



1506  
UNIVERSITÀ  
DEGLI STUDI  
DI URBINO  
CARLO BO

# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI URBINO

## “CARLO BO”

DIPARTIMENTO DI SCIENZE BIOMOLECOLARI (DISB)

**Corso di Dottorato di Ricerca in Scienze della Vita, Salute e  
Biotecnologie**  
CICLO XXIX

---

### **REALIZZAZIONE DI UN SISTEMA QUALITATIVO IN REAL-TIME PCR PER L'IDENTIFICAZIONE DI *ESCHERICHIA COLI* PATOGENI**

Settore scientifico disciplinare: MED/42 - Igiene generale e applicata

*Relatore: Chiar.mo Prof.*

MAURO MAGNANI

*Dottorando: Dott.*

LUCA ROTUNDO

*Co-relatore: Chiar.ma Prof.ssa*

GIULIA AMAGLIANI

*Co-relatore aziendale: Dott.ssa*

ENRICA OMICCIOLI

---

Anno accademico 2015/2016

# INDICE

---

<b>INTRODUZIONE</b> .....	2
<i>ESCHERICHIA COLI</i> .....	3
<i>Caratteristiche generali</i> .....	3
<i>Principali patogruppi di Escherichia coli patogeni</i> .....	4
<i>Dati epidemiologici in Europa.</i> .....	10
<i>Dati epidemiologici negli USA</i> .....	13
<b>REGOLAMENTI E NORMATIVE NELL'UNIONE EUROPEA</b> .....	15
<b>METODI UFFICIALI PER LA RICERCA DI <i>E. COLI</i> PATOGENI</b> .....	17
<b>KIT DIAGNOSTICI</b> .....	23
<b>SCOPO DELLA TESI</b> .....	24
<b>MATERIALI E METODI</b> .....	27
<b>RISULTATI</b> .....	66
<b>DISCUSSIONE</b> .....	124
<b>CONCLUSIONI</b> .....	140
<b>BIBLIOGRAFIA E SITOGRAFIA</b> .....	142
<b>RINGRAZIAMENTI</b> .....	158

# INTRODUZIONE

---

## ***ESCHERICHIA COLI***

### *Caratteristiche generali*

*Escherichia coli* è un batterio appartenente alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* ed è inserito nel gruppo dei coliformi. Si trova normalmente nel tratto gastrointestinale dell'uomo e dei grossi ruminanti e partecipa alla sintesi di vitamine del gruppo B (La Placa, 2008; Kaper et al., 2004). È stato isolato per la prima volta nel 1885 da feci di neonato a opera del batteriologo tedesco Theodor Escherich, e fu denominato originariamente *Bacterium coli*.

Batterio Gram negativo, di forma bastoncellare (ma a volte anche coccoide), con dimensioni di 1.1-1.5/2.0-6.0  $\mu\text{m}$ , asporigeno, aerobio-anaerobio facoltativo, mobile per la presenza di flagelli peritrichi, acapsulato, catalasi positivo e ossidasi negativo. Dal punto di vista nutrizionale non presenta esigenze particolari e cresce rapidamente sui comuni terreni colturali, tra 10 e 45°C con un optimum a 37°C. Forma colonie circolari incolori, dal diametro di 1-3 mm, leggermente convesse e con margini netti (La Placa, 2008).

Circa il 95% di *E. coli* è in grado di fermentare il sorbitolo mentre il sierotipo O157:H7 non possiede questa caratteristica, la quale viene utilizzata come mezzo selettivo per l'identificazione.

Secondo la classificazione tradizionale la specie produce indolo in terreni al triptofano ed è lattosio fermentante, distinguendosi dai coliformi non termotolleranti per la crescita a 44°C. Cresce con facilità nei terreni selettivi, e per identificarlo può essere utilizzato il MacConkey agar che permette di discernere i ceppi fermentanti il lattosio da quelli privi di  $\beta$ -galattosidasi.

I ceppi vengono distinti sierologicamente in base a tre antigeni (Ag) di superficie: O somatico (di cui si conoscono 170 Ag), K capsulare (80 Ag), entrambi di natura polisaccaridica, e H flagellare, di natura proteica (50 Ag).

WHO ha riconosciuto *E. coli* come indicatore della contaminazione fecale delle acque. Questo perché tale batterio, rispetto alle altre tipologie di coliformi, è costitutivamente presente nel materiale fecale. Inoltre possiede una resistenza, nei confronti delle procedure di sanificazione e disinfezione, maggiore rispetto ad altri patogeni enterici.

### *Principali patogruppi di Escherichia coli*

Sebbene la maggior parte di *E. coli* siano innocui per l'uomo, esistono dei gruppi patogeni caratterizzati da specifici fattori di virulenza. Questi vengono classificati, in base al loro profilo patogenetico (patologie provocate, fattori di virulenza, meccanismo di azione, profilo filogenetico), in sei patogruppi: Enterotossigeni (ETEC), Enteropatogeni (EPEC), Enteroinvasivi (EIEC), Enteroemorragici (EHEC), Enteroaggregativi (EAggEC), Diffusamente Aderenti (DAEC) (Tabella 1). Ognuno di essi può contenere diversi sierogruppi, poiché i fattori di patogenicità sono spesso trasportati da elementi genetici mobili, come plasmidi. Questo determina l'acquisizione di tali fattori che possono conferire caratteristiche di patogenicità ad un sierogrupo che precedentemente non ne era dotato (Tozzoli and Scheutz, 2014).

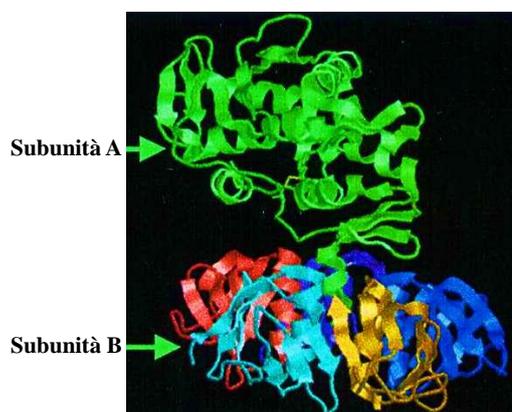
Gli *E. coli* verocitoproduttori sono un particolare sottogruppo degli EHEC, in grado di sintetizzare tossine di tipo Shiga (Shiga-liketoxins). Sono indicati con gli acronimi STEC (Shiga toxin-producing *E. coli*) o VTEC (Verocytotoxin producing *E. coli*) e sono quelli maggiormente associati a casi di infezioni di origine alimentare, anche mortali. Sulla base dei dati epidemiologici, *E. coli* O157:H7 è considerato il sierogrupo maggiormente associato con le forme più severe di patologia, seguito dai sierogruppi O26, O103, O111 e O145 (ESFA, Scientific opinion 2007).

La dose infettante è di 10-100 CFU, ma questa concentrazione può ridursi ulteriormente nei soggetti in stato debilitato o in età pediatrica. Il periodo di incubazione è di circa 3-4 giorni durante i quali si manifestano dapprima disturbi intestinali come diarrea, dolori addominali, nausea, vomito e, in seguito a distruzione degli enterociti, con comparsa di diarrea sanguinolenta (Calderwood et al., 1996; Baylis et al., 2008).

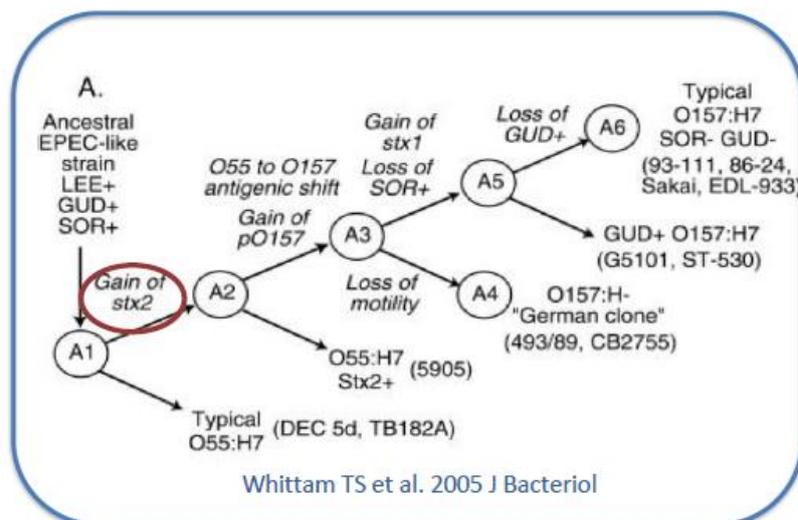
**Tab. 1:** Geni associati ai diversi patogruppi di *Escherichia coli*.

Patogruppo	Geni caratteristici
EHEC	Intimina ( <i>eae</i> ) Porcine A/E associated adhesion ( <i>Paa</i> ) <i>E. coli</i> factor for adherence ( <i>Efa</i> )-1 Long polar fimbriae ( <i>LPF</i> ) STEC adesina auto agglutinante ( <i>Saa</i> ) <i>E. coli</i> immunoglobulin-binding protein ( <i>EibG</i> ) IrgA homologue adhesin ( <i>Iha</i> ) EHEC autotransporter encoding gene A ( <i>EhaA</i> )
STEC	Aggregative adherence fimbriae (AAF) <i>IrgA</i> homologue adhesin ( <i>Iha</i> ) STEC adesina auto agglutinante ( <i>Saa</i> )
DAEC	Afimbrial ( <i>Afa</i> ) o fimbrial (Dr) adhesins
EPEC	Intimina ( <i>eae</i> ) Bundle forming pili ( <i>BFP</i> ) Porcine A/E associated adhesion ( <i>Paa</i> ) Long polar fimbriae ( <i>LPF</i> ) IrgA homologue adhesin ( <i>Iha</i> ) <i>EhaA</i>
ETEC	Colonization factor ( <i>CF</i> ) Porcine A/E associated adhesion ( <i>Paa</i> )
EAggEC	Aggregative adherence fimbriae (AAF) Toxigenicinvasion loci A ( <i>Tia</i> )

Gli STEC sono in grado di causare tossinfezioni alimentari mediante la produzione di due particolari tossine: la shigatossina 1 e la shigatossina 2, codificate rispettivamente dai geni *stx1* ed *stx2*. Entrambe le tossine sono costituite da una subunità A, dal peso di 33000 Da, e cinque subunità B dal peso di 7500 Dalton. Il pentamero delle subunità B permette il legame della tossina ad un recettore glicoproteico specifico sulla superficie degli enterociti (Gb3 o Gb4), mentre la subunità A blocca la sintesi proteica (Faser et al., 2004) (Figura 1).

**Fig. 1:** Rappresentazione della shigatossina.

Queste tossine vengono definite *Shiga-like toxin* poiché omologhe alla tossina della *Shigella dysenteriae*. La shigatossina 1 infatti presenta una omologia del 98% con quella prodotta dalla *S. dysenteriae* tipo 1, mentre la shigatossina 2 ha circa il 60% di omologia aminoacidica con la shigatossina 1 (Tahamtan et al., 2010). Dal punto di vista della sequenza nucleotidica dei geni che codificano per queste tossine, per *stx1* sono state individuate le varianti *stx1a*, *c*, *d*, che sono relativamente omogenee nelle diverse composizioni genetiche; *stx2*, invece, possiede un'ampia variabilità genetica e ne sono stati individuati sette sottotipi: *stx2a*, *b*, *c*, *d*, *e*, *f*, *g* (Tabella 2) (Scheutz et al., 2012). A questo proposito è interessante ricordare la teoria sull'evoluzione dell'acquisizione della virulenza a partire dal ceppo O55:H7 al ceppo O157:H7 sorbitolo negativo. Le due tossine, secondo tale teoria, hanno origine da batteriofagi di cui il più importante è il fago  $\lambda$ , che è in grado di inserirsi nel genoma del batterio e conferire la capacità di esprimere e produrre la tossina (Figura 2) (Whittam et al., 1993).



**Fig. 2:** Schema della teoria dell'evoluzione di *E. coli* dal ceppo ancestrale O55 al ceppo O157.

Entrambe le tossine rappresentano il maggior fattore di patogenicità e sono le principali cause dello sviluppo di complicanze extraintestinali. Infatti, una volta arrivate al circolo ematico possiedono un elevato tropismo per l'endotelio del glomerulo renale, determinandone l'occlusione microvascolare. Pertanto, dopo le iniziali manifestazioni intestinali, come diarrea emorragica e colite emorragica, la patologia può evolvere, nei casi più gravi, a sindrome emolitico uremica (HUS). La HUS si manifesta nel 5-10% dei casi di colite emorragica, è una malattia rara, colpisce specialmente bambini ed anziani ed è caratterizzata dalla comparsa di tre sintomi tipici: anemia emolitica

microangiopatica, piastrinopenia e insufficienza renale acuta. Nei casi più gravi possono comparire manifestazioni di carattere neurologico come confusione e convulsioni. La HUS è diagnosticabile attraverso metodiche complesse, non eseguite di routine dai laboratori microbiologici ospedalieri. Il decorso della malattia può essere assai rapido e pertanto è molto importante intervenire tempestivamente.

Feng et al. (2011) e Burgos and Beutin, (2012) hanno evidenziato che la variante *stx2a* ed *stx1a* sono quelle che maggiormente causano stati patologici nell'uomo, mentre *stx2c*, *stx2d* e *stx2a* sono state maggiormente isolate da pazienti con severi quadri clinici come HC o HUS; le varianti *stx2f*, *stx2b* ed *stx1c* sono state riscontrate in pochi casi di malattie con complicanze (Burgos and Beutin, 2012; Kuczius et al., 2004), mentre *stx1d*, *stx2e*, *stx2g* necessitano ancora di essere confermate in casi patologici, ciononostante sono state ritrovate in campioni di feci di pazienti affetti da diarrea e HUS. Sebbene per alcune di queste non è ancora ben chiara la loro capacità di determinare la patologia, tutte le varianti *stx* dovrebbero essere ricercate, specialmente perché alcuni ceppi di *E. coli* sono in grado di codificare per una o più varianti *stx* (Burgos and Beutin, 2012; Martin and Beutin, 2011).

La patogenicità degli STEC dipende anche dal gene *eae*, codificante per la proteina di membrana intimina, coinvolta nella fase di adesione dei batteri alla mucosa intestinale. Presenta una elevata variabilità genetica poiché se ne conoscono 22 varianti (Tabella 2), delle quali 4 considerate epidemiologicamente più rilevanti, poiché associate con i 5 sierogruppi STEC EHEC più diffusi: *eae-β1* (O26:H11), *eae-ε* (O103:H2), *eae-θ* (O111:H8) ed *eae-γ1*(O157:H7 e O145:H28) (Madic et al., 2010).

**Tab. 2:** Principali geni di virulenza di STEC e relative varianti.

GENE	FATTORE CODIFICATO	VARIANTE
<i>stx1</i>	Shigatossina 1	a, c, d
<i>stx2</i>	Shigatossina 2	a, b, c, d, e, f, g
<i>eae</i>	Intimina	α 1.1, α 1.2, β 1.1, β 2.1, γ 1.1, ε 1.1, ε 1.2, ε 1.3, ε 2.1, ζ 1.1, ζ 1.2, η 1.1, θ 1.1, ι 1.1, ι 1.2, κ 1.1, κ 1.2, λ 1.1, μ 1.1, ξ 1.1, o 1.1, ρ 1.1

Il gene *eae* è localizzato nell'ambito dell'isola di patogenicità (PAI), denominata locus of enterocyte effacement (LEE), che modula il fenomeno dell'attaching and effacing (A/E), "adesione-elisione batterica". Le isole LEE sono costituite da 40 geni e comprendono anche quelli codificanti le proteine per la trasduzione del segnale (*EspA*, *EspB* ed *EspD*), quelli per il sistema di secrezione di tipo 3 (TTSS) (sistema di

traslocazione molecolare delle proteine batteriche effettrici che sono anche tradotte nella cellula ospite), il gene *Tir*, del “translocated intimin receptor” che viene trasportato nel citoplasma cellulare mediante il TTSS e al quale si aggancia l’intimina (Delahay et al., 2001; Elliott et al., 1999). Questi geni agiscono di concerto per indurre una modificazione nella conformazione del citoscheletro delle cellule dell’organismo ospite, che porta ad una protrusione dei microvilli intestinali con perdita dell’attività funzionale (Lacher et al., 2006).

Il gene dell’intimina non è un fattore indispensabile per lo sviluppo delle complicanze nelle infezioni determinate da *E. coli*, poiché vi sono diversi fattori di aderenza (fimbrie, proteine di membrana esterne - OMPs - e lipopolisaccaridiche - LPS), che permettono al microrganismo di legarsi e di attraversare la mucosa intestinale. Un esempio è rappresentato dai fattori degli EA<sub>g</sub>EC, quali il fimbrial regulator adesin, codificato dal gene *aggR* (di origine plasmidica), e il sistema di secrezione di tipo VI, prodotto a partire dal gene *aaiC* (di origine cromosomica) (EFSA Scientific Opinion, 2015). Questo patogruppo una volta giunto nel lume intestinale può aderire al tessuto epiteliale attraverso la formazione di una struttura definita a mattone impilato (stacked-brick pattern) mediata dal fattore di aderenza AAF (aggregative adherence fimbriae), di cui sono conosciute 4 varianti principali, che a loro volta dipendono da *aggR* (Nataro et al., 1994) (Figura 3).

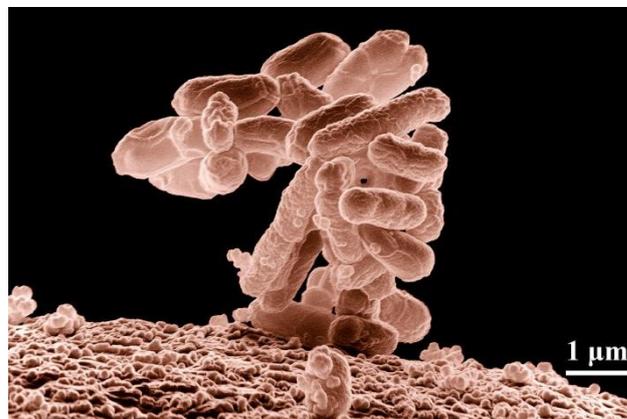
Il gene *aggR* regola una serie di fattori genetici, ed in particolar modo controlla il gene *aap*, codificante per una proteina chiamata ‘dispersin’ che partecipa come fattore colonizzante e permette alle fimbrie di rimanere adese sulla superficie del batterio. Questa proteina ha un ruolo importante nella fase di aderenza del microrganismo al lume intestinale, anche perché si pensa che induca una modificazione elettrostatica dello strato lipopolisaccaridico del batterio, agevolando la fase di adesione attraverso le fimbrie (Jensen et al., 2014; Harrington et al., 2006).

I meccanismi che invece sono alla base della loro patogenicità sono ancora di difficile identificazione poiché esiste una elevata eterogeneità genetica tra tutti gli isolati di EA<sub>g</sub>EC (Jenkins et al., 2005; Nataro, 2005) e questo determina una difficoltà nella valutazione della rilevanza clinica del microrganismo (Jensen et al., 2014). Ciononostante le tossine rappresentano le principali forme responsabili delle manifestazioni cliniche.

Sebbene non siano stati ancora identificati con precisione i principali reservoirs degli EAggEC, è generalmente accettato che l'uomo sia uno dei più importanti (Jensen et al., 2014), mentre Bibbal et al. (2014) suggeriscono che è altamente improbabile che gli animali esercitino questa funzione.

Il gruppo degli EAggEC, descritto per la prima volta nel 1987 da Nataro et al. (1987), comprende ceppi innocui e ceppi pericolosi per l'uomo poiché in grado di far insorgere diarrea, malattie gastrointestinali e in alcuni casi, come in soggetti debilitati o in età pediatrica, anche patologie mortali. Il periodo di incubazione per questa categoria è tra le 8-18 ore, e le manifestazioni cliniche si presentano con diarrea acquosa, spesso accompagnata da muco, nausea e vomito fin anche alla HUS (Huang et al., 2007).

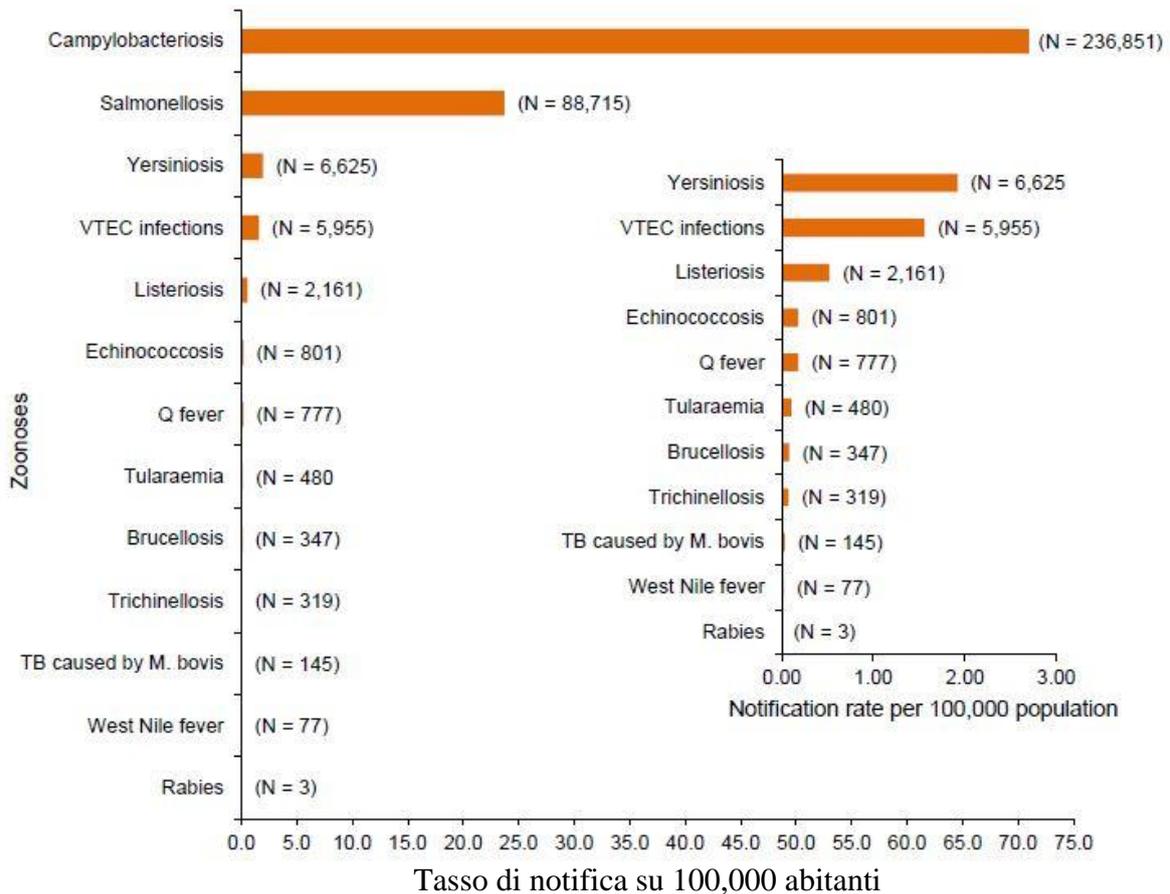
In particolare il sierotipo O104, oltre a possedere i geni caratteristici degli EAggEC, ha recentemente acquisito il gene *stx2a* mediante trasferimento fagico (Bielaszewska et al., 2011). Grazie all'acquisizione di nuovi geni, dunque, gli EAggEC hanno avuto, ed hanno ancora oggi, una evoluzione indipendente ed un importante significato patogenetico (EFSA, Scientific Opinion 2015).



**Fig. 3:** Formazione della struttura stacked-brick pattern da parte di EAggEC.

### Dati epidemiologici in Europa

*E. coli* O157:H7 determina una infezione che è considerata una zoonosi, poiché i dati epidemiologici confermano che il principale reservoir è rappresentato dai bovini, seguito da ovini e caprini (Caprioli et al., 2005). La trasmissione del patogeno avviene per la maggior parte dei casi attraverso l'ingestione di alimenti di origine animale contaminati ed è considerato il più pericoloso agente zoonotico a trasmissione alimentare. Sebbene il numero delle patologie associate a STEC si presenti con una frequenza molto bassa rispetto a campylobatteriosi o salmonellosi, devono essere considerate importanti nel quadro epidemiologico, poiché la severità della malattia e il tasso di mortalità che determinano è elevato (EFSA, 2015) (Figura 4).



**Fig. 4:** Sono riportati i casi di zoonosi notificati nei paesi dell'UE nel 2014 (EFSA, 2015).

Nel 2014 l'Organismo Comunitario European Food Safety Authority (EFSA) ha registrato nei Paesi membri un totale di 6,013 casi di infezioni da STEC, dei quali 5,955 confermati. Il tasso di notifica si attesta a 1.56 casi su 100,000 abitanti, valore in calo dell'1.9% rispetto al 2013. Questo è il frutto di un programma congiunto tra i diversi

Paesi Membri per limitare la propagazione di queste infezioni. Come nelle indagini epidemiologiche degli anni precedenti (2012-2013), il sierogruppo maggiormente coinvolto è stato O157:H7 (circa il 46% dei casi). Un alto numero di infezioni da STEC è stato registrato in Irlanda, Olanda, Danimarca e Svezia (12.42, 5.46, 4.96 e 4.86 casi su 100,000 abitanti, rispettivamente) (EFSA, 2015).

Sedici Paesi dell'Unione Europea hanno fornito i dati di pazienti ospedalizzati, che rappresentavano il 39% di tutti i casi da infezione da STEC, e di questi il 98% sono stati registrati tra Grecia, Italia, Lituania e Romania, con circa 360 casi di HUS dove la fascia di età maggiormente colpita era quella da 0-4 anni (228 casi) e 5-14 (69). I sierogruppi che in misura maggiore hanno scatenato HUS sono stati O157 (42.8%), O26 (18.6%), O111 (5.3%) e O145 (4.6%) e per questa loro elevata capacità invasiva, insieme ad O103, sono stati definiti 'top five'.

Il tasso di mortalità in Europa si attesta intorno allo 0.2%, valore diminuito rispetto allo 0.39% riportato nel 2010 (EFSA, 2015; EFSA 2012).

Numerose categorie alimentari sono coinvolte nella propagazione di infezioni. La carne macinata è il principale veicolo di patologie da STEC. Nel 2014, tra i Paesi Membri, sono stati controllati 2,549 unità di carne bovina fresca e circa il 2.6% è risultato positivo per STEC. E' stata monitorata anche la carne di capra e pecora, con 82 unità campione controllate, di cui il 4.9% è risultato positivo. Il latte crudo e i relativi prodotti caseari, invece, hanno fornito dati interessanti con 871 campioni controllati e una positività del 3.6%: valore in aumento rispetto ai dati del 2013. Infine i germogli e i semi disidratati rappresentano un caso particolare: poiché nel 2013 è stato emanato il regolamento (EU) 209/2013, che stabilisce i criteri microbiologici per STEC in germogli e semi, durante tutto il 2014 tale regolamento è stato applicato e i dati pervenuti sono stati nettamente superiori rispetto agli anni precedenti, con circa 761 campioni analizzati ma nessuna positività.

Esaminando i campioni alimentari sopra citati per l'identificazione del sierogruppo, è stata ottenuta la frequenza di distribuzione di STEC non-O157 nelle matrici alimentari: O26 è risultato particolarmente presente in campioni di latte e prodotti caseari; O111 in campioni di latte crudo; O103 e O145 rilevati sia in campioni di carne che prodotti caseari (EFSA, 2015).

Diverso è il quadro epidemiologico per gli EAggEC, che solo recentemente hanno assunto un ruolo chiave nella propagazione di infezioni alimentari. In passato, infatti, non sono stati associati a forme gravi di infezione e questo ha ridotto drasticamente

l'attività di ricerca epidemiologica. Ciò ha portato ad una ridotta raccolta dati tale da rendere l'European Epidemiological Surveillance System (TESSy) privo di informazioni sulla loro diffusione e questo ha reso estremamente difficile eseguire una reale stima della situazione EAggEC (EFSA Scientific Opinion, 2016). Solo dopo alcuni gravi episodi epidemici scatenati da questo patogruppo si è cominciato a livello Europeo a monitorarli e identificarli.

Ciononostante gli EAggEC sono considerati come la seconda causa di diarrea del viaggiatore, dopo gli ETEC, e Nataro et al (2006) evidenziano che rappresentano la principale causa di sindromi diarroiche negli Stati Uniti. Nonostante la loro scarsa diffusione a livello Europeo, nei Paesi in via di sviluppo sono stati rilevati come principali responsabili di forme diarroiche, anche mortali, nei bambini (Nataro and Kaper, 1998; Kotloff et al., 2013), mentre in Brasile si sono registrati numerosi casi di gastroenteriti in pazienti al di sotto dei 2 anni (Araujo et al., 2007). Sono stati anche associati come importanti patogeni enterici nei soggetti affetti da AIDS (Wanke et al., 1998).

Una categoria di EAggEC interessante è rappresentata dai produttori di *stx*, la cui prima identificazione e descrizione è avvenuta in seguito ad alcuni casi di HUS e HC in Francia, nel 1992, ad opera del ceppo O111:H2 che aveva mostrato la capacità di aderire al lume intestinale, tramite il meccanismo di stacked-brick adhesion (Nataro and Kaper, 1998), e di produrre *stx2* (Morabito et al., 1998). Il sierogruppo maggiormente documentato come causa di epidemia da EAggEC produttore di *stx* è stato il ceppo O104:H4, identificato per la prima volta nel nord della Germania nel maggio del 2011. Questo focolaio epidemico, correlato con il consumo di germogli di fieno greco contaminato, causò circa 4,000 casi di infezione, con 750 soggetti (circa il 20%) affetti da HUS e 44 decessi, di cui 28 presentavano la HUS (Scheutz et al., 2011; EFSA, 2011). L'impatto di questa epidemia determinò un cambiamento sostanziale nella considerazione dei patogruppi.

Altri focolai epidemici, ad opera di EAggEC, si sono registrati in diverse nazioni come in Giappone, nel 1993, dove furono coinvolti circa 2,500 bambini a causa del consumo di cibo contaminato nella mensa scolastica (Itoh et al., 1997); o ancora in Shizuoka, Giappone 2005, presso un istituto di polizia, in cui sette soggetti presentarono sintomi clinici da EAggEC (diarrea e febbre) dopo aver consumato cibo contaminato: era stato identificato il sierogruppo O126:H27 (Harada et al. 2007).

Anche in Europa sono stati registrati casi di infezioni da EAggEC ad opera di matrici alimentari come formaggi, prodotti caseari realizzati con latte non pastorizzato, prodotti freschi (Smith et al., 1997; Scavia et al., 2008). In UK nel 1994 si verificarono 4 focolai epidemici in diversi punti ristoro (ristoranti, centri conferenza ed hotel) e furono registrati 133 casi di gastroenteriti. Le successive analisi confermarono la presenza di EAggEC, ma non è mai stata identificata la sorgente di infezione (Smith et al., 1997). Infine anche in Italia si sono registrati diversi casi di infezione da EAggEC: in un resort nel 2007 fu isolato il ceppo O92:H33 da sei clienti e un componente dello staff, ma non fu mai identificata la fonte di infezione (Scavia et al., 2008); nel 2013, invece, si registrò un piccolo focolaio ad opera di O127:H4 produttore di *stx* (Tozzoli et al., 2014). Tutte queste situazioni evidenziano l'importanza della sicurezza alimentare durante le fasi di preparazione degli alimenti.

#### *Dati epidemiologici negli USA*

Negli Stati Uniti l'*E. coli* è stato identificato come patogeno di origine alimentare per la prima volta nel 1982, in seguito ad una infezione associata al consumo di hamburger in un fast-food. Si identificò il sierogruppo O157:H7 come responsabile dei casi di colite emorragica: fino a quel momento non era mai stato associato a malattia nell'uomo (Riley et al., 1983).

Nel 1993 sempre il ceppo O157:H7 si rese responsabile di una grave epidemia che interessò diversi Stati nel nord-ovest del Pacifico, a causa del consumo di carni poco cotte di una catena di fast-food. Si contarono circa 700 casi, 41 HUS e 4 decessi (Bell et al., 1994; CDC-1993). In seguito a questo grave pericolo sanitario il governo americano decise di adoperare misure di prevenzione per limitarne la diffusione. Infatti, nel settembre del 1994 l'USDA-FSIS dichiarò il ceppo O157:H7 adulterante in carne cruda macinata. L'FSIS giustificò questa presa di posizione affermando che: 'These products are adulterated because they contain a poisonous or deleterious substance that may render them injurious to health' (USDA-FSIS, 2011). Successivamente anche alcuni sierogruppi di STEC non-O157 causarono gravi focolai epidemici, con quadri patologici gravi come HC e HUS. Per questo i sierogruppi non-O157 responsabili della maggior parte dei casi di infezione in USA furono classificati come 'top six': O26-O103-O111-O145, comuni a quelli identificati in EU, e O45-O121. Secondo Gould et al. (2013) l'82% delle patologie che si sono sviluppate durante gli anni 2000-2010 sono da

ricondere ai top six non-O157 STEC. Nel settembre del 2011 l'USDA-FSIS dichiarò anche i top six non-O157 come adulteranti degli alimenti (USDA-FSIS 2011).

E' stato calcolato che negli Stati Uniti gli STEC causano circa 256,000 infezioni all'anno, con 3,600 soggetti ospedalizzati e 30 decessi (Scallan et al., 2011). E' stato istituito nel 1996 il Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet), con lo scopo di raccogliere tutti i dati relativi alle malattie di origine alimentare e monitorarne l'incidenza. Negli anni tra il 2000 e il 2010 il network ha registrato circa 2,006 casi di infezioni associate a non-O157 STEC, con una incidenza di infezione dello 0.95 per 100,000 abitanti (valore che risulta aumentato in confronto a quello ottenuto nel 2000 di 0.12), e circa 5,688 casi associati a O157:H7, con un tasso di incidenza di infezione dello 0.95 su 100,000 abitanti (valore diminuito se confrontato con quello del 2000 di 2.17). Inoltre, di tutti i casi di malattia sopra citati i ceppi non-O157 STEC sono stati identificati nella percentuale di: O26 (26%), O103 (22%), O111 (19%), O121 (6%), O45 (5%), e O145 (4%). I prodotti caseari e i prodotti a base di carne sono stati i principali veicoli di trasmissione (Gould et al., 2013).

Nel 2014 FoodNet ha registrato su un totale di 19,507 casi di malattia, circa 444 casi associati a STEC O157 dei quali 155 ospedalizzati e 3 decessi. L'incidenza di infezione è stata dello 0.91 su 100,000 abitanti. Diversamente, per i non-O157 sono stati registrati 697 casi (1.43 su 100,000 abitanti) con 106 ospedalizzati e 2 decessi (<http://www.cdc.gov/foodnet/reports/annual-reports-2014.html>).

## **REGOLAMENTI E NORMATIVE NELL'UNIONE EUROPEA**

Data l'importanza e la portata delle malattie di origine alimentare, è indispensabile fornire al consumatore delle garanzie di qualità, affidabilità e salubrità dei prodotti che vengono immessi nella grande distribuzione. La sicurezza alimentare gode oggi di una grande attenzione e ciò ha spinto la Commissione Europea a sviluppare norme in materia di igiene per il conseguimento di standard elevati di sicurezza alimentare, così da garantire il più alto livello di tutela della salute pubblica. Per poter perseguire questo obiettivo è indispensabile considerare la sicurezza degli alimenti non come una struttura a compartimenti stagni, ma come un insieme di più responsabilità che partecipano insieme al raggiungimento di tale obiettivo. Infatti l'igiene dei prodotti alimentari non è interesse esclusivo della grande industria alimentare, ma coinvolge i piccoli e medi produttori, le aziende di lavorazione e trasformazione, i servizi di trasporto e vendita al dettaglio, fino agli stessi consumatori.

Per ottemperare a questi obiettivi sono stati emanati a livello Comunitario una serie di Regolamenti atti ad armonizzare le norme legate al settore alimentare, di cui i più importanti sono:

- **REGOLAMENTO (CE) n. 2073/2005 della commissione del 15 novembre 2005** sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari;
- **REGOLAMENTO (CE) N. 1441/2007 della commissione del 5 dicembre 2007** che modifica il regolamento (CE) n. 2073/2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari;
- **REGOLAMENTO (UE) N. 209/2013 della commissione dell'11 marzo 2013** che modifica il regolamento (CE) n. 2073/2005 per quanto riguarda i criteri microbiologici applicabili ai germogli e le norme di campionamento per le carcasse di pollame e la carne fresca di pollame.

Il regolamento 2073/2005, entrato in vigore il 1 gennaio 2006 in tutti gli Stati Membri, è rivolto a tutti gli operatori del settore alimentare (OSA) facenti parte della filiera di produzione degli alimenti, ed ha lo scopo di omologare i criteri microbiologici che ne accertano la sicurezza, in modo da aumentare il livello di protezione dei consumatori. Oltre a porre l'attenzione sul tema del controllo micorbiologico, il regolamento specifica l'importanza e stabilisce i criteri del sistema di gestione della sicurezza tramite il piano HACCP (Hazard-Analysis and Critical Control Points) e le pratiche GHP (Good Hygiene Practices) e GMP (Good Manufacturing Practices).

Inoltre vengono introdotti due nuovi concetti: il criterio di sicurezza alimentare e il criterio di igiene di processo. Questi criteri dettano i parametri microbiologici, laddove il rischio di contaminazione è più elevato, che devono essere mantenuti per poter considerare accettabile, da un punto di vista igienico-sanitario, un prodotto. Vengono previsti dei limiti per i prodotti a base di carne e derivati; latte e prodotti lattiero-caseari; prodotti a base di uova; prodotti della pesca; ortaggi, frutta e prodotti derivati.

In seguito all'epidemia di infezione da STEC O104, correlata con il consumo di germogli contaminati verificatasi nella EU nel 2011, particolare attenzione è stata rivolta al controllo del patogeno in questa matrice. Tale prodotto presenta infatti alcuni aspetti critici: visto il tasso elevato di umidità e la temperatura favorevole durante il processo di germinazione, i batteri patogeni presenti nei semi essiccati potrebbero moltiplicarsi e costituire un rischio per la salute pubblica. Questo ha determinato un irrigidimento dei criteri microbiologici previsti dal regolamento 2073/2005 che non considerava la matrice "germogli". Essendo questi ultimi definiti come alimenti pronti per il consumo, il 20 ottobre 2011 l'EFSA ha emanato un Parere scientifico in merito, elencando i criteri di sicurezza alimentare inclusi i piani di campionamento, i metodi d'analisi di riferimento ed i limiti per i microrganismi, loro tossine e metaboliti. Successivamente l'EU ha prodotto un'integrazione del precedente Regolamento 2073/2005, il 209/2013, contenente i criteri di sicurezza alimentare specifici per i germogli, che sono rappresentati dall'assenza dei principali sierogruppi di STEC (Tabella 3).

**Tab. 3:** Criteri di sicurezza alimentare per la matrice germogli freschi, EU 209/2013.

Categoria alimentare	Microrganismi	Campioni <sup>(1)</sup>		Limiti <sup>(2)</sup>	Metodo di analisi di riferimento	Fase di applicazione del criterio
		n	c	m		
1.29 Germogli <sup>(23)</sup>	<i>E. coli</i> produttori di tossina Shiga (STEC) O157, O26, O111, O103, O145 e O104:H4	5	0	Assente in 25 g	CEN/ISO TS 13136 <sup>(22)</sup>	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità

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

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

## **METODI UFFICIALI PER LA RICERCA DI *ESCHERICHIA COLI* PATOGENI**

Le caratteristiche distintive degli *E. coli* STEC sono sempre state utilizzate per lo sviluppo di metodiche ufficiali utilizzate per controllare la salubrità degli alimenti. La principale è rappresentata dalla norma ISO 16654:2001 ‘Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Escherichia coli* O157’ che permette l’identificazione di O157:H7 a partire da matrici alimentari. Si suddivide in 4 fasi: arricchimento iniziale (1:10) in modified Tryptone-Soy Broth addizionato con novobiocina concentrata 20 mg/L (mTSB+N<sub>20</sub>) e incubazione a 41.5°C per un totale di 18-24 h; separazione e concentrazione del microorganismo per mezzo di particelle immunomagnetiche ricoperte da anticorpi anti-*E. coli* O157 (immunomagnetic separation, IMS), che può essere effettuata dopo 6 h o al termine della fase di arricchimento; successivo isolamento delle colonie mediante piastraggio degli immunocomplessi su piastre selettive di cefixime tellurite sorbitol MacConkey agar (CT-SMAC) e di un secondo terreno selettivo complementare; conferma biochimica con test di Kovacs delle colonie indolo-positive e sierologica attraverso reazione di agglutinazione *E. coli* O157:H7 specifica.

Poiché la grande distribuzione rende continuamente disponibile sul mercato una varietà di alimenti molto ampia, ed anche in considerazione del successivo avvento di nuovi sierogruppi sulla scena epidemiologica, la ISO 16654:2001 è apparsa non più sufficiente per offrire garanzie di sicurezza alimentare. Si è infatti evidenziata la necessità di nuovi metodi che permettessero di identificare la presenza di tutti gli STEC, in maniera specifica, rapida e sensibile. A tale proposito, sono stati sviluppati dei protocolli di tipo molecolare basati sulla rilevazione dei geni di virulenza di STEC e geni sierogruppo-specifici in PCR o real-time PCR. In quest’ottica, è stato pubblicato 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)’ che ha proposto di affiancare la ricerca in PCR dei geni delle shigatossine alla ISO 16654:2001 per la rilevazione di *E. coli* O157 e di effettuare l’identificazione dei principali sierogruppi mediante un protocollo in real-time PCR, che all’epoca (2009) era ancora in corso di valutazione da parte del Working Group 6 of the Technical Committee 275 of the European Committee for Standardization (CEN TC275/WG6). Il documento ha inoltre avuto la ulteriore finalità di armonizzare i metodi di ricerca degli STEC negli Stati Membri e di conseguenza facilitare il monitoraggio dei patogeni in oggetto e l’analisi costo-efficacia (EFSA, 2009).

Per poter adottare ufficialmente tale metodo alternativo, è stato necessario dimostrarne l'equivalenza con il metodo ufficiale ISO 16654:2001, in conformità con la norma ISO16140:2003 "Microbiology of food and animal feeding stuffs. Protocol for the validation of alternative methods". E' tuttavia necessario precisare che la validazione si è limitata a considerare STEC O157, l'unico sierogruppo per il quale esiste un metodo colturale ISO con cui confrontare il metodo alternativo, e non gli altri sierogruppi.

Al termine dello studio di validazione è stata emanata la ISO 13136:2012 (Microbiology of food and animal feed -- Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens -- Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups) con lo scopo di identificare tutti gli STEC attraverso strumenti specifici di detection e di ricerca genica, a partire da matrici alimentari. Nella ISO 13136:2012 vi è una parte iniziale dove gli *E. coli* STEC vengono classificati in 3 gruppi:

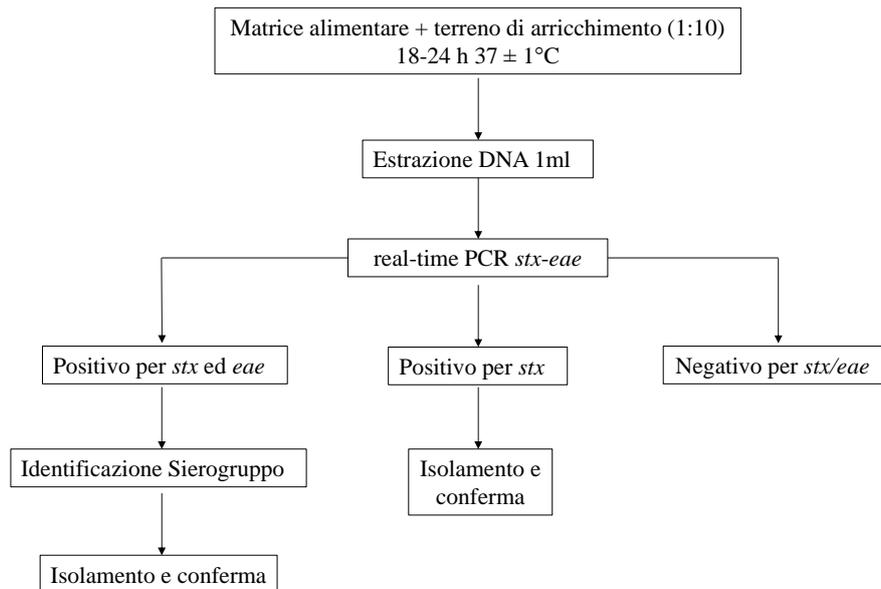
- *E. coli* produttori di Shigatossine (STEC), portatori dei geni codificanti per le shigatossine .
- *E. coli* produttori di Shigatossine (STEC) e in grado di determinano la lesione attaching and effacing, ossia portatori dei geni codificanti per le shigatossine, per l'intimina (*eae*).
- *E. coli* produttori di Shigatossine (STEC) appartenenti ai sierogruppi maggiormente patogeni, ossia portatori dei geni codificanti per le shigatossine, per l'intimina (*eae*) e appartenenti ad uno dei sierogruppi O157-O26-O103-O111-O145

L'aspetto più innovativo ed importante di tale norma è il concetto, sottolineato con enfasi nella premessa, che è necessario considerare ogni STEC come patogeno per l'uomo e quindi potenzialmente in grado di causare patologia grave in relazione alla matrice ed allo stato di salute dell'ospite. Inoltre viene anche sottolineata l'elevata plasticità genomica della specie, in grado di acquisire nuovi determinanti di virulenza mediante batteriofagi "stx-converting". Pertanto il punto chiave del metodo è l'identificazione di ceppi di *E. coli* che possiedono i geni *stx1* ed *stx2*. L'importante fattore di virulenza *eae* è qui considerato un target addizionale. Infine sono forniti i metodi per la rilevazione dei geni associati ai sierogruppi maggiormente patogeni O157, O111, O26, O103 ed O145.

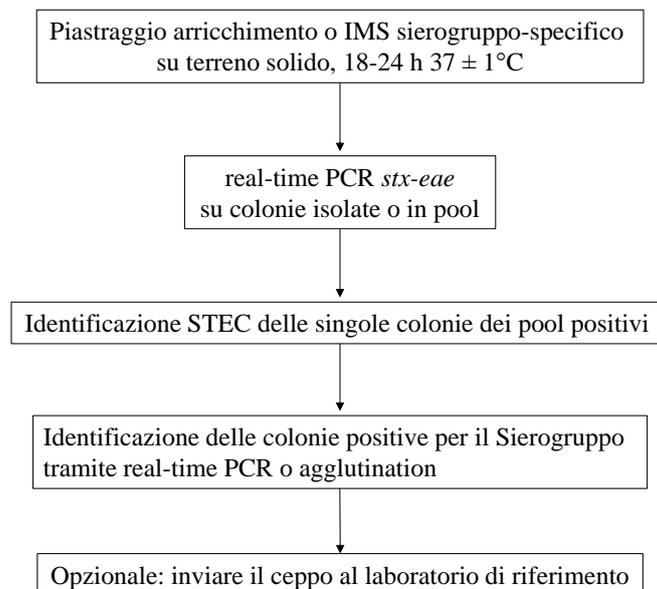
La fase iniziale del metodo ne costituisce un punto chiave. Il primo step è infatti rappresentato dalla fase di arricchimento, in cui i campioni alimentari sono miscelati in rapporto di 1:10 con un terreno liquido al fine di disperdere i microrganismi all'interno della fase liquida, permettere loro la crescita in condizioni ottimali e consentire l'estrazione dei batteri nella fase liquida (che può essere facilmente manipolata). Pertanto, vengono indicati i terreni da utilizzare durante questa fase:

- modified Tryptone-Soy Broth con l'aggiunta di novobiocina concentrata 16 mg/L (mTSB+N<sub>16</sub>)
- modified Tryptone-Soy Broth con l'aggiunta di acriflavina concentrata 12 mg/L (mTSB+A<sub>12</sub>)
- Buffered Peptone Water (BPW)

Nello specifico, si suggerisce di utilizzare l'mTSB+N<sub>16</sub> per i campioni alimentari che si presuppone contengano un elevato livello di microflora contaminante; l'mTSB+A<sub>12</sub> viene consigliata per l'analisi dei campioni di latte e prodotti caseari; il BPW, invece, è suggerito per i campioni con una carica batterica stressata (come prodotti congelati) e con un livello basso di microflora contaminante. E' da sottolineare la riduzione della concentrazione della novobiocina, da 16 a 20 mg/L, rispetto al valore indicato nella ISO16654:2001. Infatti l'utilizzo di N<sub>20</sub> sembrerebbe inibire la crescita di circa un terzo dei non-O157, aumentando il rischio di falsi negativi (Uemura et al., 2003). Una volta terminata la fase di arricchimento, si ha l'estrazione del DNA e l'amplificazione per i geni target di STEC e sierogruppi. Se il campione risulta positivo si procede con l'isolamento e la conferma del patogeno: viene prelevata un'aliquota direttamente dall'arricchimento e tramite IMS sierogruppo-specifica viene piastrata su terreni selettivi, come Tryptone-Bile-Glucuronic Agar (TBX) o Cefixime Rhamnose Sorbitol Macconkey Agar (CR-SMAC). Le colonie che presentano la morfologia di *E. coli* vengono prelevate in numero di 10-50, trasferite su nutrient agar, riunite in pool da 10 colonie in H<sub>2</sub>O per la lisi da colonia e amplificate per *stx-eae*. Se le colonie risultano positive si esegue l'analisi singolarmente su ogni colonia. Gli isolati vengono confermati o tramite real-time PCR (per i target *stx*, *eae*, sierogruppi) o tramite test di agglutinazione sierogruppo specifico (Figure 5-6).



**Fig. 5:** Schema del test di screening della ISO13136:2012 per l'identificazione di STEC e sierogruppi.



**Fig. 6:** Schema della procedura di isolamento e conferma della ISO13136:2012.

Per i campioni risultati positivi ad un solo target (*stx*) o ad entrambi (*stx-eae*) ma negativi per il sierogrupo, è richiesto solo il piastraggio dell'arricchimento direttamente su terreno selettivo, senza effettuare l'IMS.

La ISO 13136:2012 è una procedura versatile in quanto applicabile a: prodotti alimentari utilizzati per il consumo umano e per l'alimentazione animale; campioni ambientali nelle aree di produzione e trasformazione alimentare; campioni ambientali nelle aree di produzione primaria. Per quanti riguarda invece i ceppi EAggEC, l'EURL VTEC, successivamente ai casi di infezione verificatisi in Germania nel 2011, ha

emanato dei protocolli rivolti all'identificazione di questo patogruppo da campioni alimentari mediante ricerca dei geni *aggR* ed *aaiC* (EU RL\_Method\_05\_Rev 1, Detection of Enteroaggregative *Escherichia coli* in food by Real Time PCR amplification of the *aggR* and *aaiC* genes), che sono i medesimi target identificati da ECDC ed EFSA (EU RL\_Method\_05\_Rev 1). Un ulteriore protocollo di real-time PCR è stato prodotto per l'identificazione del sierogruppo O104:H4 (EU-RL VTEC\_Method\_04\_Rev 1, Detection and identification of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) O104:H4 in food by Real Time PCR).

Mentre in Europa la validazione di metodi analitici viene eseguita dall'International Organization for Standardization (ISO), in USA questo compito viene svolto dalla Food and Drug Administration (FDA) e da United States Department of Agriculture (USDA), Food Safety and Inspection Service (FSIS). Queste due strutture lavorano in sinergia per garantire la sicurezza alimentare.

L'FDA è una agenzia federale sotto il diretto controllo del Dipartimento della Salute e dei Servizi Umani. Opera nella protezione e promozione della salute pubblica attraverso il controllo della sicurezza alimentare, prodotti del tabacco, integratori alimentari, vaccini, farmaci, trasfusioni, strumenti medicali, cosmesi, mangimi per animali. Il controllo sugli alimenti viene eseguito a 360 gradi, coprendo un'ampia gamma di settori: sicurezza microbiologica e riduzione di malattie alimentari, presenza di additivi, integratori alimentari, benessere degli animali da macello, residui di farmaci nelle carni, protezione delle forniture alimentari locali da contaminazioni internazionali, controllo delle etichettature dei prodotti della grande distribuzione. Circa l'80-90% di tutte le forniture alimentari negli USA sono sotto la giurisdizione dell'FDA. Questa esercita un'azione di controllo su tutti i prodotti alimentari locali ed importati, escluso la categoria "prodotti della carne e pollame". I prodotti delle uova, sia fresche, congelate o disidratate, sono monitorate in collaborazione con l'FSIS.

L'USDA FSIS, invece, è un ente di sanità pubblica ed è sotto il diretto controllo del Dipartimento di Agricoltura. La sua attività viene svolta su circa il 10-20% di tutte le forniture alimentari degli USA e certifica che il prodotto sia sicuro, sano e correttamente confezionato ed etichettato. Opera su carcasse di animali prelevate dai macelli, sui prodotti alimentari della grande distribuzione e prodotti importati, durante i processi di trasformazione. Cadono sotto la sua giurisdizione i prodotti della carne, bovini, ovini, suini, caprini ed equini, e gli uccelli da cortile come polli, tacchini, anatre e oche. Inoltre

condivide la responsabilità del controllo dei prodotti a base di uova con l'FDA. Le due agenzie si dividono la responsabilità della sicurezza alimentare, adottando metodiche e protocolli differenti.

Il 29 giugno del 2014 l'USDA ha messo a punto un metodo molecolare per l'identificazione di *E. coli* O157:H7 a partire da campioni di carne (USDA-FSIS MLG 5.08 "Detection, Isolation and Identification of *Escherichia coli* O157:H7 from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges). Recentemente questa procedura è stata sostituita dalla versione 5.09 che include anche il metodo per la rilevazione dei sierogruppi non-O157. Di pari passo con lo sviluppo tecnologico associato alle metodiche di indagine, la stessa procedura è stata poi oggetto di ulteriori integrazioni, come la USDA-FSIS MLG 5A.04 (FSIS Procedure for the Use of *Escherichia coli* O157:H7 Screening Tests for Meat Products and Carcass and Environmental Sponges) che utilizza un metodo molecolare, il BAX System Real-Time PCR Assay per l'identificazione di *E. coli* O157:H7, per effettuare uno screening qualitativo preliminare dei campioni alimentari da esaminare. Per l'identificazione di STEC non-O157 è stata invece prodotta la metodica USDA-FSIS MLG 5B.05 (Detection and Isolation of non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) from Meat Products and Carcass and Environmental), che analogamente utilizza la tecnologia BAX System per l'identificazione dei sierogruppi. Queste procedure possono essere applicate anche a campioni di carne di maiale e/o pollo.

Per tutte le altre categorie alimentari, come i germogli, la FDA ha emanato dei protocolli che descrivono le procedure da seguire per la ricerca dei principali patogeni (*E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Campylobacter*). In particolar modo nel protocollo FDA Bacteriological Analytical Manual (BAM) Chapter 4 è possibile seguire le indicazioni ufficiali per la ricerca di *E. coli* O157 e non-O157 in diverse matrici alimentari. Come target genici sono indicati *stx1* ed *stx2* e la successiva conferma del sierogruppo O157 avviene attraverso metodiche sia molecolari che colturali. Se il campione risulta positivo per *stx* ma negativo per O157, deve essere processato per l'identificazione del sierogruppo e poiché si è visto che la presenza di geni codificanti fattori di aderenza inducono stati debilitanti molto gravi, è stato sviluppato un saggio in 13-plex in grado di identificare i sierogruppi di maggiore rilevanza clinica (O26, O45, O91, O103, O104, O111, O113, O121, O128, O145, and O157) e i geni *aggR* ed *eae*. Questo è stato sviluppato utilizzando la tecnologia Luminex.

## KIT DIAGNOSTICI

La sicurezza alimentare svolge un ruolo fondamentale nel contenere la propagazione di malattie infettive e nel tutelare il consumatore. Poiché compito della sanità pubblica è quello di prevenire lo sviluppo di focolai epidemici, tramite ad esempio il ritiro immediato dal mercato di un ipotetico lotto alimentare contaminato, è di primaria importanza avere a disposizione procedure, macchinari e saggi diagnostici semplici e rapidi da utilizzare.

La grande industria biotecnologica ha recepito questa necessità e ha sviluppato negli ultimi anni una serie di saggi molecolari in grado di rilevare i più importanti patogeni alimentari. In modo particolare per *E. coli* produttore di shigatossine sono in commercio numerosi kit diagnostici in grado di identificarne in maniera rapida e sensibile i geni target specifici per STEC e per i principali sierogruppi. Alcuni esempi di grandi aziende che partecipano attivamente nel campo del controllo alimentare sono BioRad, Life Technologies, DuPont, Qiagen ognuna delle quali si presenta sul mercato con un proprio prodotto. Alcuni di questi kit diagnostici sono riportati in Tabella 4:

**Tab. 4:** Aziende produttrici di kit diagnostici per la rilevazione di STEC.

Azienda	Gene target	Sierogruppi	Matrici	Certif.
Biorad	<i>stx1-stx2-eae</i>	O157-O26-O111-O45 O145-O121-O103	Carne cruda, prodotti caseari da latte crudo, campioni ambientali	AOAC
Life Tech.	<i>stx1-stx2-eae</i>	O157-O26-O111-O45 O145-O121-O103	Carne macinata, maiale, pollame	AOAC
DuPont	<i>stx1-stx2-eae</i>	O157-O26-O111-O45 O145-O121-O103	Carne macinata, pollame	AOAC
Biotecon Diagnostic	<i>stx1-stx2-eae</i>	8 sierotipi	Diverse tipologie alimentari	AOAC
Pall Corporation	<i>stx1-stx2-eae</i>	O157-O26-O91-O103 O111-O111-O145	Diverse tipologie alimentari	-
Qiagen	<i>stx1-stx2</i>	O157-O26-O45-O103 O111-O121-O145	Carne e diverse tipologie di alimenti	-
Instantlabs	<i>stx1-stx2-eae</i>	O157-O26-O111-O45 O145-O121-O103	Carne macinata, insalata, succo di mela, pollame	AOAC
Altona Diagnostics	<i>stx1-stx2- ipaH</i>	-	Test diagnostico in vitro	-
r-biopharm	<i>stx1-stx2-eae</i>	-	Prodotti a base di carne, prodotti lattiero caseari, verdura	-

# SCOPO DEL LAVORO

---

Alcuni patogruppi della specie batterica *Escherichia coli* sono microrganismi altamente pericolosi per l'uomo, poiché in grado di causare stati patologici anche gravi, come la colite emorragica o la sindrome emolitica-uremica che può portare a insufficienza renale acuta e talvolta avere un decorso mortale. Ceppi patogeni di *E. coli* sono stati in passato, e lo sono ancora oggi, responsabili di numerose epidemie a livello mondiale, riuscendo a colpire tutte le fasce di età della popolazione, con particolare riferimento ai soggetti in età pediatrica. Proprio per la loro pericolosità e patogenicità, sia a livello Comunitario che internazionale, sono stati adottati dei provvedimenti a livello di sicurezza alimentare per limitarne la diffusione. In Europa con la norma ISO13136:2012, che ha integrato la precedente ISO 16654:2001, si dettano le linee guida per la ricerca di *E. coli* O157 e non-O157 produttori di shigatossine attraverso vari metodi, anche molecolari in real-time PCR, mentre con la norma EURL VTEC Method\_05\_Rev 1 si indicano i criteri per la ricerca di *E. coli* enteroaggregativi, entrambi applicati a matrici alimentari; diversamente negli USA tramite il metodo FSIS Microbiology Laboratory Guidebook (MLG) 5A.04 e 5B.05, ed FDA/BAM (Bacteriological Analytical Manual) si descrivono le procedure per la ricerca di *E. coli* STEC O157 e non-O157 in alimenti. L'elemento che accomuna tutte queste norme è la 'tolleranza-zero' nei confronti degli STEC. Ecco perché il nostro scopo è stato quello di sviluppare dei saggi molecolari in real-time PCR specifici, sensibili ed efficienti in grado di soddisfare le richieste della sicurezza alimentare in merito a tali patogruppi.

In particolare gli obiettivi dello studio si sono articolati in 1) realizzazione di un saggio molecolare per l'identificazione dei geni *stx1-stx2-eae* caratteristici degli Shigatoxin-producing *E. coli* (STEC); 2) realizzazione di un saggio molecolare per l'identificazione dei sierogruppi di *E. coli* maggiormente associati a casi di infezioni severe nell'uomo (O157, O26, O103, O104, O111, O145); 3) realizzazione di un saggio molecolare per l'identificazione di *E. coli* Enteroaggregativi (EAggEC) attraverso la detection dei geni target *aggR* ed *aaiC*; 4) applicazione dei saggi molecolari per la rilevazione di STEC e dei sierogruppi su matrici alimentari artificialmente contaminate, in accordo con la norma ISO 13136:2012 ed EU-RL VTEC\_Method\_04\_Rev 1; 5) confronto dei metodi sviluppati con i protocolli ufficiali in vigore negli USA e redatti da US Department of Agriculture-Food Safety and Inspection Service, Food and Drug Administration (USDA-FSIS, FDA).

Questo lavoro è stato realizzato nell'ambito del Progetto Eureka ed ha ricevuto parziale finanziamento, oltre che dall'Università degli Studi di Urbino "Carlo Bo", dalla

Regione Marche e dall'Azienda Diatheva srl, che ha anche fornito i materiali per lo studio. Il fine ultimo del progetto è stato infatti quello di sviluppare dei kit commerciali per la rilevazione dei patogruppi sopra descritti per potenziali utilizzatori, quali i laboratori e gli Enti che si occupano di sicurezza alimentare.

# MATERIALI E METODI

---

## **STUDIO BIBLIOGRAFICO E SELEZIONE DEI GRUPPI DI *ESCHERICHIA COLI* PATOGENI**

Nella fase iniziale di questo studio è stata effettuata una ricerca bibliografica per individuare i gruppi di *E. coli* patogeni da considerare come target per il metodo diagnostico da sviluppare. Oltre alla letteratura scientifica reperita dalla sezione PubMed del sito del National Center for Biotechnology Information (NCBI, [www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed)), sono stati consultati documenti ottenuti da siti istituzionali, in particolare dal Laboratorio Europeo di riferimento per *E. coli* verocitotossiche, presso l'Istituto Superiore di Sanità (EURL VTEC, [www.iss.it/vtec](http://www.iss.it/vtec)) e dell'European Food Safety Authority (EFSA, [www.efsa.europa.eu/it](http://www.efsa.europa.eu/it)). Alcuni di questi regolamenti sono:

- Scientific Opinion on VTEC-seropathotype and scientific criteria regarding pathogenicity assessment (EFSA Panel on Biological Hazard – BIOHAZ,2013)
- Regolamento CE 2073/2015
- Regolamento EU N. 209/2013
- UNI EN ISO 16654:2003 Microbiology Of Food And Animal Feeding Stuffs - Horizontal Method For The Detection Of Escherichia Coli O157
- UNI EN ISO 13136:2012 Microbiology of food and animal feed -- Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens -- Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups

## **CEPPI DI *ESCHERICHIA COLI***

In questo studio sono stati utilizzati 44 ceppi di *E. coli*. Alcuni erano ceppi di collezione del nostro laboratorio; 12 ceppi, positivi per i geni target, sono stati utilizzati durante le prove presso United States Department of Agriculture (USDA, Wyndmoor, Philadelphia, USA). Altri, tra cui alcuni isolati contenenti tutte le varianti note dei geni *stx1* e *stx2*, sono stati ottenuti dall'EURL VTEC (Dott. Caprioli). Un ceppo di *E. coli* O104 è stato acquistato da Statens Serum Institut (Copenaghen, Danimarca). Infine un campione di DNA purificato, appartenente al ceppo di STEC O104 responsabile dell'epidemia in Germania del 2011 è stato inviato dall'Istituto di Igiene dell'Università di Munster (Germania, Prof. Karch). Le caratteristiche di questi isolati sono riportate in Tabella 5. Tutti i ceppi sono stati fatti crescere in terreno selettivo EMB (Eosin Methylene Blue Agar) e non selettivo TSA (Trypticase Soy Agar) e incubati a 30-37°C per 24 h. Successivamente per ogni campione sono state allestite microbank (cryovials) o mantenuti in TSB con 20% di glicerolo, per la conservazione a -80°C.

**Tab. 5:** Elenco dei ceppi di *E. coli* e caratteristiche molecolari.

Ceppi	Caratteristiche genetiche					Sierotipo
	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>	<i>aggR</i>	<i>aaiC</i>	
D2435	<i>stx1a</i>	<i>stx2a</i>	-	-	-	O48
D2587	-	<i>stx2b</i> <i>stx2c</i>	-	-	-	O174
D3435	-	<i>stx2d</i>	-	-	-	O73
D3509	-	<i>stx2g</i>	-	-	-	O2
D3522	<i>stx1d</i>	-	-	-	-	O8
D3546	-	<i>stx2f</i>	+	-	-	O128
D3602	<i>stx1c</i>	<i>stx2b</i>	-	-	-	O174
D3648	-	<i>stx2e</i>	-	-	-	O139
ED495	-	<i>stx2c</i> <i>stx2d</i>	-	-	-	O113
ED513	-	<i>stx2b</i>	-	-	-	O128
ED546	-	<i>stx2e</i>	-	-	-	O159
ED585	<i>stx1a</i>	-	+	-	-	O111
ED600	<i>stx1a</i>	-	+	-	-	O26
ED603	-	<i>stx2a</i>	+	-	-	O121
ED643	<i>stx1a</i>	-	+	-	-	O26
ED645	-	<i>stx2a</i>	+	-	-	O145
ED654	-	<i>stx2a</i>	+	-	-	O26
EF292	-	-	+	-	-	O145
EF299	-	-	+	-	-	O145
EF333	-	-	+	-	-	O26
EF334	-	-	+	-	-	O26
EF335	-	-	+	-	-	O26
EF337	-	-	+	-	-	O26
UU O26	+	+	+	-	-	O26
UU O103	-	+	+	-	-	O103
UU O145	+	-	+	-	-	O145
UU O111	-	-	+	-	-	O111
1952 O157	-	+	+	-	-	O157
ATCC 35150 O157	+	+	+	-	-	O157
F146 O157	-	+	+	-	-	O157
05_6544	<i>stx1a</i>	-	+	-	-	O26
04_2446	<i>stx1a</i>	-	+	-	-	O103
00_4748	<i>stx1a</i>	<i>stx2a</i>	+	-	-	O111
07_865	-	<i>stx2a</i>	+	-	-	O145
380_94	<i>stx1a</i>	<i>stx2a</i>	+	-	-	O157
98-8338	+	-	+	-	-	O111
01-387	<i>stx1a</i>	-	+	-	-	O111
TB226	n.d.	n.d.	n.d.	-	-	O111
95-0586	n.d.	n.d.	n.d.	-	-	O111
SSI 82110	-	-	-	-	-	O104
O104:H4*	-	<i>stx2a</i>	-	+	+	O104
2011C-3493	-	<i>stx2a</i>	-	+	+	O104
2009EL-2050	n.d.	n.d.	-	+	+	O104
UU O42	-	-	-	+	+	O42

\* DNA del ceppo O104 inviato dal Prof. Karch  
n.d. non determinato

### Altri ceppi batterici

Per le prove di specificità (exclusivity) sono stati utilizzati 22 ceppi non target (Tabella 6), incluse diverse specie di *Enterobacteriaceae*, presenti nella collezione di laboratorio. I ceppi sono stati seminati su terreni solidi TSA e fatti crescere a 37°C per 24 h.

**Tab. 6:** Elenco dei ceppi utilizzati per le prove di esclusività.

Ceppi	Caratteristiche geniche		
	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<i>eae</i>
<i>Enterococcus faecalis</i> UU 4421	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-	-
<i>E. coli</i> UU1	-	-	-
<i>E. coli</i> UU2	-	-	-
<i>E. coli</i> UU3	-	-	-
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090	-	-	-
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 9525	-	-	-
<i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 8724	-	-	-
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	-	-	-
<i>Serratiamarcescens</i> ATCC 14756	-	-	-
<i>Aeromonashydrophila</i> ATCC 7966	-	-	-
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	-	-	-
<i>Salmonella enteritidis</i> UU7	-	-	-
<i>Salmonella</i> Newport UU2	-	-	-
<i>Citrobacterfreundii</i> ATCC 8090	-	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	-	-	-
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	-	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	-	-	-
<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 10145	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	-	-	-
<i>S.aureus</i> ATCC 25923	-	-	-

## SAGGIO PER L'IDENTIFICAZIONE DI *E. COLI* PRODUTTORI DI SHIGATOSSINE (STEC)

### Selezione di geni e sequenze target

È stato inizialmente allestito un database contenente tutte le sequenze dei geni da impiegare come target di amplificazione nel saggio di real-time PCR. I geni erano i seguenti: *stx1* ed *stx2*, codificanti per le shigatossine di *E. coli* STEC; *eae*, gene dell'intimina. Le sequenze sono state reperite sulla banca dati GenBank dell'NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Sono stati individuati gli Accession Number citati in bibliografia (Son et al., 2014; EU-RL VTEC\_Method\_02\_Rev 0, 2013; EU RL\_Method\_05\_Rev 1, 2013; Lacher et al., 2006; Tzschoppe et al., 2011) ed ulteriori sequenze reperite mediante BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

Particolare considerazione è stata rivolta alle diverse varianti con cui si presentano i geni *stx* ed *eae* nei vari ceppi, includendo nell'analisi tutte quelle ad oggi note.

Successivamente, utilizzando il programma ClustalW2 ([www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/)), sono state allineate le sequenze delle diverse varianti geniche, valutandone le regioni conservate e quelle variabili.

### Design di primer e probe per real-time PCR

Per il design di primer e probe marcate in fluorescenza da utilizzare per il saggio di real-time PCR è stato utilizzato il programma Primer Express versione 3.0.1 (Life Technologies, Foster City, California). I parametri utilizzati per la selezione degli oligonucleotidi sono riportati in Tabella 7:

**Tab. 7:** Parametri utilizzati per il design degli oligonucleotidi.

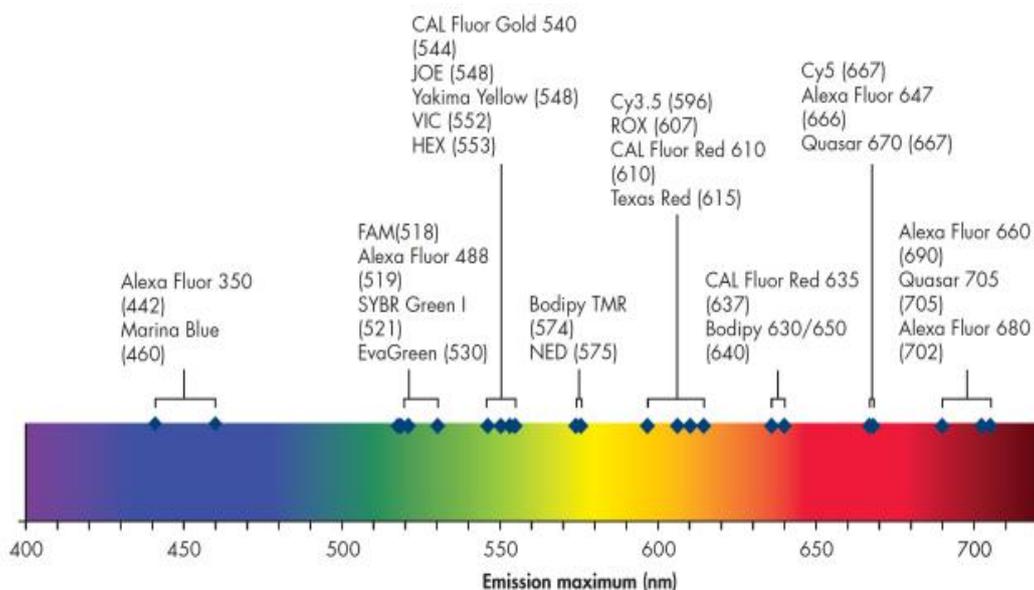
<b>Primer Tm</b>	
Min Primer Tm	58
Max Primer Tm	60
Max Difference in Tm of Two Primers	2
<b>Primer and Probe GC content</b>	
Min Primer and Probe % GC content	30
Max Primer and Probe % GC content	80
Max Primer 3' GC's	2
<b>PrimerLength</b>	
Min Primer Length	9

Max Primer Length	40
Optimal Primer Length	20
<b>Primer and Probe Composition</b>	
Max Primer G Repeats	3
Max Probe G Repeats	3
<b>Primer and Probe Secondary Structure</b>	
Max Primer and Probe Consec Base Pair	4
Max Primer and Probe Total Base Pair	8
<b>Probe Tm</b>	
Min Probe Tm	68
Max Probe Tm	70
<b>Probe Length</b>	
Min Probe Length	13
Max Probe Length	30
<b>Amplicon</b>	
Min Amplified Region Tm	0
Max Amplified Region Tm	85
Min Amplified Region Length	50
Max Amplified Region Length	150

\*Tm: temperatura di melting

In una prima fase per il saggio STEC è stata disegnata una coppia di primer che potesse amplificare entrambi i geni delle shigatossine *stx1* e *stx2*, utilizzando due differenti probe, specifiche per le due forme, per discriminarle. Successivamente il protocollo è stato modificato e sono stati progettati due diversi set di primer e probe specifici per *stx1* e *stx2*.

I diversi set di oligonucleotidi selezionati dal programma sono stati posizionati sugli allineamenti, al fine di individuare quelli presenti sulle regioni maggiormente conservate tra le varianti. Ogni oligonucleotide è stato analizzato per la Tm (Temperatura di melting), la percentuale di GC, strutture secondarie e dimeri come hairpin, self dimer e cross dimer mediante OligoAnalyzer 3.1, disponibile sul sito [www.eu.idtdna.com/sessionTimeout.aspx](http://www.eu.idtdna.com/sessionTimeout.aspx), (IDT Integrated DNA Technologies). I limiti di accettabilità sono stati:  $\Delta G$  (Kcal/mol) -2/-3 per gli hairpin;  $\Delta G$  -5/-6 per i self dimer;  $\Delta G$  -5/-6 per i cross dimer. Le marcature delle probe sono state selezionate, anche secondo i suggerimenti del Produttore (Biosearch Technologies, Petaluma, CA), per poter essere utilizzate su differenti strumentazioni ed in base alla compatibilità con i canali di eccitazione e di detection di fluorescenza. In Figura 7 sono riportate le marcature disponibili con le relative lunghezze d'onda di emissione.



**Fig. 7:** Massima emissione (nm) visualizzata in parentesi e relativi marcatori.

Nelle Tabelle 8-9-10 sono invece riportate le detection capabilities dei principali strumenti per real-time PCR.

**Tab. 8:** RotorGene 6000, caratteristiche dei canali deputati alla rilevazione del segnale e relativi fluorofori.

Canale	Eccitazione	Emissione	Fluoroforo
Verde	470	510	FAM/ SybrGreen
Giallo	530	550	VIC (JOE)
Arancione	585	610	ROX
Rosso	625	660	CalFluorRed 635
Crimson	680	710	Quasar 705
HRM	460	510	SybrGreen I; SYTO9

**Tab. 9:** 7500 Real-Time PCR System, elenco dei fluorofori detectabili.

<b>Fluoroforo</b>
Fam/SybrGreen
VIC/JOE
TAMARA/NED/CY3
ROX/TEXAS RED
CY5

**Tab. 10:** Rotor Gene Q, caratteristiche dei canali deputati alla rilevazione del segnale e relativi fluorofori.

Canale	Eccitazione	Emissione	Fluoroforo
Blue	365 ± 20	460 ± 20	Marina Blue; Edans
Verde	470 ± 10	510 ± 5	Sybr Green; EvGreen
Giallo	530 ± 5	557 ± 5	Joe; VIC; TET
Arancione	585 ± 5	610 ± 5	Rox; Texas Red
Rosso	625 ± 5	660 ± 10	Cy5; Quasar 670
Crimson	680 ± 5	712	Quasar 705
HRM	460 ± 20	510 ± 5	SybrGreen I; SYTO9

## Prove di ottimizzazione in formato singleplex

### *Prove di specificità: inclusivity ed exclusivity*

Tutti i set di primer disegnati in questo studio sui geni delle shigatossine sono stati inizialmente testati su campioni di DNA di STEC ottenuti dai ceppi già riportati in Tabella 4. Le coppie con inclusivity soddisfacente sono poi state testate per l'exclusivity con tutti gli altri ceppi non-STEC riportati in Tabella 5.

Le prove di specificità sono state realizzate utilizzando una mix standard Diatheva per real-time PCR, utilizzando la chimica del SybrGreen. La reazione è stata effettuata mediante thermalcycler RotorGene 6000 (Corbett Research, Sydney, Australia). Le condizioni di amplificazione sono riportate in Tabella 11.

**Tab. 11:** Protocollo termico per le prove di specificità con saggio SybrGreen.

STEP	TEMPERATURA	TEMPO	CICLI
Denaturazione iniziale	95°C	10 min	1X
Denaturazione	95°C	15 sec	35X
Annealing/estensione	60°C	1 min	

Alla fase di amplificazione seguiva il protocollo di melting con una pre-fase di 90 secondi a 72°C, seguita da un incremento di temperatura da 60 a 95°C con step di 1°C (5 secondi ogni step). L'acquisizione del segnale è eseguita ad ogni step per il canale verde.

Per determinare la variante del gene *eae* posseduta dai ceppi in nostro possesso è stata effettuata una caratterizzazione molecolare secondo il protocollo di Madic et al. (2010).

I ceppi batterici positivi per *eae*, mantenuti nelle microbank sono stati messi in coltura su terreno solido selettivo EMB, con incubazione a 35°C per 24 h, quindi una colonia tipica è stata sottocoltivata su terreno TSA, con incubazione come la precedente. Per queste prove è stato utilizzato DNA ottenuto mediante lisi da colonia: da colonia fresca è stato prelevato del materiale batterico tramite ansa, stemperato in 50µl di H<sub>2</sub>O sterile, mantenuto in acqua in ebollizione per 5 minuti ed infine centrifugato a 12000 g per 20 minuti a 4°C. Il surnatante contenente il DNA è stato prelevato per l'amplificazione in real-time PCR utilizzando i primer riportati in Tabella 12.

**Tab. 12:** Primer utilizzati per le prove di tipizzazione delle varianti del gene *eae* (Madic et al., 2010)

Variante	Nome Primer	Sequenza 5'-3'	Tm	% GC	Lungh.	Ampl.
<b>eae-β1</b>	eaeFβ1	ACACAATTAATGCACCGGGTAGT	58	43	23	96
	eaeRβ1	CGCTATTTGTCTTACATTTGTTTTTCG	59	35	26	
<b>eae-γ1</b>	eaeFγ1	GATGGTACATATTCATGGTATTCAGAAAA	59	31	29	76
	eaeRγ1	CCATTCAAAAGTGACTTTCCCTGATG	59	44	25	
<b>eae-ε</b>	eaeFε	GAGGCAACATGTAGAATGAATAATGC	59	38	26	79
	eaeRε	CGCCCCATTTATTATACACATCCT	59	42	24	
<b>eae-θ</b>	eaeFθ	AAAGCACCTGAGGTTACATTTTTTG	59	36	25	93
	eaeRθ	GATATTAGGTAAGTCACCAGTAACGTTCTT	58	37	30	

È stata allestita una mix di reazione con la chimica del SybrGreen utilizzando le concentrazioni indicate nel lavoro di Madic et al. (2010): 3 mM di MgCl<sub>2</sub>, 200μM di dNTP, 200 ng/μl di BSA e 0.625 U/reazione di Taq polimerasi; i primer sono stati utilizzati alla concentrazione di 0.3 μM per le varianti β1, γ1, ε e alla concentrazione di 0.8 μM per la variante θ. La reazione è stata effettuata mediante thermalcycler RotorGene 6000, caricando 5μl di DNA in un volume finale di 25 μl. E' stato utilizzato il seguente protocollo termico (Tabella 13):

**Tab. 13:** Profilo termico del saggio di tipizzazione delle varianti del gene *eae*.

STEP	TEMPERATURA	TEMPO	CICLI
Denaturazione iniziale	95°C	10 min	1X
Denaturazione	95°C	10 sec	40-50 X
Annealing/estensione	60°C	30 sec	

Alla fase di amplificazione seguiva il protocollo di melting con una pre-fase di 90 secondi a 72°C, seguita da un incremento di temperatura da 72 a 95°C con step di 1°C (5 secondi ogni step). L'acquisizione del segnale è stata eseguita ad ogni step per il canale green.

Per quanto riguarda le prove di specificità del target di amplificazione relativo al gene dell'intimina per il saggio di identificazione di STEC, tutti i ceppi che possedevano il gene *eae*, e di cui erano state determinate le varianti, sono stati impiegati nei test di inclusivity, mentre tutti gli altri ceppi batterici sono stati utilizzati nei test di exclusivity.

## **Comparazione con il protocollo di real-time PCR per l'identificazione di STEC secondo ISO 13136:2012**

Le coppie di primer disegnate in questo studio per i geni delle shigatossine e dell'intimina sono state inoltre confrontate con quella del protocollo EU-RL VTEC (Method\_02\_Rev\_0), utilizzando tutti i ceppi STEC di cui erano note le varianti di *stx1* ed *stx2* e tutti i ceppi positivi per il target *eae*.

L'isolamento e l'amplificazione del DNA sono stati effettuati come per i test di specificità.

### **Prove di sensibilità ed efficienza di amplificazione in singleplex**

Le coppie di oligonucleotidi deputate alla rilevazione dei target *stx*, selezionate dopo i test di specificità, sono state utilizzate per determinarne la sensibilità e l'efficienza di amplificazione attraverso la realizzazione di una mix di reazione contenente le diverse probe marcate in fluorescenza, utilizzando diluizioni di DNA di STEC da  $10^6$  a 1 UG, amplificate in triplicato.

Per questi esperimenti sono stati impiegati i ceppi riportati in Tabella 14:

**Tab 14:** Ceppi batterici utilizzati per i test di sensibilità ed efficienza.

<b>Ceppo batterico</b>	<b>Sierogruppo</b>	<b>Saggio</b>
ATCC 35150	O157	STEC ( <i>stx</i> – <i>eae</i> )
D2435	O48	STEC ( <i>stx</i> )

Il DNA batterico è stato ottenuto mediante purificazione su colonnina. Dopo semina su terreno selettivo e passaggio su TSA come sopra descritto, le colonie sono state messe in coltura in 10 ml di brodo TSB (Tryptic Soy Broth), con incubazione a 37°C per 18 h in agitazione. Un ml di brodocoltura è stato poi centrifugato a 6000 g per 20 minuti a 4°C e dal pellet ottenuto è stato estratto il DNA utilizzando i seguenti kit di estrazione: Bacterial Genomic DNA Isolation KIT (NorgenBiotek, Thorold, Canada) e Blood and Tissue kit (Qiagen, Hilden, Germania), seguendo il protocollo fornito dal produttore per i batteri Gram negativi.

Gli estratti ottenuti sono stati dosati al Nanodrop (Nanodrop Technologies, Wilmington, DE) (2 µl) valutando la concentrazione e la purezza del DNA tramite confronto dei rapporti di assorbanza ottenuti mediante lettura a 260/280 e 260/230 nm. Il calcolo delle

unità genomiche (UG) corrispondenti è stato effettuato assumendo che un genoma di *E. coli* STEC è 5.67 fg ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse/)).

Sono state quindi allestite diluizioni decimali del DNA in H<sub>2</sub>O milliQ sterile per avere un range di concentrazioni da 10<sup>6</sup> a 1 UG in 5 µl.

Le diluizioni sono state amplificate in triplicato.

E' stata utilizzata una mix di reazione con le stesse caratteristiche descritte nel paragrafo 'Prove di specificità: inclusivity ed esclusivity' saggio STEC a cui è stata aggiunta la probe marcata in fluorescenza.

Per ogni campione sono stati utilizzati 20 µl di mix e 5 µl di DNA, per un totale di 25µl. Per il controllo negativo (No Template Control, NTC) sono stati aggiunti 5 µl di H<sub>2</sub>O milliQ sterile in sostituzione del DNA.

La reazione è stata effettuata mediante thermalcycler RotorGene 6000. Le condizioni di amplificazione erano uguali a quelle utilizzate nelle prove di specificità, ma con durata della denaturazione ad ogni ciclo di 10 secondi anziché 15.

Sono state costruite le rette di calibrazione mettendo in relazione le quantità di DNA iniziali, espresse in forma logaritmica, con i Ct corrispondenti, e la slope della retta è stata utilizzata per calcolare l'efficienza di amplificazione secondo la seguente formula:

$$E = 10^{-1/slope}$$

ovvero, in percentuale

$$\% \text{ efficienza} = (E-1) \times 100$$

### **Sviluppo del saggio di real-time PCR in formato multiplex, condizioni di reazione e profilo termico**

Il saggio di real-time PCR in formato multiplex è stato sviluppato combinando primer e probe per i geni delle shigatossine (*stx1*, *stx2*) e dell'intimina (*eae*), in presenza di un sistema di controllo interno di amplificazione (Internal Amplification Control, IAC). Quest'ultimo era costituito da un plasmide sintetico e da uno specifico set di primer e probe (informazioni di proprietà di Diatheva srl).

### *Set-up della reazione di amplificazione*

Per la reazione di amplificazione, secondo il protocollo in multiplex real-time PCR, è stata utilizzata una mix standard Diatheva a cui sono stati aggiunti e testati primer e probe a diverse concentrazioni per individuare il settaggio ottimale.

Per le prove di amplificazione sono state utilizzate diluizioni di DNA batterico nel range  $10^6$ -1 UG per reazione. Per ogni campione sono stati utilizzati 20 µl di mix e caricati 5 µl di DNA, per un totale di 25 µl. Per il controllo negativo (No Template Control, NTC) sono stati aggiunti 5 µl di acqua sterile in sostituzione del DNA.

Inoltre i parametri di efficienza e di sensibilità sono stati valutati nelle diverse varianti dei geni *stx1* e *stx2*, utilizzando concentrazioni di DNA scalari dei ceppi ED585 (*stx1a*), D3602 (*stx1c*), D3522 (*stx1d*), ED603 (*stx2a*), ED513 (*stx2b*), ED495 (*stx2c + d*), D3435 (*stx2d*), D3648 (*stx2e*), D3546 (*stx2f*), e D3509 (*stx2g*).

La reazione è stata effettuata mediante thermalcycler RotorGene 6000, con profilo termico uguale a quello già utilizzato per le prove di efficienza in singolo, tranne la fase di Melt.

Il segnale fluorescente prodotto dall'idrolisi delle probe marcate è rilevato nei seguenti canali, durante la fase di annealing/estensione (Tabella 15):

**Tab. 15:** Canali deputati alla rilevazione della fluorescenza degli amplificati.

<b>GENE TARGET</b>	<b>CANALE DI ACQUISIZIONE</b>
<i>stx1-stx2</i>	Verde (Ex 495-Em 520 nm)
<i>eae</i>	Rosso (Ex 647-Ex 667 nm)
IAC	Giallo (Ex 538-Em 554 nm)

### **Prove con concentrazioni diverse dei DNA target**

Sono state allestite prove di amplificazione in cui le sequenze target (*stx1* o *stx2/eae*) erano presenti a concentrazioni iniziali non uguali tra loro, e con differenze di 1, 2 o 3 log.

I ceppi target sono stati fatti crescere in TSB in agitazione a 37°C overnight. Successivamente, un'aliquota è stata pellettata e il DNA è stato estratto e dosato come descritto per le prove precedenti. Tutti i campioni sono stati diluiti in H<sub>2</sub>O sterile al fine di ottenere uno stock concentrato  $0.4 \times 10^5$  UG/µl da cui sono state effettuate diluizioni decimali fino alla concentrazione di  $0.4 \times 10$  UG/µl. Prelevando volumi da 2.5 µl di ogni

diluizione, sono state allestite le combinazioni dei target riportate in Tabella 16. I campioni sono stati amplificati in duplicato.

**Tab. 16:** Combinazioni delle diverse concentrazioni delle sequenze target del saggio per l'identificazione di STEC.

<b>UG <i>stx1</i> o <i>stx2</i></b>	<b>UG <i>eae</i></b>
10	10 <sup>3</sup>
10	10 <sup>4</sup>
10 <sup>2</sup>	10 <sup>4</sup>
10 <sup>2</sup>	10 <sup>5</sup>
10 <sup>3</sup>	10
10 <sup>4</sup>	10
10 <sup>4</sup>	10 <sup>2</sup>
10 <sup>5</sup>	10 <sup>2</sup>

## **SAGGIO PER L'IDENTIFICAZIONE DEI PRINCIPALI SIEROGRUPPI DI *E. COLI* PATOGENI (O157, O26, O103, O111, O145 ed O104)**

### **Selezione di geni e sequenze target**

È stato allestito un database contenente tutte le sequenze dei geni da utilizzare come target di amplificazione nei saggi di real-time PCR per l'identificazione dei sierogruppi epidemiologicamente più rilevanti. I geni di interesse erano i seguenti: *rfbE* putative O-antigene transporter per O157; *wzx* putative O-antigene flippase per O26, O103 e per O104; *wbdI* putative glycosyltransferase per O111; *ihp1* inserted hypothetical protein 1, putative outer membrane protein per O145.

Le sequenze sono state reperite ed allineate come descritto per lo sviluppo del saggio per l'identificazione di STEC.

### **Design di primer e probe per real-time PCR**

Per il design di primer e probe marcate in fluorescenza da utilizzare per il saggio di real-time PCR, sono stati utilizzati in un primo momento gli oligonucleotidi indicati dalla norma EU-RL VTEC\_Method\_02\_Rev\_0, "Identification and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) by Real Time PCR amplification of the main virulence genes and the genes associated with the serogroups mainly associated with severe human infections", riportati anche nella norma ISO/TS 13136:2012 (Annex E, Primers and probes for the PCR assays), ma successivamente alcune di queste sequenze sono state sostituite. Nello specifico: per il sierogruppo O157 sono stati utilizzati gli oligonucleotidi indicati da Omiccioli et al. (2009); per O103, invece, sono state disegnate nuove sequenze mediante l'utilizzo di Primer Express seguendo le indicazioni riportate nel capitolo '*Design di primer e probe per real-time PCR*' relativo al saggio per l'identificazione di STEC, e ne sono state valutate le caratteristiche.

## Prove di ottimizzazione in formato singleplex

### *Prove di specificità: Inclusivity ed exclusivity*

Le prove di specificità sono state eseguite sui diversi ceppi di *E. coli* presenti nella collezione di laboratorio dei quali era noto il sierogruppo: 2 per O157, 8 per O26, 1 per O103, 2 per O111, 4 per O145.

Per le prove di exclusivity, ogni coppia di primer è stata testata amplificando alcuni ceppi di *E.coli* non target, di cui era noto il sierogruppo, utilizzando anche il DNA del ceppo O104 fornito dal Prof. Karch.

Per le prove di inclusivity, invece, tutti i ceppi di cui era noto il sierogruppo sono stati amplificati con il set di primer corrispondente.

Per tutte queste prove è stato utilizzato DNA ottenuto mediante lisi da colonia.

La mix di reazione ed il protocollo termico erano gli stessi già utilizzati per le prove del saggio per l'identificazione di STEC. L'amplificazione è stata effettuata mediante thermalcycler RotorGene 6000.

## Prove di sensibilità ed efficienza di amplificazione in singleplex

Tutte le coppie di oligonucleotidi, selezionate dopo i test di specificità, sono state utilizzate per determinare la sensibilità e l'efficienza di amplificazione attraverso la realizzazione di una mix di reazione contenente le diverse probe marcate in fluorescenza.

Per questi esperimenti sono stati impiegati i ceppi riportati in Tabella 17.

**Tab 17:** Ceppi batterici utilizzati per i test di sensibilità ed efficienza.

<b>Ceppo batterico</b>	<b>Sierogruppo</b>	<b>Saggio</b>
ATCC 35150	O157	Sierogruppi (O157)
ED 600	O26	Sierogruppi (O26)
UU O103	O103	Sierogruppi (O103)
ED585	O111	Sierogruppi (O111)
ED645	O145	Sierogruppi (O145)

Il DNA batterico utilizzato è stato ottenuto mediante purificazione su colonna, seguendo le procedure, i kit di estrazione e i dosaggi già riportati per il saggio STEC. Sono state quindi allestite diluizioni decimali del DNA in H<sub>2</sub>O milliQ sterile per avere un range di concentrazioni da 10<sup>6</sup> a 1 UG in 5 µl. Le diluizioni sono state amplificate in

triplicato utilizzando una mix standard Diatheva. Primer e probe sono stati aggiunti secondo il formato finale del saggio.

I volumi di DNA caricati in real-time PCR, il profilo termico della reazione di amplificazione e le rette di calibrazione sono le medesime indicate nel paragrafo ‘*Prove di sensibilità ed efficienza di amplificazione in singleplex*’, per il saggio STEC.

### **Prove di ottimizzazione in formato multiplex, condizioni di reazione e profilo termico**

Al fine di individuare il set-up ottimale con cui accoppiare i sierotipi per la loro rilevazione, sono stati visionati diversi articoli (Fratamico et al., 2011; Wang et al., 2012; Wheeler et al., 2015; Conrad et al., 2014) e diversi kit di amplificazione per i sierogruppi disponibili sul mercato (R-Biopharm A. G., Biorad, LifeTechnologies, BioteconDiagnostics, DuPontBax System).

Successivamente il saggio è stato sviluppato combinando primer e probe per i geni target (*wzx*, *wdbl*, *ihp1*, *rfbE*) in modo da allestire 3 saggi distinti, ciascuno per l’identificazione di due sierogruppi: I set O26/O103; II set O157/O111; III set O145/O104. In tutti i saggi era presente lo IAC.

#### *Set-up della reazione di amplificazione*

Le prove di ottimizzazione dei saggi per la rilevazione dei sierogruppi ha richiesto degli aggiustamenti nella concentrazione dei reagenti della mix di reazione e dei primer, al fine di individuare quelle che meglio fornivano valori di efficienza e sensibilità ottimali.

Per ogni campione sono stati utilizzati 20 µl di mix e 5 µl di DNA, corrispondente a  $1 \times 10^4$  UG totali, per un totale di 25 µl. Per il controllo negativo (NTC) sono stati aggiunti 5 µl di H<sub>2</sub>O milliQ sterile in sostituzione del DNA.

Per la reazione di amplificazione è stato mantenuto il protocollo termico indicato nella Tabella 11.

Il segnale fluorescente prodotto dall’idrolisi delle probe marcate è rilevato nei seguenti canali (Tabella 18), durante la fase di annealing/estensione:

**Tab. 18:** Canali deputati alla rilevazione del segnale di fluorescenza dell'amplificato.

Saggio	Target di Amplificazione	Canale di Acquisizione
O26-O103	<i>wzX</i> <sub>O26</sub>	Verde (Ex 495-Em 520 nm)
	<i>wzX</i> <sub>O103</sub>	Rosso (Ex 647-Ex 667 nm)
	IAC	Giallo (Ex 538-Em 554 nm)
O157-O111	<i>rfbE</i> <sub>O157</sub>	Verde (Ex 495-Em 520 nm)
	<i>wbdl</i> <sub>O111</sub>	Rosso (Ex 647-Ex 667 nm)
	IAC	Giallo (Ex 538-Em 554 nm)
O145-O104	<i>ihp1</i> <sub>O145</sub>	Verde (Ex 495-Em 520 nm)
	<i>wzX</i> <sub>O104</sub>	Rosso (Ex 647-Ex 667 nm)
	IAC	Giallo (Ex 538-Em 554 nm)

### Prove con concentrazioni diverse dei DNA target

Sono state allestite prove di amplificazione in cui erano contemporaneamente amplificate le coppie dei geni target (O26-O103, O157-O111, O145-O104), caricati a concentrazioni diverse. Per queste prove sono stati utilizzati ceppi specifici positivi per i geni target.

Estrazione, dosaggio e diluizioni del DNA sono stati effettuati come per le prove del saggio STEC (Tabella 19).

**Tab. 19:** Combinazioni delle diverse concentrazioni delle sequenze target dei saggi per l'identificazione dei sierogruppi (Saggi O26-O103; O157-O111; O145-O104).

<i>Saggio O26-O103</i>		<i>Saggio O157-O111</i>		<i>Saggio O145-O104</i>	
UG O26	UG O103	UG O157	UG O111	UG O145	UG O104
10	10 <sup>3</sup>	10	10 <sup>3</sup>	10	10 <sup>3</sup>
10	10 <sup>4</sup>	10	10 <sup>4</sup>	10	10 <sup>4</sup>
10 <sup>2</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>4</sup>
10 <sup>2</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>5</sup>
10 <sup>3</sup>	10	10 <sup>3</sup>	10	10 <sup>3</sup>	10
10 <sup>4</sup>	10	10 <sup>4</sup>	10	10 <sup>4</sup>	10
10 <sup>4</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>2</sup>
10 <sup>5</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>2</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>2</sup>

## **SVILUPPO DEL SAGGIO PER L'IDENTIFICAZIONE DI *E. COLI* ENTEROAGGREGATIVI (EAggEC)**

### **Selezione di geni e sequenze target**

È stato allestito un database contenente tutte le sequenze dei geni da utilizzare come target di amplificazione nei saggi di real-time PCR per l'identificazione di EAggEC. I geni di interesse erano i seguenti: *aggR* (di origine plasmidica) regolatore trascrizionale codificante per molteplici fattori di virulenza, ed *aaiC* (di origine cromosomica) codificante per il sistema di secrezione di tipo VI, entrambi associati con i ceppi di *E. coli* enteroaggregativi (EAggEC).

Le sequenze sono state reperite ed allineate secondo le indicazioni riportate nel capitolo '*Target genici selezionati e reperimento sequenze target*', relativo allo sviluppo del saggio per l'identificazione di STEC.

### **Design di primer e probe per real-time PCR**

Per il design di primer e probe specifici per la detection di EAggEC sono state utilizzate le procedure e i parametri descritti nel capitolo '*Design di primer e probe per real-time PCR*', saggio per l'identificazione di STEC.

### **Prove di sensibilità e di efficienza di amplificazione in singleplex**

Primer e probe selezionati con Primer Express sono stati testati sul campione di DNA di EAggEC (ceppo epidemico) fornito dall'Università di Munster, positivo per i geni *aggR* ed *aaiC*. Inizialmente ogni coppia di primer è stata testata separatamente in un saggio di real-time PCR con rilevazione mediante chimica SybrGreen, allo scopo di verificarne la corretta funzionalità. Le concentrazioni dei primer e della mix di reazione sono le medesime riportate nel capitolo '*Prove di specificità: inclusivity ed exclusivity*' per la rilevazione di STEC.

Successivamente sono state inserite le probe, mantenendo le medesime condizioni di mix di reazione e sono stati testati tutti i parametri di amplificazione per ottenere valori ottimali di efficienza e sensibilità. Le condizioni di amplificazione e l'acquisizione del segnale sono le stesse riportate precedentemente.

## **Clonaggio dei marker diagnostici di EAggEC**

### *Amplificazione e purificazione*

Il DNA del ceppo O104 fornito dall'Università di Munster è stato sottoposto a clonaggio per le sequenze target di *aggR* e *aaiC* (*aggR* Accession Number AF411067.1, bp 447-521; *aaiC* Accession Number CP003297.1, bp 60 - 174).

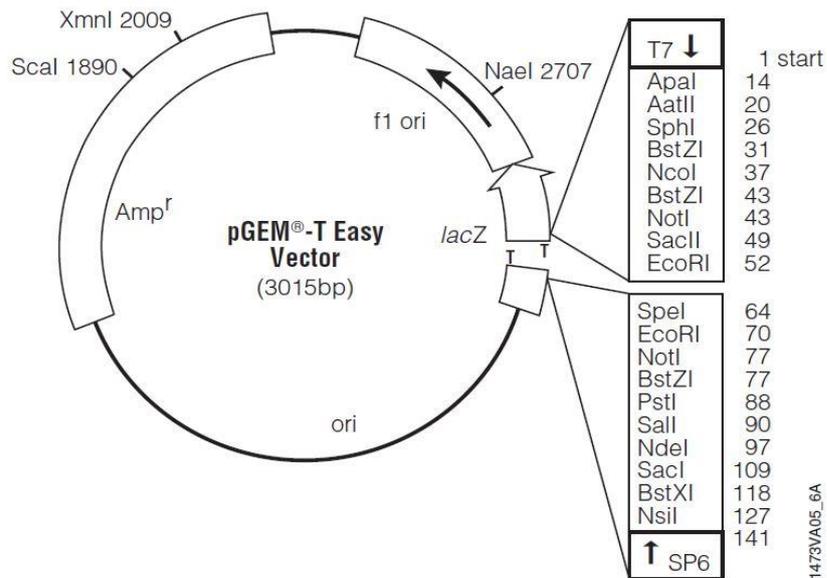
In un primo momento i target genetici sono stati amplificati in PCR, utilizzando una mix standard Diatheva in real-time PCR. Come protocollo termico è stato utilizzato quello indicato nel paragrafo '*Prove di sensibilità ed efficienza di amplificazione*' saggio STEC.

In un volume finale di 25 µl sono stati caricati in PCR 1 µl di DNA del campione *aggR*, concentrato 18 ng/µl, e 2 µl di DNA del campione *aaiC*, concentrato 7 ng/µl.

Successivamente gli amplificati sono stati dosati su gel di agaroso al 2.5% in TBE 1X, utilizzando il marker 100 bp LADDER ed il Marker 9 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Dopo escissione della banda da gel, gli amplificati dosati sono stati estratti mediante QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) seguendo il protocollo fornito dal produttore.

### *Reazione di ligazione*

Per questa fase è stato utilizzato il KIT pGEM-T and pGEM-TeasyVector System (Promega, Wisconsin, USA) seguendo il protocollo fornito dal produttore. Questo kit utilizza come vettore il pGEM-T Easy vector, con le seguenti caratteristiche: *lacZ*, start codon; *lacO*, operatore lac;  $\beta$ -lactamase coding region; SP6 promotore e codone di inizio della trascrizione della polimerasi; T7 promotore e codone di inizio della polimerasi, f1 ori- origine di replicazione del fago; Amp- resistenza all'Ampicillina (Figura 8).



**Fig. 8:** Mappa della sequenza del vettore pGEM Easy.

Ottimizzazione dell'inserto: la concentrazione del prodotto di PCR, per i target *aggR* ed *aaiC*, è stata misurata mediante corsa su gel, come descritto nel paragrafo *Amplificazione e purificazione*. Al fine di calcolare la quantità di inserto disponibile come prodotto di PCR, da includere nella reazione di ligazione, è stata utilizzata la seguente formula:

$$\frac{\text{ng vettore} \times \text{kb lunghezza inserto}}{\text{kb lunghezza vettore}} \times \frac{\text{inserto}}{\text{vettore}} \text{ molar ratio} = \text{ng di inserto}$$

Secondo i risultati ottenuti, sono stati prelevati 0.56 µl di DNA *aggR*, e 1.42 µl di DNA *aaiC*. Successivamente sono state realizzate due mix per la reazione di ligazione utilizzando i componenti e i volumi riportati in Tabella 20, per un volume finale di 10 µl:

**Tab. 20:** Componenti e volumi per la prova di clonaggio.

Componenti di reazione	Volume
2x buffer di ligazione	5 µl
pGEM-T or pGEM-T easy Vector	1 µl
Prodotto di PCR	3 µl
T4 DNA Ligasi	1 µl

I campioni sono stati incubati a temperatura ambiente per 1 h al fine di permettere la reazione di ligazione.

### *Trasformazione ed estrazione del DNA plasmidico*

I campioni di vettore + inserto sono stati aggiunti a cellule batteriche competenti ad alta efficienza JM109. Mantenuti in ghiaccio per 20 minuti, sono stati poi trasferiti a 42°C per 50 secondi ed infine nuovamente messi in ghiaccio per 2 minuti. Terminata la fase di trasformazione, i campioni sono stati seminati in Super Optimal broth with Catabolite repression (SOC), incubati a 37°C per 1 h e agitati ogni 10 minuti. La sospensione batterica è stata quindi piastrata su terreno LB agar + Ampicillina 100 µg/ml e incubata overnight a 37°C. Il giorno seguente è stata eseguita una sottocoltura delle colonie ottenute sullo stesso terreno, con analoghe condizioni di incubazione. La presenza dell'inserto nel plasmide è stata verificata mediante estrazione del DNA da colonia e successiva real-time PCR.

Le colonie risultate positive per i geni target sono state seminate in terreno liquido LB + Ampicillina 100 µg/ml, con incubazione overnight a 37°C. Successivamente un'aliquota è stata pellettata ed è stato estratto il DNA plasmidico tramite il QIAprep-Spin-Miniprep-Kit-High-Yield (Qiagen) e i campioni sono stati dosati al nanodrop.

### *Sequenziamento del DNA*

Le sequenze sono state utilizzate come stampo per reazioni di marcatura di sequenza secondo il metodo Sanger (Sanger et al., 1977) utilizzando il BigDye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, USA). Sono stati caricati per ogni reazione circa 300 ng di DNA plasmidico, utilizzando 3.2 pmoli di primer di sequenza (SP6 forward, T7 Revers). La purificazione delle reazioni di sequenza sono state eseguite attraverso gel di esclusione con colonna DyeEx 96 kit (Qiagen) e i campioni sono stati analizzati tramite elettroforesi capillare utilizzando il sequenziatore automatico ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystem). I risultati ottenuti sono stati analizzati e verificati tramite il programma BioEdit (BioEdit Sequence Alignment Editor).

## Sviluppo del saggio di real-time PCR in formato multiplex, condizioni di reazione e profilo termico

Per lo sviluppo del saggio di real-time PCR in formato multiplex sono stati combinati primer e probe per la rilevazione dei geni target per EAggEC (*aggR*, *aaiC*), in presenza di IAC.

### *Set-up della reazione di amplificazione*

Nel formato in multiplex real-time PCR tutti i componenti della mix di reazione sono rimasti invariati, con le medesime concentrazioni utilizzate per le prove di inclusivity.

Per le prove di amplificazione sono stati adoperati gli estratti di DNA plasmidico clonato utilizzando il QIAprep-Spin-Miniprep-Kit-High-Yield (Qiagen) e dosati al nanodrop. Per ogni campione sono stati utilizzati 20 µl di mix e caricati 5 µl di DNA, corrispondente a 5 ng totali, per un totale di 25 µl. Per il controllo negativo (No Template Control, NTC) sono stati aggiunti 5 µl di acqua sterile in sostituzione del DNA.

La reazione è stata effettuata mediante thermalcycler RotorGene 6000, mantenendo le medesime condizioni del profilo termico indicate nella tabella 11. Il segnale fluorescente prodotto dall'idrolisi delle probe marcate è rilevato nei seguenti canali, durante la fase di annealing/estensione (Tabella 21):

**Tab. 21:** Canali deputati alla rilevazione del segnale di fluorescenza dell'amplificato.

<b>Gene target</b>	<b>Canale di Acquisizione</b>
<i>aggR</i>	Verde (Ex 495-Em 520 nm)
<i>aaiC</i>	Rosso (Ex 647-Ex 667 nm)
IAC	Giallo (Ex 538-Em 554 nm)

### *Prove di specificità: Inclusivity*

I set di primer disegnati in questo studio per la rilevazione dei geni target per EAggEC sono stati testati su campioni di DNA ottenuti da ceppi presenti nella collezione di laboratorio USDA (Tabella 22).

**Tab. 22:** Ceppi batterici utilizzati per i test di specificità (inclusivity).

<b>Campione</b>	<b>Sierotipo</b>	<b>Target</b>
O42	O42	
3493	O104	
2071	O104	<i>aggR-aaiC</i>
2050	O104	
DNA <sub>O104</sub>	O104	

Le prove sono state realizzate preparando una mix di reazione e allestendo il protocollo termico e l'acquisizione del segnale secondo il formato multiplex.

*Prove di specificità: exclusivity*

Per le prove di exclusivity sono stati selezionati 18 ceppi facenti parte della famiglia delle *Enterobacteriaceae* e 26 ceppi di *E. coli* non Enteroaggregativi. Tutti e 44 i campioni sono stati riattivati mediante semina su piastra TSA e incubati overnight a 37°C; è stata effettuata l'estrazione del DNA da colonia e gli estratti ottenuti sono stati amplificati secondo il formato multiplex, in presenza del Controllo Interno di Amplificazione.

## **SAGGIO PER L'IDENTIFICAZIONE DI *E. COLI* ENTEROEMORRAGICHE (EHEC)**

### **Target genici selezionati e reperimento sequenze target**

È stato inizialmente allestito un database contenente tutte le sequenze del gene da impiegare come target di amplificazione nel saggio di real-time PCR. Il gene di interesse era il seguente: *ehxA* codificante per l'emolisina. Le sequenze sono state reperite sulla banca dati GenBank dell'NCBI. Sono stati individuati gli Accession Number citati in bibliografia (Son et al., 2014; Tzschoppe et al., 2012) ed ulteriori sequenze reperite mediante BLAST. Particolare considerazione è stata rivolta alle diverse varianti con cui il gene si presenta (A-F), includendo nell'analisi tutte quelle ad oggi note.

Successivamente, utilizzando il programma ClustalW2, sono state allineate le sequenze delle diverse varianti geniche, valutandone le regioni conservate e quelle variabili.

### **Design di primer e probe per real-time PCR**

Per il design di primer e probe specifici per la detection di EHEC sono state utilizzate le procedure e i parametri descritti nel paragrafo '*Design di primer e probe per real-time PCR*', saggio per l'identificazione di STEC.

## **PROVE DI TRASFERIBILITÀ SU ALTRI STRUMENTI**

Prove di efficienza sono state realizzate su diverse tipologie di termociclatori per real-time PCR, ed hanno interessato i saggi per l'identificazione di STEC ed EAggEC. Per il primo saggio sono state utilizzate le concentrazioni di DNA target nel range di  $10^6$ -1 UG, diversamente per il secondo saggio sono state utilizzate solo le concentrazioni  $10^5$ - $10^4$ -10 UG. Le macchine prese in esame sono state la 7500 Real-Time PCR System (Life Technologies), il Rotor Gene Q (Qiagen) e il RotorGene 6000 (Corbett Research).

Durante le prove di trasferibilità del metodo sono state mantenute le condizioni di amplificazione e di acquisizione del segnale utilizzate nelle prove di efficienza con il RotorGene 6000.

## **PERFORMANCE E STABILITÀ DEI SAGGI PER LA RILEVAZIONE DI STEC E SIEROGRUPPI**

Per ognuno dei due saggi STEC e Sierogruppi è stata allestita una singola mix di reazione mantenuta a  $-20^{\circ}\text{C}$  ed utilizzata in diverse prove di efficienza. Sono state utilizzate concentrazioni scalari di DNA target, effettuando diluizioni decimali in  $\text{H}_2\text{O}$  milliQ sterile per avere un range di concentrazioni da  $10^6$  a 1 UG in 5  $\mu\text{l}$ .

Sono stati prelevati 5  $\mu\text{l}$  di DNA target, inseriti in un volume finale di 25  $\mu\text{l}$  e caricati in real-time PCR in formato multiplex seguendo il protocollo termico indicato nel capitolo '*Sviluppo del saggio di real-time PCR in formato multiplex, condizioni di reazione e profilo termico*', saggio STEC. Le prove sono state eseguite ad intervalli di circa 7 giorni per la durata complessiva di un mese.

Sono stati utilizzati i ceppi ATCC35150, ED600, O103, ED585, ED645 ed SSI 82110e la reazione di amplificazione è stata eseguita mediante 7500 Real-Time PCR System (Life Technologies).

## VALUTAZIONE DEI TERRENI DI ARRICCHIMENTO

### Crescita dei sierogruppi target nei principali terreni di arricchimento per STEC

I ceppi di *E. coli* di interesse (O157-O26-O111-O103-O145-O104), sono stati fatti crescere in terreno Modified Tryptone Soya Broth (mTSB, ThermoScientific - Oxoid, Basingstoke, UK) con novobiocina concentrata 16 mg/L (Sigma-Aldrich, St Louis, MO) ed è stata monitorata la moltiplicazione batterica tramite lettura della densità ottica con spettrofotometro UV-2401 PC (UV-VIS Recording Spectrophotometer, Shimadzu Corporation). Successivamente, sono state allestite ulteriori crescite batteriche utilizzando concentrazioni scalari di novobiocina (16-8-2-0 mg/L). Brevemente, da colonia fresca in TSA è stato prelevato del materiale batterico, stemperato in TSB (10 ml) e miscelato tramite vortex per 30 secondi. Sono stati prelevati 100 µl della sospensione batterica e inseriti in 4 falcon da 20 ml, ognuna contenente mTSB con le diverse concentrazioni di N<sub>0-16</sub>. I campioni sono stati incubati a 37°C in agitazione e la lettura della densità ottica, mediante spettrofotometro UV-2401 PC con OD 600, è stata eseguita ogni 30 minuti prelevando 1 ml della sospensione.

Utilizzando l'arricchimento mTSB+N<sub>0-16</sub> sono state condotte ulteriori prove su 5 ceppi O111 (00-4748, 98-8338, 01-387, TB226, 95-0586) presenti nella collezione di laboratorio dell'USDA. Brevemente: da coltura overnight in TSB sono stati prelevati 10 µl di sospensione infettante, inseriti in 4 falcon contenenti 5 ml di mTSB, ciascuna con una diversa concentrazione di novobiocina (16-8-2-0 mg/L) e sono stati vortexati per 10 secondi. Le sospensioni batteriche sono state versate in Sterile Pyramid Reagent Reservoir (Phenix, Candler, NC, USA) e, tramite multichannel, sono stati prelevati 200 µl, in triplicato, inseriti in una piastra a 96 pozzetti (Tissue culture test plate 96 FTTP, Trasadingen, Svizzera) e caricati sullo strumento Safire<sup>2</sup> (Tecan, TermoFisher). La macchina è stata impostata ad una temperatura di 37°C e le letture automatiche sono state eseguite ogni 30 minuti per 15 ore. La prova è stata ripetuta 3 volte e i dati ottenuti sono stati analizzati utilizzando il programma Excel 2013.

Successivamente le crescite overnight sono state sottoposte a diluizioni decimali, utilizzando una piastra a 96 pozzetti, seguendo il protocollo descritto da Chen et al. (2003). Si è ipotizzato che il campione intero fosse concentrato 10<sup>9</sup> CFU/ml e, partendo da questo valore, sono state eseguite diluizioni decimali fino a 10 CFU/ml. Dalle diluizioni 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-5</sup>, 10<sup>-6</sup> sono stati prelevati 10 µl, seminati su TSA, incubati a 37°C per 6 h e successivamente sono state contate le colonie cresciute.

Infine è stato eseguito un confronto di crescita dei 6 Sierogruppi nei terreni di arricchimento: Buffered Peptone Water (BPW) (Sigma-Aldrich); mTSB + Acriflavina (12 mg/L) (Sigma-Aldrich); Modified Buffered Peptone Water with Pyruvate (Acumedia, Neogen Corporation, Lansing, MI) + Acriflavina (10 mg/L) Cefsulodin (10 mg/L) Vancomycin (8 mg/L) (Sigma-Aldrich) (mBPWp + ACV) aggiungendo gli antibiotici dopo 5 ore di incubazione; sempre mBPWp + CV, mancante di acriflavina, con e senza agitazione (100 rpm). Le sospensioni batteriche sono state preparate come sopra descritto e incubate a: 37°C per BPW e mTSB + A; 37°C per 5 h e successivamente 42°C con l'aggiunta degli antibiotici (mBPWp + ACV); 42°C per mBPWp + CV. La densità ottica è stata misurata tramite spettrofotometro a intervalli di 60 minuti e dopo 24 ore.

## **TEST DI FUNZIONALITÀ SU MATRICI ALIMENTARI ARTIFICIALMENTE CONTAMINATE**

### **Selezione delle matrici alimentari**

Sono state individuate 3 distinte categorie alimentari, nelle quali è possibile ipotizzare la presenza di STEC, ed in ciascuna è stata selezionata una specifica matrice:

- Categoria Latte crudo e prodotti derivati: formaggi molli (Brie)
- Categoria Carne cruda e prodotti carnei pronti da cuocere (eccetto pollame):  
carne di manzo macinata
- Categoria Vegetali freschi e frutta: germogli freschi di fagiolo

Gli alimenti sono stati acquistati dalla grande distribuzione.

### **Titolazione dei ceppi batterici**

I ceppi ATCC35150 (O157), ED600 (O26), ED585 (O111), O103, ED645 (O145) ed SSI 82110 (O104), presenti nella collezione di laboratorio, sono stati utilizzati per le prove di contaminazione delle matrici alimentari; i ceppi 380-94 (O157), 05-6544 (O26), 04-2446 (O103), 00-4748 (O111), ed 07-865 (O145), presenti nella collezione di laboratorio dell'USDA, sono stati utilizzati per le prove di comparazione dei metodi. Al fine di avere una sospensione batterica concentrata  $1 \times 10^8$  CFU/ml, si è reso necessario identificare specifici valori di assorbanza corrispondenti alla concentrazione desiderata. Per questo sono state eseguite, per ciascun ceppo batterico, prove di titolazione. I ceppi batterici sono stati fatti crescere in 15 ml di TSB in agitazione a 37°C. Intorno al range di assorbanza ( $OD_{600}$ ) di 0.22-0.32 sono state prelevate diverse aliquote di sospensione batterica (1ml) e sono state realizzate diluizioni decimali fino alla concentrazione di 10 CFU/ml. Successivamente, 100  $\mu$ l delle diluizioni sono stati piastrati su TSA, con incubazione a 37°C overnight. Il giorno seguente è stata effettuata la conta delle colonie cresciute ed è stato individuato il valore di assorbanza ottimale.

## **Prove di funzionalità del saggio STEC sulla matrice alimentare Brie**

### *Ceppi batterici utilizzati*

*E. coli* ATCC35150 O157 (*stx1*, *stx2* ed *eae* positivo) ed ATCC 25922 (negativo per i tre target).

### *Preparazione della sospensione contaminante*

Dopo un passaggio su EMB, i ceppi batterici sono stati messi in coltura in 10 ml di TSB, fatti crescere in agitazione a 37°C fino ad OD<sub>600</sub> corrispondente a circa 10<sup>8</sup> CFU/ml (OD 0.275 per entrambi i ceppi), ed effettuate diluizioni decimali fino a 10<sup>-7</sup> (10 CFU/ml) in TSB per ottenere una concentrazione da utilizzare come inoculo per le matrici alimentari. Per verificare il reale titolo batterico, aliquote di 100 µl sono state seminate su piastra TSA ed incubate a 37°C overnight.

### *Preparazione della matrice alimentare ed arricchimento*

Aliquote da 5 g sono state omogeneizzate con 45 ml di terreno mTSB (1:10) con novobiocina concentrata 16 mg/L e contaminati secondo lo schema seguente:

Livello “0”:	5 repliche contaminate con 100 CFU di <i>E. coli</i> ATCC 25922	(~20 CFU/g)
Livello “Low”:	20 repliche contaminate con 1 CFU di STEC ATCC 35150	(~0.2 CFU/g)
Livello “Medium”:	5 repliche contaminate con 10 CFU di STEC ATCC 35150	(~2 CFU/g)
Livello “High”:	5 repliche contaminate con 100 CFU di STEC ATCC 35150	(~20 CFU/g)

I campioni sono stati incubati a 37°C per 18-24 ore

### *Stoccaggio dei campioni, estrazione del DNA e multiplex real-time PCR*

Dopo incubazione overnight, 1 ml di ogni brodo di arricchimento è stato centrifugato a 6000 g per 1 minuto a 4°C. Dal pellet ottenuto è stato estratto il DNA tramite il kit DNA Isolation System (Nexttec, GmbH Biotechnologie, Hilgertshausen, Germania), seguendo il protocollo fornito dal produttore, quindi è stato amplificato con 7500 Real-Time PCR System utilizzando il saggio in multiplex real-time PCR per l'identificazione di STEC.

## **Prove di funzionalità dei saggi con la matrice carne macinata**

### *Ceppi batterici utilizzati*

Ceppo ATCC 35150 (O157 positivo per *stx1*, *stx2*, *eae* ed *rfbE*), ED585 (O111 positivo per *wbdl*), ATCC 25922 (negativo per i target *stx1*, *stx2*, *eae*).

### *Preparazione della sospensione contaminante*

E' stato seguito il protocollo descritto precedentemente per le prove sul brie.

### *Preparazione della matrice alimentare ed arricchimento*

In una prima fase aliquote da 5 g sono state omogeneizzate con 45 ml di terreno mTSB + novobiocina 16 mg/L (1:10), contaminati ed incubati secondo lo schema riportato nel capitolo '*Preparazione della matrice alimentare ed arricchimento*' (brie).

In una seconda fase è stata eseguita una prova preliminare per ottimizzare le condizioni di crescita del ceppo O111 all'interno del terreno di arricchimento mTSB + N indicato dalla norma ISO 13136:2012, poiché da letteratura si è visto essere sensibile alla novobiocina (Vimont et al., 2007, Kanki et al., 2011). Sono state quindi preparate aliquote da 25 ml di mTSB con diverse concentrazioni di antibiotico (16-8-2-0 mg/L) e per ognuna di queste condizioni sono stati pesati 5 grammi di carne macinata contaminata con il ceppo ED585 O111 alla concentrazione di 10 CFU totali (3 repliche) e 100 CFU totali (2 repliche). Inoltre è stata utilizzata una incubazione in doppio: A) 37°C per 6 h e 44°C per 15 h; B) 37°C overnight (Verstraete et al., 2012; Possè et al., 2008; Vimont et al., 2006).

In seguito, definite le condizioni di incubazione, porzioni da 25 grammi di alimento sono state omogeneizzate 1:10 in terreno mTSB con diverse concentrazioni di novobiocina (16-8-2-0 mg/L) e contaminate con il ceppo ED585 (O111) secondo lo schema seguente:

Livello "Low":	1 CFU tot.	(5 repliche con 0-2-8-16 novobiocina)
Livello "Medium":	10 CFU tot.	(2 repliche con 0-2-8-16 novobiocina)
Livello "High":	100 CFU tot.	(2 repliche con 0-2-8-16 novobiocina)
Livello "Zero":	0 CFU	(1 replica)

Tutti e 37 i campioni sono stati incubati a 37°C per 6 ore e successivamente a 44°C overnight.

### *Stoccaggio dei campioni, estrazione del DNA e multiplex real-time PCR*

Dopo incubazione overnight, dalle unità campione contenenti 5 g di alimento, è stato prelevato 1 ml e centrifugato a 6000 g per 1 minuto a 4°C. Dal pellet ottenuto è stato estratto il DNA tramite il kit DNA Isolation System (Nexttec) seguendo il protocollo fornito dal produttore, quindi è stato amplificato con 7500 Real-Time PCR System utilizzando il saggio in multiplex real-time PCR per l'identificazione degli STEC.

Viceversa, per le unità campione contenenti 25g di alimento, dopo incubazione overnight, è stato prelevato 1 ml e centrifugato a 10000 rpm per 4 minuti. Dal pellet ottenuto è stato estratto il DNA tramite FAST DNA Extraction Kit (Diateva), seguendo il protocollo fornito dal produttore, ed amplificato mediante RotorGene 6000 utilizzando il saggio in multiplex real-time PCR per l'identificazione di STEC e Sierogruppi.

### **Prove di funzionalità dei saggi sulla matrice germogli**

#### *Ceppi batterici utilizzati*

Ceppo ATCC 35150 (O157 positivo per *stx1*, *stx2*, *eae* ed *rfbE*), ED600 (O26 positivo per *wzx*), ED585 (O111 positivo per *wbdl*), O103 (positivo per *wzx*), ED645 (O145 positivo per *ihp1*), SSI 82110 (O104 positivo per *wzx*), ATCC 25922 (negativo per i tre target).

#### *Preparazione della sospensione contaminante*

Seguendo il protocollo descritto precedentemente, sono stati raggiunti per ogni sierogruppo valori di OD<sub>600</sub> corrispondenti a circa 10<sup>8</sup> CFU/ml (OD 0.275 per entrambi gli ATCC e O103, OD 0.29 per O26, O145 e O104, OD 0.28 per O111). Sono state effettuate diluizioni decimali fino a 10<sup>-7</sup> (10 CFU/ml) in TSB per ottenere una concentrazione da utilizzare come inoculo per le matrici alimentari. Per verificare il reale titolo batterico, aliquote di 100 µl sono state seminate su piastra TSA ed incubate a 37°C overnight.

#### *Preparazione della matrice alimentare ed arricchimento*

In una prima fase, aliquote da 5 g sono state omogeneizzate con 45 ml di mTSB + N 16 mg/L (1:10) e contaminate secondo lo schema riportato nel capitolo '*Preparazione della*

*matrice alimentare ed arricchimento*' (brie), realizzando ulteriori 5 repliche da 5 g ciascuna contaminate con 1000 CFU totali (200 CFU/g) di STEC ATCC 35150.

Successivamente, sono state eseguite diverse prove per individuare il brodo di arricchimento ottimale per la crescita di *E. coli* target all'interno della matrice germogli. Venticinque grammi di alimento sono stati omogeneizzati 1:10 in due differenti terreni liquidi, BPW secondo ISO 13136:2012 e mBPWp con aggiunta degli antibiotici Acriflavin (Sigma Aldrich, Milano Italia), Cefsulodin (Sigma Aldrich) e Vancomycin (Sigma Aldrich) (ACV) secondo il metodo Bacteriological Analytical Manual (BAM) chapter 4A della Food and Drug Administration (FDA). I campioni sono stati contaminati con i ceppi ATCC35150 (O157), ED585 (O111) ed SSI 82110 (O104) alla concentrazione di 1-10-100 CFU totali. I campioni sono stati incubati sia a 37°C per 5 h e successivamente a 42°C per 15 h per l'arricchimento FDA, sia a 37°C overnight per l'arricchimento ISO 13136:2012.

Gli estratti di DNA sono stati amplificati tramite il termociclatore RotorGene 6000, utilizzando il saggio in multiplex real-time PCR per l'identificazione dei sierogruppi.

Una volta ottimizzato il protocollo sono stati eseguiti i test di funzionalità. Brevemente, 25 grammi di germogli sono stati omogeneizzati 1:10 in terreno mBPWp + CV (10-8 mg/L) e contaminati singolarmente con i sierogruppi O157-O26-O103-O111-O145-O104 secondo lo schema seguente:

Livello "Low":	1 CFU tot.	(20 repliche)
Livello "Medium":	10 CFU tot.	(10 repliche)
Livello "High":	100 CFU tot	(2 repliche)
Livello "Zero":	0 CFU	(1 replica)

Tutti e 198 i campioni sono stati incubati a 42°C overnight secondo Weagant et al. (2011).

#### *Stoccaggio dei campioni, estrazione del DNA e multiplex real-time PCR*

Dopo incubazione overnight, dalle unità campione contenenti 5 g di alimento è stato prelevato 1 ml di brodo di arricchimento e centrifugato a 6000 g per 1 minuto a 4°C. Dal pellet ottenuto è stato estratto il DNA tramite il kit DNA Isolation System (Nexttec), seguendo il protocollo fornito dal produttore, quindi è stato amplificato con

7500 Real-Time PCR System utilizzando il saggio in multiplex real-time PCR per l'identificazione degli STEC.

Viceversa, per le unità campione contenenti 25g di alimento, dopo incubazione overnight, è stato prelevato 1 ml di arricchimento e centrifugato a 10000 rpm per 4 minuti. Dal pellet ottenuto è stato estratto il DNA tramite FAST DNA Extraction Kit (Diateva), seguendo il protocollo fornito dal produttore, ed amplificato mediante RotorGene 6000 utilizzando il saggio in multiplex real-time PCR per l'identificazione di STEC e dei Sierogruppi.

## PROVE DI COMPARAZIONE DEI SAGGI PER L'IDENTIFICAZIONE DI STEC E SIEROGRUPPI CON I METODI IN USO PRESSO USDA

I saggi molecolari per l'identificazione di STEC e Sierogruppi sono stati confrontati con i metodi di riferimento in uso presso l'USDA per l'identificazione di *E. coli* patogeni. Nello specifico, per la matrice alimentare "carne macinata" sono stati utilizzati i metodi USDA-FSIS MLG 5A.04. (United States Department of Agriculture, Procedure for the Use of *Escherichia coli* O157:H7 Screening Tests for Meat Products and Carcass and Environmental Sponges) e USDA MLG 5B.05 (United States Department of Agriculture, Detection and Isolation of non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges), mentre per la matrice alimentare "germogli" è stato seguito FDA/BAM per la detection di *E. coli* O157 ed altri STEC.

### *Selezione dei ceppi batterici*

Sono stati selezionati ceppi batterici della collezione di laboratorio dell'USDA che presentavano le migliori combinazioni delle caratteristiche geniche di interesse (Tabella 23).

**Tab 23:** Ceppi selezionati e caratteristiche geniche.

<b>NOME</b>	<b>SIEROGRUPPO</b>	<b>stx</b>	<b>eae</b>
05_6544	O26:H11	1a	+
04_2446	O103:H2	1a	+
00_4748	O111:NM	1a, 2a	+
07_865	O145:H28	2a	+
380_94	O157:H7	1a, 2a	+

I ceppi batterici sono stati conservati a -80°C in TSB con supplemento 20% di glicerolo.

### *Preparazione della sospensione contaminante*

I ceppi batterici elencati in Tabella 23 sono stati ricostituiti su terreno solido selettivo ChromAgar (CHROMAGAR, Parigi, Francia), seguito da semina su terreno solido non selettivo TSA, quindi messi in coltura in 10 ml di TSB in agitazione a 37°C fino ad OD<sub>600</sub> corrispondente a circa 10<sup>8</sup> CFU/ml (OD 0.26 per O157, OD 0.29 per O26, OD 0.28 per O103, OD 0.23 per O111, OD 0.27 per O145). Sono state effettuate diluizioni decimali fino a 10<sup>-7</sup> (10 CFU/ml) in TSB per ottenere una concentrazione da utilizzare come inoculo per le matrici alimentari. Per verificare il reale titolo batterico, aliquote di 100 µl sono state seminate su piastra TSA ed incubate a 37°C overnight.

## *Preparazione delle matrici alimentari ed arricchimento*

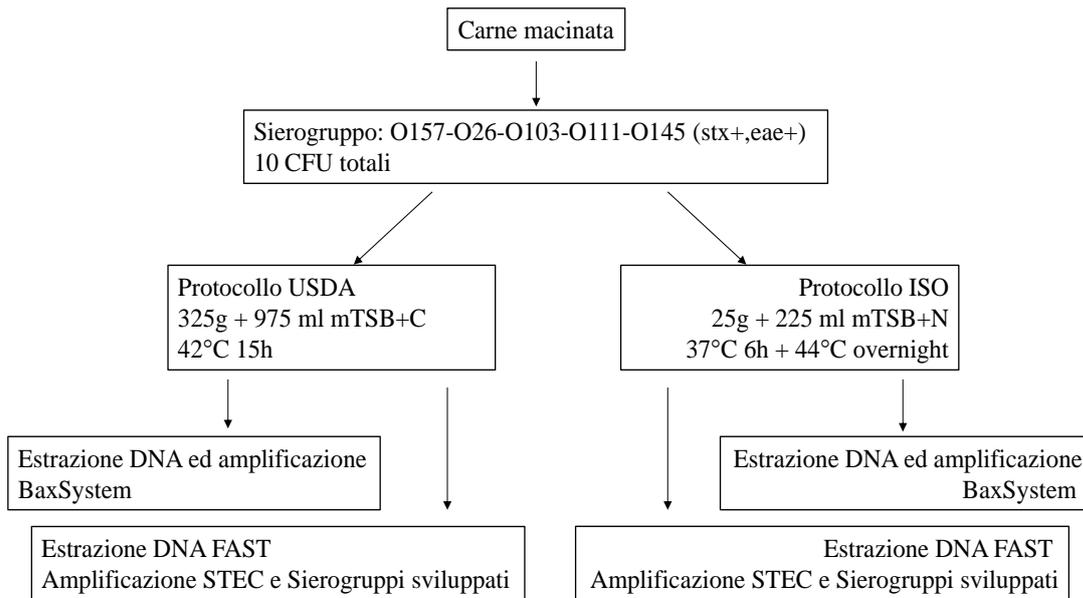
### *Carne macinata*

Presso la grande distribuzione è stato acquistato un singolo pezzo di carne di manzo, circa 10 kg, è stata eliminata la parte più superficiale ed è stato triturato utilizzando un tritacarne. Tutti gli strumenti adoperati per questa fase erano stati precedentemente disinfettati ed autoclavati.

In un primo momento è stato valutato il livello di microflora autoctona della matrice alimentare utilizzando le Aerobic Plate Count (APC) (3M Petrifilm, St. Paul, Minneapolis) seguendo le indicazioni fornite dal produttore. Sono state utilizzate tre differenti APC: Aerobic Plate Count Petrifilm per l'identificazione della carica batterica aerobica totale; *Escherichia coli*/coliformi Petrifilm per l'identificazione di coliformi ed *E. Coli*; Enterobacteriaceae Petrifilm per l'identificazione di *Enterobacteriaceae*.

Successivamente, sono stati realizzati 17 campioni di carne macinata (325 g) ed omogeneizzati 1:4 in terreno mTSB + casaminoacid 10 g/L (Acumedia, Neogen FoodSafety, Lansing, Michigan), secondo metodo USDA-FSIS/MLG. Quindici campioni sono stati contaminati con 10 CFU totali (3 repliche per ogni ceppo batterico) mentre 2 campioni sono stati utilizzati come Controlli Negativi. Tutti i campioni sono stati incubati a 42°C per 15 ore. La prova è stata eseguita due volte.

Sono stati realizzati ulteriori 17 campioni di carne macinata (25 g) ed omogeneizzati 1:10 in mTSB + N 16 mg/L, secondo ISO 13136:2012. Di questi, 15 campioni sono stati contaminati con 10 CFU totali (3 repliche per ogni ceppo batterico) mentre 2 sono stati utilizzati come Controlli Negativi. Tutti i campioni sono stati incubati a 37°C per 6 ore e successivamente a 44°C overnight (Figura 9). La prova è stata eseguita due volte.



**Fig. 9:** Schema delle prove di comparazione. Contaminazione, incubazione ed estrazione per la matrice carne macinata eseguita presso USDA.

### *Germogli*

Presso la grande distribuzione sono stati reperiti campioni di germogli freschi di fagiolo.

Anche in questo caso è stata valutata la popolazione batterica autoctona della matrice alimentare utilizzando le APC indicate precedentemente.

Per la preparazione e la contaminazione dei campioni alimentari sono stati seguiti due differenti protocolli:

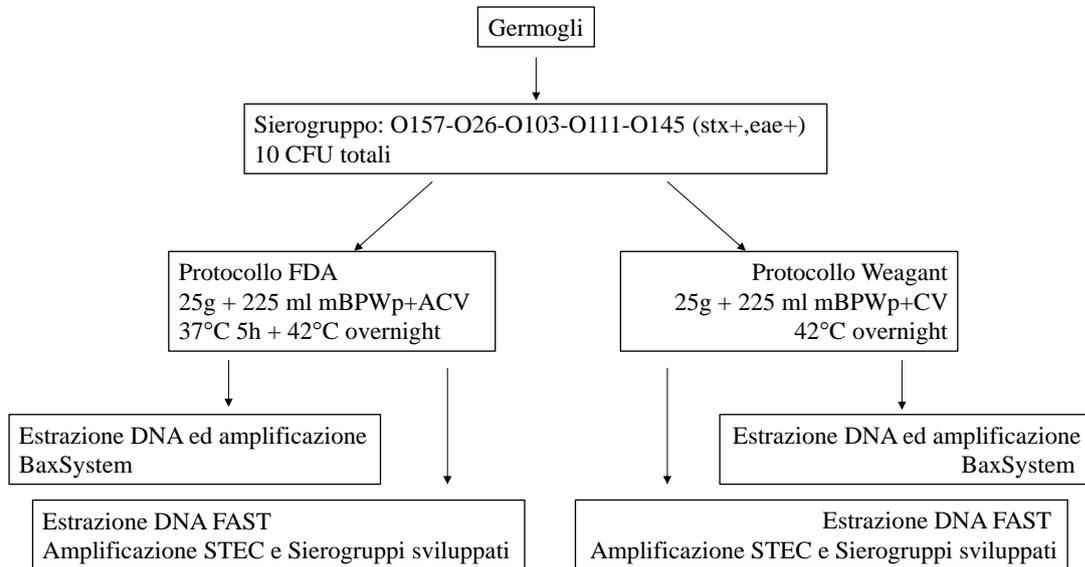
- Protocollo FDA/BAM: sono state allestite 17 sterilbag contenenti 25 g di alimento ed omogeneizzate 1:10 con l'arricchimento mBPWp. I ceppi riportati in Tabella 23 sono stati utilizzati per le contaminazioni artificiali (10 CFU totali) e, per ogni ceppo, sono state realizzate 3 repliche, per un totale di 15 campioni, e due Controlli Negativi. Tutti i campioni sono stati incubati a 37°C per 5 ore e, successivamente, sono stati aggiunti gli antibiotici ACV alla concentrazione di 10-10-8 mg/L, rispettivamente, ed incubati a 42°C overnight (Figura 10).

La prova è stata eseguita una seconda volta mantenendo le condizioni sopra descritte.

-Protocollo Weagant: sono state preparate 17 sterilbag contenenti 25 g di alimento ed omogeneizzati 1:10 con l'arricchimento mBPWp + CV alla concentrazione di 10-8 mg/L, rispettivamente. La contaminazione dei campioni è stata eseguita utilizzando i ceppi riportati nella Tabella 23 (10 CFU totali). Per ogni ceppo sono state allestite 3

repliche, per un totale di 15 campioni, e sono stati realizzati due Controlli Negativi. Tutti i campioni sono stati incubati a 42°C overnight (Figura 10).

La prova è stata eseguita una seconda volta mantenendo le condizioni sopra descritte.



**Fig. 10:** Schema delle prove di comparazione. Contaminazione, incubazione ed estrazione per la matrice germogli eseguita presso USDA.

#### *Stoccaggio dei campioni, estrazione del DNA e multiplex real-time PCR*

Terminato il periodo di incubazione, da ogni arricchimento sono state realizzate 2 aliquote, da 1 ml, e di queste una è stata processata utilizzando il DNA extraction kit DuPont Bax System Real-Time PCR assay – STEC Suite (DuPont Nutrition & Health, Wilmington, USA), seguendo il protocollo fornito dal produttore, mentre l'altra è stata processata mediante Fast DNA extraction kit (Diateva), seguendo il protocollo fornito dal produttore.

Tutti i campioni estratti con il kit BaxSystem sono stati amplificati utilizzando Screening Assay for *stx* and *eae*, Panel 1 Assay for *E. coli* O26-O111-O121, Panel 2 for *E. coli* O45-O103-O145, e *E. coli* O157:H7 Testing e caricati in 7500 FAST DX Real Time PCR Instrument (AppliedBiosystem) utilizzando uno specifico template per il saggio.

Tutti i campioni estratti con il FAST DNA extraction kit sono stati amplificati tramite i saggi per l'identificazione di STEC e Sierogruppi realizzati durante questo studio e caricati sulla macchina 7500 FAST DX Real Time PCR Instrument.

## **PROVE DI FUNZIONALITÀ SULLA MATRICE GERMOGLI CONTAMINATI CON IL SIEROGRUPPO O104**

### **Prove di funzionalità del saggio per la rilevazione di EAggEC**

#### *Ceppi batterici utilizzati*

Sono stati utilizzati i ceppi 2050, 2071, e 3439 2011 (O104) tutti positivi per i geni target *aggR* ed *aaIC*.

#### *Preparazione della sospensione contaminante*

I ceppi batterici sono stati fatti crescere in un primo momento su ChromAgar e successivamente piastrati su TSA. Singole colonie batteriche sono state prelevate e messe in coltura in 10 ml di TSB con incubazione a 37°C overnight in agitazione. Il giorno seguente sono state effettuate diluizioni decimali in Peptone Water 0.01% (PW), al fine di ottenere una concentrazione ottimale da utilizzare come inoculo per le matrici alimentari (10 CFU/ml). Per verificare il reale titolo batterico, aliquote di 100 µl sono state seminate su piastra TSA ed incubate a 37°C overnight.

#### *Preparazione delle matrici alimentari ed arricchimento*

Aliquote da 25 g di germogli sono state omogeneizzate con 225 ml di terreno mBPWP (1:10) pre-riscaldato a 42°C e contaminate, in duplicato, con 10 CFU totali dei ceppi target; un campione è stato utilizzato come Controllo Negativo. I campioni sono stati incubati a 37°C per 5 h e successivamente sono stati aggiunti gli antibiotici ACV 10-10-8 mg/L, rispettivamente, e incubati a 42°C per 16-18 h. La prova è stata ripetuta due volte.

#### *Stoccaggio dei campioni, estrazione del DNA, multiplex real-time PCR e conferma delle colonie*

Dopo incubazione overnight, da ogni brodo di arricchimento è stato prelevato 1 ml e l'estrazione del DNA batterico è stata eseguita utilizzando il PrepSEQ® Rapid Spin Sample Preparation Kits (Life-Technologies-Thermo Fisher), seguendo il protocollo fornito dal produttore. Gli estratti di DNA sono stati amplificati con 7500 FAST DX Real Time PCR Instrument utilizzando il saggio per la rilevazione di EAggEC sviluppato durante questo studio.

I campioni di arricchimento risultati positivi in real-time PCR sono stati ulteriormente analizzati mediante immunomagnetic separation, semina su piastre selettive e successiva latex agglutination.

#### *Immunomagnetic separation*

Venti microlitri di E. coli O104 IMS beads (Product No. 43060; Abraxis, Warminster, PA, USA) sono stati miscelati con 1 ml di arricchimento e incubati per 10 min. a temperatura ambiente in un agitatore meccanico. Successivamente il campione è stato inserito in un rack magnetico per 3 minuti, è stato eliminato il surnatante e le beads sono state lavate due volte in PBST costituito da 0.01 M phosphate buffered saline, 0.138 M NaCl, 0.0027 M KCl, e 0.05% Tween 20 (Sigma Aldrich), pH 7.4. Dopo l'ultimo lavaggio, le beads sono state risospese in 100 µl della stessa soluzione. La sospensione ottenuta è stata divisa in due porzioni e piastrata, utilizzando uno stantuffo sterile, su due diversi terreni selettivi: Modified Rainbow Agar O157 (mRBA) (Biolog, Hayward, CA, USA) con 0.05 mg/l cefixime trihydrate (Sigma Aldrich), 5 mg/l novobiocin sodium salt (Sigma Aldrich) e 0.15 mg/l potassium tellurite hydrate (Sigma Aldrich); CHROMagar STEC O104 (CHROMagar, Paris, France). Le piastre contaminate sono state incubate a 37°C per 24 h.

#### *Latex Agglutination*

Due colonie presumibilmente positive, cresciute ciascuna su uno specifico agar selettivo, sono state analizzate utilizzando E. coli O104:H4 Latex Test Kit (Product No. 541060; Abraxis, Warminster, PA, USA) seguendo le indicazioni fornite dal produttore.

# RISULTATI

---

## STUDIO DELLA BIBLIOGRAFIA E SELEZIONE DI *E. COLI* PATOGENI

Da ricerca bibliografica (EFSA, 2014; EFSA, 2015; ECDC, 2013; EFSA Scientific Opinion, 2015; USDA-FSIS, 2011; ECDC, 2013) sono stati ottenuti i dati epidemiologici che ci hanno permesso di individuare i gruppi di *E. coli* maggiormente coinvolti in varie forme di patologia nell'uomo ed i relativi geni di virulenza, che possono essere impiegati come target in saggi di rilevazione molecolare.

Sono stati selezionati i seguenti target (Tabella 24):

**Tab. 24:** Target selezionati e relativi geni di virulenza.

<b>TIPOLOGIA</b>	<b>GRUPPO</b>	<b>GENI</b>
<i>E. coli</i> produttori di shigatossine	(STEC)	<i>stx1, stx2, eae</i>
<i>E. coli</i> enteroaggregative	(EAEC)	<i>aaiC</i> e <i>aggR</i>
<i>E. coli</i> enteroemorragiche	(EHEC)	<i>ehxA</i>

Successivamente, non sono stati presi in considerazione per lo sviluppo dei saggi molecolari la tipologia di *E. coli* enteroemorragiche e il relativo gene di virulenza *ehxA*, a causa di uno scarso potenziale interesse commerciale.

Inoltre sono stati selezionati i sierogruppi epidemiologicamente più rilevanti, e dei quali è necessario effettuare la rilevazione molecolare secondo ISO 13136:2012, da utilizzare come ulteriore target di amplificazione: *E. coli* O157, O26, O103, O111, O145. A questi è stato aggiunto il sierogruppo O104 poiché responsabile di una grave epidemia in Germania (Scheutz et al., 2011).

In sintesi, il progetto prevedeva l'allestimento di cinque saggi di multiplex real-time PCR:

- uno per l'identificazione di *E. coli* produttori di shigatossine (STEC), secondo ISO 13136:2012.
- tre per l'identificazione dei principali sierogruppi, sempre in accordo con la norma ISO 13136:2012, secondo il panel: O157-O26; O145-O104; O103-O111.
- uno per l'identificazione di *E. coli* enteroaggregative (EA<sub>g</sub>EC)

## **SAGGIO PER L'IDENTIFICAZIONE DI *E. COLI* PRODUTTORI DI SHIGATOSSINE (STEC)**

### **Target selezionati**

Il saggio per l'identificazione di *E. coli* produttori di shigatossine (STEC) è stato allestito utilizzando i seguenti target:

- una sequenza appartenente al gene della shigatossina 1, *stx1* (comprendente tutte le varianti *stx1a*, *stx1c* e *stx1d*)
- una sequenza appartenente al gene della shigatossina 2, varianti a-e e g, *stx2a*, *stx2b*, *stx2c*, *stx2d*, *stx2e* e *stx2g*
- una sequenza appartenente al gene della shigatossina 2, variante f, *stx2f*
- una sequenza appartenente al gene dell'intimina, *eae*
- un sistema di controllo interno di amplificazione (IAC), costituito da un plasmide e da uno specifico set di primer e probe.

### **Reperimento sequenze target e comparazione mediante allineamento**

Allo scopo di disegnare primer e probe che potessero amplificare tutte le varianti note dei geni target, sono state reperite tutte le sequenze degli stessi disponibili sulla GenBank dell'NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ed è stato allestito un database con tutte le sequenze ottenute.

Per il gene *stx1* sono state reperite 13 sequenze, corrispondenti alle 3 varianti note *stx1a-d*; per il gene *stx2* 22 sequenze, corrispondenti alle 7 varianti note *stx2a-g*; per il gene *eae* 35 sequenze, corrispondenti alle 22 varianti note.

In Tabella 25 sono riportati gli Accession Number (AN) dei geni target utilizzati per questo lavoro, con i relativi riferimenti bibliografici.

**Tab. 25:** Geni target con relative varianti, AccessionNumber e riferimenti bibliografici.

<b>Gene</b>	<b>Variante</b>	<b>AccessionN. NCBI</b>	<b>Rif. Bib.</b>
<i>stx1</i>	a	AY986982.1	Son, 2014
	a	Z36899.1	Son, 2014
	a	Z36900.1	Son, 2014
	a	M19473.1	Son, 2014
	a	AM230662.1	Son, 2014
	a	M16625.1	Son, 2014
	a	AM230663.1	Son, 2014
	a	AB083044.1	Son, 2014
	a	L04539.1	Son, 2014
	a	AJ413986.1	Son, 2014
	c	Z36901.1	Son, 2014
	d	AY986980.1	Son, 2014
	d	AY170851.1	Son, 2014
	<i>stx2</i>	a	EF441599.1
a		DQ344636.3	Son, 2014
a		AY633471.1	Son, 2014
a		X07865.1	Son, 2014
a		Z50754.1	Son, 2014
a		AY633459.1	Son, 2014
b		AJ567995.1	Son, 2014
b		X65949.1	Son, 2014
b		AB012101.1	Son, 2014
c		AY633473.1	Son, 2014
c		AB015057.1	Son, 2014
c		L11079.1	Son, 2014
d		X61283.1	Son, 2014
d		X67514.1	Son, 2014
d		FM998855.1	Son, 2014
d		DQ059012.1	Son, 2014
e		AM904726.1	Son, 2014
e		AY332411.1	Son, 2014
f		AJ010730.1	Son, 2014
f		M29153.1	Son, 2014
<i>eae</i>	alfa1	M58154.1	Son, 2014
	alfa2	AF530555.1	Son, 2014
	beta1	AF200363.1	Son, 2014
	beta1	AP010953	Son, 2014
	beta2	AF530556.1	Son, 2014
	beta2	AJ715407.1	Son, 2014
	beta4	FJ609802.1	GenBank
	gamma 1	AE005174.2	Son, 2014
	gamma 1	Z11541.1	EURL-VTEC 2013
	gamma1	AF071034.1	Son, 2014
	gamma 1	AB334562.1	GenBank
	gamma1	AB647614.1	Son, 2014
	delta	AJ875027.1	Son, 2014
	epsilon	AP010958	Son, 2014
	epsilon	AIGX01000032.1	Son, 2014
	epsilon 1	AF116899.1	Son, 2014

epsilon 1.2	AY186750.1	Son, 2014
epsilon2	AF530554.1	Son, 2014
epsilon2	DQ523614.1	Lacher, 2006
zeta	AJ271407	Son, 2014
eta1	AJ308550	Son, 2014
eta2	AJ876652.1	Son, 2014
theta	AP010960	Son, 2014
theta	AF449418.1	Son, 2014
jota	AJ308551	Son, 2014
jota	DQ523602.1	Lacher, 2006
jota2	AF530553.1	Son, 2014
kappa	AJ308552	Son, 2014
lambda	AJ715409.1	Son, 2014
mi	AJ705049.1	Son, 2014
ni	AJ705050.1	Son, 2014
xi	AJ705051.1	Son, 2014
pi	AJ705052.1	GenBank
rho	DQ523613.1	Lacher, 2006
ipilon	FM872417.1	GenBank

Utilizzando le sequenze sopra descritte sono stati generati gli allineamenti con ClustalW2 Multiple Sequence Alignment ([www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2](http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2)), ed è stato possibile realizzare gli alberi filogenetici per i geni *stx* (Figura 11) ed *eae* (Figura 12).

Analizzando le sequenze è stata osservata variabilità, a volte anche molto elevata, con limitate regioni conservate.

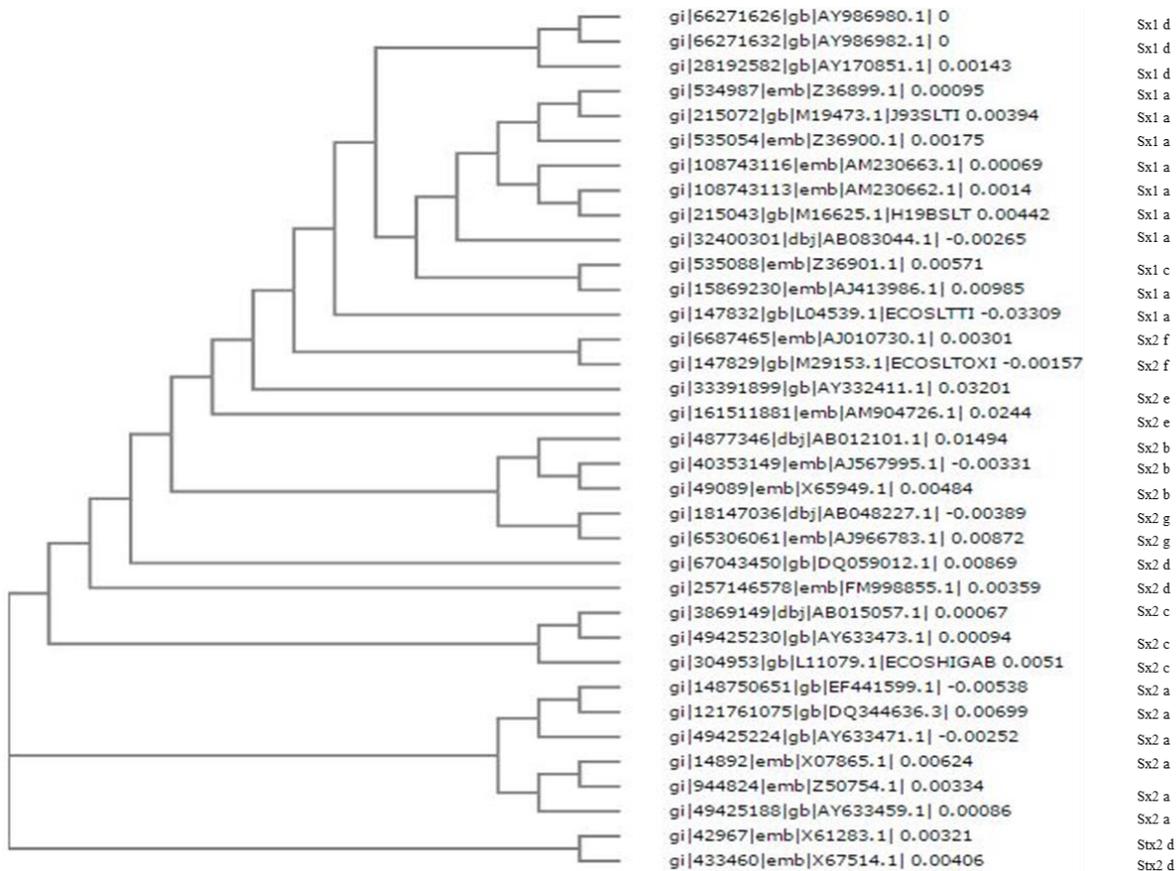


Fig. 11: Albero filogenetico realizzato utilizzando le varianti dei geni *stx1-stx2*.

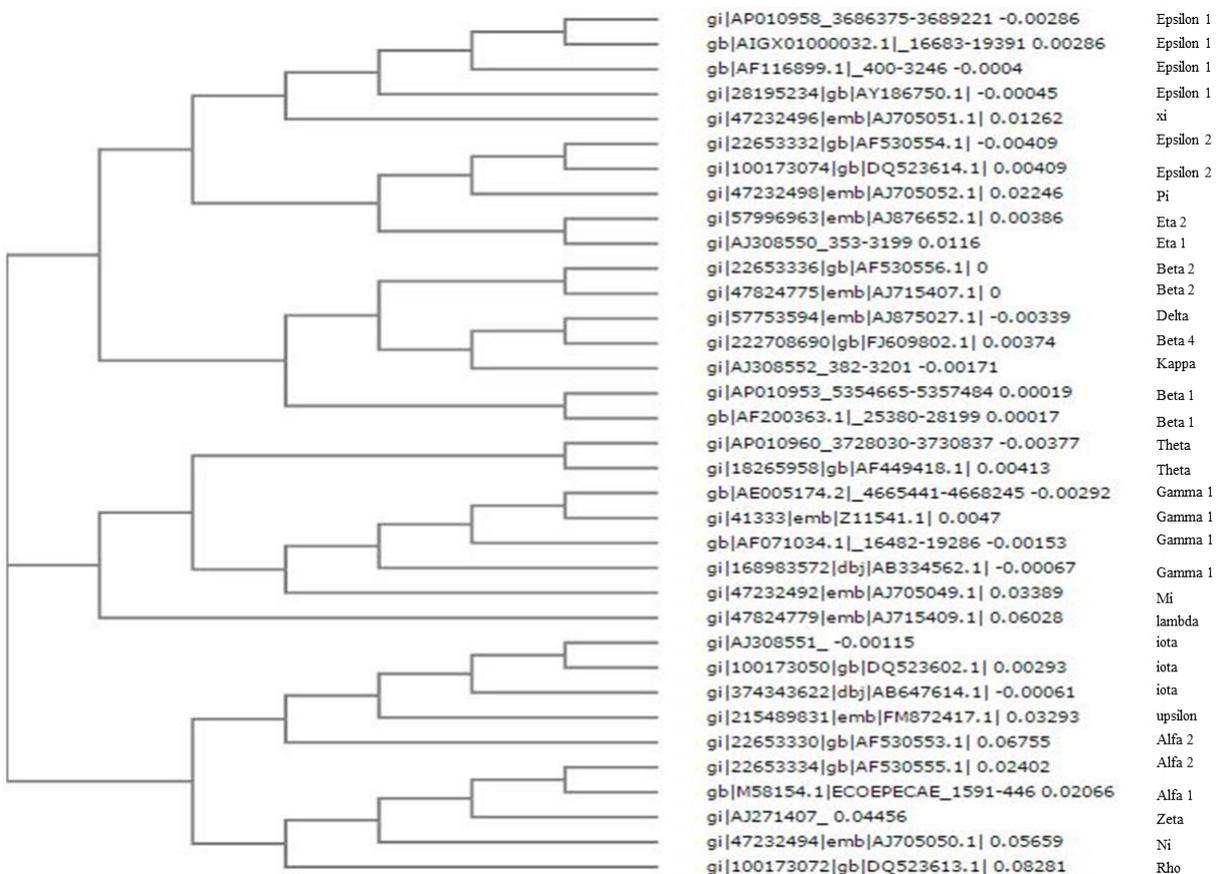


Fig. 12: Albero filogenetico realizzato utilizzando le varianti del gene *eae*.

## Design di primer e probe per real-time PCR

In una prima fase dello studio sono state disegnate una coppia di primer che potesse amplificare entrambi i geni *stx1* ed *stx2* (I set STEC) e due diverse probe, specifiche per i due target. Nei primer sono state inserite alcune basi degenerate a causa dell'elevata variabilità nucleotidica tra le varianti. In Tabella 26 sono riportate le sequenze oligonucleotidiche e le loro principali caratteristiche.

**Tab 26:** Sequenze e caratteristiche dei primer e probe utilizzate nella prima versione del saggio STEC.

I set STEC	Sequenza 5'-3'	Tm	% GC	Lungh. amplificato
Stx F	TYAGGCARATACAGAGRGRATTTCG	53-60	44	103 bp
Stx R	AWYCTYCCCCAGTTCARWGT	51-58.5	47.5	
Stx1 P	CTTGATGATCTCAGTGGGCGTTCTTATGTAA	78	42	
Stx2 P	TGAAACTGCTCCTGTGTATACGATGACGCC	78	50	

Legenda basi degenerate: Y= C+T; R= A+G; W= A+T, M= A+C; K= G+T

Successivamente queste sequenze sono state abbandonate per problemi di inclusivity (vedi paragrafo *Prove di specificità: Inclusivity*) e per ogni gene delle shigatossine 1 e 2 è stata disegnata separatamente una coppia di primer (II set STEC) con le relative probe. Inoltre è stato necessario prevedere due versioni della probe per *stx2*: Stx2 P (specifica per le varianti a, b, c, d, e, g di *stx2*) e Stx2 Pf (specifica per la variante f di *stx2*). L'analisi delle caratteristiche degli oligonucleotidi, effettuata con OligoAnalyzer 3.1 (<http://eu.idtdna.com/calc/analyzer>) ha fornito i risultati di Tm e % GC riportate in Tabella 27.

**Tab. 27:** Principali caratteristiche dei primer e probe del saggio STEC definitivo.

Nome	Target	Tm	%GC	Lunghezza amplificato
stx1 F	stx1	58.3	45	104 bp
stx1 R		59.2	43	
stx1 P		78	55	
Nome	Target	Tm	%GC	Lunghezza amplificato
stx2 F	stx2	53.8-61.8	50	102 bp
stx2 R		55.9-61.6	55	
stx2 Pf		79	50	
stx2 P		78	50	
Nome	Target	Tm	%GC	Lunghezza amplificato
Eae F	eae	58.7	38	93 bp
Eae R		58.8	45	
Eae P		79	50	

Strutture secondarie e dimeri sono risultati prevalentemente entro i range di accettabilità, e in Tabella 28 vengono riportati i risultati:

**Tab. 28:** Parametri di valutazione degli oligonucleotidi ottenuti tramite OligoAnalyzer 3.1.

*stx1*

	<b>Hairpin</b>	<b>Self dimer (Kcal/mol)</b>	<b>Cross Dimer</b>
stx1 F	-0.34; 0.14	-7.05; -3.61	-3.61; -1.94
stx1 R	0.01; 0.44	-3.90; -3.61	-3.61; -1.94
stx1 P	-1.7	-6.24; -3.61	

*stx2*

	<b>Hairpin</b>	<b>Self dimer (Kcal/mol)</b>	<b>Cross Dimer</b>
stx2 F	0.8; 1.72	-5.36; -3.52	-4.99; -1.34
stx2 R	1.24; 2.06	-3.61; -1.57	-4.99; -1.34
stx2 P	-1.06	-6.00; -1.34	
stx2f P	-1.1; -0.27	-6.60; -1.47	

*eae*

	<b>Hairpin</b>	<b>Self dimer (Kcal/mol)</b>	<b>Cross Dimer</b>
Eae F	0.44; 0.57	-3.61; -3.53	-6.69; -3.55
Eae R	0.38; 0.52	-6.21; -3.61	-6.69; -3.55
Eae P	-1.2; -0.98	-5.36; -5.13	

## **Prove di ottimizzazione in formato singleplex**

### *Prove di specificità: Inclusivity*

Nella prima fase di sviluppo del metodo molecolare per la rilevazione di STEC i primer selezionati sono stati testati sui ceppi batterici in nostro possesso, di cui sono note le varianti dei geni target, utilizzando un saggio con chimica SybrGreen. I risultati mostrano che la coppia di primer disegnata per amplificare simultaneamente i geni delle due shigatossine (stxF-stxR, I set STEC) non è stata in grado di amplificare correttamente tutte le varianti, in quanto i ceppi D3522 (*stx1d*) e D3546 (*stx2f*) non venivano riconosciuti. Pertanto sono state utilizzate due nuove coppie di primer (stx1F-stx1R e stx2F-stx2R, II set STEC) per amplificare separatamente i due geni target. In questo caso tutte le varianti sono state correttamente amplificate (Tabella 29).

**Tab. 29:** Prove di inclusivity su ceppi STEC con i set di primer disegnati in questo studio.

CEPPI STEC	VARIANTI		I set	II set	
	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	<b>stxF-stxR</b>	<b>stx1F-stx1R</b>	<b>stx2F-stx2R</b>
D2435	<b>+a</b>	<b>+a</b>	+	+	+
D2587	-	<b>+b, c</b>	+	-	+
D3435	-	<b>+d</b>	+	-	+
D3509	-	<b>+g</b>	+	-	+
D3522	<b>+d</b>	-	-	+	-
D3546	-	<b>+f</b>	-	-	+
D3602	<b>+c</b>	<b>+b</b>	+	+	+
D3648	-	<b>+e</b>	+	-	+
ED495	-	<b>+c, d</b>	+	-	+
ED513	-	<b>+b</b>	+	-	+
ED546	-	<b>+e</b>	+	-	+
ED585	<b>+a</b>	-	+	+	-
ED600	<b>+a</b>	-	+	+	-
ED603	-	<b>+a</b>	+	-	+
ED643	<b>+a</b>	-	+	+	-
ED645	-	<b>+a</b>	+	-	+
ED654	-	<b>+a</b>	+	-	+
O26	+	+	n.d.	+	+
O103	-	+	n.d.	-	+
O145	+	-	n.d.	+	-
O157	+	+	n.d.	+	+
1955	-	+	n.d.	-	+
ATCC 35150	+	+	n.d.	+	+
F146	-	+	n.d.	-	+

n.d.: prova non effettuata.

Per verificare l'inclusivity del target *eae*, dal momento che i ceppi della nostra collezione non erano caratterizzati per le varianti, è stato necessario effettuare tale tipizzazione.

Per le prove di caratterizzazione molecolare dei ceppi presenti nel nostro laboratorio sono state utilizzate le sequenze indicate da Madic et al., (2010), che permettono di identificare le varianti associate ai sierogruppi epidemiologicamente più rilevanti.

I risultati mostrano che nella nostra collezione erano presenti le varianti  $\theta$  (n. 2 ceppi),  $\beta 1$  (n. 10 ceppi),  $\varepsilon$  (n. 1 ceppo) e  $\gamma 1$  (n. 7 ceppi), associate rispettivamente ai sierogruppi O111, O26, O103 e O157/O145 (Tabella 30).

In un secondo momento i campioni tipizzati sono stati amplificati utilizzando i primer disegnati per il saggio STEC, confermandone l'inclusivity, almeno sulle varianti disponibili.

**Tab. 30:** Varianti del gene *eae* attribuite secondo il protocollo di Madic (2010) e risultati del test di inclusivity.

Ceppi	Sierogruppo	Variante	Inclusivity eaeF-eaeR
ED585	O111	$\theta$	+
ED600	O26	$\beta 1$	+
ED603	O121	$\varepsilon$	+
ED643	O26	$\beta 1$	+
ED645	O145	$\gamma 1$	+
ED654	O26	$\beta 1$	+
D3546	non noto	$\beta 1$	+
1955	O157	$\gamma 1$	+
O26	O26	$\beta 1$	+
O145	O145	$\gamma 1$	+
O103	O103	$\theta$	+
O111	O111	$\beta 1$	+
F146	O157	$\gamma 1$	+
ATCC 35150	O157	$\gamma 1$	+
EF292	O145	$\gamma 1$	+
EF299	O145	$\gamma 1$	+
EF333	O26	$\beta 1$	+
EF334	O26	$\beta 1$	+
EF335	O26	$\beta 1$	+
EF337	O26	$\beta 1$	+

*Prove di specificità: Exclusivity*

Per le prove di exclusivity sono stati utilizzati ceppi di *E. coli* non produttori di shigatossine e 19 ceppi batterici appartenenti ad altre specie. I risultati hanno confermato l'exclusivity del saggio e sono riportati in Tabella 31.

In particolare, si sottolinea questo aspetto in riferimento alla specie *Shigella flexneri* (ceppo ATCC 12022), che produce una tossina omologa a quella prodotta dal gene target *stx1* (Islam et al., 2008).

**Tab. 31:** Risultati delle prove di exclusivity per il saggio STEC.

n.	Specie	stx	eae
1	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-
2	<i>E. coli</i> isolato 1	-	-
3	<i>E. coli</i> isolato 2	-	-
4	<i>E. coli</i> isolato 3	-	-
5	EF292	-	n.d.
6	EF299	-	n.d.
7	EF333	-	n.d.
8	EF334	-	n.d.
9	EF335	-	n.d.
10	EF337	-	n.d.
11	O111	-	n.d.
12	<i>Enterococcus faecalis</i> UU 4421	-	-
13	<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090	-	-
14	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 9525	-	-
15	<i>Klebsiella oxytoca</i> ATCC 8724	-	-
16	<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC13883	-	-
17	<i>Serratia marcescens</i> ATCC 14756	-	-
18	<i>Aeromonas hydrophila</i> ATCC 7966	-	-
19	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	-	-
20	<i>Salmonella enteritidis</i> isolato 7	-	-
21	<i>Salmonella Newport</i> isolato 2	-	-
22	<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090	-	-
23	<i>Proteus vulgaris</i>	-	-
24	<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	-	-
25	<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC13047	-	-
26	<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048	-	-
27	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC10145	-	-
28	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	-	-
29	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	-
30	D2435	n.d.	-
31	D2587	n.d.	-
32	D3435	n.d.	-
33	D3509	n.d.	-
34	D3522	n.d.	-
35	D3602	n.d.	-
36	D3648	n.d.	-
37	ED495	n.d.	-
38	ED513	n.d.	-
39	ED546	n.d.	-

n.d.: prova non effettuata poiché i ceppi erano stati utilizzati solo per testare l'exclusivity di uno dei due target *stx* o *eae*.

Pertanto il saggio ha rilevato correttamente tutte le varianti note dei geni *stx1* e *stx2* e quelle di *eae* associate ai sierogruppi più importanti. Ha dimostrato inoltre 100% di inclusivity ed exclusivity.

## Comparazione con il protocollo di real-time PCR per l'identificazione di STEC secondo ISO 13136:2012

Il saggio per l'identificazione di STEC sviluppato nel presente studio è stato confrontato con il metodo indicato nella norma ISO 13136:2012, utilizzando il DNA dei ceppi positivi per i geni target. I risultati hanno evidenziato una maggiore inclusivity per il set di primer disegnato in questo lavoro, in quanto il metodo indicato dalla norma ISO non ha rilevato la variante 'stx2f' (Tabella 32); il motivo è da attribuirsi alla variabilità di sequenza della variante 'stx2f' nei punti di annealing dei primer ISO 13136:2012 per *stx2*, come osservato dagli allineamenti analizzati.

**Tab. 32:** Confronto dei risultati sulle varianti dei geni *stx1* e *stx2*.

CEPPI STEC	VARIANTI		II set STEC		ISO13136:2012
	<i>stx1</i>	<i>stx2</i>	stx1F-stx1R	stx2F-stx2R	stxF-stxR
D2435	<b>+a</b>	<b>+a</b>	+	+	+
D2587	-	<b>+b, c</b>	-	+	+
D3435	-	<b>+d</b>	-	+	+
D3509	-	<b>+g</b>	-	+	+
D3522	<b>+d</b>	-	+	-	+
D3546	-	<b>+f</b>	-	+	-
D3602	<b>+c</b>	<b>+b</b>	+	+	+
D3648	-	<b>+e</b>	-	+	+
ED495	-	<b>+c, d</b>	-	+	+
ED513	-	<b>+b</b>	-	+	+
ED546	-	<b>+e</b>	-	+	+
ED585	<b>+a</b>	-	+	-	+
ED600	<b>+a</b>	-	+	-	+
ED603	-	<b>+a</b>	-	+	+
ED643	<b>+a</b>	-	+	-	+
ED645	-	<b>+a</b>	-	+	+
ED654	-	<b>+a</b>	-	+	+

Per quanto riguarda invece il target *eae*, i risultati hanno mostrato che tutti i ceppi in possesso del gene dell'intimina sono stati correttamente identificati con entrambi i metodi (Tabella 33).

**Tab.33:** Confronto dei risultati sul gene *eae* con il metodo ISO 13136:2012.

CEPPI	<i>eaeF-eaeR-eaeP</i>	ISO13136:2012 target <i>eae</i>
D3546	+	+
ED585	+	+
ED600	+	+
ED603	+	+
ED643	+	+
ED645	+	+
ED654	+	+
EF292	+	+
EF299	+	+
EF333	+	+
EF334	+	+
EF335	+	+
EF337	+	+
O26	+	+
O103	+	+
O145	+	+
O111	+	+
O157	+	+
1955	+	+
ATCC 35150	+	+
F146	+	+

### Prove di sensibilità e di efficienza di amplificazione in singleplex

Gli indici di sensibilità e di efficienza di amplificazione del saggio sono stati eseguiti utilizzando diluizioni di DNA di STEC da  $10^6$  a 1 UG, amplificate in triplicato.

Alcune prove di efficienza sono state inizialmente eseguite in real-time PCR in formato singleplex sui geni *stx*. I dati di efficienza ed  $R^2$  riscontrati sono ottimali e risultano pressoché invariati nel confronto tra la prima e la seconda prova, sottolineando la riproducibilità del saggio. La sensibilità del metodo, invece, risulta varia e si attesta tra 1 UG, dove non tutte e tre le repliche vengono amplificate correttamente, e 10 UG caratterizzate dall'amplificazione di tutte le repliche (Tabella 34).

**Tab. 34:** Prove di efficienza eseguite singolarmente sui geni target *stx1*, *stx2*.

	PRIMA PROVA			SECONDA PROVA		
	EFFICIENZA	$R^2$	SENSIBILITÀ	EFFICIENZA	$R^2$	SENSIBILITÀ
<i>stx1</i>	0.952	0.996	1 UG(1/3)	0.975	0.997	10 UG (3/3)
<i>stx2</i>	1.00	0.991	10 UG (3/3)	0.961	0.997	1 UG (2/3)

## Sviluppo del saggio di real-timePCR in formato multiplex

Il saggio è stato assemblato in formato multiplex, dapprima utilizzando canali separati per ciascun target (*stx1-stx2-eae*), quindi riunendo in uno solo canale di acquisizione gli *stx* ed aggiungendo il controllo interno di amplificazione. Le marcature sono state selezionate tenendo conto dei fluorofori disponibili presso il produttore delle dual labeled probe e delle capacità di detection dei principali strumenti per real-time PCR (Tabella 35).

**Tab. 35:** Combinazioni dei target nelle due versioni prodotte durante lo sviluppo del saggio per l'identificazione di STEC.

	Target	Oligonucleotidi	Canale di acquisizione
I set STEC	<i>stx1</i>	<i>stx1F-stx1R-stx1P</i>	Green
	<i>stx2</i>	<i>stx2F-stx2R-stx2P-stx2Pf</i>	Yellow
	IAC	<i>181F-304R-IAC P</i>	Red
II set STEC	<i>stx</i>	<i>stxF-stxR-stxP</i>	Green
	<i>eae</i>	<i>eaeF-eaeR-eaeP</i>	Red
	IAC	<i>IACF-IACR-IAC P</i>	Yellow

La seconda versione delle combinazioni mostrate in Tabella 35 è stata quella utilizzata nel formato definitivo, in quanto permetteva la presenza dello IAC.

Sensibilità ed efficienza sono state valutate mediante aggiustamenti nella concentrazione dei reagenti e della DNA polimerasi. Il protocollo definitivo ha fornito valori di efficienza del 100% per entrambi i target; la sensibilità è risultata nel range di 1-10 UG, con 2/3 repliche positive per entrambi i livelli (Tabella 36).

**Tab. 36:** Sensibilità ed efficienza di amplificazione del saggio per l'identificazione di STEC. Risultati di alcune prove di ottimizzazione sulle concentrazioni dei reagenti.

Modifiche	Target	Efficienza	R <sup>2</sup>	Sensibilità (UG)
Primer	<i>stx1-stx2</i>	0.93	0.999	10 (1/3)
DNA pol	<i>eae</i>	0.91	0.986	10 (3/3)
Primer DNA pol	<i>stx1-stx2</i>	0.85	0.988	1 (2/3)
		1.03	0.998	10 (2/3)
	<i>eae</i>	1.11	0.99	1 (2/3)
		1.04	0.998	10 (2/3)
Primer	<i>stx1-stx2</i>	0.99	0.995	10 (3/3)
DNA pol	<i>eae</i>	1.08	0.996	10 (3/3)

Ulteriori prove sono state eseguite per valutare eventuali differenze di efficienza e di sensibilità tra le varianti dei geni *stx1* ed *stx2*. Come riportato in Tabella 37, i valori di efficienza per tutte le varianti considerate risultano superiori al 90%, mentre la sensibilità si conferma a 10 UG, anche se non in tutte le repliche.

**Tab. 37:** Prove di efficienza eseguite su tutte le varianti dei geni *stx1* ed *stx2* prese singolarmente.

CAMPIONE	VARIANTE	EFFICIENZA	R <sup>2</sup>	REPLICHE
ED585	<i>stx1a</i>	1.00	0.994	10 UG (2/3)
D3602	<i>stx1c</i>	0.91	0.985	10 UG (2/3)
D3522	<i>stx1d</i>	1.00	0.998	10 UG (2/3)
ED603	<i>stx2a</i>	0.99	0.991	10 UG (3/3)
ED513	<i>stx2b</i>	1.03	0.987	10 UG (2/3)
ED495	<i>stx2c + d</i>	0.98	0.991	10 UG (3/3)
D3435	<i>stx2d</i>	1.00	0.997	10 UG (2/3)
D3648	<i>stx2e</i>	0.99	0.996	10 UG (2/3)
D3546	<i>stx2f</i>	1.00	0.992	10 UG (3/3)
D3509	<i>stx2g</i>	0.98	0.994	10 UG (3/3)

### Prove con concentrazioni diverse dei DNA target

Sono state eseguite prove di sensibilità utilizzando contemporaneamente, e a concentrazioni differenti, i DNA target dei geni *stx1*, *stx2* ed *eae*. I risultati (Tabella 38) indicano che il saggio riesce a rilevare la positività anche quando uno dei due target è in concentrazioni molto inferiori rispetto all'altro (3 log), sempre entro il 40esimo Ct. Questa prova conferma la sensibilità e l'affidabilità dell'intero sistema.

**Tab. 38:** Prove di amplificazione con diverse concentrazioni di DNA dei geni target (*stx1*, *stx2* ed *eae*). Sono riportati i Ct ottenuti nel saggio di amplificazione.

Concentrazione	Ct <i>stx</i>	Ct <i>eae</i>
10 <i>stx1</i> - 10 <sup>3</sup> <i>eae</i>	33.33	28.05
10 <i>stx2</i> - 10 <sup>3</sup> <i>eae</i>	37.25	28.03
10 <i>stx1</i> - 10 <sup>4</sup> <i>eae</i>	37.70	24.74
10 <i>stx2</i> - 10 <sup>4</sup> <i>eae</i>	40.70	24.75
10 <sup>2</sup> <i>stx1</i> - 10 <sup>5</sup> <i>eae</i>	32.39	21.28
10 <sup>2</sup> <i>stx2</i> - 10 <sup>5</sup> <i>eae</i>	36.61	21.26
10 <sup>2</sup> <i>stx1</i> - 10 <sup>4</sup> <i>eae</i>	29.61	24.64
10 <sup>2</sup> <i>stx2</i> - 10 <sup>4</sup> <i>eae</i>	31.40	24.78
10 <sup>3</sup> <i>stx1</i> - 10 <sup>6</sup> <i>eae</i>	27.99	17.93
10 <sup>3</sup> <i>stx2</i> - 10 <sup>6</sup> <i>eae</i>	21.93	17.89
10 <sup>3</sup> <i>stx1</i> - 10 <sup>5</sup> <i>eae</i>	26.11	21.36
10 <sup>3</sup> <i>stx2</i> - 10 <sup>5</sup> <i>eae</i>	27.14	21.36

## SAGGIO PER L'IDENTIFICAZIONE DEI PRINCIPALI SIEROGRUPPI DI *E. COLI* PATOGENI (O157, O26, O103, O111, O145 ed O104)

### Target selezionati e oligonucleotidi utilizzati

I tre saggi per l'identificazione dei principali sierogruppi di *E. coli* patogeni sono stati allestiti secondo lo schema seguente:

- Identificazione dei sierogruppi O157 e O111: sequenze appartenenti ai geni *rfbE* e *wbdI*
- Identificazione dei sierogruppi O26 e O103: sequenze appartenenti ai geni *wzx<sub>O26</sub>* e *wzx<sub>O103</sub>*
- Identificazione dei sierogruppi O145 e O104: sequenze appartenenti ai geni *ihp1* e *wzx<sub>O104</sub>*

In ogni saggio è stato inserito un sistema di controllo interno di amplificazione (IAC), costituito da un plasmide e da uno specifico set di primer e probe.

I primer e i geni target selezionati per discriminare i sierogruppi O26, O103, O111 ed O145 sono stati ottenuti dalla norma di riferimento ISO 13136:2012, mentre quelli per O104 sono stati ottenuti da EU-RL VTEC\_Method\_04\_Rev\_1 (Tabelle 39 e 40).

**Tab. 39:** Sequenze di primer e probe indicate dalla norma ISO 13136:2012 ed utilizzate nei saggi sviluppati.

Gene target	Sequenze oligonucleotidiche (5'-3')	Amplificato (bp)	GenBank Acc.N.
<i>wbdI</i> (O111) <sup>a</sup>	FCGAGGCAACACATTATATAGTGCTTT RTTTTTGAATAGTTATGAACATCTTGTTTAGC ProbeTTGAATCTCCCAGATGATCAACATCGTGAA	146	AF078736
<i>wzx</i> (O26) <sup>a</sup>	FCGCGACGGCAGAGAAAATT RAGCAGGCTTTTATATTCTCCAACCTTT ProbeCCCCGTTAAATCAATACTATTTACGAGGTTGA	135	AF529080
<i>ihp1</i> (O145) <sup>a</sup>	FCGATAATATTTACCCACCAGTACAG RGCCCGCGCAATGCTT ProbeCCGCCATTCAGAATGCACACAATATCG	132	AF531429
<i>wzx</i> (O103) <sup>b</sup>	FCAAGGTGATTACGAAAATGCATGT RGAAAAAAGCACCCCCGTAATTAT ProbeCATAGCCTGTTGTTTTAT	99	AY532664

<sup>a</sup>Perelle et al., 2004; <sup>b</sup>Perelle et al., 2005.

**Tab. 40:** Sequenze di primer e probe indicate dalla norma EU-RL VTEC\_Method\_04\_Rev\_1 ed utilizzate nel saggio sviluppato.

Gene target	Sequenze oligonucleotidiche (5'-3')	Amplificato (bp)	GenBank Acc. N.
<i>wzx</i> (O104) <sup>c</sup>	FTGTTCGCGCAAAGAATTTCAAC RAAAATCCTTTAACTATACGCCC ProbeTTGGTTTTTTTTGTATTAGCAATAAGTGGTGTC	100	CU928145

<sup>c</sup>Bugarel et al., 2010.

In un secondo momento primer e probe per l'identificazione del sierogruppo O103 sono stati sostituiti con un altro set disegnato nell'ambito di questo studio. Per verificare eventuali variabilità di sequenza nelle posizioni degli oligonucleotidi sono stati allineati i geni *wzx*<sub>O103</sub> disponibili in banca dati con gli Accession Number sottoelencati (Tabella 41).

**Tab. 41:** Gene target ed Accession Number per il sierogruppo O103.

Gene	Accession Number
<i>wzx</i> <sub>O103</sub>	AP010958.1
	AB704861
	AB704860.1
	AY532664.1

In Tabella 42 vengono riportate le principali caratteristiche del nuovo set oligonucleotidico:

**Tab. 42:** Principali caratteristiche di primer e probe per il saggio Sierogruppi O103.

Nome	Tm	%GC	Amplificato (bp)
For O103	58.6	44	88
Rev O103	58.1	43	
Probe O103	79.0	52	

Strutture secondarie e dimeri sono risultati prevalentemente entro i range di accettabilità. In Tabella 43 vengono riportati i risultati:

**Tab. 43:** Parametri di valutazione degli oligonucleotidi ottenuti tramite OligoAnalyzer 3.1.

	Hairpin	Self dimer (Kcal/mol)	Cross dimer
For O103	1.05; 1.82	-3.14; -0.96	-3.42; -1.34
Rev O103	-1.10; -0.96	-7.00; -1.47	-3.42; -1.34
Probe O103	-1.03; -0.04	-3.14; -1.47	

### Prove di ottimizzazione in formato singleplex

#### *Prove di specificità: Inclusivity ed exclusivity*

Le prove di inclusivity effettuate con tutti gli isolati della collezione di laboratorio di cui era noto il sierogruppo hanno confermato che i primer selezionati erano in grado di amplificare diversi ceppi (Tabella 44).

**Tab. 44:** Risultati delle prove di inclusivity dei saggi per l'identificazione dei sierogruppi.

<b>Campione</b>	<b>Risultato</b>	<b>Campione</b>	<b>Risultato</b>
ATCC 35150 (O157)	+	EF 337 (O26)	+
F146 (O157)	+	O103 (O103)	+
O26 (O26)	+	O111 (O111)	+
ED 600 (O26)	+	ED 585 (O111)	+
ED 654 (O26)	+	O145 (O145)	+
ED 643 (O26)	+	ED 645 (O145)	+
EF 333 (O26)	+	EF 292 (O145)	+
EF 334 (O26)	+	EF 299 (O145)	+
EF 335 (O26)	+	O104	+

Le prove effettuate con ogni coppia di primer sui ceppi appartenenti a sierogruppi diversi hanno escluso effetti di cross-reattività, confermando la specificità (exclusivity) (Tabella 45).

**Tab. 45:** Risultati delle prove di exclusivity dei saggi per l'identificazione dei sierogruppi.

<b>Sierogruppi</b>	<b>Target</b>	<b>Amplificati</b>					
		O26	O103	O111	O145	O157	O104
O26	<i>wzx</i> <sub>O26</sub>	+	-	-	-	-	-
O103	<i>wzx</i> <sub>O103</sub>	-	+	-	-	-	-
O111	<i>wdbl</i>	-	-	+	-	-	-
O145	<i>ihp1</i>	-	-	-	+	-	-
O157	<i>rfbE</i>	-	-	-	-	+	-
O104	<i>wzx</i> <sub>O104</sub>	-	-	-	-	-	+

### Prove di sensibilità e di efficienza di amplificazione in singleplex

Gli indici di sensibilità e di efficienza sono stati valutati singolarmente per ogni saggio molecolare utilizzando diluizioni decimali di DNA target come descritto nella sezione dei metodi. I dati riportati in Tabella 46 mostrano come per i sierogruppi O26, O111 e O145 sia stato sufficiente eseguire una singola prova per ottenere risultati ottimali, con valori di efficienza che si attestano nel range di 0.99-1, ed una sensibilità elevata, poiché in grado di amplificare 2/3 repliche con 1 UG per i sierogruppi O26 ed O111, mentre 3/3 repliche con 1 UG per il sierogruppo O145. Diversamente, per i sierogruppi O157, O103, ed O104 sono state eseguite diverse prove per individuare le condizioni ottimali di amplificazione. Per il sierogruppo O157, nella seconda prova, in cui è stata aumentata la concentrazione dei primer, i risultati di efficienza sono stati migliori e le curve di amplificazione presentavano un segnale di fluorescenza più elevato. I dati di sensibilità mostrano la capacità del saggio di amplificare 2/3 repliche con 1 UG, con un R<sup>2</sup> di 1.01. Per il sierogruppo O103, a causa di problemi di riproducibilità del segnale di amplificazione, si è reso necessario selezionare un nuovo set di primer e probe e

valutarne i parametri di sensibilità e di efficienza. I dati ottenuti (terza prova) mostrano una efficienza di 1.03 ed una sensibilità che si attesta ad 1 UG dove vengono amplificate tutte e tre le repliche. Per il sierogruppo O104 sono state eseguite tre prove con modifiche nella concentrazione dei primer e della composizione della mix di reazione. I valori di efficienza e di  $R^2$  risultano migliori per la terza prova, 0.99 e 0.997 rispettivamente, mentre la sensibilità rimane invariata in tutte le prove, dove con 1 UG vengono amplificate 2/3 repliche.

**Tab. 46:** Risultati delle prove di efficienza dei saggi per l'identificazione dei sierogruppi.

Sierogruppo	Prova	Efficienza	$R^2$	Sensibilità
O26	I	0.99	0.98	1 UG 2/3
O111	I	0.99	1.03	1 UG 2/3
O145	I	1.00	0.99	1 UG 3/3
O157	I	0.99	0.92	10 UG 2/3
	II	0.99	1.01	1 UG 2/3
O103	I	0.96	0.99	10 UG 1/3
	II	0.92	1.12	10 UG 3/3
	III	1.03	0.99	1 UG 3/3
O104	I	0.95	0.99	1 UG 2/3
	II	1.03	0.99	1 UG 2/3
	III	0.99	0.99	1 UG 2/3

### Prove di ottimizzazione in formato multiplex

I parametri di sensibilità ed efficienza di amplificazione sono stati testati in formato multiplex, nella forma definitiva dei saggi. I risultati relativi a ciascun metodo hanno mostrato una sensibilità che si attesta intorno alle 10 UG, in cui tutte le repliche vengono correttamente amplificate per entrambi i geni target. I valori di efficienza sono molto simili tra i target di ogni singolo saggio, in particolare per O26-O103 otteniamo valori di efficienza vicino ad 1, per O157-O111 otteniamo valori maggiori di 0.9, mentre per O145-O104 si riscontra una maggiore variabilità poichè otteniamo valori di 0.93 e 0.99, rispettivamente (Tabella 47).

**Tab. 47:** Risultati delle prove di efficienza dei tre saggi eseguite in formato multiplex.

<b>Saggio O26-O103</b>			
	<b>EFFICIENZA</b>	<b><math>R^2</math></b>	<b>SENSIBILITA'</b>
O26	1.07	0.991	10 UG 3/3
O103	1.03	0.998	10 UG 3/3
<b>Saggio O157-O111</b>			
	<b>EFFICIENZA</b>	<b><math>R^2</math></b>	<b>SENSIBILITA'</b>
O157	0.96	0.967	10 UG 3/3
O111	0.99	0.996	10 UG 3/3

<b>Saggio O145-O104</b>			
	<b>EFFICIENZA</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>SENSIBILITA'</b>
O145	0.93	0.996	10 UG 3/3
O104	0.99	0.993	10 UG 3/3

### Prove con concentrazioni diverse dei DNA target

I risultati delle prove con concentrazioni non uguali dei geni target sono riportati in Tabella 48. I campioni sono stati allestiti in duplicato e di seguito vengono riportate le medie dei Ct.

**Tab. 48:** Prove di amplificazione con concentrazioni diverse di DNA dei geni target. Sono riportate le medie dei Ct ottenuti nel saggio di amplificazione.

#### O26-O103

<b>CONCENTRAZIONE</b>	<b>O26</b>	<b>O103</b>
10 O26 - 10 <sup>3</sup> O103	35.71	25.61
10 O26 - 10 <sup>4</sup> O103	38.83	22.45
10 <sup>2</sup> O26 - 10 <sup>4</sup> O103	30.82	22.48
10 <sup>2</sup> O26 - 10 <sup>5</sup> O103	32.08	19.33
10 <sup>3</sup> O26 - 10 O103	26.93	32.20
10 <sup>4</sup> O26 - 10 O103	23.65	31.86
10 <sup>4</sup> O26 - 10 <sup>2</sup> O103	23.86	28.92
10 <sup>5</sup> O26 - 10 <sup>2</sup> O103	20.49	28.77

#### O145-O104

<b>CONCENTRAZIONE</b>	<b>O145</b>	<b>O104</b>
10 O145 - 10 <sup>3</sup> O104	34.45	26.25
10 O145 - 10 <sup>4</sup> O104	-	23.14
10 <sup>2</sup> O145 - 10 <sup>4</sup> O104	31.03	23.10
10 <sup>2</sup> O145 - 10 <sup>5</sup> O104	33.83	19.67
10 <sup>3</sup> O145 - 10 O104	26.12	31.61
10 <sup>4</sup> O145 - 10 O104	22.85	34.70
10 <sup>4</sup> O145 - 10 <sup>2</sup> O104	22.92	28.75
10 <sup>5</sup> O145 - 10 <sup>2</sup> O104	19.78	29.46

#### O157-O111

<b>CONCENTRAZIONE</b>	<b>O157</b>	<b>O111</b>
10 O157 - 10 <sup>3</sup> O111	33.02	26.45
10 O157 - 10 <sup>4</sup> O111	-	23.06
10 <sup>2</sup> O157 - 10 <sup>4</sup> O111	29.71	23.15
10 <sup>2</sup> O157 - 10 <sup>5</sup> O111	31.44	19.62
10 <sup>3</sup> O157 - 10 O111	26.22	32.65
10 <sup>4</sup> O157 - 10 O111	22.91	-
10 <sup>4</sup> O157 - 10 <sup>2</sup> O111	23.30	29.37
10 <sup>5</sup> O157 - 10 <sup>2</sup> O111	19.65	32.52

Per il saggio O26-O103 i campioni con una differenza di 2 log tra i DNA target sono rilevati entro il 35esimo ciclo, mentre i campioni con 3 log di differenza si attestano vicino al 40esimo, a dimostrazione che i target si influenzano seppur in maniera lieve.

Per il saggio O145-O104 i campioni con una differenza sia di 2 che di 3 log vengono rilevati entro il 35esimo Ct, sebbene un solo campione con tre log di differenza (10 UG O145 e  $10^4$  UG O104) non viene amplificato.

Per il saggio O157-O111 i campioni con 10 UG e 3 log di differenza (10 e  $10^4$  UG) non vengono amplificati, né per il target O157 né per il target O111 a dimostrazione che, per questo specifico saggio, concentrazioni elevate di un target influiscono in maniera competitiva sull'amplificazione dell'altro.

## SAGGIO PER L'IDENTIFICAZIONE DI *E. COLI* ENTEROAGGREGATIVI (EAggEC)

### Target selezionati e oligonucleotidi utilizzati

Il saggio per l'identificazione di *E. coli* enteroaggregativi (EAggEC) è stato allestito utilizzando i seguenti target:

- una sequenza appartenente al gene codificante per molteplici fattori di virulenza, *aggR* (di origine plasmidica)
- una sequenza appartenente al gene codificante per il sistema di secrezione di tipo VI, *aaiC* (di origine cromosomiale)
- un sistema di controllo interno di amplificazione (IAC), costituito da un plasmide e da uno specifico set di primer e probe.

### Reperimento sequenze target e comparazione mediante allineamento

Per lo sviluppo del saggio per gli EAggEC sono state utilizzate 14 sequenze per il gene *aggR* e 5 sequenze per il gene *aaiC*. Analizzate come descritto precedentemente, si è riscontrata una bassa variabilità, con numerose zone conservate. Gli Accession Number reperiti sulla GenBank sono riportati in Tabella 49.

**Tab. 49:** Accession Number geni *aggR* ed *aaiC*.

Accession N. di <i>aggR</i>	Accession N. di <i>aaiC</i>
AF411067.1	CP003289.1
AFPS01000102.1	CP003301.1
CU928159	CP003297.1
HE603111.1	FN554766.1
Z18751.1	218350208
Z32523.1	
CP003299.1	
CP003302.1	
HE610901.2	
CP003291.1	
AFOB02000132.1	
AFST01000024.2	
NZAFST01000024.1	
FN554767.1	

## Design di primer e probe per real-timePCR

Le principali caratteristiche delle sequenze oligonucleotidiche per la rilevazione di EAggEC sono riportate di seguito (Tabella 50):

**Tab. 50:** Principali caratteristiche dei primer e probe per il saggio per EAggEC.

Nome	Target	Tm	%GC	Amplificato (bp)
aggR F	aggR	58	42	99
aggR R		58	40	
aggR P		68	48	
aaiC F	aaiC	60	33	114
aaiC R		58	36	
aaiC P		69	41	

Strutture secondarie e dimeri sono risultati prevalentemente entro i range di accettabilità. In Tabella 51 vengono riportati i risultati:

**Tab. 51:** Parametri di valutazione degli oligonucleotidi ottenuti tramite OligoAnalyzer 3.1.

	Hairpin	Self dimer (Kcal/mol)	Cross Dimer
aggR F	-1.52	-3.61; -0.96	-5.00; -1.47
aggR R	-0.98; -0.95	-3.61; -0.96	-5.00; -1.47
aggR P	-1.23; -0.37	-3.61; -1.57	
aaiC F	0.26; 0.88	-3.52; -0.96	-5.36; -0.96
aaiC R	1.43; 2.37	-3.65; -1.34	-5.36; -0.96
aaiC P	0.02; 1.00	-4.67; -1.34	

## Prove di ottimizzazione in formato singleplex

### *Prove di specificità: Inclusivity*

Per le prove di inclusivity sono stati utilizzati: il DNA genomico del ceppo O104 epidemico fornito dall'Università di Munster; 4 ceppi presenti nella collezione di laboratorio dell'USDA, compreso il ceppo O42 considerato prototipo degli EAggEC (Chaudhuri et al., 2010).

I risultati ottenuti mostrano che le sequenze oligonucleotidiche amplificano correttamente i geni target. I dati riportati in Tabella 52 mostrano la corretta rilevazione di tutti i campioni, con Ct ottimali nel range di 14-19 e molto simili tra i due target.

**Tab. 52:** Risultati delle prove di inclusivity per il saggio EAggEC.

Campione	aggR (Ct)	aaiC (Ct)	Sierotipo
O42	14.9	14.9	O42
3493	17.1	17.1	O104
2071	18.3	18.1	O104
2050	19.4	19.3	O104
DNA <sub>O104</sub>	14.0	13.0	-

*Prove di specificità: Exclusivity*

Per le prove di exclusivity sono stati utilizzati 44 ceppi presenti nella collezione di laboratorio. I risultati riportati in Tabella 53 mostrano una elevata specificità dei primer.

**Tab. 53:** Risultati delle prove di exclusivity per il saggio EAggEC.

<b>Nome</b>	<b>aggR</b>	<b>aaiC</b>
<i>Enterococcus faecalis</i> UU 4421	-	-
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	-
<i>E. coli</i> isolato 1	-	-
<i>E. coli</i> isolato 2	-	-
<i>E. coli</i> isolato 3	-	-
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090	-	-
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 9525	-	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC13883	-	-
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	-	-
<i>Salmonella enteritidis</i> isolato 7	-	-
<i>Salmonella</i> Newport isolato 2	-	-
<i>Citrobacter freundii</i> ATCC 8090	-	-
<i>Proteus vulgaris</i>	-	-
<i>Shigella flexneri</i> ATCC 12022	-	-
<i>Enterobacter cloacae</i> ATCC13047	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC10145	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	-	-
ED495	-	-
ED513	-	-
ED546	-	-
ED585	-	-
ED600	-	-
ED603	-	-
ED643	-	-
ED645	-	-
ED654	-	-
D2435	-	-
D2587	-	-
D3435	-	-
D3509	-	-
D3522	-	-
D3546	-	-
D3602	-	-
D3648	-	-
EF292	-	-
EF299	-	-
EF333	-	-
EF334	-	-
EF335	-	-
EF337	-	-
O103	-	-
O145	-	-
ATCC 35150	-	-

Il saggio ha dimostrato quindi di avere una inclusivity ed una exclusivity del 100%.

### **Prove di sensibilità e di efficienza di amplificazione in formato singleplex**

Sono state valutate sensibilità ed efficienza del saggio per l'identificazione di EAggEC per completezza di dati, sebbene questo metodo sia stato sviluppato solo per la caratterizzazione delle colonie isolate dopo l'arricchimento colturale dei campioni alimentari. I risultati riportati in Tabella 54 mostrano per il target *aaiC* valori di efficienza di 1, con una sensibilità ottimale poiché riesce ad amplificare tutte e tre le repliche con 10 UG. Per il target *aggR*, invece, otteniamo valori di efficienza e di sensibilità più bassi, rispettivamente dello 0.96 e 2/3 repliche alla concentrazione di 10 UG. I valori di  $R^2$  risultano uguali per entrambi i saggi.

**Tab. 54:** Risultati di efficienza e sensibilità del saggio per l'identificazione di EAggEC.

<b>TARGET</b>	<b>EFFICIENZA</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>SENSIBILITÀ'</b>
<i>aggR</i>	0.96	0.99	10 UG 2/3
<i>aaiC</i>	1.00	0.99	10 UG 3/3

### **Clonaggio dei marker diagnostici di EAggEC**

Il clonaggio delle sequenze di *aggR* ed *aaiC* è stato correttamente verificato mediante real-time PCR. Sono stati quindi selezionati due cloni, clone B (per *aggR*) e clone C (per *aaiC*), su cui il sequenziamento e la successiva analisi con Bioedit hanno confermato la corretta identità degli inserti.

### **Sviluppo del saggio di real-time PCR in formato multiplex**

Il saggio per l'identificazione di EAggEC è stato assemblato nel formato multiplex e ne sono stati valutati i parametri di efficienza e di sensibilità. I risultati di tre prove, effettuate tutte nelle stesse condizioni, sono riportati in Tabella 55 e mostrano valori ottimali sia di efficienza, poiché compresa tra 0.98-1.10 per il target *aggR* e 0.96-1.11 per il target *aaiC*, sia di  $R^2$ , tra 0.98-0.99 per entrambi i target. La sensibilità si attesta sulle 10 UG nonostante durante la prima e seconda prova siano state rilevate solo 2/3 repliche, mentre nella terza prova tutte le tre repliche sono state correttamente amplificate.

**Tab. 55:** Risultati di efficienza e sensibilità del saggio per l'identificazione di EAggEC in formato multiplex.

	<b>TARGET</b>	<b>EFFICIENZA</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>LOD</b>
<b>I prova</b>	<i>aggR</i>	1.04	0.99	10 (2/3)
	<i>aaiC</i>	0.99	0.98	10 (2/3)
<b>II prova</b>	<i>aggR</i>	0.98	0.99	10 (3/3)
	<i>aaiC</i>	0.96	0.99	10 (2/3)
<b>III prova</b>	<i>aggR</i>	1.10	0.99	10 (3/3)
	<i>aaiC</i>	1.11	0.99	10 (3/3)

## SAGGIO PER L'IDENTIFICAZIONE DI *E. COLI* ENTEROEMORRAGICHE (EHEC)

### Target selezionati

Il saggio per l'identificazione di *E. coli* enteroemorragiche (EHEC) prevedeva i seguenti target:

- una sequenza appartenente al gene della emolisina *ehxA* (comprendente tutte le 6 varianti A-F)
- un sistema di controllo interno di amplificazione (IAC), costituito da un plasmide e da uno specifico set di primer e probe.

### Reperimento sequenze target e comparazione mediante allineamento

Allo scopo di disegnare primer e probe che potessero amplificare tutte le varianti note del gene *ehxA*, sono state reperite 11 sequenze disponibili sulla GenBank dell'NCBI. In Tabella 56 sono riportati gli Accession Number (A.N.).

**Tab. 56:** Gene target ed Accession Number per l'identificazione di EHEC.

Gene	Accession Number
<i>ehxA</i>	EF204922
	EF204925
	EF204924
	EF204929
	EF204919
	EF204920
	EF204927
	EF204928
	EF204923
	EF204921
	EF204926

Utilizzando le sequenze sopra descritte sono stati generati gli allineamenti che hanno evidenziato una variabilità molto limitata, con numerose zone conservate.

## Design di primer e probe per real-time PCR

Le principali caratteristiche dei primer e probe disegnati per l'amplificazione di *ehxA* sulle regioni conservate del gene sono riportati in Tabella 57.

**Tab. 57:** Principali caratteristiche di primer e probe per l'identificazione di EHEC.

Nome	Tm	%GC	Amplificato (bp)
ehxA F	59	55	
ehxA R	59	38	83
ehxA P	69	52	

Strutture secondarie e dimeri sono risultati prevalentemente entro i range di accettabilità. In tabella 58 vengono riportati i risultati:

**Tab. 58:** Parametri di valutazione degli oligonucleotidi ottenuti tramite OligoAnalyzer 3.1.

	Hairpin	Self dimer (Kcal/mol)	Cross dimer
ehxA F	-0.83	-3.61; -1.34	-5.09; -1.47
ehxA R	-0.52; 0.3	-4.74; -0.96	-5.09; -1.47
ehxA P	-1.41; -0.49	-3.61; -0.96	

## PROVE DI TRASFERIBILITÀ SU ALTRI STRUMENTI

Le prove di trasferibilità su altra strumentazione per real-time PCR, eseguite per i saggi per l'identificazione di STEC e di EAggEC, hanno dimostrato l'applicabilità del protocollo sviluppato sugli strumenti più diffusi. Sebbene con una certa variabilità in funzione dello strumento utilizzato, i parametri di sensibilità ed efficienza sono comunque risultati comparabili e sempre nel range che assicura buona performance ed affidabilità, in particolare per un saggio di tipo qualitativo (Tabella 59-60).

**Tab. 59:** Risultati delle prove di trasferibilità del metodo per l'identificazione di STEC. I termociclatori utilizzati sono stati: 7500 Real-Time PCR System, Rotor Gene Q e RotorGene 6000.

	<b>EFFICIENZA</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>LOD* (UG)</b>
<b>RotorGene 6000</b>			
<b>I prova</b>			
<i>stx1-2</i>	0.999	0.997	10 (2/3)
<i>eae</i>	1.085	0.997	10 (2/3)
<b>II prova</b>			
<i>stx1-2</i>	0.998	0.995	10 (3/3)
<i>eae</i>	1.081	0.996	10 (3/3)
<b>Rotor Gene Q</b>			
<b>I prova</b>			
<i>stx1-2</i>	0.856	0.989	10 (3/3)
<i>eae</i>	0.989	0.995	10 (3/3)
<b>II prova</b>			
<i>stx1-2</i>	0.809	0.988	10 (2/3)
<i>eae</i>	0.964	0.998	10 (2/3)
<b>7500 Real-Time PCR System</b>			
<b>I prova</b>			
<i>stx1-2</i>	0.916	0.996	1 (1/3)
<i>eae</i>	0.963	0.999	1 (1/3)
<b>II prova</b>			
<i>stx1-2</i>	0.925	0.999	10 (2/3)
<i>eae</i>	0.969	0.999	10 (2/3)
<b>III prova</b>			
<i>stx1-2</i>	1.057	0.998	10 (2/3)
<i>eae</i>	1.026	0.998	10 (2/3)

\* LOD: Limit of detection.

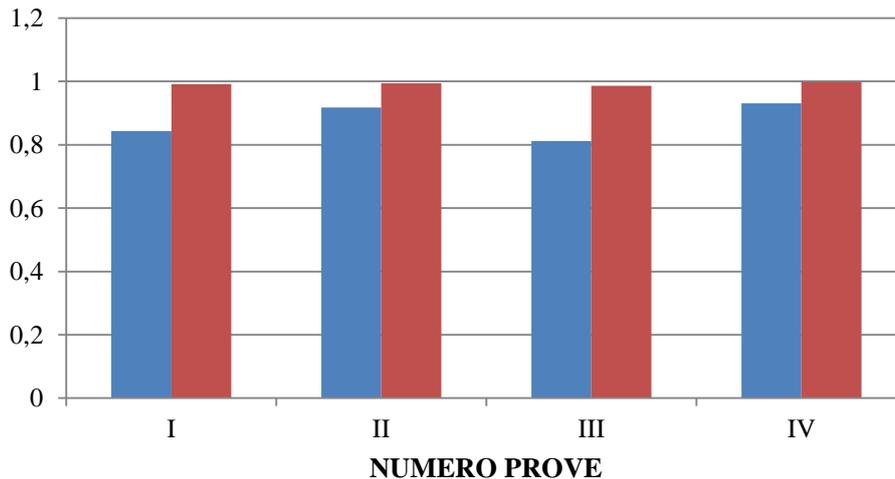
**Tab. 60:** Risultati delle prove di trasferibilità del metodo per l'identificazione di EAggEC. I termociclatori utilizzati sono stati: 7500 Real-Time PCR System, Rotor Gene Q e RotorGene 6000.

	<b>EFFICIENZA</b>	<b>R<sup>2</sup></b>	<b>LOD*</b>
<b>RotorGene 6000</b>			
<i>aggR</i>	0.987	0.995	10 (3/3)
<i>aaiC</i>	0.966	0.998	10 (2/3)
<b>RotorGene Q</b>			
<i>aggR</i>	0.894	0.998	10 (2/3)
<i>aaiC</i>	0.839	0.994	10 (2/3)
<b>7500 Real-Time PCR System</b>			
<i>aggR</i>	0.832	0.998	10 (2/3)
<i>aaiC</i>	0.861	0.994	10 (3/3)

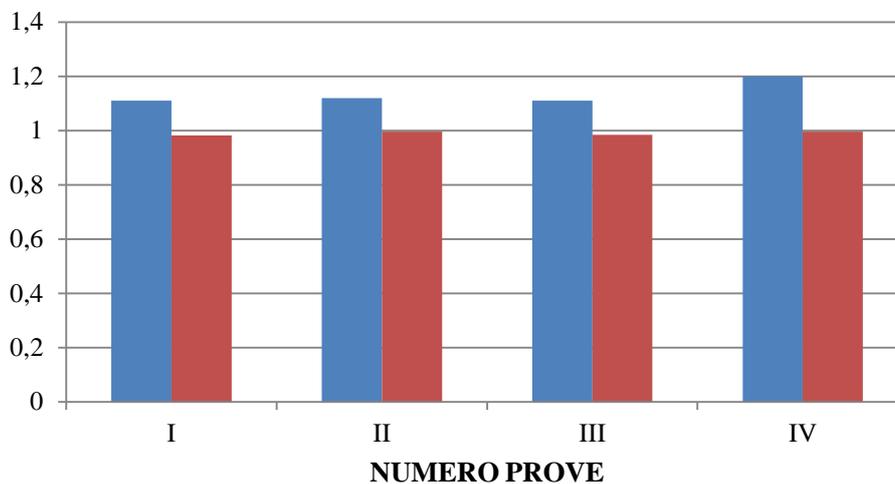
\* LOD: Limit of detection.

## PERFORMANCE E STABILITA' DEI SAGGI PER L'IDENTIFICAZIONE DI STEC E DEI SIEROGRUPPI

Le prove di performance e stabilità dei saggi per l'identificazione di STEC e dei sierogruppi sono state eseguite per un periodo di tempo di un mese utilizzando il termociclatore 7500 Real-Time PCR System. I risultati relativi alle prove per il kit STEC sono riportati nelle Figure 13 e 14:



**Fig. 13:** Stabilità dell'efficienza di amplificazione e dell'R<sup>2</sup> relative all'amplificazione del target *stx*. Test in bulk. Blu: efficienza; Porpora: R<sup>2</sup>.

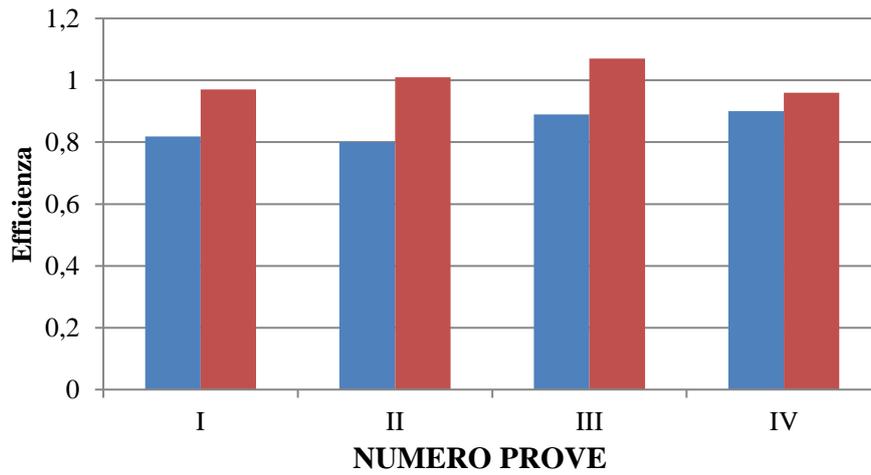


**Fig. 14:** Stabilità dell'efficienza di amplificazione e dell'R<sup>2</sup> relative all'amplificazione del target *eae*. Test in bulk. Blu: efficienza; Porpora: R<sup>2</sup>.

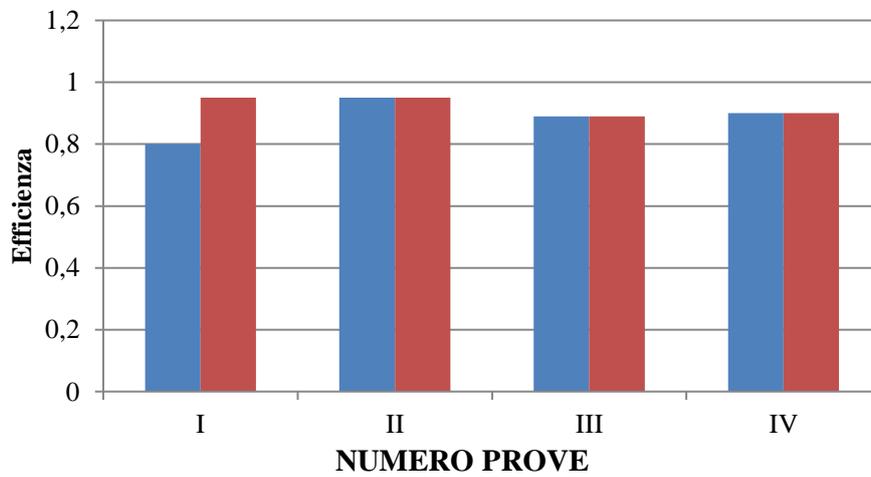
I risultati mostrano una buona stabilità nel tempo della mix del saggio per l'identificazione di STEC, per entrambi i target.

I risultati delle prove di stabilità eseguite sui saggi per i sierogruppi sono riportati nelle Figure 15-16.

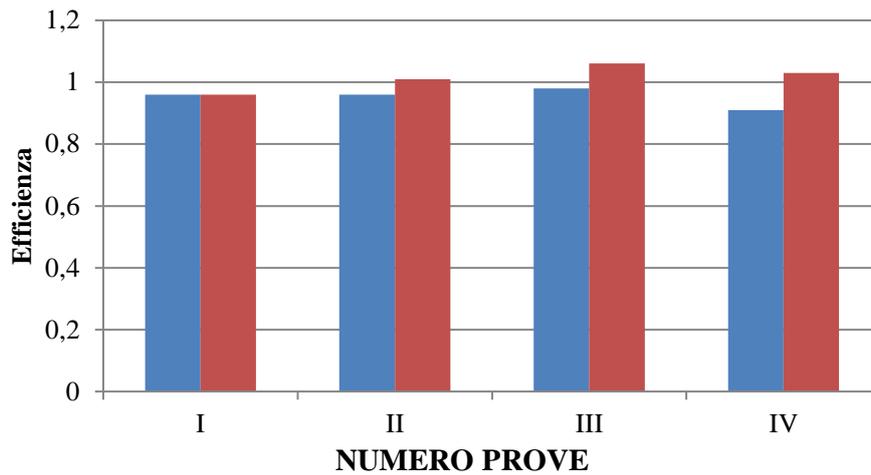
15a



15b

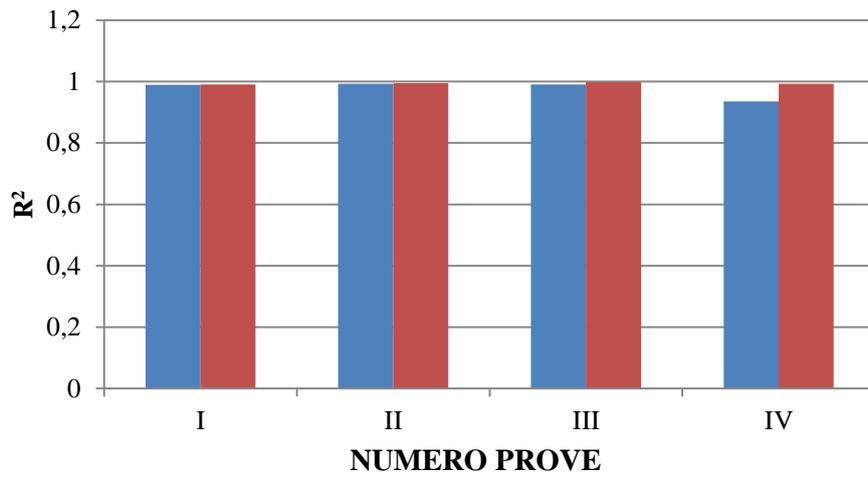


15c

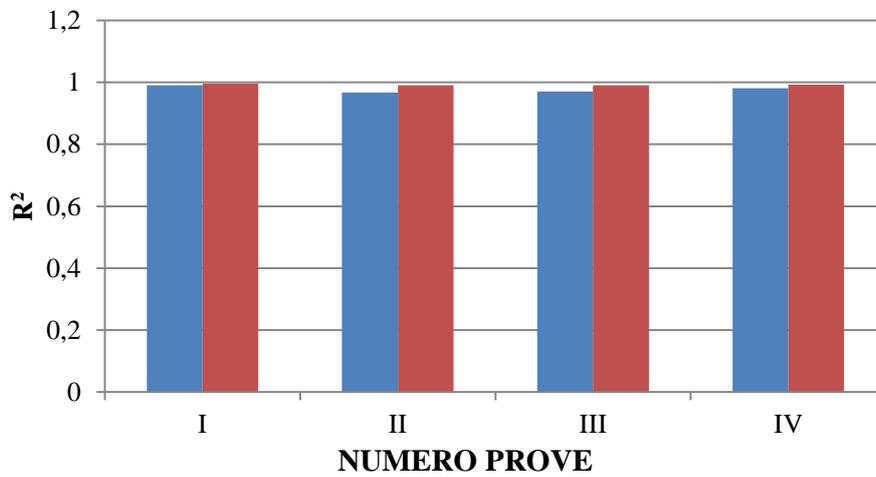


**Figura 15:** Stabilità dell'efficienza di amplificazione dei saggi O26-O103 (15a; O26 in blu, O103 in rosso); O157-O111 (15b; O157 in blu, O111 in rosso); O145-O104 (15c; O145 in blu, O104 in rosso). Test in bulk.

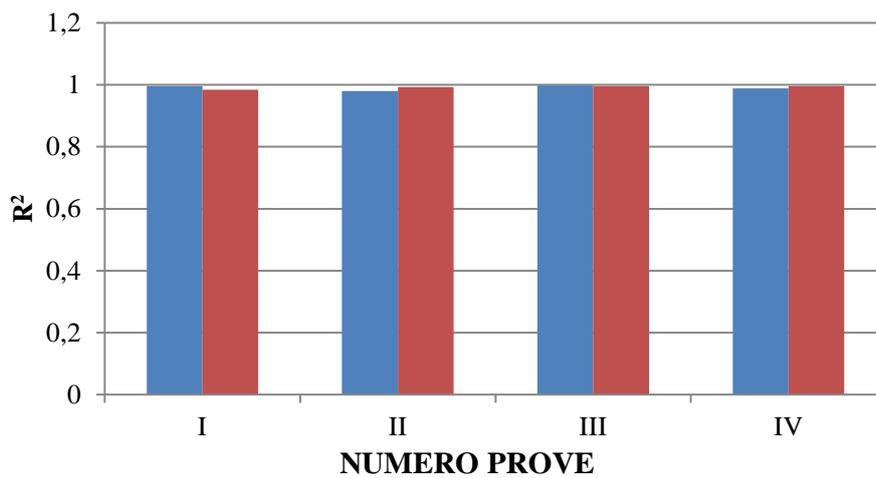
16a



16b



16c



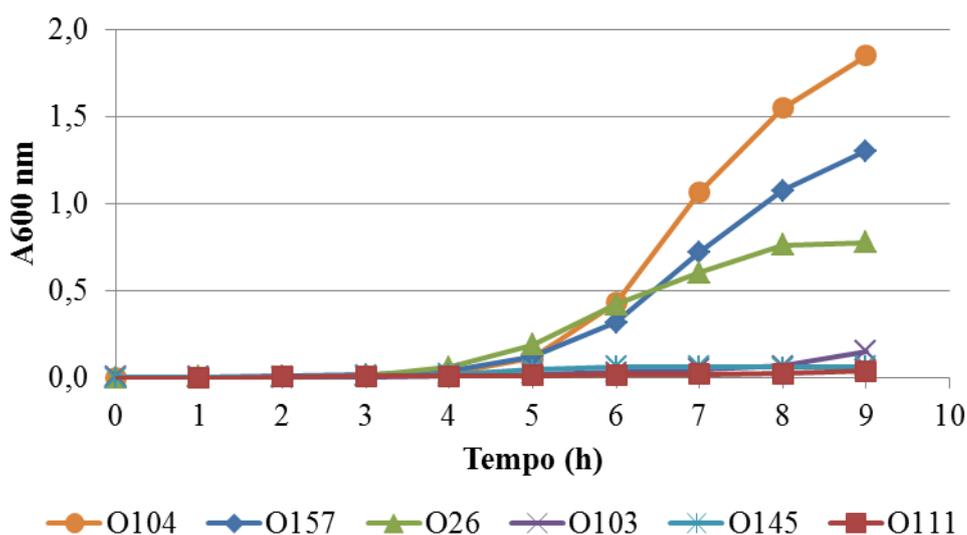
**Figura 16:** Stabilità dell' $R^2$  dei saggi O26-O103 (16a; O26 in blu, O103 in rosso); O157-O111 (16b; O157 in blu, O111 in rosso); O145-O104 (16c; O145 in blu, O104 in rosso). Test in bulk.

Le prove eseguite mostrano una buona stabilità dei saggi, con valori di efficienza che rientrano sempre nel range di accettabilità e costanti nel tempo.

## VALUTAZIONE DEI TERRENI DI ARRICCHIMENTO

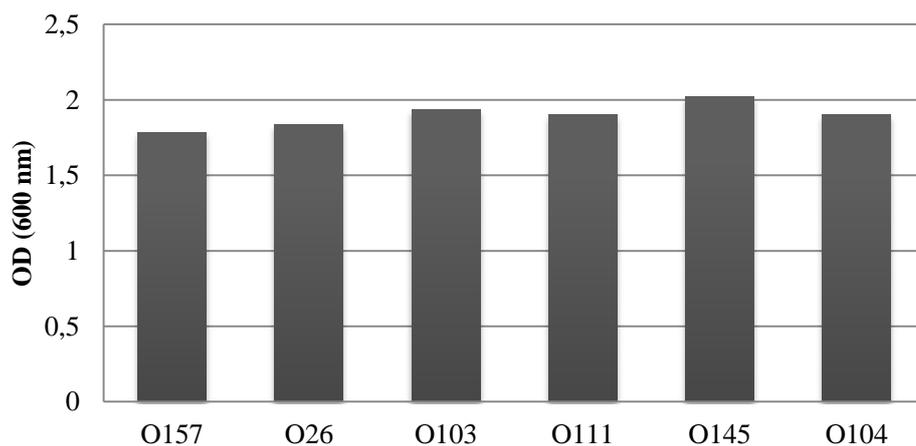
### Crescita dei sierogruppi target nei principali terreni di arricchimento per STEC

In una prima fase i ceppi di *E. coli* O157-O26-O103-O111-O145-O104 sono stati fatti crescere in terreno mTSB + Novobiocina 16 mg/L. Dall'analisi dei risultati (Figura 17) si riscontra che i sierogruppi O111, O103 ed O145 subivano un forte effetto inibitorio e la moltiplicazione batterica veniva ritardata per tutta la durata del monitoraggio. Diversamente, O104 cresceva in maniera ottimale in questo arricchimento ed anche O157 ed O26 non presentavano particolari ritardi.



**Fig. 17:** Crescita dei sierogruppi O26-O103-O111-O145-O157-O104 in mTSB +N<sub>16</sub>.

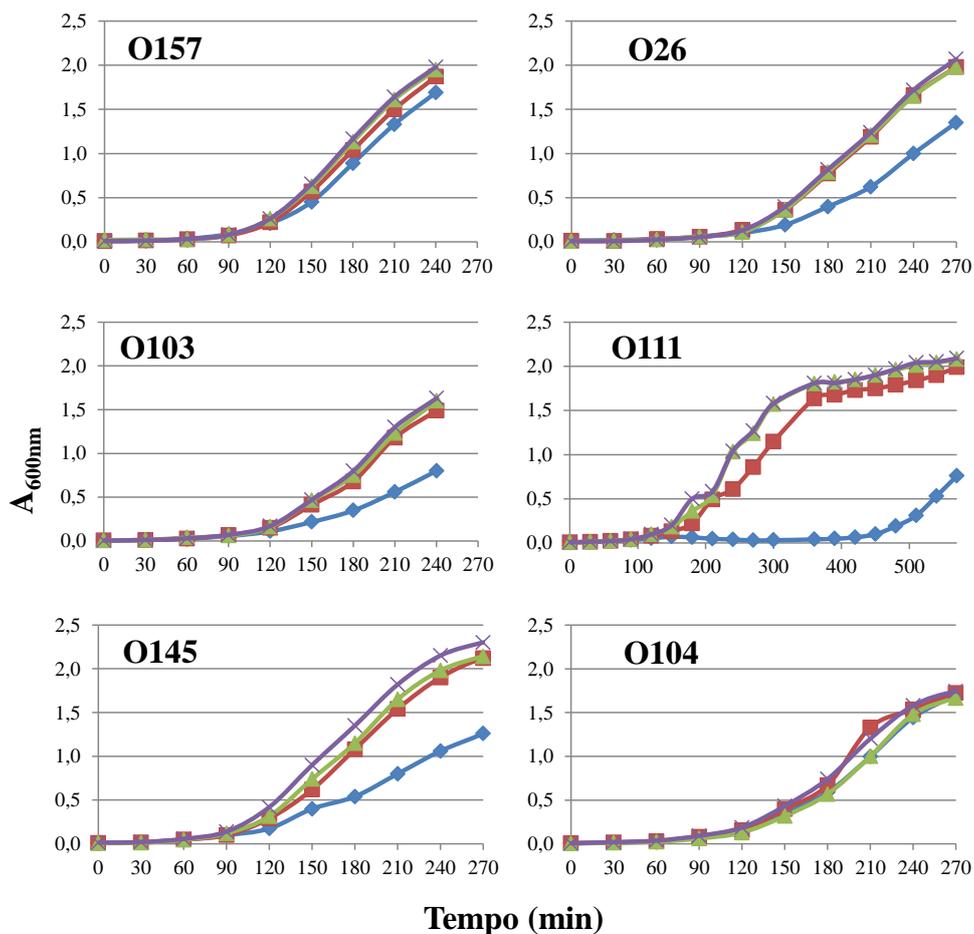
L'assorbanza delle stesse brodocolture dopo crescita per 24 h evidenziava che, nonostante una fase di latenza più prolungata per O103, O145 ed O111, tutti i ceppi riprendevano la crescita arrivando a plateau con valori di assorbanza simili tra di loro (Figura 18).



**Fig. 18:** Assorbanza delle brodocolture dei sierogruppi target dopo crescita per 24 h in mTSB+N<sub>16</sub>.

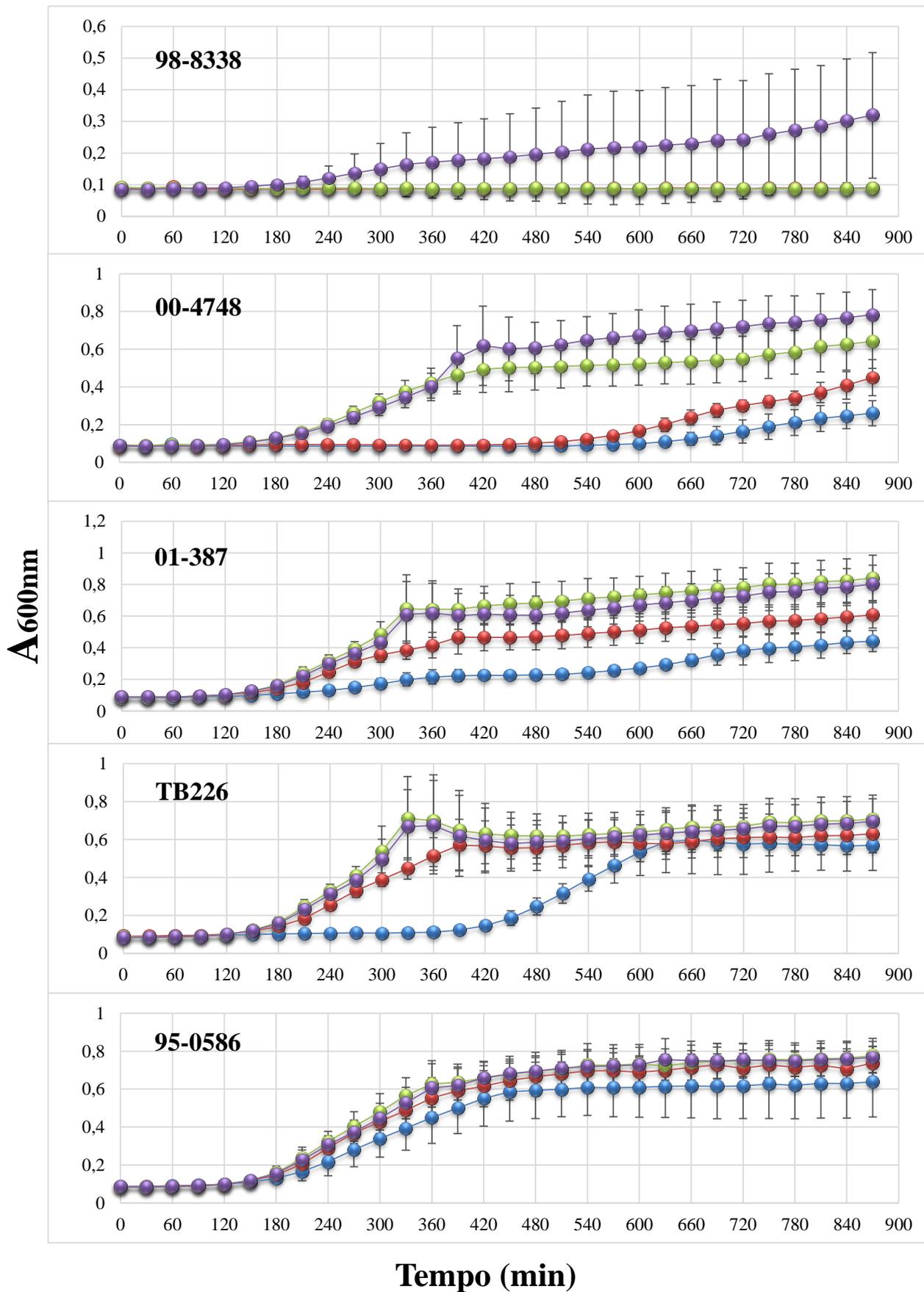
Ipotizzando un effetto di inibizione della novobiocina, la concentrazione della stessa in terreno mTSB è stata ridotta in maniera scalare (16-8-2-0 mg/L) e sono state valutate le crescite degli stessi ceppi appartenenti ai sei sierogruppi target in tali condizioni.

Dall'analisi delle curve di crescita (Figura 19) si riscontra che la riduzione della concentrazione, o l'assenza, della novobiocina determinava una conseguente riduzione o soppressione dell'effetto inibitorio, in particolare per il sierogruppo O111. Solo il sierogruppo O157 non ha risentito della presenza della novobiocina per tutte le concentrazioni di antibiotico utilizzate.



**Fig. 19:** Effetto del terreno mTSB+N<sub>0-16</sub> sulla crescita di STEC O157-O26-O103-O145-O111-O104.  
 N<sub>16</sub>, rombo; N<sub>8</sub>, quadrato; N<sub>2</sub>, triangolo; N<sub>0</sub>, x.

Le curve di crescita di cinque ceppi della collezione di laboratorio dell'USDA, appartenenti al sierogruppo O111, evidenziavano una differente sensibilità a tale antibiotico. Nello specifico, il ceppo 98\_8338 si era dimostrato particolarmente sensibile, subendo una forte azione inibente già alla concentrazione di 2 mg/L. Il ceppo 00\_4748 subiva una inibizione di crescita alle concentrazioni più elevate, con un effetto dose-dipendente. Lo stesso effetto, anche se meno marcato, si notava anche per lo 01\_387. Il ceppo TB\_226 risultava sensibile solo alla concentrazione 16 mg/L, anche se dopo 10 h di crescita raggiungeva i livelli delle altre condizioni, mentre il ceppo 95\_0586 cresceva sempre in maniera ottimale, dimostrandosi il più resistente (Figura 20).

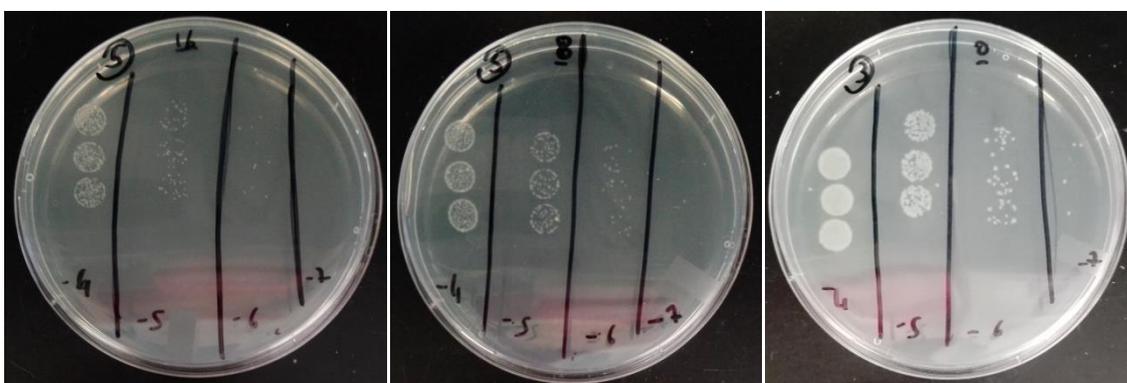


**Fig. 20:** Effetto del terreno mTSB +  $N_{0-16}$  sui ceppi O111 98-8338, 00-4748, 01-387, TB226, 95-0586  
 $N_{16}$ , blu;  $N_8$ , rosso;  $N_2$ , verde;  $N_0$ , viola.

La conta delle colonie, eseguita sulle diluizioni decimali a partire dalle crescite overnight utilizzando il protocollo indicato da Chen et al. (2003) (Figura 21), presenta i seguenti risultati (Tabella 61) e conferma gli effetti già osservati con la lettura dell'assorbanza.

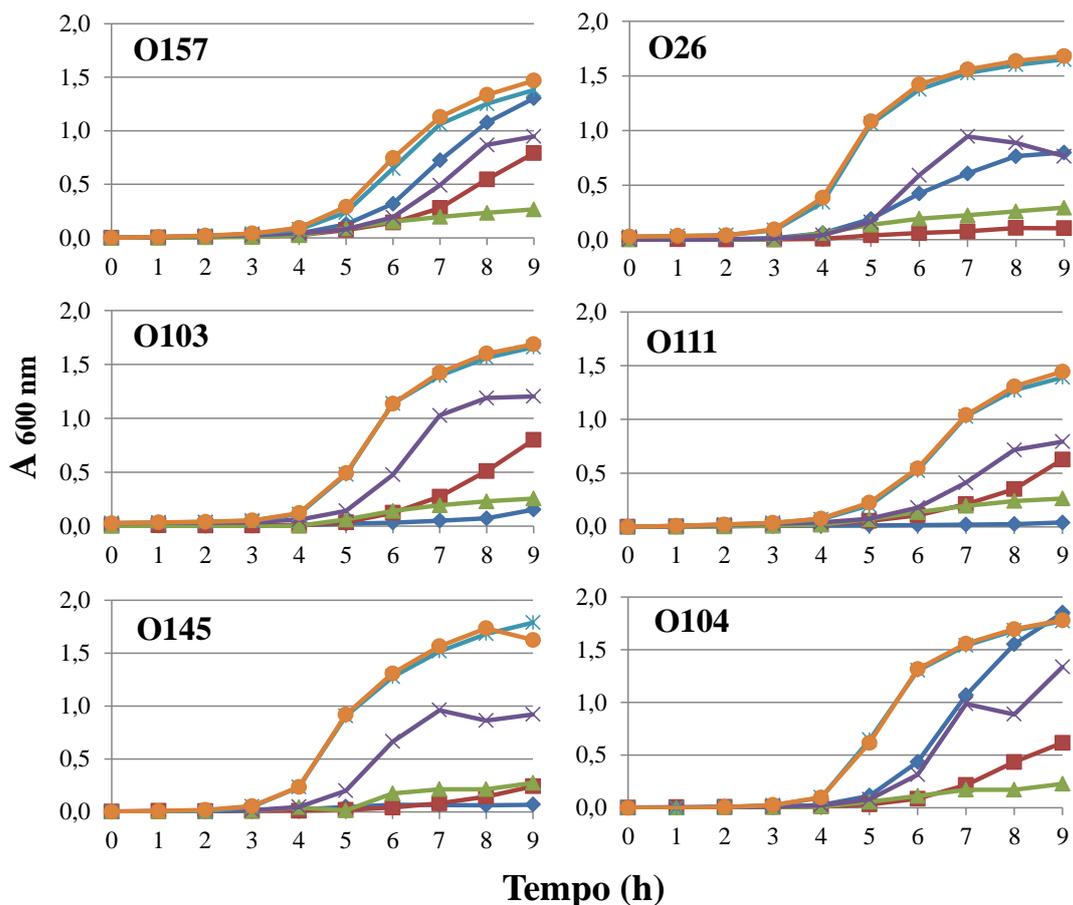
**Tab. 61:** Risultati delle conte batteriche su TSA delle crescite overnight in mTSB+N<sub>0-16</sub> dei ceppi O111 (98-8338, 00-4748, 01-387, TB226, 95-0586).

Novobiocina	Concentrazione CFU/ml				
	98-8338	00-4748	01-387	TB226	95-0586
16mg/l	-	3.20 x 10 <sup>8</sup>	4.55 x 10 <sup>8</sup>	0.97 x 10 <sup>8</sup>	3.56 x 10 <sup>8</sup>
8 mg/l	-	2.25 x 10 <sup>8</sup>	6.01 x 10 <sup>8</sup>	1.30 x 10 <sup>8</sup>	9.46 x 10 <sup>8</sup>
2 mg/l	-	1.35 x 10 <sup>8</sup>	10.5 x 10 <sup>8</sup>	1.84 x 10 <sup>8</sup>	6.75 x 10 <sup>8</sup>
0 mg/l	5.31 x 10 <sup>8</sup>	6.73 x 10 <sup>8</sup>	11.7 x 10 <sup>8</sup>	2.24 x 10 <sup>8</sup>	7.35 x 10 <sup>8</sup>



**Fig. 21:** Esempio di crescite batteriche di diluizioni decimali utilizzando il protocollo 6x6. In figura vengono riportate le conte delle colonie cresciute in mTSB con novobiocina 16-8-0 mg/L, rispettivamente.

Successivamente sono stati testati ulteriori arricchimenti: BPW ed mTSB + A<sub>12</sub>, indicati nella norma ISO 13136:2012; mBPWp + ACV indicato nella norma FDA/BAM; mBPWp + CV suggerito da Weagant et al. (2011). Dall'analisi dei grafici (Figura 22) si evince che l'arricchimento BPW produce il minor tasso di crescita per tutti e sei i sierogruppi: le letture di OD non superano il valore 1 e le curve di crescita non presentano una chiara fase logaritmica. L'arricchimento mBPWp + ACV permette una buona crescita dei vari ceppi anche se non ottimale; lo stesso medium, ma senza acriflavina, sia in condizioni di crescita statica che in agitazione, fornisce invece le condizioni migliori ed i maggiori livelli di assorbanza per tutti i sierogruppi.



**Fig. 22:** Confronto delle crescite dei ceppi O157-O26-O103-O111-O145-O104 in diversi media di arricchimento.

mTSB + N<sub>16</sub>, quadrato blu; mTSB + A<sub>12</sub>, quadrato porpora; BPW, triangolo verde; mBPWp + ACV, x viola; mBPWp + CV statico, x blu; mBPWp + CV in agitazione, cerchio arancione.

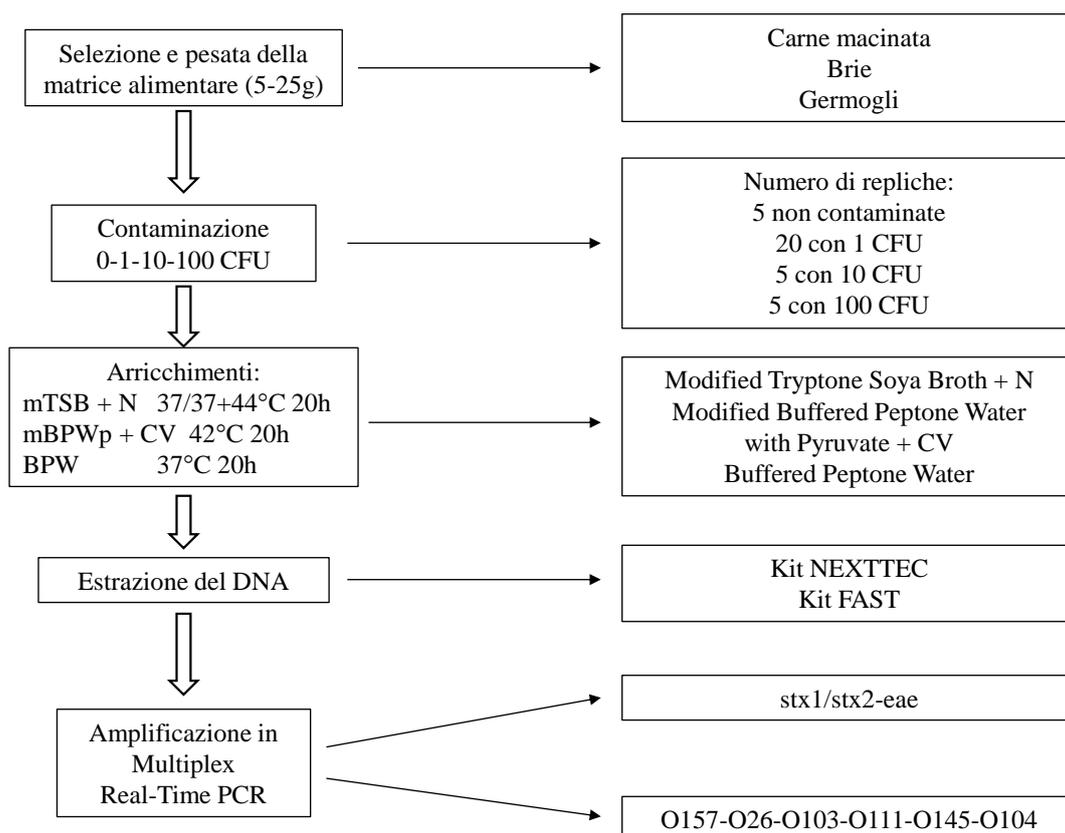
L'analisi delle stesse brodocolture dopo 24 h di incubazione (Tabella 62) evidenzia una ripresa della crescita in quasi tutte le condizioni, tranne per BPW dove si registra una bassa crescita microbica per tutti i sierogruppi, con valori di OD che non superano 0.4. Un lieve effetto di inibizione sulla crescita di O26 ed O111 si rileva infine per il terreno mBPWp+ACV.

**Tab. 62:** Crescite overnight dei sei sierogruppi con arricchimento mTSB + N, BPW, mBPWp + ACV, mBPWp + CV.

Sierogruppo	mTSB+N <sub>16</sub>	mTSB+A <sub>12</sub>	BPW	mBPWp+ACV	mBPWp+CV statico	mBPWp+CV dinamico
O157	1.786	1.918	0.366	1.013	1.744	1.841
O26	1.838	1.002	0.423	0.620	1.775	1.830
O103	1.934	1.821	0.420	1.305	1.840	1.923
O111	1.905	1.947	0.346	0.553	1.600	1.607
O145	2.024	1.848	0.360	0.927	1.977	2.066
O104	1.903	1.865	0.398	1.431	2.089	1.921

## TEST DI FUNZIONALITA' SU MATRICI ALIMENTARI ARTIFICIALMENTE CONTAMINATE

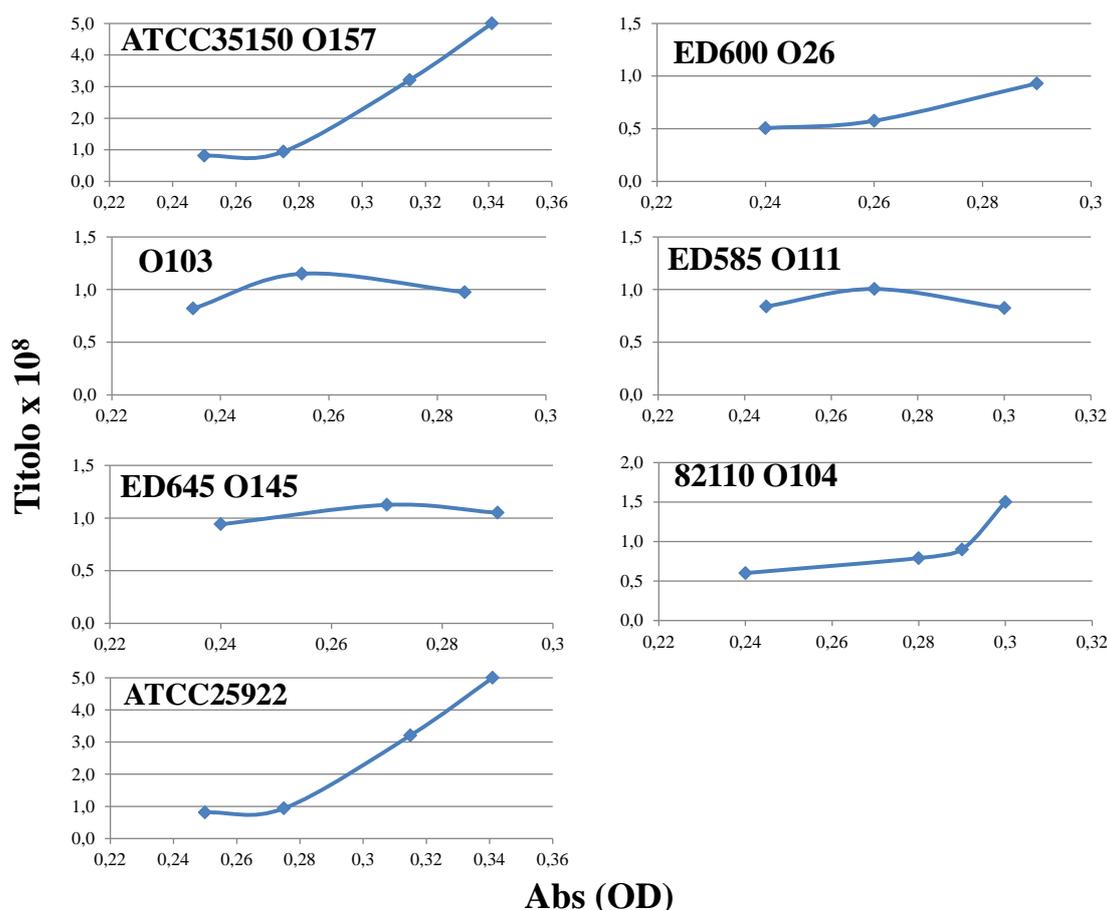
Le prove di funzionalità hanno interessato diverse matrici alimentari (brie, carne macinata e germogli) contaminate artificialmente con i ceppi positivi per i geni target, e gli estarti di DNA sono stati amplificati in real-time PCR utilizzando i saggi molecolari sviluppati durante questo studio. In Figura 23 viene riportato lo schema riassuntivo delle fasi eseguite per la realizzazione del test.



**Fig. 23:** Schema riassuntivo delle prove di contaminazione delle matrici alimentari.

### Titolazione dei ceppi batterici

I ceppi ATCC25922, ATCC35150 (O157), ED600 (O26), ED585 (O111), O103, ED645 (O145) ed SSI 82110 (O104), sono stati fatti crescere in TSB e, a differenti punti di OD, sono stati diluiti e piastrati su TSA al fine di individuare il valore corrispondente ad una concentrazione batterica di  $1 \times 10^8$  CFU/ml. In Figura 24 sono riportati i valori di OD e le rispettive concentrazioni batteriche. Dall'analisi del numero delle colonie cresciute sono stati individuati i seguenti valori di assorbanza: OD 0.27 per ATCC25922, O157 e O103; 0.29 per O26 e O145 e O104; 0.28 per O111.



**Fig. 24:** Prove di titolazione, eseguita sui sierogruppi O157-O26-O111-O103-O145-O104, per individuare il valore di OD ottimale per le prove di contaminazione.

I valori di assorbanza selezionati sono stati utilizzati per le successive prove di contaminazione degli alimenti. In Tabella 63 vengono riportati i titoli batterici reali utilizzati per le prove di funzionalità sulle tre diverse matrici alimentari.

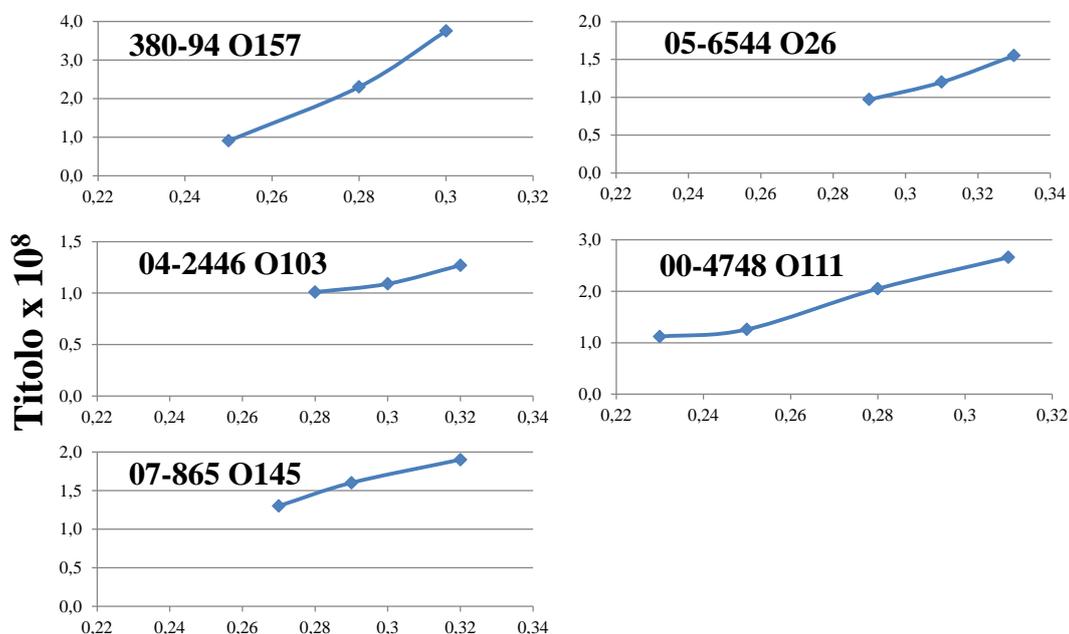
**Tab. 63:** Titolo batterico ottenuto durante le prove di contaminazione artificiale delle matrici alimentari per i test di funzionalità.

Ceppo	Sierogr.	OD <sub>600</sub>	Titolo reale (10 <sup>8</sup> CFU/ml) ±DS*	Livello cont. CFU	Livello cont. atteso CFU
ATCC25922	O6	0.270	0.70±0.28	~70	100
ATCC35150	O157	0.280	1.03±0.35	~1.03-10.3-100	1-10-100
ED600	O26	0.291	0.89±0.02	~0.89-8.90-89	1-10-100
O103	O103	0.275	1.08±0.31	~1.08-10.8-108	1-10-100
ED585	O111	0.282	0.90±0.16	~0.90-9.0-90	1-10-100
ED645	O145	0.290	0.84±0.12	~0.84-8.4-84	1-10-100
SSI 82110	O104	0.290	0.82±0.08	~0.82-8.2-82	1-10-100

\*Concentrazione reale delle sospensioni batteriche utilizzate per le contaminazioni degli alimenti (titolo atteso: 1x10<sup>8</sup> CFU/ml)

I ceppi 380-94 (O157), 05-6544 (O26), 04-2446 (O103), 00-4748 (O111), ed 07-865 (O145), presenti nella collezione di laboratorio dell'USDA, sono stati analizzati per

individuare valori di OD ottimali per le prove di contaminazione, come descritto precedentemente. Dall'analisi dei risultati (Figura 25) sono stati selezionati i seguenti valori di assorbanza: OD 0.26 per O157; 0.29 per O26; 0.28 per O103; 0.23 per O111; 0.27 per O145.



### Abs (OD)

**Fig. 25:** Prove di titolazione, eseguita sui sierogruppi O157-O26-O111-O103-O145 (USDA), per individuare il valore di OD ottimale per le prove di contaminazione.

I valori di assorbanza individuati sono stati utilizzati per le successive prove di contaminazione degli alimenti. In Tabella 64 viene riportato il titolo batterico reale, con la relativa DS, utilizzati per le prove di funzionalità sulle diverse matrici alimentari.

**Tab. 64:** Titolo batterico utilizzato per le prove di contaminazione su matrici alimentari eseguito presso l'USDA.

Ceppo	Sierogr.	OD <sub>600</sub>	Titolo reale (10 <sup>8</sup> CFU/ml) ±DS*	Livello cont. CFU	Livello cont. atteso CFU
380-94	O157	0.26	0.99±0.25	~0.9-9.9-99	10
05-6544	O26	0.29	0.92±0.34	~0.9-9.2-92	10
04-2446	O103	0.28	0.97±0.19	~0.9-9.7-97	10
00-4748	O111	0.23	1.06±0.29	~1.0-10.6-106	10
07-865	O145	0.27	0.84±0.57	~0.84-8.4-84	10

\*Concentrazione reale delle sospensioni batteriche utilizzate per le contaminazioni degli alimenti (titolo atteso: 1x10<sup>8</sup> CFU/ml)

Anche il saggio per l'identificazione di EAggEC è stato testato su campioni di germogli artificialmente contaminati e, in Tabella 65, viene riportato il titolo batterico utilizzato.

**Tab. 65:** Titolo batterio utilizzato per le prove di contaminazione su germogli eseguito presso l'USDA.

Matrice alimentare	Ceppo	Sierogruppo	Titolo reale (10 <sup>8</sup> CFU/ml)*	Livello contaminazione CFU**
Germogli	2050	O104	0.86	8.6
	2071	O104	1.06	10.6
	3493	O104	1.40	14

\*Concentrazione reale delle sospensioni batteriche utilizzate per le contaminazioni degli alimenti (titolo atteso: 1x10<sup>8</sup> CFU/ml)

\*\* Livello di contaminazione reale delle unità campione (atteso: 10 CFU).

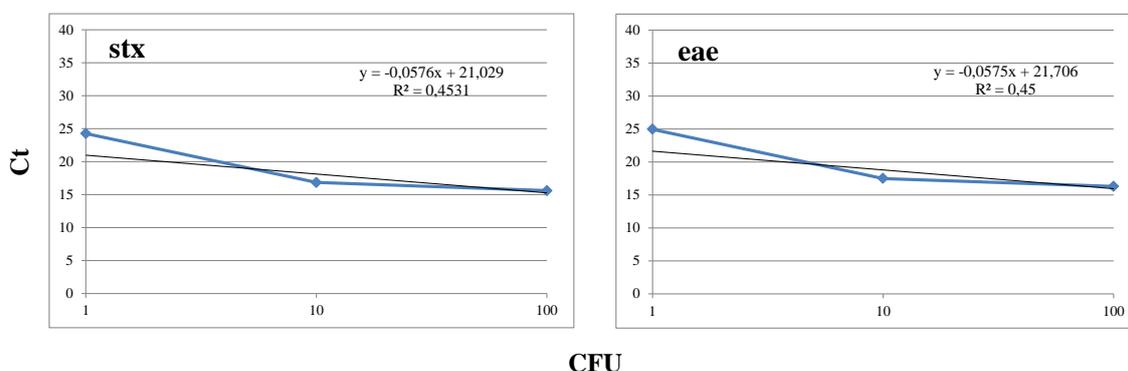
### Prove di funzionalità del saggio STEC sulla matrice alimentare brie

Campioni di formaggio brie di 5 g, contaminati con 1, 10 e 100 CFU totali, sono stati sottoposti ad arricchimento in mTSB + N<sub>16</sub> con incubazione a 37°C. Gli estratti di DNA ottenuti sono stati amplificati con il saggio per l'identificazione di STEC. Su un totale di 30 campioni i livelli 'Medium' (10 CFU) e 'High' (100 CFU) sono stati tutti correttamente rilevati, mentre per il livello 'Low' (1 CFU) solo 10 campioni su 20 sono stati amplificati, con una positività per questo livello del 50%. I controlli negativi non hanno mostrato nessun amplificato. Lo IAC è risultato sempre presente. (Tabella 66).

**Tab. 66:** Risultati del test di funzionalità per il saggio per l'identificazione di STEC su campioni di brie (5 g) artificialmente contaminata.

Target	0 CFU	1 CFU	10 CFU	100 CFU
<i>stx</i>	-	+ (10/20)	+ (5/5)	+ (5/5)
<i>eae</i>	-	+ (10/20)	+ (5/5)	+ (5/5)
IAC	+	+	+	+

Confrontando i diversi livelli di contaminazione e le medie dei Ct ottenuti si nota una mancanza di linearità tra il livello 'Low' (media Ct 24) e i due livelli 'Medium' e 'High' (media Ct 16 – media Ct 17) (Figura 26).



**Fig. 26:** Relazione tra le medie dei Ct e il titolo di contaminazione iniziale nei campioni di brie.

## Prove di funzionalità dei saggi con carne macinata

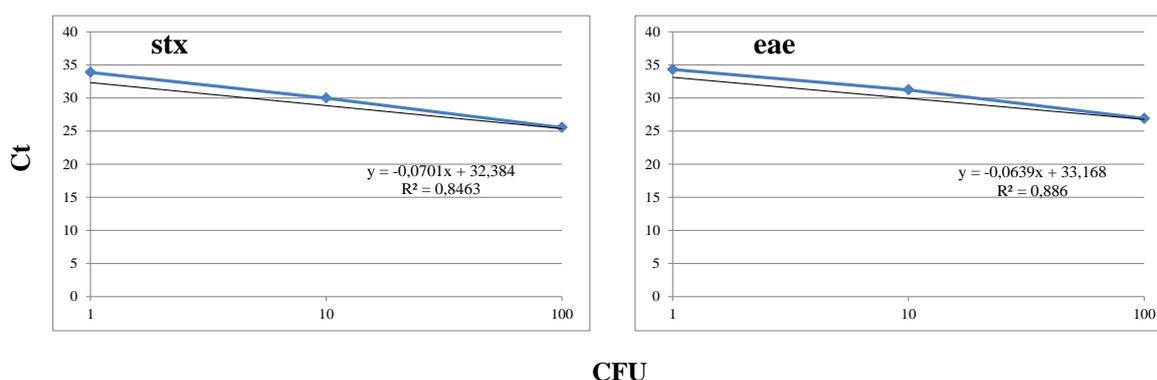
In un primo esperimento sono state impiegate unità campione di 5 g, contaminate con 1, 10 e 100 CFU totali, effettuando l'arricchimento in mTSB+N<sub>16</sub> con incubazione a 37°C.

Il DNA estratto da questi campioni è stato amplificato con il saggio per l'identificazione di STEC. Su un totale di 30 campioni è stato ottenuto il 100% di positività per i livelli di contaminazione 'Medium' (10 CFU) e 'High' (100 CFU), mentre per il livello 'Low' (1 CFU) sono stati rilevati 13/20 campioni, rappresentando il 65% delle positività (Tabella 67). I controlli negativi non hanno mostrato nessun amplificato. Lo IAC è risultato sempre presente.

**Tab. 67:** Risultati del test di funzionalità per il saggio per l'identificazione di STEC su carne macinata (5 g) artificialmente contaminata.

Target	0 CFU	1 CFU	10 CFU	100 CFU
<i>stx</i>	-	+ (13/20)	+ (5/5)	+ (5/5)
<i>eae</i>	-	+ (13/20)	+ (5/5)	+ (5/5)
IAC	+	+	+	+

Inoltre, analizzando le medie dei Ct ottenuti per ogni livello di contaminazione, si rileva un aumento del valore in relazione al titolo di partenza, più alto per il livello 'Low' (media Ct 34) e più basso per il livello 'High' (media Ct 26) (Figura 27).



**Fig. 27:** Relazione tra le medie dei Ct e il titolo di contaminazione iniziale nei campioni di carne.

In una prova successiva, in considerazione degli effetti di inibizione sulla crescita del sierogruppo O111 da parte della novobiocina, campioni di 5 g di carne macinata sono stati contaminati con il ceppo O111 ED585 (10 CFU, 3 repliche; e 100 CFU, 2 repliche) e sottoposti ad arricchimento con mTSB+N<sub>0-16</sub>. In questo esperimento sono state valutate inoltre due diverse condizioni di incubazione: 37°C oppure 37°C per 5 h

seguito da 44°C. Gli estratti di DNA, amplificati con il saggio per l'identificazione di STEC, hanno fornito i risultati riportati in Tabella 68.

**Tab 68:** Risultati del test di funzionalità per il saggio per l'identificazione di STEC su carne macinata (5 g) artificialmente contaminata con ED585 sierogruppo O111, con due protocolli di incubazione (37°C, 37 + 42°C) e N<sub>0-16</sub>.

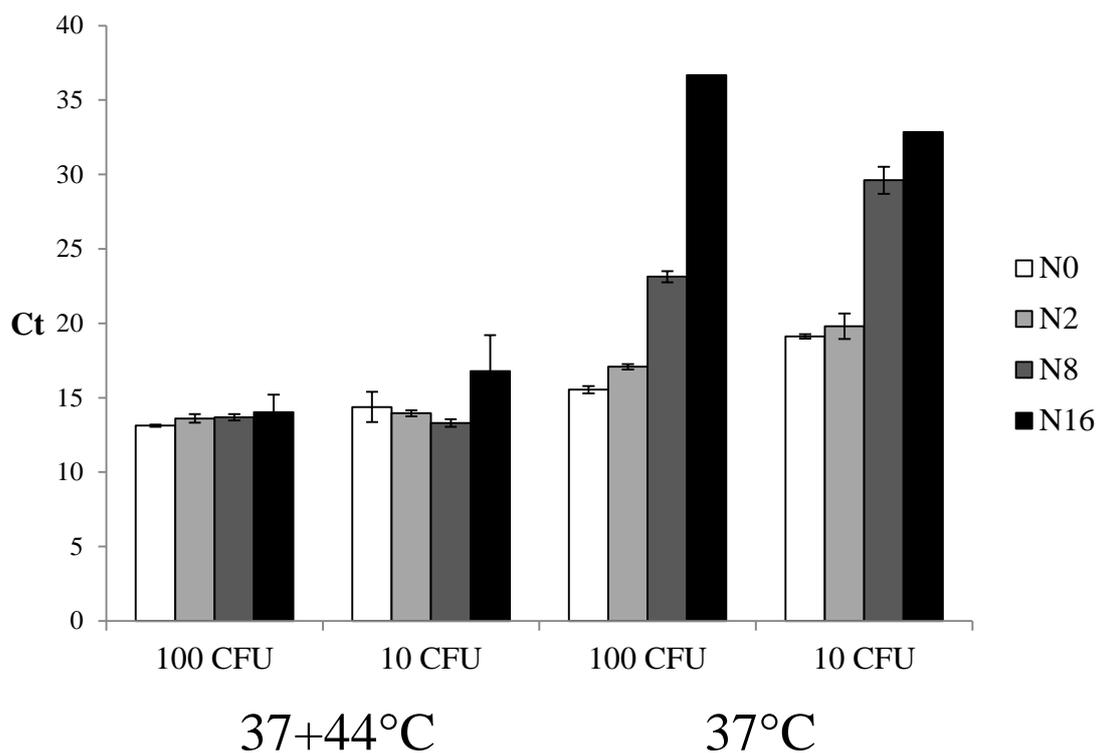
Protocollo termico 37 + 44°C			Protocollo termico 37°C		
CFU e conc. novobiocina (mg/l)	Media Ct <i>stx</i>	Media Ct <i>ee</i>	CFU e conc. novobiocina (mg/l)	Media Ct <i>stx</i>	Media Ct <i>ee</i>
100 N <sub>0</sub>	13.25	15.25	100 N <sub>0</sub>	14.65	16.98
10 N <sub>0</sub>	14.39	16.35	10 N <sub>0</sub>	18.17	20.76
100 N <sub>2</sub>	13.68	15.70	100 N <sub>2</sub>	16.06	18.60
10 N <sub>2</sub>	13.90	16.07	10 N <sub>2</sub>	18.50	21.53
100 N <sub>8</sub>	13.36	15.40	100 N <sub>8</sub>	22.02	24.40
10 N <sub>8</sub>	13.17	15.23	10 N <sub>8</sub>	27.77	30.90
100 N <sub>16</sub>	13.80	16.30	100 N <sub>16</sub>	34.21	36.39
10 N <sub>16</sub>	17.29	19.70	10 N <sub>16</sub>	33.64	36.90

Tutti i campioni sono stati correttamente amplificati, tranne una replica con 100 CFU in mTSB+N<sub>16</sub>, che è risultata positiva per *stx* ma negativa per *ee*.

Gli stessi campioni di DNA sono stati poi esaminati con il saggio per l'identificazione dei sierogruppi O111-O157. I risultati sono mostrati in Tabella 69 ed in Figura 28.

**Tab. 69:** Risultati del test di funzionalità per il saggio per l'identificazione dei sierogruppi O157-O111 su carne macinata (5 g) artificialmente contaminata con O111 (ED585), con due protocolli di incubazione (37°C, 37 + 44°C) e N<sub>0-16</sub>.

Protocollo termico 37 + 44°C		Protocollo termico 37°C	
CFU e conc. novobiocina (mg/l)	Media Ct O111	CFU e conc. novobiocina (mg/l)	Media Ct O111
100 N <sub>0</sub>	13.11	100 N <sub>0</sub>	15.54
10 N <sub>0</sub>	14.38	10 N <sub>0</sub>	19.12
100 N <sub>2</sub>	13.61	100 N <sub>2</sub>	17.08
10 N <sub>2</sub>	13.96	10 N <sub>2</sub>	19.80
100 N <sub>8</sub>	13.68	100 N <sub>8</sub>	23.13
10 N <sub>8</sub>	13.30	10 N <sub>8</sub>	29.61
100 N <sub>16</sub>	14.03	100 N <sub>16</sub>	36.67
10 N <sub>16</sub>	16.78	10 N <sub>16</sub>	32.84



**Fig. 28:** Risultati del test di funzionalità per il saggio per l'identificazione dei sierogruppi O111-O157 su carne macinata (5 g) artificialmente contaminata con O111 con due protocolli di incubazione (37°C, 37 + 44°C) e N<sub>0-16</sub>. I risultati sono espressi come medie dei Ct ± standard deviation.

Dall'analisi della Figura 29 si riscontra che tutte le repliche contaminate con i due livelli sono state correttamente amplificate quando per l'arricchimento era stato utilizzato il protocollo a due step (37+44°C), con Ct nel range 13-16. Diversamente, con il protocollo a 37°C non venivano rilevate 1/2 repliche contaminate con 100 (la stessa che era risultata negativa per *eae* con il saggio STEC) e 2/3 con 10 CFU (entrambe correttamente identificate con il saggio STEC). Inoltre questo secondo protocollo di incubazione forniva dei valori di Ct più alti (15-36) e proporzionali all'aumento della concentrazione di novobiocina. Infine il confronto dei campioni con eguali livelli di contaminazione e di concentrazione di antibiotico mostravano una significativa differenza tra i due protocolli di incubazione ( $p < 0.001$  per tutti i campioni, eccetto per 100 CFU, N<sub>0</sub>  $p < 0.01$ ).

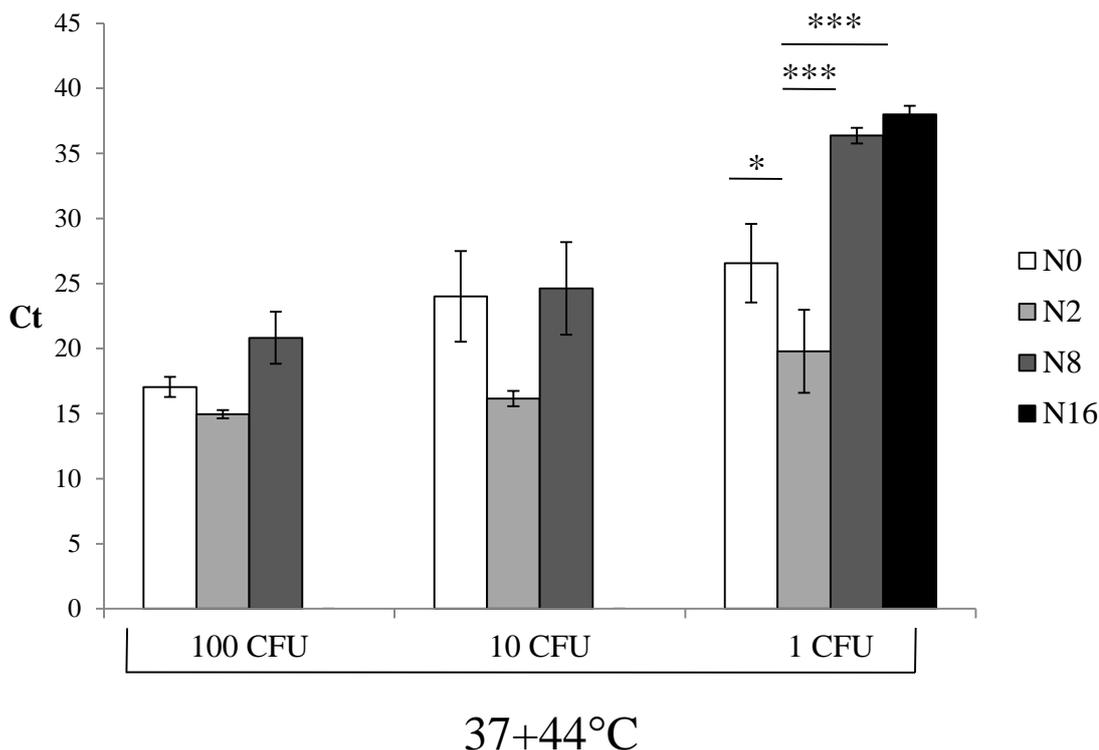
Successivamente 25 g di carne sono stati contaminati con 1-10-100 CFU del ceppo O111 (ED585) in mTSB+N<sub>0-16</sub> con incubazione a due step e amplificati utilizzando sia il saggio per l'identificazione di STEC che quello per il sierogruppo. I risultati (Tabella 70) confermano l'effetto di inibizione svolto dalla novobiocina sul ceppo di O111 utilizzato per queste prove: quando la novobiocina è alla massima concentrazione si

riscontrano alcune repliche false negative per ogni livello di contaminazione. Diminuendo a 8 mg/L la concentrazione di novobiocina, si nota che i campioni con 100 e 10 CFU risultano sempre correttamente identificati, mentre per quelli con 1 CFU si evidenzia nuovamente la presenza di alcuni falsi negativi. Infine, per le concentrazioni più basse di antibiotico, si ottengono sempre risultati positivi (tranne una replica ad 1 CFU per il target *eae*), e si rileva che, a parità di livello di contaminazione si ottengono Ct più bassi alla concentrazione di 2 mg/L.

**Tab. 70:** Risultati del test di funzionalità per i saggi per l'identificazione di STEC e di O111 su carne macinata (25 g) artificialmente contaminata con O111 (ED585) con protocollo a due step di incubazione (37 + 44°C) e N<sub>0-16</sub>.

CFU e conc. novobiocina (mg/l)	Media Ct <i>stx</i>	Rate positività	Media Ct <i>eae</i>	Rate positività	Media Ct O111	Rate positività
100 N <sub>0</sub>	17.09	2/2	19.75	2/2	17.04	2/2
10 N <sub>0</sub>	23.91	2/2	26.07	2/2	24.00	2/2
1 N <sub>0</sub>	27.74	5/5	29.10	4/5	28.70	5/5
100 N <sub>2</sub>	14.10	2/2	17.07	2/2	14.95	2/2
10 N <sub>2</sub>	15.57	2/2	19.20	2/2	16.16	2/2
1 N <sub>2</sub>	22.38	5/5	22.67	4/5	22.90	5/5
100 N <sub>8</sub>	22.44	2/2	24.94	2/2	20.80	2/2
10 N <sub>8</sub>	26.17	2/2	29.70	2/2	24.62	2/2
1 N <sub>8</sub>	36.62	2/5	37.11	1/5	36.30	2/5
100 N <sub>16</sub>	37.09	1/2	-	0/2	-	0/2
10 N <sub>16</sub>	38.14	1/2	-	0/2	-	0/2
1 N <sub>16</sub>	-	0/5	37.59	1/5	38.00	2/5

Le medie dei Ct ottenute con il saggio per i sierogruppi sono anche riportate in Figura 29, in cui si evidenziano i risultati dell'analisi statistica di significatività. Considerando in particolare i campioni contaminati con 1 CFU si nota una differenza significativa tra N<sub>2</sub> e N<sub>0</sub> ( $p < 0.05$ ) e tra N<sub>2</sub> e le altre concentrazioni di novobiocina ( $p < 0.001$ ).



**Fig. 29:** Risultati del test di funzionalità per il saggio per l'identificazione dei sierogruppi O111-O157 su carne macinata (25 g) artificialmente contaminata con O111 (ED585) e  $N_{0-16}$ . I risultati sono espressi come medie dei Ct  $\pm$  standard deviations. Analisi statistica eseguita mediante one-way ANOVA con Bonferroni test. \*( $p < 0.05$ ), \*\*\*( $p < 0.001$ ).

### Prove di funzionalità dei saggi sulla matrice germogli

Campioni di germogli di 5 g, contaminati con 1, 10, 100 e 1000 CFU totali, sono stati sottoposti ad arricchimento in mTSB +  $N_{16}$  con incubazione a 37°C. Gli estratti di DNA ottenuti sono stati amplificati con il saggio per l'identificazione di STEC. Su un totale di 35 campioni sono state ottenute 5 positività per il livello 1000 CFU, 3 per 100 CFU, mentre i campioni con 10 e 1 CFU sono risultati tutti falsi negativi (Tabella 71). Lo IAC è risultato sempre presente.

**Tab. 71:** Risultati del test di funzionalità per il saggio per l'identificazione di STEC su germogli (5 g) artificialmente contaminati con il ceppo ATCC35150.

Geni target	0 CFU	1 CFU	10 CFU	100 CFU	1000 CFU
<i>stx</i>	-	+ (0/20)	+ (0/5)	+ (3/5)	+ (5/5)
<i>eae</i>	-	+ (0/20)	+ (0/5)	+ (3/5)	+ (5/5)
IAC	+	+	+	+	+

Ulteriori prove sono state eseguite cambiando il medium di arricchimento ed aumentando la quantità di matrice a 25 g. Inizialmente i campioni di germogli

contaminati con i sierogruppi O111 (ED585), O104 (SSI 82110) ed O157 (ATCC35150) sono stati incubati nei terreni di arricchimento BPW e mBPWp + ACV. I risultati mostrano come per il sierogruppo O111 (Tabella 72) l'arricchimento BPW non sia stato efficace nel far crescere il ceppo batterico ad un livello detectabile quando presente a basse concentrazioni: 0/6 campioni positivi con 1 CFU; 1/5 con 10 CFU; 3/3 con 100 CFU. Diversamente, con arricchimento mBPWp + ACV otteniamo il 100% delle positività per i livelli di contaminazione 10-100 CFU, mentre 2/6 sono risultati positivi per 1 CFU.

**Tab. 72:** Risultati del test di funzionalità per il saggio per l'identificazione dei sierogruppi su germogli (25 g) artificialmente contaminati con ceppo O111 (ED585) in diversi media (BPW, mBPWp + ACV).

<b>Livello contaminazione</b>	<b>Ct O111 BPW</b>	<b>Ct O111 mBPWp+ACV</b>
1 CFU	-	38.00
	-	37.33
	-	-
	-	-
	-	-
	-	-
10 CFU	38.14	33.87
	-	36.60
	-	31.91
	-	31.54
	-	35.84
100 CFU	33.34	28.70
	32.86	27.64
	37.77	26.45

I campioni contaminati con il sierogruppo O104 (SSI 82110) (Tabella 73) forniscono risultati pressoché uguali a quelli ottenuti con il sierogruppo precedente: per l'arricchimento BPW, 0/6 campioni erano positivi per il livello di contaminazione 1 CFU, 2/5 per il livello 10 CFU e 3/3 per il livello 100 CFU; per l'arricchimento mBPWp + ACV, otteniamo il 100% delle positività per i due livelli di contaminazione maggiori, mentre con 1 CFU vengono amplificati 5/6 campioni.

**Tab. 73:** Risultati del test di funzionalità per il saggio per l'identificazione dei sierogruppi su germogli (25 g) artificialmente contaminati con ceppo O104 (SSI 82110) in diversi media (BPW, mBPWp + ACV).

Livello contaminazione	Ct O104	
	BPW	mBPWp+ACV
1 CFU	-	-
	-	25.55
	-	32.92
	-	31.47
	-	25.21
	-	33.37
10 CFU	37.29	27.59
	-	26.85
	37.65	22.44
	-	22.35
	-	27.58
	32.89	20.20
100 CFU	32.88	17.88
	33.50	23.03

Diversamente, le prove eseguite con il sierogruppo O157 (ATCC35150) hanno fornito risultati falsi negativi a tutti i livelli di contaminazione e per entrambi i media, fatta eccezione per un campione in BPW con livello di contaminazione 100 CFU risultato positivo ma a Ct molto elevato. Un confronto dei risultati è mostrato in Tabella 74.

**Tab. 74:** Confronto dei risultati ottenuti nei test di funzionalità con germogli contaminati con i sierogruppi O111-O104-O157 in diversi media (BPW, mBPWp + ACV).

	BPW		mBPWp+ACV	
	Rate di positività	Media Ct	Rate di positività	Media Ct
<b>O111 CFU</b>				
1	0/6	-	2/6	38.32
10	1/5	38.91	5/5	34.72
100	3/3	35.39	3/3	27.93
<b>O104 CFU</b>				
1	0/6	-	5/6	29.70
10	2/5	37.47	5/5	25.36
100	3/3	33.09	3/3	20.37
<b>O157 CFU</b>				
1	0/10	-	0/10	-
10	0/6	-	0/6	-
100	1/2	39.00	0/2	-

L'ultima serie di prove è stata effettuata utilizzando tutti i sei sierogruppi O157-O26-O103-O111-O145-O104 con l'arricchimento mBPWp + CV con incubazione a 42°C, come suggerito da Weagant et al. (2011). L'applicazione di questo protocollo ha

permesso di ottenere i migliori risultati per la matrice germogli, con un detection rate del 100% per i livelli di contaminazione 10-100 CFU, ed un range 45-80% per il livello 1 CFU, con una variabilità specifica per ogni sierogruppo (Tabella 75). Come si nota in Tabella 75, il ceppo O104 SSI 82110, utilizzato per la contaminazione dei germogli, non presentava i marker *stx* ed *eae*. La presenza dei vari ceppi appartenenti ai diversi sierogruppi è stata poi confermata in tutti i campioni mediante i relativi saggi per l'assegnazione del sierogruppo.

**Tab. 75:** Risultati dei test di funzionalità su germogli (25g) artificialmente contaminati con i sei sierogruppi in terreno mBPWp+CV a 42°C per 18-24 h.

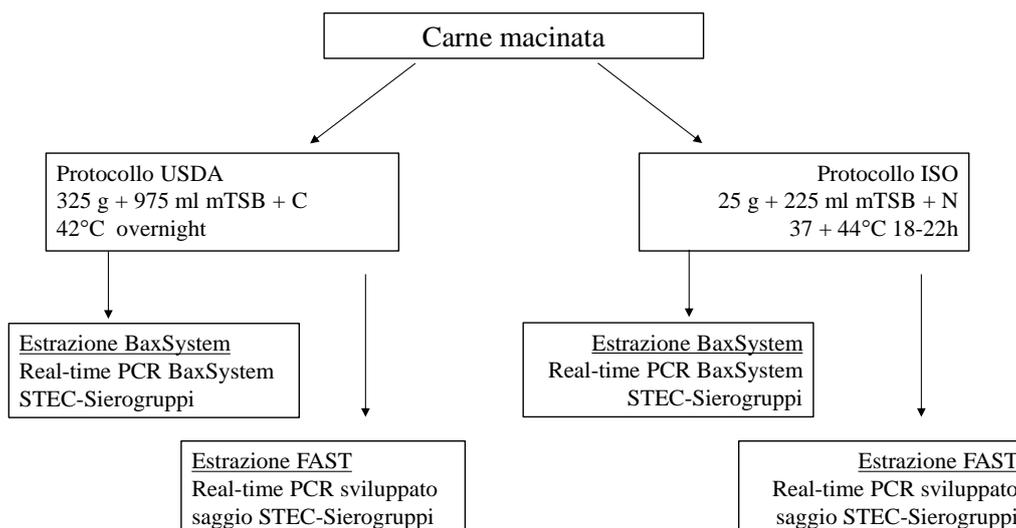
STEC sierogruppo	Livello contaminazione (CFU tot) – repliche positive/totale (%)		Media Ct ± DS		Media Ct ± DS Saggio Sierogruppi
			Saggio STEC		
			<i>stx</i>	<i>eae</i>	
O157	1 – 9/20	(45%)	35.58 ± 4.2	32.88 ± 2.3	35.18 ± 2.3
	10 – 9/10		29.98 ± 3.8	29.12 ± 3.2	31.00 ± 2.9
	100 – 2/2		28.21 ± 5.5	27.38 ± 4.6	29.24 ± 5.4
O111	1 – 15/20	(75%)	26.30 ± 0.9	26.06 ± 0.9	26.45 ± 1.1
	10 – 10/10		22.39 ± 1.1	22.05 ± 1.0	22.50 ± 0.8
	100 – 2/2		21.74 ± 2.6	21.34 ± 2.6	21.27 ± 2.4
O26	1 – 11/20	(55%)	32.88 ± 3.5	23.88 ± 3.5	25.93 ± 3.3
	10 – 10/10		22.43 ± 3.1	20.85 ± 3.1	22.86 ± 2.9
	100 – 2/2		16.36 ± 0.6	15.04 ± 0.6	17.08 ± 0.7
O103	1 – 16/20	(80%)	35.70 ± 2.3	30.76 ± 1.8	28.85 ± 1.5
	10 – 10/10		30.01 ± 1.7	25.97 ± 1.5	24.58 ± 1.2
	100 – 2/2		24.82 ± 0.3	21.02 ± 0.1	19.29 ± 0.2
O145	1 – 12/20	(60%)	27.34 ± 1.2	25.17 ± 1.0	25.34 ± 1.2
	10 – 10/10		25.97 ± 1.2	22.65 ± 1.1	22.54 ± 0.9
	100 – 2/2		21.02 ± 0.1	18.96 ± 0.3	17.96 ± 0.7
O104*	1 – 11/20	(55%)			24.09 ± 1.5
	10 – 10/10		-	-	22.17 ± 0.9
	100 – 2/2				18.32 ± 0.4

\*Ceppo SSI 82110, mancante geni *stx* ed *eae*, è stato utilizzato per la contaminazione dei germogli.

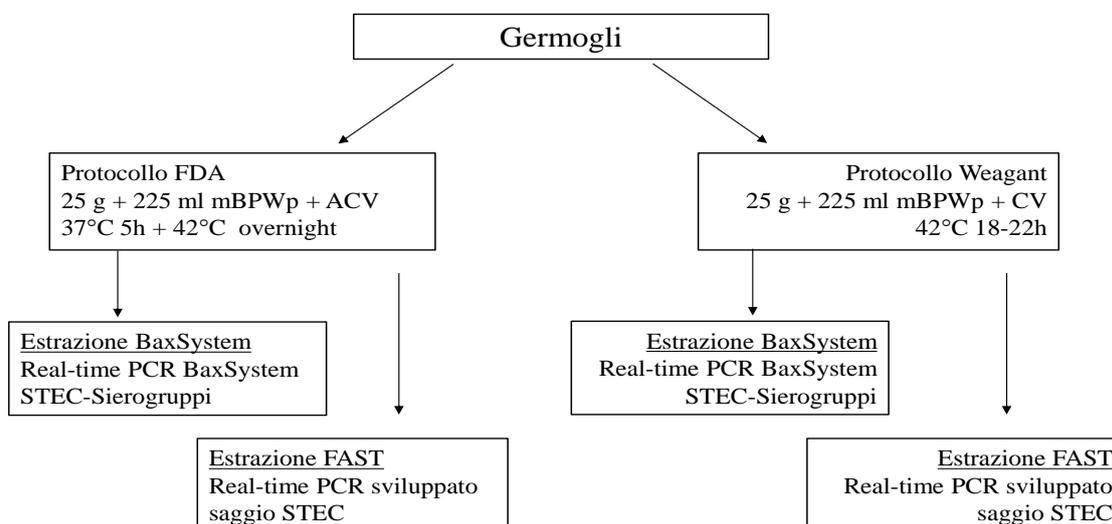
## **PROVE DI COMPARAZIONE DEI SAGGI PER L'IDENTIFICAZIONE DI STEC E SIEROGRUPPI CON I METODI IN USO PRESSO USDA**

I saggi per l'identificazione di STEC e dei sierogruppi, messi a punto durante questo studio, sono stati confrontati con i metodi utilizzati presso l'USDA, Dept. of Agriculture. Questi ultimi erano: BAX® System Real-Time PCR STEC Suite (che comprendeva un saggio per l'identificazione di STEC e due panel per i sierogruppi O26-O111-O121, O45-O103-O145); BAX® System Real-Time PCR Assay for *E. coli* O157:H7.

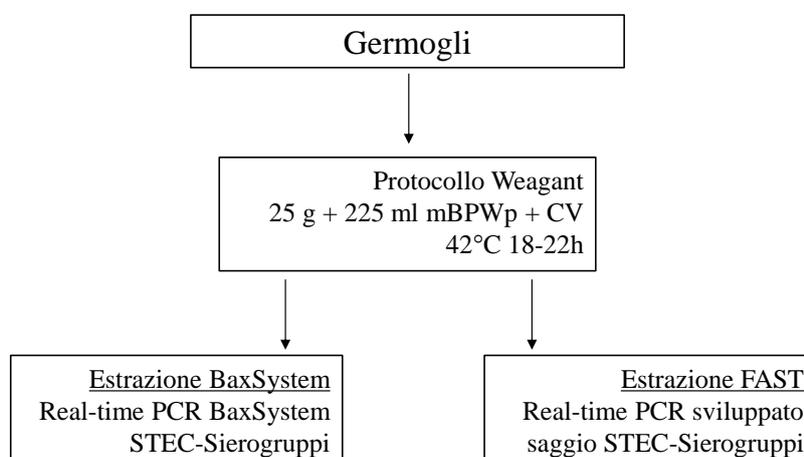
I protocolli eseguiti per le prove di contaminazione, estrazione del DNA ed amplificazione in real-time PCR utilizzando i saggi molecolari sopra menzionati sono riportati nelle Figure 30-31-32 divise per matrice alimentare.



**Fig. 30:** Schema riassuntivo delle prove di comparazione eseguite sulla matrice ‘carne macinata’ presso l’USDA.



**Fig. 31:** Schema riassuntivo delle prove di comparazione eseguite sulla matrice ‘germogli lotto’ presso l’USDA.



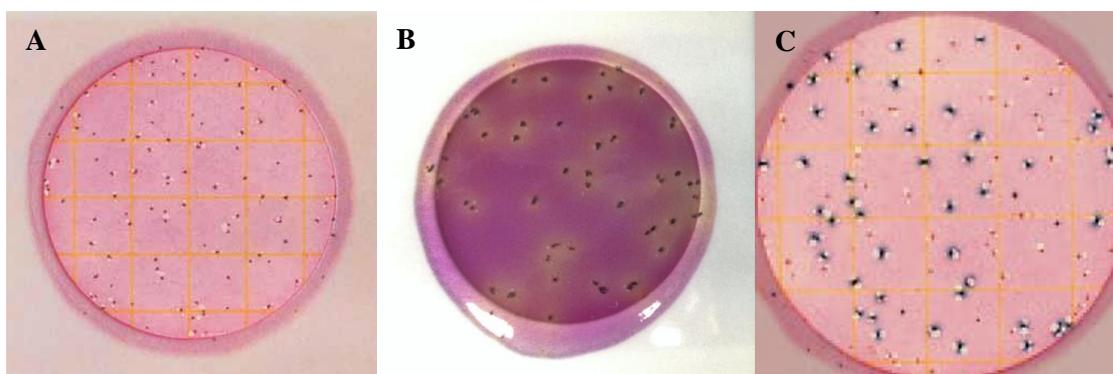
**Fig. 32:** Schema riassuntivo delle prove di comparazione eseguite sulla matrice ‘germogli lotto D’ presso l’USDA.

### Prove con campioni di carne macinata

Inizialmente è stata calcolata la quantità di flora batterica di background dei campioni di carne utilizzati per le prove di comparazione (lotto A, lotto B) (Tabella 76 e Figura 33, per un esempio di crescita batterica su piastre APC).

**Tab. 76:** Analisi della carica batterica di background della matrice “carne macinata” sui tre tipi di piastre APC.

Tipologia di terreno APC	lotto A	lotto B
<i>E.coli</i> /coliformi	$6.46 \times 10^2$ CFU/g	$7.32 \times 10^2$ CFU/g
<i>Enterobacteriaceae</i>	$4.42 \times 10^2$ CFU/g	$1.61 \times 10^2$ CFU/g
Batteri aerobi	$7.92 \times 10^4$ CFU/g	$4.19 \times 10^4$ CFU/g



**Fig. 33:** Esempi di crescita microbica sui tre tipi di piastre selettive APC.

A: Carica batterica aerobica totale; B: Conta di *Enterobacteriaceae*; C: Conta di *E. coli* (di colore blu) /Coliformi (di colore rosso).

Le concentrazioni batteriche, per i vari gruppi tassonomici, sono stati registrati nella media di quanto riscontrato in altri campioni di carne macinata (Wasilenko et al. 2014).

Le unità campione di carne, contaminate artificialmente con i ceppi selezionati, sono state processate secondo i relativi protocolli e gli estratti di DNA ottenuti sono stati amplificati in real-time PCR.

I metodi utilizzati forniscono risultati equivalenti per tutti i sierogruppi (Tabella 77), tranne per O111 con arricchimento mTSB+N<sub>16</sub> dove, con entrambi i sistemi di estrazione ed amplificazione, sono stati ottenuti risultati falsi negativi; diversamente, con arricchimento mTSB+C sono stati registrati valori medi di Ct simili utilizzando entrambi i saggi per la rilevazione dei sierogruppi, e valori inferiori utilizzando BaxSystem per l'identificazione degli STEC. I sierogruppi O157 ed O26 hanno fornito risultati simili, con valori medi di Ct leggermente inferiori per i saggi sviluppati in questo studio; viceversa non è stata riscontrata una sostanziale differenza tra i due arricchimenti utilizzati. Per il sierogruppo O145 il terreno ISO ha fornito risultati

migliori, con Ct più bassi; diversamente a parità di arricchimento non sono state registrate sostanziali differenze. Infine, per il sierogruppo O103 si ottengono i risultati migliori utilizzando l'arricchimento mTSB+N<sub>16</sub>, mentre a parità di terreni sono stati ottenuti valori medi di Ct nettamente inferiori per i saggi sviluppati durante questo studio.

**Tab. 77:** Risultati delle prove di comparazione su carne macinata artificialmente contaminata con i sierogruppi O157-O26-O111-O103-O145, utilizzando due media (mTSB+C, mTSB+N) e saggi molecolari differenti per la rilevazione di STEC e sierogruppi (BAX System Real-Time PCR STEC Suite; BAX System Panel 1; BAX System Panel 2; BAX System Real-Time PCR Assay for *E. coli* O157:H7; saggi per l'identificazione di STEC e sierogruppi sviluppati durante questo studio). I risultati sono espressi come medie dei Ct ± standard deviations.

Medium	BaxSystem			Questo studio		
	STEC		Sierogr.	STEC		Sierogr.
O157	<i>stx</i>	<i>eae</i>		<i>stx</i>	<i>eae</i>	
mTSB+C	23.8±2.5	23.4±2.5	37.0±0.8 (S) 36.9±3.5 (W)	22.5±3.3	23.75±3.5	23.9±2.9
mTSB+N	22.2±1.1	21.9±0.8	34.8±2.8 (S) 33.6±2.9 (W)	18.8±1.7	19.5±1.3	19.2±1.1
<b>O26</b>						
mTSB+C	25.8±3.9	24.9±3.9	34.4±7.0	24.3±3.8	25.4±3.9	27.75±3.0
mTSB+N	24.2±0.8	23.4±1.0	33.9±4.9	23.7±1.5	24.5±1.6	26.2±2.1
<b>O111</b>						
mTSB+C	25.75±2.0	26.5±1.7	29.6±1.7	32.4±3.2	32.7±2.4	28.3±1.8
mTSB+N	-	-	-	-	-	-
<b>O145</b>						
mTSB+C	22.4±1.2	22.5±1.2	21.8±1.3	25.5±4.3	21.0±4.0	22.5±2.8
mTSB+N	20.5±0.4	20.8±0.5	22.1±3.3	23.5±2.6	17.25±1.7	15.6±1.5
<b>O103</b>						
mTSB+C	22.3±0.9	21.9±0.8	24.7±5.3	18.3±2.4	19.8±2.4	20.6±2.6
mTSB+N	21.4±0.3	21.3±0.6	25.8±3.6	15.1±1.0	16.3±0.9	16.7±1.1

### Prove con campioni di germogli

Inizialmente è stata calcolata la quantità di flora batterica di background dei campioni di germogli utilizzati per le prove di comparazione (lotto C, lotto D). I risultati sono riportati in Tabella 78:

**Tab. 78:** Analisi della carica batterica di background della matrice germogli su tre tipi di piastre APC.

Tipologia di terreno APC	lotto C	lotto D
<i>E.coli</i> /coliformi	5.67x10 <sup>2</sup> CFU/g	7.32x10 <sup>2</sup> CFU/g
Enterobacteriaceae	4.46x10 <sup>2</sup> CFU/g	1.61x10 <sup>2</sup> CFU/g
Batteri aerobi	13.98x10 <sup>2</sup> CFU/g	41.9x10 <sup>3</sup> CFU/g

Le concentrazioni batteriche, per i vari gruppi tassonomici, sono risultati nella media di quanto riscontrato in altri lavori (Viswanathan et al., 2001; Fu et al., 2001).

Le unità campione di germogli, contaminate artificialmente con i ceppi selezionati, sono state processate secondo i relativi protocolli e gli estratti di DNA ottenuti sono stati amplificati in real-time PCR. L'arricchimento mBPWp+CV ha permesso di ottenere buoni risultati (Tabella 79) poiché tutti i campioni sono stati correttamente amplificati, con valori medi di Ct inferiori per i saggi per l'identificazione di STEC e sierogruppi sviluppati durante questo studio. Solo per il sierotipo O145 (target *stx*) sono stati rilevati valori di Ct leggermente più alti rispetto a quelli ottenuti con il saggio BaxSystem.

**Tab. 79:** Risultati delle prove di comparazione su germogli artificialmente contaminati con i sierogruppi O157-O26-O111-O103-O145, utilizzando il terreno mBPWp+CV e due saggi molecolari differenti per la rilevazione di STEC e sierogruppi (BAX System Real-Time PCR STEC Suite; BAX System Panel 1; BAX System Panel 2; BAX System Real-Time PCR Assay for *E. coli* O157:H7; saggi per l'identificazione di STEC e sierogruppi sviluppati durante questo studio). I risultati sono espressi come medie dei Ct  $\pm$  standard deviations.

Medium	BaxSystem			Questo studio		
	STEC		Sierogr.	STEC		Sierogr.
	<i>stx</i>	<i>eae</i>		<i>stx</i>	<i>eae</i>	
<b>O157</b>						
mBPWp+CV	29.0 $\pm$ 5.9	30.0 $\pm$ 2.6	36.0 $\pm$ 6.3 (S) 37.0 $\pm$ 3.0 (W)	24.1 $\pm$ 6.7	24.2 $\pm$ 5.3	25.2 $\pm$ 6.6
<b>O26</b>						
mBPWp+CV	35.2 $\pm$ 1.2	33.0 $\pm$ 1.5	28.9 $\pm$ 3.4	30.3 $\pm$ 22.0	25.9 $\pm$ 1.3	23.3 $\pm$ 4.2
<b>O111</b>						
mBPWp+CV	30.4 $\pm$ 2.5	31.1 $\pm$ 2.3	32.0 $\pm$ 1.6	26.1 $\pm$ 2.3	27.5 $\pm$ 1.9	24.0 $\pm$ 2.0
<b>O145</b>						
mBPWp+CV	26.2 $\pm$ 2.8	26.0 $\pm$ 3.0	25.8 $\pm$ 3.3	30.3 $\pm$ 6.8	20.7 $\pm$ 3.4	18.9 $\pm$ 4.0
<b>O103</b>						
mBPWp+CV	32.5 $\pm$ 1.8	32.1 $\pm$ 2.0	28.8 $\pm$ 4.5	27.3 $\pm$ 4.3	24.7 $\pm$ 2.0	22.1 $\pm$ 4.4

Inoltre, con il medium mBPWp+ACV tutti i campioni estratti ed amplificati con BaxSystem per la rilevazione di STEC e sierogruppi hanno fornito risultati falsi negativi, tranne per il sierotipo O157; diversamente, tutti i campioni estratti ed amplificati con il saggio per la rilevazione di STEC sviluppato durante questo studio sono risultati negativi per *stx* ma positivi per il target *eae*, tranne O111 (Tabella 80). Il controllo interno di amplificazione è stato sempre rilevato.

**Tab. 80:** Risultati delle prove di comparazione su germogli artificialmente contaminati con i sierogruppi O157-O26-O111-O103-O145, utilizzando l'arricchimento mBPWp+ACV e due saggi molecolari differenti per la rilevazione di STEC e sierogruppi (BAX System Real-Time PCR STEC Suite; BAX System Panel 1; BAX System Panel 2; BAX System Real-Time PCR Assay for *E. coli* O157:H7; saggio per l'identificazione di STEC sviluppato durante questo studio). I risultati sono espressi come medie dei Ct  $\pm$  standard deviations.

Medium	BaxSystem			Questo studio		
	STEC		Sierogr.	STEC		Sierogr.
	<i>stx</i>	<i>eae</i>		<i>stx</i>	<i>eae</i>	
<b>O157</b>						
mBPWp+ACV	?	?	40.2 $\pm$ 1.6 (S) 34.3 $\pm$ 0.1 (W)	-	31.1 $\pm$ 0.3	n.d.
<b>O26</b>						
mBPWp+ACV	?	?	?	-	38.8 $\pm$ 4.0	n.d.
<b>O111</b>						
mBPWp+ACV	?	?	?	-	-	n.d.
<b>O145</b>						
mBPWp+ACV	?	?	?	-	31.2 $\pm$ 0.7	n.d.
<b>O103</b>						
mBPWp+ACV	?	?	?	-	36.8 $\pm$ 2.6	n.d.

n.d., non determinato; “?”:campioni dubbi

Al fine di comprendere le cause dei risultati falsi negativi, due campioni da arricchimento mBPWp+ACV e due campioni precedentemente estratti con BaxSystem (O26 e O157) sono stati estratti con il PrepSeqRapid Spin DNA extraction kit (Life-Technologies-Thermo Fisher) ed amplificati in real-time PCR. In questo caso i campioni sono stati correttamente amplificati, dimostrando la presenza dei target all'interno degli arricchimenti (Tabella 81).

**Tab.81:** Risultati delle prove di germogli contaminati con O26-O157 in terreno mBPWp+ACV, estratti utilizzando il PrepSeqRapid Spin DNA extraction kit ed amplificati con set di primer e probe in uso presso l'USDA.

	USDA in house	
	<i>stx</i>	<i>eae</i>
<b>O157</b>		
brodocoltura	31.9	32.9
doppia estrazione	37.0	37.9
<b>O26</b>		
brodocoltura	36.1	37.8
doppia estrazione	38.9	40.9

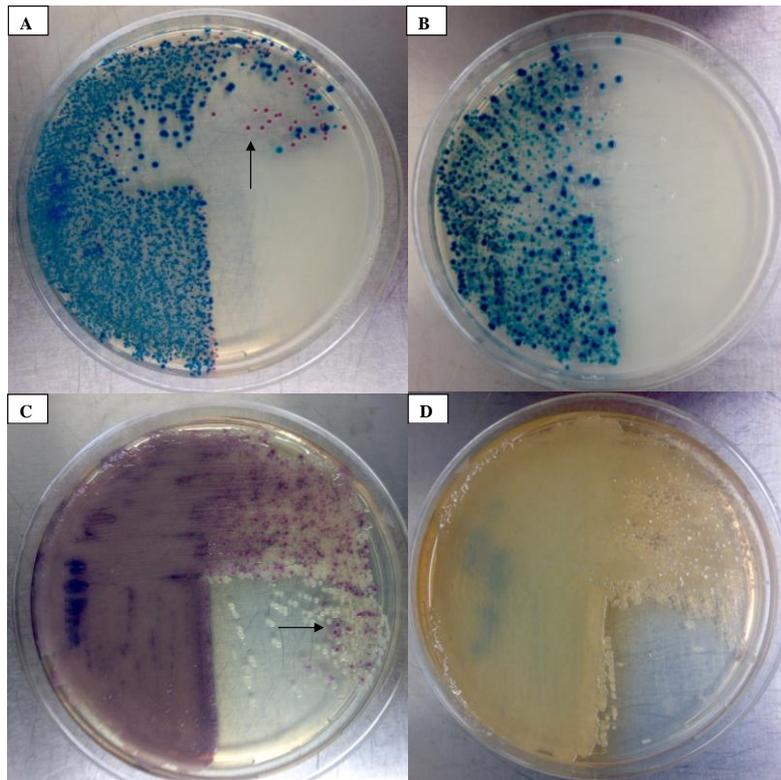
## PROVE DI FUNZIONALITA' SULLA MATRICE GERMOGLI CONTAMINATI CON IL SIEROGRUPPO O104

In una seconda fase sono stati eseguiti test di funzionalità sulla matrice germogli utilizzando il saggio per l'identificazione di EA<sub>gg</sub>EC sviluppato durante questo studio, sebbene formulato per test su colonia isolata. Unità campione da 25 g di germogli di fagiolo sono state artificialmente contaminate utilizzando i ceppi 2050, 2071, e 3493 2011, sierogruppo O104, e gli estratti di DNA sono stati analizzati in real-time PCR. Il saggio per la rilevazione di EA<sub>gg</sub>EC ha fornito ottimi risultati, poiché in grado di rilevare correttamente tutti i campioni (Tabella 82). Lo IAC è risultato sempre presente.

**Tab. 82:** Risultati delle prove di funzionalità su germogli contaminati con i sierogruppi O104 2050-2071-3493 2011 ed amplificati con il saggio per l'identificazione di EA<sub>gg</sub>EC. I risultati sono espressi come medie dei Ct  $\pm$  standard deviations.

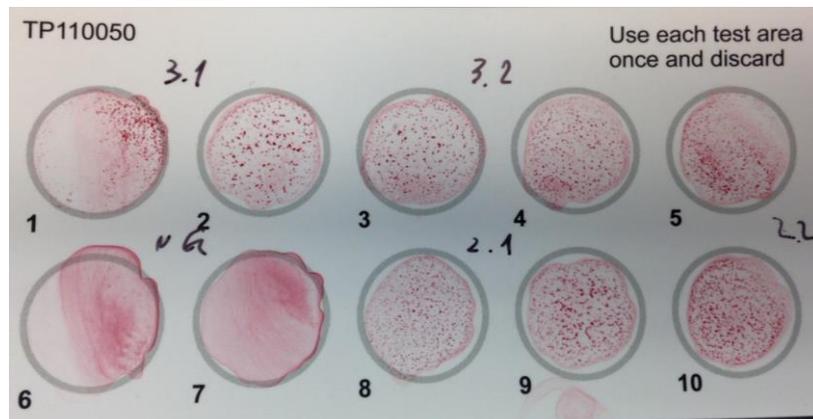
<b>Ceppo</b>	<b>Sierogruppo</b>	<b>aggR</b>	<b>aaiC</b>
2050	O104	21.85 $\pm$ 2.05	21.22 $\pm$ 2.40
2071	O104	18.75 $\pm$ 0.07	28.25 $\pm$ 0.07
3493 2011	O104	23.40 $\pm$ 0.70	22.50 $\pm$ 0.70

In parallelo gli arricchimenti sono stati sottoposti a conferma colturale: Immunomagnetic Separation, specifico per il sierogruppo O104; semina su terreni solidi selettivi (CHROMagar, mRMA) (Figura 34); conferma delle colonie cresciute sui terreni selettivi mediante latex agglutination test (Figura 35). Tutti i campioni e le colonie considerate sono risultate positive, in accordo con i risultati del metodo molecolare.



**Fig. 34:** Crescita batterica su terreni solidi selettivi dopo IMS degli arricchimenti di germogli contaminati con i ceppi O104.

A: CRHOMagar con colonie positive O104 (viola); B: CHROMagar privo di colonie tipiche O104; C: mRBA con colonie positive O104 (viola); D: mRBA privo di colonie tipiche O104.



**Fig. 35:** Risultati della latex agglutination eseguite sulle colonie di O104 cresciute in terreni solidi selettivi. I campioni numero 6 e 7 rappresentano i Controlli Negativi.

# DISCUSSIONE

---

La sicurezza alimentare ha l'obiettivo di proteggere il consumatore e ridurre la diffusione delle infezioni veicolate dagli alimenti nella popolazione. Le recenti epidemie diffuse a livello mondiale, l'immissione nel mercato di prodotti sempre più innovativi e *ready-to-eat*, e la globalizzazione dei mercati necessitano di strumenti altamente tecnologici, semplici da usare e sensibili, in grado di poter identificare nel più breve tempo possibile un lotto alimentare contaminato, così da poter intervenire con le specifiche metodiche (Gould et al., 2009).

Nell'ambito del Dottorato di ricerca in Scienze della Vita, Salute e Biotecnologie, supportato dal progetto Eureka in collaborazione con Diatheva srl, Università di Urbino e Regione Marche sono stati sviluppati alcuni saggi molecolari in real-time PCR in formato multiplex per l'identificazione di *E. coli* patogeni a partire da matrici alimentari. Nel presente lavoro sono stati messi a punto sistemi di rilevazione di STEC, in accordo con la norma ISO 13136:2012 (Microbiology of food and animal feed -- Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens – Horizontal method for the detection of Shigatoxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups) che identifica i geni target (*stx-eae*) e i sierogruppi maggiormente patogeni (O157-O26-O103-O111-O145), a cui è stato aggiunto il sierogruppo O104, responsabile di una recente epidemia in Germania nel 2011 con 3800 casi e più di 40 morti (Scheutz et al., 2011). Inoltre, è stato prodotto un sistema per la detection di EAggEC mediante rilevazione dei geni *aggR* ed *aaiC*, caratteristici di questo sierogruppo. Infatti, anche secondo il parere autorevole dell'EFSA (2012), non è sufficiente evidenziare la presenza di STEC per stimare il reale rischio dei consumatori dato che esistono altri importanti patogruppi che dovrebbero essere tenuti in considerazione per la loro rilevanza patogenetica ed epidemiologica.

Per lo sviluppo del saggio per la rilevazione di STEC (*stx-eae*) sono state inizialmente individuate le regioni conservate dei geni di interesse, tramite allineamenti delle sequenze dei geni target, al fine di disegnare primer e probe specifici. Sono state utilizzate sonde dual-labelled di tipo TaqMan, che offrono la possibilità di avere un sistema di rilevamento altamente specifico, poiché disegnate in modo da ibridarsi all'interno del frammento amplificato. Le marcature in fluorescenza sono state scelte in modo tale da poter essere utilizzate sui principali strumenti di real-time PCR attualmente sul mercato.

Per quanto riguarda la configurazione del metodo, in un primo momento era stato allestito un singolo saggio in grado di amplificare entrambi i geni target delle shigatossine *stx1* e *stx2*, utilizzando due differenti probe, specifiche per le due forme, per discriminarle. Erano state inserite basi degenerate (Perelle et al., 2004; Linhart and Shamir, 2002) nei punti dove la sequenza presentava dei polimorfismi tra le varianti ma, a causa dell'elevata variabilità delle sequenze nucleotidiche, i valori di inclusivity ottenuti non erano ancora soddisfacenti, poiché non in grado di identificare le *stx1d* ed *stx2f*. Per questo, sono stati disegnati due nuovi set di primer e probe, sempre con basi degenerate, in modo da rilevare i target *stx1/stx2*, senza discriminarli, e con 100% di inclusivity. La specificità del saggio è risultata particolarmente soddisfacente, soprattutto se si considerano le prove di comparazione eseguite con il metodo "ufficiale" riportato nella ISO 13136:2012 e fornito dall'EURL VTEC (Laboratorio di Riferimento della EU per STEC). Infatti questo metodo non è in grado di rilevare correttamente la variante *stx2f*, a causa di una variabilità di sequenza nei punti di annealing dei primer, come osservato dagli allineamenti analizzati e da Wasilenko et al., (2012). Anche recenti pubblicazioni (Reischl et al., 2002; Beutin et al. 2009), in cui sono descritte metodiche simili, mostrano che la variante *stx2f* non viene rilevata, tuttavia, la capacità di riuscire ad amplificare tutte le varianti dei geni *stx1* e *stx2* è di primaria importanza per un kit diagnostico per STEC (Harada et al., 2015). Infatti, la variante *stx2f*, in passato considerata poco rilevante poiché non associata a casi di patologia nell'uomo, è stata recentemente identificata in un ceppo di *E. coli* responsabile di un focolaio epidemico in Olanda, con 87 casi di infezione tra il 2008 ed il 2011 (Van Duynhoven et al., 2008; Friesema et al., 2014).

Per quanto riguarda il gene dell'intimina, il saggio molecolare per l'identificazione di STEC si è dimostrato in grado di amplificare le varianti del gene *eae* associate ai 5 sierogruppi maggiormente coinvolti dal punto di vista epidemiologico: O157:H7 e O145:H28 (*eae-γ1*), O26:H11 (*eae-β1*), O103:H2 (*eae-ε*), O111:H8 (*eae-θ*) (Madic et al., 2010), detectandoli in 10, 1, 2 e 7 ceppi della collezione di laboratorio, rispettivamente. Il saggio ha dimostrato anche una buona exclusivity, testata con numerose specie ed in particolare con *Shigella flexneri* (ceppo ATCC12022), che produce una tossina omologa a quella codificata da *stx1* (Islam et al., 2008), evitando il rischio di risultati falsi positivi.

Il metodo molecolare è stato sviluppato in presenza di un Controllo Interno di Amplificazione (IAC) in accordo con la norma EN ISO 22174:2005 (Microbiology of

food and animal feeding stuffs—Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of foodborne pathogens - General requirements and definitions), obbligatorio per tutte le PCR diagnostiche, al fine di assicurare l'attendibilità dei risultati rivelando i possibili esiti falsi negativi. Questi ultimi, infatti, si possono determinare o a causa della presenza nel campione di sostanze che inibiscono l'attività della DNA polimerasi, oppure a causa di errori dell'operatore durante il set up della reazione.

Al termine della fase di ottimizzazione, il sistema in formato multiplex realizzato si è rivelato molto sensibile (fino a 10 UG), con un'efficienza di amplificazione dello 0.9. I valori di efficienza erano migliori per il gene *eae* rispetto a quelli per *stx*, probabilmente perché l'amplificazione del target *stx* richiede l'impiego di 3 probe per la rilevazione di tutte le varianti, rendendo il sistema più complesso. Gli stessi indici sono stati confermati anche mediante amplificazione del DNA di ceppi contenenti tutte le più importanti varianti dei geni target (*stx1<sub>a-d</sub>*; *stx2<sub>a-g</sub>*; *eae*  $\gamma 1$ - $\beta 1$ - $\epsilon$ - $\theta$ ), evidenziando la robustezza del metodo.

Successivamente sono stati sviluppati i saggi molecolari per l'identificazione dei sierogruppi maggiormente coinvolti in casi di infezione nell'uomo. E' stata visionata la norma EU-RL VTEC\_Method\_02\_Rev\_0, "Identification and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) by Real Time PCR amplification of the main virulence genes and the genes associated with the serogroups mainly associated with severe human infections", riportati anche nella norma ISO/TS 13136:2012 (Annex E, Primers and probes for the PCR assays) che individua i sierogruppi, i relativi geni target (*rfbE* per O157; *wzx* per O26, O103 e per O104; *wbdl* per O111; *ihp1* per O145) e le sequenze oligonucleotidiche da utilizzare per l'identificazione molecolare. Queste ultime sono state inizialmente adoperate per le prove in formato singleplex, testandone i livelli di efficienza e di sensibilità ma successivamente, per i target O157 ed O103, sono stati utilizzati nuovi set di primer e probe al fine di ottenere valori di efficienze di amplificazioni migliori e più performanti. I risultati ottenuti dall'utilizzo di queste nuove sequenze si sono rivelati quindi più soddisfacenti.

Al fine di individuare le combinazioni migliori per la rilevazione dei sierotipi in formato multiplex, sono stati visionati diversi articoli scientifici (Fratamico et al., 2011; Wang et al., 2013; Conrad et al., 2014) e diversi kit di amplificazione disponibili sul mercato (R-Biopharm A. G., Biorad, LifeTechnologies, Bioteccon Diagnostics, DuPont Bax

System). Sulla base di queste informazioni sono stati realizzati 3 distinti saggi, ciascuno deputato alla rilevazione di due sierogruppi: O157-O111, O26-O103, O145-O104 tutti in presenza di IAC. Sono stati valutati i parametri di efficienza di amplificazione, sempre superiore a 0.95, e di sensibilità, che si attestava tra 10-1 UG. Inoltre test di inclusivity e cross-reactivity hanno mostrato una specificità del 100%.

Poiché in un campione reale i target di amplificazione, derivanti da cellule batteriche di diverso tipo simultaneamente presenti, potrebbero essere in quantità diverse tra loro, è importante valutarne possibili effetti di competizione nell'amplificazione che determinerebbero falsi negativi. Sono stati quindi allestiti dei test in cui erano utilizzate quantità di DNA dei geni target non equilibrate, ovvero con 3 log di differenza. Queste prove sono state allestite sia per il saggio per l'identificazione di STEC sia per quello dei sierogruppi. Nel primo caso sono state combinate diverse quantità di *stx1*, *stx2* ed *eae*, ottenendo la positività del campione anche quando uno dei due target era in concentrazione molto inferiore rispetto all'altro (3 log). Nel secondo caso i saggi per i sierogruppi hanno fornito i seguenti risultati: per il set O145-O104 non si ha una interazione nella rilevazione dei target, con valori sempre sotto il 35esimo Ct per i campioni con 3 log di differenza; per il set O26-O103 si registra una interferenza, seppur lieve, nella rilevazione dei geni target, ma con Ct accettabili e sempre al di sotto del 40esimo ciclo per i campioni con 3 log di differenza; per il set O157-O111, invece, entrambi i target con 3 log di differenza (10 e 10<sup>4</sup> UG) non sono stati amplificati. Questo dimostra che all'interno della reazione si è sviluppata una interazione di tipo competitivo tra i target (Edward and Gibbs, 1994).

La valutazione della stabilità nel tempo dei saggi sopra menzionati (STEC e sierogruppi) è stata condotta attraverso la realizzazione di un batch di mix di reazione per l'esecuzione di prove di efficienza e sensibilità durante l'arco di un mese. Anche se l'intervallo di tempo considerato non era molto lungo, poteva tuttavia dare una indicazione sull'eventuale calo delle performances. Il saggio STEC e i sierogruppi O157-O111 e O145-O104 hanno mostrato valori di efficienza costanti nel tempo, mentre il set O26-O103 ha fornito valori meno stabili, ma comunque sempre nel range di accettabilità. Nel complesso i risultati ottenuti sono stati soddisfacenti per tutti i saggi considerati.

Infine è stato messo a punto un saggio in grado di rilevare la presenza di *E.coli* EAaggEC secondo quanto suggerito da EU RL\_Method\_05\_Rev 1 (Detection of

Enteroaggregative *Escherichia coli* in food by Real Time PCR amplification of the *aggR* and *aaiC* genes). Sono stati disegnati gli oligonucleotidi per la rilevazione dei target genici di interesse (*aggR* ed *aaiC*) e sono stati combinati in formato multiplex, in presenza di IAC. I parametri di sensibilità hanno evidenziato la capacità del saggio di identificare fino a 10 UG, mentre l'efficienza di amplificazione è sempre stata vicino al valore 1 per entrambi i target.

Al fine di verificare la robustezza e la riproducibilità dei metodi molecolari, sono state eseguite prove di efficienza su diverse strumentazioni in real-time PCR. Le prove hanno interessato i saggi per l'identificazione di STEC ed EAaggEC, utilizzando la 7500 Real-Time PCR System (Life Technologies), il RotorGene Q (Qiagen) e il RotorGene 6000 (Corbett Research). Sebbene con una lieve variabilità in funzione dello strumento adoperato, i risultati hanno fornito dei parametri di sensibilità ed efficienza che assicurano la buona performance del sistema, con valori comparabili tra di loro ed affidabili. Questo dimostra la possibilità di applicare i metodi molecolari sugli strumenti per real-time PCR più diffusi, importante caratteristica come evidenziato da Lin et al. (2011). Diversamente Beutin et al. (2009) limita enormemente la versatilità del suo saggio per la rilevazione di STEC perché sviluppato con tecnologia GeneDisc.

In queste prove le variabili più critiche sono rappresentate dalla qualità del DNA, la purezza dei reagenti, l'accuratezza della temperatura durante la fase di amplificazione ed infine l'attendibilità dei termociclatori. Specialmente quest'ultimo aspetto deve essere tenuto in considerazione. Sebbene i diversi strumenti abbiano la capacità di mantenere in modo costante ed omogenea la temperatura di reazione per non inficiare la fase di amplificazione, presentano delle notevoli differenze, sia per il sistema di acquisizione del segnale sia per l'analisi dei dati. Ad esempio la 7500 Real-Time PCR System utilizza come sorgente una lampada al tungsteno che è in grado di irradiare i campioni e determinarne l'emissione della fluorescenza. Questa viene rilevata da una camera CCD e, ad opera di uno specifico software, il segnale luminoso viene convertito in dati numerici. Inoltre questa tecnologia prevede l'utilizzo di un fluoroforo di riferimento interno (internal reference dye) definito come controllo passivo (ROX) e viene utilizzato dallo strumento per normalizzare le fluttuazioni di fluorescenza non correlate alle reazioni di amplificazione. Infine i campioni vengono caricati su di un blocco fisso a 96 pozzetti (Manuale per 7500 e 7500 Fast Real-Time PCR). Diversamente, sia il Rotor Gene Q che il RotorGene 6000 utilizzano come sorgente specifici LED (in numero di 3 o 5 dipende dal tipo di strumento) che irradiano il

campione e determinano l'emissione di un segnale fluorescente. Questo viene convogliato in un set di filtri e detectato dallo strumento che, tramite uno specifico software, lo converte in valore numerico. Inoltre non utilizzano il ROX per la fase di normalizzazione e presentano un rotore interno, che gira a circa 400 rpm, dove vengono caricati i campioni e, durante la rotazione, avviene l'acquisizione del segnale. Se tutte queste variabili vengono soddisfatte e il metodo risulta robusto, possiamo avere una buona riproducibilità inter-laboratorio.

In conclusione durante la prima fase di lavoro sono stati sviluppati i saggi molecolari per l'identificazione di STEC (*stx-eae*), sierogruppi (O157-O26-O103-O111-O145-O104) ed EAaggEC (*aggR-aaIC*), con range di efficienza di amplificazione e di sensibilità accettabili e che risultano conformi ai requisiti previsti della ISO 13136:2012 e dalla EU RL\_Method\_05\_Rev 1. In letteratura sono riportati numerosi studi che descrivono saggi molecolari per la ricerca di STEC O157 e non-O157, (Lin et al., 2011; O'Hanlon et al., 2004; Harada et al., 2015) e che offrono quindi la possibilità di utilizzare open source primer e probe testati ed ottimizzati (Wang et al., 2013). Tuttavia nel nostro lavoro il design di nuove sequenze oligonucleotidiche è stato preceduto dalla creazione di un database di sequenze geniche con i dati più recenti ed aggiornati, ed ha quindi permesso di migliorare l'inclusivity del test e di ottenere un prodotto in grado di rispondere agli standard qualitativi in continua evoluzione (Conrad et al., 2014).

Poiché gli alimenti differiscono tra di loro nella composizione chimica, nella concentrazione della flora di background e ben noto è l'effetto inibitorio che tali componenti possono esercitare sulla crescita microbica (Wilson, 1997; Tzschoppe et al., 2012), una volta ottimizzati i metodi molecolari si è voluto testarli, tramite prove di funzionalità, su matrici alimentari artificialmente contaminate. In una prima fase è stata valutata la crescita dei top five STEC, più O104, nei principali terreni di arricchimento secondo ISO 13136 (BPW, mTSB+N<sub>0-16</sub>, mTSB+A<sub>12</sub>) ed FDA/BAM (mBPW<sub>p</sub>+ACV) al fine di individuare le migliori condizioni. Prove simili sono state eseguite da Kanki et al. (2011), considerando 5 diversi terreni per la crescita di STEC e ne hanno valutato le performance. Infatti la scelta dell'arricchimento è un punto chiave per la buona riuscita del metodo, poiché permette la crescita ottimale del patogeno, ne aumenta la concentrazione e si ha la certezza che i risultati positivi provengano da cellule vive e in moltiplicazione, evitando così risultati falsi negativi (ISO 13136:2012; Weagant et al., 2011; Tzschoppe et al., 2012; Kanki et al., 2011). I risultati hanno sottolineato che il terreno mTSB+N<sub>16</sub> esercita un effetto inibitorio sugli STEC O111, O103 e O145,

visibile soprattutto durante le prime ore di incubazione. Viceversa, la riduzione della novobiocina (8-2 mg/L) o una sua assenza, è in correlazione con la riduzione o soppressione dell'effetto inibitorio, a dimostrazione che l'antibiotico interferisce in maniera diretta sulla crescita di specifici sierogruppi. Se l'incubazione era prolungata overnight tale effetto era superato ed i valori di assorbanza diventavano simili per tutti i sierogruppi esaminati.

L'mTSB è raccomandato dalla ISO 13136:2012 come terreno per l'analisi di matrici alimentari sospette di contenere un elevato livello di microflora, a cui devono essere aggiunte la novobiocina o l'acriflavina. Nonostante la stessa ISO 13136:2012 precisa che la novobiocina potrebbe interferire sulla crescita batterica, da questo studio si evince che la concentrazione di 16 mg/L suggerita in tale norma potrebbe non essere appropriata dati i risultati falsi negativi ottenuti, specialmente alle più basse concentrazioni batteriche e con alcuni sierogruppi. Infatti Vimont et al. (2007) suggeriscono di non aggiungere l'antibiotico negli arricchimenti per la ricerca degli STEC; Mancusi e Trevisani (2014), invece, dimostrano l'effetto inibente dell'acriflavina.

L'mBPWp+CV, con o senza agitazione, ha fornito le migliori condizioni di crescita (Weagant et al., 2011), probabilmente grazie alla composizione di micro e macronutrienti di cui è costituito (Stephens et al., 2000), che forniscono il substrato energetico ottimale per la crescita batterica. Lo stesso terreno con l'aggiunta dell'acriflavina, raccomandato da FDA/BAM Enterohemorrhagic *E. coli* protocol ([www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacterialAnalyticalManualBAM/default.htm](http://www.fda.gov/Food/ScienceResearch/LaboratoryMethods/BacterialAnalyticalManualBAM/default.htm)), ha prodotto risultati meno performanti: una ridotta crescita di tutti i ceppi batterici, con una ripresa registrata nell'intervallo di 8 h, dovuta all'aggiunta di ACV e/o all'aumento della temperatura. Diversamente l'arricchimento BPW, suggerito dalla ISO 13136:2012 per i campioni con patogeni stressati e con un basso livello di contaminazione, ha fornito i tassi di crescita più bassi per tutti i sierogruppi, dimostrandosi un terreno non ottimale per la crescita batterica. Questo probabilmente è dovuto alla composizione povera in nutrienti, poiché privo di fonti di carboidrati, di agenti stimolanti, di vitamine e con una ridotta concentrazione di azoto.

Successivamente presso US Department of Agriculture, sono state condotte ulteriori prove di crescita batterica per verificare se l'azione inibente della novobiocina fosse ceppo-dipendente. Per questo motivo 5 diversi ceppi appartenenti al sierogruppo O111

(98-8338, 00-4748, 01-387, TB226, 95-0586) sono stati fatti crescere in mTSB+N<sub>0-16</sub>. I risultati hanno confermato l'effetto inibitorio indotto dalla novobiocina, che è risultato ceppo-dipendente: a parità di concentrazione di antibiotico i patogeni rispondevano in maniera differente. Questa condizione può essere causata da specifiche mutazioni sul gene bersaglio dell'antibiotico e ciò può indurre una maggiore o minore resistenza, e quindi un comportamento differente (Hardy and Cozzarelli, 2003). La novobiocina è un antibiotico cumarinico che agisce a livello della DNAGirasi, enzima indispensabile per la replicazione del DNA, legandosi sulla sua subunità B e inibendo l'attività ATPasica (azione batteriostatica). Viene comunemente usata per la crescita di *E. coli* O157 in matrici alimentari (ISO 16654:2001) perché è stata dimostrata la sua attività antimicrobica nei confronti di batteri Gram-positivi, mentre presenta una ridotta azione nei confronti dei Gram-negativi (Kirby et al., 1956; Smith and Davis, 1967; Pao et al., 2005). Ciononostante diversi autori (Uemura et al., 2003; Vimont et al., 2006; Vimont et al., 2007; Weagant et al., 2011; Tzschoppe et al., 2012; Kanki et al., 2011) hanno messo in evidenza l'attività inibitoria di questo antibiotico, il cui utilizzo è ancora molto controverso (Vimont et al., 2007).

Per quanto riguarda i test sui campioni alimentari, sono stati individuati e selezionati alcuni alimenti maggiormente coinvolti in casi di infezione. Infatti, sebbene i germogli siano l'unica categoria alimentare per cui sono previsti dei criteri microbiologici per la presenza di STEC (ER Regulation 209/2013), sia la carne bovina che il latte crudo e prodotti caseari sono direttamente implicati in casi di infezioni da Shigatoxin-producing *E. coli* (EFSA and ECDC, 2015).

Gli alimenti selezionati erano brie, carne bovina macinata e germogli freschi (fagiolo).

Le matrici alimentari brie e carne macinata sono state inizialmente analizzate mediante il saggio per l'identificazione di STEC. I risultati hanno fornito per i livelli di contaminazione 10-100 CFU il 100% di positività, mentre con 1 CFU il 50% e il 65%, rispettivamente. E' ipotizzabile che questa differenza di risultati sia dovuta alle caratteristiche dell'alimento, poiché il brie si presenta come matrice grassa e complessa, e potrebbe inibire, seppur in maniera lieve, la crescita del microrganismo. Risultati simili vengono riportati anche da Vernozy-Rozand et al. (2005), Madic et al. (2011), dove si suggerisce di utilizzare l'IMS per migliorare la sensibilità. Tuttavia è da sottolineare che per i campioni contaminati con 1 CFU è altamente improbabile ottenere una sensibilità del 100% in quanto, secondo la legge di Poisson applicata alla

distribuzione delle cellule batteriche nelle unità campione durante la fase di contaminazione artificiale con 1 CFU, il 37% dei campioni non dovrebbe contenere il patogeno, un altro 37% dovrebbe contenere 1 cellula batterica, il 18% 2 cellule batteriche e il restante 8% più di due cellule, per cui in media solo il 63% delle aliquote realizzate risulteranno contenere realmente il patogeno (Rossmannith and Wagner, 2001).

Ulteriori prove con la carne macinata con il ceppo O111 hanno evidenziato un effetto di inibizione della crescita, con conseguenti risultati falsi negativi. Risultati simili erano stati registrati anche da Fratamico et al. (2014), Lin et al. (2011) e Verstraete et al. (2012), con zero positività per il ceppo O111 quando inoculato a bassi livelli. Il problema si è risolto applicando un protocollo di incubazione a due step (37+44°C). Anche altri autori (Verstraete et al., 2012; Possè et al., 2008; Wang et al., 2013; FDA/BAM; Vimont et al., 2006), infatti, hanno mostrato che a 40°C la capacità di crescita di *E. coli* non-O157 risulta migliore rispetto che a 37°C. Pertanto, l'incremento della temperatura di incubazione, accompagnato da una riduzione della concentrazione di novobiocina, forniva maggiore sensibilità e determinava valori di Ct più bassi in tutte le condizioni. Questo risultato suggerisce anche che l'incremento della temperatura contribuisce a limitare la crescita della microflora di background della carne, in genere presente a livelli molto più alti degli eventuali patogeni, che potrebbe competere con O111. Verstraete et al. (2012), Possè et al. (2008), Wang et al. (2013) riportano performance simili. Alla luce di questi risultati il protocollo a due step di incubazione è stato utilizzato per le successive prove di funzionalità sulla matrice carne.

La matrice “germogli” è stata quella che si è dimostrata più problematica. Il livello di detection ottenuto nelle prime prove non era conforme con quanto previsto dal Regolamento (EU) 209/2013, che prevede la completa assenza di STEC nei germogli.

In questo particolare prodotto alimentare la rilevazione di STEC può risultare alquanto difficoltosa, a causa dell'elevato livello di flora di background che può interferire con la crescita del microrganismo, specialmente quando presente a basse concentrazioni (Weagant et al., 1995; Weagant et al., 2011). Infatti i germogli rappresentano una vera sfida: sono una matrice complessa, vengono mantenuti umidi durante e dopo la fase di produzione, hanno un pH neutro, un elevato quantitativo di H<sub>2</sub>O e componenti con attività inibente sull'amplificazione del DNA, e durante la fase di germinazione sono ricchi di nutrienti che potrebbero essere facilmente utilizzati dai microrganismi. La popolazione batterica di background è di circa 7-8 log CFU/g (Jinneman et al., 2012), e

si presenta molto varia poiché caratterizzata da Gram-negativi per il 69% e da Gram-positivi per il 17% (Splittstoesser et al., 1983). Da alcuni studi si è visto che tali microrganismi sono in grado di crescere di circa 2-3 unità logaritmiche al giorno fino ad arrivare a  $10^8$  CFU/g (Fu et al., 2001; Splittstoesser et al., 1983). Tutte queste variabili lo rendono un campione difficile da gestire e da analizzare e per questo alcuni metodi diagnostici molecolari non sono in grado di rilevare bassi livelli di contaminazione di STEC (Margot et al., 2015; Tzschoppe et al., 2012).

Al fine di identificare l'arricchimento che meglio si adatta a questa particolare matrice alimentare, ulteriori prove sono state condotte utilizzando i terreni indicati nella ISO 13136:2012 (BPW), in accordo con il proficiency testing PT15 sviluppato dall'EURL VTEC (Babsa et al., 2015), nella FDA/BAM (mBPWp + ACV) e il protocollo suggerito da Weagant et al. (2011) (mBPWp + CV). Prove simili sono state condotte sia da Hara-Kudo et al., (1999) testando TSB, mTSB, mEC+N, mTSB+vancomycin, cefixime and cefsulodin (VCC), o TSB+cefixime, tellurite and vancomycin (CTV), sia da Weagant et al., (2011).

I risultati ottenuti hanno evidenziato che il terreno BPW non è in grado di far crescere i patogeni a livelli detectabili. Una possibile causa può risiedere nella elementare composizione chimica e nutritiva di cui è costituito, mancante di elementi antimicrobici selettivi. Questo potrebbe aver determinato la sovracrescita della microflora autoctona a discapito del ceppo inoculato: perciò non risulta adeguato per questa fase.

L'arricchimento mBPWp+ACV, invece, ha fornito dei risultati falsi negativi con il sierogruppo O157. Tutte le repliche sono risultate negative e questo probabilmente è dipeso dell'azione inibente esercitata dall'acriflavina, come riportato anche da Mancusi e Trevisani, (2014). Dato che in campioni alimentari reali non è noto il sierogruppo contaminante, l'mBPWp+ACV non risulta utilizzabile in questa fase poiché non garantisce risultati riproducibili con tutti i sierogruppi.

La procedura indicata da Weagant et al. (2011), invece, ha fornito risultati soddisfacenti per tutti i sierogruppi, ottenendo un range di positività del 45-80% per il livello 1 CFU, con una variabilità specifica per ogni sierogruppo, e con una LOD simile ai risultati di Baranzoni et al. (2014) e di Hara-Kudo et al. (2016). Weagant elimina l'incubazione di 6 h poiché questa servirebbe per rigenerare i batteri stressati o danneggiati ma, dato che alcuni lavori dimostrano che i microrganismi sono in una condizione favorevole grazie agli elementi semplici reperibili dai germogli (Charkowski et al., 2002; Stewart et al.,

2001), è superfluo eseguire questo passaggio perché improbabile che i batteri possano trarne beneficio. Considerazioni simili vengono riportate anche in Wang et al. (2013) il quale afferma che su varie matrici alimentari di origine vegetale (lattuga, spinaci, germogli alfa alfa) la temperatura di 42°C permette una migliore crescita dei top six STEC, rispetto alla classica temperatura di 37°C.

In conclusione il protocollo Weagant si è rilevato essere il più performante e dovrebbe essere tenuto in considerazione tra gli operatori della sicurezza alimentare.

In definitiva sono stati sviluppati saggi molecolari per la detection di *E. coli* STEC (*stx-eae*) e dei sierogruppi epidemiologicamente più rilevanti (O157-O26-O103-O111-O145-O104) conformi ai requisiti previsti dalla norma ISO 13136:2012.

Ulteriori prove di funzionalità sono state realizzate presso lo US Department of Agriculture con la finalità di confrontare i saggi molecolari per l'identificazione di STEC e sierogruppi, con i metodi diagnostici molecolari in uso presso il loro dipartimento. In particolare l'USDA utilizza il BAX System Real-Time PCR STEC Suite (che comprende un saggio per l'identificazione di STEC e due panel per i sierogruppi O26-O111-O121, O45-O103-O145); BAX System Real-Time PCR Assay for *E. coli* O157:H7. Tali saggi molecolari sono caratterizzati dalla facilità di esecuzione, non necessitano della preparazione della mix di reazione, non hanno un protocollo di estrazione del DNA lungo e laborioso (che spesso non rimuove a sufficienza gli inibitori di PCR), e nel tubo da PCR è presente una compressa disidratata contenente tutti i reagenti per la reazione di amplificazione (primer, probe, polimerasi, nucleotidi, IPC), a cui deve essere aggiunto solo il volume dell'arricchimento estratto. Questo workflow riduce al minimo la possibilità di compiere errori e contaminazioni, (Fratamico et al., 2014), ed è un metodo certificato dalla Association of Official Agricultural Chemists (AOAC).

Per la matrice carne macinata è stato seguito il protocollo fornito da USDA-FSIS MLG, mentre per la matrice germogli il protocollo fornito da FDA/BAM.

Le unità campione di alimenti sono state precedentemente processate attraverso le Aerobic Plate Count (APC), per identificare il livello di microflora di background posseduto. Queste piastre sono altamente specifiche e selettive, poiché composte da nutrienti modificati VRB, da un agente gelificante solubile in acqua fredda, un indicatore di colore (tetrazolio) che facilita il conteggio delle colonie, un film superiore che trattiene il gas prodotto dai Coliformi che fermentano il lattosio, e vari elementi

selettivi che permettono la crescita di specifici batteri. La conta delle colonie cresciute ci ha permesso di avere un range di background di partenza che è simile a quelli riportati da Baranzoni et al. (2014), Jinneman et al. (2012).

Per la matrice carne macinata i risultati hanno dimostrato l'equivalenza dei due metodi messi a confronto, BaxSystem e saggi sviluppati. Solo il sierogruppo O111 con arricchimento ISO 13136:2012 ha fornito tutti risultati falsi negativi (Lin et al., 2011; Fratamico et al., 2011;). Questo ha confermato da una parte l'inadeguatezza della concentrazione di novobiocina 16 mg/L nel fornire le condizioni di crescita ottimali per il sierogruppo O111, dall'altra che l'mTSB+C (USDA-FSIS) risulta essere nettamente migliore per la crescita e la rilevazione del sierogruppo. Alla luce delle prove di crescita in colture pure eseguite su diversi ceppi O111, sarebbe interessante verificare il comportamento del ceppo 95-0586, che si era dimostrato essere il più resistente all'azione della novobiocina, utilizzandolo per contaminare campioni di carne. A parità di medium, i valori di Ct sono generalmente simili per entrambi i saggi, in particolare si registrano valori più bassi con il saggio sierogruppi per O157-O26-O103 sviluppato in questo studio, mentre per O145 non sono presenti sostanziali differenze. Anche gli arricchimenti non si comportano in maniera costante: mTSB+C permette una migliore rilevazione per O111; mTSB+N<sub>16</sub> permette una migliore rilevazione per O145-O103; invece per O157-O26 non sono state riscontrate sostanziali differenze.

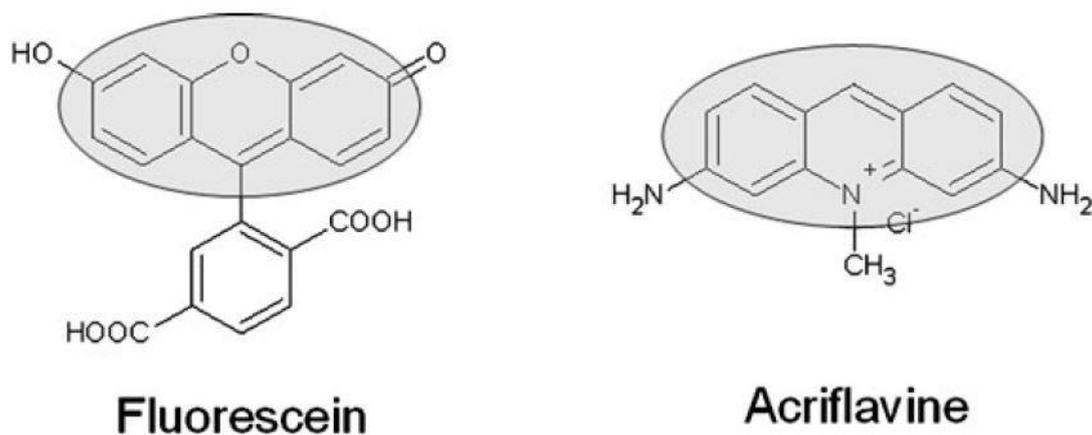
Per la matrice germogli in arricchimento FDA/BAM i risultati non sono stati soddisfacenti fornendo valori indeterminati (saggio BAX) o ambigui (saggio STEC sviluppato in questo studio) per tutti i sierogruppi, tranne O157 anche se a Ct molto alti. Il risultato indeterminato è dovuto alla mancata amplificazione del target genico e del IPC. I risultati ambigui dipendono dal fatto che i campioni risultavano negativi per il target *stx* e positivi per *eae* e per l'IAC, escludendo la presenza di inibitori di PCR. Il ceppo O111, invece, ha sempre fornito valori negativi. Alla luce dei risultati contrastanti, si è deciso di non adoperare più l'arricchimento mBPWp+ACV e di non utilizzare il saggio sierogruppi sui campioni di DNA estratti da questo terreno, ma di impiegare solo il protocollo Weagant et al. (2011), i quali affermano che è estremamente difficile ottenere una buona detection di O157:H7 in matrici alimentari utilizzando l'arricchimento indicato dalle procedure FDA/BAM.

Diversamente, con mBPWp+CV sono stati correttamente rilevati tutti i campioni contaminati con i sierogruppi selezionati; i valori di Ct sono risultati inferiori per i saggi

STEC e sierogruppi sviluppati durante questo studio. Solo per O145 i Ct risultavano più bassi utilizzando BaxSystem screening test (*stx-eae*).

In conclusione il protocollo suggerito da Weagant si conferma essere il più performante con questa tipologia di matrice alimentare.

Una considerazione deve essere fatta sull'arricchimento mBPWp+ACV da cui abbiamo ottenuto risultati ambigui. Infatti questo è un terreno indicato dall' FDA/BAM, per cui prima di essere adottato è stato sottoposto a numerosi test di convalida. Inoltre è stato utilizzato come medium nel lavoro di Baranzoni et al. (2014) che non hanno riscontrato problematiche. Al fine di comprendere la causa di tali risultati si è deciso di eseguire una purificazione addizionale dei campioni di DNA già estratti, utilizzando il PrepSEQ® Rapid Spin Sample Preparation Kits, specifico per matrici alimentari complesse. Questo è dotato di un particolare filtro in grado di trattenere le impurità e i possibili inibitori di PCR, permettendo il passaggio dei batteri che si vanno a depositare sul fondo della provetta. I campioni ripurificati con il nuovo kit, ed amplificati utilizzando primer e probe in uso presso l'USDA (Wasilenko et al., 2012), hanno fornito valori positivi. Analoghi risultati si sono ottenuti direttamente da aliquote di arricchimento non precedentemente sottoposte ad alcun passaggio di estrazione. La causa dei risultati falsi negativi è da ricercare in un sistema di estrazione del DNA che non è sufficientemente idoneo per questo tipo di arricchimento e, presumibilmente, non riesce ad eliminare completamente l'antibiotico che determina interferenza nella lettura della fluorescenza. Infatti da letteratura si evince che l'acriflavina (Figura 36) è costituita da un sistema di tre anelli etero-coniugati (hetero-conjugated), che sono analoghi alla fluoresceina (struttura fluorescente di base dei reporter dyes FAM, TET e HEX). La similarità delle strutture tra acriflavina e fluoresceina suggerisce la causa di una forte rilevazione del segnale, poiché i dati dello spettro dimostrano che l'acriflavina emette un segnale forte tra 468 e 650 nm, e le rispettive lunghezze d'onda dei termociclatori in real-time PCR sono di 516 (FAM), 555 (HEX), 538 nm (TET) (Rossmannith et al., 2009).



**Fig. 36:** Struttura molecolare della fluoresceina e acriflavina. Sono evidenziate le analogie strutturali. Eccitazione 490 nm.

Possiamo supporre che i risultati dubbi ottenuti con il BaxSystem e i risultati negativi ottenuti per *stx* con il saggio STEC siano stati determinati da una insufficiente purificazione del DNA e che l'acriflavina abbia interferito e modificato il settaggio del termociclature durante la fase di acquisizione del segnale.

In conclusione questo lavoro ha dimostrato che i saggi molecolari per l'identificazione di STEC (*stx-eae*) e dei sierogruppi (O157-O111, O26-O103, O145-O104), sviluppati durante questo studio, non presentano differenze significative con i metodi di riferimento dell'USDA-FSIS per le matrici carne macinata, e con la norma FDA per la ricerca di patogeni nei germogli, sottolineando che i due metodi sono comparabili in fatto di performance ed affidabilità; che in mTSB+N<sub>16</sub> il ceppo O111 non cresce; che la scelta dell'arricchimento e del metodo di estrazione sono un punto focale per la buona riuscita della prova.

Tuttavia dobbiamo sottolineare che i valori di Ct provenienti da due differenti sistemi di amplificazione non possono essere messi a confronto in maniera assoluta poiché gli algoritmi di calcolo e i software sono differenti.

In ultima analisi il saggio per l'identificazione di EAggEC, seppur sviluppato solo per la caratterizzazione delle colonie isolate dopo l'arricchimento colturale di matrici alimentari, è stato testato su campioni di germogli contaminati con il sierogruppo O104. I risultati hanno dimostrato che il saggio riesce ad amplificare correttamente tutti i campioni, con valori di Ct tra 18 e 28. I risultati si sono dimostrati in completo accordo con quelli ottenuti tramite la metodica ufficiale USDA-FSIS (IMS seguita da piastraggio su terreni selettivi cromogeni e conferma sierologica) sugli stessi campioni.

In definitiva il metodo ha permesso una rapida conferma e caratterizzazione dei ceppi STEC O104 anche da arricchimento con una contaminazione iniziale di 10 CFU in 25 g di germogli.

Il kit per l'identificazione di STEC è attualmente a catalogo di Diatheva srl con il nome commerciale di 'STEC FLUO Detection kit – Real-Time PCR'.

# CONCLUSIONI

---

In conclusione durante questo lavoro sono stati sviluppati saggi sensibili, specifici e di rapida applicazione per la detection di *E. coli* STEC (*stx-eae*), dei sierogruppi maggiormente patogeni per l'uomo (O157-O26-O103-O111-O145-O104), in accordo con le norme ISO 13136:2012 ed EU RL VTEC \_Method\_04\_Rev 1, e di EAaggEC. Questi saggi sono stati in grado di identificare *E. coli* patogeni nei principali prodotti alimentari implicati in focolai epidemici, e in particolar modo soddisfano le richieste della norma EU 209/2013 per cui gli *E. coli* STEC devono essere completamente assenti nella matrice alimentare germogli. Inoltre questo lavoro dimostra che la buona performance dei saggi dipende dal processo di arricchimento, che rimane un punto chiave nello sviluppo del metodo. Poiché normalmente il livello di contaminazione di *E. coli* patogeni in alimenti è basso, la selezione di un medium ottimale in grado di far crescere il patogeno è fondamentale nello sviluppo di un protocollo efficace, al fine di ridurre il rischio di risultati falsi negativi. Per questo un arricchimento alternativo a quelli indicati dalle norme ufficiali dovrebbe essere preso in considerazione.

Infine, il confronto dei saggi molecolari sviluppati per l'identificazione di STEC e sierogruppi con i protocolli ufficiali dell'USDA-FSIS e della FDA hanno dimostrato che i metodi sono comparabili tra loro in fatto di performance e sensibilità, ottenendo in taluni casi risultati migliori con il nostro metodo.

## BIBLIOGRAFIA

- Araujo, J. M., Tabarelli, G. F., Aranda, K. R., Fabbriotti, S. H., Fagundes-Neto, U., Mendes, C. M., & Scaletsky, I. C. (2007). Typical enteroaggregative and atypical enteropathogenic types of *Escherichia coli* are the most prevalent diarrhea-associated pathotypes among Brazilian children. *Journal of clinical microbiology*, *45*(10), 3396-3399.
- Babsa, S., Caprioli, A., Chiani, P., Ferreri, C., Galati, F., Maugliani, A., Michelacci, V., Minelli, F., Morabito, S., Tozzoli, R. (2015). Report of the 15th inter-laboratory study on the detection of Verocytotoxin-producing *E. coli* (VTEC) in sprouts (PT15) – 2015. Available at <http://www.iss.it/vtec/index.php?lang=2>
- Baranzoni, G. M., Fratamico, P. M., Rubio, F., Glaze, T., Bagi, L. K., & Albonetti, S. (2014). Detection and isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O104 from sprouts. *International journal of food microbiology*, *173*, 99-104.
- Baylis C., Smith H., Bolton E., & O'Brien S. (2008); 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
- Bell, B. P., Goldoft, M., Griffin, P. M., Davis, M. A., Gordon, D. C., Tarr, P. I., Bartleson, C. A., Lewis, J. H., Barrett, T. J., Wells, J. G., Baron, R., & Kobayashi, J. (1994). A multistate outbreak of *Escherichia coli* O157: H7—associated bloody diarrhea and hemolytic uremic syndrome from hamburgers: the Washington experience. *Jama*, *272*(17), 1349-1353.
- Beutin, L., Jahn, S., & Fach, P. (2009). Evaluation of the 'GeneDisc' real-time PCR system for detection of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) O26, O103, O111, O145 and O157 strains according to their virulence markers and their O- and H-antigen-associated genes. *Journal of applied microbiology*, *106*(4), 1122-1132.
- Bibbal, D., Kérourédan, M., Loukiadis, E., Scheutz, F., Oswald, E., & Brugère, H. (2014). Slaughterhouse effluent discharges into rivers not responsible for environmental occurrence of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Veterinary microbiology*, *168*(2), 451-454.

- Bielaszewska, M., Mellmann, A., Zhang, W., Köck, R., Fruth, A., Bauwens, A., Peters, A., & Karch, H. (2011). Characterisation of the *Escherichia coli* strain associated with an outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, 2011: a microbiological study. *The Lancet infectious diseases*, *11*(9), 671-676.
- Bugarel, M., Beutin, L., Martin, A., Gill, A., & Fach, P. (2010). Micro-array for the identification of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) seropathotypes associated with Hemorrhagic Colitis and Hemolytic Uremic Syndrome in humans. *International journal of food microbiology*, *142*(3), 318-329.
- Burgos, Y., & Beutin, L. (2012). Evaluation of an Immuno-Chromatographic Detection System for Shiga Toxins and the E. coli O157 Antigen. INTECH Open Access Publisher.
- Calderwood, S. B., Acheson, D. W. K., Keusch, G. T., Barrett, T. J., Griffin, P. M., Strockbine N. A., Swaminathan, B., Kaper, J. B., Levine, M. M., Kaplan, B. S., Karch, H., O'Brien, A. D., Obrig, T. G., Takeda, Y., Tarr, P. I., Wachsmuth, I. K. (1996). Proposed new nomenclature for SLT (VT) family. *ASM news*, *62*, 118-119.
- Caprioli, A., Morabito, S., Brugère, H., & Oswald, E. (2005). Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Veterinary research*, *36*(3), 289-311.
- CDC. (1993). Update: multistate outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections from hamburgers – Western United States, 1992-1993. *MMWR* *42*:258-263.
- Charkowski, A. O., Barak, J. D., Sarreal, C. Z., & Mandrell, R. E. (2002). Differences in growth of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157: H7 on alfalfa sprouts. *Applied and environmental microbiology*, *68*(6), 3114-3120.
- Chaudhuri, R. R., Sebaihia, M., Hobman, J. L., Webber, M. A., Leyton, D. L., Goldberg, M. D., Cunningham, A. F., Scott-Tucker, A., Ferguson, P. R., Thomas, C. M., Frankel, G., Tang, C. M., Dudley, E. G., Roberts, I. S., Rasko, D. A., Pallen, M. J., Parkhill, J., Nataro, J. P., Thomson, N. R., & Henderson, I. R. (2010). Complete genome sequence and comparative metabolic profiling of the prototypical enteroaggregative *Escherichia coli* strain 042. *PloS one*, *5*(1), e8801.
- Chen, C. Y., Nace, G. W., & Irwin, P. L. (2003). A 6× 6 drop plate method for simultaneous colony counting and MPN enumeration of *Campylobacter jejuni*,

- Listeria monocytogenes*, and *Escherichia coli*. *Journal of Microbiological Methods*, 55(2), 475-479.
- Conrad, C. C., Stanford, K., McAllister, T. A., Thomas, J., & Reuter, T. (2014). Further development of sample preparation and detection methods for O157 and the top 6 non-O157 STEC serogroups in cattle feces. *Journal of microbiological methods*, 105, 22-30.
- Delahay, R. M., Frankel, G., & Knutton, S. (2001). Intimate interactions of enteropathogenic *Escherichia coli* at the host cell surface. *Current opinion in infectious diseases*, 14(5), 559-565.
- ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). (2013). Surveillance of food-and waterborne diseases in the EU/EEA – 2006–2009. Stockholm: ECDC, 2013.
- Edwards, M. C., & Gibbs, R. A. (1994). Multiplex PCR: advantages, development, and applications. *GenomeResearch*, 3(4), S65-S75.
- EFSA (European Food Safety Authority). (2011). Tracing seeds, in particular fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seeds, in relation to the Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) O104:H4 2011 outbreaks in Germany and France.
- EFSA (European Food Safety Authority). (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.
- EFSA (European Food Safety Authority), Scientific Opinion. (2014). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014.
- EFSA (European Food Safety Authority) and ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control). (2015). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2014. EFSA Journal 2015;13(12):4329, 191 pp. doi:10.2903/j.efsa.2015.4329.
- EFSA (European Food Safety Authority). (2009). Technical specifications for the monitoring and reporting of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) on animals and food (VTEC surveys on animals and food). *EFSA J*, 7, 1366.

- EFSA (European Food Safety Authority) Scientific Opinion. (2007). Monitoring of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) and identification of human pathogenic VTEC types. *Eur. Food Saf. Author. J.* 2007, (579), pp. 1-61.
- EFSA (European Food Safety Authority) Scientific Opinion. (2015). Public health risks associated with Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) as a food-borne pathogen.
- Elliott, S. J., Yu, J., & Kaper, J. B. (1999). The Cloned Locus of Enterocyte Effacement from Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 is unable to confer the attaching and effacing phenotype upon *E. coli* K-12. *Infection and immunity*, 67(8), 4260-4263.
- Feng, P. C., Jinneman, K., Scheutz, F., & Monday, S. R. (2011). Specificity of PCR and serological assays in the detection of *Escherichia coli* Shiga toxin subtypes. *Applied and environmental microbiology*, 77(18), 6699-6702.
- Fraser, M. E., Fujinaga, M., Cherney, M. M., Melton-Celsa, A. R., Twiddy, E. M., O'Brien, A. D., & James, M. N. (2004). Structure of Shiga toxin type 2 (Stx2) from *Escherichia coli* O157: H7. *Journal of Biological Chemistry*, 279(26), 27511-27517.
- Fratamico, P. M., Bagi, L. K., Cray Jr, W. C., Narang, N., Yan, X., Medina, M., & Liu, Y. (2011). Detection by multiplex real-time polymerase chain reaction assays and isolation of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serogroups O26, O45, O103, O111, O121, and O145 in ground beef. *Foodborne Pathogens and Disease*, 8(5), 601-607.
- Fratamico, P. M., Wasilenko, J. L., Garman, B., DeMarco, D. R., Varkey, S., Jensen, M., Rhoden, K., & Tice, G. (2014). Evaluation of a multiplex real-time PCR method for detecting Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in beef and comparison to the US Department of Agriculture Food Safety and Inspection Service microbiology laboratory guidebook method. *Journal of Food Protection®*, 77(2), 180-188.
- Friesema, I., van der Zwaluw, K., Schuurman, T., Kooistra-Smid, M., Franz, E., van Duynhoven, Y., & van Pelt, W. (2014). Emergence of *Escherichia coli* encoding Shiga toxin 2f in human Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) infections in the Netherlands, January 2008 to December 2011. *Euro Surveill*, 19, 26-32.

- Fu T., Stewart D., Reineke K., Ulaszek J., Schlessner J., & Tortorello M. (2001). Use of spent irrigation water for microbiological analysis of alfalfa sprouts. *Journal of Food Protection*, 64(6), 802-806.
- Gould, L. H., Bopp, C., Strockbine, N., Atkinson, R., Baselski, V., Body, B., Carey, R., Crandall, C., Hurd, S., Kaplan, R., Neill, M., Shea, S., Somsel, P., Tobin-D'Angelo, M., Griffin, P. M., & Gerner-Smidt, P. (2009). Recommendations for diagnosis of shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections by clinical laboratories. *MMWR. Recommendations and reports: Morbidity and mortality weekly report. Recommendations and reports/Centers for Disease Control*, 58(RR-12), 1-14.
- Gould, L. H., Mody, R. K., Ong, K. L., Clogher, P., Cronquist, A. B., Garman, K. N., Lathrop, S., Medus, C., Spina, N. L., Webb, T. H., White, P. L., Wynmore, K., Gierke, R. E., Mahon, B. E., & Griffin, P. M. (2013). Increased recognition of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections in the United States during 2000–2010: Epidemiologic features and comparison with *E. coli* O157 infections. *Foodborne pathogens and disease*, 10(5), 453-460.
- Harada, T., Hiroi, M., Kawamori, F., Furusawa, A., Ohata, K., Sugiyama, K., & Masuda, T. (2007). A food poisoning diarrhea outbreak caused by enteroaggregative *Escherichia coli* serogroup O126: H27 in Shizuoka, Japan. *J. Clin. Microbiol*, 42, 1787-1789.
- Harada, T., Iguchi, A., Iyoda, S., Seto, K., Taguchi, M., & Kumeda, Y. (2015). Multiplex Real-Time PCR Assays for Screening of Shiga Toxin 1 and 2 Genes, Including All Known Subtypes, and *Escherichia coli* O26-, O111-, and O157-Specific Genes in Beef and Sprout Enrichment Cultures. *Journal of Food Protection*, 78(10), 1800-1811.
- Hara-Kudo, Y., Konishi, N., Ohtsuka, K., Iwabuchi, K., Kikuchi, R., Isobe, J., Yamazaki, T., Suzuki, F., Nagai, Y., Yamada, H., Tanouchi, A., Mori, T., Nakagawa, H., Ueda, Y., & Terajima, J. (2016). An interlaboratory study on efficient detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O26, O103, O111, O121, O145, and O157 in food using real-time PCR assay and chromogenic agar. *International journal of food microbiology*, 230, 81-88.
- Hara-Kudo, Y., Onoue, Y., Konuma, H., Nakagawa, H., & Kumagai, S. (1999). Comparison of enrichment procedures for isolation of *Escherichia coli* O157: H7

- from ground beef and radish sprouts. *International journal of food microbiology*, 50(3), 211-214.
- Hardy, C. D., & Cozzarelli, N. R. (2003). Alteration of *Escherichia coli* topoisomerase IV to novobiocin resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47(3), 941-947.
- Harrington, S. M., Dudley, E. G., & Nataro, J. P. (2006). Pathogenesis of enteroaggregative *Escherichia coli* infection. *FEMS microbiology letters*, 254(1), 12-18.
- Huang, D. B., Mohamed, J. A., Nataro, J. P., DuPont, H. L., Jiang, Z. D., & Okhuysen, P. C. (2007). Virulence characteristics and the molecular epidemiology of enteroaggregative *Escherichia coli* isolates from travellers to developing countries. *Journal of medical microbiology*, 56(10), 1386-1392.
- Itoh, Y., Nagano, I., Kunishima, M., & Ezaki, T. (1997). Laboratory investigation of enteroaggregative *Escherichia coli* O untypeable: H10 associated with a massive outbreak of gastrointestinal illness. *Journal of clinical microbiology*, 35(10), 2546-2550.
- Jenkins, C., van Ijperen, C., Dudley, E. G., Chart, H., Willshaw, G. A., Cheasty, T., Smith, H. R., & Nataro, J. P. (2005). Use of a microarray to assess the distribution of plasmid and chromosomal virulence genes in strains of enteroaggregative *Escherichia coli*. *FEMS microbiology letters*, 253(1), 119-124.
- Jensen, B. H., Olsen, K. E., Struve, C., Krogfelt, K. A., & Petersen, A. M. (2014). Epidemiology and clinical manifestations of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*, 27(3), 614-630.
- Jinneman, K. C., Waite-Cusic, J. G., & Yoshitomi, K. J. (2012). Evaluation of shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) method for the detection and identification of STEC O104 strains from sprouts. *Food microbiology*, 30(1), 321-328.
- Kanki, M., Seto, K., Harada, T., Yonogi, S., & Kumeda, Y. (2011). Comparison of four enrichment broths for the detection of non-O157 Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O91, O103, O111, O119, O121, O145 and O165 from pure culture and food samples. *Letters in applied microbiology*, 53(2), 167-173.

- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, 2(2), 123-140.
- Kirby, W. M., Hudson, D. G., & Noyes, W. D. (1956). Clinical and laboratory studies of novobiocin, a new antibiotic. *AMA archives of internal medicine*, 98(1), 1-7.
- Kotloff, K. L., Nataro, J. P., Blackwelder, W. C., Nasrin, D., Farag, T. H., Panchalingam, S., Wu, Y., O Sow, S., Sur, D., Breiman, R. F., Faruque, A. S. G., Zaidi, A. K. M., Saha, D., Alonso, P. L., Tamboura, B., Sanogo, D., Onwuchekwa, U., Manna, B., & Ramamurthy, T. (2013). Burden and aetiology of diarrhoeal disease in infants and young children in developing countries (the Global Enteric Multicenter Study, GEMS): a prospective, case-control study. *The Lancet*, 382(9888), 209-222.
- Kuczius, T., Bielaszewska, M., Friedrich, A. W., & Zhang, W. (2004). A rapid method for the discrimination of genes encoding classical Shiga toxin (Stx) 1 and its variants, Stx1c and Stx1d, in *Escherichia coli*. *Molecular nutrition & food research*, 48(7), 515-521.
- La Placa M. e AAVV. (2008). Principi di microbiologia medica. Ed. Esculapio, 11° edizione, pag. 244-289.
- Lacher, D. W., Steinsland, H., & Whittam, T. S. (2006). Allelic subtyping of the intimin locus (*eae*) of pathogenic *Escherichia coli* by fluorescent RFLP. *FEMS microbiology letters*, 261(1), 80-87.
- Lin, A., Sultan, O., Lau, H. K., Wong, E., Hartman, G., & Lauzon, C. R. (2011). O serogroup specific real time PCR assays for the detection and identification of nine clinically relevant non-O157 STECs. *Food microbiology*, 28(3), 478-483.
- Linhart, C., & Shamir, R. (2002). The degenerate primer design problem. *Bioinformatics*, 18(suppl 1), S172-S181.
- Madic, J., Peytavin de Garam, C., Vingadassalon, N., Oswald, E., Fach, P., Jamet, E., & Auvray, F. (2010). Simplex and multiplex real-time PCR assays for the detection of flagellar (H-antigen) *fliC* alleles and intimin (*eae*) variants associated with enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) serotypes O26: H11, O103: H2, O111: H8, O145: H28 and O157: H7. *Journal of applied microbiology*, 109(5), 1696-1705.

- Madic, J., Vingadassalon, N., de Garam, C. P., Marault, M., Scheutz, F., Brugère, H., Jamet, E., & Auvray, F. (2011). Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* serotypes O26: H11, O103: H2, O111: H8, O145: H28, and O157: H7 in raw-milk cheeses by using multiplex real-time PCR. *Applied and environmental microbiology*, 77(6), 2035-2041.
- Mancusi, R., & Trevisani, M. (2014). Enumeration of verocytotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) O157 and O26 in milk by quantitative PCR. *International journal of food microbiology*, 184, 121-127.
- Margot, H., Zwietering, M. H., Joosten, H., O'Mahony, E., & Stephan, R. (2015). Evaluation of different buffered peptone water (BPW) based enrichment broths for detection of Gram-negative foodborne pathogens from various food matrices. *International journal of food microbiology*, 214, 109-115.
- Martin, A., & Beutin, L. (2011). Characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from meat and milk products of different origins and association with food producing animals as main contamination sources. *International journal of food microbiology*, 146(1), 99-104.
- Islam, M. A., Mondol, A. S., De Boer, E., Beumer, R. R., Zwietering, M. H., Talukder, K. A., & Heuvelink, A. E. (2008). Prevalence and genetic characterization of shiga toxin-producing *Escherichia coli* isolates from slaughtered animals in Bangladesh. *Applied and environmental microbiology*, 74(17), 5414-5421.
- Morabito, S., Karch, H., Mariani-Kurkdjian, P., Schmidt, H., Minelli, F., Bingen, E., & Caprioli, A. (1998). Enterohemorrhagic, Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O111: H2 Associated with an Outbreak of Hemolytic-Uremic Syndrome. *Journal of clinical microbiology*, 36(3), 840-842.
- Nataro, J. P. (2005). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* pathogenesis. *Current opinion in gastroenterology*, 21(1), 4-8.
- Nataro, J. P., & Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews*, 11(1), 142-201.
- Nataro, J. P., Kaper, J. B., Robins-Browne, R. O. Y., Prado, V., Vial, P., & Levine, M. M. (1987). Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *The Pediatric infectious disease journal*, 6(9), 829-831.

- Nataro, J. P., Mai, V., Johnson, J., Blackwelder, W. C., Heimer, R., Tirrell, S., Tirrell, S., Edberg, S. C., Braden, C. R., Glenn Morris Jr., & Hirshon, J. M. (2006). Diarrheagenic *Escherichia coli* infection in Baltimore, Maryland, and New Haven, Connecticut. *Clinical Infectious Diseases*, 43(4), 402-407.
- Nataro, J. P., Yikang, D., Yingkang, D., & Walker, K. (1994). AggR, a transcriptional activator of aggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 176(15), 4691-4699.
- O'Hanlon, K. A., Catarama, T. M. G., Duffy, G., Blair, I. S., & McDowell, D. A. (2004). RAPID detection and quantification of *E. coli* O157/O26/O111 in minced beef by real-time PCR. *Journal of Applied Microbiology*, 96(5), 1013-1023.
- Omiccioli, E., Amagliani, G., Brandi, G., & Magnani, M. (2009). A new platform for Real-Time PCR detection of *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157 in milk. *Food Microbiology*, 26(6), 615-622.
- Pao, S., Patel, D., Kalantari, A., Tritschler, J. P., Wildeus, S., & Sayre, B. L. (2005). Detection of *Salmonella* strains and *Escherichia coli* O157: H7 in feces of small ruminants and their isolation with various media. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(4), 2158-2161.
- 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(3), 185-192.
- Perelle, S., Dilasser, F., Grout, J., & Fach, P. (2005). Detection of *Escherichia coli* serogroup O103 by real-time polymerase chain reaction. *Journal of Applied Microbiology*, 98(5), 1162-1168.
- Possé, 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(1), 227-235.
- Reischl, U., Youssef, M. T., Kilwinski, J., Lehn, N., Zhang, W. L., Karch, H., & Strockbine, N. A. (2002). Real-time fluorescence PCR assays for detection and characterization of Shiga toxin, intimin, and enterohemolysin genes from Shiga

- toxin-producing *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology*, 40(7), 2555-2565.
- Riley, L. W., Remis, R. S., Helgerson, S. D., McGee, H. B., Wells, J. G., Davis, B. R., & Blake, P. A. (1983). Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *New England Journal of Medicine*, 308(12), 681-685.
- Rossmannith P, Wagner M. (2011). A novel poisson distribution-based approach for testing boundaries of real-time PCR assays for food pathogen quantification. *J Food Prot.* 74:1404-12.
- Rossmannith, P., Fuchs, S., & Wagner, M. (2010). The fluorescence characteristics of enrichment media in the wavelength range of real-time PCR thermocycler optical path assignments. *Food analytical methods*, 3(3), 219-224.
- Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson MA, Roy SL, et al. Foodborne illness acquired in the United States---major pathogens. *Emerg Infect Dis* (2011); 17(1): 7-15.
- Scavia, G., Morabito, S., Tozzoli, R., Michelacci, V., Marziano, M. L., Minelli, F., Ferreri, C., Paglialonga, F., Edefonti, A., & Caprioli, A. (2011). Similarity of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O104: H4 strains from Italy and Germany. *Emerg Infect Dis*, 17(10), 1957-1958.
- Scavia, G., Staffolani, M., Fisichella, S., Striano, G., Colletta, S., Ferri, G., Escher, M., Minelli, F., & Caprioli, A. (2008). Enterohaggardive *Escherichia coli* associated with a foodborne outbreak of gastroenteritis. *Journal of medical microbiology*, 57(9), 1141-1146.
- Scheutz, F., Nielsen, E.M., Frimodt-Moller, J., Boisen, N., Morabito, S., Tozzoli, R., Nataro, J.P. and Caprioli, A. (2011). Characteristics of the enterohaggardive Shiga toxin/verotoxin-producing *Escherichia coli* O104: H4 strain causing the outbreak of haemolytic uraemic syndrome in Germany, May to June 2011. *Euro surveill*, 16(24), p.19889.
- Mellmann A, Caprioli A, Tozzoli R, Morabito S, Strockbine NA, Melton-Celsa AR, Sanchez M, Persson S, O'Brien AD.
- Scheutz, F., Teel, L. D., Beutin, L., Piérard, D., Buvens, G., Karch, H., Mellmann, A., Caprioli, A., Tozzoli, R., Morabito, S., Strockbine, N. A., Melton-Celsa, A. R., Sanchez, M., Persson, S., & O'Brien, A. D. (2012). Multicenter evaluation of a

- sequence-based protocol for subtyping Shiga toxins and standardizing Stx nomenclature. *Journal of clinical microbiology*, 50(9), 2951-2963.
- Smith, D. H., & Davis, B. D. (1967). Mode of action of novobiocin in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 93(1), 71-79.
- Smith, H. R., Cheasty, T., & Rowe, B. (1997). Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* and outbreaks of gastroenteritis in UK. *The Lancet*, 350(9080), 814-815.
- Son, I., Binet, R., Maounounen-Laasri, A., Lin, A., Hammack, T. S., & Kase, J. A. (2014). Detection of five Shiga toxin-producing *Escherichia coli* genes with multiplex PCR. *Food microbiology*, 40, 31-40.
- Splittstoesser D. F., Queale D. T., & Andaloro B. W. (1983). The microbiology of vegetable sprouts during commercial production. *Journal of Food Safety*, 5(2), 79-86.
- Stephens, P. J., Druggan, P., & Nebe-von Caron, G. (2000). Stressed Salmonella are exposed to reactive oxygen species from two independent sources during recovery in conventional culture media. *International journal of food microbiology*, 60(2), 269-285.
- Stewart, D., Reineke, K., Ulaszek, J., Fu, T., & Tortorello, M. (2001). Growth of *Escherichia coli* O157: H7 during sprouting of alfalfa seeds. *Letters in applied microbiology*, 33(2), 95-99.
- Tahamtan, Y., Hayati, M., & Namavari, M. M. (2010). Prevalence and distribution of the stx1, stx2 genes in Shiga toxin producing *E. coli* (STEC) isolates from cattle. *Iranian journal of microbiology*, 2(1), 9-14.
- Tozzoli, R., & Scheutz, F. (2014). Diarrhoeagenic *Escherichia coli* infections in humans. *Pathogenic Escherichia Coli, Molecular and Cellular Microbiology*, 1-18.
- Tozzoli, R., Grande, L., Michelacci, V., Ranieri, P., Maugliani, A., Caprioli, A., & Morabito, S. (2014). Shiga toxin-converting phages and the emergence of new pathogenic *Escherichia coli*: a world in motion. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 4, 80.
- Tzschoppe, M., Martin, A., & Beutin, L. (2012). A rapid procedure for the detection and isolation of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC) serogroup O26, O103,

- O111, O118, O121, O145 and O157 strains and the aggregative EHEC O104: H4 strain from ready-to-eat vegetables. *International journal of food microbiology*, 152(1), 19-30.
- Uemura, R., Sueyoshi, M., Nagayoshi, M., & Nagatomo, H. (2003). Antimicrobial Susceptibilities of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Isolates from Pigs with Edema Disease in Japan. *Microbiology and immunology*, 47(1), 57-61.
- USDA-FSIS. 2011. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in certain raw beef products, Proposed Rule. U.S. Department of Agriculture, Food Safety and Inspection Service. Code of Federal Regulations. Fed. Regist. 76(182):58157-58165.
- Van Duynhoven, Y. T. H. P., Friesema, I. H. M., Schuurman, T., Roovers, A., Van Zwet, A. A., Sabbe, L. J. M., & Heilmann, F. G. C. (2008). Prevalence, characterisation and clinical profiles of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in The Netherlands. *Clinical Microbiology and Infection*, 14(5), 437-445.
- 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(3), 235-241.
- 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(1), 49-55.
- 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(3), 326-331.
- Vimont, A., Vernozy-Rozand, C., & Delignette-Muller, M. L. (2006). Isolation of *E. coli* O157: H7 and non-O157 STEC in different matrices: review of the most commonly used enrichment protocols. *Letters in applied microbiology*, 42(2), 102-108.

- Viswanathan, P., & Kaur, R. (2001). Prevalence and growth of pathogens on salad vegetables, fruits and sprouts. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 203(3), 205-213.
- Wang, F., Yang, Q., Kase, J. A., Meng, J., Clotilde, L. M., Lin, A., & Ge, B. (2013). Current trends in detecting non-O157 shiga toxin-producing *Escherichia coli* in food. *Foodborne pathogens and disease*, 10(8), 665-677.
- Wanke, C. A., Mayer, H., Weber, R., Zbinden, R., Watson, D. A., & Acheson, D. (1998). Enteroaggregative *Escherichia coli* as a potential cause of diarrheal disease in adults infected with human immunodeficiency virus. *Journal of Infectious Diseases*, 178(1), 185-190.
- Wanke, C. A., Mayer, H., Weber, R., Zbinden, R., Watson, D. A., & Acheson, D. (1998). Enteroaggregative *Escherichia coli* as a potential cause of diarrheal disease in adults infected with human immunodeficiency virus. *Journal of Infectious Diseases*, 178(1), 185-190.
- Wasilenko, J. L., Fratamico, P. M., Narang, N., Tillman, G. E., Ladely, S., Simmons, M., & Cray Jr, W. C. (2012). Influence of primer sequences and DNA extraction method on detection of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in ground beef by real-time PCR targeting the *eae*, *stx*, and serogroup-specific genes. *Journal of Food Protection*®, 75(11), 1939-1950.
- Wasilenko, J. L., Fratamico, P. M., Sommers, C., DeMarco, D. R., Varkey, S., Rhoden, K., & Tice, G. (2014). Detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) O157: H7, O26, O45, O103, O111, O121, and O145, and *Salmonella* in retail raw ground beef using the DuPont™ BAX® system. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 4.
- Weagant, S. D., Bryant, J. L., & Jinneman, K. G. (1995). An improved rapid technique for isolation of *Escherichia coli* O157: H7 from foods. *Journal of Food Protection*®, 58(1), 7-12.
- Weagant, S. D., Jinneman, K. C., Yoshitomi, K. J., Zapata, R., & Fedio, W. M. (2011). Optimization and evaluation of a modified enrichment procedure combined with immunomagnetic separation for detection of *E. coli* O157: H7 from artificially contaminated alfalfa sprouts. *International journal of food microbiology*, 149(3), 209-217.

- Whittam, T. S., Wolfe, M. L., Wachsmuth, I. K., Orskov, F., Orskov, I., & Wilson, R. A. (1993). Clonal relationships among *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis and infantile diarrhea. *Infection and Immunity*, *61*(5), 1619-1629.
- Wilson, I. G. (1997). Inhibition and facilitation of nucleic acid amplification. *Appl Environ Microbiol* *63*:3741–3751.

## REGOLAMENTI E SITOGRAFIA

BAM (Bacteriological Analytical Manual), 8th edition. U.S. Food and Drug Administration (Revised, Chapter 4A, <http://www.fda.gov/Food/FoodScienceResearch/LaboratoryMethods/ucm070080.htm> (accessed 8.16.13)).

Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs.

Commission Regulation (EU) No 209/2013 of 11 March 2013 amending Regulation (EC) No 2073/2005 as regards microbiological criteria for sprouts and the sampling rules for poultry carcasses and fresh poultry meat.

ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), 2013. Surveillance of food- and waterborne diseases in the EU/EEA – 2006–2009. Stockholm: ECDC, 2013.

EU RL\_Method\_05\_Rev 1, Detection of Enteroaggregative *Escherichia coli* in food by Real Time PCR amplification of the *aggR* and *aaiC* genes.

EU-RL VTEC\_Method\_02\_Rev\_0, 2013. “Identification and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) by Real Time PCR amplification of the main virulence genes and the genes associated with the serogroups mainly associated with severe human infections”

EU-RL VTEC\_Method\_04\_Rev 1, Detection and identification of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) O104:H4 in food by Real Time PCR.

International Organization for Standardization. 2001. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection of *Escherichia coli* O157. ISO16654:2001. International Organization for Standardization, Geneva.

International Organization for Standardization. 2003. Microbiology of food and animal feeding stuff – Protocol for the validation of alternative methods. ISO16140:2003. International Organization for Standardization, Geneva.

International Organization for Standardization. 2012. Microbiology of food and animal feed -- Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens -- Horizontal method for the detection of Shiga toxin-

producing *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups. 1st ed. ISO/TS13136:2012 (E). International Organization for Standardization, Geneva.

USDA-FSIS MLG 5.08 “Detection, Isolation and Identification of *Escherichia coli* O157:H7 from Meat Products and Carcass and Environmental Sponges”.

USDA-FSIS MLG 5A.04. FSIS Procedure for the Use of *Escherichia coli* O157:H7 Screening Tests for Meat Products and Carcass and Environmental Sponges. *In* Microbiology Laboratory Guidebook. Available at: <http://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/6d1b7f96-1db7-4b0d-8081-e861206aedab/MLG-5A.pdf?MOD=AJPERES>. Accessed 17 May 2016.

USDA-FSIS MLG 5B.05 (Detection and Isolation of non-O157 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) from Meat Products and Carcass and Environmental sponges. *In* Microbiology Laboratory Guidebook, chapter 5B.05. Available at: <http://www.fsis.usda.gov/wps/wcm/connect/7ffc02b5-3d33-4a79-b50c-81f208893204/MLG-5B.pdf?MOD=AJPERES>. Accessed on May 17 2016.

EURL VTEC, [www.iss.it/vtec](http://www.iss.it/vtec)

FoodNet, <http://www.cdc.gov/foodnet/reports/annual-reports-2014.html>

EFSA, [www.efsa.europa.eu/it](http://www.efsa.europa.eu/it)

OligoAnalyzer 3.1, <http://eu.idtdna.com/calc/analyzer>

National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

BLAST Basic Local Alignment Search Tool, <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>

ClustalW2 Multiple Sequence Alignment Basic Local Alignment Search Tool, [www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/)

NCBI, [www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/browse)

# RINGRAZIAMENTI

---

VORREI RIVOLGERE UN RINGRAZIAMENTO ALL'AZIENDA DIATHEVA SRL CHE HA SUPPORTATO QUESTO STUDIO ED HA COFINANZIATO LA BORSA DI DOTTORATO ATTRAVERSO IL PROGETTO EUREKA.

UN ALTRO RINGRAZIAMENTO ALLA REGIONE MARCHE PER ANALOGO CONTRIBUTO ALLA BORSA DI DOTTORATO ATTRAVERSO IL PROGETTO EUREKA.

INOLTRE VORREI RINGRAZIARE LA DOTT.SSA PINA FRATAMICO PER LA DISPONIBILITA' E L'OPPORTUNITA' CONCESSAMI DI SVOLGERE UN BREVE PERIODO DI RICERCA PRESSO I LABORATORI DEL US DEPARTMENT OF AGRICULTURE-FOOD SAFETY AND INSPECTION SERVICE.