli accampamenti militari, *etc.* dove sovente la cottura delle carni è frettolosa ed effettuata da cuochi improvvisati. A differenza delle carni rosse, nelle carni avicole non si ha l'effetto detto "batteriostatico" dato dall'azione disidratante della ventilazione forzata nelle celle di refrigerazione; i polli infatti quando subiscono una refrigerazione in acqua corrente mantengono una maggiore umidità superficiale che favorisce la sopravvivenza di *Campylobacter*.

I *Campylobacter* termofili non si moltiplicano negli alimenti conservati a temperatura inferiore a 28°C ma sopravvivono nel latte e nell'acqua anche parecchie settimane se mantenuti a 4°C e nel pollame congelato per parecchi mesi.

Sono particolarmente sensibili alla disidratazione e a bassi valori di pH (inferiori a 5.1) e l'esposizione a stress chimico-fisici li induce a trasformarsi rapidamente in forme dette “vitali non coltivabili”.

3.3 PATOGENESI

La patogenicità di *Campylobacter* è legata a vari fattori, anche se l'effettivo ruolo di questi non è stato definito (26, 41). La motilità del microrganismo favorisce la penetrazione dello stesso nello strato di muco che ricopre l'epitelio intestinale, diverse adesine e gli stessi flagelli favoriscono l'attacco alle cellule epiteliali e la loro successiva invasione.

La presenza di leucociti e sangue nei campioni fecali in molti casi di gastroenterite da *Campylobacter* depone per un meccanismo di tipo invasivo di questo microrganismo.

3.4 SINTOMATOLOGIA

L'infezione da *Campylobacter* si manifesta sporadicamente o in piccoli episodi epidemici a carattere familiare, non mancano però

le segnalazioni di epidemie più vaste.

I casi sporadici hanno un picco di incidenza nei mesi estivi, mentre le epidemie sembrano culminare in maggio e ottobre. Il *Campylobacter jejuni* è la specie di più frequente riscontro seguito da *Campylobacter coli* ed altre specie di *Campylobacter spp.*, specie definite termotolleranti perchè capaci di tollerare temperature di 42°C (2, 16, 21, 28).

L'infezione sostenuta da *Campylobacter spp.* da luogo ad enterite acuta caratterizzata da febbre alta e persistente, diarrea (inizialmente acquosa e successivamente sanguinolenta) e violenti crampi addominali.

3.5 LEGISLAZIONE

Diversi sono i regolamenti da prendere in considerazione, ricordiamo tra questi:

- 1) Regolamento CEE n. 2777/1975 del Consiglio del 29/10/1975
relativo all'organizzazione comune dei mercati nel settore del
pollame
- 2) Regolamento CEE n. 1235/1989 recante modifica del

regolamento precedente e riguardante l'organizzazione comune dei mercati nel settore del pollame

3)Regolamento CEE n. 1906/1990 del Consiglio del 26/06/1990 che stabilisce alcune norme di commercializzazione per le carni di pollame

4)Regolamento CEE n. 317/1993 del Consiglio del 9/02/1993 che modifica il precedente e stabilisce alcune norme sulla commercializzazione di carni di pollame

5)Decreto n. 465 del 10/9/1999 che indica norme per l'applicazione di disposizioni comunitarie riguardanti l'uso di particolari diciture in materia di commercializzazione delle carni di pollame

6)Regolamento CEE n. 1804/1999 che stabilisce norme comunitarie sui prodotti biologici di origine animale

7)Raccomandazione della Commissione n. 2004/24/CE del 19/12/2003 relativa a un programma di controlli ufficiali dei prodotti alimentari per il 2004

Il Consiglio delle Comunità Europee, con il regolamento CEE n. 2777/1975, fin dalla sua applicazione, ha inteso armonizzare i

mercati del settore disciplinando l'etichettatura e la pubblicità delle carni di pollame.

Il mercato avicolo, inteso come filiera d'allevamento, macellazione, sezionamento, confezionamento, distribuzione e vendita affronta notevoli problemi di mercato a causa della concorrenza dei paesi extra-UE che sono presenti sul mercato con prezzi più bassi.

Il notevole commercio di carni avicole impongono una maggiore sorveglianza della vigilanza sanitaria per impedire la diffusione di zoonosi legate al consumo di carni avicole.

Tra le zoonosi particolare interesse riveste la campylobacteriosi i cui batteri sono tra le più comuni cause di enterite nell'uomo ed una delle modalità di infezione nell'uomo sempre è rappresentata dal consumo di carni di specie avicole poco cotte.

3.6 DIAGNOSI DI LABORATORIO

Attualmente la diagnosi della campylobacteriosi è eseguita mediante test microbiologici anche se questi sono limitati e quindi poco affidabili.

I tradizionali test possono dare luogo a falsi positivi a seguito di cross-reattività fra alcuni antigeni e per la presenza di un' alta percentuale di ceppi non tipizzati.

In questo contesto abbiamo ritenuto utile applicare le più recenti tecniche di biologia molecolare fondate sull'utilizzo dei principi della *Polymerase Chain Reaction (PCR)* che consentono il riconoscimento di numerose specie patogene.

Tali tecniche hanno rivelato un potenziale maggiore per la sub-tipizzazione degli isolati rispetto a quello offerto dalle tecniche basate sulla caratterizzazione a livello fenotipico, consentendo una differenziazione anche per isolati che condividono gli stessi marcatori molecolari di superficie.

Per la sub-tipizzazione sono state saggiate le potenzialità dei prodotti ottenute in seguito all'amplificazione di specifiche sequenze genomiche.

Recentemente è stata proposta la tecnica PCR, definita *multiplex*, in grado di evidenziare in un'unica reazione di amplificazione numerosi loci genetici caratteristici del patogeno ricercato o appartenenti a differenti patogeni.

La tecnica prevede l'utilizzo di più coppie di *primers* (quattro coppie) nella stessa reazione di amplificazione.

Questo test è stato già applicato a numerose matrici alimentari, rivelandosi attendibile e soprattutto, richiedendo tempi più brevi rispetto alle altre metodiche.

3.7 SCOPO DELLA SPERIMENTAZIONE

Negli ultimi anni è stata posta una maggiore attenzione verso alcuni microrganismi veicolati dagli alimenti, che rappresentano un serio problema per la salute umana.

Nonostante le numerose indagini riguardanti la frequenza e la quantità di *Campylobacter* nelle carni di pollame sono ancora scarsi i riferimenti in letteratura riguardo la localizzazione del microrganismo sulla carcassa di pollame macellato.

Anche la raccomandazione 2002/24/CE relativa ad un programma coordinato di controlli ufficiali per il 2004, individua la necessità di acquisire informazioni sulla presenza di *Campylobacter* termofili nelle carni avicole per valutare la sicurezza per il consumatore (20).

Lo scopo di questo lavoro è stato definire un protocollo di riconoscimento rapido di *C. jejuni* e *C. coli* da carcasse di pollo durante la macellazione mediante tecniche di indagine molecolare (PCR *multiplex*).

Particolare attenzione è stata posta anche ad evidenziare la localizzazione preferenziale del batterio.

3.8 MATERIALE E METODI

Per la messa a punto della metodica sono stati utilizzati i seguenti ceppi batterici:

1) *Campylobacter jejuni* - CUUG18265

2) *Campylobacter coli* - CUUG11283

forniti dall'Istituto Superiore della Sanità.

La ricerca di *Campylobacter* è stata effettuata su 93 carcasse di pollo provenienti da diversi allevamenti e pervenuti in un unico macello.

Il metodo di campionamento delle carcasse è stato eseguito in accordo con le norme dettate nelle linee guida della Decisione CEE 2001/471 utilizzando il “*metodo distruttivo*”. Per il metodo

distruttivo, occorre prelevare dalla carcassa 4 campioni di tessuto subito dopo le operazioni di macellazione ma prima dell'inizio del raffreddamento della carcassa .

Da ciascuna carcassa sono state prelevate aliquote di cute dalle regioni del collo, della cloaca, del dorso, del petto, con uno strumento sterile di 2 cm x 2,5 cm di lato. Dalle quattro aliquote è stato ottenuto un pool per le analisi. Limitatamente a 22 carcasse i prelievi di cute sono stati effettuati in doppio e analizzati anche separatamente per effettuare una verifica sulle sedi preferenziali di rinvenimento del *Campylobacter* dopo la macellazione. Su tali campioni la ricerca del *Campylobacter* è stata eseguita secondo la metodica consigliata dall'FDA.

I campioni di cute prelevati al macello sono stati posti in modo asettico in provette contenenti *Bolton Selective Broth* in rapporto di 1:10 (campione-arricchimento). Al brodo è stato addizionato un antibiotico (SR0183) per rendere il terreno estremamente selettivo nei confronti del *Campylobacter*, e con *Laked Horse Blood* (SR0048C) che aumenta la fonte di elementi nutritivi a disposizione di microrganismi esigenti.

I campioni prelevati sono stati posti in contenitore isotermico e trasportati in laboratorio nel più breve tempo possibile.

Giunti in laboratorio i campioni sono stati incubati per circa 4 ore a 37°C e poi per 24-48 ore a 42°C, successivamente è stata effettuata la semina su terreni di arricchimento selettivi.

E' importante migliorare la sensibilità delle tecniche di isolamento attraverso l'inserimento di una fase di arricchimento che aumenta il numero di microrganismi disponibili per la crescita in coltura, favorendo la sopravvivenza ed il recupero delle cellule danneggiate in modo subletale. In questo modo il *Campylobacter* può moltiplicarsi fino a livelli evidenziabili nella successiva fase di isolamento su terreno selettivo.

Dopo la crescita nel brodo di arricchimento un'aliquota di 10 µL della brodocoltura di arricchimento è stata prelevata mediante anse e strisciata su terreno selettivo in modo da ottenere colonie ben isolate.

Il terreno selettivo utilizzato per la crescita del *Campylobacter* è stato il *Campylobacter blood-free selective medium* addizionato con supplemento antibiotico CCDA *selective supplement* (SR

155E) che inibisce la crescita di altri batteri.

Il terreno utilizzato è basato sulla composizione descritta da Bolton e coll. (4, 5) ed è utilizzato per isolare esclusivamente *C. jejuni*, *C. coli* e *Campylobacter* termofili resistenti all'acido nalidixico (NARTC) (40) da campioni fecali umani.

Questo terreno, denominato “Agar Desossicolato, Carbone, Cefoperazone” (CCDA) (5) è stato sviluppato per sostituire il sangue (intero o lisato) con carbone, solfato ferroso e sodio piruvato, che hanno anche dimostrato di aumentare la crescita e l'aerotolleranza di *Campylobacter*.

L'aggiunta di cefoperazone aumenta l'inibizione dei contaminanti, mentre l'amfotericina B sopprime lieviti e funghi che possono crescere a 42°C.

Le piastre ottenute sono state poste in microaerofilia (5% di ossigeno, 10% di anidride carbonica e 84-85% di azoto) usando il *Gas Generating Kit* per *Campylobacter* (BR 056 A) ed il catalizzatore attivo (BR 042 A), posti nella giara per anaerobiosi Oxoid (HP 011 A) e incubate per 48 ore a 42°C.

Sulle colonie isolate è stata eseguita la colorazione di Gram, al

fine di evidenziare la presenza di batteri riconducibili morfologicamente al genere *Campylobacter*. La morfologia delle colonie di *Campylobacter* può essere usata come guida per l'identificazione di specie.

I ceppi di *C. jejuni* producono colonie grigie, umide, piatte e sciamanti. Alcuni ceppi possono avere tonalità verde o un aspetto secco con o senza riflessi metallici, le colonie di *C. coli* si presentano come piccole formazioni di colore grigio-crema, umide, leggermente rilevate e spesso ben separate.

Le colonie che presentano morfologia sospetta sono state sottoposte a test biochimici catalasi-ossidasi. Tuttavia i test fenotipici per la differenziazione sono limitati e poco affidabili.

Le tecniche per la caratterizzazione dei ceppi, sierotipizzazione, fagotipizzazione e biotipizzazione forniscono risultati ambigui per la scarsa disponibilità dei reagenti, della non standardizzazione degli stessi e per la presenza di reazioni crociate fra alcuni antigeni.

Per questi motivi negli ultimi anni sono stati effettuati molti studi finalizzati all'identificazione di tecniche alternative di

caratterizzazione a livello genotipico, basati su saggi PCR specifici in grado di identificare contemporaneamente sia *C. jejuni* che *C. coli*. Per la subtipizzazione sono state amplificate sequenze genomiche specie specifiche.

3.9 ESTRAZIONE DEL DNA BATTERICO

Le colonie sospette isolate dal terreno selettivo sono state sottoposte a “*Polimerase Chain Reaction*” o reazione a catena della polimerasi. Per l'estrazione del DNA sono state adoperate le seguenti procedure: dai ceppi di riferimento e quelli sospetti isolati dalle carcasse, conservati a 4°C in *Campylobacter blood-free selective medium*, sono state prelevate le singole colonie che sono state stemperate in 1 mL di acqua bidistillata sterile.

L'omogenato è stato centrifugato a 14.000 r.p.m. per 2 minuti.

Allontanato il sovrantante, il sedimento (*pellet*) è stato risospeso in 200 µL di *PrepMan Ultra Preparation Reagent* (Perkin Elmer) e sottoposto a denaturazione a 100°C per 10 minuti e raffreddato per 2 minuti in ghiaccio. Successivamente la sospensione del *pellet* è stata centrifugata a 14.000 r.p.m. per 3 minuti e 50 µL del

sovranatante, contenente il DNA estratto, sono stati recuperati per la reazione PCR.

3.10 REAZIONE DI AMPLIFICAZIONE (PCR MULTIPLEX)

Nella reazione di PCR *multiplex* sono stati amplificati i segmenti di DNA che codificano per una lipoproteina di membrana di 37 kDa responsabile della virulenza del batterio e comune a tutte le specie del genere *Campylobacter* (adesina) in grado di determinare l'adesività del batterio sulle cellule della mucosa intestinale.

Per differenziare la specie *C. jejuni* è stato amplificato un frammento del DNA specifico per *C. jejuni*, per i *C. coli* è stato invece amplificato un frammento del gene che codifica per una lipoproteina di membrana coinvolta nel trasporto dello ione ferro.

I *primers* utilizzati per la reazione sono stati i seguenti.

1) cad F2B (400pb) , cad R1B (400pb) per il genere (27):

F- TTGAAGGTAATTTAGATATG

R- CTAATACCTAAAGTTGAAAG

2) Col 1(894pb) , Col 2 (894pb) per la specie C. Coli (19) :

F-ATGAAAAAATATTTAGTTTTTGCA

R-ATTTTATTATTTGTAGCAGCG

3) C1 (160pb) , C4 (160pb) per la specie C. Jejuni (44) :

F-CAAATAAAGTTAGAGGTAGAATGT

R-GGATAAGCACTAGCTAGCTGAT

La reazione di amplificazione è stata condotta in Robocycler 96

(Stratagene) utilizzando 50µL di miscela sterile costituita da:

1) 1X PCR Buffer Plus (Invitogen)

2) 5 ng del DNA estratto

3) MgCl₂ 1.5 mM

4) 0.1% Triton X-100

5) 200 µL di dNTP

6) 0.4 µL di ogni coppia di primers

7) 1.2 U di Taq DNA polymerase (Invitrogen)

La reazione è stata ripetuta per 30 cicli ed ogni ciclo ha effettuato

le reazioni di :

1) Denaturazione a 94°C per 1 minuto

2) *Annealing* a 52°C per 1 minuto

3) *Extension* a 72°C per 1 minuto

Il primo ciclo è stato preceduto da una denaturazione condotta a 94°C per 4 minuti.

Al termine dei 30 cicli è stata eseguita una *extension* a 72°C per 5 minuti.

I prodotti di elettroforesi sono stati poi separati mediante elettroforesi in gel di agarosio (1,5%) a 70 V e visualizzati mediante transilluminatore UV, previa colorazione con bromuro di etidio. Per la corsa elettroforetica come punto di riferimento è stato utilizzato un *ladder* di 100pb.

3.11 ELETTROFORESI IN GEL DI AGAROSIO

L'elettroforesi su gel di agarosio è un metodo utilizzato per separare, identificare e purificare frammenti di DNA e RNA.

Questa tecnica è semplice, veloce e può risolvere frammenti che non vengono separati adeguatamente da altre procedure, come la centrifugazione su gradiente di densità.

E' possibile visualizzare direttamente, mediante colorazione con il colorante fluorescente bromuro di etidio ed esame in luce ultravioletta (UV), bande di DNA fino a 1-10 ng di DNA. Se necessario, le bande di DNA possono essere recuperate dal gel e sottoposte a manipolazioni enzimatiche successive. E' possibile versare gel in diverse forme e dimensioni; la porosità dipende dalla concentrazione di agarosio utilizzata ed influenza il potere di risoluzione. Il parametro più importante da considerare è la dimensione delle molecole da separare. Il gel di agarosio ha un buon potere di risoluzione ed una gamma di separazione molto ampia (globalmente da 100bp a 50kb); lo specifico intervallo di risoluzione varia a seconda della concentrazione di agarosio. Normalmente la direzione e la forza del campo elettrico vengono mantenuti costanti durante la corsa. I frammenti di DNA di dimensioni maggiori, fino a 10.000 kb, possono essere utilizzati con una tecnica di elettroforesi che impiega variazioni cicliche della direzione del campo elettrico (*pulsed-field*, elettroforesi su gel a campi pulsanti).

L'agarosio è uno glucide estratto da un'alga marina, è un polimero

di unità costituito da D-galattosio e 3,6-anidro L-galattosio.

Attualmente le preparazioni standard del commercio hanno quantitativi minimi di contaminanti. Forme di agarosio chimicamente modificate gelificano e fondono a basse temperature senza che si abbia perdita di resistenza meccanica del gel, queste forme vengono usate per elettroforesi preparativa del DNA e per la digestione *in situ*.

3.12 RISULTATI E CONCLUSIONI

La tecnica PCR *multiplex*, applicata ai ceppi batterici di riferimento, ha consentito di differenziare *C. jejuni* da *C. coli*.

Tale tecnica applicata alle colonie sospette, dopo isolamento su terreno selettivo, ha evidenziato la presenza di *Campylobacter jejuni* in 35 carcasse di pollo, pari a 37,6% dei campioni esaminati, non sono mai stati riscontrati invece i *Campylobacter coli*.

Di ogni carcassa sono state analizzate 4 regioni: petto, cloaca, collo, dorso. La regione della carcassa maggiormente contaminata è stata il collo (9 carcasse sono risultate positive pari al 40,9% dei

soggetti esaminati), seguita dalle regioni della cloaca (7 carcasse positive pari al 31,8% dei soggetti esaminati), del petto (6 carcasse positive pari al 27,3% dei soggetti esaminati) ed infine del dorso (5 carcasse positive pari al 22,7% dei soggetti esaminati).

E' possibile affermare che la tecnica utilizzata è utile e adatta alla ricerca di *Campylobacter* in particolare per *C. jejuni* e *C. coli*.

Il tempo richiesto per il test (*max* 30 ore dal ricevimento del campione) è notevolmente inferiore rispetto a quello necessario per le metodiche tradizionali di isolamento e di identificazione, e quindi può consentire ai laboratori una più rapida valutazione delle condizioni sanitarie delle carni avicole dando maggiori garanzie ai consumatori.

Il lavoro svolto ha confermato il ruolo del pollo come diffusore di *Campylobacter spp.*.

L'isolamento di stipiti di *Campylobacter spp.* a livello cloacale e cutaneo testimonia sia la possibilità sia di auto-contaminazione sia di contaminazione crociata, che si verifica durante le operazioni di macellazione, tra portatori intestinali e non, nonché

tra soggetti contaminati e non (6).

Particolarmente oculata sembra pertanto la Raccomandazione 2004/24/CE, che fornisce importanti informazioni in merito alla diffusione di *Campylobacter* termofili nei macelli e di stabilire quali siano le condizioni strutturali o di operatività che ne favoriscono la diffusione e l'eventuale annidamento.



Lanes 1-16= Ladder 100 bp

Lanes 2-3-4= *Campylobacter coli* (primers COL1- COL2 849bp)

Lanes 5-6-7= *Campylobacter jejuni* (primers C1-C4 169bp)

Lanes 8-9-10= *Campylobacter coli* (primers CADF-CADR 400bp)

Lanes 11-12-13= *Campylobacter jejuni* (primers CADF-CADR 400bp)

Lanes 14= *Campylobacter coli* (primers COL1-COL2/CADF-CADR/C1-C4)

Lanes 15= *Campylobacter jejuni* (primers C1-C4/CADF-CADR/COL1-COL2)

Ceppi di referenza testati mediante PCR convenzionale e PCR *multiplex*

CAPITOLO IV

**RICERCA DI *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 ED ALTRI
BATTERI PRODUTTORI DI VEROCITOTOSSINE IN
MYTILUS GALLOPROVINCIALIS MEDIANTE TECNICA
PCR MULTIPLEX**

4.1 GENERALITA'

Escherichia coli appartiene alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* che comprende generi patogeni per gli animali e per l'uomo (*Escherichia spp.*, *Salmonella spp.*, *Yersina spp.*), patogeni opportunisti (*Citrobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Shigella spp.*), ed altri ancora dal significato patogeno incerto.

Il genere *Escherichia* comprende microrganismi di forma allungata e diritta (1,1-1,5 x 2,0-6,0 μm), disposti in singoli elementi o a coppia, Gram negativi, peritrichi, anaerobi facoltativi, a metabolismo sia respiratorio che fermentativo.

Il genere *Escherichia* comprende diverse specie:

- *E. coli*
- *E. fergusonii*
- *E. vulneris*
- *E. adecarboxilate*
- *E. blattae*
- *E. hermani.*

Tutte queste specie menzionate sono state isolate in casi clinici ad eccezione della *E. blattae* isolato dal tratto intestinale dello scarafaggio.

La specie *E. coli* è presente nella porzione distale dell'intestino degli omeotermi e viene eliminata con le feci, ne deriva che la sua presenza nell'ambiente e negli alimenti è da considerare come indice di contaminazione fecale.

E. coli isolato al di fuori dell'intestino presenta spesso una capsula o microcapsula polisaccaridica.

Cresce rapidamente sui comuni terreni colturali, in agar produce colonie lisce, leggermente convesse, umide, con margini netti, grigiastri e facilmente emulsionabili, oppure colonie rugose, secche e non emulsionabili; è possibile riscontrare anche alcune colonie mucose. La crescita in brodo, se in fase S, determina un intorbidimento uniforme del mezzo con deposito sul fondo che, dopo agitazione, si risospende facilmente; le forme in fase R danno invece origine ad un anello superficiale e ad un deposito sul fondo che anche in seguito ad agitazione non si risospende.

Ad *Escherichia coli* appartengono sia ceppi comuni abitatori

dell'intestino di uomini ed animali, sia ceppi patogeni responsabili di mastite nelle bovine, setticemie emorragiche nei suini, e di forme enteriche, di infezioni endogene delle vie urinarie, della sindrome uremico-emolitica, meningiti, malattie immunologiche e artriti reumatoidi nell'uomo.

La maggior parte degli autori (33) classifica i ceppi patogeni in base alla virulenza, alla modalità d'azione sulla mucosa intestinale, epidemiologia e sintomatologia clinica, così da riconoscere cinque gruppi principali:

- *Escherichia coli* Enteropatogeni o EPEC;
- *Escherichia coli* Enterotossigeni o ETEC;
- *Escherichia coli* Enteroinvasivi o EIEC;
- *Escherichia coli* Enteroaggregativi o EaggEC;
- *Escherichia coli* Enteroemorragici o EHEC.

Ogni gruppo possiede particolari fattori di patogenicità e ogni fattore di patogenicità è codificato da geni in molti casi già clonati e utilizzati per la produzione di sonde specifiche.

I) *E. coli* Enterotossigeni (ETEC)

Tali stipiti sono stati evidenziati per la prima volta a Calcutta nel 1971 e costituiscono la principale causa di diarrea infantile nei paesi in via di sviluppo; sono inoltre gli agenti più frequentemente responsabili della così detta “Diarrea del viaggiatore”.

Determinano una diarrea acquosa con nausea, crampi addominali e febbre di modesta entità.

Gli stipiti ETEC sono provvisti di adesine (fimbrie) specifiche per la mucosa intestinale e devono la loro patogenicità alla produzione di due potenti enterotossine di cui una termolabile (LT) ed una termostabile (ST), responsabili della secrezione di liquidi nell'intestino e della conseguente diarrea.

La tossina LT possiede il 75% degli amminoacidi in comune con la tossina del colera (CT) e può provocare la comparsa di manifestazioni diarroiche della stessa gravità di quelle coleriche.

• II) *E. coli* Enteroinvasivi (EIEC)

Tali stipiti prediligono la mucosa del colon e sono responsabili di una forma dissenterica (*Shigella-like*) caratterizzata clinicamente da febbre, intensi crampi addominali, malessere, emissione di feci prima liquide e poi sanguinolenti ricche in elementi polimorfonucleati. La capacità di invasione è dovuta alla presenza di una proteina di membrana che codifica per un plasmide di circa 140 MDa che aderisce alla mucosa dell'intestino crasso.

La differenza tra *E. coli* e *Shigella* è che quest'ultima presenta una maggiore patogenicità rispetto ai gruppi EIEC, dal momento che è più resistente all'ambiente gastrico visto che le proteine di membrana hanno una struttura diversa.

L'uomo è il principale serbatoio di EIEC ed i sierogruppi più frequentemente associati a malattie sono: O28, O29, O112, O124, O136, O143.

- **III) *E. coli* Enteroggregativi (EaggEC)**

Tali batteri sono associati a diarrea persistente nei bambini. La

loro principale caratteristica è quella di produrre un particolare tipo di aderenza aggregativa nei confronti delle cellule dell'epitelio intestinale, associate alla presenza di un fattore di aderenza (AAF/I). Il gene AAF/I è presente in un plasmide di 60 MDa.

- **IV) *E. coli* Enteropatogeni (EPEC)**

I batteri appartenenti a questo gruppo sono stati i primi ad essere riconosciuti come responsabili di patologie intestinali tenendo conto delle epidemiologie.

I batteri di questo gruppo presentano attività patogena anche se non producono tossine. Il carattere “adesività localizzata” è situato in un fattore EAF (*EPEC Adherence Factor*) codificante per una proteina di membrana esterna di 94 KDa. Tale proteina è una fimbria di adesione che innesca l'adesione alle cellule in microcolonie compatte.

- **V) *E. coli* Enteroemorragici (EHEC)**

Gli *E. coli* Enteroemorragici sono caratterizzati dalla capacità di elaborare due potenti citotossine *Shiga-like* (SLT-1 e SLT-2) (39), così chiamate perché molto simili alla tossina prodotta da *Shigella Dysenteriae*, dette anche Verocitotossine (VT-1 e VT-2). Tali tossine sono in grado di provocare lesioni cellulari. I batteri appartenenti a questo gruppo causano coliti emorragiche accompagnate da diarrea sanguinolenta, con l'eliminazione delle tossine possono essere interessati anche organi bersaglio molto distanti come il sistema nervoso centrale, la complicanza più grave è rappresentata dalla sindrome uremica emolitica.

Negli animali gli EHEC sono in grado di colonizzare il tratto terminale dell'ileo, il cieco ed il colon.

- ***E. coli* O157:H7**

Il microrganismo principalmente responsabile della colite emorragica e della sindrome uremico emolitica è stato identificato

nel 1982 (34-37-38) come *Escherichia coli* O157:H7 in occasione di un'epidemia verificatasi nel Nord America in seguito al consumo di *hamburger* contaminati.

E' considerato capostipite di un sottogruppo di batteri in grado di produrre verocitotossine (VT) classificato come Ceppo Enteroemorragico Verocitotossico (VTEC).

I ceppi VTEC sono in grado di elaborare due differenti tipi di tossine: VT1 e VT2, entrambe correlate con la tossina prodotta da *Shigella Disenteriae* tipo 1.

I caratteri distintivi del sierotipo O157:H7 sono la mancata capacità di fermentare il sorbitolo e la negatività alla prova d'idrolisi del MUG (4-metilumbelliferil beta-D-glucuronide), anche se si sono avuti dei falsi positivi alla prova del sorbitolo e questo può essere attribuito alle notevoli capacità di mutazione attribuite a tale batterio.

Recenti indagini hanno messo in evidenza una nuova caratteristica del ceppo O157:H7, infatti se le cellule batteriche sono esposte a temperature leggermente superiori a quelle di crescita (45°C), queste sono in grado di sintetizzare rapidamente

un pool di proteine dette *Heat Shock Proteins* (HSPs) che da loro termo-tolleranza ovvero aumenta la capacità di sopportare trattamenti termici letali in condizioni normali. Per quanto riguarda le basse temperature si è osservato che tale patogeno è in grado di resistere anche per tempi relativamente lunghi senza variazioni significative nella carica infettante.

Un'importante caratteristica dei ceppi VTEC, che può incidere sulla loro capacità di colonizzare l'intestino umano, soprattutto a basse dosi di infezione, è la resistenza all'acidità dello stomaco. È noto che l'esposizione di batteri enterici ad un pH basso causa una risposta acido-tollerante e questo ha dimostrato di aumentare la sopravvivenza di O157:H7 in alimenti moderatamente acidi.

I ceppi VTEC possono essere classificati in tre sottocategorie (31):

- Produttori di tossina in traccia;
- Produttori di tossina a bassi livelli;
- Produttori di tossina ad alti livelli.

Strutturalmente le tossine sono costituite da due subunità, una detta A (attiva) (32) e cinque B (*binding*) leganti. La tossina si

lega ad un recettore specifico sulla superficie cellulare grazie alla subunità B.

Il recettore è stato identificato a livello della zona corticale del rene dell'uomo, questa scoperta è importante per correlare il recettore funzionale di VT-1 e di VT-2 al ruolo eziologico del microrganismo nella sindrome uremico-emolitica. Successivamente la subunità A viene interiorizzata ed interagisce con specifici componenti della struttura cellulare.

Esistono delle differenze tra i termini “tossina *Shiga-like* (SLT)” e “verocitotossina (VT)”. I geni della *Shiga* tossina e della VT-1 hanno caratteristiche in comune per oltre il 90%, i geni della VT-1 e VT-2 presentano analogie solo per il 60%, da ciò si deduce che gli antisieri contro la VT-1 e la *Shiga* tossina non neutralizzano la VT-2.

Escherichia coli O157:H7 è caratterizzato anche dalla presenza di un plasmide di 60 MDa che codifica per altri fattori di virulenza e quindi va ad influenzare quella che è la patogenicità del batterio.

L'antigene flagellare H7 aumenta la virulenza del sierotipo O157 in vari modi. Questo infatti facilita il superamento dello strato di

muco che riveste le mucose e quindi facilita l'adesione e la colonizzazione, inoltre permette l'attività chemiotassica ed accelera la dispersione delle cellule in un mezzo liquido facilitandone il contatto sia con materiale nutritivo sia con altre cellule.

Escherichia coli O157:H7 presenta dei pili di adesione attraverso i quali si realizza l'attacco alle cellule intestinali, in particolare nell'intestino dove tale patogeno elabora tossine che sono causa forme di colite emorragica o HC e di sindrome uremico-emolitica o HUS e porpora trombocitopenica o TPP.

4.2 EPIDEMIOLOGIA

L'infezione da *E. coli* O157:H7 è causata dal consumo di bevande ed alimenti contaminati. L'ingestione di carne cruda o poco cotta rappresenta la prima causa, infatti il bovino è considerato serbatoio naturale di tale patogeno che vive a livello intestinale. Le feci bovine contaminano le derrate alimentari e durante la macellazione si può avere contaminazione della carcassa con

materiale fecale. L'escrezione del patogeno, di durata variabile ed intermittente, fa sì che l'infezione persista per lungo tempo nell'allevamento, inoltre si è riscontrato che il numero di soggetti escretori aumenta nei mesi estivi.

Oltre al bovino tale batterio è stato riscontrato anche nelle feci di suini, agnelli e polli.

Anche altri alimenti sono causa di contagio, tra questi si ricorda il latte non pastorizzato o ricontaminato dopo il trattamento termico (29), i vegetali e la frutta contaminati da liquami, l'acqua contaminata con materiale fecale (18), inoltre la contaminazione può avvenire anche tra persone infette.

E' possibile anche una contaminazione dei prodotti della pesca ed in particolare molluschi eduli lamellibranchi, che sono veicolo di malattie alimentari acute nell'uomo. Si è dimostrato comunque che gli alimenti di origine marina non rappresentano la fonte più pericolosa di malattie alimentari per l'uomo, infatti, la maggior parte di epidemie è stata causata dall'ingestione di prodotti crudi o poco cotti ed inoltre è ipotizzabile che la contaminazione dei prodotti della pesca da *E. coli* O157:H7 avvenga in seguito

all'inquinamento da corpi idrici superficiali e profondi da parte di scarichi fognari o di liquami zootecnici.

La produzione e l'immissione sul mercato dei molluschi bivalve è regolata dal Reg. CE 853/2004 (*Sez. 7 molluschi bivalve*) in base al quale i molluschi bivalve devono soddisfare alcuni requisiti:

- 1) possedere caratteristiche di freschezza, essere vivi e vitali, presentare gusci privi di sudiciume;
- 2) contenere meno di 300 coliformi fecali o meno di 230 *E. coli* per 100 grammi di polpa e di liquido intervalvare;
- 3) essere privi di salmonella in 25 grammi di polpa;
- 4) non contenere sostanze tossiche o nocive di origine naturale o immesse nell'ambiente elencate nell'allegato A del Decreto Legislativo 27/1/1992 n. 131, in quantità tali che l'assunzione di alimenti calcolata superi la dose giornaliera ammissibile (DGA) per l'uomo o tali da alterare il gusto dei molluschi;
- 5) contenere biotossine algali del tipo PSP (*Paralytic Shellfish Poison*) in quantità non superiore a 80 microgrammi per 100 grammi di polpa;

6) non dare risposta positiva per le tossine DSP (*Diarrhetic Shellfish Poison*).

Nel Reg. CE 853/2004 (*Sez. 7 molluschi bivalve*) sono fissati i requisiti relativi al confezionamento, alla bollatura, al trasporto fino all'immissione sul mercato del prodotto vivo e vitale ed inoltre mette in evidenza l'importanza del controllo sanitario e della sorveglianza della produzione al fine di evitare eventuali infrazioni circa la loro provenienza e destinazione e comporta la verifica periodica dei requisiti microbiologici dei molluschi e delle acque dove questi ultimi sono prodotti o tabulati.

4.3 PATOGENESI E SINTOMATOLOGIA

L'uomo contrae l'infezione per via orale, il germe ha buone possibilità di superare la barriera dello stomaco e di colonizzare l'intestino in quanto resiste al pH acido dello stomaco. Il microrganismo una volta giunto nell'intestino aderisce e colonizza la mucosa intestinale, grazie ad un meccanismo noto come "*Attaching-effacing*". Successivamente *E. coli* O157:H7 produce

le verocitotossine che vengono assorbite e riversate in circolo causando nell'uomo alterazioni sia a livello intestinale che sistemico (15). La patologia da *E. coli* O157:H7 si caratterizza per la comparsa di: Colite Emorragica, Sindrome Emolitico-Uremica (HUS), Porpora Trombotica Trombocitopenica (TTP), in alcuni casi però può aversi una forma asintomatica.

La Colite emorragica si manifesta con la comparsa di improvvisi dolori addominali, diarrea acquosa nelle prime 24 ore che poi diventa emorragica, nausea, vomito ma non si ha febbre. La febbre infatti è un sintomo differenziale molto importante che ci permette di fare una diagnosi differenziale da *E. coli* e da *Shigella dysenteriae*.

La Sindrome uremico emolitica colpisce principalmente immunodepressi, anziani e bambini. La sindrome è caratterizzata da una classica sintomatologia: insufficienza renale acuta, trombocitopenia ed anemia emolitica microangiopatica (25). I pazienti colpiti devono sottoporsi a dialisi e continue trasfusioni. Possono ancora presentarsi complicanze a livello cardiaco e del SNC.

La Porpora Trombotica Trombocitopenica (TTP) causa danni vascolari molto gravi, la sintomatologia è simile alla Sindrome uremico-emolitica ma presenta una maggiore gravità ed il costante coinvolgimento del sistema nervoso centrale.

L'infezione da *E. coli* O157:H7 può portare anche altri sintomi tra cui cistiti, balaniti, balanopostiti emorragiche e convulsioni (17) .

Dal momento che non esiste in Italia la notifica obbligatoria dei casi di infezione da VTEC O157 e/o dei casi di sindrome uremico-emolitica, la sorveglianza è basata su iniziative volontarie, come:

- 1) sistema di sorveglianza nazionale della HUS in età pediatrica;
- 2) programma di sorveglianza delle diarree emorragiche portato avanti dall'ISS in collaborazione con l'Associazione Microbiologici Clinici Italiani.

4.4 METODI DI RICERCA DI *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 E DI CEPPI VTEC

La dose infettante di *E. coli* O157:H7 è molto bassa e per questo è importante rilevare anche piccole quantità di patogeno. Un brodo selettivo idoneo all'arricchimento dei VTEC O157:H7 è il *Tryptone Soya Broth* al quale vengono aggiunti come antibiotici la novobiocina o l'acriflevina per contrastare lo sviluppo di batteri Gram positivi. Dopo la crescita nel brodo di arricchimento sono stati proposti ed utilizzati diversi metodi per individuare i ceppi di *E. coli* O157:H7. La tecnica più utilizzata prevede che un'aliquota della brodocoltura di arricchimento venga seminata in terreno solido utilizzando il *Sorbitol MacConkey agar* che è una variante del classico *MacConkey agar* in cui, al posto del lattosio è presente lo 0,1% di D-sorbitolo. Le colonie visualizzate appaiono incolori al contrario di quelle sorbitolo fermentanti che assumono una colorazione rossa (18). Tuttavia questo non permette di distinguere i VTEC O157:H7 da altri ceppi di *E. coli* sorbitolo negativi o altri non fermentanti e questo può portare a falsi positivi.

Esistono però rari ceppi di *E. coli* O157:H7 che fermentano il sorbitolo e che di conseguenza darebbero dei risultati falsi positivi a causa della formazione di colonie di color rosso porpora.

Nel 1990 Thompson e coll. (43), hanno messo a punto un test fluorogeno di rapida esecuzione, basato sull'utilizzo del 4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide (MUG) (33) che viene idrolizzato nel composto fluorogeno metilumbelliferone da parte dell'enzima β -glucuronidasi. *E. coli* O157:H7 è glucuronidasi negativo, ovviamente ci sono sempre delle eccezioni, mentre la quasi totalità dei ceppi di *E. coli* (96%) è glucuronidasi positiva. Il test viene eseguito stemperando la patina batterica in una soluzione contenente MUG ed acqua distillata (100 mg di MUG per litro di acqua distillata sterile). Dopo incubazione a 37°C per 4-5 ore la comparsa di fluorescenza azzurra alla luce di Wood sta ad indicare una reazione positiva. Altra metodica è stata proposta da Zadick e coll. (46), nel quale al *Sorbitol MacConkey agar* viene aggiunto cefexime (0,05 mg/l) e tellurito (2,5 mg/l), in quanto le minime concentrazioni inibenti (MIC) per questi composti sono più elevate per i VTEC O157 rispetto agli altri

stipiti di *E. coli* e ad altri batteri enterici sorbitolo negativi, quali *Aeromonas spp.*, *Plesiomonas spp.*, *Morganella morganii*.

La metodica più accreditata è basata su una fase di arricchimento del campione in mTSB seguita dalla separazione immunomagnetica e dalla successiva piastratura di 100 microlitri della soluzione tampone contenente le palline immunomagnetiche specifiche per *E. coli* O157:H7 sul terreno Cefexime Tellurito *Sorbitol MacConkey agar* (CT-SMAC). I risultati devono essere poi confermati con test biochimici e sottoposte ad indagini sierologiche utilizzando sieri anti O ed anti H. Allo scopo di identificare meglio il batterio si utilizzano comunemente i sistemi miniaturizzati Api 20E (bioMérieux), enterotube (Roche) o Microbact 12A (Med Vet) che in sole 24 ore possono portare alla corretta identificazione di specie. Recentemente sono stati messi a punto alcuni kit per l'agglutinazione al lattice del sierogruppo O157 che riescono a stabilire l'appartenenza del ceppo isolato al sierotipo O157:H7. Per l'identificazione dei VTEC vengono impiegate sonde polinucleotidiche derivate da geni clonati di VT1 e VT2. Recentemente è stato clonato e sequenziato il gene eaeA

di *E. coli* O157:H7, quindi è stata costituita una sonda a partire da questo gene che permette di identificare i sierotipi che lo posseggono. Questo permette la determinazione di VTEC O157 senza dover ricorrere a metodiche immunologiche che spesso danno reazioni crociate.

4.5 SEPARAZIONE IMMUNOMAGNETICA (IMS)

Questa tecnica sembra essere molto efficace in quanto diminuisce il tempo di analisi ed aumenta la soglia di ritrovamento (43). Tale tecnica rappresenta un arricchimento selettivo fisico necessario per il miglioramento dei metodi colturali convenzionali. Tale tecnica consiste nell'utilizzo di microsfere paramagnetiche in polistirene con diametro di 2,8 µm coniugate con una miscela di anticorpi policlonali purificati per affinità, specifici per l'antigene somatico O157, sospese in PBS ph 7,4 con aggiunta di BSA (sieroalbumina bovina) 0,1% e Sodio azide 0,02%. Le *Dynabeads* anti-*E. coli* O157 permettono la concentrazione selettiva rapida di *E. coli* O157:H7. Quando le particelle vengono aggiunte alla brodocultura dei campioni da analizzare, *E. coli* O157:H7 viene

catturato dagli anticorpi adesi sulla superficie delle biglie magnetiche che vengono isolati mediante un concentratore magnetico di particelle.

Così i microrganismi vengono separati sia dalle particelle alimentari che da altri microrganismi presenti nel campione che potrebbero interferire negativamente con la prova analitica.

Le cellule batteriche legate al magnete vengono risospese poi in un volume di soluzione tampone ridotto che, successivamente viene seminato su terreni selettivi specifici (44).

4.6 POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

Nel controllo della qualità degli alimenti, questa tecnica permette di stabilire se un alimento è venuto in contatto con patogeni anche dopo la loro distruzione termica.

4.7 SCOPO DELLA SPERIMENTAZIONE

Negli ultimi anni è stata posta una maggiore attenzione verso alcuni microrganismi veicolati dagli alimenti che rappresentano un serio problema per la salute pubblica. In particolare sono stati

studiati ceppi di *E. coli* produttori di verocitotossine che provocano malattie gastrointestinali caratterizzate da elevata mortalità e morbilità. Solo di recente si è riconosciuto il ruolo patogeno per l'uomo di *E. coli* O157:H7 responsabile di tossinfezione connessa al consumo di alimenti contaminati, per lo più di origine animale. Scopo di questa tesi è stato quello di ricercare *E. coli* O157:H7 ed altri batteri produttori di verocitotossine, in campioni di *Mytilus galloprovincialis* reperiti sul mercato. Su questi campioni la ricerca del patogeno è stata effettuata impiegando la tecnica sperimentale PCR *multiplex*.

4.8 MATERIALE E METODI

La ricerca di *E. coli* O157:H7 è stata effettuata su 110 campioni di *Mytilus galloprovincialis* acquistati presso alcuni rivenditori della regione Campania.

Da circa 100 g di prodotto sono state prelevate 25 mL di aliquota ed omogenizzate in 225 mL di brodo di pre-arricchimento addizionato con antibiotico (33) quale *Tryptone Soya Broth* e poi incubate a 35°C per 24 h (arricchimento). Per i saggi preliminari

della tecnica PCR *multyplex* sono stati utilizzati i seguenti ceppi batterici: - EDL933 (O157:H7, VT1+, VT2+, eae+); - H30 (O26:H11, VT1+, eae+); - E32511 (O157:NM, VT2+, eae+); - D228 (O157:H4, VT-, eae-), forniti dall'Istituto Superiore di Sanità.

Le colonie sospette sono state sottoposte a *Polymerase Chain Reaction*, inoltre tale tecnica è stata utilizzata anche per il DNA ottenuto a partire da un'aliquota del brodo di arricchimento di ciascun campione.

Per l'estrazione del DNA sono state adoperate le seguenti procedure:

- dai ceppi di riferimento e dai campioni sospetti è stato prelevato un piccolo quantitativo di patina microbica che è stata posta in 50 µL di acqua bidistillata sterile e sottoposto poi a denaturazione a 99°C per 10'. Il DNA ottenuto è stato poi utilizzato per la PCR;
- dai campioni di *Mytilus galloprovincialis* è stata prelevata un'aliquota di 1 mL della brodocoltura di pre-arricchimento e

posta in un *ependorf* da 2 mL, è stata effettuata poi a centrifugazione per 3' alla velocità massima. Il pellet che si è formato adeso alle pareti dell'*ependorf* è stato poi risospeso in 200 µL di *PrepMan Ultra Sample Preparation Reagent* (Perkin Elmer) previa asportazione del surnatante. Il campione è stato sottoposto a denaturazione per 10' e subito dopo in ghiaccio per 2'. Dopo aver effettuato una centrifugazione a velocità massima sono stati prelevati 50 µL del surnatante contenente il DNA estratto e poi è stata eseguita la PCR.

4.9 REAZIONE DI AMPLIFICAZIONE (PCR *MULTYPLEX*)

Per effettuare tale reazione sono stati utilizzati i seguenti *primers*:

SLT1(210bp) per la verocitotossina VT1:

F-TGTA ACTGGAAAGGTGGAGTATACA

R-GCTATTCTGAGTCAACGAAAAATAAC

SLT2 (484bp) per la verocitotossina VT2:

F-GTTTTTCTTCGGTATCCTATTCC

R-GATGCATCTCTGGTCATTGTATTAC

MFS1 (166bp) per il DNA plasmidico:

F-CTTCACGTCACCATACATAT

R-ACGATGTGGTTTATTCTGGA

FLICH7 (650bp) per l'antigene flagellare H7:

F-GCGCTGTCGAAGTTCTATCGAGC

R-CAACGGTGACTTTATCGCCATTCC

La reazione di amplificazione è stata effettuata utilizzando una miscela di 50 µL costituita da:

- 1X PCR Buffer Plus (Invitrogen)
- 2 μ L del DNA estratto
- $MgCl_2$
- 0,1% di Triton X-100
- 400 μ M di ogni dNTP
- 0,5 μ M di ogni coppia di primers
- 2,5 U di Taq polymerase

I prodotti di amplificazione sono stati separati mediante elettroforesi in gel di agarosio all'1,5% a 70 V e visualizzati mediante transilluminatore UV, previa colorazione con bromuro di etidio. Come punto di riferimento è stato utilizzato un *ladder* (Invitrogen) di 100 bp.

4.10 RISULTATI E CONCLUSIONI

L'analisi mediante separazione immunomagnetica non ha dato risultati interpretabili in modo inequivocabile, infatti, spesso ha evidenziato reazioni debolmente positive. Pertanto le colonie sospette sono state analizzate mediante la tecnica PCR *multiplex*.

Tale tecnica precedentemente applicata ai ceppi batterici di riferimento, ha consentito di differenziare *E. coli* O157:H7 da altri sierotipi che presentavano analogie per una o più caratteristiche del genoma (figura 1). Inoltre è stato sempre possibile identificare gli stessi ceppi batterici sperimentalmente inoculati in mitili (figure 2 e 3). La PCR *multiplex*, è stata pertanto applicata alle colonie sospette ottenute dopo separazione immunomagnetica, dai campioni di *Mytilus galloprovincialis* reperiti sul mercato.

Dalle analisi svolte si è dimostrato che *E. coli* O157:H7 è risultata sempre assente in questi campioni. In un solo caso è stata accertata la presenza di una banda di amplificazione riferibile alla verotossina SLT-2 (484 bp) (figura 4), indicativa della presenza di un ceppo di *E. coli* verocitotossico (VTEC). L'individuazione di questo ceppo, reso possibile dall'uso di una sonda oligonucleotidica, non ha trovato conferma nel corso di procedure di isolamento microbiologico tradizionali. Infatti i ceppi VTEC conosciuti, differenti da O157:H7, presentano caratteristiche biochimiche e morfologiche del tutto simili a quelle dei coli non patogeni. Per quanto riguarda l'identificazione dei ceppi VTEC i

pareri dei ricercatori sono discordi, secondo alcuni infatti è necessario condurre indagini mirate per la ricerca di *E. coli* O157:H7, invece per altri è importante ricercare tutti gli *E. coli* enterotossici in quanto potenzialmente pericolosi (12).

A differenza di altri patogeni anche pochi *E. coli* O157:H7 sono in grado di causare malattia nell'uomo per cui la moltiplicazione di questo batterio negli alimenti non sembra essere un prerequisito per la malattia. La PCR *multyplex* descritta presenta un alto grado di sensibilità e specificità e può essere applicata alla ricerca di ceppi VTEC con particolare riferimento al sierotipo O157:H7. Il tempo richiesto per il test (max 30 h dal ricevimento del campione) è inferiore al tempo richiesto per le metodiche tradizionali di isolamento ed identificazione e può consentire ai laboratori ed agli impianti di depurazione una più rapida valutazione delle condizioni sanitarie dei mitili, aumentando le garanzie per la salute del consumatore.

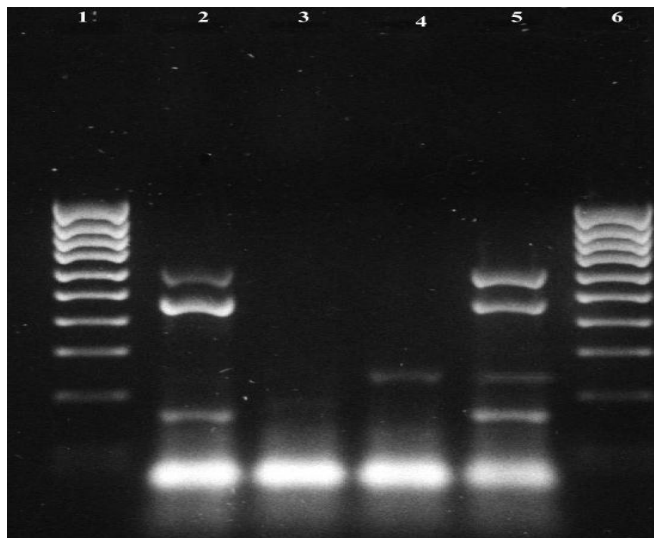


Figura 1
Colture pure:
 Lane 1-6: ladder 100bp
 Lane 2: Ceppo E. Coli E32511
 Lane 3: Ceppo E. Coli D228
 Lane 4: Ceppo E. Coli H30
 Lane 5: Ceppo E. Coli EDL 933

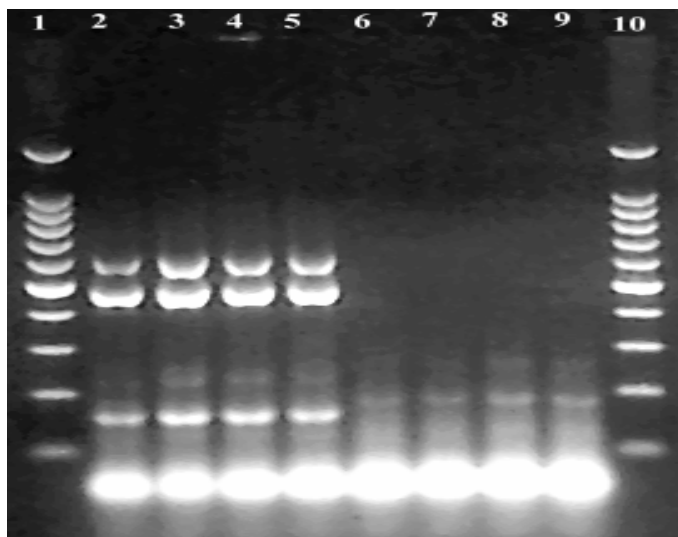


Fig.2
Campioni di mitili inoculati con ceppo E.coli E32511 e con ceppo E.coli D228 a diluizioni scalari:

- Lane1: Ladder 100bp
- Lane 2: Campione di mitili inoculato con ceppo E.coli E32511 1 UFC/ml
- Lane 3: Campione di mitili inoculato con ceppo E.coli E32511 10 UFC/ml
- Lane 4: Campione di mitili inoculato con ceppo E.coli E32511 100 UFC/ml
- Lane 5: Campione di mitili inoculato con ceppo E.coli E32511 1000 UFC/ml
- Lane 6: Campione di mitili inoculato con ceppo E.coli D228 1 UFC/ml
- Lane 7: Campione di mitili inoculato con ceppo E.coli D228 10 UFC/ml
- Lane 8: Campione di mitili inoculato con ceppo E.coli D228 100 UFC/ml
- Lane 9: Campione di mitili inoculato con ceppo E.coli D228 1000 UFC/ml

Ceppo E.coli E32511 (O157:NM; VT2⁺; eae⁺)
Ceppo E.coli D228 (O157:H4; VT⁻; eae⁻)

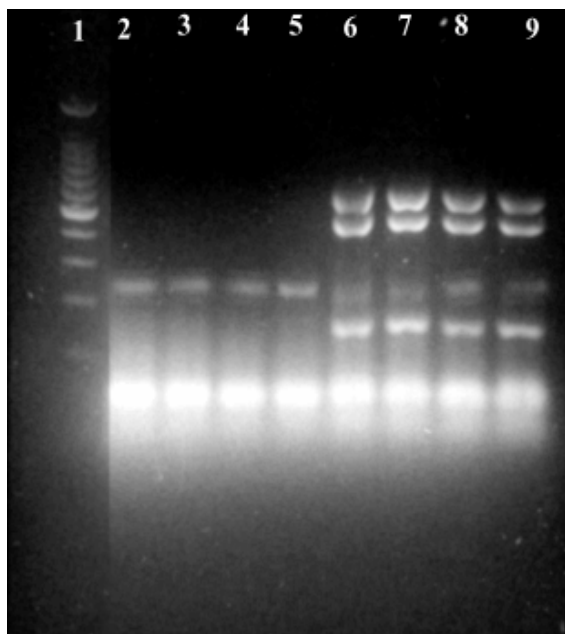


Fig.3

Campioni di mitili inoculati con ceppo E.coli H30 e con ceppo E.coli EDL933 a diluizioni scalari:

Lane1: Ladder 100bp

Lane 2: Campione di mitili inoculato con ceppo E.coli H30 UFC/ml

Lane 3: Campione di mitili inoculato con ceppo E.coli H30 10 UFC/ml

Lane 4: Campione di mitili inoculato con ceppo E.coli H30 100 UFC/ml

Lane 5: Campione di mitili inoculato con ceppo E.coli H30 1000 UFC/ml

Lane 6: Campione di mitili inoculato con ceppo E.coli EDL933 1 UFC/ml

Lane 7: Campione di mitili inoculato con ceppo E.coli EDL933 10 UFC/ml

Lane 8: Campione di mitili inoculato con ceppo E.coli EDL933 100 UFC/ml

Lane 9: Campione di mitili inoculato con ceppo E.coli EDL933 1000 UFC/ml

Ceppo E.coli H30 (O26:H11; VT1⁺; eae⁺)

Ceppo E.coli EDL933 (O157:H7; VT1⁺; eae⁺)

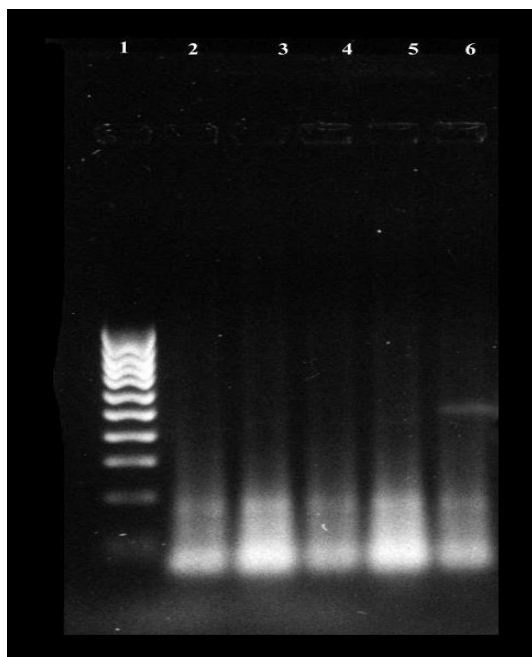


Fig. 4
Campioni di mitili non depurati
reperiti in Campania
Lane1: Ladder 100bp
Lane 2 a 5: Campioni negativi
Lane 6: Campione con banda
riferibile alla VT2 (484 bp)

CAPITOLO V

**RICERCA DI *LISTERIA MONOCYTOGENES* IN FILETTI
DI ORATA DI ALLEVAMENTO ED IDENTIFICAZIONE
DEL PATOGENO MEDIANTE TECNICA PCR
*MULTIPLEX***

5.1 GENERALITA'

Il genere *Listeria* comprende un gruppo di batteri Gram positivi, asporigeni, mobili (a temperatura di 20-30°C) per la presenza di rare ciglia peritriche ed inoltre sono aerobi o anaerobi facoltativi.

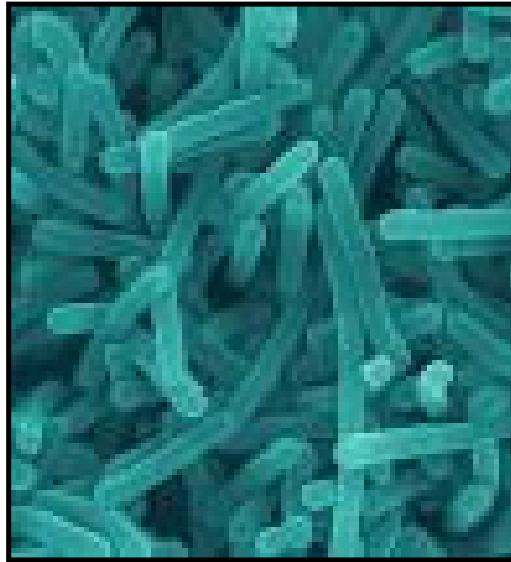
Il genere *Listeria* comprende cinque specie, ma solo una di esse, la *Listeria monocytogenes* assume notevole importanza risultando patogena per numerose specie di animali e per l'uomo. Tra le principali specie del genere *Listeria* si annoverano la *Listeria innocua*, *Listeria ivanovii*, *Listeria welshimeri*, *Listeria sceeligeri*.

La *Listeria monocytogenes* si presenta in forma di corto bacillo, esile, isolato o disposto in coppie parallele o riunite ad angolo.

Sviluppa di preferenza su terreni a pH neutro o leggermente alcalino e non ha particolari esigenze nutritive. La crescita è ottimale in terreni arricchiti con sangue 5% o siero di sangue, glucosio o triptosio. La temperatura di sviluppo è compresa fra 30 e 37°C in aerobiosi o microaerofilia. In tali condizioni le colture emanano un caratteristico odore di latte acido. E' comunque in grado di moltiplicarsi anche a basse temperature di refrigerazione.

Nei terreni solidi le colonie appaiono rotonde, lisce, regolari, con

margini netti, traslucide e se osservate a luce obliqua presentano colore blu-verdastro.



5.2 STRUTTURA ANTIGENICA

Le attuali conoscenze riconoscono una diversa struttura antigenica tra i diversi stipti di *L. monocytogenes*. Prove di agglutinazione e di assorbimento delle agglutinine hanno permesso di riconoscere 5 distinti tipi sierologici indicati come 1, 2, 3, 4a, 4b. Questa classificazione si basa sulla presenza di 15 antigeni somatici O (da I a XV) e 4 flagellari H (A, B, C, D). La presenza di antigeni comuni con altri batteri (*Corynebacterium*, *E.*

coli, etc.) può provocare reazioni sierologiche crociate e risultati non corretti nelle prove di identificazione. *L. monocytogenes* elabora prodotti tossici quali emolisina, lipolisina, MPA (*Monocytosis Producing Agent*), esotossina-like ed endotossina-like. L'emolisina responsabile della β -emolisi è filtrabile e viene prodotta nelle colture in fase S. E' attiva nei confronti delle emazie umane e di altri mammiferi. Il fattore esotossina-like è emolitico e relativamente termostabile, mentre il fattore endotossina-like ha natura polisaccaridica, provoca edema ed eritema cutanei e svolge azione piretogenica.

5.3 EPIDEMIOLOGIA

Lo spettro d'ospite di *L. monocytogenes* comprende uomo, mammiferi domestici e selvatici, liberi o in cattività, volatili, rettili ed insetti. Il microrganismo contamina il terreno ed i vegetali, pervenendovi con le feci di soggetti ammalati o portatori. L'uomo e gli animali svolgono un ruolo epidemiologico non trascurabile, come sembrano dimostrare gli isolamenti dal terreno anche sei mesi dopo la concimazione con stallatico

proveniente da bovini infetti (17).

Il frequente isolamento di *L. monocytogenes* dal terreno e dai vegetali conferma l'ipotesi del suo passaggio negli insilati e la moltiplicazione in condizioni ottimali di ph, cioè, in condizioni di insufficiente acidificazione dell'insilato viene considerato “microorganismo geofilo”, in grado di sopravvivere come saprofita al di fuori dell'organismo animale. La malattia è da considerare una saproozoonosi o geonosi, in quanto l'agente causale appartiene al gruppo dei patogeni facoltativi.

I diversi ceppi noti di *L. monocytogenes* non sono ospite-specifici né provocano differenti quadri clinici nelle varie specie sensibili. L'infezione può stabilirsi per via orale tramite l'alimento, oppure per via aerogena e rimanere allo stato latente o divenire setticemica o abortigena. Nella forma encefalica, l'agente causale raggiunge il sistema nervoso centrale per via neurogena ascendente.

5.4 PATOGENESI

L'infezione colpisce soggetti di tutte le età, i giovani sono comunque più sensibili e presentano quadri morbososi acuti e gravi. Alcuni fattori quali *stress* fisici, processi infettivi di varia natura, affezioni parassitarie possono favorire l'insorgenza o aggravare il decorso della malattia. L'apparato digerente è la via attraverso la quale la *Listeria* raggiunge l'ospite. L'interazione tra *L. monocytogenes* e ospite ha inizio con la fase “epiteliale”, durante la quale il germe, preso contatto con gli elementi cellulari, inizia a moltiplicarsi. Attorno alle cellule colpite confluiscono leucociti polimorfonucleati, in grado di distruggere i microrganismi già presenti nell'interstizio e quelli che vi pervengono dopo moltiplicazione endocellulare.

5.5 SINTOMATOLOGIA

Sul piano anatomico-clinico si distinguono almeno tre forme: cerebrale (encefalica, meningo-encefalica), genitale (aborto, metrite settica), setticemia. Il quadro anatomoclinico della listeriosi non offre elementi così caratteristici da consentire un

sicuro orientamento diagnostico. Pertanto la diagnosi di certezza può derivare solamente da esami di laboratorio mirati ad evidenziare, isolare e tipizzare l'agente causale. L'accertamento batteriologico offre risultati definitivi quando il materiale di partenza non è eccessivamente contaminato. Viene tuttora indicato come vantaggioso il metodo di arricchimento cosiddetto “a freddo”, tale metodo consiste nel seminare il materiale prelevato in terreno di arricchimento ed incubare a 37°C ed a 4°C. L'incubazione a 4°C viene prolungata per più tempo considerato la capacità di *L. monocytogenes* di sviluppare a basse temperature. In alternativa si può far ricorso a terreni selettivi contenenti acido nalidixico ed acriflavina. Dopo la semina le colture sono incubate a 37°C per 24-48 h. Sulle colonie isolate si effettuano poi esame microscopico previa colorazione di Gram, identificazione biochimica e tipizzazione sierologica.

Nell'uomo la listeriosi si manifesta di solito sporadicamente, solo in qualche caso assume carattere endemico. Il contagio si realizza per contatto diretto con secreti ed escreti di animali ammalati sia indirettamente per inalazione di polvere o di altro materiale

contenente l'agente patogeno e sia in seguito all'ingestione di prodotti di origine animale inquinati quale per esempio latte e latticini freschi (8-10).

5.6 LISTERIA IN PRODOTTI ITTICI

Le attuali scelte dei consumatori orientate al consumo di alimenti considerati sani, dietetici ed in grado di incidere positivamente sulla salute dell'uomo ha portato all'affermazione dei prodotti ittici come abituali componenti della dieta (8, 9, 10).

Il consumo dei prodotti ittici negli ultimi anni è aumentato notevolmente. Poiché fra il 1995 ed il 2001 si è verificato nei paesi dell'UE un calo del pescato si è osservata una notevole crescita delle importazioni ed inoltre si è assistito ad un incremento degli impianti di acquicoltura il cui prodotto , se correttamente lavorato e conservato, può garantire un ottimo livello qualitativo e sanitario. Nel corso dello stoccaggio delle orate confezionate a temperature di + 3°C, è stata effettuata la ricerca di microrganismi patogeni e potenzialmente patogeni. Infatti i prodotti di acquicoltura, al pari di altri alimenti, possono

veicolare patogeni trasmissibili all'uomo, per cui si rende indispensabile la ricerca e la tipizzazione dei microrganismi.

Lo scopo del lavoro è stata la ricerca di *L. monocytogenes* in orate d'acquicoltura del peso medio di 500 g, tutte provenienti dallo stesso allevamento situato nel golfo di Pozzuoli. Il Reg. 2073/2005/CE della Commissione, stabilisce i criteri di igiene per gli alimenti crudi da consumarsi cotti, mediante definizione di un valore indicativo della presenza di *Listeria*. L'attuale consuetudine alimentare di consumare prodotti ittici crudi comporta, tuttavia, la necessità di verificare con grande accuratezza i requisiti microbiologici per i prodotti della pesca.

5.7 MATERIALE E METODI

Sono state analizzate 64 orate.

Le orate sono state sottoposte ad un regime alimentare noto e tale da consentirne la rintracciabilità. I pesci non alimentati nelle 36 ore precedenti la cattura sono stati uccisi in acqua e ghiaccio e trasportati subito dopo o al massimo nell'arco di poche ore, in box di polistirolo sotto ghiaccio e in automezzo refrigerato, presso la

Sezione di Ispezione degli Alimenti di Origina Animale della Facoltà di Medicina Veterinaria dell'Università degli Studi di Napoli “Federico II”. Qui sono giunte in serata e sono state stoccate alla stessa temperatura in frigoriferi dotati di termografo fino al momento delle analisi.

5.8 ANALISI MICROBIOLOGICA

Per la messa a punto della metodica è stato utilizzato seguente ceppo batterico:

1) 19111 **ATCC**

fornito dall'Istituto Superiore della Sanità.

Tutti i campioni sono stati sottoposti ad analisi microbiologiche.

La procedura ha previsto un arricchimento primario di 25 g di campione in 100 mL di *Listeria Enrichment Broth* (UVM1) a 31°C per 24 h. Il giorno successivo a partire dall'UVM1 si è eseguita una semina su terreno solido selettivo *Palcam* ed incubate a 37°C per 24-48 h. Contemporaneamente un'aliquota di 0,1 mL di UVM2 è stata incubata a 30°C per 24 h. Il giorno successivo a partire dall'UVM2 si è eseguita una semina su

terreno solido selettivo *Palcam* ed incubate a 37°C per 24 h. I ceppi identificati di *L. monocytogenes* sono stati sottoposti ad analisi mediante PCR.

5.9 ESTRAZIONE DEL DNA

Per l'estrazione del DNA sono state utilizzate le colonie ottenute su piastra. Sono state raccolte 2 ansate dalle piastre e diluite in 1 mL di acqua bidistillata sterile. Il *pellet* batterico è stato ottenuto mediante centrifugazione a 7500-8000 rpm per 10'. Al *pellet* batterico è stato aggiunto il *CellLytic Buffer* in proporzione di 10mL/1g (Sigma) e posto ad incubare a 37°C per 30'. Successivamente sono stati aggiunti 20 µL di proteinasi K e 200 µL di Buffer AL (Quiagen), omogenati ed incubati a 65°C *overnight*. Il giorno successivo ai campioni sono stati aggiunti 210 µL di etanolo e nuovamente omogenati. Successivamente la sospensione del *pellet* è stata purificata su colonnine a scambio ionico (Quiagen) seguendo le indicazioni della casa produttrice.

5.10 POLYMERASE CHAIN REACTION (PCR)

Il DNA è stato amplificato mediante PCR *multiplex* utilizzando tre coppie di *primers* disegnati sulla sequenza del gene *iap* che codifica per la proteina P60, di membrana, coinvolta nei processi di aderenza del batterio alle cellule eucariote. Dei frammenti prodotti uno è comune a tutti i ceppi del genere *Listeria*, e due specifici rispettivamente per le specie *monocytogenes* e *innocua*.

I primers utilizzati sono :

- per *Listeria innocua* Ino 2

R-ACTAGCACTCCAGTTGTAAAC

F-TTATACGCGACCGAAGCCAAC

- per *Listeria monocytogenes* Mono A

R-CAAAGTCTAACACAGCTACT

F-TTATACGCGACCGAAGCCAAC

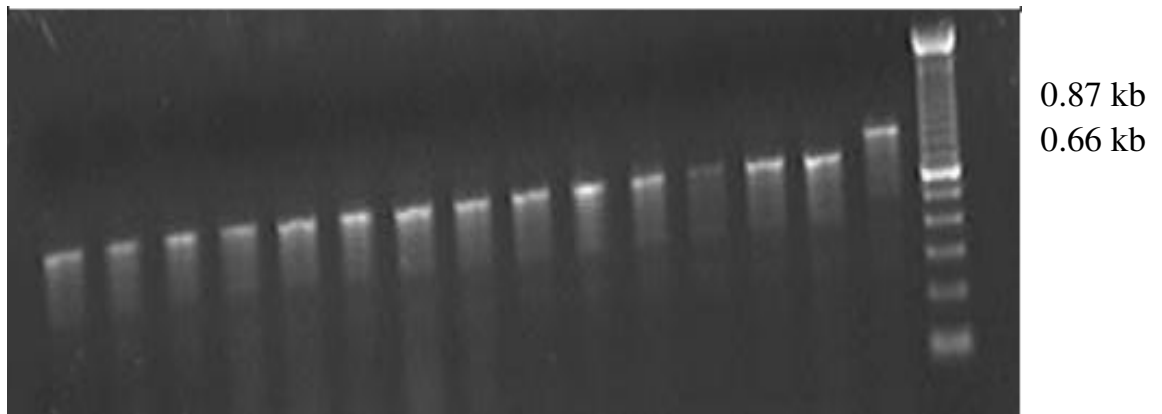
- per il genere *Listeria* Lis1A

R-ATGAATATGAAAAAAGCAAC

F-TTGGCTTCGGTCGCGTATAA

Gli amplificati sono stati evidenziati in gel di agarosio all'1%

previa colorazione con bromuro etidio e visualizzati mediante trans-illuminatore UV. E' stato possibile evidenziare la presenza di una banda di 1,6 Kb per il genere *Listeria*, una banda di 0,66 Kb per la specie *monocytogenes* ed una di 0,87 Kb per la specie *innocua*.



5.11 RISULTATI E CONCLUSIONI

I risultati del presente lavoro hanno evidenziato la presenza di *Listeria innocua* in un solo campione di orata. 50 campioni sono risultati positivi per la specie *monocytogenes*.

La PCR *multiplex* applicata ai ceppi batterici ha consentito di differenziare la specie *innocua* dalla *monocytogenes*. Le indagini effettuate hanno permesso di fornire al veterinario

ispettore uno strumento utile per svelare l'immissione sul mercato di prodotti ittici contenenti *Listeria spp.*.

CAPITOLO VI

6.1 CONSIDERAZIONI

La tecnica proposta nel presente lavoro di tesi rappresenta un'ulteriore possibilità di controllo analitico degli alimenti in alternativa o come supporto alle tecniche di microbiologia tradizionale.

Inoltre, si presenta come uno strumento valido per valorizzare le recenti disposizioni normative in campo di sicurezza alimentare, in conformità con il Reg. CE 178/2002.

Il regolamento interessa l'intera filiera alimentare secondo il motto "*from farm to fork*".

L'obiettivo, il filo conduttore, è quello di garantire il mantenimento di elevati standard di sicurezza su tutti gli alimenti e mangimi posti in commercio nel mercato comune mediante l'applicazione di regole armonizzate, così come indicate nel "pacchetto igiene" che illustra i ruoli e le responsabilità di tutti gli operatori della filiera e della Autorità di controllo Europea per la Sicurezza Alimentare.

Tra gli aspetti fondamentali illustrati nel "pacchetto igiene"

un ruolo primario è rappresentato dal controllo microbiologico degli alimenti lungo tutta la filiera produttiva, secondo il principio “dai campi alla tavola” proposto dal Libro Bianco sulla sicurezza alimentare

Il regolamento ha previsto inoltre la creazione di una “rete europea” per l’analisi e la gestione del rischio mediante un sistema di raccolta centrale delle notizie di allerta (*Rapid Alert System*).

La ricerca dei microrganismi negli alimenti viene effettuata mediante metodiche tradizionali, tuttavia queste spesso sono inadeguate per i tempi lunghi di esecuzione, la scarsa sensibilità e specificità, l'eccessiva laboriosità ed il pericolo intrinseco per il personale addetto. Per questo motivo negli ultimi tempi è stata posta grande attenzione allo sviluppo di metodi alternativi basati sull'analisi del DNA. Le metodiche biomolecolari sono caratterizzate da elevata specificità, inequivocabile oggettività del risultato ottenuto e da maggiore rapidità di esecuzione delle analisi rispetto alle metodiche tradizionali di isolamento e identificazione e, pertanto, possono consentire ai laboratori di

analisi degli alimenti una più rapida valutazione delle condizioni igieniche degli alimenti, aumentando le garanzie per la salute del consumatore. Purtroppo queste tecniche ancora oggi sono utilizzate solo per una conferma dei risultati ottenuti mediante indagini di microbiologia classica piuttosto che per analisi di routine. Infatti non esiste ancora a livello nazionale/internazionale una standardizzazione e certificazione delle tecniche biomolecolari.

In accordo con le indicazioni CE che sottolineano la necessità di una maggiore trasparenza a tutti i livelli della politica alimentare, tale da contribuire ad accreditare garanzia ai prodotti posti in commercio e ad infondere maggiore sicurezza nel consumatore, indirizzandolo verso una scelta consapevole la metodica adottata appare un ottimo strumento d'analisi per il riconoscimento di specie patogene

BIBLIOGRAFIA

- 1) Al-Soud, W.A., Lantz, P.G., Backman, A., Olcen, P., Radstrom, P. (1998). A sample preparation method which facilitates detection of bacteria in blood cultures by polymerase chain reaction. *Journal of Microbiological Methods* 32, 217-224;
- 2) Altekruse, S.F., Stren, N.J., Fields, P.I., Swerdlow, D.L. *Campylobacter jejuni*: an emerging foodborne pathogen. *Emerging Infectious Diseases* 1998, 5:28-35;
- 3) Baldus, J.P. (2001). 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in clinical laboratori. *Molecular Diagnosis* 6, 313-321;
- 4) Bolton, F.J., Hutchinson, D.N., Coates, D., *Clin. J. Microbiolol.* 19, 169-171;
- 5) Bolton, F.J., Sails AD, Fox AJ, Wareing DR, Greenway DL. Detection of *Campylobacter Coli* in foods by enrichment culture and polymerase chain reaction enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Food Prot.* 2002, 65:760-7
- 6) Brindani, F., Bacci, C., Bonardi, S., Paris, A., Maggi, E. *Campilobatteri termofili in matrici aviarie: classificazione con metodica API e PCR e individuazione del gene di patogenicità cadF*;
- 7) Bryan, F.L. (1982). *Disease transmitted by foods.* Atlanta, the United

States: Center for diseases control;

- 8) Bubert A., Heine I., Lehner A., Yoon B., Goebel W., Wagner M., 1999. Detection and differentiation of *Listeria spp.* by a single reaction based on Multiplex PCR. *Appl. Environ. Microbiol.*: 10: 4688-4692;
- 9) Bubert A., Kohler S., Goebel W. 1992. The homologous and heterologous regions within the iap gene allow genus and species-specific identification of *Listeria spp.* by polymerase chain reaction. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2625-2632;
- 10) Bubert A., Kuhn M., Goebel W., Kohler S. 1992. Structural and functional properties of the P60 proteins from different *Listeria* species. *J. Bacteriol.* 174: 8166-8171.
- 11) Call, D.R., Brockman, F.J., Chandler, D.P. (2001). Detection and genotyping *Escherichia coli* O157:H7 using multiplex PCR and nucleic acid microarrays. *International Journal of Food Microbiology* 67, 71-80;
- 12) Cantoni C., Cocolin L., Menzano M., Comi G. A PCR microplate capture hybridization method to detect *Listeria monocytogenes* in blood. *Mol. Cell. Probes.* 1998;
- 13) Cocolin, L., Manzano, M., Cantoni, C., Comi, G. (2000). A multiplex-PCR method to detect enterohemorrhagic (EHEC) and enteropathogenic (EPEC) *Escherichia coli* in artificially contaminated foods. *International Journal of Hygiene and Environmental* 203, 159-164;
- 14) Colwell, R. (1997). Detection of viable but not culturable and stressed

- microbial cells. In: Tortorello M.L., Gendel, S.M. (Eds), Food Microbiological Analysis-New technologies, Marcel Dekker, New York, 289-304;
- 15) Conedera G., Marangon S., Caprioli A., Luzzi I., Infezioni da *Escherichia coli* produttori di verocitotossine. Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie. Centro regionale di epidemiologia veterinaria (1995). Summa, 12: 65-68,1995;
- 16) Crotti, D. Aspetti attuali nella diagnosi delle infezioni intestinali. La coprocultura in chiave moderna. Documenta, Edizioni Scientifiche Mascia Brunelli-Biolife, Milano, 1997;
- 17) Engberg I., Gerner-Smidt P., Schaentz F., Nielsen E.M., On SLW, Molback K. Water-borne *Campylobacter jejuni* infection in a Danish town-a-week continuous outbreak. Clin Microbiol Infect 1998 4:648-56;
- 18) Farina R., Scatozza F. Trattato di malattie infettive degli animali, 1998;
- 19) Farmer, J.J., Davis, B.R. H7 antiserum-sorbitol fermentation medium: a single tube screening medium for detecting *Escherichia coli* O157:H7 associated with hemorrhagic colitis. J. Clin Microbiol. 22: 620-625. 1985;
- 20) Gonzales et al., 1997;
- 21) Grassi, M.A., Dal Masso, A., Cerreti Sola, S., Dando, A., Grottarola, C., Andruetto, S. Indagine sulla presenza di *Campylobacter spp.* nella filiera produttiva avicola.

- 22) Griffiths, P.L., Park, R.W.A. *Campylobacter* associated with human diarrhoeal disease. *J Appl Bacteriol* 1990, 69:281-301;
- 23) Hannu T., Mattila L., Rautelin H., Pelkonen P., Lahdenne P., Siitonen A., Leirisalo-Repo M. (2002). *Campylobacter* triggered reactive arthritis: a population-based study. *Rheumatology* 41, 312-318;
- 24) Jacobs-Reitsma, W.F. Aspects of epidemiology of *Campylobacter* in poultry. *Vet Q* 1997, 19:113-7;
- 25) Karmali, M.A., Steele, B.T., Petric, M., Lim, C. (1983). Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. *The Lancet* 1, 619-620;
- 26) Karmali M.A., Petric M., Lim C., Fleming P.C., Arbus C.S., Lior H. The association between Idiopathic haemolytic Uremic Syndrome and infection by verotoxin-producing *Escherichia coli*. *The J. of Infect. Diseases* 5:775-782, 1985;
- 27) Ketley, J.M. Pathogenesis of enteric infection by *Campylobacter* *Microbiology* 1997, 1435-21;
- 28) Konkel et al., 1999;
- 29) Lerner, J., Brumberger, V., Preac-Mursic, V. Severe diarrhea associated with *Arcobacter butzleri*. *J. Clin. Infect. Dis.* 1994, 13:660:2;
- 30) Lupton e Cola J.E. Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infection associated with pasteurized milk supply. *Lancet* 344-195, 1994;
- 31) Mattila L., Lerisalo-Repo M., Pelkonen P., Koskimies S., Granfors K.,

- Siitonen A. (1998). Reactive arthritis following an outbreak of *Salmonella Bovismorbificans* infection. *Journal Infection* 36, 289-295;
- 32) O'Brien, A.D., Chen, M. *Lancet* 77-78
- 33) O'Brien, A.D., Laveck, G.D., Thompson, M.R., Formal, S.B. Production of *Shigella dysenteriae* type 1-like cytotoxin by *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 146: 763-769. 1982;
- 34) Okrend A.J.G., Rose B.E., Lattuada C.P. Use of 5-Bromo-4-Chloro-3-Indolyl- β -D-Glucuronide in MacConkey Sorbitol Agar to aid in the isolation of *Escherichia coli* O157:H7 in Ground Beef. *J. Food. Prot.* 53:941-943, 1990;
- 35) Padhye, N.V., Doyle, M.P. *Escherichia coli* O157:H7: Epidemiology, pathogenesis and methods for detection in food . *J. Food Prot.* 55, 7:555-565. 1992;
- 36) Pai, C.H., Gordon, R., Sims, H.V., Bryan, L.E. Sporadic cases of hemorrhagic colitis associated with *Escherichia coli* O157:H7. *Ann. Inter. Med.* 101: 738-742. 1984;
- 37) Piersimoni C., Bornigia S., Curzi L., De Sio G. Comparison of two selective media and a membrane filter technique for isolation of *Campylobacter* species from diarrhoeal stools. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 1995; 14: 539-42
- 38) Progetto POR 2000/2006. Tecnologie Innovative per la valorizzazione e qualificazione di prodotti lavorati della maricoltura campana;

- 39) Read, S.C., Clarke, R.C., Martin, A., De Grandis, S.A., Hii, J., McEwen, S., Gyles, C.L. (1992). Polymerase chain reaction for detection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* isolated from animal and food sources. *Molecular and Cellular Probes* 6, 153-161;
- 40) Remis, R.S., MacDonald, K.L., Riley, L.W., Puh, N.D., Wells J.G., Davids, B.R., Blake, P.A., Cohen, L.L. Sporadic cases of hemorrhagic colitis associated with *Escherichia coli* O157:H7. *Ann. Intern. Med.* 101: 624-626. 1984;
- 41) Ryan, C.A., Tauxe, R.V., Hisek, G.W., Wells, J.G., Stoesz, P.A., McFadden Jr, H.W., Smith, P.W., Wright, G.F., Blake, P.A. *Escherichia coli* O157:H7 diarrhea in a nursing home: clinical, epidemiological, and pathological findings. *J. Infect. Dis.* 154: 631-638. 1986;
- 42) Scotland, S.M. et al. *Lancet*, 2:885-886. 1985;
- 43) Skirrow M.B., Benjamin J. *Hyg. J.* 85, 427-442;
- 44) Tsen, H.Y., Jian, L.Z., Chi, W.R. (1998). Use of a multiplex PCR system for the simultaneous detection of heat labile toxin I and the heat stable toxin II genes of enterotoxigenic *Escherichia coli* in skim milk and porcine stool. *Journal of Food Protection.* 61, 141-145;
- 45) Vandamme, P., Pugina, P., Benzi, G. Outbrek of recurrent abdominal cremps associated with *Arcobacter butzleri* in an Italian school. *J. Clin Microbiol* 1992, 30:2335-7;
- 46) Vernozy , Rozand C. *J. Appl. Microbiol.* 62:537-551, 1997;

- 47) Wells J. G., Davis B.R., Wachsmuth I.K., Riley L.W., Remis R.S., Soklow R., Morris G.K. Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype. J. Clin. Microbiol. 18:512-520, 1983;
- 48) Winters et al., 1995;
- 49) Zadik P.M., Chapman P.A., Siddons C.A. Use of tellurite for the selection of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157:H7. J. Med. Microbiol. 39:155-159, 1993.