

Ricerca di patogeni mediante tecniche biomolecolari Escherichia coli

Biotechnologie applicate all'ispezione
degli alimenti di origine animale

Dip. di Medicina Veterinaria e Produzioni animali

tiziana.pepe@unina.it

- Riconoscimento di specie patogene quali:
 - Virus
 - Batteri
 - Protozoi
 - Miceti
- Per il controllo delle frodi alimentari
 - Sostituzione di specie
 - Omissione di dichiarazione (specie, OGM)

Famiglia: Enterobacteriaceae

Genere : Escherichiae

Specie : coli,blattali,fergusoni, hermani,vulneris, adecarboxylate

E. coli comprende ceppi saprofiti e **ceppi patogeni** che provocano:

negli animali: - mastiti bovine - setticemie emorragiche nei suini

nell'uomo: - sindromi uremico-emolitiche - meningiti - setticemie - malattie immunologiche - artrite reumatoide - forme enteriche

Si classificano in base a:

- virulenza
- modalità d'azione sulla mucosa intestinale
- epidemiologia e sintomatologia clinica indotta

I ceppi di E. coli patogeni si differenziano in:

- **ETEC** - E. coli enterotossigeni (causa della diarrea del viaggiatore)
- **EPEC** - E. coli enteropatogeni (diarrea infantile)
- **EIEC** - E. coli enteroinvasivi (diarrea acquosa)
- **EHEC** - E. coli enteroemorragici (diarrea emorragica)

Tra gli E.coli enteroemorragici si distingue il

Sottogruppo VTEC

Detti così in quanto produttori di verocitossine (**VT1** e **VT2**).

Le VT provocano effetto citopatico sulle cellule Vero ed HeLa.

All'interno del sottogruppo VTEC si distinguono:

E. coli produttori di tossine

- a) in traccia
- b) a bassi livelli
- c) ad alti livelli

Il capostipite dei VTEC è **E. coli O157:H7**

Corto batterio bastoncellare Gram -, mobile o immobile

Il sierotipo O157: H7 possiede caratteri biochimici comuni alla specie E. coli

- ossidasi -
- *Voges-Proskauer* -
- catalasi +
- indolo +
- rosso metile +
- lattosio fermentante
- aerobio-anaerobio facoltativo

- **Incapacità a fermentare il sorbitolo**

(80.3% dei ceppi di *E. coli* sono sorbitolo fermentanti)

- **Assenza dell'enzima b-glucoronidasi**

(96.0 % dei ceppi di *E. coli* sono b- glucoronidasi +)

N.B. esistono alcuni stipiti di O157:H7 sorbitolo fermentanti e b-glucoronidasi +

- **Resistenza termica:** da -20° C a +40° C

Possiedono Heat Shock Proteins -HSPs- (pool di proteine)

- **pH di crescita:** da 3.5 a 9.0

- **Geni produttori di verocitossine indicate come VT1 e VT2**

Le verocitossine possiedono una **subunità A attiva e cinque subunità B che legano i recettori di membrana** (costituiti dal ceramide GB3)

- **Locus LEE**
(Locus di produzione della proteina Adesina che lega e riduce ad un tappeto cellulare gli enterociti)
- **Plasmide 60 MDa**
(che codifica per fimbrie ed enteroemolisine)
- **Gene flic**
(che codifica per l'antigene flagellare)
- **pili di adesione**

- Il serbatoio principale è il **BOVINO ADULTO** sano;
accanto a Suini, Avicoli e Ovini
- Le vie di trasmissione sono gli **alimenti contaminati**, ma esiste anche possibilità di trasmissione **da persona a persona**
- Le maggiori **fonti di contagio** per l'uomo sono
 - carne bovina macinata (hamburger)
 - latte non pastorizzato o ricontaminato
 - verdure
 - maionese (pH 3,6- 3,9)
 - formaggi
 - sidro di mele (pH 3,7- 3,9)
 - arrosto di tacchino.

•I fattori che influenzano la proliferazione intestinale di E. coli O157 H7 e la loro escrezione sono:

- Lo svezzamento
- Il cambiamento nella composizione della dieta
- Il digiuno
- Il trasporto
- Le malattie

- L' infezione si contrae per os
- Il periodo di incubazione è di 4- 8 gg.
- La sede di colonizzazione del patogeno è il colon
- Le modalità di infezione sono dette attaching-effacing
- Il meccanismo patogeno avviene mediante la produzione di tossine
- La sede d'elezione dell'infezione sono le cellule endoteliali del microcircolo di rene e colon.

L'infezione da E. coli O157H7 si può manifestare in forme e sintomatologie diverse.
Le più comuni sono:

Forma asintomatica

Nessun sintomo

Colite emorragica

Crampi addominali, diarrea acquosa, diarrea emorragica
nausea, vomito, febbre
assente o poca elevata

Sindrome emolitica uremica (HUS)*(triade sintomatologica)

Insufficienza renale acuta,
piastrinopenia, anemi emolitica
microangiopatica, complicanze al
SNC e al miocardio.

*evoluzione del 5-10% dei casi di colite emorragica,
sono colpiti i pazienti immunodepressi, anziani e bambini

Porpora trombocitica trombocitopenica (PTT)

Sintomi simili a HUS con
coinvolgimento del SNC,
anemia emolitica microangiopatica,
grave trombocitopenia,
manifestazioni neurologiche
variabili, febbre e bassa azotemia
ALTA MORTALITA'

La ricerca viene effettuata su terreno liquido arricchito con sostanze ad attività antibiotica

I terreni più utilizzati sono:

- modified Tryptone Soya Broth -mTSB- con addizione di novobiocina o di acriflavina
- Bacto@ modified Ec Medium

Un'altra tecnica è l' Immunoseparazione magnetica

in cui si utilizzano anticorpi specifici per l'antigene O157 adesi a supporti magnetici

Oppure si effettua una semina del batterio su terreno solido selettivo differenziale

Si usa:

- Sorbitol MacConkey agar (SMCA)
(sostituzione del lattosio del MCA con D-sorbitolo 0.1%)

Interpretazione dei risultati:

- **colonie sorbitolo** - sospette O157:H7
(falsi positivi: ceppi di E. coli e altri generi non fermentanti)
- **colonie sorbitolo +** con colorazione rosso porpora
(falsi negativi: ceppi di O157:H7 sorbitolo fermentanti di cui non è ancora nota la prevalenza)

Si possono effettuare anche:

Test fluorogeno basato sull'impiego del MUG

(4-metilumbelliferil beta-D-glucuronide)

Il substrato fluorogeno (MUG) forma macchie fluorescenti (sotto luce UV) attorno all'E.Coli (batteri produttori di beta-glucoronidasi)

Test cromogeno basato sull'impiego del BCIG

(5-Br-4-Cl-3-indolil- β -D-glucuronide)

Il metodo permette di contare il numero delle colonie di *E. coli* cresciute su una membrana posta su terreno agarizzato addizionato con sostanze cromogene.

Altri test biochimici

- Sistemi Api 20E (bioMèrieux)
- Enterotubo (Roche)
- Microbact 12A (MedVet)

Identificazione dei microrganismi sospetti in base a caratteristiche immunologiche

Si usano:

- Kit di agglutinazione al lattice del sierogruppo O157 (latex test)
- Specifici antisieri per l'antigene flagellare H7 di E. Coli

Tra i metodi innovativi di ricerca dell' E.Coli O157H7 vi è:

**Identificazione e differenziazione nell'ambito dei
VTEC del ceppo O157:H7 attraverso
l'uso di sonde oligonucleotidiche (PCR)**

Tale metodica presenta

- **Alta sensibilità**

possibilità di ritrovamento del patogeno anche a basse concentrazioni

- **Alta specificità**

il numero di eventuali falsi positivi è molto limitato

- **Ampia versatilità**

possibilità di identificare altri sierotipi VTEC

- **Rapidità di esecuzione**

- La tradizionale tecnica PCR consente di identificare singoli tratti del genoma

- La PCR, applicata dopo coltura di prearricchimento, permette di identificare negli alimenti i ceppi batterici patogeni in 2-4 h.

La **PCR *multiplex*** è in grado di evidenziare in un'unica reazione di amplificazione numerosi loci genici.

L'uso della PCR multiplex risulta molto utile per caratterizzare il sierotipo O157:H7 di E. coli, in quanto permette di identificare le espressioni geniche correlate ai suoi fattori di virulenza.

I tratti genomici amplificati per la caratterizzazione di E. coli O157H7 frammenti di geni che codificano per i fattori di virulenza del batterio:

- **Regione upstream del gene eaeA** (primers SZ) (Meng et al., 1996)
- **Gene eaeA** (attaching and effacing) (primers C) (Sandhu et al., 1996)
- **Geni di verocitossine** (SLT-I e SLT-II)
- **DNA Plasmidico** (50-70 MDa) (Fratamico et al., 1993)
- **Antigene H7** (flagellare) (Gannon et al., 1997)

L' **estrazione del DNA** avviene a partire da **culture pure** e viene effettuata mediante lisi cellulare per **shock termico**.

I **Primers** scelti per la PCR sono:

- **SLT-1** (210 bp) per **VT1** (Meng et al., 1995)
- **SLT-2** (484 bp) per **VT2** (Meng et al., 1995)
- **MFS-I** (166 bp) per **DNA plasmidico** (Fratamico et al., 1995)
- **FLICH7** (650 bp) per l'**antigene H7** (Gannon et al., 1997)

La fase finale prevede l'analisi dei prodotti dell'amplificazione attraverso corsa elettroforetica su gel di agarosio

Nell'immagine :

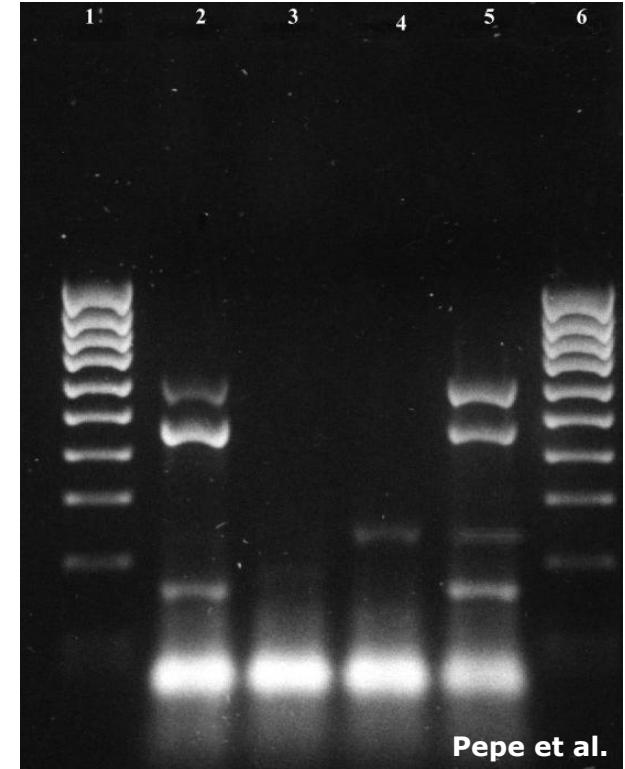
Pozzetti 1, 6: Ladder 100 bp

Pozzetto 2: Ceppo E.coli E32511

Pozzetto 3: Ceppo E.coli E-D 228

Pozzetto 4 : Ceppo E.coli H30

Pozzetto 5: Ceppo E.coli EDL 933



**Elettroforesi delle colture pure di
E.Coli O157H7**

Nelle premesse si legge che:

Il CSMVSP ha emesso il 21 e 22 gennaio 2003 un parere sulla presenza di E. coli produttori di verocitossine (VTEC) negli alimenti, nel quale reputa poco probabile che **l'applicazione a VTEC O157 di una norma microbiologica per prodotti finali produca una riduzione significativa dei rischi connessi per i consumatori.** Tuttavia, la definizione di linee guida microbiologiche intese a ridurre la contaminazione fecale lungo la catena alimentare può contribuire a ridurre i rischi per la salute pubblica, compresi quelli associati ai VTEC. Il CSMVSP ha individuato le seguenti categorie alimentari per le quali i VTEC rappresentano un pericolo per la salute pubblica:

la **carne di manzo cruda o poco cotta** ed eventualmente la carne di altri ruminanti, la **carne macinata**, la **carne di manzo fermentata** e i prodotti derivati, il **latte crudo e i prodotti a base di latte crudo**, i **prodotti freschi**, in particolare i semi germogliati e i **succhi di frutta e di ortaggi non pastorizzati.**