

*Breve comunicazione***E. COLI verotossici ed E. COLI 0157: H7
Osservazioni sulla diagnosi****M. Zavanella***Brescia*

Già nel 1993 Pohl (4) elencava tra le patologie da *coli* verotossici (VTEC) le seguenti forme: dissenteria nei bovini (da sierotipi O 5-26-111-112); probabile malattia degli edemi nei suini (da sierotipi O 138 - 139 -141); diarrea nel gatto (da sierotipi O 2-6); infezione intestinale nell'uomo (da sierotipi O 26-157). Quest'ultima malattia (1) dopo 3 - 4 giorni d'incubazione compare soprattutto nei bambini in età prescolare e negli anziani, con sintomi variabili da modesta diarrea acquosa a grave colite emorragica, capaci di evolvere dopo 5 - 10 giorni in una sindrome emolitico-uremica con insufficienza renale e complicanze neurologiche.

Si formano anticorpi dopo 6 - 7 giorni dai primi sintomi e l'eliminazione può durare per 2 mesi. La trasmissione del microrganismo avviene attraverso cibi crudi e nel 10% dei casi per contagio interpersonale. Dei vari *coli* verotossici citati, nessuno ha raggiunto la notorietà del sierotipo O157 : H7, ottenuta attraverso un'intensa produzione di lavori statistici e di ricerche su nuovi metodi d'indagine.

Nonostante l'impegno profuso dai Ricercatori, non è stato finora approntato un metodo diagnostico che riveli direttamente la presenza delle verotossine nelle feci o negli alimenti, indipendentemente dai sierotipi di *coli*, anche se alcune tecniche innovative sono allo studio (5).

Per il momento la diagnosi di laboratorio dell'infezione nell'uomo è ristretta all'isolamento dell' *E. coli* O157 : H7, con svariati metodi qualitativi ed un solo metodo quantitativo introdotto da Mc Carty e Coll. (2).

Considerando quest'ultimo metodo più significativo degli altri, si è ritenuto utile modificarlo, per cercare di estendere il suo campo d'azione ai *coli* verotossici in genere, come sotto spiegato in dettaglio.

- Si preparano sterilizzate in autoclave a 121 °C per 15' delle membrane per filtrazione da 0.2

mmicron in polietersulfone della misura interna di una piastra Petri. Per ogni esame si predispongono le membrane sulla superficie asciutta di quattro piastre contenenti terreno Trypticase Soy Agar (TSA)

- Da un omogenato 1 : 10 del campione in soluzione di Ringer si seminano due piastre a 0.5 ml e due piastre a 0.1 ml, distribuendo l'inoculo sull'intera superficie delle membrane con una spatola sterile
- Dopo incubazione delle piastre capovolte per 4 h a 37 °C (allo scopo di rivitalizzare le cellule batteriche stressate), con una pinza sterile si trasferiscono le membrane su quattro piastre asciutte di Sorbitol-Mac Conkey-Agar, che vengono incubate capovolte per 18 -24 h a 37 °C
- Le colonie prodotte da *coli* sorbitolo-negativi (tra cui il sierotipo O157: H7) si presentano gialle, rotonde, lisce, a margine netto, del diametro di 2-3 mm, mentre quelle formate da ceppi sorbitolo-positivi sono rosse e di diametro maggiore. Il conteggio (espresso come UFC per grammo o ml di campione) avviene facendo la somma delle colonie gialle sulle due piastre seminate con 0.5 ml (oppure la media delle colonie sulle due piastre seminate con 0.1 ml) e moltiplicando il risultato, rispettivamente, per 10 o per 100 . Le diluizioni consigliate sono il più delle volte sufficienti per l'analisi di routine degli alimenti e consentono di contare da 1 a 30 colonie (pari a 10 - 3000 UFC per grammo o ml di campione)
- Si allestiscono da alcune colonie gialle dei trapianti su Kligler, che vengono incubati a 37 °C per 18-24 h
Nell'evenienza di piastre con elevato numero di colonie rosse o quando esiste un sospetto fondato, è raccomandabile estendere il trapianto anche ad alcune colonie rosse

- Si selezionano i ceppi isolati mediante prove biochimiche per *Enterobacteriaceae*
- Si saggiano i ceppi risultati *E. coli* con anticorpi agglutinanti *O157:H7*
- Uno o più ceppi biochimicamente identificati come *E. coli* (ma non necessariamente positivi all'agglutinazione con anticorpi *O157:H7*) vengono esaminati per la capacità a produrre verotossine in vitro con un test su cellule VERO oppure con micrometodi appositamente predisposti
- Il controllo di qualità si allestisce seminando due piastre di TSA + membrana con 0.1 ml ciascuna di latte contaminato artificialmente (inoculo contenente 100 UFC / ml di *E. coli O157:H7* ed *E. coli sorbitolo+* in rapporto 1 : 1) e procedendo come sopra.

Un tipo di test su cellule VERO collegabile alla metodica sopra esposta è descritto da Palumbo e Coll. (3) come segue :

- Dai Kligler selezionati si trapianta in brodo BHI, da incubare a 37 °C per 24 h e quindi centrifugare a 3000 rpm per 10'. Il soprastante viene passato su filtro-siringa da 0.2 mmicron e il filtrato usato per il test (con eventuale congelamento in caso di analisi non immediata)
- In una piastra Microtiter da 96 pozzetti vengono dispensati 100 mcl di cellule VERO per pozzetto alla concentrazione di $10^5 - 10^6$ / ml, con successiva incubazione a 37 °C per 18-24 h (+5% di CO₂)
- I campioni vengono seminati a 100 mcl nella prima colonna di ciascuna fila e diluiti al raddoppio mediante passaggi da sinistra verso destra con una micropipetta

- Dopo 72 h a 37 °C (+ 5% CO₂), la piastra viene letta per l'effetto citopatico e si considera positivo il campione che lisa almeno il 50% delle cellule. Il titolo della tossina è pari al reciproco della più alta diluizione che dà effetto citopatico

Se in certi Paesi (USA, Inghilterra, Giappone) l'argomento *E. coli O 157 : H7* può essere giustamente considerato d'attualità a causa dei grossi focolai registrati, da noi la questione (che si presenta sotto un profilo epidemiologico attenuato, probabilmente grazie alle diverse abitudini alimentari) andrebbe un po' ridimensionata.

Bibliografia

1. Lansbury L. E. e Coll., *Escherichia coli O 157 : Lessons from the Past 15 Years*. J. Infect. 34, 189 - 193, 1997
2. Mc Carty J. e Coll., *An Improved Direct Plate Method for the Enumeration of Stressed Escherichia coli O 157 : H7 from Food*. J. Food Protect. 61, 1093 - 1097, 1998
3. Palumbo S.A. e Coll., *Minimum and Maximum Temperature for Growth and Verotoxin Production by Hemorrhagic Strains Escherichia coli*, J. Food Protect. 58, 352 - 356, 1995
4. Pohl P., *Les souches pathogènes d' Escherichia coli, histoire et classification*, Ann. Med. Vet. 137, 325 - 333, 1993
5. Thoms B., *Nachweis von verotoxinbildenden Escherichia coli in Rehfleisch*. Arch. Lebens. 50, 49 - 72, 1999