



FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE E ZOOTECHNICHE
BRESCIA

ESCHERICHIA COLI

UNA SCOPERTA CONTINUA

Maurizio Zavanella

EDITO A CURA DELLA
FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE
E ZOOTECHNICHE - BRESCIA

76

ESCHERICHIA COLI

Nella stessa collana sono stati pubblicati i seguenti volumi:

- 1 - 1979 Infezioni respiratorie del bovino
- 2 - 1980 L'oggi e il domani della sulfamidoterapia veterinaria
- 3 - 1980 Ormoni della riproduzione e Medicina Veterinaria
- 4 - 1980 Gli antibiotici nella pratica veterinaria
- 5 - 1981 La leucosi bovina enzootica
- 6 - 1981 La «Scuola per la Ricerca Scientifica» di Brescia
- 7 - 1982 Gli indicatori di Sanità Veterinaria nel Servizio Sanitario Nazionale
- 8 - 1982 Le elmintiasi nell'allevamento intensivo del bovino
- 9 - 1983 Zoonosi ed animali da compagnia
- 10 - 1983 Le infezioni da *Escherichia coli* degli animali
- 11 - 1983 Immunogenetica animale e immunopatologia veterinaria
- 12 - 1984 5° Congresso Nazionale Associazione Scientifica di Produzione Animale
- 13 - 1984 Il controllo delle affezioni respiratorie del cavallo
- 14 - 1984 1° Simposio Internazionale di Medicina veterinaria sul cavallo da competizione
- 15 - 1985 La malattia di Aujeszky. Attualità e prospettive di profilassi nell'allevamento suino
- 16 - 1986 Immunologia comparata della malattia neoplastica
- 17 - 1986 6° Congresso Nazionale Associazione Scientifica di Produzione Animale
- 18 - 1987 Embryo transfer oggi: problemi biologici e tecnici aperti e prospettive
- 19 - 1987 Coniglicoltura: tecniche di gestione, ecopatologia e *marketing*
- 20 - 1988 Trentennale della Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche di Brescia, 1956-1986
- 21 - 1989 Le infezioni erpetiche del bovino e del suino
- 22 - 1989 Nuove frontiere della diagnostica nelle scienze veterinarie
- 23 - 1989 La rabbia silvestre: risultati e prospettive della vaccinazione orale in Europa
- 24 - 1989 Chick Anemia ed infezioni enteriche virali nei volatili
- 25 - 1990 Mappaggio del genoma bovino
- 26 - 1990 Riproduzione nella specie suina
- 27 - 1990 La nube di Chernobyl sul territorio bresciano
- 28 - 1991 Le immunodeficienze da retrovirus e le encefalopatie spongiformi
- 29 - 1991 La sindrome chetotica nel bovino
- 30 - 1991 Atti del convegno annuale del gruppo di lavoro delle regioni alpine per la profilassi delle mastiti
- 31 - 1991 Allevamento delle piccole specie
- 32 - 1992 Gestione e protezione del patrimonio faunistico
- 33 - 1992 Allevamento e malattie del visone
- 34 - 1993 Atti del XIX Meeting annuale della S.I.P.A.S., e del Convegno su Malattie dismetaboliche del suino
- 35 - 1993 Stato dell'arte delle ricerche italiane nel settore delle biotecnologie applicate alle scienze veterinarie e zootecniche - Atti 1a conferenza nazionale
- 36 - 1993 Argomenti di patologia veterinaria
- 37 - 1994 Stato dell'arte delle ricerche italiane sul settore delle biotecnologie applicate alle scienze veterinarie e zootecniche
- 38 - 1995 Atti del XIX corso in patologia suina e tecnica dell'allevamento
- 39 - 1995 Quale bioetica in campo animale? Le frontiere dell'ingegneria genetica

- 40 - 1996 Principi e metodi di tossicologia in vitro
- 41 - 1996 Diagnostica istologica dei tumori degli animali
- 42 - 1998 Umanesimo ed animalismo
- 43 - 1998 Atti del Convegno scientifico sulle enteropatie del coniglio
- 44 - 1998 Lezioni di citologia diagnostica veterinaria
- 45 - 2000 Metodi di analisi microbiologica degli alimenti
- 46 - 2000 Animali, terapia dell'anima
- 47 - 2001 Quarantacinquesimo della Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche di Brescia, 1955- 2000
- 48 - 2001 Atti III Convegno Nazionale di Storia della Medicina Veterinaria
- 49 - 2001 Tipizzare le salmonelle
- 50 - 2002 Atti della giornata di studio in cardiologia veterinaria
- 51 - 2002 La valutazione del benessere nella specie bovina
- 52 - 2003 La ipofertilità della bovina da latte
- 53 - 2003 Il benessere dei suini e delle bovine da latte: punti critici e valutazione in allevamento
- 54 - 2003 Proceedings of the 37th international congress of the ISAE
- 55 - 2004 Riproduzione e benessere in conigliocultura: recenti acquisizioni scientifiche e trasferibilità in campo
- 56 - 2004 Guida alla diagnosi necroscopica in patologia suina
- 57 - 2004 Atti del XXVII corso in patologia suina e tecnica dell'allevamento
- 58 - 2005 Piccola storia della Medicina Veterinaria raccontata dai francobolli
- 59 - 2005 IV Congresso Italiano di Storia della Medicina Veterinaria
- 60 - 2005 Atti del XXVIII corso in patologia suina e tecnica dell'allevamento
- 61 - 2006 Atlante di patologia cardiovascolare degli animali da reddito
- 62 - 2006 50° Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche di Brescia, 1955- 2005
- 63 - 2006 Guida alla diagnosi necroscopica in patologia del coniglio
- 64 - 2006 Atti del XXIX corso in patologia suina e tecnica dell'allevamento
- 65 - 2006 Proceedings of the 2nd International Equitation Science Symposium
- 66 - 2007 Piccola storia della Medicina Veterinaria raccontata dai francobolli - II edizione
- 67 - 2007 Il benessere degli animali da reddito: quale e come valutarlo
- 68 - 2007 Proceedings of the 6th International Veterinary Behaviour Meeting
- 69 - 2007 Atti del XXX corso in patologia suina
- 70 - 2007 Microbi e alimenti
- 71 - 2008 V Convegno Nazionale di Storia della Medicina Veterinaria
- 72 - 2008 Proceedings of the 9th world rabbit congress
- 73 - 2008 Atti Corso Introduttivo alla Medicina non Convenzionale Veterinaria
- 74 - 2008 La biosicurezza in veterinaria
- 75 - 2009 Atlante di patologia suina

FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE E ZOOTECHNICHE
- BRESCIA -

Direttore scientifico: Prof. E. LODETTI

ESCHERICHIA COLI

UNA SCOPERTA CONTINUA

MAURIZIO ZAVANELLA

Collaboratori:

VITTORIO SAMBRI

LUISA MIRAGLIOTTA

FEDERICA CAROLI

GIUSEPPE RAVIZZOLA

RENZO MIONI

SALVATORE CATANIA

RICCARDO MULIARI

GABRIELLA CONEDERA

SILVIA TAGLIABUE

MARIO D'INCAU

EDITO A CURA DELLA
FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE
E ZOOTECHNICHE - BRESCIA
Via Istria, 3/b - 25125 Brescia

ISBN 978-88-902814-9-5

© Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche - Brescia, giugno 2009

Tipografia Camuna - Brescia 2009

NOTE BIOGRAFICHE DEGLI AUTORI

MAURIZIO ZAVANELLA Biologo, laureato a Padova, ha lavorato dal 1966 al 1998 presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna – Sede Centrale di Brescia – dirigendo il Dipartimento di Batteriologia. Dal 1968 ha prodotto sieri diagnostici per colì e salmonelle, iniziandone la tipizzazione. Nel 1972 ha allestito il Reparto di Microbiologia degli Alimenti.

VITTORIO SAMBRI Medico, Professore Associato di Microbiologia dell'Università degli Studi di Bologna – Dipartimento di Ematologia e Oncologia – Reparto di Microbiologia.

LUISA MIRAGLIOTTA Biotecnologa dell'Università degli Studi di Bari, Specializzanda in Patologia Clinica presso l'Università degli Studi di Bologna.

FEDERICA CAROLI Biologa presso l'U.O. di Microbiologia dell'Università degli Studi di Bologna.

GIUSEPPE RAVIZZOLA Biologo del Laboratorio di Microbiologia e Virologia dell'Ospedale Civile di Brescia. Si occupa di diagnostica delle malattie ad eziologia batterica e vanta una lodevole conoscenza pratica dei metodi d'analisi. Ha pubblicato vari lavori dedicati, tra l'altro, all'azione dei farmaci sui batteri e al fenomeno dell'antibiotico-resistenza.

RENZO MIONI Laureato in Scienze Biologiche all'Università di Padova nel 1976, ha acquisito una notevole esperienza nel controllo igienico-sanitario degli alimenti di origine animale finalizzato alla sicurezza alimentare. È autore di numerose pubblicazioni sui patogeni intestinali trasmessi con gli alimenti e sui colì, sia nelle carni che nei molluschi bivalvi allevati e commercializzati nella Regione Veneto. Dirige la Struttura Complessa di Microbiologia Alimentare presso l'Istituto Zooprofilattico delle Venezie di Legnaro (Padova).

SALVATORE CATANIA Dirigente Veterinario nella Struttura Complessa Territoriale per l'area diagnostica di Padova presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie – Sede Centrale di Legnaro (Padova). La sua attività è mirata all'avicoltura, compreso il settore delle specie aviarie d'affezione e ornamentali.

RICCARDO MULIARI Dirigente Veterinario nella Struttura Complessa Territoriale per l'area diagnostica di Verona dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie. Data la zona di competenza, la sua attività di laboratorio è concentrata soprattutto sui problemi sanitari legati agli allevamenti avicoli.

GABRIELLA CONEDERA Dirigente Veterinario, dirige la Struttura Complessa Territoriale per l'area diagnostica di Pordenone dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie. Nella sua carriera si è dedicata con passione alla diagnosi e allo studio epidemiologico delle malattie enteriche dei bovini, con particolare riguardo al problema del colì O157:H7.

SILVIA TAGLIABUE Biologa, dirige il Reparto di Batteriologia Specializzata presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna – Sede Centrale di Brescia. Relativamente alla diagnostica dei colì, è responsabile degli aspetti analitici ed epidemiologici connessi all'attività di identificazione, tipizzazione e sensibilità ai farmaci, compiti istituzionali del Reparto.

MARIO D'INCAU Veterinario nel Reparto di Batteriologia Specializzata dell'Istituto Zoo-profilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna – Sede Centrale di Brescia. Già Veterinario Ufficiale dell'ASL di Chioggia (VE), unisce alla pratica di laboratorio la sua esperienza professionale sui problemi d'allevamento dei suini.

PREFAZIONE

Il dottor Maurizio Zavanella, da tanti anni stretto collaboratore della Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche di Brescia e appassionato microbiologo, ci ha proposto di dare alla stampa un nuovo “Quaderno” dal titolo: “Escherichia coli, una scoperta continua” che andrà ad arricchire e aggiornare le problematiche di questo antico ma sempre attuale agente patogeno, sia in medicina umana che in medicina veterinaria.

Il “Quaderno” è dedicato ai cultori della materia: medici, veterinari, biologi, specializzandi e ai giovani che frequentano i Corsi di Laurea per Tecnici di Laboratorio Biomedico e Tecnici della Prevenzione.

La Fondazione esprime al dottor Zavanella il più sincero ringraziamento per questa nuova fatica, che certamente seguirà il successo dei precedenti lavori: “Metodi per l’analisi microbiologica degli alimenti” edito nel 2000, “Tipizzare le salmonelle” edito nel 2001, “Microbi ed alimenti” edito nel 2008, tutti andati rapidamente in esaurimento.

La Fondazione si augura, ma ne è certa, che questo nuovo elaborato del dottor Zavanella sarà apprezzato da tutti gli operatori del settore.

**Il Segretario Generale
dr. Stefano Capretti**

PREMESSA

Per quasi un secolo l'enigma di un microbo - ora innocuo ora patogeno - ha appassionato la scienza medica e veterinaria, contribuendo non poco allo sviluppo dell'epidemiologia in senso moderno.

Dopo le conoscenze acquisite da studi di biochimica e sierologia, una serie di scoperte sulla capacità di aderire alle cellule, invaderle e ucciderle formando tossine, ha permesso di valutare meglio la potenzialità aggressiva del coli, specie verso bambini e animali nei primi anni di vita.

Anche se oggi l'igiene e gli antibiotici permettono di controllare meglio l'infezione, la comparsa di nuovi sierotipi virulenti mantiene alto l'interesse degli infettivologi per questo microrganismo.

Forse la storia del coli, intrecciata con le ricerche sulla qualità dell'acqua e del latte, testimonia il più grande sforzo fatto dai batteriologi per inventare terreni e metodi diagnostici sempre più raffinati.

Ragioni sufficienti per stimolare gli specialisti a rivisitare un argomento quanto mai suggestivo, cercando di semplificarlo per invitare i più giovani a continuarne lo studio.

INDICE

Parte Prima - Teoria

Cenni su alcune ricerche storicamente importanti	3
Metodiche di laboratorio	4
Posizione tassonomica e caratteri principali	6
Struttura antigene	6
Classificazione dei ceppi patogeni	7
Meccanismi di patogenicità e fattori di virulenza	8
Adesività	8
Invasività	9
Produzione di tossine	10
Altri fattori di virulenza	11
Reazioni difensive degli organismi viventi aggrediti	12
Sindromi cliniche nell'uomo	13
Setticemia	13
Infezioni del tratto urinario	14
Meningiti neonatali	14
Gastroenteriti	14
Ceppi ETEC	14
Ceppi EPEC	15
Ceppi EIEC	15
Ceppi EHEC	15
Ceppi EAEC	15
Ceppi DAEC	15
Colibacillosi in veterinaria	17
Diagnosi di colibacillosi negli animali d'allevamento	17
Colibacillosi nel bovino	18
Il problema del sierotipo O157:H7 nel bovino	19
Colibacillosi nel suino	22
Diarrea neonatale	22
Diarrea pre-svezzamento	22
Diarrea post-svezzamento	23
Gastroenterite emorragica	23
Malattia degli edemi	23
Colibacillosi sistemica	24
Coli patogeni per i volatili	25
Sierogruppi	26
Proprietà biochimiche	26
Fattori di colonizzazione	26
Fimbrie	26
Sistemi di acquisizione del ferro: aerobactina	27
Resistenza al siero	27
Tossine	27
Ceppi enteropatogeni (EPEC) nel coniglio	27
Coli patogeni nel cane e nel gatto	29
Alcuni dati statistici sulla distribuzione dei coli negli animali	30

Antibiotici e antibiotico-resistenza	32
Alimenti contaminati da <i>E. coli</i>	35
Dati statistici	35
Norme	36
Prevenzione.....	38

Parte Seconda - Pratica di laboratorio

Tecniche colturali tradizionali per isolare <i>Escherichia coli</i>	41
Terreni batteriologici più datati	41
Terreni liquidi e solidi: dai brodi per i conteggi con il metodo MPN ai substrati selettivi e/o differenziali per analisi quantitative su alimenti	42
Terreni cromogenici e fluorogenici	43
Terreni per l'isolamento di <i>Escherichia coli</i> O157:H7.....	46
Metodi di referenza per la ricerca del coli in microbiologia alimentare	48
Alimenti e mangimi.....	48
<i>ISO 16649-2 (2001)</i>	48
<i>ISO 16649-3 (2005)</i>	48
Acque potabili	48
<i>UNI EN ISO 9308-1 (2000)</i>	48
Ambienti e superfici di lavorazione degli alimenti.....	49
<i>ISO 18593 (2004) + ISO 16649-2 (2001)</i>	49
Metodi alternativi e innovativi in diagnostica.....	50
<i>Kit</i> per MPN.....	50
Immuno-separazione magnetica (IMS).....	51
Concentrazione dei batteri su membrana filtrante (MF)	51
Sistemi Petrifilm® / Compact Dry® / Rida Count®	52
Immunoenzimatica	53
Immunofluorescenza	54
Impedometria.....	55
Amplificazione genica e sonde molecolari.....	55
Ricerca degli anticorpi nel siero	57
Identificazione biochimica.....	58
Adesività e invasività.....	59
Ricerca delle adesine	59
Agglutinazioni rapide su vetrino	59
<i>Agglutinazione rapida su vetrino per la dimostrazione di adesine K88</i>	59
<i>Agglutinazione rapida su vetrino per la dimostrazione di adesine K99</i>	60
<i>Agglutinazione rapida su vetrino per la dimostrazione di adesine P987</i>	60
Emoagglutinazione in presenza di D-mannosio	60
Test di invasività.....	61
<i>Test di Sereny su topo</i>	61
Tipizzazione dei coli	62
Sierotipizzazione O.....	62
<i>Metodo dell'agglutinazione lenta in piastra (secondo Blanco e Coll., 1993)</i>	62
<i>Metodo dell'Istituto Superiore di Sanità, Roma (2008)</i>	63
Preparazione dei sieri diagnostici.....	63
<i>Sieri anti-O</i>	63

<i>Siero anti-K88</i>	65
<i>Siero anti-K99</i>	65
<i>Siero anti-987P</i>	65
<i>Siero anti-CFA</i>	66
<i>Siero anti-F41</i>	66
<i>Siero anti-Att25</i>	67
<i>Adsorbimento dei sieri</i>	67
Biotipi	68
Fagotipi	68
Test per riconoscere le tossine	69
Tossina ST	69
<i>Kit in ELISA</i>	69
<i>Agglutinazione al lattice</i>	70
Tossina LT	70
<i>Prove in vitro su colture di tessuti</i>	70
<i>Immunodiffusione in agar-gel (Biken test)</i>	70
<i>Reverse Passive Latex Agglutination Test</i>	70
<i>Coagglutination Test</i>	71
<i>Sonde geniche</i>	72
Verocitotossine	72
<i>Ricerca della tossina libera nelle feci</i>	72
<i>Ricerca della tossina prodotta da ceppi isolati in coltura</i>	73
<i>Ricerca della tossina da feci o da ceppi isolati in coltura con metodo ELISA</i>	73
<i>Ricerca attraverso reverse passive latex agglutination (RPLA)</i>	73
<i>Ricerca attraverso tecniche di biologia molecolare</i>	73
Prove di sensibilità ai farmaci	75
Sensititre®	75
Micro-Scan®	76
E-Test®	76

Appendice - Terreni, reagenti, soluzioni, tabella per il conteggio MPN

Terreni	79
Reagenti	91
Soluzioni	92
Tabella per il conteggio MPN	94

Riferimenti bibliografici

PARTE PRIMA

TEORIA

CENNI SU ALCUNE RICERCHE STORICAMENTE IMPORTANTI

Verso la fine dell'800, quando in Europa la diarrea infantile era ancora una malattia mortale, il pediatra e batteriologo tedesco Théodor Ehrlich era riuscito a isolare ripetutamente un germe, chiamandolo *Bacterium coli*. Pur consapevole del suo ruolo patogenetico, Ehrlich non risolse mai il dilemma della somiglianza di quel microbo con quelli presenti nelle feci dei bambini sani.

Dieci anni dopo, un veterinario danese, Jensen, descrisse una malattia simile nei vitelli appena nati, la “diarrea bianca”, che supponeva causata da qualche ceppo “anomalo” di *Bacterium coli*.

In effetti, i Ricercatori di allora non potevano fare di più, cioè discriminare i patogeni dai saprofiti, perché, senza sierologia, era impossibile stabilire la struttura antigenica dei germi.

Nonostante i tentativi di Christiansen (1917) e di Lovell (1937), solo nel 1943 Kauffmann giunse a dimostrare antigeni somatici O, capsulari K e ciliari H in quel *Bacterium coli*, denominato nel frattempo *Escherichia coli* (Castellani, 1912).

Analogamente a quanto era avvenuto per le salmonelle, anche per il coli fu possibile dopo Kauffmann iniziare a fare veramente epidemiologia, grazie al supporto di prove sierologiche di laboratorio.

Così Sojka ed altri Autori (Schoenaers, Kaeckenbeeck, Orskov) fra il 1950 e il 1980 presero ad associare determinate forme di colibacillosi a sierotipi ben definiti. Attribuirono, ad esempio, al gruppo O111 (ma non solo ad esso) la diarrea neonatale dei bambini, al gruppo O78 la setticemia dei vitelli, al tipo O149:K88 la diarrea neonatale dei suinetti, al tipo O141:K85 la malattia degli edemi nel suino, al tipo O101:K99 la diarrea dei vitelli.

Dai primi 20 antigeni somatici di Kauffmann, si passò a 25 con Knipschildt (1945) e poi a 170 con Orskov (1984).

Tuttavia, ancora nel 1960, Lovell dubitava sulla possibilità di associare determinati sierotipi a specifiche malattie negli animali, giudicando la sierologia (e anche la biochimica) insufficiente per stabilire chiari rapporti di causa-effetto.

Le incertezze di Lovell, che parlava di ceppi “normali” e di ceppi “selvaggi”, erano state ereditate da una sequela di Autori precedenti, tra cui Joest (1903), Langer (1907), Hove e Coll. (1920), Smith e Coll. (1922).

Essi avevano osservato che gli animali appena nati, colpiti da diarrea, non avevano anticorpi circolanti verso i coli che isolavano in coltura, mentre la madre, attraverso il colostro, era in grado di trasmetterli.

Inoltre, avevano notato che certi ceppi provocavano setticemia, accompagnata da anticorpi nel sangue e da lesioni in vari organi, mentre altri ceppi inducevano solo diarrea. Iniziarono perciò a sospettare che questi ultimi si moltiplicassero solamente nell'intestino.

I primi coli intestinali sicuramente patogeni erano stati isolati da Bray (1940), mentre Sojka (1950) era riuscito a far moltiplicare in laboratorio il primo coli produttore di tossina.

Taylor e Coll. (1961) avevano visto che certi coli isolati da diarrea infantile riuscivano a dilatare l'ansa intestinale legata di coniglio, similmente a quanto scoperto nel 1953 studiando il vibrione del colera.

Anche Smith e Coll., nel 1967, dimostrarono che solamente certi ceppi di coli, inoculati nell'ansa intestinale legata di vitello, provocano diarrea. Trattandosi di un sito circoscritto, ipotizzarono che la virulenza dipendesse dall'adesione alla mucosa intestinale e dalla formazione *in loco* di enterotossine.

Quest'ipotesi si è rivelata giusta grazie a due scoperte, avvenute successivamente, che hanno finalmente chiarito l'attività dei ceppi virulenti enterotossici.

Smith *e Coll.* (1970) e Orskov (1984) hanno riconosciuto i *pili* quali organi di adesione all'epitelio intestinale, rispettivamente nei suinetti (K88) e nei vitelli (K99), giungendo a precisare che si tratta di antigeni codificati da plasmidi.

Smith *e Coll.* nel 1970 hanno poi ottenuto la purificazione di tossine termostabili (ST), dipendenti dagli stessi plasmidi responsabili dell'adesività, e di una tossina termolabile (LT), simile a quella di *Shigella dysenteriae*.

La ricerca delle tossine era ormai iniziata e altri Autori fecero in seguito notevoli passi avanti su questa strada.

Konowalchuk (1977) scoprì nell'uomo le tossine che distruggono *in vitro* le cellule Vero, suddivise poi da O'Brien (1980) in VT1 (o *Shiga-like toxine*, per somiglianza alla tossina della *Shigella dysenteriae*) e VT2.

Caprioli *e Coll.* (1983) da enteriti nei bambini isolarono il fattore citotossico necrotizzante (CNF-I), che provoca multinucleazione in colture cellulari e necrosi della pelle del coniglio. De Rycke *e Coll.* (1990) riconobbero il CNF-2, codificato da un plasmide *Vir*, diverso dal precedente fattore per peso molecolare, effetto citopatico e necrosi specifica nel cuscinetto plantare del coniglio.

Più recente è la scoperta della tossina citoletale distendente (CLDT), trovata in diarreie infantili, che allunga le cellule renali di *hamster*, distruggendole dopo 96-120 ore.

Il ritrovamento di altri fattori di virulenza (AE, emolisine, aerobactina, resistenza al complemento e alla fagocitosi) ha dimostrato, se ce n'era bisogno, che la dotazione di "armi d'offesa" del coli è davvero impressionante.

METODICHE DI LABORATORIO

Per arrivare alle scoperte sopra menzionate sono state messe a punto diverse tecniche, a seconda delle preferenze degli Autori.

Un buon numero ha usato le prove biologiche su vitello, suino, coniglio, topo. Si citano Dean (1972), Giannella (1976), Girardeau (1980), Josse (1980), Gerday *e Coll.* (1984).

In tempi più recenti, i *test* su animali da esperimento sono stati sostituiti da prove *in vitro*. Così, per evidenziare sperimentalmente le varie proprietà (adesività, invasività, tossicità), sono state usate agglutinazione, immunofluorescenza, ELISA, emoagglutinazione e inoculazione di colture cellulari.

Tutti i metodi di laboratorio finora considerati, *in vivo* o *in vitro*, operano sul fenotipo, in quanto mettono in evidenza l'effetto di attività biochimiche, di proprietà antigeniche, di tossine prodotte.

Nuovi orizzonti si sono aperti con l'avvento della biologia molecolare, iniziata da Moseley *e Coll.* (1980), che ricerca non più i prodotti dei geni, ma i geni stessi, attraverso l'ibridazione degli acidi nucleici mediante apposite sonde molecolari. Queste permettono di esplorare il materiale genetico dei ceppi di coli e vedere quando esistono particolari sequenze del DNA compatibili, che costituiscono il presupposto affinché si manifestino, spontaneamente o ereditate da altri germi, i fenomeni di colonizzazione e di aggressione (Mainil *e Coll.*, 1984).

Harford (1981) ha riconosciuto il gene responsabile dell'enterotossina termostabile ST, Newland (1988) e Jerse (1990) quelli delle verotossine.

Molti altri studi, in campi diversi dalla clinica, hanno avuto come protagonista il coli. Basti ricordare, nella microbiologia degli alimenti, il ricorso a questo germe quale indice di contaminazione fecale nelle acque o nel settore lattiero-caseario (Dogan-Halkman *e Coll.*, 2003).

In farmacologia, gli esperimenti di ingegneria genetica, iniziati nel 1946 da Lederberg e Tatum, mostrarono, per la prima volta, il trasferimento di materiale cromosomico da un organismo a un altro, proprio tra due ceppi mutanti di *E. coli* K12.

In seguito, la possibilità di inserire in un microrganismo un gene, responsabile, in natura, della produzione di qualche sostanza utile ottenendone infinite copie, ha allargato in maniera enorme le possibilità di intervento clinico.

L'impiego del cosiddetto DNA ricombinante ha consentito di poter fabbricare numerosi principi attivi, primo dei quali l'insulina umana, prodotta nel 1982 a livello industriale utilizzando appunto *E. coli* assieme a vettori di espressione plasmidici.

A titolo di curiosità (ma non tanto, fra qualche anno), è notizia recente che alcuni Ricercatori americani sono riusciti a ricavare etanolo dalla fermentazione batterica del glicerolo, estratto dallo zucchero di barbabietola o dalla cellulosa delle piante. In pratica, hanno fatto produrre dal coli un carburante biodiesel (Kalscheuer e Coll., 2006).

Gli Autori citati che non si trovano riportati nei riferimenti bibliografici sono presi da Kaeckenbeek (1993) e da Pohl (1993).

POSIZIONE TASSONOMICA E CARATTERI PRINCIPALI

Secondo *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (2000), *Escherichia coli* è una delle cinque specie che compongono il genere *Escherichia*, appartenente alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*. Le altre specie di *Escherichia* si chiamano *blattae*, *fergusonii*, *hermannii*, *vulneris* e si distinguono facilmente per via biochimica, grazie alle seguenti reazioni differenziali:

Reazione biochimica	<i>E. coli</i>	<i>E. blattae</i>	<i>E. fergusonii</i>	<i>E. hermannii</i>	<i>E. vulneris</i>
Indolo	+	-	+	+	-
Cellobiosio	-	-	+	+	+
Lisina decarbossilasi	+	+	-	-	+

Il germe è un bacillo di 1,1-1,5 x 2,0-6,0 µm, disposto singolarmente o in coppia, talvolta capsulato, Gram-negativo. Prevalentemente mobile (ma non sempre), anaerobio facoltativo, possiede un metabolismo respiratorio e anche fermentativo. Cresce meglio a +37°C, fermenta il glucosio e altri carboidrati, con produzione di acido e di gas.

È ossidasi negativo, catalasi positivo, rosso-metile positivo e Voges-Proskauer negativo. Ugualmente dà reazione negativa al citrato, all'urea, alla lipasi e alla formazione di acido solfidrico. Riduce i nitrati a nitriti e, in maggior parte, fermenta arabinosio, maltosio, mannite, mannosio, ramnosio, trealosio, xilosio.

Le reazioni biochimiche che differenziano il coli dagli altri enterobatteri sono riportate nella seconda parte – pratica di laboratorio.

STRUTTURA ANTIGENE

La membrana esterna è formata da un lipopolisaccaride (o LPS) contenente tre componenti: un polisaccaride O (antigene somatico), un *core* polisaccaridico (antigene comune a tutte le *Enterobacteriaceae*) e un lipide A (endotossina).

La classificazione sierologica si basa su tre principali gruppi di antigeni: il polisaccaride somatico O (termostabile), l'antigene capsulare K (termolabile, di natura proteica e polisaccaridica) e l'antigene flagellare H (termolabile, proteico).

Gli antigeni K del coli possono impedire la dimostrazione degli antigeni somatici O (si eliminano perciò con il riscaldamento) e provocare reazioni crociate con altri microrganismi (*Neisseria meningitidis* ed *Haemophilus influenzae*).

Gross e Coll. (1985) hanno tracciato uno schema delle strutture antigeniche fino a quel tempo individuate, nel quale riconoscono 170 antigeni O e 55 antigeni H, uniti in numerose combinazioni O:H.

La natura chimica, genetica e immunologica degli antigeni è descritta nel lavoro di Orskov e Coll. (1977).

CLASSIFICAZIONE DEI CEPPI PATOGENI

Sempre più spesso, in luogo di citare la struttura antigene, si preferisce classificare i coli patogeni in categorie, sulla base della forma clinica scatenata in diverse specie animali, come indicato nella tabella seguente:

Tabella 1 – Classificazione dei coli patogeni nell’uomo e in alcune specie animali secondo Pohl (1993)

Categorie	Uomo	Bovino-ovino	Suino	Coniglio	Cane-gatto
Sistemic	Meningiti neonatali	Setticemie	Setticemie		
Enterotossici (ETEC)	Diarrea dei viaggiatori, diarrea infantile e degli adulti (terzo mondo)	Diarree neonatali	Diarree neonatali	Diarree neonatali	Diarree?
Verotossici (VTEC)	Colite emorragica, sindrome emolitico-uremica	Dissenteria	Malattia degli edemi		Diarrea del gatto
Enteropatogeni (EPEC)	Diarree estive infantili (terzo mondo)	Dissenteria?	Diarrea pre- / post-svezzamento	Diarrea post-svezzamento	
Enteroinvasivi (EIEC)	Dissenteria				
Citotossici necrotizzanti (CNF)	Infezioni urinarie, intestinali ed extra-intestinali				

MECCANISMI DI PATOGENICITÀ E FATTORI DI VIRULENZA

La scoperta, perfezionata negli anni, di molteplici fattori di virulenza ha permesso di definire meglio i coli patogeni, suddividendoli in categorie:

Tabella 2 – Classificazione dei coli patogeni a seconda dei principali fattori di virulenza posseduti

Categorie di <i>E. coli</i>	Adesività	Invasività	Produzione di enterotossine	Produzione di verotossine	Azione <i>attaching / effacing</i>	Produzione di aerobactina	Resistenza a complemento e fagocitosi
Enterotossici (ETEC)	■		■				
Verotossici (VTEC)	■			■	■		
Enteropatogeni (EPEC)	■				■		
Enteroinvasivi (EIEC)		■				■	
Citotossici necrotizzanti (CNF 1)						■	■
Citotossici necrotizzanti (CNF 2)			■			■	■
Sistemici						■	■

■ Fattore di virulenza posseduto

ADESIVITÀ

I coli patogeni si attaccano al bordo delle cellule epiteliali intestinali (microvilli) *quasi esclusivamente* mediante *pili o fimbrie*, filamenti sottili (diametro 20-80 Ångstrom), lunghi fino a 2 millimicron, presenti sulla superficie del germe.

Vengono chiamati *adesine*, sono antigeni formati da proteine termolabili, hanno un'origine genetica, essendo codificati da plasmidi posti sul cromosoma batterico.

I plasmidi possono essere trasferiti, mediante semplice coniugazione fra cellule batteriche, da un germe a un altro, anche non patogeno, che acquista l'adesività assieme ad altre proprietà, come, per esempio, la capacità di fermentare un particolare carboidrato di valore diagnostico.

Aderendo alla mucosa, i germi riescono ad evitare di essere rimossi col movimento della peristalsi intestinale.

Sulla superficie dei batteri si trovano altre strutture, come i flagelli, che non hanno importanti funzioni adesive, ma solo di movimento. Possono essere distinte dai pili, in quanto, a differenza della maggior parte di questi ultimi, non agglutinano i globuli rossi in presenza di D-mannosio.

Per formarsi *in vitro*, le adesine richiedono che il germe venga coltivato a più di 20 °C su terreni solidi specifici.

Partendo dalle colonie ottenute, la diagnosi può avvenire mediante agglutinazione rapida su vetrino con antisieri specifici, emoagglutinazione, adesione a linee cellulari.

Tabella 3 - Alcuni organi di adesione (fra i numerosi descritti) dei coli isolati da casi di diarrea

Categorye	Uomo	Bovino	Suino	Coniglio
Enterotossici (ETEC)	CFA-I/III/IV CFA-III PCF CS	K99 (F5) Att25 K88 (F4) F41	K88 (ab, ac, ad) (F4) P987 (F6) F41 K99 (F5)	
Verotossici (VTEC)	CFA		F107	
Enteropatogeni (EPEC)	EAF			AF/R1
Citotossici necrotizzanti (CNF)		Fattori adesivi ai microvilli		

Oltre alle adesine, esistono altri fattori di colonizzazione non sufficientemente noti, che vengono tuttora studiati mediante prove *in vivo* o *in vitro* (aderenza a eritrociti o a particolari linee cellulari tipo HeLa, Hep2, Henle 407, CaCO₂, ecc).

Sono stati pertanto riconosciuti nuovi fenotipi di aderenza, chiamata localizzata (LA), diffusa (DA), aggregativa (EAgg).

INVASIVITÀ

Sono stati osservati, per ora solo nell'uomo, ceppi che invadono gli enterociti del colon, si moltiplicano e li distruggono. Hanno proprietà biochimiche e sierologiche particolari, che assomigliano a quelle delle shigelle. L'invasività dipende dagli stessi geni, posti sul cromosoma o nei plasmidi, che governano la sintesi proteica della membrana esterna del coli. I ceppi appartengono frequentemente ai sierogruppi O 28-112-115-124-164.

PRODUZIONE DI TOSSINE

Tabella 4 – Principali classi di tossine prodotte da E. coli

Classe	Tipi di tossine	Specie animali sensibili	Azione	Effetto	Prove classiche di riconoscimento	Struttura antigene O di alcuni ceppi caratteristici produttori di tossine
Enterotossine ST termostabili (100°C 15')	ST-I a, b Metanolo solubile	Uomo, bovino, suino, coniglio	Non immunogeniche	Ipersecrezione rapida Diarrea	Ansa legata di suino	Uomo: 15-25-63-78-128 Bovino: 9-101 Suino: 149 Coniglio: 109
	Proteine a basso p.m. (30.000) codificate da plasmidi	ST-II Metanolo Insolubile	Uomo, suino		Attivazione guanilato-ciclastasi ?	

Classe	Tipi di tossine	Specie animali sensibili	Azione	Effetto	Prove classiche di riconoscimento	Struttura antigene O di alcuni ceppi caratteristici produttori di tossine
Enterotossine LT termolabili (60°C)	LT-I	Uomo, suino	Immunogeniche	Ipersecrezione prolungata Diarrea	Ansa legata di suino Cellule Vero, Y-I, CHO	Uomo: 15-25-27-63-128-148-159
	Proteine ad elevato p.m. (≥100.000) codificate da plasmidi	LT-II	Uomo, bovino			
Verotossine	VT-I	Uomo, bovino, gatto	Endocellulare	Enterite emorragica, SEU	Test su topo + Cellule Vero, Hela +	Uomo: 26-111-157 Bovino: 5-26-111-112 Gatto: 2-6
	Proteine codificate dal gene <i>eae</i>	VT-II	Esocellulare	Diarrea	Test su topo –	Uomo: 111-157 Bovino: 20-111-116-157
		VTe	Suino	Associata ad adesine	Malattia degli edemi	Test su topo + e su cellule Vero +, Hela -

Classe	Tipi di tossine	Specie animali sensibili	Azione	Effetto	Prove classiche di riconoscimento	Struttura antigene O di alcuni ceppi caratteristici produttori di tossine
Citotossine necrotizzanti	CNF-I	Uomo, suino, bovino, cane, gatto	Associata a produzione di aerobactina, alfa-emolisina e resistenza al complemento	Affezioni intestinali ed extra-	Cellule Hela + Test su topo –	Uomo: 2-4-6-22-75-83 Bovino: 4-15-78-149-153 Suino: 2-8-11 Cane, gatto: 2-4-6-23
	CNF-II codificate da <i>Vir</i> plasmide	Bovino, ovino	Tossina <i>Vir</i>	Diverse patologie	Cellule Hela + Test su topo –	Bovino, ovino: 2-4-78-123

ALTRI FATTORI DI VIRULENZA

Meccanismo di adesione e distruzione (attaching/effacing, AE)

Sierotipi causa di diarrea nell'uomo, bovino e coniglio si attaccano ai microvilli delle cellule enteriche e li distruggono, attraverso un meccanismo di polimerizzazione dell'actina e rottura del citoscheletro.

Produzione di aerobactina

Soprattutto i coli sistemici ed entero-invasivi, tramite l'aerobactina (un sideroforo) introducono ferro nel citoplasma cellulare dell'ospite attraverso i pori della membrana, sottraendolo al siero dell'animale, dove normalmente è tenuto legato dalla transferrina.

Resistenza al complemento e alla fagocitosi

I coli patogeni per mettere in atto questi meccanismi contro le difese dell'ospite si avvalgono di alcune strutture di superficie (capsula K1, lipopolisaccaridi o LPS, proteine *traT* e *iss*).

REAZIONI DIFENSIVE DEGLI ORGANISMI VIVENTI AGGREDITI

Tabella 5 - Meccanismi immunologici aspecifici - Immunità naturale

<p style="text-align: center;">Difese naturali delle mucose</p>	Azione muco-ciliare, peristalsi intestinale, pH acido di secrezioni e liquidi organici, lisozima
<p style="text-align: center;">Flora batterica normale</p>	Azione concorrenziale (esclusione competitiva)
<p style="text-align: center;">Processo infiammatorio:</p> <ul style="list-style-type: none"> - vasodilatazione e aumento della permeabilità capillare - arrivo di cellule fagocitarie (leucociti polimorfonucleati e macrofagi) 	<ul style="list-style-type: none"> - passaggio di cellule fagocitarie e di immunoglobuline nei tessuti - inglobamento e distruzione di batteri - da monociti e linfociti secrezione di proteine infiammatorie: interleuchina-L, <i>tumor necrosis factor</i> (TNF), interleuchina-6, interleuchina-8 - abbassamento antibatterico del pH nei tessuti
<p style="text-align: center;">Attivazione del complemento</p> <p style="text-align: center;">e conseguente liberazione di mediatori chimici:</p> <ul style="list-style-type: none"> - dalle mast-cellule: istamina - dai polimorfo-nucleati: bradichinina - dall'ipotalamo: prostaglandine - dal siero: fattore di Hageman - dal fegato: proteina C-reattiva - transferrina 	<ul style="list-style-type: none"> - lisi delle cellule batteriche - potenziamento della fagocitosi (opsonizzazione) - aumento della permeabilità vasale - azione simile all'istamina - azione sui centri termoregolatori cerebrali (febbre) - attivato dagli antigeni LPS dei batteri, li lega - lega l'antigene LPS - riduce la disponibilità di ferro per i batteri

Tabella 6 - Meccanismi immunologici specifici - Immunità acquisita

Immunità umorale	Proteine solubili circolanti (anticorpi)	- neutrofilie e macrofagi - linfociti B (plasmacellule)	Citochine	Fagocitosi
			Immunoglobuline IgA, IgM, IgG	Cattura degli antigeni
			Citochine	Sostanze citotossiche
			Mediatori infiammatori	Richiamo di cellule ad attività immunogena

SINDROMI CLINICHE NELL'UOMO

Un numero molto elevato di coli è normalmente presente nel tratto gastro-enterico e da qui possono originare setticemie, infezioni del tratto urinario, meningiti neonatali e gastroenteriti. Questi fatti morbosi dipendono da diminuzione delle difese organiche dell'individuo.

Tabella 6 – Classificazione dei coli patogeni nell'uomo secondo Murray e Coll. (2003)

Gruppo	Luogo d'azione	Malattia	Patogenesi
<i>E. coli</i> enterotossigeni (ETEC)	Intestino tenue	Diarrea del viaggiatore e diarrea infantile nei paesi sottosviluppati. <i>Diarrea acquosa con vomito, crampi, nausea, febbre lieve</i>	Enterotossine termostabili e/o termolabili che stimolano l'ipersecrezione di fluidi ed elettroliti
<i>E. coli</i> enteropatogeni (EPEC)	Intestino tenue	Diarrea infantile nei paesi sottosviluppati. <i>Diarrea accompagnata da febbre, nausea, vomito e feci non sanguinolente</i>	Istopatologia A/E plasmide-mediata con distruzione della normale struttura dei microvilli risultante in malassorbimento e diarrea
<i>E. coli</i> enteroinvasivi (EIEC)	Intestino crasso	Malattia dei paesi sottosviluppati. <i>Febbre, crampi, diarrea acquosa. Può evolvere a diarrea con emissione occasionale di feci sanguinolente</i>	Invasione e distruzione plasmide-mediata delle cellule epiteliali di rivestimento del colon
<i>E. coli</i> enteroemorragici (EHEC)	Intestino crasso	Colite emorragica (HC) con forti crampi addominali. <i>Iniziale diarrea acquosa, seguita da abbondante diarrea sanguinolenta. Poca o assente la febbre. Può degenerare a sindrome emolitico-uremica (HUS)</i>	Mediazione delle tossine Shiga citotossiche (Stx1 – Stx2) che inibiscono la sintesi proteica. Lesioni A/E con distruzione dei microvilli intestinali e diminuzione dell'assorbimento
<i>E. coli</i> enteroaggreganti (EAEC)	Intestino tenue	Diarrea infantile nei paesi sottosviluppati. <i>Diarrea acquosa persistente con vomito, diarrea e febbre lieve</i>	Adesione plasmide-mediata di bacilli con accorciamento dei microvilli, infiltrazione mononucleata ed emorragia; diminuito assorbimento dei fluidi
<i>E. coli</i> aggregante diffusa (DAEC)	Intestino tenue	<i>Diarrea acquosa in bambini di 1-5 anni</i>	Stimola l'allungamento dei microvilli
<i>E. coli</i> sistemici	Cervello	<i>Meningiti neonatali</i>	

SETTICEMIA

Generalmente ha origine da un'infezione delle vie urinarie, oppure da un'infezione intra-addominale secondaria a perforazione intestinale. Il tasso di mortalità è elevato.

INFEZIONI DEL TRATTO URINARIO

Secondo alcuni Autori, il coli è responsabile dell'80% delle infezioni nosocomiali riguardanti le vie urinarie. L'infezione segue generalmente un percorso ascendente, poiché i germi partono dal colon, contaminano l'uretra, risalgono fino alla vescica, dando luogo a cistite. Da qui possono migrare al rene, con possibilità di pielonefrite, o alla prostata (prostatite).

Lo sviluppo della malattia è legato a particolari sierotipi patogeni, particolarmente virulenti in quanto possessori di adesine o di emolisine. L'attacco all'epitelio vescicale si ritiene sia mediato dall'acido sialico.

Le adesine sono *pili* di tipo P, AAF I, AAF II, Dr. L'emolisina principale è *HlyA*, capace di lisare gli eritrociti e altre cellule. La liberazione di citochine induce una risposta infiammatoria.

MENINGITI NEONATALI

Il coli spartisce con lo streptococco di gruppo B il primato sull'eziologia delle meningiti batteriche in bambini di età inferiore a un mese. La sua azione sembrerebbe collegata al possesso dell'antigene capsulare K1, caratteristico di ceppi che spesso colonizzano il tratto intestinale di donne gravide.

GASTROENTERITI

Questi sono gli episodi più frequenti e alla base di essi si trovano agenti eziologici dotati di differenti proprietà. Attualmente si distinguono i seguenti casi:

Tabella 7 - Coli patogeni nell'uomo

Caratteristiche	EPEC (enteropatogeni)	ETEC (enterotossigenici)	EIEC (enteroinvasivi)	EHEC (enteroemorragici)
Fattori di colonizzazione	Fattore adesivo EAF	CFA – PCF – CS	Proteine della membrana esterna	Adesine a cellule Henle 407
Tossine	Non prodotte	Enterotossine ST e LT	Invasione delle cellule senza produzione di tossine	Verotossine VT1 e VT2
Tratto intestinale di colonizzazione	tenu e crasso	tenu e	crasso	crasso
Diarrea	Acquosa	Acquosa	Sanguinolenta con febbre	Sanguinolenta senza febbre
Paesi maggiormente colpiti	Dovunque	Nazioni in via di sviluppo	Distribuzione molto limitata	Europa e Canada

Ceppi ETEC

Si tratta di stipiti acquisiti attraverso acqua o alimenti fortemente contaminati. Non si conosce la diffusione interpersonale.

Questi ceppi producono due tipi di tossine, termolabili (LT-I e LT-II) e termostabili (STa e STb), entrambe evocate da geni localizzati su plasmidi trasferibili. La formazione di tossine

non è rapportabile a determinati sierotipi, per cui la dimostrazione della tossicità è possibile solo con prove su colture cellulari o su animali da esperimento.

LT-I dà malattia nell'uomo ed è composta da una sub-unità A e da cinque sub-unità B. Ha la stessa struttura e lo stesso comportamento della tossina del colera. Difatti si attacca ai medesimi recettori presenti sulle cellule epiteliali dell'intestino tenue, cioè il ganglioside GM₁ e le glicoproteine di superficie.

Successivamente, la sub-unità A penetra nelle cellule, dove attiva l'ADP-ribosil-transferasi, reagisce con la proteina di membrana Gs e fa aumentare l'adenilato-ciclasi.

La sovrapproduzione di adenosina monofosfato altera gli scambi ionici e dalle cellule fuoriesce cloro ed entra una minor quantità di sodio. Si ottiene così perdita di liquidi, cioè diarrea acquosa. La fuoruscita di liquidi è aggravata dall'infiammazione della mucosa. La tossina, infatti, fa produrre alle cellule sostanze pro-infiammatorie (prostaglandine e citochine).

StA si lega alla guanilato-ciclasi, facendo aumentare il guanosin-monofosfato, responsabile dell'ipersecrezione di fluidi (Sears e Coll., 1996).

Ceppi EPEC

Questi ceppi formano microcolonie adese alle cellule epiteliali del tenue attraverso elementi che ricordano il piedistallo di un calice.

Per attaccarsi alla mucosa i germi usano delle adesine particolari, fra cui l'*intimina*. Questa abbisogna di recettori nell'intestino ospite e i germi, allo scopo, secernono una proteina (recettore dell'intimina traslocato, *Tir*) che viene inserita nella membrana delle cellule intestinali.

Qui sotto viene mostrata la posizione dei coli enteropatogeni fra i microrganismi isolati da feci diarroiche in tre anni (2006-2007-2008) nella realtà locale.

Ordine	Microrganismo	Numero isolamenti	% sul totale
1	<i>Clostridium difficile</i>	149	33
2	<i>E. coli enteropatogeno</i>	107	24
3	<i>Salmonella</i>	94	21
4	<i>Campylobacter</i>	92	20
5	<i>Shigella</i>	6	1
6	<i>Yersinia enterocolitica</i>	1	<1

Ceppi EIEC

Simili alle shigelle, possiedono un gruppo di geni (*plnv*) collocati su un plasmide, responsabili dell'invasione dell'epitelio del colon. I batteri entrano nelle cellule lisando il vacuolo, si moltiplicano nel citoplasma, migrano verso altre cellule adiacenti seguendo dei percorsi formati da filamenti di actina. Questo tipo di movimento assomiglia a quello delle listerie. La distruzione delle cellule epiteliali può portare alla perforazione del colon.

Ceppi EHEC

L'ingestione di meno di 100 bacilli può causare una diarrea di gravità variabile. Si conoscono un centinaio di sierotipi che hanno queste proprietà, ma il ceppo che ha dato luogo al maggior numero di episodi rimane O157:H7. Altri sierotipi frequentemente trovati sono O26, O103, O111, O145 (Caprioli, 2008).

Il germe forma una o due tossine del tipo Stx, in buona parte uguali alle tossine delle

shigelle, trasmissibili attraverso batteriofagi lisogeni. Le tossine si legano a un glicolipide della cellula ospite (Gb₃) che abbonda nei villi intestinali e nelle cellule renali. La distruzione dei villi intestinali causa una diminuzione dell'assorbimento e, quindi, un maggior rilascio di fluidi.

La complicazione più temuta è la sindrome emolitico-uremica (HUS), che dipende dalla tossina Stx-2. Questa distrugge le cellule renali del glomerulo, fa diminuire la capacità filtrante e causa l'insufficienza renale acuta. Oltre a ciò, la tossina stimola la produzione di sostanze pro-infiammatorie (TNF-alfa, interleuchina-6, citochine) e la quantità di recettori Gb₃.

La malattia si manifesta dopo 3-4 giorni d'incubazione con diarrea sanguinolenta, forti dolori addominali, vomito, trombocitopenia e anemia emolitica microangiopatica. I sintomi possono scomparire spontaneamente dopo 4-10 giorni, ma permangono rischi di complicazioni (30%) e di mortalità (3-5%).

È più frequente nei mesi caldi in bambini sotto i 5 anni. Sembra sia veicolata da carni bovine, latte, acqua, vegetali crudi e frutta.

Secondo l'esperienza decennale del Laboratorio Centrale di Colindale (Londra), gli anticorpi anti-O157 e anti-LPS (riferibili a ceppi EHEC) erano presenti in percentuale fuori dalla norma nel siero di bambini e di persone addette all'allevamento dei bovini. Le cause sono state attribuite, per i bambini, a scarsa igiene (mani non lavate prima di mangiare) e, per gli adulti, a contatti con il mantello degli animali imbrattato da feci (Chart *e Coll.*, 2008).

Ceppi EAEC

I batteri si dispongono a forma di mattoni ammassati grazie a fasci di fimbrie (organi di aderenza) denominate AAF-I e AAF-2. I germi stimolano la secrezione di muco, per cui si formano dei *biofilm* batterici stratificati sulle cellule dell'intestino tenue. In questo caso, i microvilli si accorciano, si ha infiltrazione di mononucleati ed emorragie (Wilson *e Coll.*, 2001). Non sono state dimostrate tossine (Shazberg *e Coll.*, 2003).

Ceppi DAEC

Aderiscono facilmente ai monostrati delle colture cellulari. *In vivo* provocano allungamento dei microvilli e si fanno inglobare dall'epitelio intestinale.

COLIBACILLOSI IN VETERINARIA

DIAGNOSI DI COLIBACILLOSI NEGLI ANIMALI D'ALLEVAMENTO

Il rilievo dei sintomi e delle lesioni anatomo-patologiche, preceduto da un'accurata anamnesi, costituisce un elemento fondamentale per una corretta diagnosi delle infezioni sostenute da *Escherichia coli*.

Nelle forme enteriche va tenuto presente che la comparsa di diarrea può essere associata ad altri agenti eziologici, tra i quali vanno ricordati *Rotavirus*, *Coronavirus* e coccidi. Una diagnosi presuntiva può basarsi sul rilievo del pH fecale, che nelle infezioni da ceppi ETEC risulta alcalino, mentre nelle forme diarroiche, dovute a *Rotavirus* e *Coronavirus*, risulta acido. Le lesioni anatomo-patologiche comprendono la disidratazione, la dilatazione dello stomaco e quella del piccolo intestino, la cui mucosa appare congesta. Nelle forme emorragiche i sintomi che si possono osservare sono la morte improvvisa oppure il rapido deperimento, mentre le lesioni consistono in una marcata congestione delle mucose, sia gastrica che intestinale, con presenza di sangue in notevole quantità.

Quadri anatomo-patologici particolari si possono osservare nelle forme sistemiche, come, per esempio, nella malattia degli edemi del suino, nella quale, oltre ai sintomi clinici visibili nella forma acuta (andatura barcollante, parziale atassia, edema sottocutaneo delle regioni frontali e orbitali), si osservano edemi alla regione cardiaca dello stomaco e al mesocolon.

Gli esami clinici e anatomo-patologici richiedono quasi sempre una conferma diagnostica di laboratorio, volta non solo all'isolamento ma anche alla caratterizzazione del ceppo isolato. In tal modo è possibile disporre di informazioni che consentono di adottare dei provvedimenti mirati di profilassi vaccinale e di terapia.

L'isolamento del germe può avvenire dalle feci, dal contenuto intestinale o da tamponi rettali. A tale scopo, si impiegano terreni selettivi e differenziali, la cui semina può essere o meno preceduta dall'utilizzo di terreni di arricchimento. Numerosi sono i terreni disponibili e ciascuno di essi è caratterizzato da una particolare azione selettiva e da specifiche reazioni, che consentono un'identificazione presuntiva da confermarsi successivamente mediante prove biochimiche.

Tra le metodiche d'isolamento di più recente sviluppo (*vedi parte seconda - tecniche di laboratorio*), vale la pena di citare quella dell'immuno-separazione magnetica, concepita per l'evidenziazione del sierogruppo O157, e quelle basate sull'impiego di terreni contenenti cromogeni o composti inibenti. Nella prima, la ricerca si svolge attraverso un arricchimento in terreno liquido (per esempio, brodo soia triptosio modificato e addizionato di novobiocina), seguito dalla separazione e concentrazione dei microorganismi mediante particelle immunomagnetiche rivestite di anticorpi nei confronti di *E. coli* O157 e quindi dall'isolamento su terreni selettivi e differenziali (agar al sorbitolo di MacConkey addizionato o meno di cefixime e tellurito).

I terreni cromogenici contengono delle sostanze sintetiche costituite da un composto carbonioso e da un cromogeno legati tra loro. Se il microorganismo possiede dei sistemi di trasporto trans-membrana ed enzimatici in grado di utilizzare il substrato, il composto cromogeno, una volta liberato, conferisce alle colonie una colorazione caratteristica.

Sullo stesso principio si basano i terreni contenenti composti inibenti: in tal caso, al composto carbonioso è legata una sostanza che, solo nella forma libera, è in grado di bloccare la crescita dei microorganismi su cui viene attuata la selezione.

La caratterizzazione dell'isolato si basa sulla determinazione delle proprietà antigeniche e dei fattori di virulenza, tra cui vanno ricordati tossine e adesine.

La caratterizzazione antigenica si limita, generalmente, alla determinazione del sierogruppo con tecniche di agglutinazione lenta o rapida e impiego di sieri monospecifici. Solamente nei laboratori di referenza, a scopo di studio e di ricerca epidemiologica, si esegue una caratterizzazione completa. Importante è, invece, la ricerca degli antigeni fimbriali, per la connotazione del ceppo dal punto di vista dell'attività patogena. Gli antigeni di maggior interesse sono F4, F5 e F6, per i quali sono state messe a punto prove di sieroagglutinazione e di agglutinazione su supporto al lattice (*latex agglutination test*).

Per la ricerca delle tossine, vanno citate, per ragioni storiche, le tecniche che prevedono l'impiego di substrati cellulari e, per ragioni di importanza pratica, le tecniche di biologia molecolare. Tra queste ultime sono diverse le tecniche di PCR messe a punto per la caratterizzazione dei geni codificanti le tossine (verotossine, tossine LT e ST) e le adesine.

COLIBACILLOSI NEL BOVINO

I ceppi patogeni di *E. coli* nel bovino sono responsabili di patologie che interessano principalmente i giovani soggetti, ma sono inclusi anche tra le cause di mastite nelle vacche. La colibacillosi dei vitelli può manifestarsi con sintomi limitati all'apparato gastroenterico, oppure può avere un'evoluzione sistemica caratterizzata da setticemia con esito infausto. I ceppi di *E. coli* responsabili di forme gastroenteriche sono distinguibili in enterotossigeni (ETEC), verocitotossici (VTEC) ed enteropatogeni *sensu stricto* (EPEC).

I ceppi **ETEC** appartengono a diversi sierogruppi, tra cui O8, O9, O20, O101; si caratterizzano per la presenza di strutture cellulari che favoriscono l'adesione alla parete intestinale (adesine), quali, principalmente, i fattori F5 e F41, e per la produzione di enterotossine termostabili di tipo a (STa). La colonizzazione intestinale ha luogo fin dalle prime ore di vita, quando cioè la densità di recettori intestinali per le adesine è particolarmente elevata; successivamente alla 12ma ora il numero di recettori si riduce progressivamente e, di conseguenza, diminuiscono anche le probabilità di colonizzazione. L'azione delle tossine induce un'ipersecrezione acquosa con perdita di elettroliti, che si esprime clinicamente in diarrea, disidratazione con enoftalmia e acidosi metabolica. La mortalità è elevata e i soggetti che sopravvivono sono comunque fortemente debilitati e particolarmente esposti a contrarre ulteriori infezioni.

I ceppi **VTEC** sono distinti in due categorie, in base alla loro capacità o meno di produrre lesioni alla struttura dei microvilli intestinali (lesioni *attaching and effacing*).

I ceppi dotati di questa proprietà (VTEC/AEEC) appartengono ai sierogruppi O5, O26, O111, O118 e O157: esplicano la loro azione patogena prima mediante la colonizzazione della parete intestinale, grazie ad un'adesina (EPEC *adherence factor* o EAF), poi con l'alterazione della struttura dei microvilli e infine attraverso un proteina (intimina) che favorisce l'intima aderenza delle cellule batteriche alle cellule della parete intestinale. Tali ceppi sono inoltre produttori, nella maggioranza dei casi, della verotossina VT1; alcuni ceppi producono, anche in associazione, la tossina VT2. I ceppi VTEC non AEEC appartengono principalmente ai sierogruppi O8, O20 e O22 e producono le tossine VT1 e/o VT2.

Dal punto di vista clinico, i sintomi si osservano nei soggetti di età compresa tra una e sei settimane e, a differenza di quanto si osserva nell'infezione da ceppi ETEC, la mortalità è inferiore; non si osserva la comparsa di diarrea acquosa bensì l'emissione di feci molli con muco e/o sangue. Le lesioni sono reperibili esclusivamente, o quasi, a livello del colon e sono di tipo emorragico o mucoso-emorragico, diffuse o localizzate.

I ceppi **EPEC** sono di più difficile riscontro: provocano lesioni intestinali, in particolare all'intestino tenue, alterando la struttura dei microvilli (lesioni *attaching and effacing*) con

meccanismi analoghi a quelli dei ceppi VTEC, dato che esprimono anch'essi, quale fattore di virulenza, un'intimina.

La colisetticemia da ceppi **SEPEC** è un'infezione ad esito infausto acquisita nelle prime ore, o al massimo entro il terzo giorno di vita, per via orale od ombelicale. Si manifesta con febbre, apatia, disoressia o anoressia, gonfiori alle articolazioni, sintomi nervosi; raramente è accompagnata da diarrea. La morte sopraggiunge, nella maggioranza dei casi, entro 24 ore dalla comparsa dei sintomi.

Le caratteristiche di virulenza dei ceppi che causano la setticemia (SEPEC) sono principalmente: la resistenza all'azione battericida del siero, la produzione di aerobactina (agente chelante il ferro), la produzione di colicina V, l'espressione di una tossina letale e di un antigene di superficie genericamente entrambi denominati *Vir*. Tali proprietà sono codificate da plasmidi che, per trasferimento tra cellule batteriche, possono rendere potenzialmente invasivo un ceppo apatogeno.

Alcuni ceppi SEPEC sono inoltre in grado di produrre tossine ad azione citotossica e necrotizzante di tipo 1 e/o di tipo 2 (CNF1 e CNF2); va ricordato, a tale proposito, che i ceppi produttori di tali tossine possono essere isolati anche nel corso di altre patologie, quali patologie gastroenteriche, respiratorie, urogenitali e mammarie.

I ceppi produttori di CNF1 appartengono ai sierogruppi O4, O78 e O153, sono dotati di un'adesina di tipo P (*PAP like*) e producono aerobactina. I ceppi produttori di CNF2 sono invece inclusi nei sierogruppi O2, O4, O8, O15, O78, O88, O123; alcuni di essi esprimono inoltre un fattore di adesione simile al fattore F17 (*F17 like*). Va ricordato, peraltro, che alcuni di questi ceppi non producono aerobactina e altri ancora sono privi di resistenza al siero: pertanto i ceppi SEPEC non sono sempre dotati di tutti i fattori di virulenza propri degli stipti invasivi.

I ceppi che non producono tossine CNF appartengono ai sierogruppi O7, O8, O11, O20, O86, O117, O153, producono aerobactina e resistono all'azione battericida del siero.

Il problema del sierotipo O157:H7 nel bovino

Il bovino, assieme ad altri ruminanti domestici e selvatici (ovini, caprini, bufali, cervi), rappresenta il principale serbatoio di *E. coli* O157:H7; esso è il più importante e studiato tra i ceppi VTEC patogeni per l'uomo, anche se vengono isolati con crescente frequenza VTEC di sierogruppo non-O157 associati a gravi patologie umane. All'interno dei VTEC, *E. coli* O157 appartiene al gruppo dei ceppi enteroemorragici (EHEC), così definiti perché causa di patologie intestinali umane caratterizzate da diarrea emorragica. *E. coli* O157, come altri EHEC, è caratterizzato, oltre che dalla produzione di VT, anche dalla capacità di colonizzare la mucosa intestinale determinando lesioni a carico degli enterociti di tipo "*attaching and effacing*" (A/E), processo governato da geni cromosomici posizionati su un'isola di patogenicità detta LEE (*Locus of Enterocyte Effacement*) e dalla presenza di un plasmide di 60 MDa codificante la produzione di un'emolisina detta "enteroemolisina".

E. coli O157 si localizza nel tratto gastrointestinale del bovino senza dare, di norma, alcuna patologia. L'escrezione del microrganismo con le feci è generalmente di breve durata, in bassa carica (<10²/g di feci), spesso intermittente; può essere però più prolungata in alcuni soggetti.

È stata recentemente riconosciuta la presenza di animali definiti *super-shedder*, caratterizzati da una peculiare colonizzazione del microrganismo a livello della mucosa del retto terminale, in grado di eliminare *E. coli* O157 in cariche elevate (>10⁴/g di feci) e per periodi prolungati di settimane o mesi. Tali animali, attraverso l'elevata escrezione, avrebbero un ruolo rilevante in allevamento nel determinare una maggiore contaminazione ambientale, condizionando attraverso un maggior tasso di trasmissione anche una maggior prevalenza intra-alle-

vamento di animali escretori. Non sono ancora noti i meccanismi che conducono alla colonizzazione rettale e alla formazione di un *super-shedder*, ma è stato ipotizzato l'intervento di fattori legati all'ospite, al patogeno, alle modalità di trasmissione dell'infezione.

La prevalenza all'interno degli allevamenti positivi è di norma bassa, spesso attorno all'1-2%, più elevata nei giovani animali (vitelli post-svezzamento e manze) rispetto agli adulti, ma soggetta a notevole aumento, fino anche al 20-30%, con ampie fluttuazioni legate a stagionalità (picco nei mesi caldi), fattori stressanti (trasporto, digiuno), brusche variazioni alimentari; meno chiaro il ruolo della composizione della razione, anche se un'alimentazione ricca di concentrati condizionerebbe una maggiore escrezione fecale. La notevole capacità di sopravvivenza del microrganismo nell'acqua delle vasche di abbeverata (superiore a 4 mesi) e la sua moltiplicazione sono molto importanti per il mantenimento e la disseminazione dell'infezione in allevamento e può essere motivo del più elevato livello di escrezione che si registra nei mesi caldi. *E. coli* O157 può sopravvivere per mesi in feci e liquami, con possibilità di contaminazione di suolo, acque e vegetali che possono rappresentare fonte d'infezione per gli animali e per l'uomo. Infatti, oltre alla trasmissione attraverso gli alimenti, l'uomo può acquisire l'infezione mediante contatto diretto e indiretto con animali e attraverso l'ambiente contaminato da deiezioni, con una crescente segnalazione di casi umani associati ad attività ricreative e visite in allevamenti.

I dati sulla prevalenza di allevamenti positivi nei vari Paesi sono molto variabili in base a obiettivi e modalità di campionamento, tipologia di allevamento e metodiche di analisi utilizzate, con valori compresi tra il 7 e il 20% circa in alcune vaste indagini. Alcuni studi condotti negli USA hanno evidenziato valori anche superiori, dimostrando che la percentuale di allevamenti positivi aumenta considerevolmente se si campionano gli stessi allevamenti ripetutamente.

Nelle nostre zone, uno studio sulla frequenza di ceppi verocitotossici nel bovino (e nel suino) è stato pubblicato da Caprioli *e Coll.* (1993).

A fini di profilassi e di controllo, fattori di rischio da considerare per l'introduzione in allevamento di *E. coli* O157 sono: l'acquisto di bovini, il contatto con bovini di altri allevamenti (pascolo promiscuo, re-introduzione di capi usciti per fiere), l'introduzione di alimenti contaminati da materiale fecale. Va inoltre considerato il ruolo di altri animali, quali roditori, uccelli e fauna selvatica.

È possibile contrastare il mantenimento e la diffusione del microrganismo in allevamento adottando buone pratiche igieniche e gestionali, in particolare evitando la contaminazione fecale degli alimenti e riducendo quella dell'acqua di abbeverata mediante regolare pulizia delle vaschette, mantenendo la lettiera quanto più possibile asciutta, evitando il contatto tra animali giovani e adulti, mantenendo gli animali in gruppi omogenei senza continui rimescolamenti, evitando brusche variazioni alimentari e fattori stressanti.

Oltre a ciò, sono state condotte sperimentazioni per tentare di contrastare la colonizzazione intestinale da *E. coli* O157 somministrando probiotici e batteriofagi, agendo sulle caratteristiche della razione e utilizzando vaccini. Tra quest'ultimi, pur senza trovare ancora un concreto utilizzo, i più promettenti sono quelli basati sulle proteine secrete da *E. coli* O157 mediante sistema di tipo III, miranti a prevenire l'adesione batterica alle cellule intestinali.

Una serie di rilievi epidemiologici in Lombardia ed Emilia sulle infezioni da *E. coli* nel vitello è stata pubblicata da Nigrelli *e Coll.* (1984).

Tabella 8 - Categorie e fattori di virulenza degli stipiti di E. coli patogeni per il bovino

Categoria	Sierogruppo	Fattori di virulenza											
		Adesine					Tossine				Altri		
		F5	F41	EAF	P	F17	CS31A	STa	VT	CNF1	CNF2	Intimina	Res. siero
ETEC	O8												
	O9	+	+					+					
	O20												
VTEC AEEC	O5												
	O26												
	O111			+					+			+	
	O118												
	O157												
VTEC	O8												
	O20								+				
	O22												
SEPEC	O4												
	O78				+					+		+	+
	O153												
	O2												
	O4												
	O8												
	O15					+					+	±	±
	O78												
	O88												
	O123												
	O7												
	O8												
	O11												
	O20							±				+	+
	O86												
O117													
O153													

Legenda:

+ associato più frequentemente al sierogruppo

± associato occasionalmente al sierogruppo

COLIBACILLOSI NEL SUINO

Le infezioni sostenute da *E. coli* costituiscono una delle principali cause di perdite economiche per gli allevamenti suini. Si tratta di patologie di una certa complessità, dati gli innumerevoli fattori che contribuiscono alla loro insorgenza. Le colibacillosi sono infatti delle tipiche patologie condizionate, legate a situazioni ambientali, manageriali, igieniche, nutrizionali.

Sotto il profilo eziologico, i ceppi di *E. coli* responsabili di patologie si possono distinguere in base ai meccanismi che provocano l'infezione: enterotossigeni (ETEC), enteroemorragici (EHEC), enteropatogeni (EPEC).

I ceppi **ETEC** sono dotati di fattori di adesione (adesine) e producono tossine citotossiche (enterotossine): termolabili (LT) e termostabili (ST).

I ceppi **EHEC** sono così denominati in quanto il prototipo di questo gruppo, il sierotipo O157:H7, provoca, nell'uomo, una colite emorragica. Dato che tale stipite produce delle tossine citotossiche (verocitotossine, VT), i termini "enteroemorragico" (EHEC) e "verocitotossico" (VTEC) sono stati spesso sovrapposti. Per la precisione, solo alcuni ceppi di EHEC producono VT, per cui è più corretto operare una distinzione in due categorie, tenendo presente che quella dei ceppi VTEC comprende quella dei ceppi EHEC. I ceppi VTEC isolati nel suino sono responsabili di una tossiemia, per cui vengono denominati anche enterotossiemici (ETEEC).

I ceppi **EPEC** producono anch'essi delle lesioni intestinali, ma agiscono attraverso meccanismi distinti da quelli dei ceppi ETEC ed EHEC e in base ad essi sono distinti in due categorie: quelli isolati nel suino sono dotati del fattore *eae* (*Escherichia coli attaching and effacing*), mentre sono praticamente assenti i ceppi, riscontrati invece in individui della specie umana, dotati del fattore EAF (*EPEC adherence factor*).

Dal punto di vista clinico, le colibacillosi del suino si possono dividere in infezioni intestinali ed extraintestinali. Le prime si manifestano in forma di diarrea (neonatale e pre- o post-svezzamento), di gastroenterite emorragica o in una forma tossiemica denominata malattia degli edemi. Le seconde comprendono invece la setticemia e la polisierosite o, più raramente, la mastite, la cistite e la pielonefrite.

Diarrea neonatale

La diarrea neonatale colpisce i suinetti di età compresa tra 4-7 giorni e si manifesta con sintomi di intensità variabile e tassi di morbilità e mortalità elevati. Gli agenti responsabili sono ceppi enterotossigeni le cui caratteristiche di virulenza sono riportate nella tabella 9.

Nei soggetti colpiti in questa fascia di età prevalgono i sierogruppi produttori di tossina termostabile di tipo a (STa), associata ai fattori di adesione F5, F6 ed F41 (singoli o in combinazione). Minore prevalenza mostrano i sierogruppi produttori di tossina termolabile di tipo b (STb), la cui produzione è generalmente associata con quella della tossina termolabile (LT). In tali ceppi, il fattore di adesione presente nella maggior parte dei casi è F4.

Diarrea pre-svezzamento

La diarrea pre-svezzamento si manifesta in soggetti prossimi allo svezzamento con sintomi di minore gravità rispetto a quelli che si osservano nella diarrea neonatale, nonché con indici di morbilità e di mortalità inferiori. I sierogruppi prevalenti sono caratterizzati dalla presenza del fattore di adesione F4, associato alla produzione della tossina STb.

La diversa distribuzione, in rapporto all'età, dei sierogruppi è conseguenza dei fattori di virulenza espressi e delle caratteristiche fenotipiche dell'ospite. Infatti, il numero dei recettori intestinali per le adesine F4 e F6, presenti nel muco, aumenta progressivamente dopo la nascita, mentre quello dei recettori per l'adesina F5, presenti sulla parete, diminuisce.

Le adesine citate non sono le uniche riscontrate tra gli isolati di *E. coli*. Ceppi appartenenti ai sierogruppi O8, O115 e O147, produttori delle tossine STb e di LT, sono in grado di colonizzare l'intestino tenue senza aderire alla parete, ma associandosi al muco. Tale colonizzazione è legata alla presenza dell'adesina F1 o di altri fattori, come l'adesina CS1541.

Diarrea post-svezzamento

La diarrea post-svezzamento è una delle cause principali di perdite economiche nell'allevamento suino e vede implicato *E. coli* come agente causale nel 50% dei casi. Oltre ai fattori legati all'agente eziologico, lo stress dello svezzamento, la riduzione degli anticorpi colostrali e il cambio di alimentazione sono i principali parametri che condizionano l'insorgenza della patologia.

Anche questa forma clinica è provocata, nella maggioranza dei casi, da ceppi ETEC. Di questi, circa il 70% appartiene ai sierogruppi O147, O149 e O157, dotati dell'adesina F4 e produttori delle tossine LT e/o STb. I ceppi del sierogruppo O157, peraltro, sono spesso privi del fattore F4 e producono le tossine STa e/o STb. Vanno ricordati, infine, i sierogruppi O138, O139 e O141 per la produzione di verocitotossine. Tra queste, quella riscontrata quasi esclusivamente è la tossina VT_e, che ha scarsa attività enterotossica, ma è implicata principalmente nella patogenesi delle forme tossiemiche. I fattori di adesione sono rappresentati, oltre che da F4, da altri fattori (tabella 10).

Tra le cause della diarrea post-svezzamento vanno annoverati i ceppi EPEC. Questi, pur sprovvisti di fattori di adesione e pur non producendo tossine, sono comunque dotati del fattore *eae*, responsabile di lesioni intestinali che interessano il tratto prossimale del tenue. I sierogruppi coinvolti sono principalmente O45 e O108.

Gastroenterite emorragica

La gastroenterite emorragica si osserva con maggiore frequenza al momento dello svezzamento, ma può manifestarsi anche nei suinetti sottoscrofa. Si tratta di una forma sporadica che, dal punto di vista clinico, può presentarsi con un decorso peracuto, caratterizzato da mortalità improvvisa, o con un decorso acuto, con ipertermia, diarrea e anoressia.

La maggioranza dei ceppi di *E. coli* implicati nella gastroenterite emorragica appartengono ai sierogruppi O8, O149, O157. Essi producono un'emolisina, le tossine STb e LT e sono dotati del fattore di adesione F4. I ceppi dei sierogruppi O149 e O157 producono occasionalmente verocitotossine.

Malattia degli edemi

La malattia degli edemi è una enterotossiemia causata da ceppi VTEC appartenenti ai sierogruppi O138, O139 e O141 e produttori di tossina VT_e. Va ricordato che, nel suino, altri sierogruppi sono stati identificati come produttori di VT, senza che ne venisse peraltro associata la presenza con la comparsa di malattia.

La forma clinica si manifesta dopo lo svezzamento e la sua comparsa è altamente favorita dai fattori ambientali già ricordati per la forma enterica post-svezzamento. A conferma di ciò va ricordato che stipiti potenzialmente patogeni sono stati isolati anche da soggetti sani.

La morbilità può raggiungere il 30-40% e la mortalità, nelle condizioni ambientali meno favorevoli, arriva anche al 90%. Nella forma peracuta si osserva mortalità improvvisa, mentre, nella forma acuta, si riscontrano atassia, convulsioni, paralisi, edemi sottocutanei a cui si associa, occasionalmente, la diarrea. L'evoluzione patogenetica dell'infezione risulta piuttosto complessa e si articola attraverso le seguenti fasi: colonizzazione del tratto intestinale (grazie all'azione di fattori di adesione, tra i quali il più noto è il fattore F107); produzione della tos-

sina e suo riassorbimento; azione della tossina in sedi periferiche con esito in lesioni vascolari e formazione di edemi. L'entità di questi ultimi dipende, a sua volta, dalla concomitanza con sintomi di diarrea e disidratazione: infatti, se quest'ultima è pronunciata, le lesioni edematose possono risultare ridotte.

Colibacillosi sistemica

La colibacillosi sistemica si verifica sporadicamente e con maggiore frequenza nei suinetti sottoscrofa. Si possono distinguere, in particolare, la setticemia primaria, la setticemia conseguente a una forma enterica e la batteriemia successiva ad alcune infezioni debilitanti. I soggetti colpiti possono morire improvvisamente, oppure, nelle forme ad evoluzione meno rapida, manifestare depressione, dispnea o sintomi nervosi. Il quadro autoptico rivela congestione epatica e splenica, con interessamento dei gangli mesenterici e polisierosite fibrinosa.

I ceppi responsabili appartengono a sierogruppi diversi ed esprimono uno o più fattori di virulenza, alla cui presenza è correlata l'evoluzione setticemica dell'infezione: aerobactina, colicina V, fattori di resistenza al sistema del complemento e alla fagocitosi (per esempio, certi antigeni O e strutture capsulari). Alcuni ceppi producono tossine (come avviene per CNF1) e possiedono inoltre fattori di adesione.

Uno studio sulle caratteristiche dei ceppi associati ad enterotossiemie post-svezzamento, isolati nelle nostre zone, è stato condotto da Nigrelli *e Coll.* (1983)

Una raccolta di dati sui ceppi isolati da suini con diarrea o malattia degli edemi negli allevamenti della pianura padana è stata pubblicata da Ansuini *e Coll.* (1994).

Tabella 9 - Stipiti di E. coli associati a diarrea neonatale del suino

Sierogruppo	Enterotossine			Adesine			
	Sta	STb	LT	F4	F5	F6	F41
O8		±	±	±			
O8	±				±	±	
O9	+				+	+	+
O9/O101	+				+		+
O9/O101	+					+	
O20	±				±	±	
O64	+				+	+	+
O147		±	±	±			
O149		+	+	+			
O157	+	+	+	+			

Legenda:

- + associato più frequentemente al sierogruppo
- ± associato occasionalmente al sierogruppo

Tabella 10 - Stipiti di E. coli enterotossigeni associati a diarrea post-svezzamento

Sierogruppo	Tossine				Adesine	
	STa	STb	LT	VT	F4	F107
O8		±	±		±	
O9	±	±				
O9		±				
O115		±				
O138	±	±	±	+	±	+
O139	±	±		+	±	+
O141	±	±		+	±	+
O147		±	±		±	
O149		+	+	+		
O157	+	+	+	+		

Legenda:

- + associato più frequentemente al sierogruppo
- ± associato occasionalmente al sierogruppo

COLI PATOGENI PER I VOLATILI

L'associazione tra *Escherichia coli* e patologia nelle specie aviarie è ormai riconosciuta da più di un secolo. Tuttavia, pur essendo uno dei più antichi agenti causali di malattia, purtroppo ad oggi non si è ancora in possesso di strumenti che permettano valutazioni univoche e oggettive per la distinzione dei ceppi patogeni (Dho-Moulin, 1993). Attualmente, i ceppi di *E. coli* che causano patologia sistemica vengono denominati APEC (*Avian Pathogenic Escherichia Coli*).

La colibacillosi aviaria è una malattia infettiva del pollame che rappresenta tuttora, per i produttori avicoli, una delle principali cause di perdita economica.

Le lesioni macroscopiche tipiche associate a forme di colibacillosi sono rappresentate da periepatite, aerosacculite e pericardite, sebbene possano essere riscontrate anche altre sindromi quali ovoperitoniti, salpingiti, coligranulomatosi, onfaliti, celluliti, osteomieliti e artriti.

In alcuni casi si possono anche manifestare forme piuttosto tipiche, che sono attribuibili a *Escherichia coli*, anche se tali patologie abbisognano di un effetto sinergico dovuto ad altri patogeni specifici: un esempio tra tutti potrebbe essere rappresentato dalla SHS (*Swollen Head Syndrome*) (Picault e Coll., 1987).

La colibacillosi si osserva in tutte le specie aviarie comunemente allevate, prediligendo in particolare i giovani soggetti, anche se è possibile ritrovarla in animali adulti. Malattia tipica degli allevamenti industriali, può manifestarsi con differenti quadri in funzione del ceppo batterico coinvolto, dello stato immunitario dei soggetti e di fattori predisponenti. Difatti, è stato ampiamente dimostrato che le alterazioni dello stato immunitario dei soggetti in seguito a determinate patologie infettive specifiche (bronchite infettiva, micoplasmosi, malattia di Gumboro, enterite emorragica ecc.), possono favorire l'insorgenza della patologia.

L'efficienza immunitaria dell'organismo ospite potrebbe giocare un interessante ruolo anche in assenza di determinati patogeni. A tal proposito, risultano essere particolarmente interessanti

le correlazioni riportate tra evento morboso e stato immunitario nel tacchino, in cui le alterazioni tipiche della TOC (*Turkey osteomyelitis complex*) sono state correlate anche alla presenza di *Escherichia coli*. È opportuno tuttavia ricordare che tale quadro sintomatologico può manifestarsi ed essere riprodotto solamente in soggetti in cui è presente una minore efficienza immunitaria del comparto celluloso-mediato (Bayyari e Coll., 1997; Huff e Coll., 2000; 2006).

L'intestino delle specie avicole rappresenta un ottimo *pabulum* per la replicazione di *E. coli* ed è stato stimato che il 10-15% dei coliformi in esso presenti possa essere costituito da sierotipi potenzialmente patogeni (Harry e Coll., 1965). Tenendo presente inoltre che i ceppi APEC posseggono un'elevata resistenza in ambiente secco, si desume come la polvere presente negli allevamenti avicoli possa rappresentare un'ottima fonte d'infezione (Harry, 1964).

Escherichia coli, oltre a essere un comune abitante del tratto intestinale distale delle specie avicole, può essere normalmente dimostrato nelle vie aeree superiori, nonché a livello cutaneo. Tutto ciò risulta essere in stretta correlazione con i livelli di contaminazione ambientale.

Purtroppo non esistono strette correlazioni biunivoche tra ceppi APEC e patologia che possano permettere una maggiore comprensione della complessa ed eterogenea classificazione dei ceppi patogeni. Di sicuro, si può affermare che, a differenza dei mammiferi, in cui la virulenza è principalmente enterica, negli uccelli la patogenicità da coli si manifesta prevalentemente a carico dell'apparato respiratorio o provocando forme setticemiche. I ceppi patogeni non vengono differenziati dagli apatogeni mediante caratteristiche biochimiche, ma piuttosto attraverso capacità intrinseche al ceppo, come, per esempio, la capacità di resistere al complemento, di produrre aerobactina, di aderire alle cellule epiteliali mediante fimbrie.

Sierogruppi

Lo studio della struttura antigene ha permesso di dimostrare in casi di colisetticemia una certa uniformità sierologica (Dziva e Coll., 2008), anche se non è possibile associare univocamente l'appartenenza a un sierogruppo con la patogenicità. Infatti, diversi studi hanno dimostrato la presenza di sierotipi coinvolti in forme setticemiche anche in animali sani (Blanco e Coll., 1998).

I sierogruppi correlati con forme patologiche sono O1, O2, O8, O15, O18, O35, O78, O88, O109 e O115, anche se è opportuno evidenziare che O1, O2, O78 rappresentano di gran lunga quelli più frequentemente isolati (Dziva e Coll., 2008). Infine, occorre ricordare che altri vengono definiti non tipizzabili, non rientrando in nessun sierogruppo noto.

Proprietà biochimiche

Si è evidenziato che alcune caratteristiche, quali ad esempio la fermentazione di dulcitolio, mannitolo, adonitolo, non sono direttamente correlabili al potere patogeno che si riteneva in passato, ma bensì al sierotipo del ceppo isolato, per cui rivestono scarso valore diagnostico.

Fattori di colonizzazione

Differenti studi hanno stabilito che l'apparato respiratorio costituisce la via di ingresso preferenziale per il patogeno, mentre l'apparato digerente costituisce un ottimo serbatoio sia per i ceppi patogeni che non. L'espressione di diverse adesine in alcuni ceppi APEC potrebbe essere uno strumento valido per la colonizzazione di differenti organi interni nonché per il superamento della barriera intestinale (Stordeur, 2002).

Fimbrie

La possibilità per alcuni ceppi di aderire a determinati epiteli è stata dimostrata nelle fimbrie di Tipo-I (mannosio sensibili), presenti nel 70-100% degli APEC, anche se rimane tut-

tora aperta la questione circa il loro effettivo ruolo nella virulenza. Infatti, ceppi mutanti per il gene che codifica tali fimbrie (*fim*) risultano possedere ancora capacità invasive (Marc *e Coll.*, 1998).

Sono state anche dimostrate adesine di tipo P, associate inizialmente a ceppi del tratto urinario prossimale nell'uomo. Nei volatili, non sono strettamente correlate con una particolare sindrome, anche se trovate in ceppi che colonizzano organi differenti dalla trachea (Pourbakhsh *e Coll.*, 1997). Di sicuro, la loro assenza non pregiudica il potere patogeno di alcuni ceppi, suggerendo che la loro funzione potrebbe essere espletata da altre adesine (Stordeur *e Coll.*, 2004). Sono stati riportati ulteriori tipi di fimbrie, anche se non esistono evidenze specifiche e univoche che correlino queste ultime con determinate patologie aviarie.

Sistemi di acquisizione del ferro: aerobactina

La capacità di alcuni batteri di acquisire con meccanismi attivi il ferro dai fluidi organici è considerata centrale nel meccanismo patogenetico. Negli APEC tale capacità è stata correlata con la letalità nel pulcino di 1 giorno (Dho *e Coll.*, 1984).

Diversi studi hanno dimostrato che la maggior parte degli APEC (73-98%) possiede il sistema di acquisizione del ferro, mentre i ceppi non considerati patogeni presentano tale caratteristica con minore frequenza. Il gene è localizzato in un plasmide denominato *colV*. La perdita di tale plasmide produce una riduzione della virulenza e della resistenza agli effetti battericidi del siero e una perdita del sistema di acquisizione del ferro. Tali proprietà vengono prontamente recuperate reintroducendo il plasmide (Ike *e Coll.*, 1992).

Resistenza al siero

La presenza di sistemi di resistenza nei confronti dell'attività battericida del siero sono considerati un'importante tassello nella virulenza dei ceppi APEC. Le regioni geniche che sono state correlate a tali meccanismi sono localizzate a livello del plasmide *colV* ed i geni coinvolti sono denominati *traT* e *iss*.

Alcuni polisaccaridi, in particolare quelli contenenti acidi n-acetil-neuroammidici, sono considerati idonei a interferire con la via classica o alternativa del complemento. Questo può indurre nel germe delle resistenze nei confronti delle azioni battericide del complemento stesso. L'antigene capsulare K1, scarsamente immunogeno, è frequentemente associato agli APEC, in particolare a ceppi di sierogruppo O1 e O2, ma anche a ceppi non tipizzabili (Dho-Moulin *e Coll.*, 1999).

Tossine

Il ruolo svolto delle tossine del coli in campo aviario risulta poco esplorato, anche se differenti tipi sono stati dimostrati in ceppi APEC. Uno studio riporta che solamente il 7% dei ceppi aveva potere tossigenico (Blanco *e Coll.*, 1997). La sequenza genica delle Shiga-tossine o verocitotossine è stata rilevata in alcuni ceppi APEC, anche se non esistono evidenze che ne dimostrino l'espressione (Parreira *e Coll.*, 2002).

CEPPI ENTEROPATOGENI (EPEC) NEL CONIGLIO

Come risulta da una rassegna sintetica di Peeters del 1993, nel coniglio sano i coli intestinali sono normalmente pochi, per effetto protettivo degli acidi grassi volatili del cieco. Peraltro, l'intestino del coniglio è molto sensibile alle infezioni batteriche e virali, che possono provocare negli allevamenti perdite fino al 60%. Sembra siano sufficienti 150 cellule di un

ceppo patogeno di coli per scatenare una diarrea liquida con elevata mortalità, massimamente nei giovani di 4-5 settimane.

Il coli avrebbe un'incidenza percentuale sulle malattie enteriche compresa fra il 25 e il 40%.

Le condizioni igieniche d'allevamento (*stress*, freddo, mancanza d'acqua), sanitarie (problemi respiratori da *Rotavirus*, coccidiosi, mixomatosi) e, soprattutto, la dieta giocano un ruolo fondamentale nell'instaurarsi della malattia. Sono benefiche nell'alimentazione le fibre (fra il 9 e il 17% della razione), un contenuto proteico inferiore al 16%, un tenore di amido intorno al 18%. Sono invece fattori che predispongono alla colibacillosi la scarsità d'amido e l'eccesso di proteine (più del 18%).

I ceppi che provocano diarrea non producono enterotossine e non sono invasivi, ma aderiscono alla mucosa intestinale mediante una proteina di membrana codificata dal gene *eae*. Danneggiano i microvilli degli enterociti e distruggono poi le stesse cellule, comportando riduzione della capacità digestiva, diarrea, cattiva conversione alimentare, perdita di peso e mortalità (Blanco e Coll., 1996).

Grandi quantità di coli EPEC (fino a 10^9 per grammo) vengono escrete con le feci per 2-3 settimane, mantenendo il ciclo dell'infezione nell'allevamento.

Nei neonati fra 3 e 12 giorni, alcuni ceppi patogeni danno una grave diarrea giallastra, seguita da mortalità anche del 100% in 24-48 ore.

All'autopsia, l'intestino tenue si presenta congestionato, il contenuto ciecale è liquido, di colore giallastro, spesso sanguinolento, mentre lo stomaco è pieno di latte coagulato.

Nei conigli adulti, i primi sintomi compaiono dopo 5-14 giorni dallo svezzamento e raramente dopo l'età di 3 mesi. Gli animali non mangiano e non bevono, presentano diarrea mucoida non sanguinolenta per circa 4 giorni.

All'autopsia, si può notare semplicemente un contenuto ciecale liquido di colore brunastro, oppure lesioni riguardanti soprattutto cieco e colon, comprendenti gangli mesenterici gonfi, edema e petecchie sulla sierosa.

La risposta immunitaria comporta la comparsa di IgG e IgM nel siero dopo circa 4 giorni dall'infezione, mentre le IgA compaiono nell'intestino tenue dopo 7-13 giorni.

La presenza di IgA nel latte spiega il fenomeno secondo il quale le madri (escluse le primipare) non vengono quasi mai colpite dall'infezione, per cui non è necessaria la vaccinazione dei riproduttori.

L'impiego di vaccini formulati nell'acqua da bere è invece consigliato nei coniglietti per 4 giorni dopo lo svezzamento, con richiamo dopo 3 settimane.

I coli del coniglio non sono un gruppo omogeneo: alcuni sono più frequenti nei neonati, altri nei soggetti svezzati. Si possono riconoscere i ceppi patogeni sulla base del biotipo (fermentazione di dulcitate, raffinose, ramnose, sorbose), della mobilità e del sierotipo (Okerman e Coll., 1985). Alcune caratteristiche sui ceppi sono racchiuse nella tabella seguente:

Tabella 11 - Patogenicità dei ceppi coli enteropatogeni (EPEC) per il coniglio

Ceppi che provocano diarrea nei neonati	Ceppi molto patogeni	O109 (biotipo 1+)	100% di mortalità, colonizzano tutto l'intestino
	Ceppi poco patogeni	O 2-8-15-103 (vari biotipi)	Da 0 a 30% di mortalità, colonizzano ileo, cieco e colon
Ceppi che provocano diarrea negli animali svezzati	Ceppi molto patogeni	O15 (biotipo 3-) O25 (biotipo 4+)	50-100% di mortalità, colonizzano ileo, cieco e colon
	Ceppi poco patogeni	O2 (biotipo 3+) O 20-109-153 (biotipo 1+) O 128-132 (biotipo 2+)	0-30% di mortalità, colonizzano ileo, cieco e colon, sono responsabili soprattutto di cattiva conversione alimentare

NOTA - Secondo la classificazione di Camguilhem e Coll. (1989), il biotipo 1 è contraddistinto da fermentazione di ramnosio e raffinosisio, il biotipo 2 da dulcitate, raffinosisio e ramnosio, il biotipo 4 da raffinosisio e sorbosio.

Il segno + o - si riferisce alla mobilità.

COLI PATOGENI NEL CANE E NEL GATTO

La letteratura in merito (Broes, 1993) non è molto ricca di episodi, per cui il ruolo patogenico del coli in questi animali, del tutto poco chiaro, necessita ancora di ricerche.

Le principali affezioni e i sierotipi, ritenuti con qualche probabilità responsabili, sono riassunte nella tabella seguente:

Tabella 12 - Principali affezioni nel cane e nel gatto e relativi tipi di coli isolati ritenuti probabilmente responsabili di malattia

Patologia	Cane	Gatto	Tipo di coli	Sierogruppi principali	Proprietà dei ceppi isolati
Setticemia neonatale	+	+	Citotossici	O2-O4-O6	Hanno i fattori tossici CNF1 e CNF2
Diarrea	+	?	EPEC	O4-O6-O8-O17-O20-O23-O25-O42-O105	Adesività attraverso fimbrie Att712 e probabilmente anche K88, K99, F41, 987P Tossine STa e STb Spesso emolitici Agglutinine mannosio-sensibili
			VTEC	O2-O4-O6-O157:H7	Citotossici, producono una tossina VT1 neutralizzata dal siero anti-Shigella
			AEEC	O49-O111	<i>Attaching and effacing Escherichia coli</i> Distrucono i microvilli intestinali Hanno il fattore tossico CNF
			Citotossici	O2-O4-O6-O75-O83	Emolitici, hanno i fattori tossici CNF1 e CNF2

Patologia	Cane	Gatto	Tipo di coli	Sierogruppi principali	Proprietà dei ceppi isolati
Pielonefrite	+	?	Citotossici	O2-O4-O6-O7-O18-O83	Hanno fimbrie di tipo P, una capsula polisaccaridica, secernono un'alfa-emolisina, producono aerobactina, resistono all'effetto battericida del siero, emoagglutinano
Metrite / piometra	+	+	Citotossici	O2-O4-O6-O22	Emolitici, hanno i fattori tossici CNF1 e CNF2
Cistite	+	+	Citotossici	O2-O4-O6	Emolitici, hanno i fattori tossici CNF1 e CNF2

ALCUNI DATI STATISTICI SULLA DISTRIBUZIONE DEI COLI NEGLI ANIMALI

Mentre all'estero sono state fatte numerose pubblicazioni sui sierotipi isolati, in Italia la tipizzazione non risulta altrettanto estesa.

Alcune informazioni desunte dalla realtà locale sono riportate a scopo indicativo nella seguente tabella:

Tabella 13 – Tipizzazioni di Escherichia coli isolati da animali. Elaborazione di una statistica 2006-2007 dell' I.Z.L.E.R. (Batteriologia Specializzata)

Specie	Sierogruppi O prevalenti e incidenza % sul totale dei ceppi tipizzati					Somma delle percentuali
bovini	O139 (20%)	O11 (15%)	O78 (9%)	O149 (9%)	O73 (8%)	61
suini	O149 (32%)	O157 (20%)	O139 (15%)	O141 (8%)		75
ovini	O157 (25%)	O139 (25%)	O73 (25%)	O20 (25%)		100
conigli	O103* (50%)	O2 (11%)	O49 (5%)	O8 (4%)	O141 (4%)	74
polli e tacchini	O78 (32%)	O139 (11%)	O2 (8%)	O128 (7%)		58
cavalli	O2 (50%)	O75 (50%)				100
cani	O6 (56%)					56
gatti	O2 (57%)	O6 (29%)				86

*sierotipo particolarmente patogeno caratterizzato dalla presenza (68%) del gene *eae*

NOTA - Le prove di tipizzazione sierologica sono state effettuate mediante agglutinazione lenta utilizzando un pannello di antisieri monospecifici verso 37 antigeni somatici: O1, O2, O4, O6, O8, O9, O10, O11, O15, O18, O20, O21, O22, O26, O45, O49, O64, O73, O75, O78, O83, O86, O88, O101, O103, O109, O111, O115, O128, O132, O138, O139, O141, O147, O149, O153, O157. Gli antisieri sono stati selezionati in accordo con la letteratura nazionale e internazionale (Blanco e Coll., 1996; Farina e Coll., 1996) e con la diffusione attuale in Italia degli antigeni O fra gli animali domestici (Farina e Coll., 1996).

Un'ampia rassegna sulle colibacillosi in veterinaria è stata pubblicata nel 1983 da Nigrelli, Conedera, Meliota, Zavanella, durante un periodo fecondo di ricerche finalizzate alla produzione di vaccini presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna di Brescia.

La preparazione dei sieri diagnostici, l'isolamento dei coli dall'allevamento, la tipizzazione e le prove di patogenicità affiancavano la produzione di vaccini inattivati e adsorbiti a idrossido d'alluminio. Per la prima volta i vaccini, destinati soprattutto a vitelli e suini, nascevano da biomasse coltivate su fermentatori. Esperienze che rievocano, tra l'altro, alcune possibilità di trattamenti immunizzanti, ricordate nei lavori di Nigrelli *e Coll.* (1983) e di Ansuini *e Coll.* (1991).

Per effetto di una stretta collaborazione (Bisicchia, Zavanella *e Coll.*), quelle ricerche sui coli negli animali si intrecciavano con studi analoghi in pediatria.

ANTIBIOTICI E ANTIBIOTICO-RESISTENZA

È opinione comune in medicina umana che, per i patogeni enterici, non esista una terapia specifica. Si ritiene che, con sintomatologia esclusivamente di tipo diarroico, a seguito di patologie infettive di probabile origine alimentare, il trattamento sia costituito da somministrazione di liquidi, spasmolitici (se sono presenti dolori addominali), antisecretori intestinali (per diarree con probabile meccanismo secretorio), eventuali farmaci che rallentano il transito (Rondanelli *e Coll.*, 2006).

Nei casi più gravi, nei quali appare indispensabile il ricorso a sostanze antibiotiche, risulta fondamentale l'esecuzione degli opportuni antibiogrammi.

Si sa che sulfamidici, ampicillina, cefalosporine, fluorochinoloni e aminoglicosidi esercitano uno spiccato effetto antibatterico, per cui è frequente il loro uso nei trattamenti.

A scopo profilattico, nelle zone dove le condizioni igieniche ambientali sono scadenti, è stato proposto, per i soggetti più a rischio, l'impiego di ciprofloxacina oppure di trimethoprim-sulfametossazolo durante brevi periodi (Javetz *e Coll.*, 2001).

Nell'uomo alcuni dati provenienti dalla realtà locale mostrano le seguenti percentuali di sensibilità in 107 ceppi di *E. coli* enteropatogeni isolati da feci diarroiche in tre anni (2006-2007-2008)

Ampicillina	58
Ampicillina/sulbactam	62
Aztreonam	96
Cefapime	96
Cefotetan	100
Ceftazidime	96
Ceftriaxone	96
Cefuroxime	85
Ciprofloxacina	74
Ertapenem	100
Imipenem	100
Levofloxacina	74
Piperacillina	72
Piperacillina/tazobactam	99
Tobramicina	90
Trimethoprim/sulfametossazolo	65
Ceppi con beta-lattamasi a largo spettro (ESBL)	4

Un quadro meno favorevole emerge dal trattamento di infezioni urinarie acquisite in comunità, dove sembrano sempre meno efficaci i fluorochinoloni (Gagliotti *e Coll.*, 2008).

Secondo Pitout (2008), la produzione di beta-lattamasi a spettro esteso (ESBL), in particolare del gruppo CTX-M, vede al primo posto fra gli enterobatteri *Klebsiella pneumoniae* ed *Escherichia coli*.

Più di 50 tipi di questi enzimi idrolizzano, rendendoli inattivi, parecchi farmaci beta-lattamici compresi nelle cefalosporine (cefotaxime, ceftriaxone, ceftazidime) e nei monobattamici (ad esempio, aztreonam), ma non le cefamicine (cefoxitina e cefotetan) e i carbapenemi (imipenem, meropenem, ertapenem).

Altri Autori riferiscono, in Israele e in Spagna, di multi-resistenze a cotrimoxazolo, gentamicina, ciprofloxacina in focolai da coli setticemici produttori di beta-tattamasi CTX-M sviluppati in comunità.

In *veterinaria*, non si delincono grosse differenze con la medicina umana. Difatti, *E. coli* sembra sensibile alle beta-lattamine beta-lattamasi-resistenti (monobattamici, cefalosporine di II e III generazione) e a molti aminoglicosidi (gentamicina, tobramicina, amikacina, netilmicina). Inoltre, è generalmente molto sensibile ai fluorochinoloni, ad esempio ciprofloxacina, ofloxacina, pefloxacina, enoxacina, levofloxacina (Poli e Coll., 1996).

Da un monitoraggio nazionale sull'antibiotico-resistenza in medicina veterinaria, condotto in Italia nel 2002-2003, sono emerse, per i *ceppi isolati da casi clinici* in alcune specie animali, le seguenti percentuali di resistenza (ITAVARM, 2003):

Antibiotico	Bovini	Ovini	Cani
Acido nalidixico	31.3	5.1	24.4
Amikacina	0.6	0.4	0
Amoxicillina/acido clavulanico	10.8	2.2	15.8
Ampicillina	49.1	16.1	40.3
Cefazolina	8.8	2.2	15
Cefotaxime	1.2	0	11.5
Cloramfenicolo	28	6.1	19
Colistina	2.4	1.3	5.7
Enrofloxacin	25.6	1.3	17.2
Gentamicina	6.1	1.7	7.6
Kanamicina	26.4	3.8	14.8
Spectinomycin	15.7	5.3	15.8
Streptomycin	53.2	18.6	35.9
Sulfonamidi	54.1	18.1	41.5
Tetracycline	57.8	26.3	44.6
Trimethoprim/sulfamethoxazole	29.9	8.6	30

A risultati opposti sono giunti Krnjaic e Coll. (2005), i quali, in Serbia e Montenegro, hanno rilevato, nei bovini, resistenza generalizzata verso i comuni antibiotici di uso veterinario e sensibilità solo a colistina e cefalosporine di terza generazione.

Aksoy e Coll. (2007) riferiscono su coli resistenti al 51% verso tetracicline e al 24% verso streptomycin nei bovini in Turchia, con prevalenza nelle femmine al di sotto dei due anni.

Lee Yung e Coll. (2005) hanno trovato che i coli provenienti da polli allevati in Corea erano al 97% resistenti a cinque antibiotici. Tra i farmaci che manifestavano percentuali di resistenza sopra al 50%, si trovavano le cefalosporine e i fluorochinoloni (enrofloxacin, ciprofloxacina, norfloxacina).

Dall'Inghilterra si segnala inoltre che, in Europa, sono in forte aumento le antibiotico-resistenze fra i batteri che infettano gli animali d'affezione. I germi maggiormente interessati sono *Escherichia coli*, *Acinetobacter baumannii*, *Salmonella* spp., *Staphylococcus intermedius*.

La causa del fenomeno viene attribuita all'incremento della somministrazione di antibiotici agli animali tenuti in casa (*pets*), passata, ad esempio, dal 3% all'8% nei paesi nordici (Sve-

zia, Norvegia). Così pure, in Danimarca, tra il 2001 e il 2004 il consumo di cefalosporine destinate ad animali d'affezione è cresciuto circa del 70%. Addirittura, nel 2003 il commercio, attraverso farmacie e mangimisti, di fluorchinoloni e cefalosporine è stato assorbito al 45% da cani e al 55% da gatti (Lloyd, 2007).

Negli *alimenti* si cita il lavoro di Saenz *e Coll.* (2004), che hanno studiato, in Spagna, 47 ceppi, dei quali circa il 10% era insensibile, contemporaneamente, ad acido nalidixico, ampicillina, rifampicina, cloramfenicolo, sulfametossazolo, streptomina e tetraciclina.

Anche Mayrhofer *e Coll.* (2006) hanno svolto delle ricerche in Austria su carni di animali regolarmente macellati, trovando coli resistenti a tetraciclina e acido nalidixico nei suini (76%), polli (63%) e bovini (40%). Avendo visto una situazione opposta negli animali abbattuti dai cacciatori, affermano che l'antibiotico-resistenza non deriva dall'ambiente, ma dall'uso intensivo di tetracicline negli allevamenti in genere e, in particolare, di fluorochinoloni negli aviari.

ALIMENTI CONTAMINATI DA *ESCHERICHIA COLI*

DATI STATISTICI

Sono indicate nella seguente tabella alcune stime su vari prodotti:

Tabella 14 - Cariche di *E. coli* in alimenti per l'uomo

Alimento	Paese	Intervalli di carica di <i>E. coli</i> per grammo o ml	Indicazioni di sierotipi	Autore
Carne bovina macinata	Inghilterra	0 – 100	<i>E. coli</i> non specificati	Solecki e Coll., 2007
Latte di massa alla stalla	Albania	20-32	<i>E. coli</i>	Shaban, 2003
Formaggi non stagionati da latte non pastorizzato	Italia	7800 – 300.000.000	<i>E. coli</i> non patogeni	Zago e Coll., 2007
Ricotta e formaggi molli da latte pastorizzato	Australia	10 – 100	<i>E. coli</i>	ACT, 2002
Verdure crude pronte per il consumo	Inghilterra	100	<i>E. coli</i>	Sagoo e Coll., 2001
Insalata	Inghilterra	120-1140	<i>E. coli</i>	Meldrum e Coll., 2009
Riso cotto	Inghilterra	340	<i>E. coli</i>	Meldrum e Coll., 2009
Carcasse di bovino Rifilature di carne bovina Spolpi di testa bovina	U.S.A.	5 – 25 5 - 40 5 10	O157:H7	Carney e Coll., 2006
Cereali Piselli Aglio Cavolfiori (prodotti importati da Cina, Vietnam, Thailandia, India)	Australia	240 110-400 3 3	<i>E. coli</i>	Wellings, 2005
Molluschi e crostacei importati Carne suina e di pollo cotta congelata importata	Australia	10 10	<i>E. coli</i>	Bull e Coll., 2002

Limitatamente ai paesi europei, la presenza di *Escherichia coli* negli alimenti non è vista come una ricerca di interesse prioritario.

Probabilmente, la prevalente concentrazione industriale delle produzioni ha ingenerato da qualche tempo nel legislatore una maggior fiducia sulle garanzie di sicurezza dovute alla certificazione di qualità.

Escherichia coli nelle matrici alimentari è sempre stata storicamente considerata come un indicatore di contaminazione di origine fecale, la cui presenza a concentrazioni crescenti era direttamente proporzionale alla probabilità di isolare alcuni patogeni che condividevano lo stesso *habitat* intestinale.

Si assiste, invece, per alcune matrici, a un andamento inversamente proporzionale tra la presenza di *E. coli* nell'alimento e la presenza di patogeni intestinali quali *Salmonella* spp.

I dati riportati di seguito riguardano le cariche di *E. coli* superiori a 10^5 ufc/g su formaggi prodotti con latte crudo in malghe dell'arco alpino negli ultimi 7 anni.

Escherichia coli e presenza di patogeni nei formaggi prodotti con latte crudo
(osservazioni dell'I.Z.S. delle Venezia)

formaggi		Anno						
		2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008
<i>E. coli</i>	campioni esaminati	57	57	99	120	145	146	186
	campioni con <i>E. coli</i> > 10^5 ufc/g	8	13	22	29	16	29	12
	% campioni con <i>E. coli</i> > 10^5 ufc/g	14,04%	22,81%	22,22%	24,17%	11,03%	19,86%	6,45%
<i>Salmonella</i> spp.	campioni esaminati	57	57	99	73	136	97	152
	presente/assente in 25 g	assente	assente	assente	assente	assente	assente	assente

Si tratta di prodotti lattiero-caseari (spesso lavorati in condizioni igieniche precarie) dai quali non sono mai state isolate salmonelle, nonostante le cariche particolarmente alte di *E. coli*.

L'elevata concentrazione di *E. coli* negli alimenti di origine animale non ha quasi mai rappresentato un pericolo diretto per il consumatore. Infatti, raramente questi prodotti hanno causato una sindrome gastroenterica. Più spesso, le patologie legate al consumo di formaggi prodotti negli alpeggi con latte crudo sono in relazione al numero elevato di stafilococchi coagulasi-positivi, che si comportano da indicatori di igiene di processo.

Essi derivano da forme di mastite negli animali o da contaminazioni crociate originate dal personale che ospita questi potenziali patogeni nelle mani o nella cavità orofaringea.

Di conseguenza, il coli è sempre stato considerato un microrganismo indicatore del mancato rispetto delle più elementari norme igieniche in fase di lavorazione e trasformazione degli alimenti.

NORME

Le disposizioni comunitarie (Regolamento 2073/05 e successivo 1441/07) prevedono la ricerca quantitativa del coli fra i criteri d'igiene di processo per un ristretto gruppo di prodotti (tabella 15).

Viceversa, queste norme considerano lo stesso *E. coli* fra i criteri di sicurezza solo riguardo a molluschi, tunicati e gasteropodi vivi, probabilmente per il pericolo di altri rischi biologici e chimici dovuti al livello di contaminazione spesso elevato delle acque.

Appare pertanto paradossale che lo stesso microrganismo venga considerato, da un lato, *un criterio di igiene di processo* per molte matrici alimentari (tabella 15) con limiti di accettabilità anche piuttosto alti ($100-1000$ ufc/g), il cui superamento comporta, come azione correttiva, un semplice intervento di miglioramento delle condizioni igieniche del processo e, dall'altro lato, venga considerato per i molluschi bivalvi *un criterio di sicurezza alimentare*. Peraltro, in questo caso con un limite particolarmente restrittivo (2.3 ufc/g), il cui superamento com-

porta un intervento di tipo repressivo, penalmente perseguibile, indipendentemente dalla contemporanea presenza di un patogeno intestinale quale *Salmonella* spp.

È questo nonostante che alcuni tipi di alimenti, come formaggi, burro, frutta e ortaggi pre-tagliati, vengano consumati crudi da una fascia di popolazione senza dubbio disomogenea, che può comprendere bambini, adulti ed anziani.

Tabella 15 - Alcune indicazioni sui limiti d'accettabilità per *Escherichia coli* negli alimenti

1. **Requisiti di sicurezza** alimentare previsti dal Regolamento CE 2073/05 aggiornato dal Regolamento CE 1441/07 - Analisi su una unità campionaria (u.c.) di **prodotti immessi sul mercato**

Prodotto	Quantità massima consentita (u.f.c./grammo)
Molluschi bivalvi vivi ed echinodermi, tunicati e gasteropodi vivi	230 in 100 g di carne e liquido intravalvare

2. **Requisiti di igiene del processo** previsti dal Regolamento CE 2073/05 aggiornato dal Regolamento CE 1441/07 - Analisi su cinque unità campionarie (u.c.) di **prodotti non immessi sul mercato**

Prodotto	Quantità massima consentita (u.f.c./grammo)
Carne macinata	50
	500 (su 2 u.c.)
Carni separate meccanicamente	50
	500 (su 2 u.c.)
Preparazioni a base di carne	500
	5.000 (su 2 u.c.)
Formaggi a base di latte o siero di latte sottoposto a trattamento termico	100
	1.000 (su 2 u.c.)
Burro e panna a base di latte crudo o di latte sottoposto a trattamento termico a temperatura inferiore a quella di pastorizzazione	10
	100 (su 2 u.c.)
Prodotti sgusciati di molluschi e crostacei cotti	1
	10 (su 2 u.c.)
Frutta e ortaggi pretagliati (pronti al consumo)	100
	1.000 (su 2 u.c.)
Succhi di frutta e di ortaggi non pastorizzati (pronti al consumo)	100
	1.000 (su 2 u.c.)

3. Altri alimenti con limiti per *Escherichia coli* regolati da **disposizioni preesistenti**

Prodotto	Quantità massima consentita
Acqua potabile non confezionata (D.L. 02/02/01 n. 31)	0 in 100 ml
Acqua in bottiglie o in contenitori (D.L. 02/02/01 n. 31)	0 in 250 ml
Paste farcite precotte surgelate (Circ. Min. 03/08/85 n. 32)	Assenza in 1 grammo su 5 u.c.

NOTA

Il primo valore ("m") indica il limite di accettabilità microbiologica del prodotto; il secondo ("M") la carica tollerabile (nel caso specifico, in 2 su 5 unità campionarie esaminate)

u.f.c./grammo = unità formanti colonia. Corrisponde al numero di germi per grammo o ml di alimento.

Mentre i coli in generale non destano eccessive preoccupazioni sanitarie, almeno nelle nostre zone, la situazione non è vista allo stesso modo per i coli verocitotossici, che possono essere trasmessi con alcuni cibi, tra cui il latte crudo.

Tra essi primeggia il sierotipo O157:H7, che possiede caratteristiche preoccupanti per la salute, vale a dire una carica infettante molto bassa (stimata attorno a 50 cellule), complicanze gravi (sindrome emolitico-uremica o SEU) nelle fasce di popolazione più deboli, facile trasmissione interumana (10% dei casi), escrezione per 17 giorni dalla comparsa dei sintomi, persistenza nelle feci dei portatori per due mesi (Landsbury *e Coll.*, 1997).

Molti lavori pubblicati segnalano isolamenti di *E. coli* O157:H7 negli allevamenti bovini, ad esempio Wilson *e Coll.* (1992) in Canada; Conedera *e Coll.* (1997) in Italia; Jenkins *e Coll.* (2002) in Inghilterra.

Di conseguenza, altrettanto numerose segnalazioni riguardano la carne bovina, specie se tritata, ad esempio Soncini *e Coll.* (1988) in Italia, Heuvelink *e Coll.* (1997) in Olanda, Arun *e Coll.* (2002) in Germania.

Il latte crudo bovino è stato trovato più volte contaminato in Canada (Wilson *e Coll.*, 1992) e negli USA (Duncan *e Coll.*, 1994), come pure i formaggi prodotti da latte non pastorizzato in Italia (D'Aubert *e Coll.*, 1995) e lo yogurt in Inghilterra (Morgan *e Coll.*, 1993).

Tra gli alimenti inquinati da questo sierotipo e riportati in letteratura, si citano anche: carni suine lavorate (Rocelle *e Coll.*, 1996; Faith *e Coll.*, 1997), carni avicole (Read *e Coll.*, 1990), cacciagione (Thoms, 1999), maionese (Zhao *e Coll.*, 1994; Erickson *e Coll.*, 1995), verdure fresche (Fujisawa *e Coll.*, 2000), spinaci confezionati (FDA, 2006), pizza commerciale (FDA, 2006), vitello tonnato (Caserio *e Coll.*, 2001) e l'acqua (Rice *e Coll.*, 1996; Kerr *e Coll.*, 1999).

Intossicazioni da consumo di insalate inquinate da *E. coli* O157:H7 (lattuga, *iceberg* ecc.) sono riportate negli USA dal *Center for Infectious Diseases* di Atlanta (Sivapalasingam *e Coll.*, 2004).

PREVENZIONE

Si basa su misure classiche, valide anche per altri microrganismi potenzialmente patogeni: scelta di materie prime di qualità, igiene fondata sulla disinfezione e contenimento delle temperature.

La pratica dell'autocontrollo, recentemente resa obbligatoria nella comunità europea, dovrebbe, specie attraverso analisi di laboratorio, consentire di individuare errori soprattutto in fatto di igiene per consentire efficaci correzioni.

L'importazione di alimenti da paesi in condizioni igieniche precarie richiede una certa prudenza, soprattutto se si tratta di prodotti da consumare tal quali (spezie, cereali, semi e altri vegetali in genere, frutta, formaggi).

Le recenti disposizioni legislative europee non hanno stabilito norme specifiche per i coli verocitotossici, ritenendole inutili ai fini della riduzione dei rischi per la salute del consumatore. Tuttavia, esse allertano sul rischio potenziale di prodotti che possono maggiormente contenerne: carne di manzo cruda o poco cotta ed eventualmente carne di altri ruminanti; la carne macinata; carne di manzo fermentata e prodotti derivati; latte crudo; prodotti freschi, in particolare semi germogliati e succhi di frutta e di ortaggi non pastorizzati.

PARTE SECONDA

PRATICA DI LABORATORIO

TECNICHE COLTURALI TRADIZIONALI PER ISOLARE *ESCHERICHIA COLI*

Avvertenza

I nomi dei prodotti commerciali citati nel testo sono stati presi da Truant (2002) “Commercial Methods for Microbiology”, Guenzi (2001) “Strumenti, reagenti e kit per il laboratorio biologico e biotecnologico” e da lavori scientifici riportati in bibliografia.

TERRENI BATTERIOLOGICI PIÙ DATATI

Sono apparsi agli inizi del novecento ed erano composti da peptone di carne, digerito di caseina, cloruro di sodio, sostanze selettive (bile, verde brillante, cristalvioletto), zuccheri (quasi sempre lattosio), un indicatore di pH e, per i solidi, agar-agar, noto a Koch dal 1880.

La fermentazione del lattosio, tipica dei microrganismi intestinali resistenti alla bile e ad altri agenti selettivi, era evidenziata dal colore delle colonie.

Trattandosi di terreni poco selettivi, il microbiologo trapiantava in coltura pura le colonie sospette per poi identificarle biochimicamente, ad esempio con la prova dell'indolo e la fermentazione di alcuni carboidrati (lattosio, saccarosio, maltosio, sorbitolo, adonitolo, salicina).

Pochi terreni sono rimasti in uso, se si escludono alcuni fatti per selezionare le salmonelle, sui quali cresce anche il coli.

- 1901 – MacConkey mette a punto uno dei primi brodi selettivi per la flora enterica, Bile Salt Broth, contenente sodio taurocolato 0,5% e l'indicatore tornasole, sostituito da rosso neutro nel 1908.
- 1902 – Drigalski e Coll. approntano il Litmus Lactose Agar, sul quale il coli, fermentando il lattosio, fa virare il tornasole (*litmus*) al rosso, anticipando il sistema indicatore acido-base presente nei terreni moderni.
- 1904 – Endo, per la ricerca del bacillo del tifo, inventa Endo Agar, un terreno di larga applicazione nelle analisi su acqua e latte, contenente fenoltaleina, mantenuta incolore dal solfito di sodio fino a pH acido in caso di fermentazione del lattosio. Si tratta del secondo sistema indicatore acido-base.
- 1905 – MacConkey realizza alcuni terreni solidi ben presto preferiti ai brodi: MacConkey Agar, destinato inizialmente alla microbiologia clinica (contenente lattosio, sali biliari, cristalvioletto, rosso neutro) e Violet Red Bile Agar, simile al precedente ma con estratto di lievito e cristalvioletto in concentrazione doppia.
- 1916 – Holt-Harris e Coll., per esami in umana, approntano Eosin Methylen Blue Agar (EMB) contenente lattosio, saccarosio e due indicatori, eosina Y e blu di metilene.
- 1918 – Levine esclude il saccarosio da EMB Agar nel terreno che porta il suo nome.
- 1918 – Gassner formula un agar contenente blu acqua, giallo metacromo e lattosio, modificato da Pagnini nel 1938 con l'aggiunta di saccarosio per distinguere il genere *Proteus*.
- 1926 – Durham introduce un brodo d'arricchimento, Brilliant Green Bile 2% Broth, in grado di esaltare la fermentazione del lattosio con produzione di gas, raccolto in campanule capovolte.

- 1935 – Leifson, per differenziare i patogeni intestinali nell'acqua e nel latte, formula un terreno selettivo, Desossicolato Citrato Agar (DCA), ripetutamente modificato, i cui ingredienti principali sono desossicolato di sodio, lattosio, sodio citrato, sodio tiosolfato e rosso neutro.
- 1935 – Nobel e Coll., per contare i coli nell'acqua, preparano il Brilliant Green Bile Agar (BGBA), basato sulla fermentazione del lattosio e sull'indicatore fucsina basica, che conferisce alle colonie il colore rosso.
- 1939 – Weiss e Hunter, per semplificare la ricerca dei lattosio-fermentanti nell'acqua potabile con un *test* di presenza-assenza, seminano il campione in PA Broth contenente lattosio, bromocresolporpora (indicatore) e sodio lauril-solfato (selettivo).
- 1943 – Hajna e Coll. introducono EC Medium, un brodo per analizzare acque, molluschi e alimenti contenente lattosio e sali biliari.
- 1947 – Chapman mette a punto Tergitol-7 Broth e Tergitol-7 Agar, terreni selettivi basati sull'azione inibente del sodio eptadecil-solfato e sulla fermentazione del lattosio, evidenziata da blu di bromotimolo, per cui il coli cresce con colonie giallo-verdi circondate da un alone giallo.

TERRENI LIQUIDI E SOLIDI: DAI BRODI PER I CONTEGGI CON IL METODO MPN AI SUBSTRATI SELETTIVI E/O DIFFERENZIALI PER ANALISI QUANTITATIVE SU ALIMENTI

Nel periodo di maggior sviluppo della microbiologia (anni 60-70), pochi terreni vengono dedicati alla diagnosi clinica, fatta eccezione per CLED Agar, destinato all'esame delle urine. Contiene cistina, lattosio, blu di bromotimolo e le colonie del coli crescono gialle, quelle degli altri germi blu-verdi (Sandys, 1960).

L'attenzione dei batteriologi è maggiormente rivolta al controllo igienico-sanitario degli alimenti di produzione industriale, in forte espansione.

La ricerca del coli verde inizialmente su acqua e latte, noti veicoli del tifo (e quindi obiettivo prioritario dei controlli), per estendersi poi ad altri alimenti.

La tecnica d'analisi preferita è quantitativa: si chiama *Most Probable Number* (MPN) e prevede la semina di diluizioni decimali del campione in opportuni brodi, ripartita su 3 o 5 provette, da incubare e trapiantare su terreno selettivo solido per verificare la natura dei germi sviluppati. Il vantaggio dei terreni liquidi, rispetto a quelli solidi, starebbe nella capacità di recuperare anche poche cellule batteriche, rivitalizzando quelle stressate da trattamenti fisico-chimici (calore, congelamento).

I brodi adatti alla tecnica MPN diventano numerosi, ma simili nel principio di funzionamento: fermentazione del lattosio, evidenziata dalla formazione di gas raccolto in una provettina capovolta (campana di Durham) e selettività indotta da sostanze già note (bile, verde brillante, lauril solfato di sodio).

Fra questi terreni si trovano: Lauryl Sulphate Broth (Mallmann e Coll., 1943), Lactose Broth (APHA, 1946), EE Broth (Mossel e Coll., 1963), A-1 Broth (Andrews, 1972), Lauryl Tryptose Mannitol Broth (PHLS, 1980).

Successivamente, il metodo MPN viene trascurato, perché ritenuto indaginoso e suscettibile di interpretazioni contraddittorie, essendo basato su calcoli statistici. Inoltre, esso si rivela equiparabile ai conteggi in piastra, decisamente più snelli (Bredie e Coll., 1992; Garcia e Coll., 1995; Geissler e Coll., 2000).

La tecnica MPN rimane tuttavia in alcuni protocolli per il controllo ufficiale degli alimenti, anche se ne viene accettata la sostituzione con *altri metodi, purché in grado di fornire risultati equivalenti*.

In microbiologia alimentare si afferma la semina di diluizioni del campione su terreni solidi, tra i quali prevale il Violet Red Bile Agar (VRBA), reso maggiormente selettivo dall'incubazione a +44°C. Molti Autori si sono serviti di questo terreno, come dimostrato dagli esempi che seguono.

Klein *e Coll.* (1976) sperimentano con successo, per le determinazioni quantitative degli enterobatteri fecali, il terreno VRBA. La selezione è affidata alla bile, al cristalvioletto e alla temperatura elevata d'incubazione (+44,5 °C per 24 ore). Solo le colonie di colore rosso scuro, più larghe di 0,5 mm e circondate da un alone rosso maggiore di 1 mm, vengono attribuite a coliformi cosiddetti "fecali", tra cui *Escherichia coli*.

Mossel *e Coll.* (1977) stendono un protocollo semplificato per l'esame dell'acqua potabile unicamente con l'uso di terreni solidi.

Richards (1978) confronta la tecnica MPN con il conteggio su Violet Red Bile Agar, concludendo per la parità fra i due metodi se la popolazione dei colibatteri è superiore a 15 cellule. Mossel *e Coll.* (1979) sostituiscono il glucosio al lattosio nel Violet Red Bile Agar. Il nuovo terreno, destinato a far crescere con colonie rosse gli enterobatteri in generale, si chiama Violet Red Bile Glucose Agar o VRBG.

Hanh *e Coll.* (1986) ribadiscono l'effetto positivo dell'incubazione a +44,5 °C per isolare il coli dai formaggi.

Mossel *e Coll.* (1986) e Takacs *e Coll.* (1979) preferiscono invece l'incubazione del Violet Red Bile Agar a +42,5 °C per contare il coli negli alimenti deperibili.

Stiles *e Coll.* (1980) per ricercare il coli nella carne trita usano, con risultati paragonabili al metodo MPN, la semina in profondità su Violet Red Bile Agar, incubato a +44 °C per 24 ore.

Oblinger *e Coll.* (1982) effettuano un'ampia disamina sulle capacità selettive di Violet Red Bile Agar con e senza glucosio, seminato con vari alimenti e incubato a differenti temperature.

Monti *e Coll.* (1995) consigliano, dopo incubazione a +44 °C, di trapiantare da Violet Red Bile Agar alcune colonie sospette su Brillant Green Lactose Bile Broth 2% e su Trypticase Soy Agar, per verificare, dopo 24-48 ore a +44 °C, rispettivamente, la crescita e l'identità biochimica dei germi mediante Enterotube®. Considerano veri coliformi fecali solamente *Escherichia coli*, *Enterobacter cloacae*, *Enterobacter aerogenes*, *Klebsiella pneumoniae* e *Citrobacter freundii*.

TERRENI CROMOGENICI E FLUOROGENICI

Al posto delle classiche reazioni di fermentazione, questi terreni mettono in evidenza nei batteri il possesso di alcuni enzimi specifici, ad esempio la glucuronidasi nell'*Escherichia coli*, scoperta da Buehler nel 1949, in grado di idrolizzare un glucuronide, e la galattosidasi nei coliformi, che agisce sui galattopiranosidi.

I substrati metabolizzabili specificatamente da coli e coliformi vengono inclusi, da soli o in coppia, in terreni solidi o liquidi, legati indifferentemente a un pigmento cromogeno o a un fluorocromo.

In seguito a idrolisi del substrato, questi marcatori si liberano, colorando i terreni liquidi e le colonie sui solidi, oppure rendendoli fluorescenti al buio se osservati in luce ultravioletta.

I rimanenti ingredienti sono invariati: sostanze proteiche (peptoni, idrolisati, estratti di lievito), fosfati per la regolazione del pH, sali biliari ad azione selettiva e agar-agar nei terreni solidi.

Kilian *e Coll.* (1976) sono tra i primi Autori a descrivere il valore diagnostico dell'enzima glucuronidasi su metil-umbelliferil-Beta-D-glucuronide o GUD.

Feng *e Coll.* (1982) scelgono, invece, la reazione su metil-umbelliferil-Beta-D-galattopiranoside o MUG. Propongono un brodo che diventa fluorescente se vi crescono coli, salmonelle e shigelle.

Trepeta *e Coll.* (1984) aggiungono MUG al terreno di MacConkey e ne stimano alta la specificità per la ricerca del coli in campioni clinici.

Wright (1984) sperimenta un nuovo terreno agarizzato selettivo e differenziale per *E. coli* e coliformi.

Damaré *e Coll.* (1985), per la conta del coli negli alimenti, trovano uguale, e in qualche caso superiore al metodo MPN, la semina dei campioni su PTG Agar contenente MUG, da incubare a +35 °C per 16-24 ore.

Hanh (1987) è convinto che i vari terreni solidi o liquidi in uso contenenti MUG (VRB, BLG, PMK) rivelino circa il 100% dei coli in conseguenza dell'incubazione a +44,5 °C e della fluorescenza.

Dello stesso parere sono anche:

Singh *e Coll.* (1986); Poelma *e Coll.* (1987) in ricerche su alimenti ad alto contenuto d'umidità; Schmidt-Lorenz *e Coll.* (1988), su alimenti vari; Heizmann *e Coll.* (1988) su campioni clinici; Moberg *e Coll.* (1988) su alimenti congelati; Manafi *e Coll.* (1989) per l'analisi delle acque; Matushek *e Coll.* (1992) per i gelati; Vanderzant *e Coll.* (1992); Blood *e Coll.* (1995) per tutti i tipi di alimenti.

In microbiologia clinica e alimentare, per facilitare la selezione delle colonie di *Escherichia coli*, sono stati formulati e impiegati anche altri terreni, caratterizzati da una composizione più elaborata rispetto ai precedenti (Restaino *e Coll.*, 1999).

Goodsey *e Coll.* (1981), per isolare e differenziare i patogeni urinari, perfezionano un terreno che consente di ricercare contemporaneamente tre enzimi: galattosidasi (coliformi), glucuronidasi (*E. coli*), xilosidasi (*Klebsiella*), sfruttando un cromogeno e un fluorogeno. I coli crescono con colonie rosso-viola, i protei marrone, *Klebsiella*, *Enterobacter* e *Serratia* blu-verde.

Rayman *e Coll.* (1981) adottano le piastre di Anderson-Baird Parker Agar per contare il coli negli alimenti.

Hall (1984) espone un metodo che prevede la dimostrazione delle colonie indolo-positive su piastre seminate con alimenti congelati.

Cantoni *e Coll.* (1986) precisano che non tutte le colonie fluorescenti su terreni contenenti MUG sono *Escherichia coli*, raccomandando la verifica su PMK o Monensin Agar.

Frampton *e Coll.* (1987) preferiscono includere il substrato glucuronide a 50 gamma/ml in Peptone Tergitol Agar (PTA), dopo sterilizzazione del terreno base, consigliando l'incubazione delle piastre a +37 °C per 24 ore (le colonie di *Escherichia coli* appaiono blu). Nonostante il costo maggiore rispetto a un terreno contenente MUG, non occorre la lampada di Wood per leggere la fluorescenza.

Il Servizio Sanitario Svizzero uniforma una tecnica che migliora la specificità e riduce il numero dei falsi positivi, basata sul terreno MSDA + MUG senza aggiunta di urea (Bundesamtes für Gesundheitswesen, 1990).

Manafi *e Coll.* (1991) hanno modificato un terreno liquido già esistente (Lauryl Sulphate Broth) in LSB X-GAL-MUG, nel quale i coliformi, idrolizzando due galatopiranosidi, fanno virare il brodo al blu, mentre *E. coli*, attaccando un glucuronide, rende il terreno fluorescente.

Mosso *e Coll.* (1991) cercano i coliformi totali in Brodo Bile Verde Brillante con campana di Durham per 48 ore a +32 °C, seguendo la tecnica MPN. Successivamente, per restringere la determinazione al coli, trapiantano le provette positive (+gas) su VRBA + MUG, da incubare a +37 °C per 24 ore.

Frampton *e Coll.* (1993) combinano un glucuronide con un galatopiranoside, proponendo un terreno cromogenico che differenzia, in base al colore delle colonie, i coliformi (beta-galattosidasi positivi) da *Escherichia coli* (glucuronidasi positivo).

Haines *e Coll.* (1993), come pure Villari *e Coll.* (1997), aggiungono dei glucuronidi a vari terreni, in ragione di 250 mg/ml, ottenendo una sensibilità del 93,3% rispetto ai metodi tradizionali.

Garcia *e Coll.* (1995), per analizzare i molluschi, includono diluizioni del campione omogeneizzato in terreno fuso ETPC Agar a doppia concentrazione. Questo, distribuito in piastre, viene incubato a +45,5 °C per 24 ore. Il metodo dà risultati uguali alla tecnica MPN su 3 o 5 provette.

Mazuyer *e Coll.* (1995), per differenziare nelle infezioni urinarie *E. coli* da *Proteus* e *Shigella*, utilizzano un glucuronide nel terreno CPS ID2, contenente anche un glucoside per riconoscere *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Serratia*, oltre a triptofano, per distinguere, dalla deaminasi, *Proteus*, *Providencia* e *Morganella*.

Attualmente, i terreni cromogenici e fluorogenici sono molto usati e alcuni di essi vengono comunemente chiamati col nome commerciale, ad esempio: Chromagar (Oxoid,UK), Coli-Gel (Charm, USA), SD-39 (QA Life Sci., USA).

Un'analisi accurata dei terreni selettivi e differenziali che permettono la determinazione contemporanea in piastra di *Escherichia coli* e coliformi, ristretta agli alimenti di origine animale, è stata pubblicata da Mioni *e Coll.* (1997).

Recentemente, Perry *e Coll.* (2007) hanno compilato una rassegna sull'applicazione dei terreni cromogenici in clinica microbiologica.

Altri prodotti, oltre a quelli già menzionati, sono riportati nella tabella che segue:

Tabella 16 – Esempi di terreni cromogenici e fluorogenici (da Manafi, 1996)

Terreno	Substrato		Sostanza selettiva	Casa produttrice
	Colore colonie coliformi	Colore colonie <i>E. coli</i>		
Liquidi				
Fluorocult LMX Broth	X GAL Blu-verde	MUG Blu fluorescente	Lauryl solfato	Merck (D)
Colilert	ONPG Giallo-rosso	MUG Blu fluorescente		Environetics (USA)
ColiQuick	ONPG Giallo-rosso	MUG Blu fluorescente		Hach (USA)
Colisure	- Rosso	MUG Blu fluorescente		Millipore (USA)
Coli-Complete	X GAL Blu	MUG Blu fluorescente		Bio-Control (USA)
Solidi				
EMXAgar	X GAL Blu	MUG Blu fluorescente	Sali biliari	Biotest (D)
C-EC-MF Agar	X GAL Blu	MUG Blu fluorescente	Sali biliari	Biolife (I)
Chromocult	SalmonGAL Rosso	X GLUC Blu-violetto	Tergitol -7	Merck (D)
Coli ID	X GAL Blu	- Rosa-violetto		Bio-Merieux (F)
CHROMagar ECC	- Rosso	X GLUC Blu		Chromagar (F)

TERRENI PER L'ISOLAMENTO DI ESCHERICHIA COLI O157:H7

I terreni per isolare i coli si sono rivelati insufficienti dopo la scoperta di questo sierotipo, che, a differenza degli altri, sui terreni al MUG generalmente non forma colonie fluorescenti e preferisce l'incubazione a +37 °C anziché a +44 °C (Hofstra e Coll., 1988).

Per ovviare all'inconveniente, parecchi Ricercatori hanno adottato la semina diretta dei campioni su MacConkey Agar con l'aggiunta di sorbitolo, zucchero per lo più non fermentato da O157, che, pertanto, cresce con colonie incolori anziché rosse (D'Aubert e Coll., 1995 ; Rice e Coll., 1996 ; Fiorina e Coll., 1997).

Lo stesso terreno è stato modificato aggiungendo sostanze che differenziano il sierotipo O157 dagli altri: MUG (Zhao e Coll., 1994), acido glucuronico (Martin e Coll., 1994), potassio tellurito più cefixime (Bennett e Coll., 1995; Fujisawa e Coll., 2000). Questi Autori consigliano di confermare le colonie sospette con un'agglutinazione al lattice.

Altri Autori, che consideravano il terreno di MacConkey troppo selettivo e, pertanto, poco sensibile, si sono orientati verso substrati differenti.

Ahmed *e Coll.* (1995), per evidenziare germi stressati termicamente, usano Phenol Red Sorbitol Agar (PRSA) addizionato di MUG 0,005%.

Erickson *e Coll.* (1995), per analizzare la maionese, cercano le colonie rosa su SD-39 EHEC Selective Agar, incubato a +44,5 °C per 24-48 ore.

Weagant *e Coll.* (1995) antepongono alle piastre di MacConkey Sorbitol Agar + tellurito + cefixime un arricchimento del campione in Trypticase Soy Broth (TSB) antibiotato (vancomicina + cefsulodin + cefixime), incubato a +37 °C per 6 ore.

Pozzi *e Coll.* (1996), per la ricerca di ceppi coli produttori di enteroemolisine, arricchiscono il campione in TSB a +37 °C per 6 ore, quindi trapiantano alcune diluizioni decimali da brodo su Enteroemolysin Agar Vancomycin (EAV), da incubare a +37 °C per 18-24 ore. Anche in questo caso, le colonie sospette (emolitiche o no) richiedono una serie di conferme per via biochimica (lattosio, sorbitolo, MUG) e sierologica (agglutinazione con sieri O157, O26, O111), nonché la dimostrazione della produzione *in vitro* di tossine SLT1 e SLT2.

Wallace *e Coll.* (1996) propongono l'arricchimento di campioni clinici provenienti da allevamenti bovini in Brodo Trypticase (TSB) incubato a +37 °C per 24 ore e trapiantato su Chromagar (colonie rosa) e su Lactose Monensin Glucuronate Agar o LMG (colonie blu).

Fiorina *e Coll.* (1997) preferiscono seminare i tamponi, adoperati per valutare l'igiene di lavorazione degli alimenti, su MacConkey Sorbitol Agar. Dopo 24 ore a +37 °C, trapiantano le colonie incolori su MacConkey Agar, per poi verificare con un siero agglutinante le colonie rosse.

Miglioramenti al metodo tradizionale sono stati apportati combinando la coltura con l'immuno-separazione magnetica (*vedi metodi alternativi e innovativi in diagnostica*).

Tuttavia, indipendentemente dalla tecnica impiegata, il ritrovamento di un centinaio di sierotipi produttori di verocitotossine (tra cui O26, O111, ecc.) ha indebolito il valore della ricerca limitata al sierotipo O157:H7.

Attualmente, la dimostrazione diretta delle verocitotossine nel materiale in esame sembra aver ottenuto maggiori consensi fra i Ricercatori (Bülte, 1995).

METODI DI REFERENZA PER LA RICERCA DEL COLI IN MICROBIOLOGIA ALIMENTARE

ALIMENTI E MANGIMI

ISO 16649-2 (2001)

Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase positive Escherichia coli

Dall'omogenato del campione, vengono allestite opportune diluizioni decimali in diluente fisiologico, da ognuna delle quali 1 ml viene trasferito, in doppio, entro piastre Petri sterili. All'inoculo vengono mescolati ml 15 per piastra di TBX Medium fuso a 50 °C, da incubare, dopo solidificazione, a +44 °C per 18-24 ore. *Escherichia coli* cresce con colonie blu.

Se si sospettano germi stressati, le piastre possono essere pre-incubate a +37 °C per 4 ore.

ISO 16649-3 (2005)

Microbiology of food and animal feedstuffs - Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive-Escherichia coli.

Part 3: Most probable number technique using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-glucuronide

La metodica MPN prevede, in questo caso, la semina di tre provette per diluizione. Tuttavia, per l'esame di molluschi vivi o altri prodotti, per i quali si esige una maggiore accuratezza di risultati, si seminano cinque provette per diluizione. Il brodo da seminare è il Mineral Modified Glutamate Medium (MMGM), distribuito in provette con 10 ml di terreno, preparato, rispettivamente, a doppia e a semplice concentrazione.

Dal campione liquido o dall'omogenato (se alimento solido), si seminano tre provette di brodo a doppia concentrazione con 10 ml ciascuna e tre provette di brodo a semplice concentrazione con 1 ml ciascuna.

Dalle eventuali diluizioni del campione (1/10 e 1/100), si seminano tre provette di brodo a semplice concentrazione con 1 ml ciascuna.

Dopo incubazione in termostato a +37 °C per 24 ± 2 ore, si scelgono le provette virate al giallo (produzione di acido), che vengono trapiantate con ansa su Tryptone Bile Glucuronide Agar (TBX), in modo da ottenere colonie staccate.

Le piastre, incubate a +44 °C per 20-24 ore, che mostrano colonie blu o blu-verdi, sono ritenute positive (*E. coli* beta-glucuronidasi positivo), per cui anche le provette d'origine sono da conteggiare positive ai fini della lettura con le tabelle MPN di Mc Crady (*vedi appendice*).

ACQUE POTABILI

UNI EN ISO 9308-1 (2000)

Water quality - Detection and enumeration of Escherichia coli and coliform bacteria.

Part 1: Membrane Filtration Method.

100 ml di acqua (250 se in bottiglie) vengono filtrati, preferibilmente in doppio, su

membrane (diametro 47 mm, porosità 0,45 mmicron) da collocare su piastre di TTC Agar con incubazione di 24 ore, rispettivamente, a 37 e a 44 °C, per migliorare la selettività.

Si contano le colonie lattosio+ (gialle), trapiantandone un numero rappresentativo (almeno 10) in terreno non selettivo da incubare a 37 °C per 24 ore.

La conferma avviene con *test* dell'ossidasi, da allestire su carta da filtro saturata con reattivo fresco dell'ossidasi (positivo con viraggio al blu entro 30 sec) e con *test* dell'indolo (trapianto in Tryptophan Broth, incubazione a 44 °C per 24 ore, aggiunta di ml 0.2-0.3 di reattivo di Kovacs, positivo con sviluppo di anello rosso).

I coliformi sono ossidasi-, mentre *Escherichia coli* è ossidasi- e indolo+.

AMBIENTI E SUPERFICI DI LAVORAZIONE DEGLI ALIMENTI

ISO 18593 (2004) + ISO 16649-2 (2001)

Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for sampling technique from surfaces using contact plates and swabs

Tamponi (preventivamente inumiditi in diluente sterile) oppure garze o spugne sterilizzate vengono strisciati su 20-100 cm² della superficie da esaminare.

I prelievi vanno introdotti in recipienti sterili (provetta o sacchetto) contenenti una sufficiente quantità di diluente, addizionato con una sostanza neutralizzante detergenti e disinfettanti (ad esempio, sorbitan monooleato o lecitina).

Dopo trasporto refrigerato al laboratorio, si allestiscono opportune diluizioni in diluente fisiologico da seminare in profondità su TBX Medium (*vedi ISO 16649-2*), con possibilità di adottare, in alternativa, la semina in superficie (0,1 ml) o *drop* (0,05 ml).

METODI ALTERNATIVI E INNOVATIVI IN DIAGNOSTICA

Questi metodi si possono suddividere in:

- alternativi (quando partono da metodi classici per poi discostarsi lungo il percorso);
- innovativi (se si basano su principi diversi dalla tecnica colturale).

Una forte accelerazione alla ricerca di nuove tecniche diagnostiche è stata data dalla scoperta del sierotipo O157:H7, trattandosi di un ceppo patogeno che presenta qualche problema d'isolamento sui terreni colturali. Infatti, pur essendo comunemente negativo al sorbitolo e alla fluorescenza (MUG), non sempre mantiene queste caratteristiche (Scotland *e Coll.*, 1991).

KIT PER MPN

Si tratta di sistemi confezionati in piastre *microtiter* per la quantificazione di coliformi ed *E. coli*. Sono molto affidabili (limite di confidenza del 95%), economici, in quanto consentono di risparmiare tempo (il risultato è disponibile in 24 ore) rispetto ai metodi tradizionali e di facile esecuzione. Inoltre, questi sistemi hanno altri vantaggi: richiedono meno di un minuto di lavoro per campione; eliminano il conteggio soggettivo delle colonie e altre operazioni manuali dell'operatore.

Questi sistemi miniaturizzati distribuiscono automaticamente la miscela di campione e reagente in pozzetti separati. Il numero di pozzetti positivi può essere convertito in Numero Più Probabile (MPN), usando le tabelle di riferimento. Il numero di pozzetti della piastra che dimostrano variazioni permette, attraverso una formula, di risalire alla concentrazione di batteri nell'unità di misura del materiale esaminato.

Hanno un valido campo d'utilizzo nell'esame delle acque (giudizio di potabilità, contaminazione da scarichi industriali, acque dolci o salate destinate a balneazione, piscine, ecc.).

Nel sistema Quanti-Tray® della IDEXX, la presenza del germe nei pozzetti, dove è stata distribuita la miscela terreno+campione, provoca sviluppo di colore (se coliformi) o fluorescenza (se *E. coli*).

Il kit Colilert-18® della stessa casa permette, invece, la dimostrazione di presenza/assenza degli stessi germi in un campione di 100 ml d'acqua incubato per 18 ore.

Il kit Coli-Track® della BioControl contiene nei pozzetti della piastra il brodo LST+MUG, che mostra, in caso positivo, sviluppo di gas (coliformi) oppure fluorescenza (*E. coli*).

Nel sistema Microplate MUG-EC (Biokar), il campione può essere ripartito su 96 pozzetti della micropiastra, contenenti il terreno liofilizzato A-1 più un glucuronide. Dopo 36 ore a +44 °C, i pozzetti che risultano contaminati da *E. coli* appaiono fluorescenti in luce UV e possono fornire, applicando una formula che sta alla base del metodo MPN, la concentrazione approssimativa del microrganismo nel campione.

IMMUNO-SEPARAZIONE MAGNETICA (IMS)

Okrend *e Coll.* (1992) descrivono per primi una tecnica d'isolamento di *E. coli* O157:H7, spesso presente a basse concentrazioni nel materiale da esaminare, che usa anticorpi specifici adsorbiti su particelle paramagnetiche. Queste, una volta attratte da un magnete e seminate su terreni liquidi o solidi, offrono maggiori probabilità di crescita ai germi catturati. L'impiego di questa tecnica riduce notevolmente il tempo di analisi e aumenta la sensibilità del metodo.

Heuvelink *e Coll.* (1997) arricchiscono il campione di carne trita a +37 °C per 6 ore in brodo EC modificato + novobiocina, sotto agitazione a 100 rpm, poi effettuano la separazione immuno-magnetica con Dynabeads® e quindi piastrano le cellule concentrate su MacConkey Sorbitol Agar addizionato di cefixime e tellurito di potassio (CT-SMAC). Cercano, infine, se il ceppo isolato produce verocitotossine VT1 e/o VT2 con il *kit* Verotox F®.

Vernozy-Rozand *e Coll.* (1997) arricchiscono il campione di carne trita a +42 °C per 4-6 ore in TSB modificato. Il prodotto della separazione immuno-magnetica (ottenuto mescolando 1 ml di brodo-coltura con 20 microlitri di Dynabeads® e 30 microlitri di PBS con Tween-80) viene piastrato su MacConkey Cefixime Tellurite Agar (CT-SMAC) e su Chromagar® *E. coli* O157:H7 per 18-24 ore a +37 °C.

Le Jeune *e Coll.* (2001) concentrano i batteri seminando il campione d'acqua in TSB a +44,5 °C ed effettuando su questo terreno l'immunoseparazione mediante Dynabeads®.

Arun *e Coll.* (2002) esaminano *hamburger* arricchendo a +37 °C per 6 ore il campione in Buffered Peptone Water più antibiotici (vancomicina+cefixime+cefsulodina) e, dopo separazione immuno-magnetica, piastrano le sferette Dynabeads® su terreno CT-SMAC.

Mercanoglu *e Coll.* (2006), esaminando il pollame, hanno ottenuto, con la coltura associata a IMS, risultati positivi nel 2,9% dei campioni, contro lo 0,9% dello stesso metodo senza IMS.

CONCENTRAZIONE DEI BATTERI SU MEMBRANA FILTRANTE (MF)

Il metodo della filtrazione su membrana consente di determinare, in campioni di acqua, la concentrazione di batteri *coliformi* che hanno formato colonie su una membrana posta su un terreno colturale agarizzato. Dopo incubazione a $36^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ per 18-24 ore, bisogna contare le colonie tipiche (*coliformi* presuntivi) e sottoporle a conferma per la verifica dell'appartenenza al gruppo dei *coliformi*. Il volume di campione da analizzare, generalmente pari a 100 ml, è funzione della tipologia e della qualità dell'acqua da esaminare. È necessario filtrare un'aliquota del campione, o un volume di una sua diluizione, attraverso una membrana di esteri di cellulosa (diametro 47 mm) con pori di 0,45 µm. Successivamente, si pone la membrana sulla superficie del terreno e si procede all'incubazione. Le colonie cresciute entro 24 ore, rosse con riflesso metallico e, generalmente, con colorazione rosso scuro del terreno sotto la membrana, si considerano formate da *coliformi*. Per verificarle, è necessario un *test* dell'ossidasi (negativo) o di fermentazione del lattosio (positivo), oppure l'utilizzo dei sistemi miniaturizzati di identificazione biochimica in commercio. Tuttavia, prima di effettuare ciascuna prova di conferma, è necessario trapiantare le colonie sospette su terreno agarizzato ed effettuare le prove su colonie con non più di 24 ore di incubazione.

Fra i terreni più noti, modificazioni di formule già esistenti, si citano: mFC Broth, mENDO Broth MF, mFC Agar, mENDO Agar LES, mColi Blue (Erdmann *e Coll.*, 2002).

Le membrane di acetato o nitrato di cellulosa possono avere una funzione diversa dalla filtrazione. Se si distribuisce, con una spatola sterile, il campione sopra una membrana adagiata su un terreno semplice, le cellule batteriche si rivitalizzano, assumendo le sostanze nutritive del terreno attraverso i pori della membrana, durante un breve periodo d'incubazione in termostato. La selezione dei germi avviene trasferendo la membrana sopra un secondo terreno, da incubare in maniera tradizionale.

Gill e Coll. (1966) contano i coli sulle superfici di lavorazione delle carni, seminando il liquido raccolto con tamponi su membrana appoggiata sopra Monensin Glucuronate Agar (LMGA). Dopo 24 ore a +37 °C, la membrana viene trasferita su BMA Agar, dove le colonie appaiono fluorescenti se esaminate in luce UV.

Anderson e Coll. (1975) seminano 0,1 ml del campione su una membrana da 0,45 µm appoggiata sulla superficie del terreno Tryptose Bile Agar. Dopo incubazione di 24 ore a +44 °C, la membrana viene trasferita, con una pinza sterile, sul coperchio della piastra e bagnata con reattivo di Kovacs, in modo da far colorare le colonie di coli in rosa.

McCarty e Coll. (1998) stendono uniformemente 0,1 ml del campione omogeneizzato su una membrana da filtrazione della porosità di 0,45 µm, incubano la piastra a +37 °C per 4 ore, trasferiscono quindi la membrana su MacConkey Sorbitol Agar, da porre a +37 °C per 20 ore.

SISTEMI PETRIFILM® / COMPACT DRY® / RIDA COUNT®

Si tratta di sistemi basati su un terreno che viene reidratato dal campione al momento della semina. Essi permettono di esaminare diluizioni di campioni, ad esempio di alimenti omogeneizzati, di superfici per contatto diretto (previa idratazione del prodotto con soluzione fisiologica), di tamponi umidificati.

Le piastre Petrifilm® (3M) costituiscono una gamma di terreni di coltura pronti per l'uso, studiati in modo esclusivo per garantire un risparmio di tempo, una maggiore produttività, affidabilità ed efficienza. Queste piastre offrono un sistema monouso di conteggio microbiologico facile da utilizzare e più sicuro rispetto ai metodi tradizionali, in quanto non richiedono arricchimenti o trasferimenti di colture, quindi minori rischi di contaminazione crociata al momento del prelievo. Permettono il conteggio dei *coliformi* e presentano una lettura facilitata da un indicatore che colora in rosso le colonie. Il *film* superiore cattura il gas prodotto dalla fermentazione del lattosio da parte dei *coliformi*. Le piastre Petrifilm® contengono un indicatore della β-glucuronidasi per il riconoscimento di *E. coli*; inoltre garantiscono il risultato in 24-48 ore.

Le piastre Compact Dry® (Hy Serve) sono brevettate, rigide e compatte, si conservano a temperatura ambiente, presentano sul fondo un *gel* solubile in acqua e un terreno nutritivo disidratato. Sono pronte all'uso, in quanto il liquido del campione idrata il terreno, diffonde immediatamente per capillarità. Il riconoscimento e il conteggio delle colonie sono facilitati da substrati cromogeni, contenenti un glucuronide e un galattopiranoside. *E. coli* cresce con colonie blu, i coliformi con colonie rosse.

Le piastre Rida® Count *E. coli* (R-Biopharm) sono formate da una base su cui è adeso un terreno cromogenico coperto da uno strato di tessuto non-tessuto che riceve il campione e lo lascia diffondere nel mezzo nutritivo sottostante. Le colonie di *E. coli* appaiono dopo 24 ore a +37 °C di color porpora.

Restaino (1987) sostiene l'efficacia di Petrifilm® VRB per conteggiare coliformi ed *E. coli* in carni bovine congelate.

Ottaviani (1989) illustra la tecnica di ricerca del coli negli alimenti con Petrifilm® 3M in comparazione col metodo MPN e con i terreni al MUG.

Okrend e Coll. (1990) descrivono per primi l'uso del Petrifilm® Test Kit HEC (3M) per isolare i coli emorragici dalle carni.

Calicchia e Coll. (1994) sostengono che nei campioni moderatamente contaminati da coliformi (fra 10 e 40.000 cellule/g) è possibile contare le colonie blu attribuibili a coli O157:H7, seminando 1 ml dell'omogenato del campione (diluito 1:10) direttamente su Petrifilm® HEC.

Heuvelink e Coll. (1997), per esami su carni, diluiscono il campione 1:10 in EC Broth + novobiocina. Dopo mantenimento dell'omogenato a +37°C per 6-8 ore, seminano 0,1 ml su Petrifilm® E. coli e su Petrifilm® HEC (specifico per O157), che incubano a +42°C per 18 ore.

IMMUNOENZIMATICA

Il dosaggio immunoenzimatico (ELISA) è una tecnica molto importante per l'analisi quantitativa di campioni biologici. Tale metodica unisce la specificità della reazione immunologica antigene-anticorpo con la sensibilità di un semplice dosaggio spettrofotometrico. La tecnica ELISA (Enzyme-Like-ImmunoSorbent-Assay) ha un'elevata selettività nei confronti dei composti da determinare, in quanto l'anticorpo è in grado di riconoscere specificamente l'antigene che ne ha evocato la formazione. Il legame fra anticorpo e antigene è svelato dall'aggiunta di un substrato e dei reattivi necessari a evidenziare l'attività enzimatica.

Nella forma più comune del *test*, un anticorpo primario si trova adeso ai pozzetti di una piastra *microtiter* e viene posto a contatto col campione sospettato di contenere l'antigene da dimostrare. Se questo è presente, resta legato e la successiva aggiunta di un anticorpo secondario, coniugato con un enzima, completa la reazione immunologica. L'enzima agisce quindi su un substrato, producendo una sostanza colorata o fluorescente visibile e misurabile con uno spettrofotometro.

Il kit Elisa Dipstick Immunoassay Petrifilm® abbina il principio tecnico della reazione immunoenzimatica a un supporto plastico su cui sono adsorbiti gli anticorpi specifici. È stato usato da Mi Sun Kim e Coll. (1992) per analizzare campioni di carne trita e da Johnson e Coll. (1995) in focolai di tossinfezione.

Il GeneQuence *E. coli* O157:H7 della Neogen è un *test* ELISA a *sandwich* che utilizza anticorpi specifici adesi ai pozzetti di una piastra *microtiter*. Un volume pari a 100 µl di arricchimento del campione vengono collocati nella piastra, incubato per 20 minuti e lavato 5 volte. Dopo una serie di incubazioni (di 10 minuti ciascuna) e di lavaggi, vengono poi addizionati in sequenza: l'enzima coniugato, il substrato cromogeno e lo *stop*. La prova può essere letta anche a 450 nm con uno spettrofotometro.

Numerosi prodotti commerciali, assimilabili per principio di funzionamento, sono pure citati da varie fonti:

Unique® (TECRA), Elisa O157 (TECRA), Assurance® (BIO-CONTROL), Premier® (MERIDIAN), RapidTest® (MICROGEN), TransiaCard® (TRANSIA).

Esistono strumentazioni automatizzate per assolvere la manualità delle operazioni. I sistemi più conosciuti sono: Vidas® (BIO-MERIEUX), che opera secondo il principio dell'ELFA, una variante fluorescente del metodo ELISA, ed EIA-Foss® (FOSS), funzionante anch'esso su base immunoenzimatica.

IMMUNOFLUORESCENZA (IF)

È una tecnica di indagine mediante anticorpi diretti contro antigeni di cui si vuole vagliare la presenza, marcati con sostanze fluorescenti (fluorofori o fluorocromi), che, assorbendo onde ad alta frequenza, (ultravioletti) emettono nel visibile. Eventuali immunocomplessi antigene-anticorpo si possono osservare usando spettrofluorimetri, microscopi a fluorescenza, citofluorimetri. Il fluorocromo più impiegato è l'isotiocianato di fluoresceina. In alcuni casi, l'immunofluorescenza può anche essere adoperata per determinare la concentrazione approssimativa di un antigene, specialmente attraverso un analizzatore d'immagini. L'associazione specifica antigene-anticorpo dipende da ponti idrogeno, interazioni idrofobiche, forze elettrostatiche e forze di Van der Waals. Questa tecnica, che ha trovato largo impiego in sierologia, è di fondamentale importanza in microbiologia per rilevare nei campioni la presenza di specifici antigeni o anticorpi ignoti, la cui controparte nota (quella a disposizione del ricercatore) è variamente legata a un marcatore. Esistono due principali metodiche di immunofluorescenza, diretta e indiretta.

Nell'immunofluorescenza diretta, un anticorpo marcato riconosce un antigene batterico di superficie e si lega, per cui, al microscopio, si vedono corpuscoli fluorescenti (verdi brillanti) su uno sfondo scuro omogeneo. Questa marcatura diretta diminuisce il numero di passaggi ed evita reazioni crociate.

Con la tecnica diretta, non si possono cercare anticorpi specifici nel siero, cosa possibile con l'immunofluorescenza indiretta, dove un anticorpo non marcato si lega all'antigene, formando un immunocomplesso primario. A questo, più precisamente al frammento *FC*, si lega a sua volta un anticorpo marcato con fluoresceina. Tra i vantaggi della tecnica indiretta, si ha l'uso di un solo tipo di anticorpi marcati con fluoresceina, cioè quelli anti-immunoglobuline di varie specie animali, disponibili in commercio. Inoltre a ogni anticorpo primario "nudo", legato all'antigene fissato, si legano (alle porzioni costanti *Fc* dell'Ab I) più anticorpi secondari marcati, col risultato di una maggiore luminosità. I problemi di scarsa specificità sono superabili se si adoperano anticorpi monoclonali.

Le potenzialità di questa tecnica, sviluppata da Coons *e Coll.*, sono state applicate da Cherry *e Coll.* (1965) per la diagnosi nei bambini dei coli enteropatogeni O26, 55, 86, 111, 119, 125, 126, 127, 128.

Tison (1990) ha usato il metodo diretto (DFT) per individuare il sierotipo O157:H7 fra le colonie non-fermentanti sviluppate su piastre di MacConkey Sorbitol Agar (SMAC) seminate con campioni fecali. Gli anticorpi policlonali erano forniti da Kirkegaard & Perry (Gaithersburg, MD, USA).

Caruso *e Coll.* (2000) hanno invece provato con successo la tecnica di immunofluorescenza indiretta (IMF) per misurare il grado d'inquinamento da coli nel mare dello stretto di Messina in paragone col metodo della conta su m-FC agar.

IMPEDOMETRIA

Tecnica basata sulla misura delle variazioni di conducibilità elettrica di un mezzo. L'impedenza è la somma delle forze che si oppongono al flusso di corrente elettrica. La crescita dei microrganismi (a concentrazioni di 10^6 - 10^7 cellule/ml) porta a modificazioni dell'impedenza elettrica del terreno di coltura, dovute all'attività metabolica batterica, che determina la trasformazione di grosse molecole (proteine, carboidrati, ecc.) in metaboliti a basso peso molecolare e carichi elettricamente (aminoacidi, acidi organici, ecc.). Sulla base delle variazioni di conduttanza dovute alla crescita microbica, si ottengono delle curve di correlazione tra concentrazione microbica e valore di conduttanza. La misurazione viene effettuata mediante elettrodi per semplice immersione nel campione. La natura degli elettrodi, la temperatura di analisi, la frequenza di corrente applicata, il pH e la concentrazione salina del mezzo influiscono sulle misurazioni eseguite. È importante la scelta del terreno selettivo e la conoscenza della curva di crescita del microrganismo.

Valenti *e Coll.* (1989) hanno provato il sistema Malthus[®] (che, notoriamente, rapporta le variazioni di conduttanza elettrica alla moltiplicazione dei batteri) per cercare, nelle carni, i coliformi, compreso il coli, ottenendo buona sensibilità (fino a 40 germi/g) e rapidità di risposta (7 ore per segnalare 1000 germi/g).

Ogden (1993) sfrutta la reazione TMAO/TMA, parallela alla fermentazione dell'acido D-glucuronico, nel sistema Malthus[®] nell'arco di 10 ore a +37 °C, per stabilire la concentrazione di *E. coli* nel campione e trova buona correlazione con il conteggio su piastra, nonostante esistano reazioni crociate verso *Salmonella* e *Citrobacter*.

Edmiston *e Coll.* (1998), per valutare la contaminazione superficiale, seminano l'acqua di lavaggio usata sulle carcasse di pollo in Coliform Medium e determinano la curva di crescita dei germi attraverso la misurazione della conducibilità elettrica con il sistema Bac-tometer[®].

Il sistema analizzatore a impedenza Bac Trac 4300[®] (Sy-Lab, Austria) è stato validato nel 2009 come alternativo al metodo MPN di riferimento (ISO 16649-3) per il conteggio di *E. coli* in molluschi vivi bivalvi nel controllo ufficiale previsto dal Regolamento europeo (CE 2073 del 2005).

AMPLIFICAZIONE GENICA E SONDE MOLECOLARI

La reazione a catena della polimerasi, comunemente nota con l'acronimo PCR, è una tecnica di biologia molecolare che consente l'amplificazione di frammenti di acidi nucleici dei quali si conoscano le sequenze nucleotidiche iniziali e terminali. Tale metodica fu ideata nel 1983 da Kary B. Mullis il quale ottenne, per questo, il premio Nobel per la chimica nel 1993. La PCR ricostruisce *in vitro* uno specifico passaggio della riproduzione cellulare, cioè la sintesi di un segmento di DNA "completo" (a doppia elica) a partire da un filamento a singola elica. Il filamento mancante viene ricostruito a partire da una serie di nucleotidi (i "mattoni" elementari che costituiscono gli acidi nucleici), che vengono disposti nella corretta sequenza, complementare a quella del DNA interessato. Questo processo viene svolto in natura da enzimi chiamati DNA-polimerasi, che sono in grado di sintetizzare progressivamente un nuovo filamento di DNA. In primo luogo, il segmento di DNA prescelto viene separato nei singoli filamenti mediante riscaldamento (90-95 °C) e, in seguito, raffreddato (37-65 °C),

permettendo ai due oligonucleotidi (*primer*), che fungono da inneschi, di ibridare con le rispettive sequenze complementari presenti su due filamenti.

I *primer*, in genere, hanno una lunghezza compresa tra 20 e 30 oligonucleotidi e sono definiti 'senso' ('*upstream*' o '*forward*', che si appaia all'estremità 3' della sequenza codificante) e 'antisenso' ('*downstream*' o '*reverse*', che si appaia all'estremità 3' della sequenza complementare a quella codificante). Nella fase successiva, le DNA-polimerasi provocano l'allungamento degli inneschi, aggiungendo dNTPs a partire dall'estremo 3'-OH di ciascun innesco. I filamenti del DNA bersaglio e i dNTPs allungati avranno le stesse sequenze di basi.

In questo modo, si produce un numero di duplicati dei filamenti della molecola di DNA bersaglio, che cresce in misura esponenziale finché non raggiunge un *plateau* e l'incremento nella quantità di DNA bersaglio diventa lineare. Poiché la PCR necessita di diversi cicli di riscaldamento e raffreddamento, si utilizza una particolare DNA-polimerasi estratta dal batterio *Thermus aquaticus*, che vive nelle sorgenti calde a una temperatura di 75°C. La *Taq* polimerasi è stabile e attiva sino alla temperatura di 94 °C e basta aggiungerla solo all'inizio della reazione. Generalmente, i campioni di DNA sono sottoposti a cicli di reazione a temperature comprese tra 98 °C e 60 °C.

Il prodotto della reazione di PCR può essere poi sequenziato o separato mediante elettroforesi, colorato con etidio bromuro o *gel red* e osservato in fluorescenza UV. Il DNA prodotto può però anche essere trasferito su membrana di nitrocellulosa, fissato e ibridato con sonde specifiche, formate da oligonucleotidi a DNA marcati terminalmente con un enzima. Se la sonda è complementare al DNA in esame, avviene l'ibridazione delle due semi-eliche e l'enzima può agire su un substrato cromogeno, visualizzando lo sviluppo di un colore.

La lista dei Ricercatori che hanno messo a punto, nei loro laboratori, *test* PCR (*Polymerase Chain Reaction*) è in espansione, per cui si ricordano solo i lavori di Romick *e Coll.* (1989), Baumgartner *e Coll.* (1995) e Xiao Long *e Coll.* (2005), che, amplificando i geni specifici *wzx* e *fliC*, hanno raggiunto, con un *test* di *duplex* PCR, una sensibilità media di circa 500 *E. coli* O157:H7 per grammo di alimento (latte e carne artificialmente contaminati).

Tuttavia la maggior parte degli studi non si è tradotta nella nascita di metodi alla portata di tutti i laboratori, fatta eccezione per alcuni kit commerciali comparsi sul mercato in seguito all'esigenza di ricercare il sierotipo E. coli O157:H7.

Di questi ultimi si cita qualche esempio.

Nel kit Gene-Probe® (San Diego, California, USA), il DNA batterico, estratto per lisi dalle cellule contenute nel campione, viene denaturato chimicamente e trasferito su un supporto di nitrocellulosa. Segue l'ibridazione con una sonda (DNA *probe*) marcata con arancio d'acridina. Dopo un lavaggio, la reazione viene letta al luminometro. Questa tecnica si chiama *Dot blot ibridisation*.

Nel kit Gene-Track® (Neogen) il campione viene arricchito in terreno liquido per moltiplicare le cellule batteriche, che, lisate, liberano RNA dai ribosomi. Il RNA viene ibridato con una sonda (di cattura), che si fissa a un supporto solido, assieme a una seconda sonda (di rivelazione) marcata con fluoresceina. Si aggiunge un anticorpo anti-fluoresceina coniugato con perossidasi, che, in caso di avvenuta ibridazione (RNA + sonda di cattura + sonda di rivelazione), agisce su un substrato cromogeno liberando colore leggibile allo spettrofotometro.

Nel *kit* BAX[®]-test (Qualicon Inc., Wilmington, DE, USA), dopo arricchimento del campione, le cellule batteriche vengono lisate e la sospensione serve per idratare i reagenti necessari alla PCR forniti in tavolette. Tutti i passaggi di questa tecnica sono stati automatizzati e avvengono in un'apposita apparecchiatura. Hochberg *e Coll.* (2000) l'hanno impiegata in ricerche su carne bovina tritata.

RICERCA DEGLI ANTICORPI NEL SIERO

Dall'esperienza di Chart *e Coll.* (2008), risulta che l'isolamento di coli verocitotossici (in particolare del sierotipo O157:H7) è reso difficoltoso dalla breve permanenza del germe nelle feci.

Pertanto, presso l'*Health Protection Agency* di Londra è stata adottata la ricerca degli anticorpi contro l'antigene somatico (oppure contro l'antigene LPS) nei campioni di siero mediante la tecnica di elettroforesi su *gel* di acrilamide, seguita da *immunoblotting* su nitrocellulosa. L'antigene diagnostico LPS è comune ai sierotipi O26, O55, O103, O111, O128, O145.

IDENTIFICAZIONE BIOCHIMICA

Come è noto, le prove biochimiche per enterobatteri storicamente hanno avuto inizio con i *test* in provetta raggruppati sotto la sigla IMVIC, vale a dire indolo, rosso metile, acetil-metil-carbinolo o reazione di Voges-Proskauer (VP) e citrato, affiancati dalle prove di idrolisi dell'urea e di fermentazione di alcuni carboidrati.

Nel 1960-70, si è passati dalla dimostrazione del prodotto metabolizzato alla ricerca di enzimi responsabili di reazioni significative: per il coli la beta-galattosidasi, che interviene nella scissione del lattosio in glucosio e galattosio (Le Minor, 1962; Bulow, 1964; Lapage, 1964).

Il *test* ONPG permette di riconoscere, in due ore, i germi lenti fermentatori del lattosio (Cruickshank, 1965; Costin, 1966; Goodman *e Coll.*, 1966) e di ridurre il numero delle prove sufficienti per definire presuntivamente i principali generi che sviluppano sulle piastre dei terreni selettivi per enterobatteri (Bulling, 1965):

<i>Test</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Salmonella</i>	<i>Proteus</i>	<i>Citrobacter</i>
Indolo	+	-	-	-
Urea	-	-	+	-
Beta-galattosidasi	+	-	-	+

I *test* su striscia di carta impregnata con il reagente da metabolizzare tipo Patho-Tec® hanno reso meno conveniente l'uso delle provette (Prevorsek *e Coll.*, 1968; Reinhold, 1975).

La disponibilità di materiali plastici (per esempio i pozzetti delle piastre di polistirene già note in sierologia) ha portato dei vantaggi anche in biochimica (Zavanella *e Coll.*, 1972), soprattutto con la creazione di *kit* ingegnosi, che avrebbero ottenuto una larghissima diffusione nei laboratori.

Nella maggior parte dei *kit* (ad esempio, Enterotube® Roche, API 20E® bio-Mérieux, Crystal Ent® BBL), le reazioni avvengono in 18-24 ore a +37 °C, entro scomparti o celle nelle quali si manifestano variazioni di colore o sviluppo di fluorescenza. La lettura, seguita dall'attribuzione di un punteggio alle varie prove, crea un codice numerico da confrontare con un *database*, che indica la percentuale di sovrapposizione con il profilo-tipo del germe identificato ed, eventualmente, la necessità di prove supplementari. L'automazione ha migliorato sensibilmente le prestazioni dei *kit*.

Nel sistema API® (bio-Mérieux), l'allestimento delle gallerie e la valutazione dei risultati avvengono automaticamente.

Nel sistema Vitek® (bio-Mérieux), sono automatizzati i passaggi per l'identificazione, che avvengono in un modulo di semina e in un modulo incubatore/lettore. Un *computer* controlla in continuo le operazioni, memorizza, elabora e interpreta i risultati ottenuti (Knight *e Coll.*, 1990).

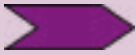
Nel sistema Autoscan® (Dade Behring), l'apparecchio può analizzare due tipi di pannelli, destinati, rispettivamente, all'identificazione biochimica e alla determinazione della MIC, eseguibile anche manualmente con una micropipetta.

ADESIVITÀ E INVASIVITÀ

RICERCA DELLE ADESINE

La dimostrazione che un ceppo possiede adesine può essere fatta con diversi metodi, più o meno complessi. Sono stati studiati *test* su cellule intestinali di suino, cavia, coniglio (*brush borders*) e *test* in ELISA (Mills e Coll., 1984), ma quelli maggiormente applicati nella *routine* sono l'agglutinazione rapida su vetrino e l'emoagglutinazione con o senza mannosio (Bisicchia e Coll., 1985).

Si ricordano i più importanti fattori:

K88 ab, ac, ad	nel suino		emoagglutinano in presenza di D-mannosio (mannosio resistenti)
K99	nel bovino		
P987	nel suino		
CFA	nell'uomo		
Fimbrie di tipo 1	patogenicità non dimostrata		non emoagglutinano in presenza di D-mannosio (mannosio sensibili)

Sono antigeni di natura proteica situati sulla superficie dei batteri che hanno forma di filamenti lunghi fino a 8 millimicron (Duguid, 1959).

La loro formazione è codificata da plasmidi che possono essere trasferiti da un batterio all'altro al momento della coniugazione.

Si producono *in vitro* coltivando i germi su Agar sangue (K88), terreno di Minca+Isovitalex (K99), CFA Agar (CFA), Brodo Nutritivo (P987) e non si formano se si coltivano i germi a +20°C.

La conservazione dei ceppi provvisti di adesine può avvenire per alcuni anni in brodo addizionato dello 0,5% di glicerolo a -7 °C, in Dorset Egg Medium a +4 °C, oppure con la liofilizzazione.

I ceppi produttori di adesine K88 possono essere selezionati in base alla capacità di fermentare il raffinoso (Orskov, 1961).

AGGLUTINAZIONI RAPIDE SU VETRINO

Agglutinazione rapida su vetrino per la dimostrazione di adesine K88

1. Seminare un'ansata di materiale fecale o un tampone rettale su una piastra di Agar sangue.
Incubare a +37 °C per una notte.
2. Scegliere 3-4 colonie, dando la preferenza a quelle emolitiche.
3. Mescolare su un vetrino una goccia di siero polivalente K88 con una parte delle colonie raccolte con l'ago.
4. Lettura:
Agglutinazione +
Ripetere la prova con i sieri singoli K88 ab, ac, ad su trapianti in terreno di Minca +

Isovitalex (*slant*) incubati a +37 °C e a +20 °C per una notte. Devono agglutinare solo i trapianti coltivati a +37 °C.

Agglutinazione -

Trapiantare 3-5 colonie su terreno di Minca con Isovitalex. Incubare una notte a +37 °C e a +20 °C.

Ricercare le adesine K99 e P987. Se negative, testare i ceppi per la formazione di enterotossine.

Agglutinazione rapida su vetrino per la dimostrazione di adesine K99

1. Mescolare per alcuni secondi su un vetrino una goccia di antisiero K99 con una piccola quantità di patina colturale, ottenuta da sub-coltura su terreno di Minca con Isovitalex. Spesso le colture K99+ hanno aspetto mucoso.
2. Solo le agglutinazioni di trapianti incubati a +37 °C sono specifiche.

Agglutinazione rapida su vetrino per la dimostrazione di adesine P987

1. Coltivare il ceppo in Brodo Nutritivo a +37 °C per 5 giorni, senza agitazione, per ottenere la formazione di una pellicola di crescita.
2. Mescolare su un vetrino una goccia di brodocoltura con una goccia di antisiero P987.

EMOAGGLUTINAZIONE IN PRESENZA DI D-MANNOSSIO

(Orskov e Coll., 1977; Bisicchia e Coll., 1985)

1. Coltivare il ceppo in ml 5 di Brodo di Mueller-Hinton a +37 °C per 5 giorni, senza agitazione.
2. Trapiantare su piastra di Agar CFA o terreno di Minca+Isovitalex o Agar sangue e incubare a +37 °C per una notte.
3. Raccogliere la crescita batterica con 1 ml di tampone PBS, in modo da ottenere una concentrazione di circa 10¹² batteri/ml (*reagente 3*).
4. Preparare una sospensione al 3% di D-mannosio in PBS. Aggiungere globuli rossi di cavia fino al 5% del volume, incubare a temperatura ambiente per 15 minuti e poi in frigorifero a +4 °C per altri 15 minuti. Centrifugare a 2000 rpm per 10 minuti ed eliminare i globuli rossi (*reagente 2*).
5. Preparare una sospensione di globuli rossi di cavia raccolti in soluzione di Alsever. Lavarli per tre volte centrifugandoli a 2000 rpm per 10 minuti e risospingendoli in PBS. Alla fine sospenderli in PBS alla concentrazione del 5% (v/v) (*reagente 1*).
6. In due pozzetti ad U di una piastra *microtiter* mettere:
50 µl di globuli rossi al 5% (*reagente 1*)
50 µl di soluzione al 3% di D-mannosio (*reagente 2*)
50 µl di crescita batterica risospesa in PBS (*reagente 3*)
7. Aggiungere due pozzetti di controllo contenenti i reagenti 1 e 3, più 50 µl di PBS al posto del D-mannosio.
8. Incubare a temperatura ambiente per 5 minuti agitando delicatamente la piastra e per 10 minuti in frigorifero a +4 °C.
9. Lettura: se avviene l'agglutinazione degli eritrociti nei pozzetti che contengono D-mannosio, il ceppo viene considerato *resistente*; in caso di mancata agglutinazione mannosio-*sensibile*.
Questa reazione è influenzata dalla temperatura e risulta negativa per le adesine P987.

TEST DI INVASIVITÀ

Test di Sereny su topo

I ceppi di coli enteroinvasivi e alcune specie di shigelle (*flexneri*, *dysenteriae*, *boydii*, *sonnei*), responsabili della diarrea bacillare umana, hanno la capacità di invadere e proliferare nelle cellule epiteliali della mucosa del colon.

Il fenomeno dipende dalla presenza di un plasmide ed è stato riprodotto da Sereny sulla cavia e sul coniglio, mediante infezione congiuntivale.

Yamagata Murayama e Coll. (1986) hanno proposto l'uso dei topi albini.

Il ceppo sospettato enteroinvasivo viene coltivato per una notte a +37 °C su Penassay Agar (Antibiotic Medium n. 3 Difco). La crescita viene raccolta e sospesa in Penassay Broth a una concentrazione di circa 5×10^{10} germi/ml.

Il topo viene inoculato nell'occhio destro con una goccia contenente da 1 a 5×10^8 cellule. Nell'occhio sinistro, viene istillata una goccia di soluzione fisiologica sterile, come controllo negativo.

Dopo 18-24 ore, solamente nell'occhio destro si manifesta una forte reazione infiammatoria (cheratocongiuntivite), accompagnata da infiltrazione di leucociti polimorfonucleati, che scompare dopo 3-7 giorni.

TIPIZZAZIONE DEI COLI

Può avvenire con diverse tecniche e a differenti livelli. La tecnica maggiormente praticata è l'agglutinazione lenta con sieri diagnostici per il riconoscimento degli antigeni somatici O, mentre esistono classificazioni ulteriori in biotipi, fagotipi e ceppi in possesso di particolari geni determinabili attraverso la biologia molecolare.

NOTA

Per la diagnosi degli antigeni H e K (e per la preparazione dei relativi antisieri), essendo più complessa e meno praticata, si rimanda al lavoro di Gross e Coll. (1985).

SIEROTIPIZZAZIONE O

Metodo dell'agglutinazione lenta in piastra (secondo Blanco e Coll., 1993)

1. Preparazione dell'antigene in vista dell'agglutinazione lenta

- Coltivare il ceppo da tipizzare su *slant* di Trypticase Soy Agar (TSA) a +37 °C per 18-24 ore.
- Preparare due sospensioni, ciascuna in 2 ml di soluzione fisiologica, raggiungendo la densità del tubo 6 di McFarland (circa $1,8 \times 10^9$ germi/ml).
- Riscaldare una sospensione a 100 °C per un'ora e autoclavare l'altra a 121 °C per due ore e mezza (per inattivare gli antigeni K).
- Dopo raffreddamento, aggiungere a ciascuna sospensione 2 ml di soluzione fisiologica contenente formalina allo 0,5% e violetto di genziana allo 0,005%.
- Le sospensioni possono essere conservate per due settimane in frigorifero a +4°C.

2. Agglutinazione lenta per determinare l'antigene O

- in una piastra *microtiter* da 96 pozzetti con fondo a U, distribuire i sieri diagnostici anti-O in quantità di 50 µl. I sieri devono essere usati alla diluizione opportuna (detta "diluizione d'uso", vedi *determinazione del titolo d'uso dei sieri*).
- Aggiungere a ciascun pozzetto 50 µl della sospensione antigenica preventivamente riscaldata a 100 °C.
- Coprire la piastra con foglio adesivo e incubare in termostato a +37 °C per 18 ore.
- L'avvenuta agglutinazione si manifesta sotto forma di una pellicola sulla superficie del liquido contenuto nel pozzetto. La reazione negativa ha, viceversa, l'aspetto di un bottone di sedimentazione dei germi non agglutinati sul fondo del pozzetto.
- In mancanza di agglutinazione, ripetere la prova, adoperando la sospensione preventivamente autoclavata a 121 °C per due ore e mezza.
- Se non si ottengono risultati anche dopo quest'ultima prova, il ceppo è da considerare *non tipizzabile con i sieri a disposizione*.

Metodo dell'Istituto Superiore di Sanità, Roma (2008)

1. Preparazione dell'antigene

Il ceppo da tipizzare viene seminato su MacConkey Agar e incubato a +37 °C per una notte, in modo da ottenere colonie staccate.

Una colonia viene poi trapiantata su TSA, da incubare come sopra.

La crescita batterica, raccolta e risospesa in 4 ml di soluzione fisiologica sterile, viene autoclavata a 100 °C per un'ora, agitata e lasciata riposare per un'ora a temperatura ambiente.

Dopo aver allestito l'agglutinazione lenta, questa sospensione viene conservata in frigorifero a +4 °C.

2. Allestimento delle agglutinazioni

Un volume pari a 50 µl dell'antigene, che rappresenta un ceppo batterico, viene introdotto in un pozzetto di piastra *microtiter* con fondo a U, nel quale si aggiunge, poi, a pari volume, il siero diagnostico opportunamente diluito al titolo d'uso.

L'incubazione avviene in termostato a +37 °C per una notte, ponendo la piastra con il relativo coperchio in un contenitore provvisto di una fonte d'umidità per prevenire l'evaporazione.

3. Ripetizione della prova in caso di agglutinazioni crociate

Nel caso che l'antigene venga agglutinato da più sieri (fino a 3), la sospensione batterica, usata il giorno precedente e conservata in frigorifero, viene nuovamente agitata e lasciata riposare per un'ora a temperatura ambiente.

Si procede, quindi, a una nuova serie di agglutinazioni con le stesse modalità di cui sopra, diluendo, però, in base 2 in soluzione fisiologica (fino a 1:256) i sieri responsabili di agglutinazioni.

Il siero che agglutina a titolo più elevato identifica l'antigene. I ceppi che vengono agglutinati da più di tre sieri contemporaneamente sono da considerare autoagglutinanti e, quindi, non tipizzabili.

Sono state messe a punto metodiche per semplificare la tipizzazione.

Bettelheim e Coll. (1987) hanno miscelato i sieri diagnostici in *pool*, seguendo uno schema "a scacchiera", per consentire il riconoscimento del siero responsabile dell'agglutinazione.

Gli antigeni, da provare con l'agglutinazione in piastra *microtiter*, venivano preparati coltivando i ceppi in Nutrient Broth a +37 °C per una notte, facendoli bollire per 1 ora e inattivandoli con l'aggiunta di formalina allo 0,05%.

PREPARAZIONE DEI SIERI DIAGNOSTICI

Sieri anti-O

Viene descritta la tecnica di produzione degli antisieri su coniglio, modificata da Zavanel-la, desunta da Wray (1979) e da Gross (1985)

1. Preparazione dell'antigene

Seminare il ceppo (contenente l'antigene somatico verso il quale si intende preparare il siero) su 3 piastre di Agar sangue, in modo da ottenere colonie ben isolate. Incubare a +37 °C per 24 ore.

Trapiantare tre colonie staccate in altrettante provette, ciascuna con 5 ml di TSB. Incubare a +37 °C per 24 ore.

Autoclavare le provette a +121 °C per un'ora. Le provette che dopo autoclavatura presentano un precipitato devono essere scartate.

2. Lavaggio dell'antigene

Centrifugare i germi per due volte a 3000 rpm per 20 minuti e risospendere il sedimento ogni volta in 5 ml di PBS. Dopo una terza centrifugata, risospendere il sedimento in PBS, fino a ottenere una torbidità pari al tubo 4 del nefelometro di McFarland.

3. Inoculazioni

Inoculare i conigli i/v a intervalli di 5 giorni con le seguenti quantità (in ml): 0,25, 0,5, 1, 1.

Dopo 10 giorni dall'ultima inoculazione, previa anestesia totale (0,5 ml i/v di soluzione contenente *pentothal* sodico grammi 0,083 in PBS), salassare gli animali ed eseguire la titolazione del siero tramite agglutinazione lenta.

4. Titolo d'uso

La diluizione che precede l'ultima diluizione con visibile agglutinazione viene presa come titolo d'uso.

La determinazione del titolo d'uso avviene con la seguente tecnica:

- In una piastra *microtiter* da 96 pozzetti con fondo a U, mettere, nel primo pozzetto a sinistra, 90 µl di soluzione fisiologica sterile.
- Nei rimanenti pozzetti della stessa fila, distribuire 50 µl di soluzione fisiologica sterile.
- Al primo pozzetto a sinistra, aggiungere 10 µl di siero da titolare.
- Con una micropipetta da 50 µl, procedere alle diluizioni da sinistra verso destra, trasferendo sempre 50 µl e mescolando prima di ogni passaggio. Fermarsi con le diluizioni alla penultima colonna, in modo da lasciare l'ultimo pozzetto come controllo negativo (soluzione fisiologica+antigene), dal quale verranno eliminati alla fine 50 µl.
- Aggiungere orizzontalmente a tutti i pozzetti 50 µl dell'antigene omologo, pre-riscaldato a 100 °C e allestito secondo le modalità riportate in: "*Preparazione dell'antigene in vista dell'agglutinazione lenta*".
- Sigillare la piastra con foglio adesivo e incubare in termostato a 37 °C per 18 ore.
- Le agglutinazioni "*positive*" si presentano come una pellicola, quelle "*negative*" come un bottone formato dai germi sedimentati sul fondo del pozzetto.

5. Controllo di specificità

Si provano in agglutinazione lenta i ceppi contenenti i vari antigeni, ritenuti possibili agenti eziologici di colibacillosi per la specie interessata.

In pratica, si ripetono le stesse operazioni precedentemente descritte per la determinazione del titolo del siero, adoperando, oltre all'antigene omologo (nella prima fila della piastra *microtiter*), le sospensioni degli antigeni che crociano con l'antigene omologo.

La piastra conterrà, per ogni fila orizzontale di pozzetti, un antigene diverso, mescolato alle diluizioni in base 2 dello stesso siero da controllare.

Se si ottiene qualche agglutinazione eterologa, occorre adsorbire il siero (non alla diluizione

d'uso, ma concentrato) con gli antigeni agglutinanti aspecifici e ripetere i controlli (*vedi tecnica di adsorbimento dei sieri*).

Siero anti-K88

Si usano come antigeni di preparazione tre ceppi, rispettivamente con la struttura K12: K88 ab, ac, ad, che vengono fatti crescere separatamente su BHI Agar a +37 °C per 24 ore.

Si controllano i ceppi, che devono agglutinare perfettamente con un siero di referenza anti- K88.

Ciascuna coltura su BHI Agar viene quindi trapiantata in 100 ml di Brodo BHI, posto a incubare a 37 °C per 24 ore, che servirà per la produzione di un singolo siero (ab, ac, ad).

Procedere al lavaggio degli antigeni, secondo le istruzioni date per i sieri anti-O.

La parte di procedura che segue si ripete per tre volte, essendo tre i sieri K88 da preparare.

Dividere la brodocoltura in due aliquote: una va lasciata tal quale in PBS, l'altra va trattata con formalina allo 0,5% e messa in termostato per 24 ore.

I due antigeni (uno inattivato e l'altro vivo) servono per l'inoculazione dei conigli a intervalli di 5 giorni come segue:

0,25-0,5-1 ml di sospensione inattivata i/v

1-1 ml di sospensione di batteri vivi i/v

Dopo 10 giorni dall'ultima inoculazione salassare gli animali, previa anestesia totale, come descritto in precedenza.

Eseguire l'adsorbimento verso il ceppo *E. coli* K12, coltivato a +37 °C, ma non autoclavato (*vedi tecnica di adsorbimento dei sieri*) e titolarlo mediante agglutinazione rapida contro gli antigeni monospecifici.

Riunire i tre sieri e ricontrrollare il titolo d'uso (*vedi titolo d'uso per i sieri anti-O*).

Siero anti-K99

Coltivare il ceppo in possesso del fattore K99 (e che risponde in modo ottimale all'agglutinazione rapida con un siero anti-K99) su quattro provettoni di terreno Minca + Isovitalex, da incubare per 24 ore a 37 °C.

Risospendere la patina ricavata in 80 ml di PBS.

Procedere al lavaggio secondo le istruzioni date per i sieri anti-O.

Aggiustare la concentrazione, in modo da avere una torbidità pari al tubo 4 di McFarland.

Dividere la sospensione ottenuta in due aliquote e aggiungere a una di esse formalina allo 0,5%.

Conservare la sospensione non formolata in frigorifero a +4 °C e quella formolata in termostato a 37 °C per 24 ore.

Trattare i conigli nella stessa maniera di quanto descritto per il siero K88.

Procedere all'adsorbimento del siero verso lo stesso ceppo di *E. coli* usato per immunizzare i conigli, ma fatto crescere a +20 °C e non autoclavato.

Titolare il siero (*vedi titolo d'uso dei sieri anti-O*).

Siero anti-987P

Seminare il ceppo di referenza su 10-12 piastre di Agar sangue, previamente controllate in termostato per la sterilità, in modo da ottenere colonie ben isolate. Incubare le piastre a +37 °C per 24 ore.

Trapiantare, partendo da colonie staccate, in 30 provettoni di Brodo TSB + 10% di siero equino sterile, al fine di realizzare cloni in purezza.

Incubare a +37 °C per una settimana.

Prelevare sterilmente tutte le pellicole che si sono formate sulla superficie di ciascun terreno e stemperarle in 60 ml di tampone di Sørensen a pH 7,3.

Pipettare energicamente, procedere al lavaggio (vedi lavaggio dell'antigene) e aggiustare la concentrazione (in tampone di Sørensen a pH 7,3), fino a torbidità pari al tubo 4 di McFarland.

Da questa sospensione, prelevarne metà e metterla in frigorifero a +4 °C.

Aggiungere all'altra metà lo 0,5 % di formalina e metterla in termostato a 37 °C per 24 ore.

Inoculare i conigli con l'antigene (parte vivo e parte inattivato), nella stessa maniera di quanto descritto per la preparazione del siero anti-K88.

Dopo il salasso degli animali, previa anestesia totale, eseguire l'adsorbimento del siero verso lo stesso ceppo usato per immunizzare i conigli, ma fatto crescere a +18 °C per 24-48 ore.

Titolare quindi il siero adsorbito verso il ceppo di referenza, fatto sviluppare su TSB + 10% di siero equino per una settimana e trapiantato su Agar sangue seminando la pellicola superficiale (vedi titolo d'uso).

Siero anti-CFA

Per la produzione e la purificazione dell'antigene CFA, inoculare il ceppo H-10407 di *E. coli* in terreno agarizzato 2%, addizionato con peptone 2% e NaCl 0.5%, per ottenere una crescita confluyente.

Incubare per 18 ore a 37 °C e raccogliere le cellule con *Buffer* fosfato 0.1M (pH 7.2) e sodio azide 0.02% (*buffer* di estrazione).

Omogeneizzare per 4 minuti a +4°C e centrifugare a 12.000 g per 45 minuti, filtrando poi il sovrantante (Millipore 0.8 nm).

Incubare per 3 giorni a 4 °C, centrifugare a 16.000 x g per 20 minuti e successivamente filtrare il sovrantante.

Portare il filtrato a pH 3.5 con acido acetico glaciale e incubare la soluzione per 24 ore a +4 °C.

Sciogliere poi il *pellet* in *buffer* di estrazione. Far precipitare il CFA 3 volte, portando la soluzione a pH 3.5, centrifugando ogni volta come sopra e mantenendo per 24 ore a +4°C.

Lavare il precipitato finale tre volte con *Buffer* acetato di sodio (pH 4) sciolto in *buffer* di estrazione e filtrato (Millipore 0.6 nm).

Centrifugare il preparato a 149.000 g per 5 minuti, raccogliere il sovrantante e centrifugarlo a 149.000 g per 20 minuti. Risospendere il *pellet* in *Buffer* Tris (idrossimetil) aminometano 0.02 M (pH 8). Infine, ultracentrifugare il preparato CFA.

Per ottenere l'anticorpo, inoculare 5 dosi crescenti di CFA purificato, per un totale di 3 mg per coniglio. Emulsionare la prima dose con adiuvante di Freund e iniettarla sottocute. Sospendere le altre quattro dosi in PBS 0.1 M (pH 7.2) e iniettarle intramuscolo in vari siti, a intervalli di quattro giorni. Raccogliere il sangue dopo 14 giorni, previa anestesia totale.

Siero anti-F41

Per la produzione e la purificazione dell'antigene F41, inoculare il ceppo B41M di *E. coli* K99 negativo in terreno Minca addizionato con 1 gr/L di estratto di lievito e incubare a 37°C sino a raggiungimento di OD pari a 2.

Centrifugare e risospendere il *pellet* in *Buffer* fosfato-urea e omogeneizzare per 20 minuti.

Rimuovere le cellule centrifugando la sospensione per 15 minuti a 30.000 g.

Precipitare dal sovrantante l'antigene F41, aggiungendo ammonio solfato (60% di saturazione) e agitare per 2 ore a +4°C.

Raccogliere il precipitato con centrifugazione, risospendere in 10 ml di *Buffer* fosfato-urea e mettere in dialisi.

Utilizzare l'antigene concentrato F41 per ottenere l'anticorpo anti-F41. Mescolare un ugual volume di una soluzione di F41 purificato in *Buffer* fosfato-salino con adiuvante di Freund completo, sonicare per 5 minuti e iniettare sottocute in 4 differenti siti a 2 conigli (1 mg di antigene purificato per animale).

Dopo tre settimane, iniettare i.v. una quantità simile di antigene mescolato con adiuvante di Freund incompleto. Raccogliere il sangue dopo 14 giorni, previa anestesia totale.

Siero anti-Att25

L'anticorpo contro l'antigene fimbriale FY (Att 25) si ottiene inoculando il ceppo 25KH9 di *E. coli* in terreno Minca +1% IsoVitalex per una notte a 37°C.

Centrifugare le cellule e sospendere il *pellet* in Tris idrocloride 50 mM.

Miscelare la soluzione per 5 minuti e centrifugare.

Trattare per una notte il sovrantante con ammonio solfato.

Centrifugare nuovamente, risospendere il *pellet* in Tris *Buffer* e porre in dialisi.

Successivamente, aggiungere alla sospensione sodio deossicolato e dializzarla con Tris *Buffer* 0,3% sodio deossicolato.

Centrifugare per rimuovere il sodio deossicolato insolubile e separare l'antigene Att25 dal sovrantante con metodica FPLC.

Verificare la purezza del preparato mediante corsa elettroforetica.

Utilizzare l'antigene concentrato Att25 per ottenere l'anticorpo anti-Att25. Mescolare un ugual volume di una soluzione di Att25 purificato con adiuvante di Freund e iniettarla nei conigli s.c. e intramuscolo in diversi siti.

Raccogliere il sangue dopo 14 giorni, previa anestesia totale.

Adsorbimento dei sieri

L'antigene che serve per adsorbire il siero viene seminato in bottiglie di Roux da incubare a 37 °C per 24 ore.

Dopo raccolta della patina batterica con 30 ml di soluzione fisiologica sterile o PBS per ogni bottiglia di Roux, l'antigene viene centrifugato a 3000 rpm per 30 minuti, risospeso in 5 ml di soluzione fisiologica sterile e autoclavato a 121 °C per un'ora.

L'adsorbimento avviene mescolando 5 ml di antigene con 10 ml di siero. La miscela viene incubata in bagnomaria con agitazione a 50 °C per 2 ore e poi centrifugata a 3000 rpm per 30 minuti. Il soprastante, infine, viene filtrato su Seitz EKS-1 e poi controllato (vedi titolo d'uso).

Distribuzione e conservazione dei sieri

I sieri, ricavati dagli animali ed eventualmente adsorbiti, vanno mantenuti costantemente in frigorifero (per evitare perdita di titolo) e quanto prima possibile filtrati su Seitz EKS-1, per ottenere la sterilità.

Distribuiti sterilmente in recipienti a 0,5 ml, possono essere conservati per un tempo limitato in frigorifero a +4 °C o in congelatore a -20 °C, addizionati di sodio mertiolato 1:10.000 come antibatterico.

Si conservano per un tempo indefinito se liofilizzati e mantenuti in frigorifero a +2/+4 °C.

BIOTIPI

La classificazione dei ceppi in biotipi non è esclusiva dei coli enteropatogeni (EPEC) di origine umana o animale e rappresenta un ulteriore sistema di tipizzazione rispetto alla sierologia.

Un esempio significativo sulla classificazione in biotipi riguarda le enteriti nel coniglio, dove i ceppi di *Escherichia coli* responsabili non risultano produttori di tossine ST o LT e non sono invasivi.

I ceppi, tramite il gene cromosomico *eae*, formano una proteina (intimina) sulla membrana esterna del germe, che favorisce l'adesione ai microvilli intestinali e la loro distruzione (fenomeno chiamato *attaching/effacing*, descritto per la prima volta da Jerse e Coll., 1990).

È stata riscontrata l'esistenza di forti correlazioni fra il possesso del gene *eae*, certi sierogruppi (ad esempio, nel coniglio, O103) e la fermentazione di alcuni carboidrati (Blanco e Coll., 1996).

L'esecuzione dei *test* di fermentazione risulta vantaggiosa per anticipare la prognosi e il trattamento. Per questo motivo, diversi Autori hanno elaborato schemi di classificazione in biotipi (Okerman e Coll., 1985; Camguilhelm e Coll., 1989; Blanco e Coll., 1996).

La prova può avvenire in pozzetti di una piastra *microtiter* contenenti Phenol Red Agar Base + 1% del carboidrato, da incubare a 37 °C per 48 ore e leggere per il viraggio al giallo.

Camguilhelm e Coll. (1989) hanno classificato i ceppi più frequentemente isolati da conigli con diarrea come segue:

Biotipo	Sorbosio	Dulcite	Raffinosio	Saccarosio	Ramnosio	Sierotipo prevalente
13	+	-	+	+	-	O68
14	-	+	+	+	-	O103
30	-	+	+	+	+	O128, O132
31	+	+	+	+	+	O2
Codice	1	2	4	8	16	

NOTA - Sommando i codici delle prove positive si ottiene il numero del biotipo

FAGOTIPI

Come è noto, i batteriofagi sono organismi formati da un acido nucleico (DNA oppure RNA) rivestito da un involucro proteico. Quelli ospitati dal coli vengono chiamati "colifagi" e appartengono a sei (contrassegnate da A a G) delle dieci famiglie in cui Bradley ha classificato nel 1967 i batteriofagi.

Essi resistono a pH compresi fra 4 e 10, vengono inattivati, generalmente, a 75 °C in 30 minuti e sono capaci di infettare la maggior parte dei ceppi coli.

Gli effetti deleteri sui batteri si manifestano, *in vitro*, con la formazione di placche di lisi, specialmente se si tratta di colture di coli A, B e K12. Alcuni di questi ceppi hanno pili F, oppure filamenti che albergano recettori specifici per colifagi RNA o DNA.

I colifagi sono stati studiati perché ritenuti i migliori indicatori di contaminazione fecale nelle acque, resistendo alla clorazione meglio degli *Enterovirus*. Godrebbero, inoltre, di una buona correlazione con il conteggio dei coli fecali eseguito con il metodo MPN.

Benché ubiquitari, i colifagi sono spesso riconducibili nelle acque a specifiche contaminazioni di natura fecale. Difatti, il gruppo I di colifagi è stato trovato solo nel contenuto intestinale degli animali, il gruppo II nelle feci dei suini e dell'uomo, il gruppo III (fagi RNA) esclusivamente nell'uomo.

All'infuori di questa applicazione, i batteriofagi non hanno avuto molto successo nella diagnostica differenziale dei ceppi di coli, in quanto, almeno nelle diarree umane, è stata notata una eccessiva variabilità legata alla zona geografica.

TEST PER RICONOSCERE LE TOSSINE

Metodi biologici per tossine ST ed LT

Per lungo tempo, queste tossine sono state diagnosticate mediante iniezione in una porzione legata dell'intestino tenue di suino o di coniglio (LGT, ligated gut test).

Nel suino (età da 4 a 12 settimane), la massima intensità di reazione, consistente nell'accumulo di liquidi, si può osservare dopo 24 ore e, nel coniglio, dopo 6.

Anche l'iniezione sottocutanea nel coniglio è stata impiegata come test di riconoscimento della tossina LT (rabbit skin test).

Giannella (1976) ha messo a punto, per la tossina ST, un test su topino lattante (SMT, souckling-mouse test) che consiste nell'iniettare una preparazione colorata contenente la sospetta tossina nello stomaco di topini lattanti e nell'osservare, dopo poche ore, un ingrossamento dovuto ad accumulo di fluidi (Dean e Coll., 1972).

Attualmente, le prove biologiche sono state quasi completamente abbandonate e sostituite da altri metodi di prova.

TOSSINA ST

Kit in ELISA

Un saggio immunoenzimatico (EIA) di tipo competitivo sfrutta un composto proteico sintetico di struttura analoga alla tossina e un anticorpo monoclonale coniugato con l'enzima perossidasi (De Mol e Coll., 1985).

Il test si esegue nei pozzetti di una piastra *microtiter* ai quali è stata fatta aderire una tossina sintetica, analoga alla tossina del colì.

Si aggiunge il campione e il coniugato anticorpo+enzima.

Dopo incubazione e lavaggio (che allontana l'anticorpo non legato), si introduce il substrato capace di colorarsi (fenilendiamina).

Si mette nuovamente a incubare, bloccando infine la reazione con acido solforico.

Se il campione contiene enterotossina ST, questa compete con l'analogo della tossina adeso alla piastra, per cercare di legarsi al coniugato anticorpo+enzima.

L'azione successiva sul substrato è, perciò, molto debole, non si apprezza la formazione di colore e la reazione positiva appare incolore.

Se il campione non contiene enterotossina ST, si legano fra loro: analogo della tossina, anticorpo+enzima e substrato, con formazione di colore.

Per una corretta interpretazione, è preferibile leggere l'intensità di colore con uno spettrofotometro a 490 nm e considerare positive le reazioni che mostrano densità ottica (OD) inferiore o uguale a 0,2, applicando la formula:

$$(OD \text{ campione}) / (OD \text{ controllo negativo}) - (OD \text{ controllo positivo})$$

Nel kit Oxoid *E. coli* ST EIA, la sensibilità è pari a 10 ng/ml di campione, che può essere rappresentato dalla brodocoltura di un ceppo isolato o da un filtrato di feci.

Agglutinazione al lattice

Descritta da Carrol e Coll. (1980) per la ricerca delle tossine STa.

TOSSINA LT

Prove in vitro su colture di tessuti

La tossina LT provoca alterazioni (generalmente, arrotondamento delle cellule) se inoculata in linee cellulari tumorali di topo (linea Y1), ovariche di *hamster* (linea CHO) e da rene di scimmia (Vero).

Quest'ultima linea è preferibile alle altre, in quanto facilmente coltivabile in Medium 199 più Earle e 5% di siero fetale bovino a 37 °C con il 5% di CO₂.

Anche le tossine prodotte dai coli cosiddetti verocitotossici (O157:H7 e similari) possono fruire della diagnosi su cellule Vero.

NOTA

La formazione *in vitro* di tossina LT da ceppi *E. coli* già isolati può essere incrementata aggiungendo al terreno di coltura (ad esempio, TSB o BHI) mitomicina C, polimixina B, lincomicina, tetraciclina, ioni ferrici, acido aspartico, acido glutammico.

Oltre ai terreni liquidi sopracitati, si ricorda il CAYE Agar (Blanco, 1993).

Immunodiffusione in agar-gel (Biken test)

Questo metodo è basato sul principio del *test* di Elek e sul *test* di doppia diffusione in agar-gel secondo Outcherlony, descritto da Honda e Coll. (1981 e 1982).

In una piastra Petri (diametro 9 cm) si versano 12-15 ml di terreno di Mundell (o di Evans) e, dopo solidificazione, vengono praticati 5 pozzetti, distanti fra loro 5 mm, di cui uno centrale e quattro periferici.

Si possono esaminare contemporaneamente 4 ceppi, seminandoli in corrispondenza di ognuno dei pozzetti periferici. La piastra viene incubata a +37 °C per 48 ore e quindi, sopra la crescita dei ceppi, si appoggiano dei dischetti di carta da filtro (diametro 6 mm) imbevuti con 25 µl di soluzione di polimixina B a 20.000 U.I./ml.

La piastra viene incubata in termostato per altre 5 ore.

Poi si introducono 30 µl di siero anti-tossina del colera (ottenuto da coniglio) addizionato all'1% di sodio azide nel pozzetto centrale e si incuba la piastra per 24 ore a +37 °C.

In caso positivo, tra la colonia batterica e l'antisiero si forma una linea di precipitazione visibile a occhio nudo, meglio se si appoggia la piastra sopra un *box* a luce trasmessa.

L'unico inconveniente di questo *test* consiste nel fatto che i risultati si ottengono dopo 3-4 giorni.

Reverse Passive Latex Agglutination Test

Il metodo è stato valutato da Scotland e Coll. (1989) dopo la realizzazione di un prodotto commerciale (VET-RPLA, Oxoid), utilizzabile anche per la tossina del colera, che possiede una struttura simile.

Gli anticorpi sono ricavati da conigli iperimmunizzati con la tossina del colera e fissati su particelle di lattice (polistirene).

I risultati sono stati comparati con le prove su cellule (linea Y-1) e con il Biken *test*, dimostrando una buona correlazione.

Il test si esegue in piastre *microtiter* con 96 pozzetti a U, nei quali si introducono diluizioni del ceppo da saggiare, fatto crescere per 18-24 ore a +37 °C (preferibilmente sotto agitazione) in brodo di Mundell, addizionato con polimixina B a 10.000 U/ml, che favorisce il rilascio della tossina, e ulteriormente incubato per altre 4 ore.

Il campione per la prova è costituito dal soprastante centrifugato a 3000 rpm per 20 minuti o filtrato su membrana da 0,2 µm.

Si distribuisce il diluente a 25 µl in due file da 8 pozzetti ciascuna e si aggiungono, al primo e al secondo pozzetto di ogni fila, 25 µl del campione.

Seguono le diluizioni, trasferendo 25 µl dal secondo pozzetto fino al settimo. L'ottavo pozzetto rimane di controllo con il solo diluente.

La prima fila riceve 25 µl di lattice sensibilizzato con gli anticorpi, la seconda fila il lattice di controllo senza anticorpi.

Si procede nello stesso modo per allestire un controllo positivo, nel quale il campione è sostituito da tossina del colera.

L'incubazione avviene a temperatura ambiente per 20-24 ore, dopo aver coperto la piastra con il coperchio, per prevenire l'evaporazione.

La reazione positiva appare come un'agglutinazione, mentre la reazione negativa produce la sedimentazione delle particelle di lattice, sino a formare un bottone sul fondo del pozzetto.

Coagglutination Test

Questo test, descritto da Ronnberg *e Coll.* (1983), è fondato su una reazione di agglutinazione resa visibile da *Staphylococcus aureus* (ceppo Cowan-1, ricco di proteina A in superficie) ricoperto da un siero anti-tossina LT ricavato da conigli iperimmunizzati per 5 mesi con l'antigene in adiuvante incompleto di Freund.

La procedura è la seguente:

1. Sospendere un'ansata di batteri, coltivati su Mueller-Hinton Agar + 40 µg/ml di lincomicina, in 100 µl di soluzione di polimixina B solfato.
2. Incubare per 30 minuti in bagnomaria a +37 °C.
3. Aggiungere 10 µl di soluzione acquosa di Triton X-100.
4. Incubare per 20 minuti a +37 °C in bagnomaria.
5. Centrifugare a 2000 rpm per 30 minuti.
6. Mescolare su un vetrino 25 µl di soprastante del centrifugato con 25 µl di reagente LT.
7. La coagglutinazione di un ceppo positivo avviene di solito entro 2 minuti.

Una modifica al test (Bettelheim *e Coll.*, 1985) prevede:

- dalla piastra di MacConkey di primo isolamento, trapiantare almeno 6 diverse colonie in altrettanti spicchi di una piastra di Mueller-Hinton Agar o di Casamino Agar + lincomicina, da incubare per una notte a +37 °C.
- dalla crescita di ciascuno degli spicchi, trasferire un'ansata in 200 µl di soluzione di polimixina B solfato.
- il metodo prosegue ritornando al punto 2.

Reagenti:

Mueller-Hinton + Lincomicina

A 200 ml di terreno di Mueller-Hinton sterilizzato e raffreddato a circa +50 °C aggiungere sterilmente 2 ml di soluzione di lincomicina.

Soluzione di Lincomicina

Lincomicina cloridrato mg 400, acqua distillata ml 100
Sterilizzare per filtrazione. Distribuire a 2 ml in provette e congelare.

Reagente LT

Sospensione al 2% di *S. aureus* inattivato, miscelato ad anticorpi anti-tossina LT e colorato con soluzione acquosa al 4% di blu di metilene.

Soluzione di polimixina B solfato

Sterilizzare per filtrazione una soluzione in acqua distillata di polimixina B solfato alla concentrazione di 10.000 U.I./ml

Un test di co-agglutinazione è commercializzato col nome di Phadebact® da Bactus (Huddinge, Svezia), oppure da Pharmacia (Finkelstein e Coll., 1983; Rudensky e Coll., 1988).

Sonde geniche

Un metodo colorimetrico di amplificazione del DNA è stato descritto da O'Meara e Coll. (1995). Essi fanno reagire la digoxigenina, inglobata nel prodotto di amplificazione, con un anticorpo coniugato a fosfatasi alcalina e rivelano il gene responsabile della tossina LT mediante PCR.

VEROCITOTOSSINE

La tossina VT1 è strettamente correlata, antigenicamente, con la tossina prodotta da *Shigella dysenteriae* tipo 1, mentre la tossina VT2 vi si discosta in quanto non viene neutralizzata dal siero contro *Shigella dysenteriae* e VT1.

Le tossine VT producono, *in vitro*, un effetto citopatico sulle linee cellulari HeLa e Vero. Inoltre, inducono rigonfiamento delle anse ileali nel coniglio e sono letali se inoculate in animali da esperimento (conigli, ratti e topi).

Ricerca della tossina libera nelle feci

Il campione è formato da una piccola quantità di feci, diluita in PBS, centrifugata a 10.000 rpm per 10 minuti e filtrata su membrana da 0,22 µm.

Dal filtrato, si esegue una serie di diluizioni al raddoppio in PBS, che vanno introdotte a 50 µl in pozzetti di una piastra *microtiter* già seminata con cellule Vero.

Si osservano al microscopio i monostrati cellulari giornalmente, incubando la piastra a +37 °C in termostato con 5% di CO₂.

L'*end point* è dato dalla più alta diluizione che distrugge il 50% delle cellule dopo 3 giorni.

Si conferma il test mediante una prova di siero-neutralizzazione, che consiste nell'incubare a +37 °C per un'ora il filtrato, diluito come sopra, miscelato a pari volume con il siero anti-VT1 e VT2. Segue l'infezione delle cellule Vero, che, in caso positivo, non mostreranno effetto citopatico, analogamente a un controllo negativo allestito con siero normale di coniglio.

Ricerca della tossina prodotta da ceppi isolati in coltura

Otto colonie di coli isolate su MacConKey vengono trapiantate assieme in 20 ml di Penassay Broth (Antibiotic Medium no.3 Difco), da incubare a +37 °C per 5 ore. Dopo centrifugazione a 10.000 rpm per 10 minuti, i germi sedimentati vengono risospesi in 1 ml di soluzione di polimixina B (a 0,1 mg/ml). Una volta agitata, la sospensione viene incubata per 30 minuti a +37 °C.

Il campione da esaminare su cellule Vero (previa diluizione seriale al raddoppio, come specificato nella precedente ricerca) è costituito dalla sospensione realizzata in soluzione di polimixina, centrifugata a 10.000 rpm per 10 minuti e filtrata su membrana da 0,22 µm.

La presenza di attività vero-citotossica nei pozzetti, a partire da una diluizione di 1:256, è indice di probabile presenza di almeno una colonia di coli produttore di VTEC.

Ricerca della tossina da feci o da ceppi isolati in coltura con metodo ELISA

Si è visto che il sierotipo O157:H7 è responsabile solamente dell'80% dei casi di HUS in Germania e che altri sierotipi producono gli stessi effetti.

Pertanto, la procedura più adeguata per la diagnosi dei coli verocitotossici raccomanda, oltre all'arricchimento del sospetto patogeno per una notte in brodo TSB + novobiocina a 20 mg/l e successivo isolamento su terreno selettivo, anche la ricerca della verocitotossina nelle feci o dall'arricchimento stesso.

Il metodo ELISA della Biopharm, chiamato Ridascreen® Verotoxin, rileva le verocitotossine 1 e 2 mediante anticorpi monoclonali.

Il test si esegue su piastra, inserendo due gocce del campione (sospensione fecale oppure soprastante dell'arricchimento culturale) in un pozzetto.

Un controllo positivo viene introdotto in un altro pozzetto della piastra e seguirà le stesse operazioni effettuate sul campione.

Dopo incubazione a temperatura ambiente (20-25 °C) per un'ora, si lava il contenuto dei pozzetti con soluzione di lavaggio e si introducono due gocce di coniugato.

La piastra rimane per 30 minuti a temperatura ambiente e quindi si fa un secondo lavaggio, prima di immettere due gocce di substrato.

Si mantiene la piastra al buio per 15 minuti a temperatura ambiente e quindi si aggiunge una goccia di bloccante.

La reazione positiva è data dal viraggio di colore (da azzurro a giallo), che può essere valutata anche con l'aiuto di uno spettrofotometro a 450 nm.

Ricerca attraverso reverse passive latex agglutination (RPLA)

Commercializzato da Denka Seiken Ltd., Japan, e descritto da Chart e Coll. (2001), avviene in piastre *microtiter* con pozzetti a V. Si può esaminare una coltura batterica o un estratto di feci, dopo centrifugazione e filtrazione del soprastante. La lettura avviene dopo 18 ore a t° ambiente.

Ricerca attraverso tecniche di biologia molecolare

Un'applicazione pratica riguarda la ricerca dei geni responsabili della tossicità mediante *Polymerase Chain Reaction* (PCR).

In questo caso specifico, un protocollo di analisi può presentarsi articolato in uno *screening* iniziale per il gene VT secondo Lin e Coll. (1993), seguito, in caso di esito positivo, dalla ricerca dei fattori VT1 e VT2 secondo Russmann e Coll. (1995), oppure VTe secondo Franke e Coll. (1995).

Anche la dimostrazione del gene *eae* può avvenire mediante PCR, col metodo descritto da Karch e Coll. (1993), e risulta particolarmente significativa in ceppi O103 isolati da conigli (Mazzolini e Coll., 2005).

Il campione nasce da colture di 24 ore su terreno TSA, sospese e diluite fino a torbidità pari al tubo 3 di McFarland in acqua distillata sterile e inattivate a 100 °C per 15 minuti.

I *primer* nel caso specifico citato sono:

<i>Target</i>	<i>Primer</i>	<i>Sequenza</i>
VT screening	VTLIN <i>up</i>	5'-GAA CGA AAT AAT TTA TAT GT-3'
	VTLIN <i>down</i>	5'-TTT GAT TGT TAC AGT CAT-3'
VT1	KS7	5'-ATG AAA AAA ACA TTA TTA ATA GC-3'
	KS8	5'-AGC TAT TCT GAG TCA ACG-3'
VT2	GK3	5'-ATG AAG AAG ATG TTT ATG-3'
	GK4	5'-TCA GTC ATT ATT AAA CTG -3'
VTe	FK1	5'-CCC GGA TCC AAG AAG ATG TTT ATA-3'
	FK2	5'-CCC GAA TTC TCA GTT AAA CTT CAC C-3'
<i>eae</i>	SK1	5'-CCC GAA TTC GGC ACA AGC ATA AGC-3'
	SK2	5'-CCC GGA TCC GTC TCG CCA GTA TTC G-3'

PROVE DI SENSIBILITÀ AI FARMACI

Un notevole passo avanti è stato fatto con la ricerca della concentrazione minima inibente (o MIC) su piastra, mediante la tecnica di micro-diluizione (Gavan *e Coll.*, 1970).

Alcuni *kit* commerciali hanno semplificato le procedure di laboratorio, facendo passare in secondo piano altri metodi.

Per questo, si è ritenuto opportuno citare tre esempi di *test* che possono essere realizzati senza costose apparecchiature automatizzate.

SENSITITRE®

(Seward Laboratories, London)

È la versione miniaturizzata della MIC mediante diluizioni in brodo. In una micropiastra si trovano, liofilizzate, quantità scalari di 11 antibiotici, da ricostituire con la brodocoltura del ceppo in esame. Al termine dell'incubazione, la MIC viene letta come la più bassa concentrazione di antibiotico che inibisce completamente lo sviluppo.

La piastra per Gram-negativi contiene:

Antibiotico	Range (mcg/ml)
Carbenicillina	512 – 4
Ampicillina	32 – 0,25
Tobramicina	16 – 0,12
Gentamicina	16 – 0,12
Amikacina	32 – 0,25
Tetraciclina	32 – 0,25
Cloramfenicolo	32 – 0,25
Colistina	16 – 0,12
Cefalotina	128 – 1
Sulfametoxazolo	64 – 0,5
Cotrimoxazolo	8/152 – 0,06/1.2
-	Controllo

L'inoculo viene preparato a partire da una brodocoltura in BHI di 24 ore contenente circa 10⁹ germi/ml, diluita 1:10.000 in BHI per ottenere circa 10⁵ germi/ml.

La sospensione, accuratamente agitata, viene seminata con una micropipetta a 50 µl in tutti i pozzetti della piastra, da chiudere con foglio adesivo e incubare 16-18 ore a +37 °C.

Si legge la piastra per trasparenza, individuando i pozzetti torbidi, iniziando dalla fila più bassa. In assenza di crescita, i germi sedimentano al fondo del pozzetto formando un bottone.

La MIC corrisponde al primo pozzetto limpido, ma possono verificarsi situazioni meno chiare da interpretare, quando la coltura è mista (si notano più *break-point*) o nel caso di tetraciclina e sulfamidici (il passaggio da torbido a limpido non è netto).

In tutti i casi dubbi, la MIC valida corrisponde al primo pozzetto limpido seguito da altri privi di crescita.

MICRO-SCAN® (Dade-Behring, Atterbury, UK)

Il sistema, simile al precedente, permette la determinazione della sensibilità agli agenti antimicrobici e, contemporaneamente, l'identificazione di specie.

Per un uso manuale delle piastre Micro-Scan®, si allestisce una sospensione del ceppo in 3 ml di acqua distillata sterile, fino a torbidità pari al tubo 3 di McFarland.

0,1 ml vengono mescolati con 25 ml di diluente e quindi, con micro pipetta, si seminano i pozzetti della piastra, in ragione di $115 \pm 10 \mu\text{l}$ ciascuno.

Le piastre, sigillate con foglio adesivo per prevenire l'evaporazione, vengono incubate in termostato a $+37^\circ\text{C}$ per 16-20 ore.

La MIC corrisponde alla più bassa concentrazione di antibiotico che impedisce lo sviluppo del microrganismo.

È presente un pozzetto per riconoscere i ceppi produttori di beta-lattamasi a largo spettro (ESBL), grazie all'azione antagonista dell'acido clavulanico.

I coli che presentano una MIC verso ceftazidime + acido clavulanico più bassa della MIC verso la sola ceftazidime sono, verosimilmente, produttori di beta-lattamasi.

Questa prova è utile per prevenire fallimenti terapeutici legati a scarsa attività delle cefalosporine, o nel caso di pazienti critici.

NOTA

Le beta-lattamasi a spettro esteso sono enzimi mediati da plasmidi, prodotti da batteri Gram-negativi (tra cui *E. coli* e *Klebsiella*), con la capacità di inattivare penicilline, cefalosporine a largo spettro (cefotaxime, ceftriaxone, ceftizoxime, ceftazidime) e aztreonam. I plasmidi che codificano le beta-lattamasi di solito veicolano anche la resistenza verso aminoglicosidi e trimetoprim/sulfametoxazolo.

E-TEST® (AB Biodisk, Svezia)

Determina la MIC di un singolo agente antimicrobico e consiste in una sottile striscia di plastica, larga 5 mm e lunga 6 cm, che mostra una scala di lettura graduata in $\mu\text{g/ml}$.

Sul lato opposto della striscia, è fissato l'antibiotico in 15 concentrazioni diverse, comprese nell'intervallo di diluizioni abitualmente impiegate nella ricerca della MIC con i metodi convenzionali.

Quando la striscia viene appoggiata sulla superficie di una piastra contenente un terreno solido seminato col ceppo da esaminare, il gradiente di concentrazione dell'antibiotico viene rilasciato. Dopo 18 ore, si può osservare una zona di inibizione ellittica della crescita, simmetrica e centrata lungo la striscia. La MIC, in $\mu\text{g/ml}$, si legge dalla graduazione sulla striscia al punto d'intersezione della scala con la zona d'inibizione.

Esiste una striscia E-test® specifica per la sorveglianza dei patogeni produttori di beta-lattamasi a spettro esteso (ESBL), contenente, a un'estremità, ceftazidime e, a quella opposta, ceftazidime + acido clavulanico.

L'acido clavulanico agisce da inibitore delle beta-lattamasi, al pari di tazobactam e sulbactam.

Un ceppo è ritenuto produttore di beta-lattamasi quando il rapporto delle letture fra ceftazidime + acido clavulanico e ceftazidime da solo è uguale o maggiore di 8, oppure se si osservano deformazioni dell'ellisse d'inibizione.

APPENDICE

TERRENI, REAGENTI,
SOLUZIONI, TABELLA
PER IL CONTEGGIO MPN

TERRENI

*SI riporta la composizione in grammi/litro (ove non diversamente indicato)
dei più comuni terreni batteriologici citati nel testo*

A-1 Broth

Terreno di arricchimento per coliformi

Triptone 20, lattosio 5, sodio cloruro 5, Triton X-100 1, salicina 0.5, acqua distillata 1000 ml

pH finale = 6.9 ± 0.1

Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti

Agar sangue (Blood Agar Base n° 2)

Terreno di uso generale per germi esigenti e per evidenziare l'emolisi

Peptone proteose 15, digerito di fegato 2.5, estratto di lievito 5, sodio cloruro 5, agar-agar 12, acqua distillata 1000 ml

Dopo sterilizzazione a 121 °C e raffreddamento in bagno a +50 °C, aggiungere sterilmente ml 7 di sangue defibrinato, prelevato sterilmente, di cavallo o di pecora

pH finale = 7.4 ± 0.2

Antibiotic Medium no. 3 (Broth e Agar)

Terreno per ricerca degli antibiotici e di uso generale

Peptone 5, estratto di lievito 1.5, estratto di carne 1.5, destrosio 1, sodio cloruro 3.5, potassio fosfato bibasico 3.68, potassio fosfato monobasico 1.32, acqua distillata 1000 ml

Per ottenere il terreno solido, aggiungere agar-agar 10

pH finale = 7.0 ± 0.2

Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti

Bile Salt Broth

Terreno per la ricerca dei coliformi nell'acqua e nel latte formulato da MacConkey

Peptone 40, lattosio 20, sodio cloruro 10, sodio taurocolato 5, rosso neutro 0.15, acqua distillata 1000 ml

pH finale = 7.4 ± 0.2

Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti

Brain Heart Infusion Agar (BHI Agar)

Terreno semplice in provetta o in piastra per la coltivazione di microrganismi esigenti

Infuso di cervello 200, infuso di cuore 250, peptone proteose 10, glucosio 2, sodio cloruro 5, sodio fosfato bibasico dodecaidrato 2.5, agar-agar 15, acqua distillata 1000 ml

pH finale = 7.4 ± 0.2

Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti

Brilliant Green Bile Agar

Terreno selettivo per la ricerca dei coliformi nell'acqua

Peptone 8.25, lattosio 1.9, bile 2.95 mg, sodio solfito 0.025, ferro cloruro 29.5 mg, potassio fosfato monobasico 15.3 mg, agar-agar 10.15, erio glucina 64.9 mg, fucsina basica 77.6 mg, verde brillante 29.5 mcg, acqua distillata 1000 ml

pH finale = 6.9 ± 0.2

Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti

Brilliant Green 2% Bile Broth

Arricchimento selettivo per coliformi

Peptone 10, lattosio 10, bile 20, verde brillante 0.00133, acqua distillata 1000 ml

pH finale = 7.4 ± 0.2

Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti

Brodo triptofano

Terreno indicato da UNI EN ISO 9308-1 per la conferma di E. coli nell'acqua

Digerito triptico di caseina 10, L-triptofano 1, sodio cloruro 5, acqua distillata 1000 ml

pH finale = 7.5 ± 0.1

Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti

Carbohydrate Fermentation Broth

Terreno differenziale liquido per prove biochimiche di fermentazione dei carboidrati in provetta

Peptone di caseina 5, peptone di carne 5, sodio cloruro 5, rosso fenolo 0.018, acqua distillata 950 ml

pH finale = 7.4 ± 0.2

Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti. Raffreddare a circa 50 °C ed aggiungere sterilmente lo zucchero da testare (5 g in 50 ml di acqua distillata, sterilizzazione per filtrazione)

CAYE Agar (Casamino Agar+lincomicina)

Terreno che favorisce la produzione di enterotossina LT

Casamino- acids (Difco) 20, estratto di lievito 6, sodio cloruro 2.5, potassio fosfato bibasico 8.71, agar-agar 15, acqua distillata 1000 ml

pH finale = 8.5 ± 0.2

Al terreno base, autoclavato a 121 °C per 15 minuti e raffreddato a 50 °C, aggiungere sterilmente 1 ml di soluzione di sali e 10 ml di soluzione di glucosio+lincomicina.

La soluzione di sali contiene magnesio solfato 10.2, manganese cloruro 0.78, ferro cloruro ferrico 0.73, acqua distillata 100 ml e può essere sterilizzata a parte in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

La soluzione di glucosio+lincomicina contiene glucosio 2.5, lincomicina 0.045, acqua distillata 10 ml e viene sterilizzata a parte per filtrazione (filtro da 0.22 µm)

CHROMOGENIC MEDIA

(gruppo di terreni contenenti una sostanza cromogena adatta ad evidenziare e differenziare dal colore le colonie)

Chromocult® Coliform Agar (formula Merck)

Terreno per riconoscere le colonie di coliformi e di Escherichia coli

Peptone 3, sodio cloruro 5, sodio fosfato monobasico 2.2, sodio fosfato bibasico 2.7, sodio piruvato 1, triptofano 1, agar-agar 10, sorbitolo 1, tergitol -7 0.15, cromogeno 0.4, acqua distillata 1000 ml

pH finale = 6.8 ± 0.2

Non autoclavare

Chromogenic Urine Agar (terreno di Godsey e Coll., 1981)

Terreno cromogenico e fluorogenico per identificazione in piastra dei principali patogeni urinari

Peptone di gelatina 3.3, tryptone 5, peptone di carne 10.5, triptofano 1, sostanze cromogene e fluoro gene 0.5, agar-agar 12, acqua distillata 1000 ml

pH finale = 7.0 ± 0.2

Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15' ed aggiungere, dopo raffreddamento a circa 50 °C, 3 ml di siero equino sterile

EC X-Gluc Agar® (formula Biolife)

Terreno per la ricerca dell'Escherichia coli nelle acque e negli alimenti

Triptone 20, estratto di lievito 5, sali biliari 1.5, sodio fosfato bibasico 5, potassio fosfato monobasico 1.5, sodio cloruro 5.0, X-GLUC 0.06, triptofano 1, agar-agar 12, acqua distillata 1000 ml

pH finale = 7.0 ± 0.2

Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti

CFA Agar

Terreno per la ricerca dei fattori di adesività CFA

Casamino-acids (Difco) 10, estratto di lievito 1.5, agar-agar 20, acqua distillata 1000 ml

pH finale = 7.4 ± 0.2

Al terreno base, autoclavato a 121 °C per 15 minuti, aggiungere 1 ml di soluzione di sali sterilizzata a 100 °C per 15 minuti, contenente, in 100 ml di acqua distillata, magnesio solfato 10.22 e manganese cloruro 0.78

CLED Agar

Terreno semplice per l'isolamento ed il conteggio dei germi nelle urine

Digerito di caseina 4, digerito di gelatina 4, estratto di carne 3, lattosio 10, l-cistina 0.128, blu di bromotimolo 0.02, agar-agar 15, acqua distillata 1000 ml

pH finale = 7.3 ± 0.2

Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti

Coliform Agar

Terreno selettivo e differenziale cromogeno per l'isolamento e la conta di coliformi ed Escherichia coli

Peptone 3, sodio cloruro 5, sodio fosfato monobasico 2.2, sodio fosfato bibasico 2.7, sodio piruvato 1, triptofano 1, agar-agar 10, sorbitolo 1, tergitol-7 0.15, miscela cromogena 0.4, acqua distillata 1000 ml.

Il terreno può essere antibiotato con cefsulodin 5 mg/litro.

pH finale = 6.8 ± 0.2

Non autoclavare. Colore del terreno = giallastro e opaco

CR SMAC

Terreno selettivo in piastra per E. coli O157:H7 secondo Wallace e Coll., 1996

Sorbitol MacConkey Agar + ramnosio 5.0 g/l, cefixime 0.05 mg/l

CT SMAC

Terreno selettivo in piastra per E. coli O157:H7 secondo Wallace e Coll., 1996

Sorbitol MacConkey Agar + cefixime 0.05 mg/l, potassio tellurito 2.5 mg/l

Desoxycholate Lactose Agar

Terreno selettivo in piastra per l'isolamento degli enterobatteri

Digerito di caseina 5, peptone di carne 5, lattosio 10, sodio cloruro 5, sodio citrato 2, sodio desossicolato 0.5, agar-agar 15, rosso neutro 0.033, acqua distillata 1000 ml

pH finale = 7.1 ± 0.2

Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti

EAV (Enterohemolysin Agar)

Terreno selettivo per E. coli enteroemorragici secondo Pozzi e Coll., 1996

Nutrient Agar + 5% sangue defibrinato di pecora centrifugato e lavato + CaCl₂ 10 mM + vancomicina 30 mg/l

EC Broth

Brodo d'arricchimento per enterobatteri coliformi

Triptone 20, lattosio 5, sali biliari 1.5, potassio fosfato bibasico 4, potassio fosfato monobasico 1.5, sodio cloruro 5, acqua distillata 1000 ml

pH finale = 6.9 ± 0.2

Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti

EEB

Terreno di arricchimento per la ricerca di E. coli O157:H7 secondo Weagant e Coll., 1995

TSB + vancomicina 8 mg/l, cefixime 0.05 mg/l, cefsulodin 10 mg/l

EE Broth

Brodo d'arricchimento per enterobatteri coliformi

Peptone 10, destrosio 5, sodio fosfato bibasico 6.45, potassio fosfato monobasico 2, bile 20, verde brillante 0.0135, acqua distillata 1000 ml

pH finale = 7.2 ± 0.2

Sterilizzare a 100 °C per 30 minuti

EMB (Eosin Methylene Blue Lactose Sucrose Agar)

Terreno selettivo per E. coli

Peptone 10, potassio fosfato bibasico 2, lattosio 5, saccarosio 5, eosina giallastra 0.4, blu di metilene 0.07, agar-agar 13.5, acqua distillate 1000 ml

pH finale = 7.1 ± 0.2

Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti

EMB (formula di Levine)

Terreno selettivo per E. coli

Peptone 10, lattosio 10, potassio fosfato monobasico 2, eosina giallastra 0.4, blu di metilene 0.065, agar-agar 15, acqua distillata 1000 ml

pH finale = 6.8 ± 0.2

Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti

Endo Agar

Terreno selettivo per E. coli

Peptone 10, potassio fosfato bibasico 2.5, lattosio 10, sodio solfito 3, fucsina 0.3, agar-agar 12.5, acqua distillata 1000 ml

pH finale = 7.4 ± 0.2

Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti

FLUOROGENIC MEDIA

(gruppo di terreni denominati Fluorocult® (formule Merck) contenenti una sostanza, rivelabile in luce fluorescente, che permette il riconoscimento presuntivo e la differenziazione di coliformi ed Escherichia coli. Necessitano dell'uso della lampada di Wood e del reattivo di Kovacs per la prova dell'indolo)

Fluorocult Brilliant Green Bile Broth

Terreno usato per la determinazione dei coliformi e dell'Escherichia coli nelle acque di balneazione con il metodo MPN

Peptone 10, lattosio 10, bile 20, verde brillante 0.0133, l-triptofano 1, MUG 0.1, acqua distillata 1000 ml

pH finale = 7.2 ± 0.2

Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti

Fluorocult DEV Lactose Peptone Broth

Terreno usato per la ricerca dei coliformi e dell'Escherichia coli nelle acque

Peptone di caseina 17, peptone di soia 3, lattosio 10, sodio cloruro 5, bromocresolporpora 0.02, triptofano 1, MUG 0.01, acqua distillata 1000 ml

pH finale = 7.0 ± 0.2

Sterilizzare a 115 °C per 20 minuti

Fluorocult ECD Agar

Terreno per la ricerca diretta dell'Escherichia coli

Peptone di caseina 20, lattosio 5, sodio cloruro 5, sali biliari 1.5, potassio fosfato bibasico

4, potassio fosfato monobasico 1.5, agar-agar 15, acqua distillata 1000 ml
pH finale = 7.0 ± 0.2
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti

Fluorocult ECD Agar (formula Merck)

Terreno selettivo per coliformi ed Escherichia coli
Peptone 20, lattosio 5, potassio fosfato monobasico 4, potassio fosfato bibasico 1.5, sali biliari 1.5, MUG 0.07, l-triptofano 1, agar-agar 15, acqua distillata 985 ml
pH finale = 7.0 ± 0.2
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti

Fluorocult E. coli O157:H7 Agar

Peptone di caseina 20, estratto di carne 2, estratto di lievito 1, sorbitolo 10, ferro ammonio citrato ico 0.5, MUG 0.1, sodio cloruro 5, blu di bromo timolo 0.025, sodio tiosolfato 2, sodio desossicolato 1.12, agar-agar 13, acqua distillata 1000 ml
pH finale = 7.4 ± 0.2
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti

Fluorocult LMX Broth (terreno di Manafi e Ossmer)

Terreno per la ricerca contemporanea, con varie tecniche, dei coliformi totali e dell'Escherichia coli nelle acque e negli alimenti
Tryptose 5, sodio cloruro 5, sorbitolo 1, triptofano 1, potassio fosfato bibasico 2.7, potassio fosfato monobasico 2, sodio laurilsolfato 0.1, X-GAL 0.08, 1-isopropyl-beta-D-tiogalattopiranoside 0.1, acqua distillata 1000 ml
pH finale = 6.8 ± 0.2
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti
Altri terreni basati sulla lettura in fluorescenza alla luce di Wood:
MacConkey Agar, VRB Agar, Lauryl Sulphate Broth. Diventano terreni fluorogenici aggiungendo, nella composizione, 0.1 mg/l di 4-methyl-umbelliferil-beta-D-glucuronide.

Gassner Agar

Terreno selettivo e differenziale in piastra per l'isolamento delle Enterobacteriaceae (usato in veterinaria)
Peptone 10, digerito triptico di caseina 15.5, sodio cloruro 5, lattosio 50, saccarosio 30, giallo metacromo 1.25, wasserblau 0.875, acqua distillata 1000 ml
pH finale = 7.4 ± 0.2
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti

Kligler Iron Agar

Terreno differenziale in provetta usato per il trapianto di colonie isolate di enterobatteri
Estratto di carne 3, estratto di lievito 3, peptone 15, peptone proteose 5, lattosio 10, glucosio 1, sodio cloruro 5, solfato ferroso 0.2, sodio tiosolfato 0.3, rosso fenolo 0.024, agar-agar 12, acqua distillata 1000 ml
pH finale = 7.4 ± 0.2
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti. Distribuire in modo da ottenere nella provetta uno *slant* più un fondo di circa 2 cm (distribuire a ml 7 in provette 16 × 160)

Lactose Broth

Terreno di arricchimento per germi enterici

Estratto di carne 3, peptone 5, lattosio 5, acqua distillata 1000 ml

pH finale = 6.9 ± 0.2

Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti

Lactose TTC Agar

Terreno indicato da UNI EN ISO 9308-1 per la ricerca di E. coli nell'acqua

Terreno base = lattosio 20, peptone 10, estratto di lievito 6, estratto di carne 5, blu di bromo timolo 0.05, agar-agar 15-25, acqua distillata 1000 ml

pH finale = 7.2 ± 0.1

Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti

Terreno completo = al terreno base aggiungere il 5% di soluzione TTC (trifenil tetrazolio cloruro 0.2, acqua distillata 100 ml) e il 5% di soluzione di sodio eptadecilsolfato (Tergitol - 7 ml 0.2, acqua distillata 100 ml)

Lauryl Sulphate Broth (LSB)

Terreno per il conteggio dei coliformi e di Escherichia coli con metodo MPN

Triptosio 20, lattosio 5, sodio cloruro 5, potassio fosfato bibasico 2.75, potassio fosfato monobasico 2.75, sodio lauril solfato 0.1, acqua distillata 1000 ml

pH finale = 6.8 ± 0.2

Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti

Lauryl Tryptose Mannitol Broth

Terreno per il conteggio dei coliformi e di Escherichia coli con metodo MPN

Triptosio 20, mannitolo 5, sodio cloruro 5, potassio fosfato bibasico 2.75, potassio fosfato monobasico 2.75, sodio laurilsolfato 0.1, l-triptofano 0.2, acqua distillata 1000 ml

pH finale = 6.8 ± 0.2

Sterilizzare in autoclave a 115 °C per 10 minuti

Litmus Lactose Agar (Drigalski Agar)

Terreno d'isolamento selettivo per germi lattosio fermentanti

Peptone di carne 7, sodio cloruro 5, lattosio 15, litmus 1.2, agar-agar 13, acqua distillata 1000 ml

pH finale = 7.4 ± 0.2

Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti

MacConkey Agar

Terreno selettivo e differenziale in piastra per l'isolamento delle Enterobacteriaceae, usato anche per altri germi

Peptone di carne 17, polipeptone 3, lattosio 10, sali biliari 1.5, sodio cloruro 5, rosso neutro 0.03, cristalvioletto 0.001, agar-agar 13.5, acqua distillata 1000 ml

pH finale 7.1 ± 0.2

Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti

MacConkey Sorbitol Agar

Terreno selettivo e differenziale in piastra per l'isolamento di Escherichia coli sorbitolo-negativi (O157:H7)

Peptone 20, sorbitolo 10, sali biliari 1.5, sodio cloruro 5, rosso neutro 0.03, cristalvioletto 0.001, agar-agar 15, acqua distillata 1000 ml

pH finale = 7.1 ± 0.2

Sterilizzare a 121 °C per 15 minuti

MacConkey Sorbitol Agar + MUG

Terreno in piastra per la differenziazione di E. coli e di E. coli O157:H7

c.s. con aggiunta di 0.1 g/l di MUG

m-ENDO Agar

Terreno selettivo e differenziale in piastra per la conta dei coliformi nelle acque col metodo della filtrazione su membrana

Estratto di lievito 1.2, triptone 3.7, peptone 3.7, triptosio 7.5, lattosio 9.4, potassio fosfato bibasico 3.3, potassio fosfato monobasico 1, sodio cloruro 3.7, sodio desossicolato 0.1, sodio laurilsolfato 0.05, sodio solfito 1.6, agar-agar 10, acqua demineralizzata 1000 ml

pH finale = 7.2 ± 0.2

Aggiungere 8 ml di una soluzione alcolica di fucsina basica al 10%

Sciogliere per ebollizione. Non autoclavare

m-FC Agar

Terreno selettivo e differenziale in piastra per la conta dei coliformi fecali nelle acque col metodo della filtrazione su membrana

Triptosio 10, peptone proteose 5, estratto di lievito 3, sodio cloruro 5, lattosio 12.5, sali biliari 1.5, blu di anilina 0.01, agar-agar 10, acqua demineralizzata 1000 ml

pH finale = 7.4 ± 0.2

Aggiungere 1 ml di una soluzione all' 1% di acido rosolico in NaOH 0.2 N

Sciogliere per ebollizione. Non autoclavare

Minca Is Medium

Terreno adatto alla ricerca delle adesine nei coli

Potassio fosfato monobasico 1.36, sodio fosfato bibasico biidrato 10.1, casamino-acids (Difco) 1.0, agar-agar 12.0, acqua distillata 1000 ml

pH finale = 7.5 ± 0.2

Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti e, dopo raffreddamento a 50 °C, aggiungere sterilmente:

miscela di sali 1.0

Isovitalex (BBL) 1 fiala

La miscela di sali contiene magnesio solfato 10.0, manganese cloruro 1.0, ferro cloruro ico 0.135, calcio cloruro 0.4 e viene preparata a parte, sterilizzandola a 100 °C per 20 minuti

Mineral Modified Glutamate Medium (MMGM)

Brodo selettivo per il conteggio di E. coli con metodo MPN secondo ISO 16649-3

Lattosio 20, sodio formiato 0.5, L-cistina 0.04, acido L(-) aspartico 0.048, L(+) arginina

0.04, tiamina 0.002, acido nicotinico 0.002, acido pantotenico 0.002, magnesio solfato 0.2, ferro ammonio citrato 0.02, calcio cloruro 0.02, potassio fosfato bibasico 1.8, bromocresolporpora 0.02

Per la preparazione del terreno completo a concentrazione semplice, sospendere 2.5 g di ammonio cloruro in 1000 ml di acqua distillata fredda. Aggiungere 11.35 g della miscela di ingredienti sopraindicati e 6.5 g di sodio glutammato. Mescolare per sciogliere completamente. Distribuire in provette o provettoni a 10 ml. Autoclavare a 115 °C per 10 minuti.

Per la preparazione del terreno completo a doppia concentrazione, le pesate (sempre riferite a 1000 ml d'acqua distillata) vanno raddoppiate.

pH finale = 6.7 ± 0.1

MTSB (Modified Tryptone Soy Broth)

Terreno d'arricchimento per E. coli O157:H7 secondo Vernozy-Rozand e Coll., 1997
TSB + novobiocina 20 mg/l

Mueller-Hinton Agar

Terreno semplice in piastra idoneo per l'allestimento dell'antibiogramma secondo la tecnica di Kirby-Bauer

Brodo infuso di carne + amido solubile 0,15%. Per il terreno solido, aggiunta di agar-agar all'1,5%.

pH finale = 6.8 ± 0.2

Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti

Mueller-Hinton Broth

Terreno semplice liquido per la determinazione della concentrazione minima inibente (MIC) degli antibiotici

Brodo infuso di carne + amido solubile 0,15%.

pH finale = 6.8 ± 0.2

Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti

TERRENI CONTENENTI MUG

Terreni liquidi o solidi destinati alla differenziazione di E. coli attraverso una reazione fluorescente

Violet Red Bile Agar; MacConkey Agar + MUG; Brilliant Green 2% Bile Broth; Lauryl Tryptose Broth

Contengono 4-methyl-umbelliferil-beta-D-glucuronide in proporzione di 100 mg/l nei terreni solidi e 50 mg/l nei terreni liquidi. La sostanza può essere inclusa nella miscela degli ingredienti o aggiunta come supplemento.

Nitrate Broth

Terreno differenziale liquido per la prova biochimica di riduzione dei nitrati

Peptone 5, estratto di carne 3, nitrato di potassio soluzione 0.1% 1, acqua distillata 1000 ml

pH finale = 7.0 ± 0.2

Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti

Nutrient Broth

Terreno di uso generale

Estratto di carne 1, estratto di lievito 2, peptone 5, sodio cloruro 5, acqua distillata 1000 ml
pH finale = 7.4 ± 0.2

Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti

PA Broth

Terreno per la ricerca di presenza/assenza di coliformi nelle acque

Idrolisato di caseina 10, estratto di carne 3, digerito pancreatico di gelatina 5, sodio cloruro 2.5, lattosio 7.5, potassio fosfato monobasico 1.375, potassio fosfato bibasico 1.375, sodio lauril-solfato 0.05, bromocresolporpora 0.0085, acqua distillata 1000 ml

pH finale = 6.8 ± 0.2

Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti

PTG Agar

Terreno per la conta in piastra dei microrganismi

Tryptone 10, phytone 5, glucosio 15, estratto di lievito 2.5, potassio fosfato bibasico 1.5, magnesio cloruro 1.5, cisteina cloridrato 1.5, agar-agar 15, acqua distillata 1000 ml

pH finale = 6.8 ± 0.2

Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti

Simmons Citrate Agar

Terreno per la prova di utilizzazione del citrato

Sodio citrato 2, sodio cloruro 5, potassio fosfato bibasico 1, ammonio fosfato biacido 1, magnesio solfato 0.2, blu di bromo timolo 0.08, agar-agar 15.0, acqua distillata 1000 ml

pH finale = 6.9 ± 0.2

Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti

TC SMAC

Terreno selettivo in piastra per la ricerca di E. coli O157:H7 secondo Weagant e Coll., 1995

Sorbitol MacConkey + potassio tellurito 2.5 mg/l, cefixime 0.05 mg/l

Tergitol-7 Broth (o Agar)

Terreni selettivi per coliformi

Peptone 10, estratto di lievito 6, estratto di carne 5, lattosio 20, blu di bromotimolo 0.05, tergitol-7 0.1, (agar-agar per il terreno solido 13.0), acqua distillata 1000 ml

pH finale = 7.2 ± 0.2

Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti

Terreno di Evans

Terreno raccomandato per evidenziare la produzione di tossine ST ed LT nei coli enterotossici

Casamino-acids (Difco) 20, estratto di lievito 6, sodio cloruro 2.5, potassio fosfato monobasico 8.71, acqua distillata 1000 ml

pH finale = 8.5

Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti, raffreddare a 50 °C ed aggiungere sterilmente: miscela di sali 1 ml e soluzione di glucosio al 20% 2.5 ml (sterilizzate a parte a 100 °C per 20 minuti)

Terreno di Mundell

Terreno per il riconoscimento delle tossine LT mediante immuno-diffusione in agar-gel (Biken test)

Casamino acids 2, estratto di lievito 0.6, sodio cloruro 0.25, sodio fosfato bibasico 0.871, glucosio 0.25. soluzione di sali in tracce 0.1 ml (contenente magnesio solfato 5%, manganese cloruro 0.5%, ferro cloruro ico 0.5%), Noble agar (Difco) 1.5, acqua distillata 100 ml
pH finale = 8.5

Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 20 minuti e aggiungere 90 mcg/ml di lincomicina solfato.

Terreno per test dell'indolo (TSB)

Terreno differenziale liquido per la prova biochimica di produzione di indolo in provetta

Peptone di carne, 8.6, sodio cloruro 6.4, potassio nitrato 1.5, acqua distillata 1000 ml
pH finale = 7.2 ± 0.2

Distribuire in provette a ml 5 e autoclavare a 121 °C per 15 minuti

Digerito triptico di caseina 20, sodio cloruro 5, acqua distillata 1000 ml

pH finale = 7.4 ± 0.2

Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti

Terreno per test del rosso metile (RM) e di Voges-Proskauer (VP)

Terreno specifico per le prove biochimiche RM e VP

Peptone 7, glucosio 5, potassio fosfato bibasico 5, sodio cloruro 5, acqua distillata 1000 ml

pH finale = 7.0 ± 0.2

Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti

Terreno per test dell'urea (Stuart)

Terreno differenziale liquido per la prova biochimica di idrolisi dell'urea in provetta

Estratto di lievito 10, potassio fosfato monobasico 9.1, sodio fosfato bibasico 9.5, urea 20, rosso fenolo allo 0.25% ml 4, acqua distillata 1000 ml

pH finale = 6.8 ± 0.2

Non autoclavare. Sterilizzare per filtrazione

Tryptic Soy Agar (TSA)

Terreno di uso generale

Triptone 15, peptone di soia 5, sodio cloruro 5, agar-agar 15, acqua distillata 1000 ml

pH finale = 7.0 ± 0.2

Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti

Tryptic Soy Broth (TSB)

Terreno di uso generale

Triptone 15, peptone di soia 5, sodio cloruro 5, acqua distillata 1000 ml

pH finale = 7.0 ± 0.2

Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti

Tryptone Bile Agar (T BA)

Terreno selettivo in piastra per E. coli secondo Anderson e Coll., 1975

Tryptone 2, sali biliari 0.15, agar-agar 1.5, acqua distillata 100 ml

pH finale = 7.2 ± 0.2

Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti

Tryptone Bile Glucuronic Medium (TBX)

Terreno indicato da ISO 16649-2 per ricercare E. coli in alimenti e mangimi

Digerito di caseina 20, sali biliari 1.5, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D-glucuronide (BCIG) 0.075, dimetilsulfossido 3 ml, agar-agar 9-18 g, acqua distillata 1000 ml

pH finale = 7.2 ± 0.2

Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti

Violet Red Bile Agar (VRBA)

Terreno selettivo e differenziale in piastra usato per la conta dei coliformi negli alimenti

Peptone di carne 7, estratto di lievito 3, sodio cloruro 5, lattosio 10, rosso neutro 0.03, sali biliari 1.5, cristalvioioletto 0.002, agar-agar 13, acqua distillata 1000 ml

pH finale = 7.4 ± 0.2

Non autoclavare. Sterilizzare per ebollizione

Violet Red Bile Glucose Agar (VRBG)

Terreno selettivo e differenziale in piastra usato per la conta degli enterobatteri negli alimenti

Peptone di carne 7, estratto di lievito 3, sodio cloruro 5, glucosio 10, sali biliari 1.5, rosso neutro 0.03, cristalvioioletto 0.02, agar-agar 13, acqua distillata 1000 ml

pH finale = 7.3 ± 0.2

Non autoclavare

Violet Red Bile Glucose Agar (VRBG) + MUG

Terreno selettivo e differenziale in piastra usato per il conteggio di Escherichia coli negli alimenti

Estratto di lievito 3, digerito pancreatico di gelatina 7, sali biliari 1.5, glucosio 10, sodio cloruro 5, agar-agar 15, rosso neutro 0.03, cristalvioioletto 0.002

pH finale = 7.4 ± 0.2

Scaldare fino ad ebollizione per 1 minuto in bagnomaria. Non autoclavare. Si può utilizzare anche il terreno Violet Red Bile Agar (VRBA) che contiene 10 g di lattosio per litro, aggiungendo 10 g di glucosio

REAGENTI

Test della beta-galattosidasi

Reagente 1:

soluzione tampone contenente sodio fosfato monobasico 6.9, idrossido di sodio 0.1 M 3 ml, acqua distillata 50 ml

Reagente 2:

soluzione ONPG contenente orto-nitrofenil-beta-D-galattopiranoside (ONPG) 0.08, acqua distillata 15 ml

Reagente completo per la prova:

reagente 1 = 5 ml, reagente 2 = 15 ml

Conservare in frigorifero a +4 °C fino a che il reagente completo rimane incolore

Esecuzione della prova:

preparare una sospensione lattescente del germe in 1 ml di soluzione fisiologica sterile, agitare e aggiungere a 0.1 ml di questa sospensione 1 ml di reagente completo. Incubare in termostato a +37 °C per due ore.

In caso positivo si ha viraggio al giallo.

Test dell'indolo

Reattivo di Kovacs

p-dimetil-ammino-benzaldeide 50, alcool amilico o isoamilico 750 ml, acido cloridrico concentrato 250 ml

Test dell'ossidasi

Dimetil-para-fenilendiammina soluzione acquosa all'1% (preparata al momento dell'uso)

SOLUZIONI

Acqua peptonata

Diluyente di uso generale

Peptone 10, acqua distillata 1000 ml

pH finale = 7.0

Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti

Diluyente sterile per prelievi da superfici di lavorazione alimenti

Da usare con tamponi, garze o spugne per neutralizzare detersivi e disinfettanti

Peptone 10, sodio cloruro 8.5, sodio monooleato (Polysorbate 80) 30 oppure lecitina 3, acqua distillata 1000 ml

Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti

Phosphate Buffered Saline (PBS)

Diluyente di uso generale

Sodio cloruro 10, potassio cloruro 0.250, potassio fosfato monobasico 0.250, sodio fosfato bibasico biidrato 1.755, acqua distillata 1000 ml

pH finale = 7.4

Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 20 minuti

Soluzione di Alsever

Diluyente per globuli rossi del sangue

Glucosio 20.5, sodio citrato tribasico biidrato 8, acido citrico 0.55, sodio cloruro 4.2, sodio azide 0.05, acqua distillata ml 1000

pH finale = 6.0 – 6.2

Soluzione di Ringer ¼ concentrata

Diluyente di uso generale

Una compressa in 500 ml di acqua distillata

pH finale 6.9 ± 0.1

Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti

Soluzione fisiologica 0,85% NaCl

Diluyente di uso generale

Acqua distillata 1000 ml, sodio cloruro 8.5

Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti

Soluzione fisiologica 1% peptonata

Idonea per la preparazione delle diluizioni nei conteggi batterici su alimenti

Acqua distillata 1000 ml, peptone 10, sodio cloruro 8.5

Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti

Buffered Peptone Water

Diluyente multiuso

Peptone 10, sodio cloruro 5, sodio fosfato bibasico 3.5, sodio fosfato monobasico 1.5, acqua distillata ml 1000

pH finale = 7.2 ± 0.2

TABELLA PER IL CONTEGGIO MPN

Tabella 17 - Conteggio batterico con tecnica del Numero Più Probabile (MPN) Tabella di Mc Crady per il calcolo su tre provette

Numero di tubi positivi			MPN in g o ml	Numero di tubi positivi			MPN in g o ml
g o ml	g o ml	g o ml		g o ml	g o ml	g o ml	
1	0,1	0,01	1	1	0,1	0,01	1
0,1	0,01	0,001	0,1	0,1	0,01	0,001	0,1
0	0	0	<0,3	2	2	1	2,8
0	0	1	0,3	3	3	0	2,9
0	1	0	0,3	3	0	0	2
0	2	0	0,6	3	0	1	4
1	0	0	0,4	3	0	2	6
1	0	1	0,7	3	1	0	4
1	1	0	0,7	3	1	1	7
1	1	1	1,1	3	1	2	12
1	2	0	1,1	3	2	0	9
1	2	1	1,5	3	2	1	15
1	3	0	1,6	3	2	2	21
2	0	0	0,9	3	2	3	29
2	0	1	1,4	3	3	0	20
2	1	0	1,5	3	3	1	50
2	1	1	2,0	3	3	2	110
2	2	0	2,1	3	3	3	>110

Ricostruire il numero caratteristico a tre cifre assegnando il valore 1 a ogni provetta positiva e il valore 0 a ogni provetta negativa.

Sommare fra loro i valori ottenuti in ciascun gruppo di tre provette seminate con la stessa diluizione.

Leggere il valore corrispondente sulla tabella MPN di Mc Crady.

Moltiplicare questo numero per l'inverso del fattore di diluizione della prima serie di tre provette prese in considerazione per la lettura.

Esempio di calcolo

Numero di provette risultate positive, inizialmente seminate con:

- omogenato di partenza (contenente 1 grammo di materiale/ml)..... **2** su 3 seminate
- diluizione 10^{-1} (0,1 grammi / ml)..... **1** su 3 seminate
- diluizione 10^{-2} (0,01 grammi / ml)..... **0** su 3 seminate

Confrontando sulla tabella dell'MPN, ai numeri **2-1-0** corrispondono 1,5 germi per grammo o ml di materiale.

In realtà, il calcolo fatto col metodo MPN è soggetto a una variabilità di risultati. Con il 95% di probabilità quel materiale conteneva da un minimo di 0,4 ad un massimo di 4,4 microrganismi per grammo o ml.

La formula che si applica nella lettura delle tabelle MPN di Mc Crady è la seguente:

$$C_s = (N \times F \times V_s) / V$$

dove:

C_s = concentrazione più probabile del germe in grammi o ml

N = valore letto sulla tabella MPN

F = inverso della diluizione della prima serie di provette presa in considerazione

V = diluizione base dalla tabella MPN (=1)

V_s = quantità di riferimento del campione (1 grammo o 1 ml)

*Riferimenti
bibliografici*

- 1) Ahmed N.M. *e Coll.*, Evaluation of various media for recovery of thermally-injured *Escherichia coli* O157:H7, *J. Food Protect.* 1995, 58, 357-360
- 2) Aksoy A. *e Coll.*, Verotoxin production in strains of *Escherichia coli* isolated from cattle and sheep, and their resistance to antibiotics, *Turk. J. Vet. and Animal Sci.* 2007, 31, 225-231
- 3) Anderson J.M. *e Coll.*, A rapid and direct plate method for enumerating *Escherichia coli* biotype I in food, *J. appl. Bact.* 1975, 39, 111-117
- 4) Ansuini A. *e Coll.*, *Escherichia coli*: patogenicità ed esperienze di vaccinazione, *Sel. Vet.* 1991, 32, 1211-1216
- 5) Ansuini A. *e Coll.*, Caratterizzazione di ceppi di *Escherichia coli* isolati da suini con diarrea o malattia degli edemi in allevamenti della pianura padana, *Sel. Vet.* 1994, 35, 1-7
- 6) Arun O. *e Coll.*, Recovery of *Escherichia coli* O157 from hamburger: evaluation and comparison of direct plating and immunomagnetic separation (IMS) in combination with various enrichment procedures, *Arch. Lebens.* 2002, 53, 121-144
- 7) Australian Capital Territory, Ministry of Health, Microbiological Quality of Cheese, Report 2002
- 8) Baumgartner A. *e Coll.*, Detection of verotoxin-producing *Escherichia coli* in minced beef and raw hamburgers: comparison of polymerase chain reaction (PCR) and immunomagnetic beads, *Arch. Lebens.* 1995, 46, 125-148
- 9) Bayyari G.R. *e Coll.*, Immune and physiological responses of turkeys with green-liver osteomyelitis complex, *Poultry Sci.* 1997, 76, 280-288
- 10) Bennett A.R. *e Coll.*, Evaluation of methods for the isolation and detection of *Escherichia coli* O157 in minced beef, *Letters in Appl. Micr.* 1995, 20, 375-379
- 11) Bettelheim K.A. *e Coll.*, The use of the coagglutination test to determine whether Australian and New-Zealand isolates of *E. coli* produce heat-labile enterotoxin, *Zbl. Bakt. Hyg. A*, 1985, 260, 293
- 12) Bettelheim K.A. *e Coll.*, New method of serotyping *Escherichia coli*: implementation and verification, *J. Clin. Microbiol.* 1987, 25, 781-786
- 13) Bisicchia R. *e Coll.*, Toxin production and haemoagglutination in strains of *Escherichia coli* from diarrhoea in Brescia, Italy, *J. Hyg. Camb.* 1985, 95, 353-361
- 14) Blanco J. *e Coll.*, *Escherichia coli* enterotoxigenicos, necrotoxigenicos y verotoxigenicos de origen humano y bovino, Facultad de Veterinaria, Universidade de Santiago de Compostela, 1993
- 15) Blanco J. *e Coll.*, *Escherichia coli* enterotoxigenicos, necrotoxigenicos y verotoxigenicos de origen humano y bovino. Servicio publicaciones diputacion Provincial Lugo, Lugo (Galicia), 1993

- 16) Blanco J.E. *e Coll.*, O serogroups, biotypes, and *eae* genes in *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy rabbits, *J. Clin. Microbiol.* 1996, *34*, 3101-3107
- 17) Blanco J.E. *e Coll.*, O serogroups and *eae* genes in *Escherichia coli* strains isolated from diarrheic and healthy rabbits, *J. Clin. Microbiol.* 1996, *34*, 3101-3107
- 18) Blanco J.E. *e Coll.*, Prevalence and characterisation of *Escherichia coli* with *eae* gene in diarrhoeic rabbits, *Microb. Immunol.* 1997, *48*, 77-82
- 19) Blanco J.E. *e Coll.*, Production of toxins (enterotoxins, verotoxins, and necrotoxins) and colicins by *Escherichia coli* strains isolated from septicemic and healthy chickens: relationship with in vivo pathogenicity, *J. Clin. Microbiol.* 1997, *35*, 2953-2957
- 20) Blanco J.E. *e Coll.*, Serotypes of *Escherichia coli* isolated from septicemic chickens in Galicia (northwest Spain), *Vet. Microbiol.* 1998, *61*, 229-235
- 21) Blood R.M. *e Coll.*, Media for “total” *Enterobacteriaceae*, coliforms and *Escherichia coli*, *Int. J. Food Microbiol.* 1995, *26*, 93-115
- 22) Borie C.F. *e Coll.*, Detection and characterisation of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* in slaughtered cattle, *J. Vet. Med.* 1997, *44*, 273-279
- 23) Bredie W.P.L. *e Coll.*, Evaluation of the MPN, Anderson Baird-Parker, Petrifilm *E. coli* and Fluorocult ECD method for enumeration of *E. coli* in foods of animal origin, *Int. J. Food Protect.* 1992, *16*, 197-208
- 24) Broes A., Les *Escherichia coli* pathogènes du chien et du chat, *Ann. Med. Vet.* 1993, *137*, 377-384
- 25) Buehler H.J. *e Coll.*, Bacterial glucuronidase, *Fed. Proc.* 1949, *8*, 189
- 26) Bull A.L. *e Coll.*, Australian Communicable Disease Intelligence Rev. 2002, *26*
- 27) Bulling E., Biochemical differentiation of *Enterobacteriaceae*, *Berl. Munch. Tier. Wschr.* 1965, *78*, 61
- 28) Bulow P., The ONPG test in the diagnostic bacteriology, *Acta Path. Microbiol. Scand.* 1964, *60*, 376
- 29) Bülte M., Enterohämorrhagische *E. coli* - Stämme (EHEC). Aktuell in der Bundesrepublik Deutschland ?, *Fleischwirtsch.* 1995, *75*, 1430-1432
- 30) Calicchia M. *e Coll.*, Direct enumeration of *Escherichia coli* O157:H7 from Petrifilm® EC count plates using the Petrifilm® test kit – HEC – without sample pre-enrichment, *J. Food Protect.* 1994, *57*, 859-864
- 31) Camguilhelm R. *e Coll.*, Biotypes and O serogroups of *Escherichia coli* involved in intestinal infections of weaned rabbits: clues to diagnosis of pathogenic strains, *J. Clin. Microbiol.* 1989, *27*, 743-747
- 32) Cantoni C. *e Coll.*, Validità del terreno PMK (Monensin Agar) per il conteggio dei Gram-negativi negli alimenti, *Ind. Alim.* 1987, *26*, 886
- 33) Caprioli A. *e Coll.*, Partial purification and characterisation of an *Escherichia coli* toxic factor that induces morphological cell alterations, *Inf. Immun.* 1983, *39*, 1300-1306
- 34) Caprioli A. *e Coll.*, Characterisation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* isolated from pigs and cattle in Northern Italy, *Vet. Rec.* 1993, *133*, 323-324

- 35) Caprioli A., Epidemiologia delle infezioni da *E. coli* produttori di verocitotossina (VTEC) in Italia. Attività del Laboratorio. Sanità Pubblica: scenari di sinergie medico-veterinarie. Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza alimentare, Istituto Superiore di Sanità, Roma, 8 novembre 2008
- 36) Carney E. *e Coll.*, Prevalence and level of *E. coli* O157 on beef trimmings, carcasses and boned head meat at a beef slaughter, *Food Micr.* 2006, 23, 52-59
- 37) Carrol P.J. *e Coll.*, Detection of LT and Sta toxins by latex and EIA tests, *Vet. Rec.* 1980, 127, 335
- 38) Caruso G. *e Coll.*, Use of the indirect immunofluorescence for detection and enumeration of *Escherichia coli* in seawater samples, *Letters in Appl. Micr.* 2000, 31, 274-278
- 39) Caserio G. *e Coll.*, Presence of *Escherichia coli* O157:H7 in foods, *Ind Alim.* 2001, 40, 27-28
- 40) Chart H. *e Coll.*, Evaluation of a reversed passive latex agglutination test for the detection of verocytotoxin (VT) expressed by strains of VT-producing *Escherichia coli*, *Letters in Appl. Mic.* 2001, 32, 370-374
- 41) Chart H. *e Coll.*, Human infections with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 - 10 years of *E. coli* O157 serodiagnosis, *J. Med. Microbiol.* 2008, 57, 1389-1393
- 42) Cherry W.B. *e Coll.*, Fluorescent-antibody technique in diagnostic bacteriology, *Bacteriol. Rev.* 1965, 29, 222-250
- 43) Conedera G. *e Coll.*, Atypical strains of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 on beef cattle at slaughter in Veneto region, Italy, *J. Vet. Med.* 1997, 44, 301-306
- 44) Costin R., Beta-galactosidase test, *Zbl. Bakt.* 1966, 200, 49
- 45) Cruickshank R., *Medical Microbiology*, Livingstone ed., New York, 1965
- 46) Damaré J.M. *e Coll.*, Simplified direct plating method for enhanced recovery of *E. coli* in foods, *J. Food Sci.* 1985, 50, 1736-1737
- 47) D'Aubert S. *e Coll.*, Ricerca di *E. coli* O157:H7 in alimenti di origine animale, *Arch. Vet. It.* 1995, 46, 67
- 48) Dean A.G. *e Coll.*, Tests for *E. coli* enterotoxin using infant mice: application in a study of diarrhea in children in Honolulu, *J. Inf. Dis.* 1972, 125, 407-411
- 49) De Mol P. *e Coll.*, A competitive immunosorbent assay for the detection of heat-stable enterotoxin of *E. coli*, *J. Med. Microbiol.* 1985, 20, 69
- 50) Dho M. *e Coll.*, *Escherichia coli* colonization of the trachea in poultry: comparison of virulent and avirulent strains in gnotoxenic chickens, *Avian Dis.* 1982, 26, 787-797
- 51) Dho M. *e Coll.*, Adhesive properties and iron uptake ability in *Escherichia coli* lethal and nonlethal for chicks, *Avian Dis.* 1984, 28, 1016-1025
- 52) Dho-Moulin M., Les *Escherichia coli* patogene des volailles, *Ann. Med. Vet.* 1993, 137, 353-357
- 53) Dho-Moulin M. *e Coll.*, Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC), *Vet. Res.* 1999, 30, 299-316

- 54) Dogan-Halkman H. *e Coll.*, Relationship among fecal coliforms and *Escherichia coli* in various foods, *Eur. Food Res. Technol.* 2003, *216*, 331-334
- 55) Drigalski V. *e Coll.*, *Z. Hyg. Infektionskrank.* 1902, *39*, 298
- 56) Duguid D.P. *e Coll.*, The fimbrial and non-fimbrial haemoagglutinins of *Escherichia coli*, *J. Med. Microbiol.* 1979, *12*, 213-227
- 57) Duncan S.E. *e Coll.*, Relevance of *Escherichia coli* O157:H7 in the dairy industry, *Dairy, Food and Environm. Sanitation* 1994, *14*, 656-660
- 58) Dziva F. *e Coll.*, Colibacillosis in poultry: unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts, *Avian Pathol.* 2008, *37*, 355-366
- 59) Edmiston A.L. *e Coll.*, A rapid microbiological method for enumerating *Escherichia coli* from boiler chicken carcasses, *J. Food Protect.* 1998, *61*, 1355-1377
- 60) Endo S., Über eine Verfahren zum Nachweis der Typhus bazillen, *Zbl. Bakt. Orig. I. Abt.* 1904, *35*, 109-110
- 61) Erdmann J.J. *e Coll.*, A new technique for *Escherichia coli* testing of beef and pork carcasses, *J. Food Protect.* 2002, *65*, 192-195
- 62) Erickson J.P. *e Coll.*, An assessment of *Escherichia coli* O157:H7 contamination risks in commercial mayonnaise from pasteurized eggs and environmental sources, and behaviour in low-pH dressing, *J. Food Protect.* 1995, *58*, 1059-1064
- 63) Evans D.G. *e Coll.*, Identification of enterotoxigenic *Escherichia coli* and serum antitoxic activity by the vascular permeability factor assay, *Infect. Immun.* 1973, *8*, 731-735
- 64) Fairbrother J.M., Les colibacilloses du porc, *Ann. Med. Vet.* 1993, *137*, 369-375
- 65) Faith N.G. *e Coll.*, Viability of *Escherichia coli* O157:H7 in pepperoni during the manufacture of sticks and the subsequent storage of slices at 21,4 and -20 °C under air, vacuum and CO₂, *Int. J. Food Microbiol.* 1997, *37*, 47-54
- 66) Farina C. *e Coll.*, Antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* O157 and other enterohaemorrhagic *Escherichia coli* isolated in Italy. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 1996, *15*, 351-353
- 67) FDA, Food and Drug Administration, USA, 2006, *fda.gov*
- 68) Feng P. *e Coll.*, Fluorogenic assays for immediate confirmation of *E. coli*, *Appl. Environm. Micr.* 1982, *43*, 1320-1329
- 69) Fiorina S. *e Coll.*, Ricerca di *E. coli* O157:H7 e relativi fagi negli ambienti di lavorazione e negli alimenti, *Ind. Alim.* 1997, *36*, 474
- 70) Finkelstein R. *e Coll.*, Rapid test for identification of heat-labile enterotoxin producing *Escherichia coli* colonies, *J. Clin. Microbiol.* 1983, *18*, 23
- 71) Frampton E.W. *e Coll.*, Evaluation of the beta-glucuronidase substrate 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-beta-D- glucuronide (X-gluc) in a 24 hour direct plating method for *E. coli*, *J. Food Protect.* 1988, *51*, 402
- 72) Franke S. *e Coll.*, Construction of recombinant Shiga-like toxin-Iiv (SLT-Iiv) and its use in monitoring the SLTIIv antibody status in pigs. *Vet. Microbiol.* 1995, *43*, 41-52.

- 73) Fujisawa T. *e Coll.*, Modification of sorbitol Mac Conkey medium containing cefixime and tellurite for isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from radish sprouts, *Appl. Environm. Microbiol.* 2000, *66*, 3117-3118
- 74) Gagliotti C. *e Coll.*, Resistance to fluoroquinolones and treatment failure/short – term relapse of community-acquired urinary tract infections caused by *Escherichia coli*, *J. Inf.* 2008, *57*, 179-184
- 75) Garcia G.R. *e Coll.*, Comparison of a rapid plate count and MPN methods for enumeration of fecal coliforms and *Escherichia coli* in soft-shell clams, *J. Food Protect.* 1995, *58*, 1197-1200
- 76) Giannella R.A. *e Coll.*, Suckling-mouse model for detection of heat stabile *E. coli* enterotoxin: characteristic of the model, *Inf. Immun.* 1976, *14*, 95-99
- 77) Gill C.O. *e Coll.*, Use of total *Escherichia coli* counts to assess the hygienic characteristics of a beef carcass dressing process, *Int. J. Food Micr.* 1966, *31*, 181-196
- 78) Godsey J.H. *e Coll.*, *J. Clin. Microbiol.* 1981, *13*, 483
- 79) Goodman R.E. *e Coll.*, Il test della Beta-galattosidasi nella fermentazione lenta del lattosio delle enterobatteriacee (trad.), *J. Bact.* 1966, *2*, 318
- 80) Gross R.J. *e Coll.*, Serotyping of *Escherichia coli*, The virulence of *Escherichia coli*, Society of General Microbiology, USA, pp. 345-363, 1985
- 81) Guenzi S., Strumenti, reagenti e kit per il laboratorio biologico e biotecnologico, Morgan ed. tecniche, Milano, 2001
- 82) Hall L.P., A new direct plate method for enumeration of *E. coli* in frozen foods, *J. appl. Bact.* 1984, *56*, 227
- 83) Hahn G., Fluoreszenzoptischer Nachweis von *E. coli* aus Weichkäse, *Milchwissensch.* 1987, *42*, 434-438
- 84) Hahn G. *e Coll.*, Zur differenzierung aus Weichkäse isolierter coliformer keime nach Anzüchtung bei 30°C und 44,5°C, *Arch. Lebens.* 1986, *37*, 1-28
- 85) Hall L.P., A direct plate count method for detecting *E. coli* in frozen food by detecting indole in colonies, *Food Microbiol.* 1985, *2*, 31-37
- 86) Harry, E.G., The survival of *Escherichia coli* in the dust of poultry house, *Vet. Rec.* 1964, *77*, 466-470
- 87) Harry E.G. *e Coll.*, The association between the presence of septicaemia strains of *Escherichia coli* in the respiratory and intestinal tracts of chickens and the occurrence of coli septicaemia, *Vet Rec.* 1965, *77*, 35-40
- 88) Heckötter S. *e Coll.*, Detection of *E. coli* serogroup O157 in foods by immunomagnetic separation (IMS), *Arch. Lebens.* 1997, *48*, 73-96
- 89) Heizmann W. *e Coll.*, Rapid identification of *Escherichia coli* by fluorocult media and positive indole reaction, *J. Clin. Microbiol.* 1988, *26*, 2682-2684
- 90) Heuvelink A.E. *e Coll.*, Evaluation of media and test kits for the detection and isolation of *Escherichia coli* O157 from minced beef, *J. Food Protect.* 1997, *60*, 817-824
- 91) Heuvelink A.E. *e Coll.*, Occurrence of *Escherichia coli* O157 and other Verocytotoxin-

- producing *E. coli* in retail raw meats in the Netherlands, J. Food Protect. 1997, 59, 1267-1272
- 92) Hochberg A.M. *e Coll.*, Sensitivity and specificity of the test kit BAX® for screening *E. coli* O157:H7 in ground beef: independent laboratory study, J. AOAC Int. 2000, 83, 1349
 - 93) Holt-Harris J.E. *e Coll.*, A new culture medium for the isolation of *Bacillus typhosa* from stools, J. Inf. Dis. 1916, 18, 596-600
 - 94) Honda T. *e Coll.*, Modified Elek test for detection of heat-labile enterotoxin of enterotoxigenic *Escherichia coli*, J. Clin. Microbiol. 1981, 13, 1-5
 - 95) Honda T. *e Coll.*, Further evaluation of the Biken test (modified Elek test) for detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* producing heat-labile enterotoxin and application of the test to sampling of heat-stable enterotoxin, J. Clin. Microbiol. 1982, 16, 60-62
 - 96) Huff G.R. *e Coll.*, Turkey osteomyelitis complex, Poultry Sci. 2000, 79, 1050-1056
 - 97) Huff G. *e Coll.*, Stress-induced colibacillosis and turkey osteomyelitis complex in turkeys selected for increased body weight, Poultry Sci. 2006, 85, 266-272
 - 98) Jerse A.E. *e Coll.*, A genetic locus of enteropathogenic *E. coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells, Proc. Ntl. Acad. Sci. USA 1990, 87, 7839-7843
 - 99) Johnson J. *e Coll.*, Methods used for the detection and recovery of *Escherichia coli* O157:H7 associated with a food-borne disease outbreak, J. Food Protect. 1995, 58, 597-603
 - 100) Kaeckenbeeck A., Le diagnostic des souches pathogènes d' *Escherichia coli*: petites et grandes histoires, Ann. Med. Vet. 1993, 137, 337-340
 - 101) Kalscheuer R. *e Coll.*, Microdiesel: *Escherichia coli* engineered for fuel production, Microbiology 2006, 152, 2529-2536
 - 102) Karch H. *e Coll.*, Clonal structure and pathogenicity of Shiga-like toxin producing, sorbitol fermenting *Escherichia coli* O157:H-. J. Clin Microbiol. 1993, 31, 1201-1205
 - 103) Kerr M. *e Coll.*, Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in bottled natural mineral water, J. Appl. Micr. 1999, 87, 833-841
 - 104) Kilian M. *e Coll.*, Rapid diagnosis of *Enterobacteriaceae*, Acta Path. Micr. Scand. 1976, 84, 245-251
 - 105) Klein H. *e Coll.*, Identification and quantification of fecal coliforms using Violet Red Bile Agar at elevated temperature, J. Milk Food Technol. 1976, 39, 768-770
 - 106) Knight M.T. *e Coll.*, Gram-negative identification card for identification of *Salmonella*, *E. coli* and other *Enterobacteriaceae* isolated from foods: a collaborative study, J. AOAC 1990, 73, 729
 - 107) Krnjaic D. *e Coll.*, Investigation on sensitivity and resistance to antibiotics and chemotherapeutics in *Escherichia coli* strains isolated from animals bred in intensive farming conditions, Acta Vet. (Beograd) 2005, 55, 501-509
 - 108) Ike K. *e Coll.*, Serum resistance and aerobactin iron uptake in avian *Escherichia coli* mediated by conjugative 100-megadalton plasmid, J. Vet. Med. Sci. 1992, 54, 1091-1098

- 109) ITAVARM, *Report sul monitoraggio dell'antibiotico-resistenza in medicina veterinaria in Italia*, IZS Lazio/Toscana, 2003
- 110) Jenkins C. *e Coll.*, Verocytotoxin producing *Escherichia coli* (VTEC) other than serogroup O157 from Scottish cattle, *Vet. Rec.* 2002, *151*, 58-60
- 111) Lansbury L.E. *e Coll.*, *Escherichia coli* O157: lesson from the past 15 years, *J. Infect.* 1997, *34*, 189
- 112) Lapage S., Beta-galactosidase and lactose fermentation, *J. Clin. Path.* 1964, *17*, 2
- 113) Lee Young J. *e Coll.*, Antibiotic resistance pattern of *E. coli* and *Salmonella* spp. isolated from chicken feces, *Korean J. Vet. Res.* 2005, *45*, 75-83
- 114) Leifson E., New culture media based on sodium desoxycholate for the isolation of intestinal pathogens and for the enumeration of colon bacilli in milk and water, *J. Pathol. Bacteriol.* 1935, *40*, 581-599
- 115) Le Jeune J.T. *e Coll.*, Methods for the isolation of water-borne *Escherichia coli* O157, *Letters in Appl. Micr.* 2001, *32*, 316-320
- 116) Le Minor L., Beta-galactosidase test, *Ann. Inst. Past.* 1962, *102*, 268
- 117) Levine M.M., Differentiation of *E. coli* and *B. aerogenes* on a simplified Eosin Methylene Blue Agar, *J. Inf. Dis.* 1918, *23*, 43
- 118) Lin Z. *e Coll.*, Detection of various variant verotoxin genes in *Escherichia coli* by polymerase chain reaction. *Microbiol. Immunol.* 1993, *37*, 543-548
- 119) Lloyd D.H., Reservoirs of antimicrobial resistance in pet animals, *Clin. Inf. Dis.* 2007, *45*, 148-152
- 120) MacConkey A., Lactose-fermenting bacteria in faeces, *J. Hyg.* 1905, *5*, 333-378
- 121) MacConkey A., Bile salt media and their advantage in some bacteriological examinations, *J. Hyg.* 1908, *8*, 322-334
- 122) Mainil J., Les colibacilloses dans l'espèce bovine, *Ann. Med. Vet.* 1993, *137*, 343-350
- 123) Manafi M. *e Coll.*, A combined chromogenic-fluorogenic medium for the simultaneous detection of total coliforms and *E. coli* in water, *Zbl. Hyg.* 1989, *189*, 225-234
- 124) Manafi M. *e Coll.*, A new plate medium for rapid presumptive identification and differentiation of *Enterobacteriaceae*, *Int. J. Food Micr.* 1991, *14*, 127-134
- 125) Manafi M., Fluorogenic and chromogenic enzyme substrates in culture media and identification kits, *J. Food Micr.* 1996, *31*, 45-58
- 126) Marc D. *e Coll.*, Colonization ability and pathogenic properties of a fim-mutant of an avian strain of *Escherichia coli*, *Research in Microbiology* 1998, *149*, 473-485
- 127) Martin D.R. *e Coll.*, Testing of bob calf fecal swabs for the presence of *Escherichia coli* O157:H7, *J. Food Protect.* 1994, *57*, 70-72
- 128) Matushek M.G. *e Coll.*, Comparison of various plating procedures for the detection and enumeration of coliforms in ice cream and ice milk, *J. Food Protect.* 1992, *55*, 113-115
- 129) Mayrhofer S. *e Coll.*, Antimicrobial resistance in commensal *Escherichia coli* isolated from muscle foods as related to the veterinary use of antimicrobial agents in food producing animals in Austria, *Microbial Drug Resistance* 2006, *12*, 278-283

- 130) Mazuyer M.A. *e Coll.*, Evaluation of CPS ID2 medium for detection of urinary tract bacterial isolates in specimens from a rehabilitation center, *J. Clin. Microbiol.* 1995, 33, 1025-1027
- 131) Mazzolini E. *e Coll.*, Prevalenza di *marker* genetici di virulenza in ceppi di *Escherichia coli* isolate da conigli, Giornate Coniglicoltura ASIC, 2005
- 132) Mc Carty J. *e Coll.*, An improved Direct Plate Method for the enumeration of stressed *Escherichia coli* O157:H7 from food, *J. Food Protect.* 1998, 61, 1093-1097
- 133) Meldrum R.J. *e Coll.*, Microbiological quality of ready-to-eat food served in schools in Wales, U.K., *J. Food Protect.* 2009, 72, 197-201
- 134) Mercanoglu B. *e Coll.*, Prevalence of *Escherichia coli* O157:H7 in various foods in Turkey: a study of the use of the IMS technique, *Arch. Lebens.* 2006, 57, 76-79
- 135) Mills K.W. *e Coll.*, Monoclonal antibody enzyme-linked immunosorbent assay for identification of K99 positive *E. coli* isolates from calves, *J. Clin. Microbiol.* 1984, 19, 498
- 136) Mioni R. *e Coll.*, Confronto tra terreni selettivi e differenziali. Determinazione contemporanea in piastra di *Escherichia coli* e coliformi in alimenti di origine animale, *Ind. Alim.* 1997, 36, 1014
- 137) Mi Sun Kim *e Coll.*, Dipstick immunoassay to detect enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in retail ground beef, *Appl. Environm. Microbiol.* 1992, 58, 1764-1767
- 138) Moberg L. *e Coll.*, Fluorogenic assay for rapid detection of *E. coli* in chilled and frozen foods: collaborative study, *J. AOAC* 1988, 71, 589
- 139) Morgan D. *e Coll.*, Verotoxin producing *Escherichia coli* O157 infections associated with the consumption of yogurth, *Epidemiol. Infect.* 1993, 111, 181-187
- 140) Mossel D.A.A. *e Coll.*, The examination of food for *Enterobacteriaceae* using a test of the type generally adopted for the detection of salmonellae, *J. appl. Bact.* 1963, 26, 444-452
- 141) Mossel D.A.A. *e Coll.*, A simplified procedure for the examination of drinking water for bacteria of public health significance: the differential hydrobacteriogramme, *Zbl. Bakt. Orig.* 1977, 165, 498
- 142) Mossel D.A.A. *e Coll.*, Influence of carbon source, bile salts and incubation temperature on recovery of *Enterobacteriaceae* from foods using Mac Conkey-type agars, *J. Food Protect.* 1979, 42, 470-475
- 143) Mossel D.A.A. *e Coll.*, The enumeration of thermotrophic types amongst the *Enterobacteriaceae* colonizing perishable foods, *J. appl. Bact.* 1986, 60, 289-295
- 144) Mosso C. *e Coll.*, Modifica alla metodica per la ricerca ed enumerazione di coliformi totali ed *E. coli* negli alimenti, *Ind. Alim.* 1991, 30, 989
- 145) Nigrelli A.D. *e Coll.*, Rilievi epidemiologici sulle infezioni da *Escherichia coli* negli animali domestici in Italia, *Atti Giornate di Studio sulle Infezioni da E. coli negli animali*, Scuola per la Ricerca Scientifica, Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche, Brescia, 16 giugno 1983
- 146) Nigrelli A.D. *e Coll.*, Caratteristiche di ceppi di *E. coli* associati ad enterotossiemie post-svezzamento nella specie suina, *Giorn. Mal. Inf. Parass.* 1983, 35, 808-811

- 147) Nigrelli A.D. *e Coll.*, Sulle possibilità di prevenzione e di trattamenti immunizzanti nelle infezioni da *Escherichia coli* nel suinetto prima e dopo lo svezzamento, *Sel. Vet.* 1983, 24, 383-411
- 148) Nigrelli A.D. *e Coll.*, Infezioni da *E. coli* nel vitello. Rilievi epidemiologici in Lombardia ed Emilia, *Atti SISVET* 1984, 38, 692-694
- 149) Oblinger J.L. *e Coll.*, Microflora recovered from foods on Violet Red Bile Agar with and without glucose and incubated at different temperatures, *J. Food Protect.* 1982, 45, 948
- 150) Okerman L. *e Coll.*, Biotypes of enteropathogenic *Escherichia coli* strains from rabbits, *J. Clin. Microbiol.* 1985, 22, 955-958
- 151) Okrend A. *e Coll.*, An improved screening method for the detection and isolation of *E. coli* O157:H7 from meat, incorporating the 3M Petrifilm® test kit – HEC – for hemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7, *J. Food Protect.* 1990, 53, 936-940
- 152) Okrend A. *e Coll.*, Isolation of *E. coli* O157:H7 using O157 specific antibody coated magnetic beads, *J. Food Protect.* 1992, 55, 214
- 153) O'Meara D. *e Coll.*, Colorimetric detection of heat-labile toxin-encoding gene of enterotoxigenic *Escherichia coli* by PCR, *J. Clin. Microbiol.* 1995, 33, 1957-1960
- 154) Orskov I. *e Coll.*, K antigens: K88ab (L) and K88ac (L) in *E. coli*, *Acta Path. Micr. Scand.* 1964, 62, 439-447
- 155) Orskov I. *e Coll.*, Serology, chemistry and genetics of O and K antigens of *Escherichia coli*, *Bact. Rev.* 1977, 41, 667-710
- 156) Orskov I. *e Coll.*, Special O:K:H serotypes among enterotoxigenic *E. coli* strains from diarrhea in adults and children, *Med. Microbiol. Immunol.* 1977, 163, 99
- 157) Ottaviani F., Tecnica analitica innovativa per la ricerca di *E. coli* negli alimenti, *Ind. Alim.* 1989, 28, 806
- 158) Parreira V.R. *e Coll.*, Cytotoxin produced by *Escherichia coli* isolated from chickens with swollen head syndrome (SHS), *Vet. Microbiol.* 1998, 62, 111-119
- 159) Parreira V.R. *e Coll.*, Shiga toxin genes in avian *Escherichia coli*, *Vet. Microbiol.* 2002, 87, 341-352
- 160) Peeters J.E., Les *Escherichia coli* entéropathogènes (EPEC) du lapin, *Ann. Med. Vet.* 1993, 137, 361-368
- 161) Perry J.D. *e Coll.*, The application of chromogenic media in clinical microbiology, *J Appl. Micr.* 2007, 103, 2046-2055
- 162) Petzel J.P. *e Coll.*, Monensin-based medium for determination of total Gram-negative bacteria and *Escherichia coli*, *Appl. Environm. Microbiol.* 1985, 49, 925-933
- 163) Picault J.P. *e Coll.*, Isolation of a TRTV-like virus from chickens with swollen-head syndrome. *Vet Rec.* 1987, 121, 135
- 164) Pitout J., Extended-spectrum Beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae*: an emerging public-health concern, *Lancet* 2008, 8, 159-166
- 165) Poelma P.L. *e Coll.*, Rapid fluorogenic enumeration of *Escherichia coli* in selected naturally contaminated high moisture foods, *J. AOAC* 1987, 70, 991

- 166) Pohl P., Les souches pathogènes d' *Escherichia coli*, histoire et classification, Ann. Med. Vet. 1993, 137, 325-333
- 167) Pourbakhsh S.A. *e Coll.*, Localisation of the in vivo expression of P and F1 fimbriae in chickens experimentally inoculated with pathogenic *Escherichia coli*, Microbial Pathogenesis 1997, 22, 331-341
- 168) Pozzi W. *e Coll.*, Überleben und Nachweis von enterohämorrhagischen *Escherichia coli* in streichfähiger Rohwurst, Fleischwirtsch. 1996, 76, 1300-1311
- 169) Prevorsek M. *e Coll.*, Rapid presumptive identification of enterics with reagent impregnated paper strips, Am. J. Med. Techn. 1968, 34, 271
- 170) Rayman M.K. *e Coll.*, The Anderson-Baird-Parker direct plating method versus the MPN procedure for enumerating *E. coli* in meats, Can. J. Microb. 1981, 27, 147
- 171) Read S.C. *e Coll.*, Prevalence of verocytotoxigenic *Escherichia coli* in ground beef, pork and chicken in southwestern Ontario, Epidemiol. Infect. 1990, 105, 11-20
- 172) Reinhold A., Vergleichende Untersuchungen zur biochemischen Differenzierung von *Enterobacteriaceae* unter Verwendung von Patho-Tec Teststreifen, Wissensch. Zeitschr. 1975, 24, 303
- 173) Restaino L. *e Coll.*, A chromogenic plating medium for isolating *Escherichia coli* O157:H7 from beef, Letters in Appl. Micr. 1999, 29, 26-30
- 174) Rice E.W. *e Coll.*, Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in water from coliform enrichment cultures, Letters in Appl. Micr. 1996, 23, 179-182
- 175) Richards G.P., Comparative studies for the enumeration of total and fecal coliforms in the eastern oysters *Crassostrea*, Appl. Environm. Micr. 1978, 36, 975
- 176) Rocelle M. *e Coll.*, Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in broth and processed salami as influenced by pH, water activity and temperature and suitability of media for its recovery, Appl. Environm. Micr. 1996, 62, 2735-2740
- 177) Romick T.L. *e Coll.*, Evaluation of a visual DNA probe for enterotoxigenic *E. coli* detection in foods and wastewater by colony hybridisation, J. Food Protect. 1989, 52, 466-470
- 178) Ronnberg B. *e Coll.*, Rapid detection by coagglutination test of heat-labile enterotoxin in cell lysates from blood agar-grown *Escherichia coli*, J. Clin. Microbiol. 1983, 17, 1021-1025
- 179) Rudensky B. *e Coll.*, Improved detection of heat-labile enterotoxin of enterotoxigenic *Escherichia coli* by using a commercial coagglutination test, J. Clin. Microbiol. 1988, 26, 2231
- 180) Russmann H. *e Coll.*, Genotyping of Shiga-like toxin genes in non-O157 *Escherichia coli* strains associated with haemolytic uraemic syndrome. J. Med. Microbiol. 1995, 42, 404-410
- 181) Saenz Y. *e Coll.*, Mechanisms of resistance in multiple-antibiotic-resistant *Escherichia coli* strains of human, animal, and food origin, Antimicrob. Agents and Chemotherapy 2004, 48, 3996-4001
- 182) Sagoo S.K. *e Coll.*, The microbiological examination of ready-to-eat vegetables from retail establishment, Public Health Service (Report), London, 2001

- 183) Salecki O. *e Coll.*, Can the high level of human verotoxinogenic *E. coli* O157 infections in rural areas of the NE Scotland be explained by consumption of contaminated meat ?, *J. appl. Micr.* 2007, 103, 2616-2621
- 184) Sandys G.H., A new method of preventing swarming of *Proteus spp.* with a description of a new medium suitable for use in routine laboratory practice, *J. Med. Lab. Technol.* 1960, 17, 224
- 185) Schazberg G. *e Coll.*, Enteroaggregative *Escherichia coli* serotype O126:H27, Israel, *Emerging Inf. Dis.* 2003, 9, 1170-1173
- 186) Schmidt-Lorenz W. *e Coll.*, Kritische Untersuchungen zum Aussagewert von *E. coli*, Coliformen und Enterobacteriaceae in Lebensmitteln, *Arch. Lebens.* 1988, 39, 1
- 187) Scotland S.M. *e Coll.*, Evaluation of a reversed passive latex agglutination test for detection of *Escherichia coli* heat-labile toxin in culture supernatants, *J. Clin. Microbiol.* 1989, 27, 339-340
- 188) Scotland S.M. *e Coll.*, Beta-glucuronidase activity of Vero-cytotoxin-producing strains of *E. coli*, including serogroup O157, isolated in the United Kingdom, *Letters in Appl. Micr.* 1991, 13, 42-44
- 189) Sears C. *e Coll.*, Enteric bacterial toxins mechanisms of action and linkage to intestinal secretion, *Microbiol. Rev.* 1996, 167, 215
- 190) Shaban L., Microbiological pollution of milk by environment as an indicator of its contamination rate, *J. Environm. Protect. Ecol.* 2003, 4, 401-405
- 191) Singh D. *e Coll.*, Evaluation of a rapid detection method for *Escherichia coli* in foods using fluorogenic assay, *Food Microbiol.* 1986, 3, 373-377
- 192) Sivapalasingam S. *e Coll.*, Fresh produce: a growing cause of outbreaks of foodborne illness in the United States, 1973 through 1997, *J. Food Product.* 2004, 67, 2342-2353
- 193) Soncini G. *e Coll.*, Rapida metodica per l'isolamento di *E. coli* O157:H7 da prodotti carnei, *Arch. Vet. It.* 1988, 39, 203
- 194) Stiles M.L. *e Coll.*, Estimation of *E. coli* in raw ground beef, *Appl. Environm. Micr.* 1980, 40, 346
- 195) Stordeur P. *e Coll.*, Examination of *Escherichia coli* from poultry for selected adhesion genes important in disease caused by mammalian pathogenic *E. coli*, *Vet. Microbiol.* 2002, 82, 231-241
- 196) Stordeur P. *e Coll.*, Pathogenicity of pap-negative avian *Escherichia coli* isolated from septicaemic lesions, *Microbes and Infection* 2004, 6, 637-645
- 197) Takács J. *e Coll.*, Comparative study for coliform-count on solid and fluid media, *Arch. Lebens.* 1979, 30, 41
- 198) Thoms B., Nachweis von verotoxinenbildenden *Escherichia coli* in Rehfleisch, *Arch. Lebens.* 1999, 50, 49-72
- 199) Tison D.L., Culture confirmation of *Escherichia coli* serotype O157:H7 by direct immunofluorescence, *J. Clin. Microbiol.* 1990, 28, 612-613
- 200) Trepeta R. *e Coll.*, Methylumbrelliferil-beta-D- glucuronide based medium for rapid isolation and identification of *E. coli*, *J. Clin. Microbiol.* 1984, 19, 172-174

- 201) Truant A.L., Commercial methods in clinical microbiology, ASM, Washington, USA, 2002
- 202) Valenti M. *e Coll.*, Ricerca dei coliformi nelle carni col sistema Malthus, Ind. Alim. 1989, 28, 943
- 203) Vanderzant C., Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 3rd ed., APHA, New York, 1992
- 204) Vernozy-Rozand C. *e Coll.*, A shorter enrichment culture for the isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from raw minced beef, Rev. Med. Vet. 1997, 148, 879-882
- 205) Wallace J.S. *e Coll.*, The use of selective and differential agars in the isolation of *E. coli* O157 from dairy herds, J. appl. Bact. 1996, 81, 663-668
- 206) Weagant S.D. *e Coll.*, An improved rapid technique for isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from foods, J. Food Protect. 1995, 58, 7-12
- 207) Wilson J.B. *e Coll.*, Distribution and characteristic of verocytotoxigenic *Escherichia coli* isolated from Ontario dairy cattle, Epidemiol. Infect. 1992, 108, 423-439
- 208) Wilson A. *e Coll.*, Characterisation of strains of enteroaggregative *Escherichia coli* isolated during the infectious intestinal disease study in England, Europ. J. Epidemiol. 2001, 17, 1125-1130
- 209) Wray C., Ceppi di *E. coli* del Central Veterinary Laboratory di Weybridge (Inghilterra) per la preparazione dei sieri diagnostici O, *com. pers.*, 1979
- 210) Xiao Long H. *e Coll.*, Development of duplex PCR for detecting *Escherichia coli* O157:H7 in foods of animal origin, J. Vet. Sci. Technol. 2005, 35, 626-629
- 211) Yamagata Murayama S. *e Coll.*, The use of mice in the Sereny test as a virulence assay of Shigellae and enteroinvasive *Escherichia coli*, Inf. Immunity 1986, 51, 696-698
- 212) Wellings H., Report, Australia 2005, au.todaytonight.com
- 213) Zago M. *e Coll.*, Characterisation of *E. coli* isolates from raw milk cheese, Ann. Micr. 2007, 57, 49-59
- 214) Zavarella M. *e Coll.*, Prove biochimiche rapide su piastra per l'identificazione delle salmonelle, Selezione Veterinaria 1974, 15, 470-473
- 215) Zhao T. *e Coll.*, Fate of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 in commercial mayonnaise, J. Food Protect. 1994, 57, 780-783



Finito di stampare da

Tipografia Camuna S.p.A. - Breno (Bs)
Centro Stampa di Brescia
nel mese di giugno 2009

Informazione ecologica:

pubblicazione stampata con assenza di esalazioni alcoliche
Sistema Cesium® brevetto **Philip Borman Italia**

ISBN 978-88-902814-9-5



9 788890 281495