



# UNIVERSITÀ DI PARMA

Dipartimento di Scienze Medico-Veterinarie  
Corso di Laurea Magistrale a Ciclo Unico in Medicina Veterinaria

## **IL RUOLO DELLE CARNI BOVINE NELLA TOSSINFEZIONE DA ESCHERICHIA COLI PRODUTTORI DI SHIGA-TOSSINE**

## **ROLE OF BOVINE MEAT IN SHIGA TOXIN-PRODUCING ESCHERICHIA COLI FOODBORNE DISEASE**

**Relatore:**

Chiar.ma Prof.ssa Silvia Bonardi

**Tesi di Laurea di:**

Giada Cavazza

ANNO ACCADEMICO 2021 – 2022

# Indice

Abstract .....	3
Introduzione .....	4
1. Il genere <i>Escherichia</i> .....	6
1.1. Patotipi .....	8
2. <i>Escherichia coli</i> produttori di Shiga-tossine (STEC) .....	14
2.1. Le Shiga-tossine (Stx) .....	16
2.2. <i>Escherichia coli</i> O157:H7 e non-O157.....	17
2.3. Fattori di patogenicità.....	19
3. I reservoir animali: il bovino .....	22
4. Contaminazione da STEC nelle carni bovine .....	26
4.1. Focolai da STEC .....	30
5. Patogenesi e aspetti clinici .....	32
5.1. Infezioni Intestinali .....	32
5.2. Patogenesi.....	33
5.3. Sintomi clinici dell'infezione da STEC.....	35
5.4. Complicanze dell'infezione da STEC .....	36
5.5. Diagnosi.....	37
6. La zoonosi da STEC in Europa .....	39
6.1. La zoonosi da STEC in Italia .....	44
7. Prevenzione .....	46
7.1. Norme vigenti .....	46
7.2. Prevenzione in allevamento .....	52
7.3. Prevenzione in macello .....	56
7.4. Prevenzione per il confezionamento .....	65
7.5. Prevenzione per il consumatore.....	65
8. Conclusioni .....	67
Bibliografia.....	68
Sitografia .....	78



## Abstract

*Escherichia coli* è un batterio Gram negativo appartenente alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*. Si tratta di un commensale dell'apparato gastroenterico degli animali a sangue caldo e dell'uomo. Alla specie appartengono in maggior parte ceppi non patogeni che convivono in mutuo beneficio con la microflora intestinale. Esistono, tuttavia, stipiti che sono in grado di causare nell'uomo patologie anche molto gravi in seguito all'ingestione di alimenti o acqua contaminati, le cui complicazioni più severe sono riferibili a diarrea emorragica e possibile sviluppo di sindrome emolitico uremica. La suddetta tesi si pone l'obiettivo di revisionare la letteratura esistente in merito al ruolo delle carni bovine nella tossinfezione da *E. coli* produttore di Shiga tossine (STEC). Il bovino, infatti, rappresenta il reservoir principale degli STEC e lo alberga in modo del tutto asintomatico, ad eccezione di sporadici episodi diarroici osservabili nel vitello. L'infezione umana avviene in gran parte per l'ingestione del microrganismo a seguito dell'assunzione di alimenti contaminati, in particolare carni bovine, ma anche latte, carni di altre specie, acqua e ortaggi contaminati da materiale di origine fecale. Non essendo in vigore alcun piano di controllo degli STEC a livello di produzione primaria nel nostro paese, si rende necessario applicare rigorose misure igieniche che riducano la contaminazione fecale delle carcasse in sede di macellazione e nelle successive fasi di lavorazione.

*Escherichia coli* (*E. coli*) is a Gram-negative bacterium, belonging to the *Enterobacteriaceae* family. It is a commensal microorganism commonly found in the lower intestine of warm-blooded animals and humans. Several *E. coli* strains are harmless, and they are normally part of the microbiota of the gut. However, other strains are responsible for serious food- or water-borne diseases in their hosts, which may be complicated by bloody-diarrhoea or haemolytic uremic syndrome (HUS). This degree thesis aims to revise the existing literature on Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) foodborne disease. In fact, bovines represent the main asymptomatic STEC reservoirs, with the exception of sporadic diarrheal episodes in calves. Infection in humans mostly occurs by ingestion of food contaminated by the microorganism, in particular bovine meat, milk, meat from other animal species, water and vegetables contaminated by bovine faecal matter. No plan is actually in force in Italy to control STEC in the different phases of bovine meat production, thus strict hygiene measures are needed in order to reduce faecal contamination of carcasses during slaughtering operations and the following processing steps.

## Introduzione

*Escherichia coli* è un batterio Gram negativo appartenente alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* (Jang et al., 2017), e rappresenta il commensale prevalente del tratto gastroenterico dell'uomo e degli animali a sangue caldo (Kaper et al., 2004). È identificato mediante test biochimici e la tipizzazione avviene con prove sierologiche nei confronti dei due principali antigeni di superficie O e H (Cheng et al., 2016). Nel corso degli anni sono emersi cloni patogeni di *E. coli* che hanno acquisito virulenza e capacità di causare disturbi intestinali ed extra-intestinali anche gravi, tra i quali sono compresi gli Shiga toxin– producing *E. coli* (STEC) (Croxen et al., 2013).

Gli STEC sono in grado di colonizzare l'intestino di una vasta gamma di animali, i quali per la maggior parte rimangono asintomatici e possono rappresentare una fonte importante di contaminazione per l'uomo (Newell and La Ragione, 2017). Il bovino rappresenta in assoluto il reservoir principale di STEC (Riley, 2022; Denamur et al., 2021) e il microrganismo può persistere in allevamento anche per anni divenendo fonte di contaminazione per l'uomo tramite gli alimenti di origine bovina (Wasteson, 2001). Il presente elaborato di tesi ha trattato, in particolare, il ruolo delle carni bovine nella tossinfezione umana da STEC ed i metodi di prevenzione che, a vari livelli, possono essere applicati.

L'infezione umana di origine alimentare ha inizio con l'ingestione di STEC da alimenti contaminati (Caprioli et al., 2005). I sintomi clinici principali riguardano nausea, forti crampi addominali e febbre di entità modesta (La Placa, 2005). I pazienti, nei giorni successivi all'inizio della sintomatologia, possono manifestare colite emorragica, per la quale O157:H7 è ritenuto il sierotipo maggiormente responsabile (Croxen et al., 2013). In ogni caso, l'infezione da STEC nell'uomo si manifesta con quadri clinici variabili da blandi sintomi intestinali a diarrea emorragica; inoltre, nel 10% dei pazienti possono verificarsi severe complicanze come la sindrome emolitico uremica (SEU), in particolare nei bambini in età prescolare e negli anziani (Croxen et al., 2013; OMS, 2008).

Nello studio di tale tossinfezione sono da tenere in considerazione diversi aspetti, quali le fonti di contaminazione da STEC, i punti critici riscontrabili negli allevamenti e nei macelli di bovini e la normativa vigente a tutela della salute pubblica. Ad oggi la prevenzione delle infezioni zoonotiche conseguenti al consumo degli alimenti è fortemente connessa ad un efficiente monitoraggio dei patogeni nelle specie serbatoio ed i metodi di indagine epidemiologica sono

in costante evoluzione. Per quanto riguarda gli STEC, sarebbe opportuno stilare protocolli atti a rilevare il patogeno negli animali reservoir, nell'ambiente e negli alimenti a maggior rischio (Newel and La Ragione, 2017). Tuttavia, dato che ad oggi in Italia non è in vigore alcun piano di controllo mirato a STEC né a livello di produzione primaria, né nelle successive fasi di produzione e lavorazione delle carni, sono più che mai necessarie rigorose misure igieniche per la riduzione della contaminazione in allevamento, in macello, nelle fasi di lavorazione e confezionamento delle carni, oltre ad una corretta informazione nei confronti del consumatore finale.

## 1. Il genere *Escherichia*

*Escherichia coli* è un microrganismo di forma bastoncellare, Gram negativo, appartenente alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* (Jang et al., 2017), della quale fa parte il genere *Escherichia*; è aerobio o anaerobio facoltativo, asporigeno (Tenaillon et al., 2010) e mobile per la presenza di ciglia (Croxen et al., 2013).

Convenzionalmente *E. coli* viene identificato mediante test biochimici e la tipizzazione avviene con le prove sierologiche nei confronti dei due principali antigeni di superficie: i lipopolisaccaridi (antigeni O) e le proteine flagellari (antigeni H) (Cheng et al., 2016).

In particolare, come viene riportato dall'enciclopedia Treccani sotto la voce "*Escherichia*", sono state proposte delle classificazioni basate sulla distribuzione degli antigeni O, H, K, F, grazie alle quali si sono individuati oltre 170 tipi sierologici riconducibili agli antigeni somatici di natura lipopolisaccaridica (antigeni O), più di 90 sierotipi legati agli antigeni capsulari (antigeni K), antigeni flagellari (H), delle fimbrie (antigeni F) e numerosi altri ancora, tutti significativi dal punto di vista della differenziazione. Sono poi stati individuati anche sierotipi patogeni, dei quali verrà discusso in seguito. Sono, inoltre, state condotte diverse ricerche riguardanti la sequenza genomica di *E. coli* e questo ha permesso di aprire le porte a studi multidisciplinari in campo microbiologico, clinico, genetico, immunologico, farmacologico ed anche industriale (piante e animali transgenici).

Per scopi epidemiologici, microbiologici, patogenetici e filogenetici, i microrganismi biochimicamente identificati come *E. coli* devono essere differenziati in sottotipi. Kauffmann, nel 1947, è il primo a proporre uno schema di tipizzazione sierologica basato sulle catene collaterali somatiche o polisaccaridiche (antigeni O), sugli antigeni capsulari (K) e sulle proteine flagellari (H). Ad oggi sono riconosciuti circa duecento differenti antigeni O di *Escherichia coli* e cinquantatre antigeni H; i sierogruppi (basati sugli antigeni O) e i sierotipi (basati sulle combinazioni tra O e H) sono utilizzati per descrivere eventuali focolai e condurre una sorveglianza relativa ai disturbi enterici. Un esempio di *E. coli* associato a colite emorragica e sindrome uremico – emolitica è O157:H7 (Riley L. W., 2022).

Nell'uomo e negli animali sangue caldo, *Escherichia coli* è il commensale prevalente del tratto gastrointestinale, che viene colonizzato già poche ore dopo la nascita; l'essere umano ospite e il microrganismo convivono in mutuo beneficio, senza che il batterio determini la comparsa di malattia clinica (Kaper et al., 2004), ma anzi svolgendo importanti ruoli nel processo

digestivo e nell'assimilazione di sostanze nutritive. Nell'uomo, *E. coli* ha una prevalenza superiore del 90%, con una concentrazione di  $10^7$ - $10^9$  unità formanti colonia per grammo di feci (Denamur et al., 2021). Descritto per la prima volta nel 1885 dal batteriologo tedesco Theodore Escherich e definito *Batterio coli comune*, questo microrganismo venne isolato dalle feci di un bambino sano e fino al 1950 venne considerato un normale coabitante non patogeno del tratto enterico di animali e uomo (Wasteson, 2002). Il principale bersaglio del commensale *E. coli* è rappresentato dallo strato mucoso del colon dei mammiferi. Questo batterio, infatti, è un ottimo competitore a livello del sito in questione ed è anche il più abbondante anaerobio facoltativo presente nella microflora intestinale. Nonostante l'abbondanza di letteratura sull'argomento, ed in particolare sulla genetica e sulla fisiologia del microrganismo, nei primi anni duemila non era ancora stato descritto il meccanismo tramite il quale *E. coli* instaura la stretta simbiosi con il grosso intestino. Un'interessante ipotesi in merito suggerisce l'utilizzo, da parte del batterio, del gluconato presente nel colon, in modo più efficiente rispetto alle altre specie residenti, riuscendo, quindi, ad occupare una nicchia metabolica altamente specifica (Kaper et al., 2004).

*E. coli*, potendo ritrovarsi nell'acqua e nei sedimenti, viene utilizzato come indicatore fecale dell'inquinamento delle acque. Uno studio, inoltre, ha dimostrato come questo reservoir ambientale permetta la crescita di alcuni ceppi batterici, in particolare quelli con capacità saprofiti, ovvero di utilizzare come nutrimento le sostanze in decomposizione (Croxen et al., 2013).

*E. coli* possiede, inoltre, alcune caratteristiche che hanno permesso, nel corso degli anni, di utilizzarlo come importante organismo ospite in tecniche biotecnologiche avanzate e per diverse applicazioni riguardanti l'area medica; si tratta, infatti, del microrganismo più utilizzato nel campo della tecnologia del DNA ricombinante (Yoo et al., 2009). Le peculiarità di cui sopra riguardano, in particolare, la facilità di manipolazione, la disponibilità della sequenza completa del suo genoma e la capacità di crescere in condizioni sia aerobie che anaerobie (Riley, 2022). I metodi ad oggi utilizzati per la classificazione microbica sono stati sviluppati per propositi relativi alla necessità di prendere decisioni cliniche e di salute pubblica, per le quali risulta fondamentale studiare le caratteristiche epidemiologiche e patogenetiche dei microrganismi ai quali ci si trova di fronte. In molti setting clinici, gli step utilizzati per l'identificazione di *E. coli* includono la selezione delle colonie cresciute su opportuni terreni di coltura, come ad esempio piastre MacConkey agar, l'esecuzione di test biochimici, come quello della



fermentazione del lattosio e della produzione di indolo dal triptofano, seguiti poi da una batteria di ulteriori test, spesso inclusi in kit miniaturizzati o sistemi automatizzati (Riley, 2022).

## 1.1. Patotipi

Nonostante *Escherichia coli* possa essere un innocuo commensale del tratto gastroenterico, si sono selezionati, nel corso degli anni, cloni patogeni, che hanno acquisito virulenza e capacità di causare diarrea e disturbi extra-intestinali anche gravi. Le varianti patogene del batterio sono diffuse in tutto il mondo; esse possono causare un ampio range di malattie, da quelle gastrointestinali (la diarrea da *E. coli*, in particolare, è responsabile di un'alta mortalità, soprattutto in bambini al di sotto dei cinque anni di età, soprattutto nell'Africa sub-sahariana e nel sud dell'Asia) a patologie extra-intestinali, come ad esempio a carico del tratto urinario (*E. coli* uropatogeni), setticemie o malattie del sistema nervoso centrale (Croxen et al., 2013). Gli episodi diarroici da *E. coli* sono, quindi, di grande interesse per la salute pubblica a livello mondiale (Gomes, 2016).

Schematicamente, i gruppi di *E. coli* che causano diarrea sono spesso descritti come *intestinal pathogenic E. coli* (IPEC), mentre quelli che provocano infezioni fuori dall'intestino sono definiti *extraintestinal pathogenic E. coli* (ExPEC). I primi causano principalmente malattie diarroiche, ma alcuni ceppi sono coinvolti anche nella cosiddetta sindrome emolitico-uremica (SEU); i secondi, invece, sono spesso agenti di infezioni del tratto urinario, del sangue, di sepsi e meningite neonatale. Tuttavia, mentre gli IPEC possono facilmente essere distinti dagli *E. coli* commensali grazie ai loro caratteristici fattori di virulenza, associati alle manifestazioni cliniche, gli ExPEC non sono sempre così facili da identificare e differenziare (Riley, 2022).

Gli *Escherichia coli* patogeni sono classificati in patotipi (che a loro volta comprendono ulteriori varianti) e vengono comunemente definiti tramite acronimi. La classificazione, tuttavia, è stata più volte aggiornata e non ne è presente una univoca, in quanto è possibile basarsi su differenti criteri, come: il target d'organo (es: UPEC, uropathogenic *E. coli*), l'ospite infettato (es: APEC, avian pathogenic *E. coli*), l'associazione organo-ospite (es: NMEC, newborn meningitis *E. coli*, che vede correlati il liquido cerebrospinale e il neonato), la correlazione tra organo infettato e rappresentazione di specifici geni o virulenza (es: ExPEC, extra-intestinal pathogenic *E. coli*), la patologia causata (es: diarrea per InPEC, intestinal pathogenic *E. coli*), la

presenza di determinati geni (da soli o combinati) come per *E. coli* produttori di Shiga tossine (STEC), o specifici fenotipi in vivo ad esempio adesione e invasione di cellule epiteliali (AIEC) (Denamur et al., 2021).

In definitiva, sono presenti cloni di *E. coli* che hanno acquisito specifiche caratteristiche di virulenza, che conferiscono loro la capacità di adattarsi a nuove nicchie e li rendono in grado di causare un ampio spettro di patologie. I fattori di virulenza sono codificati da geni che si combinano in modi differenti all'interno del genoma batterico, a volte creando nuove sequenze che poi vengono tramandate tra le generazioni. Alcuni elementi genetici, ad esempio, che precedentemente erano considerati *mobili*, ad oggi sono divenuti componenti fissi del genoma, evidentemente perché funzionali alle funzioni, anche patogene, del batterio. Queste modificazioni hanno fatto sì che, nel corso degli anni, si distinguessero specifici patotipi di *E. coli*, capaci di dare malattia in individui sani (Kaper et al., 2004).

Croxenet al. (2013) in una loro pubblicazione descrivono aspetti relativi ai patotipi maggiormente coinvolti in malattie gastrointestinali e pertanto definiti "*E. coli* diarrogeni": si tratta di enteropathogenic *E. coli* (EPEC); Shiga toxin – producing *E. coli* (STEC), ad esempio enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC); *Shigella* / enteroinvasive *E. coli* (EIEC); enteroaggregative *E. coli* (EAEC); diffusely adherent *E. coli* (DAEC); enterotoxigenic *E. coli* (ETEC). A questi si aggiunge il patotipo recentemente scoperto all'epoca e definito adherent invasive *E. coli* (AIEC).

Le macroaree in cui si suddividono i sintomi che possono risultare dall'infezione di uno di questi patotipi sono, come riportano Kaper et al. (2004): disturbi enterici / diarroici, infezioni del tratto urinario (UTIs), che, causate da *E. coli* uropatogeni (UPEC), rappresentano le infezioni extra-intestinali più comuni causate dal batterio, e sepsi / meningite (MNEC). A proposito dei patogeni intestinali, erano già state descritte da Nataro e Kaper (1998), più di vent'anni fa, sei gruppi patogentici:

- *E. coli* enteropatogeni (EPEC)
- *E. coli* entero-emorragici (EHEC)
- *E. coli* entero-tossigeni (ETEC)
- *E. coli* entero-aggregativi (EAEC)
- *E. coli* entero-invasivi (EIEC)
- *E. coli* diffusamente aderenti (DAEC)

*Escherichia coli* enteropatogeno (EPEC) è il primo patotipo ad essere stato descritto. Nel 1945, un focolaio di diarrea infantile nel Regno Unito ha permesso di identificare nei bambini colpiti un ceppo di *E. coli* sierologicamente differente da quelli presenti negli individui sani; anche se, ad oggi, questo ceppo è in gran parte scomparso nei paesi industrializzati, rimane una delle cause principali di diarrea infantile in quelli in via di sviluppo. Lo studio riporta che, mentre per anni è rimasto sconosciuto il meccanismo tramite il quale questa variante patogena causasse la malattia, ad oggi si tratta di quella più studiata e capita tra tutte le varianti patologiche del microrganismo. A questo ceppo è associata una lesione intestinale piuttosto specifica: il meccanismo è noto come “attaching and effacing” (A/E; attacco ed eliminazione) ed il batterio aderisce saldamente alle cellule intestinali causandone cambiamenti citoscheletrici importanti e portando alla distruzione dei microvilli. La manifestazione clinica (diarrea infantile) è probabilmente il risultato di meccanismi multipli messi in atto dal batterio: secrezione attiva (alcune varianti, infatti, producono l’enterotossina EspC), l’aumento della permeabilità della parete intestinale, l’infiammazione dell’intestino e la perdita di superficie assorbente risultante dalla distruzione dei microvilli. (Kaper et al., 2004)

*Escherichia coli* enteropatogeno resta il primo microrganismo associato a diarrea nei lattanti, e può provocare simultaneamente, a volte, anche vomito e febbre (Farfán-García et al., 2016). *Escherichia coli* entero-emorragico (EHEC) causa nell’uomo quadri clinici di diversa gravità, quali diarrea non complicata, colite emorragica, fino alla sindrome emolitico-uremica (SEU); la chiave della virulenza di questo patotipo è rappresentata dalla produzione delle Shiga tossine (Stx), anche conosciute come verocitotossine (VT), e dalla capacità di provocare le lesioni A/E tipiche del patotipo EPEC (Kaper et al., 2004). Gli EHEC sono considerati un sottoinsieme dei cosiddetti STEC (*Escherichia coli* produttori di Stx), originariamente descritti per la loro associazione con la colite emorragica (haemorrhagic colitis; HC), clinicamente distinta dalla shigellosi (Croxen et al., 2013).

*Escherichia coli* enterotossigeno (ETEC) è il maggior responsabile della cosiddetta “diarrea del viaggiatore” ed è endemico nei paesi sottosviluppati, nei quali può essere isolato da portatori sintomatici o asintomatici, con una significativa mortalità nei bambini al di sotto dei cinque anni di età (Qadri et al., 2005). Questo patotipo è in grado di produrre sia enterotossine termolabili che termostabili e può utilizzare diversi fattori di colonizzazione (CFs) per aderire all’epitelio intestinale (Croxen et al., 2013). La manifestazione clinica dell’infezione da *E. coli* enterotossigeno nell’uomo è una diarrea acquosa, che può assumere caratteristiche diverse

in termini di gravità, da lieve a molto severa. Le forme più gravi si osservano nei bambini di età inferiore ai due anni. ETEC colonizza la superficie mucosale del piccolo intestino ed elabora enterotossine che danno origine alla secrezione intestinale: La colonizzazione mucosale avviene grazie ad uno o più CFs proteici fimbriali o fibrillari identificati da sigle quali: CFA (antigeni del fattore di colonizzazione), CS (antigeni di superficie) e PCF (fattore di colonizzazione presunto), seguiti da numeri. Questo patotipo di *E. coli* causa diarrea anche negli animali, soprattutto nel suino, con elevate mortalità e morbilità nei neonati e nei suinetti post-svezzamento (Kaper et al., 2004).

*Escherichia coli* enteroaggregativo (EAEC) è responsabile di diarrea acuta o cronica; l'infezione può essere co-responsabile di ridotta crescita nei bambini, soprattutto nei paesi meno sviluppati. Fin dalle sue prime descrizioni viene considerato un patotipo non in grado di produrre le stesse enterotossine proprie di ETEC, ma capace di aderire alle cellule epiteliali HEp-2 mediante un fenotipo aggregativo (AA), (Boisen et al, 2020). Si tratta del patotipo maggiormente identificato nei campioni di feci diarroiche, grazie alla sua capacità di causare diarrea persistente nei bambini in aree endemiche, diarrea persistente nei pazienti immunodepressi affetti da HIV ed è uno degli agenti patogeni responsabili della diarrea del viaggiatore (Croxen et al., 2013).

Il pattern aggregativo mediante il quale EAEC aderisce alle cellule HEp-2 fa sì che i batteri si posizionino uno sull'altro in una configurazione definita "*a mattoni impilati*". La strategia di infezione sembra comprendere la colonizzazione della mucosa intestinale, principalmente del colon, seguita dalla secrezione di enterotossine, con la conseguenza di un significativo danno mucosale (Kaper et al., 2004).

EAEC di sierogruppo O42 è stato il prototipo dei vari studi condotti sui fattori di virulenza e la patogenicità di EAEC nell'uomo; si è, tuttavia, rilevata un'estrema variabilità di geni codificanti per le numerose adesine, tossine e proteine associate alla virulenza dei vari ceppi (Croxen et al., 2013). Anche il sito di infezione, ovvero il tratto gastrointestinale, non è uniforme: in uno studio (Hicks et al., 1996) mirato a cinque differenti EAEC isolati da bambini, si è rilevata una differente affinità dei vari ceppi ai tratti intestinali, quali digiuno, ileo e colon. Nonostante queste differenze, è emerso uno schema riguardante la patogenesi delle infezioni da EAEC: 1) aderenza alla mucosa intestinale; 2) produzione di enterotossine e citotossine; 3) infiammazione della mucosa intestinale (Estrada-Garcia and Navarro-Garcia, 2012).

Escherichia coli entero-invasivo (EIEC) è un batterio biochimicamente, geneticamente e patologicamente molto vicino a *Shigella* spp. e molti studi hanno dimostrato che i due microrganismi sono difficilmente distinguibili a livello di specie, nonostante sia stata mantenuta una distinzione a livello di nomenclatura, dovuta al significato clinico di *Shigella* spp. I due microrganismi presentano meccanismi patogenetici molto simili con diverse fasi in comune, quali: penetrazione delle cellule epiteliali, lisi dei vacuoli, moltiplicazione endocellulare, movimento attraverso il citoplasma ed estensione del danno alle cellule epiteliali adiacenti (Kaper et al., 2004). *Shigella* spp. ed EIEC sono i responsabili della dissenteria bacillare (o shigellosi), caratterizzata nell'uomo dall'invasione e infiammazione, con successiva distruzione, dell'epitelio del colon (Belotserkovsky and Sansonetti, 2018).

*Shigella* spp., inizialmente conosciuta come *Bacillus dysenteriae*, è un microrganismo non mobile e inabile nella fermentazione del lattosio, che viene descritto primariamente da Kiyoshi Shiga nel 1897, durante un'epidemia in Giappone che infettò più di 91.000 persone causando una mortalità del 20%. EIEC, invece, fu scoperto una cinquantina di anni più tardi, mostrando le stesse caratteristiche biochimiche, genetiche e patogenetiche di *Shigella* (Croxen et al., 2013).

EIEC può causare colite infiammatoria invasiva e, raramente, dissenteria, ma nella maggior parte dei casi è responsabile di diarrea acquosa, indistinguibile dalle infezioni da altri *E. coli* patogeni. Solo pochi test biochimici riescono a distinguere il batterio responsabile dell'infezione rispetto a *Shigella* (Kaper et al., 2004).

Escherichia coli diffusamente aderente (DAEC) viene descritto come un patotipo con pattern di adesione cellulare differente rispetto a quelli descritti in precedenza; in particolare, si assiste ad un'aderenza batterica diffusa su tutta la superficie delle cellule Hep-2 in coltura, diverso dai classici pattern di adesione localizzata o di adesione/eliminazione (Croxen et al., 2013). DAEC, in numerosi studi, viene rilevato come agente causale di diarrea nei bambini al di sopra dei dodici anni (Kaper et al., 2004).

A tutt'oggi, servirebbero ulteriori studi epidemiologici per meglio inquadrare l'importanza clinica di questo patotipo, ostacolati, tuttavia, dalla difficoltà di isolamento e caratterizzazione (Gomes et al., 2016).

Per quanto riguarda *Escherichia coli* aderente – invasivo (AIEC), si tratta di un ceppo che in diversi studi è stato associato a malattia infiammatoria dell'intestino (IBD); le proprietà di questo patotipo sono relative alla capacità di invadere le cellule dell'epitelio intestinale (IEC)

e di moltiplicarsi all'interno dei macrofagi, sfuggendo così al controllo del sistema immunitario. Si tratta di un batterio patogeno in quanto, nell'evoluzione adattativa del suo genoma all'interno di un ospite sensibile, promuove l'infiammazione dei tratti intestinali (Palmela et al., 2017). La massiva presenza di AIEC nelle feci persone sane tende a validare l'ipotesi secondo la quale questo batterio provoca sintomi clinici soltanto in soggetti sensibili (Perna et al., 2019).

Tra i patotipi responsabili di lesioni al di fuori del tratto intestinale (ExPEC), va sicuramente annoverato *Escherichia coli* uropatogeno (UPEC): si tratta di un gruppo che può causare infezioni del tratto urinario (UTIs) anche molto gravi, ed è il microrganismo che viene rilevato nella maggior parte di queste (Kot, 2019). Si ritiene che UPEC sia responsabile dell'80% delle UTIs non complicate e, pertanto, va considerato il batterio maggiormente implicato in problemi urinari nell'uomo (Kot, 2019; Subashchandrabose and Mobley, 2015). Tuttavia, è frequente il suo isolamento anche da patologie urinarie complicate (Kot, 2019). UPEC è un gruppo eterogeneo di *E. coli* che origina dall'intestino, e sembra che diversi animali da reddito ne possano fungere da reservoir, principalmente gli avicoli. L'infezione all'uomo potrebbe, pertanto, avvenire tramite questi ultimi ed il consumo delle loro carni, ma anche da altri prodotti da essi derivati, come le uova (Mellata et al., 2017).

Un altro patotipo importante è rappresentato da *Escherichia coli* responsabile di meningite e sepsi (MNEC): è l'agente causale della maggior parte delle meningiti neonatali da batteri Gram negativi con mortalità nel 15-40% dei casi e deficit neurologici permanenti nei sopravvissuti (Kaper et al., 2004; Kim, 2015). Si tratta di una problematica molto seria, in quanto diversi studi hanno dimostrato l'inefficacia degli antibiotici, utilizzati da soli, nel combattere questa forma di meningite, come osservato nel 2 al 21% dei bambini colpiti (Wang and Kim, 2013; Vissing et al., 2021).

## 2. *Escherichia coli* produttori di Shiga-tossine (STEC)

STEC rappresenta un gruppo di patogeni di origine alimentare distribuito in tutto il mondo, la cui principale caratteristica di virulenza è data dalla capacità di produrre una o più Shiga-tossine (Stx).

Gli STEC sono stati inizialmente denominati “*Escherichia coli* produttori di verocitotossine” (VTEC), perché le tossine prodotte hanno capacità citotossica nei confronti delle cellule Vero (Konowalchuk et al., 1977). Queste ultime sono cellule isolate per la prima volta nel 1962 dal rene di scimmia verde africana, le quali contengono una delezione del gene dell’interferone I e quindi non sono in grado di produrre interferone alpha o beta, essendo così molto suscettibili alle infezioni virali: per questo vengono utilizzate nelle colture cellulari per lo studio di moltissimi virus (Tatara, 2022), ma anche di batteri intracellulari, parassiti ed effetti di prodotti chimici e tossine (Ammerman et al., 2008).

Gli STEC risultano responsabili di una vasta gamma di infezioni, dalle più blande e inapparenti alle più pericolose per la vita dell’uomo, quali la colite emorragica e la sindrome emolitico-uremica (SEU) (Gomes, 2016).

La presenza di geni che codificano per le Stx deriva da un profago integrato nel cromosoma batterico (Denamur et al., 2021). Oltre ai geni codificanti le Stx, gli STEC possono albergare il cosiddetto Locus for Enterocyte Effacement (LEE) nel quale è compreso il gene *eae* per la sintesi della proteina intimina, un’isola di patogenicità (PAI) condivisa con gli EPEC, e possono essere portatori del gene dell’enteroemolisina *hlyA*, che determina la formazione di pori sulle membrane cellulari (Denamur et al., 2021).

LEE è presente in tutti i ceppi O157:H7 e anche nella maggior parte degli STEC non O157 e si tratta di una struttura suddivisa in tre regioni, ognuna delle quali ha una specifica funzione: nella prima regione, in particolare, troviamo il gene *eae*, codificante per l’intimina, e il gene *tir*, che a sua volta codifica per la proteina *translocated intimin receptor (Tyr)* (Elliot et al., 2002).

Esistono anche STEC LEE-negativi, e quindi privi del gene *eae*, ma dotati di altri sistemi di adesione alle cellule dell’epitelio intestinale (Newell and La Ragione, 2017). Una classificazione, attualmente superata, considerava gli stipiti che albergano il locus LEE come EHEC (*E. coli* entero-emorragici), distinti quindi dall’insieme degli STEC che sono, appunto, caratterizzati dalla capacità di produrre le tossine di Shiga. Oggi si tende a definire STEC tutti gli *E. coli* che sintetizzano le Stx, indipendentemente da altre caratteristiche di virulenza,

tenendo tra loro distinti gli STEC LEE-positivi (i vecchi EHEC) dagli STEC LEE-negativi (EFSA, 2020). Tutti gli STEC O157 possiedono il gene *eae* per la sintesi dell'intimina e sono LEE positivi (EFSA, 2007).

Le infezioni di origine alimentare sostenute dagli STEC rappresentano un grave problema, sia per la bassa dose infettante (in certi casi  $\leq 100$  microrganismi), sia per la severità delle manifestazioni cliniche, soprattutto nei bambini, nei soggetti immunocompromessi e negli anziani (Newell and La Ragione, 2017).

La classificazione sierologica di *E. coli* si basa sugli antigeni di superficie, in particolare permette una differenziazione tra sierogruppi (definiti dall'antigene somatico O, di cui sono noti 180 tipi differenti, come ad esempio O157 e O26) e sierotipi (definiti dalla combinazione tra antigene somatico O e antigene flagellare H, ad esempio O157:H7 oppure O26:H11) (EFSA, 2013).

Sono stati identificati cinque gruppi di STEC, i quali comprendono sierotipi differenti in base alla loro associazione con le patologie umane, alla capacità di dare origine a focolai o ad infezioni sporadiche, alla patologia causata (SEU o colite emorragica) e alla presenza di differenti fattori di virulenza. I gruppi individuati sono i seguenti:

- Sierotipi A: ne fanno parte tutti gli STEC O157, per la loro elevata incidenza, per la capacità di causare importanti focolai e, infine, per l'associazione con SEU.
- Sierotipi B: comprendono, ad esempio, O26:H11. Hanno una moderata incidenza, sono associati a SEU, ma causano meno comunemente focolai.
- Sierotipi C: includono stipiti appartenenti ai sierogruppi O91, O104, O113. Sono associati a SEU, ma hanno bassa incidenza e causano raramente focolai.
- Sierotipi D ed E: non sono associati a SEU, i ceppi che ne fanno parte sono difficilmente legati a patologie dell'uomo.

I gruppi A e B sono tutti LEE positivi, mentre il gruppo C può comprendere sierotipi LEE-negativi (EFSA, 2007).

Da un punto di vista zoonotico, STEC è in assoluto il microrganismo di maggior interesse, perché è in grado di causare nell'uomo malattie severe e presenta un numero elevato di serbatoi animali (Wasteson, 2001). Il bovino e altri ruminanti, quali pecore e capre, rappresentano il principale reservoir dei sierotipi di STEC frequentemente associati alle infezioni umani, soprattutto per quanto riguarda il sierotipo O157:H7 (Menge, 2020). Il



sierogruppo O157 è quello più frequentemente associato a patologie umane ed infatti il suo meccanismo patogenetico è stato a lungo studiato (EFSA, 2020).

I sierogruppi non-O157 più comuni in Europa sono O26, O103, O91, O146 e O145 (EFSA, 2020).

STEC O26:H11/H<sup>-</sup> ha grande diffusione nei paesi industrializzati e rappresenta un grave problema di salute pubblica, essendo spesso associato a casi di SEU (Denamur et al., 2021).

A causa della bassa dose infettante, della sopravvivenza nell'ambiente e nell'animale e del loro potenziale di crescita, gli STEC hanno un forte impatto sulla sicurezza alimentare e le misure preventive che possano limitarne la diffusione all'uomo assumono la massima importanza (Wasteson, 2001).

## 2.1. Le Shiga-tossine (Stx)

Le Shiga tossine (Stx) sono state così denominate dal microbiologo giapponese Kiyoshi Shiga, colui che identificò e caratterizzò *Shigella dysenteriae* nel 1897. Nel 1977 un altro gruppo di studiosi individuò citotossine prodotte da *E. coli*, inizialmente nominate verocitossine (VT) per la loro tossicità nei confronti delle cellule Vero. Solo all'inizio del 1980 O'Brien e altri riconobbero che tali isolati di *E. coli* producevano tossine molto simili a quelle di *S. dysenteriae*, definendoli di conseguenza batteri Shiga (-like) toxin-producing *E. coli* (STEC) (Liu et al., 2021).

Le Stx sono costituite da cinque subunità B, responsabili del legame tra olotossina e globotriaosilceramide, e da una subunità A il cui compito è quello di interferire e bloccare la sintesi proteica, agendo sui ribosomi (Kaper et al., 2004), in particolare rimuovendo una base di adenina dall'acido ribonucleico 28S della subunità ribosomiale 60S (EFSA, 2020). La subunità A, a sua volta, è suddivisa in un sito enzimatico (A1) e in uno di legame (A2) (Liu et al., 2021).

Esistono due varianti di Stx, Stx1 e Stx2, che hanno un'omologia tra loro di circa il 55% (Kaper et al., 2004). I geni che codificano per la produzione di queste Stx sono trasportati da batteriofagi integrati nel cromosoma degli STEC. Inizialmente erano riconosciuti tre tipi di Stx1 (Stx1a, Stx1c e Stx1d) e cinque di Stx2 (Stx2a – Stx2e), la cui nomenclatura è basata sul confronto tra le sequenze amminoacidiche (EFSA, 2020).- Ad oggi, sono state descritte altre varianti di Stx2, tutte distinguibili mediante PCR; inoltre sono stati rilevati fattori di virulenza associati, come la produzione di lesioni di attacco ed elisione (lesioni A/E) e la secrezione di emolisine plasmide-mediate (Wasteson, 2001). Di recente, le Stx2 sono state suddivise in

sottotipi da Stx2-a a Stx2-g; alcune di queste, come Stx2a, sono maggiormente responsabili dei casi di SEU (Denamur et al., 2021).

Una suddivisione ulteriore delle Stx, riporta che Stx2 comprenda ben undici sottotipi (da Stx2a a Stx2k); la stabilità proteica, la potenza della tossina, il recettore utilizzato, la gravità dei sintomi causati e i relativi serbatoi animali possono variare da un sottotipo. Stx2j e Stx2k, sono stati aggiunti recentemente alle varianti della Stx2 ma sono ancora al vaglio dei ricercatori (Liu et al., 2021).

I ceppi STEC sono spesso in grado di produrre più di una variante di Stx, in quanto è comune che possiedano diversi fagi Stx integrati nel cromosoma batterico. Questi fagi, inoltre, favoriscono la trasmissione orizzontale dei geni per la sintesi di Stx tra i diversi ceppi di *E. coli*, figurando, quindi, come importanti motori di evoluzione del patogeno con conseguenti problematiche a livello clinico: gli antisieri disponibili, infatti, sono solo parzialmente cross-protettivi nei confronti delle diverse varianti delle tossine (Menge, 2020).

Per quanto riguarda l'attitudine patogena delle diverse varianti, i ceppi STEC che producono Stx2a-2c-2d sono spesso associati a colite emorragica e SEU nelle infezioni umane, mentre gli STEC produttori di Stx2b-2e-2f-2g sono frequentemente causa di malattia negli animali, come cervi, suini, piccioni e bovini; Stx2e è considerata responsabile della malattia degli edemi del suino; Stx2k è stata isolata da diversi ceppi batterici proveniente da varie fonti, come animali (capra e suino), carne cruda di manzo e montone e pazienti umani affetti da diarrea (Liu et al., 2021).

Tuttavia ormai è noto che tutti i sottotipi di Stx sono associati a casi clinici da STEC, come diarrea emorragica e SEU (EFSA, 2020).

## 2.2. *Escherichia coli* O157:H7 e non-O157

*E. coli* O157:H7 rappresenta il prototipo degli STEC che causano malattia nell'uomo (Wasteson, 2001). Il primo focolaio di colite emorragica attribuito a questo sierotipo risale al 1982 in USA, conseguente all'ingestione di carne bovina poco cotta (Denamur et al., 2021). I ceppi appartenenti a questo sierotipo sono stati responsabili di numerosi focolai di malattia mediati dal consumo di alimenti e acqua contaminati, e sporadicamente anche estesi in aree molto ampie, come il primo caso di *hamburger-borne disease* che si è diffuso in USA dal 1992 al 1993 (Wasteson, 2001). Ad oggi STEC O157:H7 è diffuso in tutto il mondo e rappresenta il

gruppo clonale con la maggior virulenza (Denamur et al., 2021). Negli Stati Uniti si presentano approssimativamente 265.000 casi di infezioni umane ogni anno, spesso iniziate con diarrea e che poi possono evolvere con manifestazioni di dissenteria e colite emorragica; in alcuni casi, poi, incorrono SEU e disordini di tipo neurologico (Liu et al., 2021).

I tipici sintomi manifestati nelle infezioni da STEC O157:H7 includono dolori addominali, diarrea acquosa, potenzialmente complicatasi come diarrea ematica, sintomo della colite emorragica. Questa progressione è attribuita alla produzione di Stx1 e/o Stx2, le quali sono in grado di legarsi a recettori localizzati sulla membrana delle cellule eucariote e causare danni tissutali (Li et al., 2017).

Nel corso di uno studio, tra l'anno 2006 e il 2010 sono stati isolati 202 ceppi STEC da bovini, alimenti e pazienti: ventotto isolati appartenevano al sierotipo O157:H7, mentre i rimanenti erano tutti non-O157:H7, relativi a diciannove sierotipi differenti (Bustamante et al., 2012).

Alcuni studi hanno dimostrato l'evoluzione graduale di STEC O157:H7 dal sierotipo O55:H7 Stx-negativo di EPEC, che in precedenza era stato associato solo a diarrea non ematica (Kaper and O'Brien, 2014).

Gli STEC non-O157, in ogni caso, sono microrganismi patogeni trasmissibili con gli alimenti e sono ritenuti responsabili sia di casi sporadici di infezione, che di focolai più o meno estesi. Sebbene STEC O157:H7 abbia sempre attirato più attenzione, principalmente a causa delle maggiori conoscenze relative a questo sierotipo, recentemente si è posto l'accento anche sui ceppi non-O157 quali agenti patogeni a tutti gli effetti. Valga tra tutti l'esempio del grave focolaio verificatosi in Germania nel 2011, causato dal consumo di germogli contaminati da STEC O104:H4 (Li et al., 2017). I sierogruppi non-O157 maggiormente associati a patologie umane in Europa includono O26, O103, O91, O146 e O145, mentre per quanto riguarda gli USA sono maggiormente diffusi O26, O45, O103, O111, O121 e O145 (EFSA, 2020). Si può notare che i sierogruppi O26 e O103 sono nella *top six* sia dei paesi europei che extra-europei, entrambi sono spesso associati a gravi patologie (SEU) e ospedalizzazioni. STEC O26, inoltre, è associato ad un elevato numero di disturbi gastroenterici che portano a diarrea emorragica, oltre che a SEU, e rappresenta un rischio per la salute pubblica tanto quanto O157 (Vishram et al., 2021).

### 2.3. Fattori di patogenicità

La maggior parte delle conoscenze relative alla patogenicità degli STEC derivano da ricerche eseguite sul sierotipo O157:H7. Esso, infatti, è spesso isolato dai pazienti in corso di SEU ed è considerato il prototipo dei ceppi un tempo definiti EHEC. (Newel and La Ragione, 2017).

In generale, nel corso della storia, la colonizzazione batterica della mucosa intestinale dei mammiferi si è sviluppata in co-evoluzione con il sistema immunitario mucosale. I diversi ceppi batterici, infatti, hanno acquisito e sviluppato svariati meccanismi per la modulazione della risposta immunitaria dei loro ospiti. Le enterotossine termolabili (LT) di *E. coli* e la tossina del colera (CT) di *Vibrio cholerae* possiedono, ad esempio, strutture che permettono loro di essere tra gli immunomodulatori batterici meglio caratterizzati; in seguito si è osservato che la struttura basica molecolare delle Stx secrete dagli STEC è simile a quella di LT e CT (Menge, 2020).

La caratteristica principale di virulenza degli STEC è la loro capacità di produrre tossine letali per le cellule Vero, e per questo definite, inizialmente, verocitossine, molto simili alle Stx prodotte da *S. dysenteriae* (Wasteson, 2002). Le Stx, oltre all'attività enzimatica svolta dalla subunità A1, inducono una serie di risposte cellulari ed esercitano diversi effetti, come la stimolazione delle cellule dendritiche. Inoltre, sfruttano i glicolipidi come recettori cellulari. L'insieme di questi meccanismi permette loro di creare danni cellulari irreversibili (Menge, 2020).

*E. coli* esprime adesine fimbriali e non fimbriali coinvolte in misura maggiore o minore nel fenomeno di adesione cellulare. Le conoscenze in merito sono relative a studi effettuati per i ceppi di EPEC; per quanto riguarda EHEC, l'adesione sembra principalmente mediata dalla proteina di membrana denominata "intimina", ovvero un'adesina codificata dal gene *eae*, localizzato nell'isola di patogenicità cromosomica 35-kb, definita Locus for Enterocyte Effacement (LEE) (Newell and La Ragione, 2017). Gli *E. coli* patogeni possiedono, quindi, geni che codificano per specifici fattori di adesione che permettono loro di colonizzare siti che normalmente non ospitano il microrganismo, generalmente confinato nel colon, come appunto il piccolo intestino e l'uretra (Kaper et al., 2004). Il fattore di virulenza principale che permette colonizzazione e aderenza alla mucosa intestinale da parte del batterio è, appunto, rappresentato dall'intimina, attraverso il cosiddetto meccanismo di "Attaching and Effacing" (Franzin et al., 2015; FAO, 2019). L'intimina è sintetizzata dalla maggior parte degli STEC

associati ad infezioni gravi (diarrea emorragica, SEU), ma numerosi stipiti presentano sistemi di adesione alternativi, quali le fimbrie (EFSA, 2020).

Il processo patogenetico dell'infezione da *E. coli* O157:H7 inizia con la colonizzazione della mucosa intestinale e la dose infettante del batterio ingerito per via orale è estremamente bassa, talvolta inferiore a cento microrganismi (il dato è certo per il sierotipo O157:H7, ma vi sono incertezze sulla reale dose infettante per gli altri sierotipi di STEC). La bassa dose infettante riflette l'abilità del batterio di resistere all'ambiente acido dello stomaco. Inoltre, per una colonizzazione efficiente è richiesta la mobilità del microrganismo, necessaria per il raggiungimento della mucosa intestinale e l'adesione agli enterociti dell'ospite (Newel and La Ragione, 2017). La mobilità è mediata da flagelli attivi, considerati fattori di virulenza accessori, ma necessari per molti patogeni enterici, tra cui gli STEC (Yang et al., 2013).

Altri fattori di virulenza sono legati alla presenza del plasmide pO157, i cui geni codificano per l'enzima catalasi-perossidasi (katP), l'adesina ToxB, una metalloproteasi zinco-dipendente (StcE) e per un'enteroemolisina (Ehx), le cui funzioni sono legate alla mediazione del legame con la cellula ospite, alla degradazione di mucine e glicoproteine e alla regolazione dei meccanismi dell'infiammazione e di citotossicità (Farfàn-Garcia et al., 2016).

I meccanismi di patogenicità descritti per STEC, quindi, sono molteplici. Innanzitutto si verifica l'adesione del microrganismo alle cellule dell'epitelio intestinale, mediata dall'intimina e dal sistema di secrezione di tipo tre (Type 3-Secretion System, T3SS) che determinano alterazioni citoscheletriche e le lesioni A/E. Come è noto, il legame dell'intimina al suo recettore Tir (Translocated intimin receptor) e ad un recettore Tir-indipendente di recente scoperta, detto "nucleolina", contribuisce alla formazione del legame del batterio con la cellula eucariota. I geni per la sintesi dell'intimina e del recettore Tir sono presenti nell'isola di patogenicità LEE (Farfàn-Garcia et al., 2016).

Il processo di adesione del batterio alla mucosa intestinale determina le caratteristiche lesioni A/E a danno degli enterociti. Queste lesioni si formano se è presente il Translocated Intimin Receptor (Tir) che, portato all'interno delle cellule dell'ospite tramite il T3SS, si fissa alla membrana dell'enterocita e si lega all'intimina presente sulla membrana del batterio. L'adesione batterica, inoltre, viene associata ad una condensazione dell'actina, che da glomerulare diventa filamentosa e fornisce sostegno alle cosiddette "formazioni a piedistallo" che alterano la morfologia della cellula e si associano alla scomparsa dei microvilli intestinali. Questa adesione stretta consente, in seguito, il rilascio delle tossine da parte degli STEC

all'interno della cellula. Il meccanismo patogenetico descritto è quello tipico degli STEC LEE-positivi, mentre gli STEC LEE-negativi impiegano metodi alternativi di colonizzazione, legati principalmente all'espressione di flagellina (Newell and La Ragione, 2017).

L'altro fondamentale meccanismo di virulenza è relativo alla sintesi delle tossine Stx1 e Stx2, immunologicamente differenti tra loro, che possono essere elaborate anche in associazione tra loro. L'ingresso delle tossine nella cellula è mediato da tre meccanismi distinti: macropinosi (MPC), che permette l'ingresso di Stx negli enterociti, indipendentemente dalla presenza di intimina e da T3SS; transitosi, ovvero la tossina passa dallo spazio extracellulare a quello intracellulare all'interno di una vescicola; endocitosi, cioè una volta che la subunità B della tossina si è legata al recettore cellulare Gb3 (globotriosilceramide), viene introdotta nel citoplasma mediante un'invaginazione della membrana cellulare, alla quale consegue il rilascio della subunità A che svolge la propria attività enzimatica inibendo la sintesi proteica ed inducendo la morte cellulare (Farfàn-Garcia et al., 2016). Proprio a causa dell'attività enzimatica della subunità A delle Stx, che inibisce la sintesi proteica e porta a morte la cellula, queste tossine sono considerate citoletali (Menge, 2020).

Il recettore cellulare Gb3 è riconosciuto ed utilizzato dalla maggior parte delle varianti di Stx2 e da tutte le varianti di Stx1; tuttavia alcuni sottotipi di Stx2 si legano in modo preferenziale al recettore globotetraosilceramide (Gb4), che differisce da Gb3 per una molecola N-acetilgalattosamina. Questo legame ad un recettore differente, rende i sottotipi di Stx diversamente tossici; si ritiene, inoltre, che a causa del basso tasso di dissociazione con i recettori, Stx2a venga assorbita con più facilità e si riveli, dunque, maggiormente tossica rispetto ad altri sottotipi (Liu et al., 2021).

### 3. I reservoir animali: il bovino

Le fonti di infezione da STEC per l'uomo sono state studiate a lungo e si è osservato che questi microrganismi sono in grado di colonizzare il tratto intestinale di numerose specie di animali, i quali per la maggior parte rimangono asintomatici e trasmettono l'infezione all'essere umano (Newell and La Ragione, 2017).

*E. coli* potrebbe essersi evoluto nel tratto intestinale degli animali a sangue caldo, dove sono presenti abbondanti fonti di carbonio ed energia, insieme ad elevata umidità, moderato pH e temperatura ottimale per la sua crescita (38-40°C). Questi batteri, per la maggior parte, sono resistenti all'acidità dello stomaco, in quanto lo devono attraversare per giungere all'intestino, ambiente sicuramente più adatto per la loro crescita (Jang et al., 2017). I diversi ospiti di *E. coli* presentano fisiologia, alimentazione, tempi di digestione e microbiota totalmente differenti gli uni dagli altri (Croxen et al., 2013).

È stato accertato che il principale reservoir di STEC O157:H7, come anche degli altri sierotipi di STEC, è il bovino (Riley, 2022; Denamur et al., 2021), escretore asintomatico di ceppi patogeni di *E. coli* sia nell'ambiente che nella catena alimentare (Wasteson, 2001). I primi studi risalgono ancora ai tempi nei quali il microrganismo era conosciuto come *Bacillus coli*, nel primo ventennio del 1900, perché si riteneva già allora correlato alla presenza di diarrea nei vitelli (Kolenda et al., 2015).

Grazie ad indagini epidemiologiche relative a diversi focolai, studi caso-controllo e ausilio di approcci molecolari, si è potuto attribuire il ruolo di serbatoio principale di STEC ai ruminanti in generale, ed al bovino in particolare, che si pone come significativa fonte d'infezione per l'uomo (Newell and La Ragione, 2017).

I bovini adulti albergano gli STEC nel tratto intestinale senza mostrare alcun sintomo clinico, rappresentando in tal modo una nicchia ecologica ideale per la sopravvivenza dei microrganismi (Barth et al., 2020). Il primo sito di colonizzazione è la parte terminale del retto, dove il batterio causa le tipiche lesioni A/E, descritte in precedenza, sulla superficie epiteliale; l'animale, tuttavia, spesso rimane asintomatico, nonostante i danni istopatologici che escludono si possa trattare di un semplice commensale (Newell and La Ragione, 2017).

Gli STEC sono veicolati anche da altri ruminanti, come ovini e caprini (Ferens and Hovde, 2011), ma sono anche suini e polli possono comportarsi da escretori asintomatici di STEC O157:H7 (Newell and La Ragione, 2017).

In merito agli animali reservoir, gli STEC possono persistere in allevamento per anni, senza causare malattia negli animali (Wasteson, 2001). I bovini adulti sono asintomatici perché non presentano i recettori vascolari per le Stx (Ferens and Hovde., 2011), che in questo modo non sono in grado di causare alcuna patologia, ma possono agire come modulatori del sistema immunitario, rendendo l'animale un portatore sano di STEC (Kolenda et al., 2015). Pur non manifestando sintomi clinici, tuttavia, i bovini contaminano l'ambiente con le loro feci (Newell e La Ragione, 2017), anche in concentrazioni maggiori di  $10^4$  UFC/ g nei cosiddetti "super-shedder" o super escretori (McCabe et al., 2018); inoltre, anche il latte e la cute dell'animale sono responsabili di contaminazione da STEC, in particolare dei prodotti lattiero-caseari e delle carni durante la lavorazione al macello (Newell e La Ragione, 2017).

Anche il vitello è un importante fonte di contaminazione da STEC per l'uomo (Menge, 2020) ma, a differenza che nell'adulto, alcuni sierotipi di STEC possono causare diarrea e setticemia, con problemi rilevanti a livello economico per le aziende, in quanto le maggiori perdite annuali sono dovute proprio alla morte dei neonati o alla crescita di animali (Kolenda et al., 2015). Nel vitello lattante il colostro svolge un ruolo parzialmente protettivo nei confronti dell'infezione da STEC. Uno studio ha infatti dimostrato che nel piccolo e nel grosso intestino, ma anche in altri organi, di vitelli privati del colostro o che ne hanno avuto un'ingestione tardiva, si è rilevata la presenza di elevate quantità di STEC, con morte degli animali da uno a tre giorni dopo la nascita; quelli alimentati con una scarsa dose di colostro hanno, invece, sviluppato diverse manifestazioni di infezioni batteriche, come artriti, onfaliti, a volte in associazione a diarrea da STEC. Si è trattato, in tutti i casi, di situazioni nelle quali il colostro non è stato somministrato correttamente (Kolenda et al., 2015).

Altre specie animali nelle quali gli STEC si comportano da batteri patogeni sono i suini, che manifestano la malattia degli edemi (Wasteson, 2001), dovuta a ceppi simili (per epidemiologia e adesione alle cellule intestinali) agli ETEC, e produttori di Stx2e (McOrist, 2014). Inoltre, gli STEC nei cani provocano una patologia definita "Alabama rot" (Wasteson, 2001).

Come modulatori del sistema immunitario, Stx1 e Stx2 sopprimono la risposta immunitaria adattiva dell'organismo nei confronti di STEC, permettendone la colonizzazione dell'intestino e, successivamente, la diffusione. Da punto di vista epidemiologico si è dimostrato che alcuni sottotipi di Stx, ad esempio Stx2a, sono maggiormente associati ad una più ampia escrezione di STEC O157:H7 da parte dei bovini, divenendo responsabili del fenomeno noto come "super-



escrezione". Nei bovini "super shedder" Stx2a sembra rendere più efficiente la diffusione e trasmissione del batterio, presumibilmente perché viene prodotta più rapidamente rispetto ad altre Stx e va a limitare la proliferazione delle cellule epiteliali dell'intestino del bovino (Barth et al., 2020).

Negli ultimi anni ci si è chiesti se il bovino potesse trarre beneficio dalla presenza di STEC nel suo intestino, vista la convivenza in condizioni del tutto asintomatiche. Alcune ipotesi sono state indagate in diversi studi scientifici e riguardano la possibilità che la produzione di Stx possa rendere meno aggressivo il virus della leucemia bovina (BLV). Finora, tuttavia, non sono state condotte ricerche approfondite sulla correlazione tra BLV e STEC (Kolenda et al., 2015). Il dubbio è sorto in quanto, come descritto in precedenza, STEC provoca sintomatologia clinica solamente nel vitello, sia che si tratti di infezione naturale che sperimentale, mentre rimane nell'apparato gastroenterico del bovino adulto senza causare lesioni: si è concluso, di conseguenza, che il patogeno debba aver adottato uno stile di vita da commensale, in mutuo beneficio con il bovino. Gli STEC isolati dai bovini, infatti, possiedono diversi fattori di virulenza e risulta poco plausibile che nessuno di essi venga riconosciuto dal sistema immunitario dell'animale come segnale di pericolo, dando origine all'attivazione delle risposte innata e adattativa, limitando la colonizzazione del microrganismo al solo intestino. Inoltre, essendo stati rilevati anticorpi specifici per le Stx, il batterio deve aver sviluppato strategie alternative di evasione dal sistema immunitario, riuscendo a mantenere l'omeostasi dell'apparato gastroenterico del bovino, senza indurre manifestazioni cliniche (Menge, 2020).

Oltre a STEC, è stata studiata anche la prevalenza nel bovino adulto e nel vitello di altri *E. coli* che possano causare patologia nell'uomo (DAEC e EAEC), ma le informazioni in merito sono ancora scarse (Kolenda et al., 2015).

Numerosi studi hanno confrontato i fattori di virulenza degli isolati di STEC O157:H7 da bovini e da esseri umani, concludendo che la maggior parte di quelli presenti negli isolati bovini è sottorappresentata nei ceppi che infettano l'uomo, fermo restando che negli isolati bovini si trovano sia i geni per le Stx che il gene *eae*, a dimostrazione della loro patogenicità per l'uomo (Ferens e Hovde, 2011). Ci sono evidenze di diversi livelli di adattamento all'ospite da parte di STEC; ad esempio, alcuni ceppi di *E. coli* O157:H7 sembrano esprimere fattori quali *iha*, *espA*, *rfbE* e *ehxA* in misura differente nelle infezioni del bovino e dell'uomo. Anche la produzione di Stx è più elevata nei casi umani con sviluppo di SEU, piuttosto che nelle infezioni a carico dei bovini. Sono stati, quindi, intrapresi numerosi tentativi di suddivisione dei ceppi STEC escreti

dal bovino, per valutarne le conseguenze sulla salute dell'uomo, con risultati ancora poco chiari (Barth et al., 2020). In ogni caso, i bovini continuano ad essere considerati la prima fonte di contaminazione ambientale da STEC e della successiva trasmissione all'uomo, in particolare attraverso gli alimenti; diversi studi hanno, anche, dimostrato la correlazione tra le infezioni da STEC dell'uomo e la densità di popolazione dei bovini presenti nel medesimo territorio (Ohaiseadha et al., 2016). La colonizzazione batterica dei bovini, quindi, contribuisce sicuramente alla contaminazione degli ambienti agricoli, comprese le falde acquifere, divenendo un importante fattore di rischio per le malattie umane, in particolare nelle comunità rurali (Ohaiseadha et al., 2017). La pericolosità per l'uomo risiede anche nella capacità degli STEC di sopravvivere per lunghi periodi anche al di fuori del tratto intestinale dei reservoir animali e di riprodursi nel suolo, nella sabbia e nei sedimenti a diverse temperature (Jang et al., 2017), con inevitabili conseguenze sulla salute pubblica (Ferens e Hovde, 2011).

## 4. Contaminazione da STEC nelle carni bovine

Le infezioni su base alimentare correlate al consumo di carne sono un rischio globale per la salute pubblica a causa dell'elevato pericolo di contaminazione batterica da parte di diversi microrganismi. *Salmonella enterica*, *Campylobacter* e STEC sono tra i patogeni maggiormente riscontrati nelle carni bovine. In particolare, *Campylobacter*, *Salmonella*, STEC e *Yersinia enterocolitica* sono i principali responsabili di malattie legate al consumo di alimenti in Europa; *Salmonella* e STEC, inoltre, sono considerati i più importanti pericoli per la salute pubblica legati al consumo di carni bovine (Osemwowa et al., 2021).

STEC O157:H7 è il più comune tra gli STEC isolati degli alimenti, in particolare nella carne bovina cruda o poco cotta (Erickson et al., 2021). La gran parte dei focolai di infezione da STEC O157:H7 nell'uomo, infatti, sono causati dalle carni di origine bovina e sono conseguenti a pratiche scorrette riguardanti principalmente i tempi e le temperature di cottura. Anche i prodotti lattiero-caseari, comunque, rivestono un ruolo importante nella trasmissione di STEC all'uomo (Tuttle et al., 1999). Una significativa parte di malattie legate al consumo di alimenti in USA è causata proprio da ceppi patogeni di *E. coli*, i quali sono primariamente trasmessi alla popolazione umana dal bovino mediante il consumo di carne. In molti stati si è dimostrato, infatti, che esiste una correlazione significativa tra malattia umana da STEC e consumo di carne bovina macinata (Kitanov and Willms, 2018).

Il sierotipo O157:H7 è stato ampiamente studiato e riconosciuto come importante patogeno umano. Per quanto riguarda, invece, gli STEC non-O157, si hanno ancora poche conoscenze in merito al ruolo dei diversi fattori di virulenza ritenuti responsabili delle manifestazioni cliniche nell'uomo. Risulta complesso stabilire una relazione epidemiologica reale tra la carne contaminata da STEC non-O157 e le manifestazioni cliniche nei pazienti nei quali questi sierotipi sono stati isolati. Anche se gli sforzi in tal senso si stanno intensificando, siamo molto lontani da una sorveglianza attiva per i ceppi STEC O157 e non-O157 pericolosi per la salute pubblica. Basti pensare che non esiste un criterio di sicurezza alimentare per gli STEC applicabile alle carni e ai prodotti a base di carne in tutta l'Unione Europea (Regolamento CE 2073/2005), anche se si applica un criterio di "tolleranza zero" per le carni di importazione. Nel 2013, ad esempio, sono stati segnalati circa novanta casi di respingimento alle frontiere di carni bovine refrigerate contaminate da STEC provenienti da diversi paesi terzi (Brusa et al., 2017).

Come descritto nel precedente capitolo, i ruminanti sono i più importanti reservoir di STEC e i prodotti alimentari che ne derivano, in particolare per quanto riguarda il bovino, sono stati riconosciuti responsabili di malattia in tutto il mondo. Tuttavia, anche ortaggi a foglia, prodotti lattiero-caseari, frutta e altre carni sono stati associati alla contaminazione da STEC, con successiva insorgenza di malattia dopo il loro consumo (Brusa et al., 2017).

Il bovino, comunque, rimane il principale animale reservoir e la carne che ne deriva ha un ruolo chiave nell'infezione umana da STEC (Arancia et al., 2016). I bovini che arrivano al macello presentano un intestino in maggior o minor misura colonizzato da STEC, a seconda degli allevamenti dai quali provengono e del loro stato fisiologico. A fronte di questa considerazione, potrebbe essere significativo avere informazioni aggiuntive sulle condizioni della stalla di provenienza, ottenute mediante l'esecuzione di analisi microbiologiche sugli animali prima dell'invio al macello, in modo da organizzare le operazioni di macellazione in modo da limitare il rischio di contaminazione (Antic et al., 2021).

Gli STEC vivono nel tratto intestinale di bovini sani e ne contaminano la carne durante le operazioni di macellazione; i microrganismi presenti sulla superficie delle carcasse, e quindi sulle carni fresche, possono essere trasferiti nella massa carnea durante le operazioni di sezionamento e macinazione, causando, così, la contaminazione anche della carne macinata (Tuttle et al., 1999). La diffusione del batterio deriva principalmente dal mantello degli animali, che potrebbe essere considerato la maggior fonte di diffusione microbica in macello (Elder et al., 2000). Dalla superficie dell'animale, gli STEC vengono trasferiti alle attrezzature (coltelli, seghe, tavoli) e, successivamente, alle carni, sebbene in certi casi gli stipiti isolati sulle carcasse scuoiate e quelli rilevati nelle fasi successive della loro lavorazione possano non essere identici (Kitanov and Willms, 2018). È dimostrato che nelle carni il quantitativo in proteine e l'elevato contenuto di acqua libera rendono l'ambiente adatto alla crescita batterica, che concorre al più rapido deterioramento del prodotto finito (Osemwowa et al., 2021). La carne deteriorata è sicuramente favorevole alla crescita di patogeni (Choi et al., 2020).

La diffusione del microrganismo in macello può essere dovuta anche alla contaminazione di una sola carcassa, o meglio di una porzione di essa (Kitanov and Willms, 2018), ed in particolare delle superfici ricoperte di grasso, dove il materiale fecale ed i microrganismi patogeni aderiscono più facilmente (Handing et al., 1995). Nelle carcasse contaminate, la suddivisione in mezzene e in tagli più piccoli contribuisce notevolmente alla diffusione del

batterio in macello. Alla contaminazione crociata tra mezzene viene spesso attribuito un ruolo importante nella contaminazione da STEC all'interno del macello (Elder et al., 2000).

In realtà, la diffusione degli STEC può anche avvenire nelle stalle di sosta del macello, quindi quando il bovino è ancora in vita. La permanenza prolungata degli animali in questi luoghi potrebbe aumentare la dispersione dei batteri sul mantello degli animali, mediante l'imbrattamento con le feci, o la colonizzazione intestinale di batteri ingeriti per via orale. Una buona percentuale di STEC O157:H7 e di *Salmonella* presenti sulle carcasse potrebbe essere attribuita proprio alla permanenza dei bovini nelle stalle di sosta (Antic et al., 2021). Molti studi, infatti, si sono focalizzati sulla prevalenza di STEC O157:H7 negli ambienti pre-macellazione e si è osservato, grazie a dati genotipici, che la maggior parte dei microrganismi isolati dalle carcasse risultavano identici a quelli identificati nei bovini ancora in vita (Aslam et al., 2003). Uno studio sulla possibile correlazione tra STEC nelle feci, sulla cute, e quindi sulle carcasse dei bovini, ha riscontrato un numero elevato di microrganismi eliminati con le feci (Elder et al., 2000) tanto che si può stabilire una significativa correlazione tra l'escrezione fecale di STEC da parte del bovino, la sua diffusione sulle mezzene e, la sua presenza nelle carni, anche dopo lavorazione e riduzione in frammenti (carni macinate) (Aslam et al., 2003). La carica microbica all'esterno della carcassa risulta più elevata che suo interno, e soprattutto in aree maggiormente suscettibili alla contaminazione, come la punta del petto, i fianchi e i garretti (Johanson et al., 1983). Grazie alla dimostrazione di una diretta associazione tra la prevalenza di STEC O157:H7 nelle feci e la sua successiva diffusione alle carni durante i processi di lavorazione in macello, si può affermare che l'azienda di provenienza dei bovini abbia un ruolo fondamentale nella prevenzione della trasmissione degli STEC all'uomo e che, pertanto, sarebbe obbligatoria una corretta gestione e pulizia degli animali in allevamento (Elder et al., 2000).

Per quanto riguarda la carne macinata, basterebbe una sola porzione carnea contaminata per diffondere gli STEC all'intera massa del prodotto, in quanto la sua eventuale frammentazione e dispersione andrebbe a contaminarla in toto (Kitanov e Willms, 2018).

Una manipolazione impropria e una non corretta sanificazione lungo il processo porterebbero, chiaramente, ad un aumento nella diffusione dei batteri (Osemwowa et al., 2021). Ogni fase della lavorazione e manipolazione, pertanto, devono essere svolte facendo grande attenzione all'applicazione di idonee misure igieniche e da personale qualificato (Erickson et al., 2021).

La carne di bovino, inoltre, potrebbe trasmettere ceppi batterici antibiotico-resistenti all'uomo; questo rende il problema ancora più serio e sempre più urgente la messa in atto di buone pratiche di prevenzione e di controllo (Osemwowa et al., 2021). Tra l'altro, in particolare nel mondo occidentale, la processazione delle carni è legata a stabilimenti di grandi dimensioni, con eventuali focolai impattanti su una vasta componente della popolazione e responsabili di grandi perdite economiche (Kitanov and Willms, 2018).

La dose infettante stimata nell'uomo per STEC O157:H7 è molto bassa (anche < 50 cellule ingerite) (Erickson et al., 2021). Dato che è sufficiente l'ingestione di un piccolo numero di batteri perché possa manifestarsi la malattia (Tuttle et al., 1999), l'assenza di STEC O157:H7 nella carne è fondamentale (Brusa et al., 2017). A tal proposito, è presente un regolamento relativo all'utilizzo dell'acido lattico per la decontaminazione superficiale delle carcasse bovine, intesa come riduzione del numero o della prevalenza di microrganismi (Reg. UE 101/2013), in deroga al Reg. CE 853/2004 che permette l'utilizzo della sola acqua potabile. Si è dimostrato, tuttavia, che la carcassa, una volta decontaminata, presenta sulla sua superficie un numero inferiore di STEC rispetto ai valori riscontrati dopo le successive lavorazioni e la divisione in pezzi delle mezzene, a dimostrazione della facilità di contaminazione durante i vari passaggi. Si tratta di considerazioni importanti, che suggeriscono la necessità di prevenzione a tutti i livelli della catena di produzione (Aslam et al., 2003; Elder et al., 2000). Si è osservato, inoltre, che STEC O157:H7 ha buone capacità di sopravvivenza in condizioni di acidità (negli alimenti e nello stomaco), così come in seguito all'applicazione di acidi organici o lavaggi delle carcasse (Dormedy et al., 2000).

Negli anni dei primi rilevamenti dei focolai di infezione da STEC non esisteva un metodo analitico di riferimento per l'isolamento dei microrganismi dai prodotti carnei (Tuttle et al., 1999). Ancora oggi, pur essendo disponibile la norma tecnica ISO/TS 13136:2012, il rilevamento e l'isolamento di STEC richiedono tecniche analitiche impegnative, basate sulla Real-Time PCR e possono essere influenzati da modificazioni dei microrganismi durante l'arricchimento in laboratorio (Kang et al., 2020).

Le difficoltà nella valutazione effettiva del rischio di contaminazione da STEC derivano dal fatto che esso dipenda da molti fattori, come le condizioni igieniche degli impianti di lavorazione della carne, le reti di distribuzione o i metodi di cottura (Kitanov and Willms, 2018). Naturalmente, sia l'igiene nella manipolazione dei prodotti che le temperature applicate durante i trattamenti termici sono fondamentali per la prevenzione della diffusione di STEC.

Mettendo a confronto carni lavorate in Nigeria e in Finlandia, si è rilevato un livello decisamente più elevato di STEC presenti a fine processo in Nigeria rispetto che in Finlandia, in linea con la più scarsa igiene e la non corretta sanificazione delle strutture nigeriane di lavorazione della carne (Osemwowa et al., 2021).

Anche la stagione in cui vengono macellati gli animali ha la sua importanza: alcuni studi hanno dimostrato che il picco di escrezione di STEC O157 dai bovini in Nord America si verifica durante la fine dell'estate e l'inizio dell'autunno, periodo dell'anno nel quale, in effetti, si sono verificati la maggior parte dei focolai di malattia da STEC. La stagionalità potrebbe, dunque, essere presa in considerazione come fattore di rischio e potrebbe incidere sulle possibilità di intervento (Elder et al., 2000).

#### 4.1. Focolai da STEC

Nel 1982, *E. coli* O157:H7 è stato identificato come causa dei casi di diarrea emorragica dovuti al consumo di hamburger in USA. Le più gravi manifestazioni cliniche si sono osservate nei bambini e negli anziani e il 5% delle persone colpite ha sviluppato SEU, con una mortalità del 3-5%. Da novembre 1992 a febbraio 1993 un altro focolaio (700 casi) ha causato quattro decessi nella parte ovest degli Stati Uniti, per consumo di hamburger di una catena di ristoranti *fast food*. La maggior parte dei casi si sono verificati nello stato di Washington, dove tutti gli hamburger ancora congelati sono stati ritirati dal commercio entro una settimana dal riconoscimento del focolaio (Tuttle et al., 1999). Negli USA, in generale, si stimano circa 265.000 infezioni da STEC ogni anno (Choi et al., 2020).

Nel gennaio 1993 un altro caso di SEU si è verificato a Las Vegas e ad essere colpita è stata una bambina di quattro anni che aveva mangiato un hamburger in un ristorante fast food. (Cieslak et al., 1997).

Un importante focolaio causato dal sierotipo O104:H4 si è verificato nel 2011 in Germania, associato ad un grande numero di casi di SEU negli adulti. Sono stati accertati più di 3800 casi di malattia, più di 800 casi di SEU e 54 decessi. Gli studi epidemiologici hanno identificato, con grande difficoltà, i germogli di fieno greco come causa della tossinfezione; oltre al consumo volontario, i germogli vengono spesso utilizzati per la guarnizione dei piatti (il cosiddetto "alimento nascosto") e quindi consumati in modo inconsapevole (Werber et al., 2012).

Tra il primo gennaio 2009 e fine dicembre 2012, in Inghilterra, sono stati rilevati 3717 casi di infezioni da STEC appartenenti a diversi sierotipi, con una maggior incidenza nei bambini tra uno e quattro anni, nelle donne rispetto agli uomini, e nelle persone di gruppi etnici bianchi. Lo sviluppo di SEU ha interessato soprattutto donne e bambini. Anche se in Inghilterra il sierotipo più riscontrato era all'epoca O157, i sierotipi non-O157 sono stati associati ad un numero più elevato di ospedalizzazioni e di insorgenza di SEU. In quel periodo, le infezioni da STEC sono state rilevate in maggior quantità (quattro volte di più) nelle zone rurali piuttosto che in quelle urbane, a conferma del ruolo svolto anche dal contatto diretto con animali portatori o con l'ingestione, ad esempio, di latte crudo (Byrne et al., 2015).

Sempre per quanto riguarda le infezioni da STEC non-O157, dal 1995 al 2017 sono stati riportati 674 focolai in tutto il mondo, oltre al grande focolaio da STEC O104:H4 del 2011 in Germania e in Francia. Ad essere colpiti sono stati principalmente bambini e giovani adulti ed il sierogruppo maggiormente riscontrato è stato O26:H11, in particolare dal 1995 al 2014. Le manifestazioni cliniche più rilevanti fanno riferimento a diarrea (68%) e SEU (37%), maggiormente tra il 2005 ed il 2009 (Valilis et al., 2018).

Nel 2016 si è calcolato che STEC ha causato il 2% di tutti i focolai di infezione *food-borne* in Germania (8 focolai su 397); inoltre, nello stesso anno, sono stati diagnosticati 230 casi singoli di malattia da STEC nella bassa Sassonia e altri 1816 nel resto del paese (Mylius et al., 2018).

Il Centers for Disease Control and Prevention (CDC) ha stimato che, negli Stati Uniti, le infezioni da alimenti contaminati da STEC, in particolare da *E. coli* O157:H7, sono responsabili di circa 63.000 casi di malattia ogni anno, con più di 2.100 ospedalizzazioni e diversi decessi. STEC, infatti, è stato inserito tra i nove patogeni più comuni in grado di causare malattie a trasmissione alimentare (Fatima and Aziz, 2022).



## 5. Patogenesi e aspetti clinici

Così come altre specie appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, *E. coli* può essere coinvolto in una serie di manifestazioni cliniche umane. In particolare, è tra i principali responsabili di infezioni primitivamente ed esclusivamente intestinali, rappresentate da forme di enteriti o gastro-enteriti. Queste seguono l'ingestione di alimenti contaminati da materiale fecale proveniente da soggetti malati o portatori. Le infezioni si verificano maggiormente in comunità con scarsi standard economici-sociali di vita, sebbene non siano da escludere anche focolai in paesi maggiormente sviluppati (di norma in mense, ristoranti e altre comunità) (La Placa, 2005).

Si riconoscono, inoltre, infezioni a localizzazione extra-intestinale, principalmente a carico delle vie urinarie (cistiti, cisto-pieliti e pieliti). *E. coli* è talvolta responsabile di infezioni di carattere opportunistico, come nei casi di infezioni nosocomiali del tratto respiratorio, sovra-infezioni di ferite (chirurgiche e non), o altre associate a procedure invasive (ad esempio l'endoscopia). Nella maggioranza dei casi, le infezioni extra-intestinali sono endogene e derivano dalla diffusione di un focolaio infettivo in altre sedi dell'organismo. In alternativa, ceppi di *E. coli* normalmente commensali della mucosa intestinale possono divenire capaci di superare lo strato mucosale qualora l'organismo si trovi in condizioni di indebolimento delle difese immunitarie (infezioni da batteri opportunisti) (La Placa, 2005).

### 5.1. Infezioni Intestinali

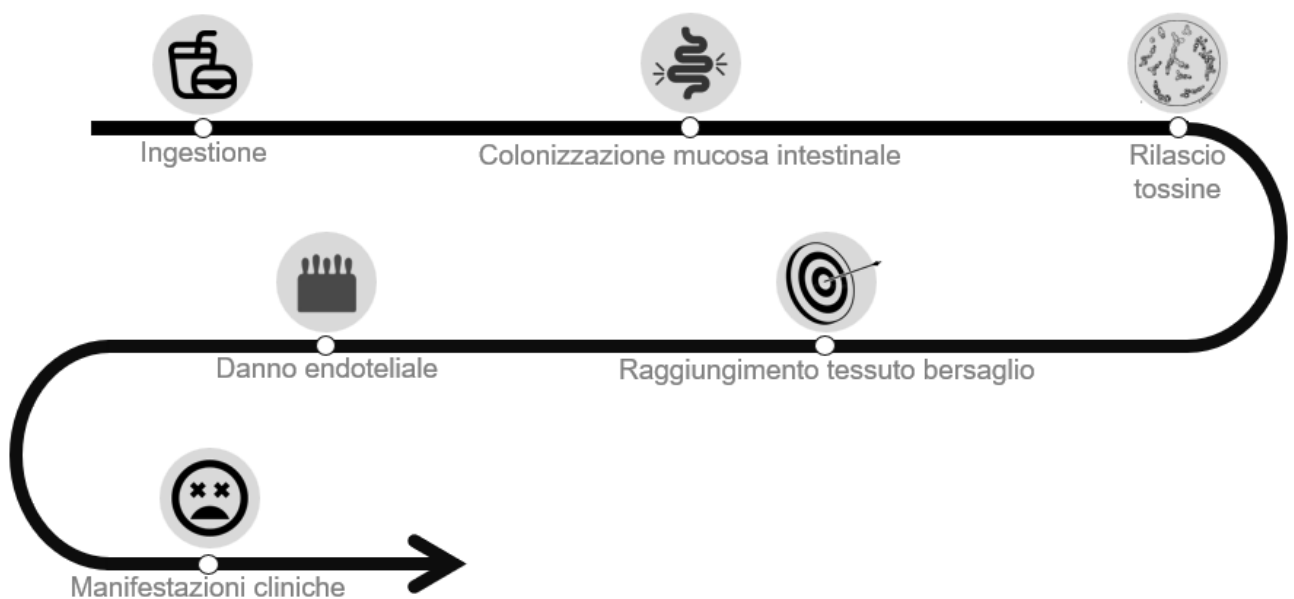
I meccanismi patogenetici relativi alle infezioni da batteri enteropatogeni sono fondamentalmente due. Si può verificare una colonizzazione dell'intestino, specialmente nella sua porzione distale, con conseguenti alterazioni istopatologiche a carico degli enterociti, con conseguenti enteriti caratterizzate da sintomi diarroici di origine infiammatoria; l'associazione a sintomi diarroici, in questi casi, è correlata con l'alterazione dei meccanismi di secrezione e riassorbimento intestinale (La Placa, 2005). Questi microrganismi penetrano nelle cellule epiteliali, come succede, ad esempio, per *Shigella* spp., *Salmonella* spp. ed EIEC (Kaper et al., 2004). Altri batteri, tra cui gli STEC, stimolano, invece, l'attività secretoria della mucosa intestinale grazie alla sintesi di enterotossine, senza penetrare nelle cellule. La sintomatologia è principalmente di tipo diarroico, conseguente all'alterata capacità di riassorbimento dei liquidi intestinali nel colon (La Placa, 2005).

Le malattie a carattere diarroico da *E. coli* rappresentano un grave problema di salute pubblica e sono tra le maggiori cause di morbilità e mortalità di neonati e bambini. Molti ceppi del batterio vivono come commensali nell'intestino degli adulti sani, e raramente causano patologie in questi soggetti; tuttavia alcuni sierotipi possono dare infezioni intestinali (ed extra-intestinali) anche molto gravi in individui immunocompromessi (Gomes et al., 2016).

## 5.2. Patogenesi

La patogenesi dell'infezione da STEC prevede l'intervento di diversi fattori di virulenza, codificati da geni cromosomici, plasmidici e derivati da batteriofagi lisogeni. In particolare, per *E. coli* O157:H7, hanno grande rilevanza i geni codificanti per le Stx, l'isola di patogenicità LEE ed il plasmide pO157 (Nataro and Kaper, 1998).

La sequenza di eventi che porta alle manifestazioni cliniche dell'infezione da STEC è la seguente illustrata di seguito (Figura 1):



**Figura 1:** Patogenesi delle infezioni da STEC (schematizzata da Caprioli et al., 2005).

Il microrganismo viene ingerito e colonizza la mucosa intestinale mediante l'adesione agli enterociti. Conseguentemente vengono rilasciate le Stx, che attraversano la cellula epiteliale (grazie al contatto molto stretto tra *E. coli* e le cellule intestinali), si portano nella sottomucosa e passano nel circolo sanguigno per raggiungere gli endoteli intestinale e renale, principali

bersagli delle tossine, ma anche della vescica, creando un danno cellulare a questo livello (Caprioli et al., 2005).

Gli STEC appartengono al gruppo degli *E. coli* non invasivi, quindi, sono raramente associati ad una fase di batteriemia. Piuttosto, una volta raggiunto l'intestino dell'organismo ospite e completata l'adesione alle cellule endoteliali della mucosa colica, avviene il rilascio di proteine batteriche all'interno degli enterociti attraverso un sistema di secrezione di tipo III. Le Stx sono responsabili del danno cellulare mediante l'inattivazione dei ribosomi ed il blocco della sintesi proteica (Fatima e Aziz, 2022).

Le Stx sono composte da due subunità: A e B. La prima viene degradata dalla proteolisi in A1 e A2, di cui A1 ha capacità enzimatica. La subunità B, invece, serve per il legame ai recettori glicolipidici Gb3 degli organi bersaglio (rappresentati dagli endoteli della microvascolatura di rene, intestino e cervello). Nel rene, in particolare, la citotossicità si amplifica maggiormente, in quanto vi è l'interazione delle Stx con il fattore alfa di necrosi tumorale (TNF $\alpha$ ). In generale, una volta che la tossina si lega alla superficie delle cellule bersaglio, vi penetra per endocitosi, viene trasportata all'apparato di Golgi e al reticolo endoplasmatico e da qui trasferita nel citoplasma, dove, agendo sui ribosomi, blocca la sintesi proteica, come precedentemente descritto, e induce la morte cellulare (Fatima e Aziz, 2022).

Il principale effetto a livello intestinale delle Stx è quello di mediare la disregolazione dei canali ionici di membrana dell'epitelio, portando ad una perdita massiva di ioni e di acqua. Tuttavia, recentemente si è compreso che le Stx sono anche in grado di modulare la risposta immunitaria dell'ospite inducendo eventi pro-apoptotici e pro-infiammatori nelle cellule. In particolare, i linfociti B, che nell'uomo producono IgG e IgA, si sono mostrati suscettibili all'effetto di Stx1. Le infezioni sperimentali dei suinetti gnotobiotici, infatti, hanno prodotto immunosoppressione. Questo effetto fa sì che le Stx possano essere considerate estremamente rilevanti nella patogenesi delle infezioni da STEC, anche se non impediscono la formazione di anticorpi specifici contro le Stx (Menge, 2020; Fatima e Aziz, 2022).

Dopo l'iniziale moltiplicazione del batterio nei tratti intestinali di ileo, cieco e colon si stabilisce un'infezione persistente che ha come conseguenza la distribuzione prolungata di STEC per numerosi mesi. I ceppi considerati maggiormente patogeni per l'essere umano, come appunto STEC O157:H7, colonizzano preferibilmente, ma non esclusivamente, l'epitelio dei follicoli linfoidi, quello squamoso delle vie urinarie e la giunzione retto-ale; inoltre possono essere ritrovati occasionalmente nella cistifellea (Menge, 2020).

### 5.3. Sintomi clinici dell'infezione da STEC

Le alterazioni intestinali indotte da STEC sono alla base di manifestazioni cliniche che nell'uomo sono caratterizzate da diarrea acquosa con nausea, forti crampi addominali e febbre di entità modesta. La deplezione idro-salina che ne consegue può essere importante e talora può avere esito fatale se non si interviene tempestivamente, specialmente nel caso di soggetti immunodepressi e bambini molto piccoli o in condizioni di malnutrizione (La Placa, 2005).

Il periodo di incubazione delle infezioni da STEC, prima della comparsa dei sintomi, è mediamente di quattro giorni (OMS, 2008), sia per i focolai da O157:H7 che per quelli da O111. Il primo sintomo, solitamente, è la diarrea, che può essere accompagnata o meno da febbre, crampi addominali e vomito. I pazienti, nei giorni successivi all'inizio della sintomatologia, possono incorrere nella colite emorragica e si ritiene che O157:H7 sia il sierotipo più comunemente associato a tale complicanza (Croxen et al., 2013). La colite emorragica si presenta con diversi sintomi e lesioni, quali forti crampi addominali, feci sanguinolente, febbre bassa (o talvolta assente), edema evidente della mucosa del colon, erosione ed emorragie intestinali (Kaper and O'Brien, 2014).

Normalmente, la diarrea da STEC O157:H7 si risolve in una settimana circa dall'inizio dei sintomi, mentre il decorso della malattia da STEC non-O157 sembra essere più duraturo. Durante il focolaio da STEC O104:H4 del 2011 in Germania, ad esempio, il tempo medio di risoluzione clinica è stato di due settimane negli adulti e di più di un mese nei bambini al di sotto dei quindici anni (Croxen et al., 2013).

La mortalità dovuta all'infezione da STEC nell'uomo è correlata sensibilmente con l'età dei pazienti ed il grado di virulenza del ceppo batterico. Per quanto riguarda le gastroenteriti, il tasso di mortalità è minore dell'1%, mentre per i casi di SEU si aggira tra il 2% e il 5%, ma può arrivare anche al 10% nei focolai sostenuti da STEC O157:H7 (Werber et al., 2012).

È raccomandato che i pazienti con diarrea emorragica vengano ospedalizzati per la gestione della sintomatologia e per evitare la diffusione del batterio (Croxen et al., 2013). La diagnosi precoce di infezione da STEC e l'inizio tempestivo di una terapia mirata rendono più favorevole la prognosi a lungo termine, riducendo, in particolare, i danni renali. Il progresso scientifico nelle pratiche di dialisi ed i miglioramenti delle cure per i bambini, inoltre, hanno portato ad una diminuzione della mortalità causata da forme acute di SEU (Fatima e Aziz, 2022).

## 5.4. Complicanze dell'infezione da STEC

L'infezione da STEC è responsabile quadri clinici molto variabili, che si manifestano con blandi sintomi intestinali oppure con grave diarrea emorragica. Tuttavia, in circa il 10% dei pazienti, gli STEC possono essere causa di severe complicanze, come la sindrome emolitico uremica (SEU), in particolare nei bambini in età prescolare e negli anziani (Croxen et al., 2013; OMS, 2008). L'infezione da STEC, quindi, può causare sintomatologia più o meno grave, presumibilmente in relazione alla diversa suscettibilità dell'ospite oltre che della differente virulenza dei ceppi (Newell and La Ragione, 2017).

La SEU è stata descritta per la prima volta nel 1955 in Svizzera da un gruppo di ricercatori ed è caratterizzata clinicamente dallo sviluppo di insufficienza renale acuta, trombocitopenia e anemia emolitica microangiopatica (OMS, 2008; Kaper and O'Brien, 2014; Farfán-García et al., 2016). I pazienti sviluppano tipicamente un irreversibile danno vascolare che si rende noto solo all'apparire della sintomatologia, e per il quale non esiste, ad oggi, un trattamento specifico (Liu et al., 2021). In questi casi, a seguito delle manifestazioni gastrointestinali (diarrea), si riscontrano complicanze endoteliali nell'apparato micro-vascolare del rene e di altri organi. L'epidemiologia di questa condizione vede un picco di incidenza soprattutto nella popolazione pediatrica, ed è tale da essere considerata la prima causa di insufficienza renale acuta nel bambino (Kaper and O'Brien, 2014; Liu et al., 2021).

Se le infezioni da STEC dell'adulto si concludono, nel 90% dei casi, senza esiti a lungo termine, la prognosi diventa riservata per i pazienti che sviluppano SEU. Alcuni bambini, per esempio, non recuperano la funzionalità renale e sono costretti a terapie sostitutive (dialisi o trapianto renale), mentre coloro che riescono a recuperare la funzionalità dell'organo sono, in ogni caso, ad alto rischio per lo sviluppo tardivo di altre patologie renali (Fatima e Aziz, 2022).

Il principale organo bersaglio della SEU è rappresentato dal rene e per la metà dei pazienti si rende necessario un trattamento dialitico, ma può essere colpito anche il sistema nervoso centrale (stato mentale alterato, convulsioni, ictus e coma), gastrointestinale (diarrea emorragica, ischemia/necrosi intestinale e perforazioni), muscoloscheletrico (sono stati descritti casi di rhabdomiolisi) e il cuore (Liu et al., 2021). In alcuni bambini è stato riportato anche lo sviluppo di diabete insulino-dipendente, insufficienza pancreatica ed altre complicazioni del tratto gastrointestinale (Fatima e Aziz, 2022).

I fattori responsabili della progressione dell'infezione, fino all'insorgenza di SEU, sono vari: il ceppo di STEC (che spesso è rappresentato da O157:H7); l'età (è più probabile che la patologia

si manifesti nei bambini al di sotto dei cinque anni); il trattamento con antibiotici che aumentano il rischio di sviluppo di SEU, grazie alla liberazione massiccia di tossine Stx dai batteri uccisi dal trattamento; fattori ambientali e genetici (Fatima e Aziz, 2022).

Nel caso della SEU, tuttavia, trattandosi di una sindrome, possono talvolta entrare in causa infezioni sostenute da altri microrganismi, quali *Streptococcus pneumoniae*, *Shigella dysenteriae* e *Citrobacter freundii*, o alterazioni biochimiche della via del complemento. Questi quadri spesso non sono preceduti da sintomi diarroici, e determinano quindi la cosiddetta “SEU atipica” (Khalid e Andreoli, 2019; Fatima e Aziz, 2022).

## 5.5. Diagnosi

*E. coli* è facilmente coltivabile ad una temperatura di 37°C. L’approccio diagnostico prevede la coltura di campioni fecali su terreni selettivi, come ad esempio Sorbitol MacConkey agar o CHROMagar O157, specificatamente per il sierotipo O157:H7 (Newell and La Ragione, 2017), il quale appunto non fermenta il sorbitolo (Bruyand et al., 2017). Tuttavia, visto l’aumento dei casi di infezione da STEC non-O157, in grado di causare patologie gravi nell’uomo, si rende necessario un sistema di screening differente, che non sia specifico soltanto per STEC O157:H7 (Newell and La Ragione, 2017). Non sono, ad oggi, disponibili terreni di coltura selettivi per i ceppi di STEC non-O157, ad eccezione del Rhamnose MacConkey agar (R-MAC) che viene utilizzato per l’isolamento di STEC O26, normalmente incapace di fermentare il ramnosio (Bruyand et al., 2017; ISO 13136:2012).

I metodi diagnostici per le infezioni da STEC possono essere diretti, mediante l’isolamento da campioni clinici, oppure indiretti, grazie ad applicazioni molecolari, fenotipiche e sierologiche (Morabito et al., 2021). Più recentemente, i laboratori hanno adottato come metodo la PCR, utilizzando come primer alcuni target specifici, in particolare i geni codificanti per le Stx. In questo modo è possibile ottenere risultati in uno o due giorni (Newell and La Ragione, 2017). I geni codificanti per le Stx e il gene *eae*, infatti, sono ben identificabili nei campioni clinici mediante PCR (Bruyand et al., 2017; ISO 13136:2012).

A fini epidemiologici, altri metodi utilizzati per la caratterizzazione degli isolati sono rappresentati dalla pulsed-field gel electrophoresis (PFGE), la multi-locus variable number of tandem repeat analysis (MLVA) e il Whole Genome Sequencing (WGS) (Bruyand et al., 2017).

Un'ulteriore possibilità è rappresentata dal rilevamento degli anticorpi anti-LPS, sviluppati dalla maggioranza dei pazienti con infezione da STEC. In particolare, si vanno a ricercare le IgM anti-LPS nel siero, analizzandolo per due volte con prelievi distanziati di quindici giorni. Questa metodica consente la diagnosi anche nel caso in cui le feci non siano state prelevate in ritardo o quando sia stata intrapresa una precoce terapia antibiotica (Bruyand et al., 2017).

## 6. La zoonosi da STEC in Europa

Le infezioni da STEC vengono segnalate con maggiore frequenza nei paesi sviluppati come Stati Uniti d'America, Canada, Australia e negli stati europei. Tra i paesi dell'America Latina, l'infezione da STEC è endemica in Argentina, primo paese al mondo per numero di casi di sindrome uremico emolitica (SEU) nei bambini (Farfán-García et al., 2016; Bustamante et al., 2012). Vengono riportati, infatti, circa cinquecento casi l'anno, con un'incidenza di 12-14 casi/100.000 bambini (< 5 anni) e una mortalità del 3-5% (Farfán-García et al., 2016).

Nel 2009, l'European Center for Disease Prevention and Control (ECDC) e l'European Food Safety Authority (EFSA) hanno reso pubbliche le incidenze delle infezioni da STEC in ventiquattro paesi dell'Unione Europea. In particolare, in Irlanda e in Danimarca l'incidenza è risultata la più elevata, rispettivamente pari a 5,33 e 2,90 casi /100.000 abitanti, a fronte dell'incidenza media segnalata in tutta l'Unione Europea di 0,75 casi/100.000 abitanti (Croxen et al., 2013). In diversi stati europei sono stati riportati, nel corso degli anni, numerosi casi di SEU, causati prevalentemente dal sierogruppo O157 (causa predominante della patologia) e O26 (Allocati et al., 2013).

Oltre al sierogruppo O157, responsabile del primo focolaio americano di *hamburger disease* del 1992-1993, due decenni fa furono identificati in Europa altri quattro sierogruppi allora emergenti, ovvero O26, O103, O111 e O145 (Yngvild, 2002). In particolare, le infezioni da STEC O26 in Europa e in Italia sono state in costante crescita (Lorusso et al., 2009) e ad oggi la maggior parte dei sierogruppi emergenti sopracitati (O26, O103 e O145), insieme ad altri, quali O146 e O91, sono i non-O157 più diffusi a livello europeo (EFSA, 2020).

Le infezioni da STEC sono considerate ad alta priorità in Europa per la tutela della salute pubblica, ma, ciò nonostante, mancano criteri microbiologici per gli alimenti ad alto rischio (carni crude, latte crudo e prodotti derivati), essendo normata a livello comunitario la sola ricerca nei semi germogliati (Regolamento CE 2073/2005).

I casi di infezione da STEC nell'uomo devono essere riportati annualmente dagli stati membri della UE e da quelli dell'Economic European Area (EEA), come stabilito dalla Decisione n. 1082/2013, all'European Surveillance System (TESSy). La sorveglianza degli STEC negli animali, alimenti e mangimi, invece, è obbligatoria per gli stati membri della UE secondo la Direttiva 2003/99/CE (EFSA, 2019). In Italia i report riguardanti le infezioni da STEC sono principalmente incentrati sullo sviluppo di SEU in età pediatrica (<15 anni), riportati annualmente dal Registro



Italiano della SEU Pediatrica. La SEU, infatti, è considerata una sindrome che può dare indicazioni sulla distribuzione degli STEC nella popolazione (Loconsole et al., 2019).

Un problema emergente riguarda i reservoir animali e la presenza di STEC negli alimenti che da essi derivano, anche in relazione alla presenza di ceppi antibiotico-resistenti che possono infettare l'uomo e che possono complicare maggiormente i protocolli terapeutici (Allocati et al., 2013).

Il numero di casi di malattia da STEC notificato in Europa è rimasto stabile dal 2014 al 2017, mentre è aumentato nel 2018, anno in cui sono stati riportati 8811 casi riconducibili all'infezione (di cui il 98% (8658) è stato confermato), con un'incidenza pari a 2,4 casi su 100.000 abitanti. Il più alto numero di casi si è verificato in Germania e in Regno Unito, ma i paesi con il maggior tasso di incidenza sono stati Irlanda, Norvegia, Svizzera, Malta e Danimarca. I sierotipi più frequentemente identificati sono O157, O26, O103, O91 e O145 (ECDC, 2020). Si può, pertanto, affermare che i sierogruppi O26 e O103, oltre a O157, si trovano tra i primi sei STEC diffusi nei paesi europei ed extraeuropei, e sono associati a sintomi gravi di SEU e ad ospedalizzazione. Il sierogruppo O26, in particolare, è associato ad un'ampia serie di disordini gastroenterici (Vishram et al., 2021).

Per quanto riguarda la carne bovina, nel 2020 sono state analizzate 5.109 unità campionarie da quindici stati membri della UE; di queste, l'1.6% è risultato positivo. Si è evidenziata una differenza significativa tra la carne venduta al dettaglio (2.6% di positività) e quella analizzata in macello (1.2% di positività). Gli STEC identificati appartenevano a ventotto sierogruppi diversi, di cui i più comuni erano O157, seguito da O26 e da O91 (EFSA e ECDC, 2020).

In Inghilterra il sierogruppo STEC maggiormente riscontrato è sicuramente O157 (Byrne et al., 2015), pur essendone identificati altri, molti dei quali responsabili di patologie nell'uomo e di focolai molto gravi. L'importanza degli STEC non-O157 è sempre più evidente, in quanto risultano responsabili di diarrea, diarrea emorragica e SEU nell'uomo. Tuttavia, mentre i fattori di virulenza e le manifestazioni cliniche associate a STEC O157 sono state ampiamente descritte, la sorveglianza nei confronti degli STEC non-O157 è risultata più tardiva, soprattutto per la mancanza di semplici metodologie di isolamento (Vishram et al., 2021). In tutti i paesi europei, gli STEC non-O157 sono stati identificati come causa di gravi malattie e riportati a livello europeo nel piano di sorveglianza del 2010 come causa di molte infezioni, sviluppo di SEU e ospedalizzazioni. È da considerare, ad esempio, che tra gennaio 2009 e fine dicembre 2012, sono stati riscontrati in Inghilterra 3.717 casi di infezioni da STEC nell'uomo, con una

maggior incidenza nei bambini da uno a quattro anni, e proprio gli STEC non-O157 sono stati associati ad un più alto numero di ospedalizzazioni e insorgenza di SEU (Byrne et al., 2015). Dal 2013, diversi laboratori negli ospedali inglesi hanno introdotto la metodica basata sulla PCR come metodo diagnostico delle infezioni da STEC, con l'utilizzo di primers che includono i geni produttori di Stx 1 e Stx2. In questo modo sono aumentati anche i casi diagnosticati di infezioni da non-O157. Tra il 2014 e il 2018, i sierotipi più comunemente rilevati in Inghilterra sono stati O26, O146, O91, O128, O103 e O117. In Europa, in generale, sono stati maggiormente riscontrati O26, O103, O91 e O145 (Vishram et al., 2021). In Inghilterra rimane elevata la morbilità per le infezioni da STEC, infatti un terzo dei pazienti vengono ospedalizzati e sviluppano SEU nel 6,4% dei casi (Byrne et al., 2015).

In Irlanda vige l'obbligo di notificare le infezioni da STEC dal primo gennaio del 2004, come riportato dall' Infectious Diseases (Amendment) Regulation N. 707 del 2003, che sono passate da 65 casi nel 2004 a 702 casi nel 2013 e 721 nel 2014. Il sierotipo maggiormente rilevato è stato, inizialmente, O157, che ad oggi causa più di duecento casi di infezione all'anno nel paese. STEC O26 ha avuto un incremento importante, con severe manifestazioni cliniche di diarrea e SEU (Ohaiseadha et al., 2017) fino a che, nel 2017, è divenuto il sierotipo più comune, seguito da O157, O145, O103, O5 e O111 (Vishram et al., 2021). Il picco di infezioni, normalmente, si verificato durante l'estate, proprio quando le mandrie di animali reservoir sono al pascolo. Studi internazionali, infatti, hanno dimostrato una correlazione tra l'incidenza delle infezioni nell'uomo e la densità di bovini nel territorio (Ohaiseadha et al., 2017). Anche in Inghilterra, tra gennaio 2009 e fine dicembre 2012, si è osservata una maggior incidenza delle infezioni da STEC nelle zone rurali, rispetto a quelle urbane, dimostrando che la contaminazione ambientale e la trasmissione dovuta al contatto con gli animali reservoir rappresentano un importante fattore di rischio per la salute pubblica. Irlanda e Scozia riportano il doppio delle infezioni annuali rispetto all'Inghilterra, dove, comunque, il maggior numero di casi è notificato nelle regioni del nord e dell'ovest, riflettendo il maggior numero di casi che si osserva nelle zone rurali, rispetto a quelle urbane. Nella stessa Inghilterra si è osservata un'ampia variazione geografica nel rilevamento degli STEC, con incidenza minore nelle zone di Londra e maggiore in quelle dello Yorkshire e di Humber (Byrne et al., 2015).

In Svizzera è stato svolto uno studio che ha preso in considerazione l'aumento dei casi di infezione da STEC tra il 2007 e il 2016, per valutarne l'incremento effettivo. L'aumento più

significativo nel numero dei casi si è verificato a partire dal 2015 con il rilevamento di diversi sierogruppi responsabili dei casi di malattia, tra i quali anche la SEU (Fischer et al., 2020).

Per quanto riguarda la carne bovina, sono stati segnalati alcuni casi sporadici di infezione da STEC riconducibili al suo consumo. In Olanda si sono verificate infezioni da STEC in due donne di mezza età, una nel 2019 e una nel 2020, che presentavano crampi addominali e diarrea emorragica. Nessuna delle due pazienti aveva dichiarato di aver intrapreso viaggi nei periodi precedenti la malattia, ma entrambe avevano consumato carne di manzo cotta: la paziente dell'anno 2019 riportava di aver mangiato carne di manzo macinata, mentre quella del 2020 citava diversi alimenti tra i quali carne di manzo, hamburger, ma anche ortaggi e frutta. In queste pazienti è stato isolato STEC O104:H4, cioè il microrganismo responsabile del grande focolaio tedesco del 2011 (Coipan et al., 2022). In tale circostanza, nell'arco di tre mesi sono stati identificati 3816 casi di infezione da STEC, dei quali il 22% (845) ha sviluppato SEU. Il focolaio ha causato 54 decessi (Denamur et al., 2021) e le persone coinvolte nel focolaio erano per la maggior parte (88%) adulti (Kaper and O'Brien, 2014). La patogenicità di questo sierotipo è da attribuirsi, probabilmente, ad una combinazione di fattori di virulenza presenti anche negli EAEC. Il sierotipo O104:H4 era già stato identificato, pochi mesi prima, in Georgia (Allocati et al., 2013). La causa dell'infezione umana, in Germania, è stata attribuita al consumo di germogli di fieno greco, riportati poi come fonte di contaminazione anche in un focolaio avvenuto in Francia, a Bordeaux, alla fine dello stesso anno (EFSA, 2011a).

Dopo il focolaio del 2011, nel corso degli anni si sono verificati casi sporadici di infezione da STEC O104:H4, la maggior parte riscontrati in Turchia e Nord Africa. Analisi successive hanno dimostrato la presenza di un antenato comune tra i vari ceppi, avvalorando l'ipotesi che diverse varianti di STEC O104:H4, più o meno distanti geneticamente, circolassero in tutto il mondo, contaminando svariate fonti di infezione per l'uomo. Nel 2021, ad esempio, l'Austrian Agency for Health and Food Safety (AGES) ha identificato il sierotipo O104:H4 in una bambina di dieci anni con SEU, che aveva consumato carne di vitello cruda. Data la virulenza del sierotipo, è sicuramente necessario ottimizzare la sorveglianza nella catena di produzione degli alimenti per proteggere la salute pubblica ed evitare futuri focolai (Coipan et al., 2022).

Altri focolai da STEC verificatisi in Europa sono relativi al consumo di latte crudo e prodotti derivati. In Inghilterra e in Galles, ad esempio, una piccola percentuale della popolazione consuma latte crudo. In ogni caso, il latte crudo per essere venduto come tale in questi due paesi deve essere testato trimestralmente e deve essere controllato anche l'allevamento dal quale proviene, che deve risultare indenne da tubercolosi e brucellosi. In commercio il prodotto deve, poi, riportare la dicitura: *“Il latte non è stato trattato termicamente e può quindi contenere organismi nocivi per la salute”*. Nonostante queste misure di prevenzione, però, si sono verificati diversi focolai di infezione da STEC attribuibili al consumo di latte crudo (Ce.I.R.S.A., 2006).

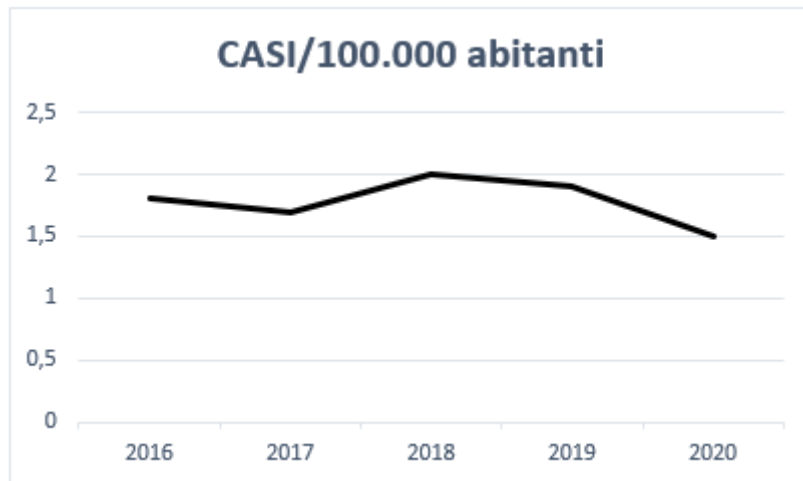
Anche in Austria nel febbraio del 2017 si sono verificati casi di gastroenterite dopo una gita scolastica in Germania, in cui sono stati coinvolti studenti e insegnanti tra i 17 e i 41 anni che hanno consumato latte crudo in un hotel. I sintomi comprendevano diarrea, vomito e dolori addominali, comparsi nei dieci giorni dopo il viaggio, e gli STEC O26 nelle feci dei partecipanti sono stati isolati anche dopo quattro settimane. Durante le indagini, le autorità austriache hanno individuato che una partita di latte crudo vaccino era stato consegnato privo di etichetta all'hotel in questione, servito per colazione proprio nel periodo del focolaio (Mylius et al., 2018).

Nel 2020 nella UE sono stati confermati 4.446 casi di infezione da STEC, che è risultato il quarto patogeno responsabile di zoonosi nell'uomo. Dai dati ottenuti sembra che non si sia verificato un significativo incremento di casi dal 2016 al 2020, ma che piuttosto il tasso di incidenza sia rimasto stabile (Tabella 1; Grafico 1) (EFSA e ECDC, 2020).

	2020	2019	2018	2017	2016
Casi confermati	4446	7801	8167	6071	6474
Casi confermati / 100.000 abitanti	1.5	1.9	2.0	1.7	1.8
Numero di casi da focolai legati al consumo di alimenti	208	273	390	260	737
Focolai legati al consumo di alimenti	34	42	50	48	43

**Tabella 1:** Numero di casi di infezione da STEC nell'uomo negli anni 2016-2020 in UE.

The European Union One Health 2020 Zoonoses Report, EFSA e ECDC (2020)



**Grafico 1:** Incidenza dei casi di infezione da STEC nell’uomo nel periodo 2016-2020 in UE.  
The European Union One Health 2020 Zoonoses Report, EFSA e ECDC (2020)

Nell’anno 2020, in Europa, si sono verificati 34 focolai da STEC legati al consumo di alimenti, che hanno determinato 208 casi di infezione, 30 ospedalizzazioni e un decesso. Tra le principali fonti di trasmissione all’uomo è citata, dopo l’acqua contaminata, la carne, insieme ai prodotti che da essa derivano, e i latticini. Sono stati testati anche i prodotti *ready to eat*, tra i quali l’1,3% è risultato positivo a STEC; di questi campioni positivi, l’1,7% era a base di carne. I dati del 2020 hanno confermato la stagionalità, con aumento dei casi nei mesi estivi, delle infezioni da STEC, come già osservato negli anni precedenti (2010 – 2019) (EFSA e ECDC, 2021).

## 6.1. La zoonosi da STEC in Italia

In Italia, dal 1988 al 2018 i casi di SEU sono aumentati costantemente e i sierotipi maggiormente identificati nei casi di infezione sono rappresentati da STEC non-O157, in particolare O26 e O111 che sono i più comuni nel nostro paese (Loconsole et al., 2020).

Un focolaio da STEC O26 ha coinvolto sei persone, causando il decesso di una di loro, a Salerno nel 2005; anche se le indagini epidemiologiche non hanno individuato con certezza la fonte d’infezione, ma ipotizza che sia correlata al consumo di latticini (Lorusso et al., 2009).

Un aumento significativo dei casi di SEU si è verificato nella regione Puglia, dove nell’estate del 2013 STEC O126 produttore di Stx2 è stato causa di un focolaio in alcuni bambini, due dei quali hanno riportato gravi danni neurologici conseguenti alla malattia (Loconsole et al., 2019).

Solo da sette di questi pazienti, in realtà, si è isolato unicamente STEC O26, mentre in tutti gli

altri casi le analisi (in particolare mediante PFGE) suggerivano un possibile focolaio ad eziologia multipla, probabilmente dovuto al consumo di latticini (Luzzi et al., 2017).

In questa regione il numero di casi pediatrici di SEU rilevati annualmente è il più alto di tutto il paese (0,67 casi su 100.000 abitanti) e tra il 2008 e il 2017 è aumentato di quattro volte rispetto al decennio precedente, principalmente per il focolaio del 2013. Inoltre, tra gennaio 2017 e giugno 2018 si è verificato un numero superiore di casi sporadici di SEU legati a infezioni da STEC rispetto a quello atteso. A seguito del focolaio pugliese del 2013, in Italia si è implementato un sistema di sorveglianza basato sui sintomi (diarrea emorragica in età pediatrica), così da consentire l'identificazione precoce dei pazienti a rischio di SEU e rilevare i focolai di STEC tempestivamente (Loconsole et al., 2020).

Sempre nel 2013, STEC O26 è stato responsabile di un'altra epidemia verificatasi a Roma, in un asilo nido, che ha coinvolto undici casi tra bambini, familiari e personale della scuola. In dieci dei casi di SEU è stato isolato STEC O26 (Luzzi et al., 2017).

Nel periodo 2010-2015 in Italia sono stati diagnosticati 139 casi di infezione da STEC e nella maggior parte dei casi (75 casi, pari al 54%) si trattava di episodi di SEU, mentre i restanti sono stati riscontrati tra familiari di pazienti con SEU, pazienti pediatrici con diarrea emorragica e altri casi sporadici di diarrea riscontrati sul territorio nazionale. Nel 40% dei casi si è identificato il sierogruppo O26, seguito in ordine di frequenza da O157, O111, O103 e O145. Gli altri sierogruppi non superavano l'1%, ad eccezione di O127 (4%) riconducibile ad un unico episodio epidemico avvenuto nel 2013 in una scuola materna del nord Italia (nove pazienti colpiti e quattro casi di SEU). STEC O127 è risultato privo del gene *eae* e dotato, invece, dei geni *aggR* e *aaiC* tipici degli EAEC, dimostrandosi atipico rispetto agli altri isolati patogeni umani, ma ugualmente virulento. Queste caratteristiche rendono STEC O127 simile a STEC O104:H4 (Luzzi et al., 2017).

## 7. Prevenzione

Per la prevenzione delle infezioni legate al consumo degli alimenti sono necessari un efficiente monitoraggio e una sorveglianza mirata. I metodi di indagine epidemiologica, ad oggi, sono in costante evoluzione. Perché si possano mettere in atto corrette procedure di sorveglianza e prevenzione rispetto all'infezione da STEC, è necessario stilare un metodo di controllo appropriato, il quale necessita di rilevare il patogeno in ogni sua potenziale fonte di contaminazione, ovvero gli animali reservoir, gli alimenti e l'ambiente (Newel and La Ragione, 2017).

La riduzione della prevalenza di STEC dovrebbe essere un obiettivo comune alle varie fasi di produzione degli alimenti, da perseguire già in allevamento, durante il trasporto degli animali e successivamente in macello e nella lavorazione delle carni. Da ultimo, ma non meno importante, sarebbe necessario informare il consumatore finale sulle buone pratiche di igiene e di cottura del prodotto finito (Hancock et al., 2001).

Le infezioni umane da STEC sono soggette a notifica obbligatoria in tutti gli Stati dell'Unione Europea e della European Economic Area, ad eccezione di Francia, Lussemburgo, Spagna, Italia e Regno Unito. In ogni caso, la maggior parte dei paesi attua una sorveglianza passiva (Loconsole et al., 2020).

I focolai di infezione da STEC sono principalmente legati al consumo di alimenti, e pertanto è fondamentale disporre di un metodo affidabile di identificazione degli alimenti contaminati per ridurre l'incidenza delle infezioni umane. Questo approccio richiede sicuramente la collaborazione di diverse figure professionali quali clinici, microbiologi, veterinari e specialisti in salute pubblica e sicurezza alimentare (Werber et al., 2012).

### 7.1. Norme vigenti

Il Reg. CE 2073/2005 stabilisce i criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari e le norme di attuazione che gli operatori del settore alimentare (OSA) devono rispettare nell'applicazione delle misure di igiene generali e specifiche di cui l'art.4 del Regolamento (CE) n.852/2004. L'autorità competente, se lo ritiene necessario, ha il diritto di procedere ad ulteriori campionamenti ed analisi per la rilevazione della presenza di microrganismi, tossine o metaboliti, nelle diverse atrici alimentari o come verifica dei processi e delle analisi attuati

dagli OSA o nel contesto dell'analisi del rischio (Reg. CE 2073/2005). Nel Reg. CE 2073/2005 vengono date alcune definizioni:

- Criterio microbiologico: definisce l'accettabilità di un prodotto, di una partita di prodotti alimentari o di un processo, in base all'assenza, alla presenza o al numero di microrganismi e/o in base alla quantità delle relative tossine o dei relativi metaboliti, per unità di massa, volume, area o partita;
- Criterio di sicurezza alimentare: definisce l'accettabilità di un prodotto o di una partita di prodotti alimentari e si applica ai prodotti immessi sul mercato;
- Criterio di igiene di processo: definisce il funzionamento accettabile del processo di produzione dei prodotti. Si applica ai prodotti non ancora immessi sul mercato. Viene fissato un valore indicativo di contaminazione al di sopra del quale sono necessarie misure correttive per il mantenimento dell'igiene del processo di produzione;
- Conformità ai criteri microbiologici: ottenimento di risultati soddisfacenti o accettabili nei controlli volti ad accertare la conformità ai valori fissati per i criteri mediante il prelievo di campioni, l'effettuazione di analisi e l'attuazione di misure correttive, conformemente alla legislazione in materia di prodotti alimentari e alle istruzioni dell'autorità competente

Limitatamente ai paesi europei, la presenza di *Escherichia coli* negli alimenti è considerata come indicatore delle contaminazioni di origine fecale (Reg. CE 2073/2005). Le disposizioni comunitarie del Reg. CE 2073/2005 prevedono la ricerca di *E. coli* tra i criteri di igiene di processo per un ristretto gruppo di prodotti e con limiti accettabili piuttosto elevati, consultabili nel regolamento stesso, il cui superamento comporta azioni correttive a livello di miglioramento delle condizioni igieniche del processo di produzione (Zavanella et al., 2009).

Alcuni stati non europei hanno stabilito, invece, criteri microbiologici specifici per gli STEC negli alimenti: in USA, ad esempio, è obbligatoria l'assenza dei sierogruppi O26, O45, O103, O111, O121 e O145 nella carne macinata e nella carne fresca di bovino. Secondo le normative dell'Unione Europea, invece, il criterio microbiologico degli STEC è applicato soltanto ai semi germogliati, in particolare per la presenza di STEC O157, O26, O111, O103, O145 e O104:H4 (Reg. CE 2073/2005; Reg. UE 209/2013).

*E. coli* viene citato tra i criteri di sicurezza alimentare solamente nel caso di molluschi, echinodermi tunicati e gasteropodi vivi, con un limite molto restrittivo (Zavanella et al., 2009).



Sono poi presenti altri alimenti i cui limiti per la presenza di *E. coli* sono regolati da disposizioni normative, ovvero l'acqua potabile non confezionata e l'acqua in bottiglie o in contenitori (regolamentate dal D.L. 02/02/01 n.31) e le paste farcite precotte surgelate (Circ. Min. 03/08/85 n.32). Per tutti questi prodotti si calcolano i limiti "m" di accettabilità microbiologica e "M" riguardante la carica massima tollerabile in due unità campionarie su cinque unità totali. Deve esserci totale assenza di *E. coli* sia per l'acqua (in 100 ml per quella non confezionata e in 250ml per quella in bottiglia o contenitore), che per le paste farcite surgelate (in un grammo su cinque unità campionarie) (Zavanella et al., 2009).

Nei criteri di igiene di processo si parla nello specifico di "Carcasse di bovini, ovini, caprini ed equini" per le quali si definiscono i criteri microbiologici relativi genericamente al conteggio di colonie aerobiche e alle *Enterobacteriaceae* (Tabella 3); questo ultimo parametro è considerato indicatore della possibile contaminazione anche da STEC, che tuttavia non viene citato nello specifico e viene solo accennato nei consideranda del Reg. CE 2073/2005.

Categoria alimentare	Microrganismi / tossine o metaboliti	Piano di campionamento		Limiti		Metodo di analisi di riferimento	Fase in cui si applica il criterio	Fase in cui si applica il criterio
		n	c	m	M			
Carcasse di bovini ovi-caprini ed equidi	Conteggio delle colonie aerobiche			3,5 log ufc/cm <sup>2</sup> log medio giornaliero	5,0 log ufc/cm <sup>2</sup> log medio giornaliero	ISO 4833	Carcasse dopo la macellazione, ma prima del raffreddamento	Miglioramento delle condizioni igieniche di macellazione e revisione dei controlli del processo
	<i>Enterobacteriaceae</i>			1,5 log ufc/cm <sup>2</sup> log medio giornaliero	2,5 log ufc/cm <sup>2</sup> log medio giornaliero	ISO 21528-2	Carcasse dopo la macellazione, ma prima del raffreddamento	Miglioramento delle condizioni igieniche di macellazione e revisione dei controlli del processo

**Tabella 3:** Criteri di igiene di processo delle carcasse di bovini, ovi-caprini ed equidi (Reg. CE 2073/2005).

Le norme regolamentano i metodi di campionamento anche delle carcasse bovine e i siti dai quali vengono prelevati i campioni, da scegliere tenendo conto della tecnica di macellazione in ciascun impianto. In ogni sessione di campionamento devono essere prelevate casualmente cinque carcasse. Quando si fa il campionamento per la ricerca delle *Enterobacteriaceae* e il conteggio delle colonie aerobiche, i prelievi devono essere fatti in quattro siti di ogni carcassa, per un totale di 20 cm<sup>2</sup> se si utilizza il metodo distruttivo, mentre in caso contrario – metodo non distruttivo – si prelevano campioni da quattro aree per un totale di 400 cm<sup>2</sup> (Reg. CE 2073/2005).

*E. coli* è considerato specificatamente solo per quanto riguarda le carni macinate (Tabella 4), le carni separate meccanicamente (CSM) (Tabella 5) ed i preparati a base di carne (Tabella 6), prodotti per cui sono definiti i limiti microbiologici (Reg. CE 2073/2005).

Categoria alimentare	Microrganismi / tossine o metaboliti	Piano di campionamento		Limiti		Metodo di analisi di riferimento	Fase in cui si applica il criterio	Fase in cui si applica il criterio
		n	c	m	M			
Carni separate meccanicamente	Conteggio delle colonie aerobiche	5	2	5x10 <sup>5</sup> ufc/g	5x10 <sup>6</sup> ufc/g	ISO 4833	Fine processo di lavorazione	Miglioramento delle condizioni igieniche di macellazione e revisione dei controlli del processo
	<i>E. coli</i>	5	2	50 ufc/g	500 ufc/g	ISO 16649-1 o 2	Fine processo di lavorazione	Miglioramento delle condizioni igieniche di macellazione e revisione dei controlli del processo

**Tabella 4:** Criteri di igiene di processo applicabili alle carni separate meccanicamente (Reg. CE 2073/2005).

Categoria alimentare	Microrganismi / tossine o metaboliti	Piano di campionamento		Limiti		Metodo di analisi di riferimento	Fase in cui si applica il criterio	Fase in cui si applica il criterio
		n	c	m	M			
Carne Macinata	Conteggio delle colonie aerobiche	5	2	5x10 <sup>5</sup> ufc/g	5x10 <sup>6</sup> ufc/g	ISO 4833	Fine processo di lavorazione	Miglioramento delle condizioni igieniche di macellazione e revisione dei controlli del processo
	<i>E. coli</i>	5	2	50 ufc/g	500 ufc/g	ISO 16649-1 o 2	Fine processo di lavorazione	Miglioramento delle condizioni igieniche di macellazione e revisione dei controlli del processo

**Tabella 5:** Criteri di igiene di processo applicabili alla carne macinata (Reg. CE 2073/2005).

Categoria alimentare	Microrganismi / tossine o metaboliti	Piano di campionamento		Limiti		Metodo di analisi di riferimento	Fase in cui si applica il criterio	Fase in cui si applica il criterio
		n	c	m	M			
Preparazioni di carne	<i>E. coli</i>	5	2	500 ufc/g o cm <sup>2</sup>	500 ufc/g o cm <sup>2</sup>	ISO 16649-1 o 2	Fine processo di lavorazione	Miglioramento delle condizioni igieniche di macellazione e revisione dei controlli del processo

**Tabella 6:** Criteri di igiene di processo applicabili alle preparazioni di carne (Reg. CE 2073/2005).

I risultati per *E. coli* e conteggio delle colonie aerobiche possono essere i seguenti:

- soddisfacente: tutti i valori osservati sono pari o inferiori a *m*
- accettabile: se un massimo di *c/n* valori è compreso tra *m* e *M* e i restanti valori sono pari o inferiori a *m*
- insoddisfacente: uno o più valori osservati sono superiori a *M* o più di *c/n* valori sono compresi tra *m* e *M* (Reg. CE 2073/2005).

La disamina delle norme in vigore mette in evidenza che, nonostante i prodotti a base di carne bovina, consumati crudi o poco cotti, siano una delle fonti più comuni di infezione da STEC nell'uomo (Erickson et al., 2021), le disposizioni legislative europee non prendono in considerazione gli STEC.

Il Reg. CE 852/2004 è relativo all'igiene dei prodotti alimentari e stabilisce le norme generali in materia di igiene, destinate agli OSA, i quali, secondo l'art. 4, devono accertarsi che vengano rispettati i criteri d'igiene indicati dal Reg. CE 853/2004, rispettando pertanto i criteri microbiologici, i criteri per le temperature di lavorazione degli alimenti, il mantenimento della catena del freddo, i metodi di campionamento ed eseguendo le analisi. Come da art.5, inoltre, gli OSA predispongono, attuano e mantengono una o più procedure permanenti basate sui principi del sistema HACCP (Reg. CE 852/2004).

Anche secondo il Reg. CE 2073/2005 sono OSA a dover provvedere alla conformità dei prodotti e al rispetto dei relativi criteri microbiologici, adottando provvedimenti nell'ambito delle procedure HACCP e delle prassi corrette in materia d'igiene in ogni fase della produzione, della lavorazione e della distribuzione, inclusa la vendita al dettaglio, per garantire che:

- la fornitura, la manipolazione e la lavorazione delle materie prime e dei prodotti alimentari che dipendono dal loro controllo si effettuino nel rispetto dei criteri di igiene di processo;
- i criteri di sicurezza alimentare applicabili per l'intera durata del periodo di conservabilità dei prodotti possano essere rispettati a condizioni ragionevolmente prevedibili di distribuzione, conservazione e uso (Reg. CE 2073/2005).

I punti critici della produzione della carne bovina, e dei suoi derivati, sui quali focalizzarsi per ridurre la contaminazione da STEC sono: allevamento animali vivi, macellazione (rimozione da pelle ed eviscerazione) e maneggiamento delle carcasse (Nam-Hee et al., 2017).

A tal proposito, nel 2005, la Codex Alimentarius Commission ha imposto un codice di pratiche igieniche per la carne (Code of Hygienic Practice for Meat, CAC) raccomandando un approccio

integrato e basato sul rischio per assicurare la sicurezza delle carni. In continuità esso, EFSA ha proposto il *risk-based meat safety assurance system* (RB-MSAS), presentato e discusso nelle opinion EFSA del 2011, 2012, e 2013 (Nastasijević et al., 2020). RB-MSAS combina una serie di misure preventive e di controllo da applicare sia negli allevamenti che nei macelli. I presupposti per un RB-MSAS di successo sono la tracciabilità degli animali e delle carni, un robusto sistema di monitoraggio per i rischi biologici e chimici, nonché la raccolta e l'analisi delle informazioni sulla catena alimentare (ICA) (Blagojevic et al., 2021; Nastasijević et al., 2020), indispensabili per prendere decisioni in merito alla gestione del rischio (Blagojevic et al., 2021).

Il Center of Disease Control and Prevention (CDC) ha suddiviso i rischi biologici in tre categorie:

- Categoria A: agenti patogeni facilmente disseminati e diffusi da persona a persona, con alta mortalità e alto impatto sulla salute pubblica
- Categoria B: patogeni moderatamente facili da disseminare, con moderate morbilità e bassa mortalità
- Categoria C: patogeni emergenti con potenziale alta morbilità.

STEC O157:H7 è stato inserito nella categoria C come *minaccia per la sicurezza alimentare* (Allocati et al., 2013).

La sicurezza della carne, riguardo la contaminazione da STEC, è da considerarsi fondamentale sia per la sanità pubblica che per quanto riguarda l'aspetto economico. Secondo alcuni autori, il controllo dovrebbe essere svolto lungo tutta la catena di produzione della carne; ossia dall'allevamento, al macello, alla lavorazione della carne, alla sua distribuzione e vendita al dettaglio, per giungere fino al consumatore (Nastasijević et al., 2020).

Un approccio integrato tra sicurezza alimentare e salute pubblica era già stato proposto da Prescott (1920), Meyer (1931) e Wilson (1933), ma solo negli anni Sessanta ha preso piede l'applicazione delle procedure basate sul sistema HACCP. Il coinvolgimento della Food and Agriculture Organization (FAO) e la World Health Organization (WHO) in materia di igiene delle carni risale al 1950, quando fu emesso il primo rapporto tecnico congiunto FAO/OMS nel quale fu riconosciuto il ruolo dell'ispezione delle carni per la salvaguardia del consumatore e la prevenzione delle patologie da esse trasmissibili (Blagojevic et al., 2021).

Tuttavia, nonostante gli sforzi internazionali, il controllo degli STEC nella filiera delle carni non è normato a livello europeo. Negli Stati Uniti, invece, oltre all'obbligatoria assenza di STEC O157:H7 nelle carni di manzo, sono presenti criteri microbiologici anche per gli STEC non-

O157: deve esserci completa assenza di sierogruppi O26, O45, O103, O111, O121 e O145 nella carne di manzo macinata. Anche nel Sud America, recentemente, l'Argentinean Food Code (AFC) ha introdotto l'obbligo di un monitoraggio per il rilevamento dei sierogruppi O26, O103, O111, O121 e O145 nella carne macinata, nei prodotti alimentari *ready to eat*, nelle salsicce e nei vegetali, oltre alla ricerca di STEC O157:H7 (Brusa et al., 2017).

In attuazione dell'articolo 33 del Regolamento (CE) 882/2004 è stato designato, dal Ministero della Salute, il Laboratorio Nazionale di Riferimento (LNR) per *Escherichia coli*, con particolare riferimento ai ceppi patogeni per l'uomo, tra cui gli STEC. Il LNR opera presso il Reparto di Sicurezza microbiologica degli alimenti e malattie a trasmissione alimentare, nel Dipartimento di Sicurezza alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria (DSANV) dell'Istituto Superiore di Sanità. Questo laboratorio svolge anche le funzioni di Laboratorio Europeo di Riferimento per *E. coli* (EU Reference Laboratory for *E. coli*, EURL-VTEC) su mandato della Commissione europea. L'ISS, inoltre, ha designato il Laboratorio di Riferimento per la diagnostica e la sorveglianza delle infezioni da STEC nell'uomo e l'Operational Contact Point (OCP) italiano dell'European Centre for Disease Control (ECDC) relativo a queste infezioni (ISS, 2021). Il LNR per gli *E. coli* patogeni ha competenza in tutti i casi in cui sia necessario confermare la patogenicità di uno stipite STEC responsabile di malattia nell'uomo, negli animali o sia presente come contaminante di alimenti e mangimi.

## 7.2. Prevenzione in allevamento

L'infezione da STEC viene considerata, da alcuni ricercatori, addirittura ubiquitaria negli allevamenti bovini, con un picco di incidenza in estate e all'inizio dell'autunno. I bovini adulti albergano gli STEC senza che vi siano manifestazioni cliniche, mentre negli animali giovani possono comparire sintomi enterici. Spesso la diffusione nell'ambiente tramite le feci presenta una fase acuta, alternata a lunghi periodi di bassa prevalenza del patogeno negli animali portatori (Hancock et al., 2001).

Gli animali escretori in allevamento aumentano soprattutto durante la stagione estiva, ma anche a seguito di eventuali variazioni nell'alimentazione e in presenza di fattori stressanti come trasporti, digiuno o cambi di gruppo (Zavanella et al., 2009). Gli alimenti e l'acqua, in allevamento, rappresentano la maggior fonte di contaminazione e successiva colonizzazione intestinale del bovino da parte degli STEC. I processi di produzione dei mangimi dovrebbero

garantire l'eliminazione degli *E. coli* patogeni (tra cui STEC), ma la contaminazione può avvenire anche in azienda per la cross-contaminazione durante lo stoccaggio o l'utilizzo stesso dei mangimi. Inoltre, gli STEC possono persistere nell'acqua degli abbeveratoi (STEC O157:H7 sopravvive anche per più di quattro mesi) con aumento delle infezioni nei bovini (Zavanella et al., 2009). Questo fa sì che l'acqua di abbeverata possa essere una fonte importante di infezione per i ruminanti e rende necessarie pratiche di decontaminazione e disinfezione periodiche degli abbeveratoi (Nam-Hee et al., 2017). STEC O157:H7 ha una sopravvivenza prolungata anche nelle feci e nei liquami (Zavanella et al., 2009), persistendo nel materiale organico utilizzato come concime utilizzato, ad esempio, per l'irrigazione dei campi agricoli. Da questo deriva la contaminazione da STEC dei vegetali consumati dall'uomo (Fairbrother e Nadeau, 2006) e l'associazione di frutta o ortaggi responsabili di focolai con le feci bovine (Hancock et al., 2001).

Una misura importante di prevenzione per ridurre il rischio di contaminazione da STEC degli alimenti e di malattia nell'uomo, è la riduzione della contaminazione fecale negli allevamenti non solo tra gli animali, ma anche a livello di ambiente, alimenti e acqua (Wasteson, 2001).

Per contrastare la diffusione di STEC in allevamento sono fondamentali buone pratiche igieniche e gestionali, quali: ridurre la contaminazione dell'acqua con regolari pulizie delle vasche da abbeverata, mantenere la lettiera pulita e asciutta, evitare il contatto tra animali adulti e giovani, non fare variazioni alimentari brusche e ridurre i fattori stressanti per i bovini (Zavanella et al., 2009). L'attuazione delle *good hygienic practices* è la strategia primaria in assoluto, e non riguarderebbe soltanto l'animale in sé, ma anche l'alimentazione e la gestione dell'allevamento. Infatti, possono essere considerati fattori di rischio per l'ingresso e la persistenza di STEC in allevamento anche l'acquisto di bovini da altri allevamenti ed il contatto in generale con bestiame esterno all'azienda (pascolo promiscuo, re-introduzione di capi usciti per fiere) e l'impiego di alimenti contaminati da materiale fecale. Va inoltre considerato il ruolo di altri animali presenti nelle aziende o a contatto con i bovini, come roditori, uccelli e fauna selvatica (Zavanella et al., 2009), per i quali sono necessarie specifiche misure di biosicurezza (Nam-Hee et al., 2017).

Nell'ambito della prevenzione, sono state messe in atto e studiate differenti strategie che riguardano direttamente la protezione del tratto gastroenterico del bovino in allevamento, come ad esempio la vaccinazione, il trattamento con probiotici, antibiotici, batteriofagi e la modificazione della dieta. L'approccio vaccinale richiede alcune ottimizzazioni in quanto

infettando gli animali sperimentalmente si è ottenuta una riduzione della eliminazione fecale degli STEC, ma il risultato in campo non ha dato gli stessi risultati ottenuti negli studi sperimentali. Un altro promettente approccio riguarda, invece, l'impiego di anticorpi presenti nel tuorlo d'uovo di galline precedentemente immunizzate con specifici fattori di virulenza degli STEC, che hanno dimostrato essere funzionali nella riduzione della diffusione fecale di O157 in ovini infettati sperimentalmente (Fairbrother e Nadeau, 2006).

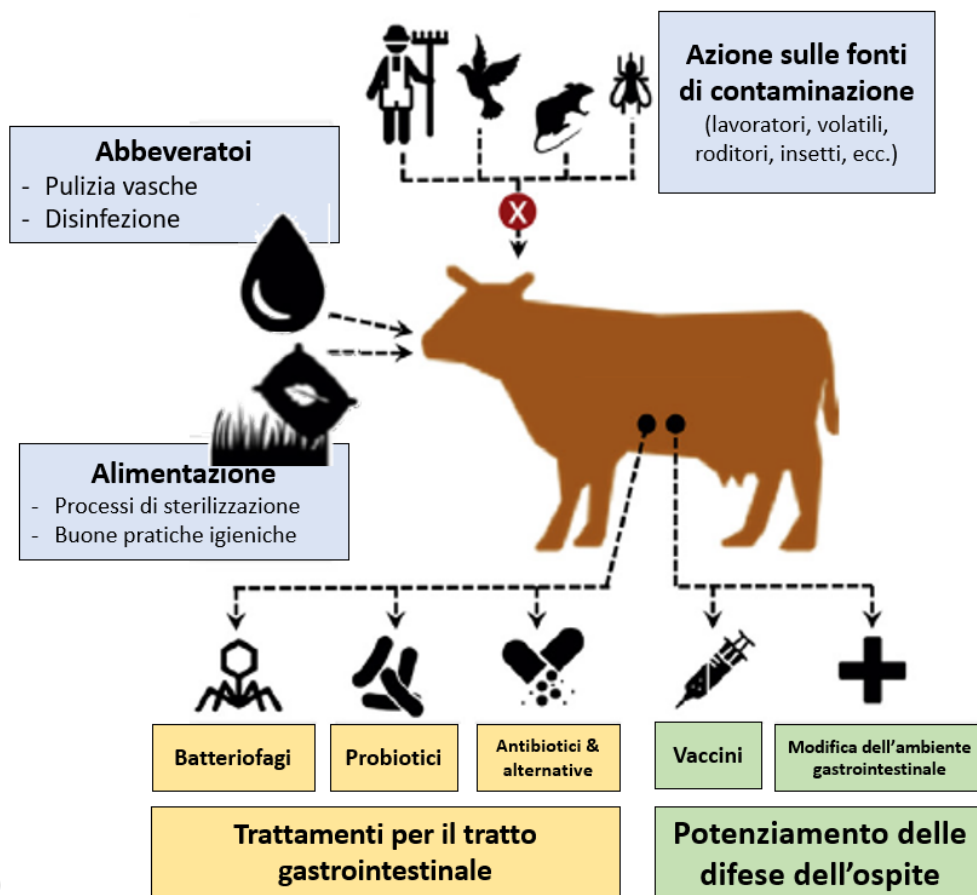
In merito ai trattamenti con probiotici, i primi studi erano basati su STEC O157:H7 e l'utilizzo di *Lactobacillus acidophilus* e colicin-producing *E. coli*, e mostravano risultati variabili. *Lactobacillus acidophilus* e *Propionibacterium freudenreichii* si sono dimostrati utili per il controllo di STEC O26 nei bovini, ma non hanno avuto una reale efficacia nella riduzione dell'eliminazione tramite le feci (Nam-Hee et al., 2017). Si è osservato che *Lactobacillus acidophilus* riduce il carico fecale di STEC O157 del 50% nei bovini, ma non di STEC O26 nei vitelli svezzati (Fairbrother e Nadeau, 2006).

L'utilizzo degli antibiotici, tra i quali neomicina, clortetraciclina e tilosina, invece, riduce sicuramente il numero degli STEC nelle feci, ma è fortemente sconsigliato per l'instaurarsi di antibiotico-resistenza e per i problemi che da essa derivano. Per ovviare all'impiego di antibiotici, sono stati condotti studi riguardanti antibatterici naturali come alghe, prodotti agrumati, tannini, composti fenolici, oli essenziali, acidi organici e lattoferrina (Nam-Hee et al., 2017).

I batteriofagi, sono stati utilizzati con specifico target per STEC O157, del quale apparentemente controllavano la crescita in laboratorio e hanno dimostrato risultati promettenti anche negli ovini infettati sperimentalmente (Fairbrother e Nadeau, 2006).

A seguito della consapevolezza che gli STEC O157 e non-O157 sopravvivono in condizioni acide e persistono nel contenuto del rumine, era stato ipotizzato che una dieta ricca di cereali, in grado di modificare l'ambiente gastrointestinale dei bovini, potesse indurre STEC ad aumentare la sua acido-resistenza, per poi essere facilitato nella sopravvivenza all'acidità dell'abomaso (Fairbrother e Nadeau, 2006). È risaputo, infatti, che una dieta maggiormente ricca di cereali concorre all'aumento dell'acidità ruminale (Newbold e Ramos-Morales, 2020). Si è provato, quindi, ad alimentare i bovini principalmente con foraggi. In realtà, non si è osservata alcuna differenza nell'eliminazione fecale di STEC O157 tra animali alimentati a cereali e quelli ai quali sono stati somministrati solo foraggi, nonostante alcuni studi

promettenti eseguiti in Danimarca avessero rilevato un maggior rischio di diffusione di STEC O157 nelle vacche da latte alimentate a cereali e melassa (Fairbrother e Nadeau, 2006).



**Figura 2:** Modalità di prevenzione dell'infezione da STEC in allevamento (tratta da Nam-Hee et al., 2017 - modificata).

A complicare la complessa epidemiologia degli STEC, è noto che si possono rilevare differenti sierotipi di STEC simultaneamente negli stessi allevamenti (Zavanella et al., 2009) e, d'altra parte, ceppi indistinguibili tra loro in aziende poste anche a centinaia di km le une dalle altre (Hancock et al., 2001). Inoltre è da considerare che l'infezione con STEC O157:H7 non previene una re-infezione con lo stesso ceppo (Zavanella et al., 2009).

La completa eradicazione degli STEC dagli allevamenti bovini non può considerarsi fattibile (Hancock et al., 2001; Fairbrother e Nadeau, 2006), data l'alta prevalenza di STEC O157:H7 nell'ambiente, la natura transitoria dell'infezione, la difficoltà di rilevare il patogeno nelle feci degli animali quando presente a basse dosi (Fairbrother e Nadeau, 2006) e l'aspecificità del range dei possibili animali ospiti (Hancock et al., 2001). Un obiettivo più realistico riguarda, invece, la riduzione della colonizzazione intestinale dei bovini, con la conseguente riduzione



della loro diffusione tramite feci. Questa misura ridurrebbe la contaminazione, ad esempio, delle fonti d'acqua che vengono in seguito utilizzate per l'irrigazione delle coltivazioni vegetali ad uso umano, ma anche della carne, dei suoi derivati e del latte. Inoltre verrebbe minimizzata la possibilità di infezione umana per contatto diretto con gli animali. Allo stesso tempo, tuttavia, dovrebbero essere prese misure per la riduzione della persistenza di STEC nell'ambiente (Fairbrother e Nadeau, 2006).

Un fattore da considerare, inoltre, è che non è strettamente necessaria la colonizzazione intestinale del bovino perché gli STEC possano contaminare le carni e, quindi, essere trasmessi all'uomo; infatti è sufficiente la contaminazione della cute dell'animale perché STEC si diffonda negli ambienti di macellazione e, successivamente, nel prodotto finito. La riduzione di STEC O157:H7 in allevamento, quindi, potrebbe comportare una sostanziale riduzione della contaminazione della carne bovina e, di conseguenza, dei casi clinici nell'uomo. Uno studio ha dimostrato, infatti, la correlazione tra la prevalenza di STEC nelle feci e sulla cute dei bovini nelle stalle di sosta dei macelli e la prevalenza sulle carcasse degli animali provenienti da queste aree (Hancock et al., 2001). Tutti gli interventi volti alla riduzione della carica batterica degli STEC nell'animale in vita sono da considerarsi fondamentali per una riduzione della contaminazione della carcassa in macello (Nam-Hee et al., 2017).

### 7.3. Prevenzione in macello

La sicurezza delle carni deve essere perseguita in macello a partire dagli spazi esterni e dalla sua stessa configurazione. Gli stabilimenti di macellazione, infatti, devono essere concepiti in modo da rispettare quanto riportato dal Reg. CE 853/2004:

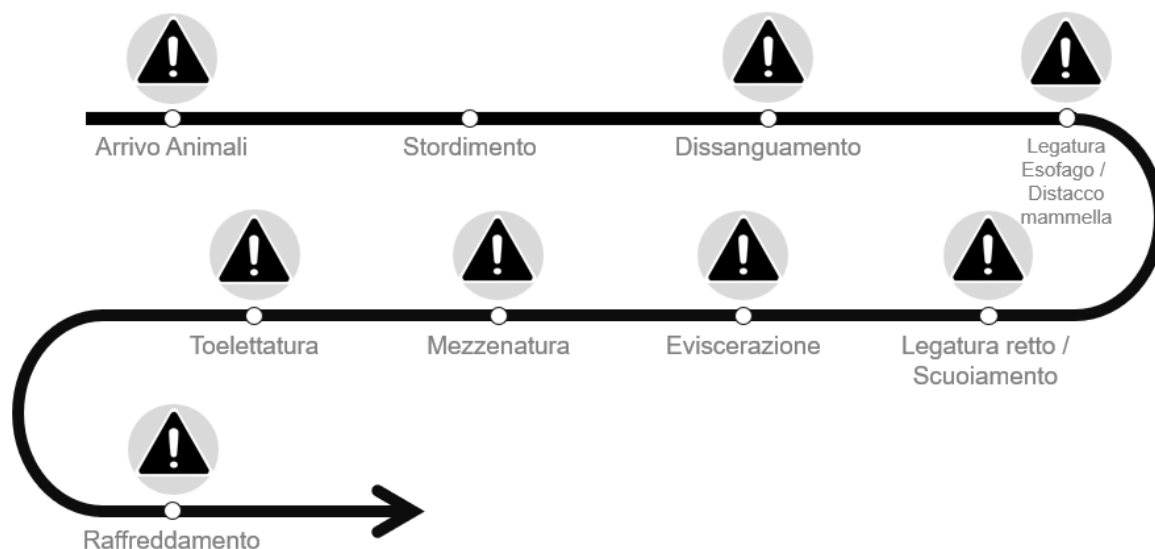
- devono disporre di un congruo numero di locali, ognuno dei quali deve essere adatto all'esecuzione delle operazioni cui è destinato;
- deve essere presente un locale separato per lo svuotamento e la pulizia di stomaci e intestini degli animali;
- deve essere rispettata la separazione, nel tempo e nello spazio, delle operazioni di stordimento e dissanguamento, eviscerazione e toelettatura, manipolazione di stomaci e intestini, preparazione e pulizia delle frattaglie, imballaggio delle frattaglie, spedizione delle carni.

Inoltre, devono essere presenti strutture, che possano essere chiuse chiave, per il deposito di carni refrigerate che devono restare in osservazione o che non sono idonee al consumo umano, ed altri locali dedicati alla macellazione di animali considerati sospetti (Reg. CE 853/2004, allegato III, sezione 1, capitolo II).

Gli OSA responsabili della struttura devono garantire che costruzione, configurazione e attrezzature dell'impianto di macellazione rispettino diversi requisiti, tra i quali la presenza di stalle di sosta adeguate e conformi alle norme igieniche e recinti esterni (se previsti) facili da pulire e disinfettare. La disposizione di questi ambienti deve essere concepita in modo da facilitare l'ispezione *ante mortem* degli animali. Inoltre, devono essere previsti uno spazio separato e adeguate strutture per la pulizia, il lavaggio e la disinfezione dei mezzi di trasporto del bestiame (Reg. CE 853/2004; Reg. CE 1009/2009).

Le norme si applicano anche nel caso di strutture che effettuino macellazioni secondo riti religiosi. Infatti, il Reg. CE 1009/2009 dichiara che l'OSA responsabile di uno stabilimento di macellazione che effettui, anche sporadicamente, macellazioni rituali deve aver presentato un'istanza all'AUSL competente ed aver ricevuto il relativo parere favorevole relativamente al possesso dei requisiti strutturali e gestionali previsti dal regolamento (Reg. CE 1009/2009).

Per quanto riguarda le fasi di macellazione, esistono misure di controllo che permettono di ridurre il rischio di contaminazione durante la lavorazione delle carni (Antic et al., 2021). Gli animali clinicamente sani che arrivano al macello, infatti, possono essere portatori di patogeni responsabili di zoonosi e quindi rappresentare un grave rischio per la salute pubblica. In particolare, tra i primi quattro microrganismi da tenere in considerazione, in Europa vanno segnalati *Campylobacter* spp., *Salmonella enterica*, *Escherichia coli* e *Yersinia enterocolitica*, albergati nel tratto digestivo e sulla cute dei bovini. Il rischio causato da questi patogeni viene controllato e ridotto grazie all'attuazione delle *Good Manufacturing and Hygiene Practice* (GMP/GHP) e alle misure relative all'*Hazard Analysis and Critical Control Point* (HACCP), dalla ricezione degli animali in macello al refrigeramento delle carcasse (Figura 3) (Blagojevic et al., 2021).



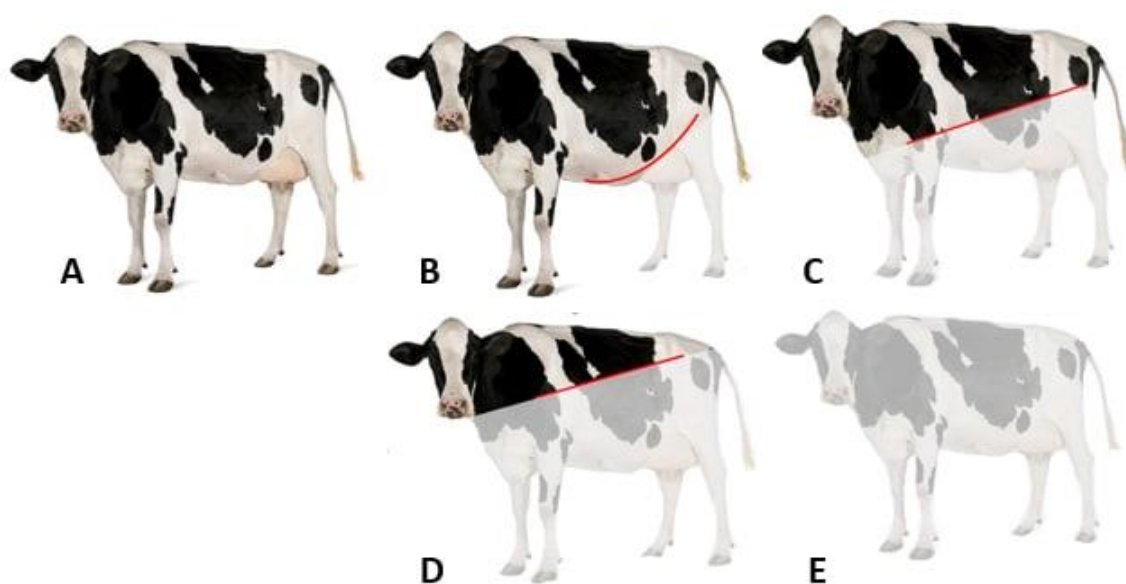
**Figura 3:** Fasi della macellazione del bovino (Ce.I.R.S.A., 2007)

Gli animali che arrivano in macello devono essere puliti (Reg. CE 853/2004, allegato III, capitolo IV), in quanto il materiale fecale presente sulla cute può costituire una fonte di contaminazione dei locali, delle attrezzature e delle carni (Ce.I.R.S.A., 2007).

La Food Standard Agency (FSA) ha elaborato, a tal proposito, una classificazione del grado di pulizia del mantello dei bovini (Tabella 7) (Figura 3).

Grado di pulizia	Definizione	Caratteristiche
A	Pulito	Nessuna sporcizia sull'animale, salvo qualche traccia
B	Abbastanza pulito	Aree sporche che si estendono oltre la metà inferiore della coscia e sulla parte inferiore dell'addome e dello sterno
C	Leggermente sporco	Aree sporche che si estendono dalla parte superiore della coscia (trocantere) nella parte anteriore dello sterno
D	Sporco	Aree sporche che si estendono dalla natica (anca) alla punta della spalla. Lo sporco sale lateralmente alla sommità del fianco e forma una spessa crosta
E	Sporco e bagnato	L'area sporca è superiore rispetto al livello 4 o uguale ai livelli 3 e 4, ma con l'aggravante dell'umidità del mantello

**Tabella 7:** Griglia FSA relativa ai cinque gradi di pulizia del mantello dei bovini che arrivano in macello (FSA, 2004).



**Figura 3:** Gradi di pulizia del mantello dei bovini (tratta da FSA, 2004 - modificata).

La FSA ha anche definito le procedure che il veterinario ufficiale deve applicare in macello a seconda del grado di pulizia degli animali, che vanno dalla normale ammissione alla macellazione (Gradi A e B), ammissione e verifica delle GMP applicate dall'OSA (Grado C), fino all'ammissione seguita da verifica delle procedure applicate dall'OSA e segnalazione all'autorità competente del territorio di provenienza degli animali (Gradi D ed E). Dal canto suo, l'OSA deve procedere, nei casi peggiori (gradi D ed E) alla macellazione differita con rallentamento della catena e successiva toelettatura igienica delle carcasse contaminate (Tabella 8).

Grado di pulizia	Azioni dell'OSA in macello	Azioni del veterinario ufficiale in macello	Azioni del veterinario ufficiale in allevamento	Azioni dell'OSA in allevamento
A / B	Nessuna	Ammissione alla macellazione	Nessuna	Misure adeguate: assicurare, per quanto possibile, la pulizia degli animali inviati al macello
C	Applicazione di Good Manufacturing Practices (GMP)	Ammissione alla macellazione e verifica dell'applicazione delle GMP previste da parte dell'OSA	Nessuna	Misure adeguate: assicurare, per quanto possibile, la pulizia degli animali inviati al macello
D / E	Macellazione, oppure: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Macellazione differita con rallentamento della catena per lasciare spazio tra carcasse di animali puliti e sporchi</li> <li>• Toelettatura igienica delle carcasse contaminate</li> </ul>	Ammissione alla macellazione e adozione delle seguenti azioni: <ul style="list-style-type: none"> <li>• Verifica corretta applicazione delle procedure elaborate dagli operatori</li> <li>• Segnalazione alle ASL competenti per l'allevamento in questione</li> </ul>	Ispezione presso l'allevamento ed eventuali altri provvedimenti conseguenti, dopo aver fatto la segnalazione	Misure adeguate: assicurare, per quanto possibile, la pulizia degli animali inviati al macello  Dichiarare nel documento ICA che la gestione della stabulazione degli animali garantisce un grado di pulizia delle pelli accettabile per il macello

**Tabella 8:** Azioni conseguenti alla macellazione di animali con mantello in diverse condizioni di pulizia (tratta da Decreto Dirigente Unità Organizzativa 2016 n.2188 - modificata)

Per cercare di ridurre al minimo la contaminazione batterica dalla cute alla carne, gli impianti di lavorazione in Nord America, ad esempio, hanno adottato differenti trattamenti di decontaminazione, come l'utilizzo di antimicrobici o la pastorizzazione. Si è visto, tuttavia, che il rischio viene ridotto, ma non può essere totalmente eliminato (Kitanov and Willms, 2018). In alcuni paesi, come appunto gli USA, i trattamenti di decontaminazione della cute e delle carcasse sono regolarmente applicati ed integrati in procedure basate sul sistema HACCP (Antic et al., 2021).

Già Van Donkersgoed et al. nel 1997 hanno riscontrato una correlazione tra lo sporco visibile sul mantello degli animali e la contaminazione delle carcasse. Un altro studio del 2000 di Byrne et al., sui lavaggi pre-macellazione, ha invece dimostrato che sarebbe necessario un lavaggio di almeno tre minuti per ridurre significativamente STEC O157:H7 sulla cute contaminata, ma che tale trattamento non avrebbe comunque azzerato la contaminazione delle carcasse (Hancock et al., 2001).

In Europa è consentito l'utilizzo del solo acido lattico per ridurre la contaminazione microbiologica superficiale da STEC su carcasse, mezzene e quarti di bovini macellati. Si

utilizzano metodi di nebulizzazione o spray in soluzioni dal 2 al 5% di acido lattico in acqua potabile con temperatura al massimo di 55°C (Reg. UE 101/2013). Secondo il Reg. UE 1474/2015 è possibile effettuare un lavaggio post-macellazione con acqua calda riciclata per ridurre la contaminazione superficiale della carcassa negli ungulati domestici, ma non è possibile eseguirla su carcasse con contaminazione fecale visibile (Reg. UE 1474/2015).

Al di là dei possibili metodi di decontaminazione, secondo il Reg. CE 853/2004 gli animali troppo sporchi devono essere macellati per ultimi e devono essere messe in atto modalità per evitare le contaminazioni durante la macellazione, come rallentamento della catena e interposizione di uno spazio vuoto tra carcasse. Inoltre va inviato un richiamo all'allevatore e, in caso la situazione si dovesse ripetere, si possono respingere i capi arrivati in condizioni di eccessiva sporcizia (Ce.I.R.S.A., 2007). Infatti, nessun intervento è sufficientemente efficace se la carica microbica iniziale della carcassa è molto elevata e nessuna delle procedure descritte (impiego di acido lattico o di acqua calda) può sostituire le *good hygienic practices*, ma rappresenta solo una misura addizionale ad esse (Antic et al., 2021; EFSA, 2014).

Un altro punto critico per la contaminazione sono i tagli eseguiti per il dissanguamento, in particolare devono essere utilizzati due coltelli (uno per incidere la cute, l'altro per incidere i vasi) in modo che non ci sia contaminazione dalla cute al circolo sanguigno (Ce.I.R.S.A., 2007). È anche necessario fare attenzione al distacco della mammella, per non dare luogo a contaminazione della carcassa con latte o colostro (Reg. CE 853/2004, allegato III, capitolo IV). Prima di procedere con la lavorazione, è fondamentale eseguire la legatura del retto, perché l'uscita di materiale fecale dall'orifizio anale durante l'eviscerazione causerebbe contaminazioni sia delle attrezzature che, successivamente, delle carni (Ce.I.R.S.A., 2007).

In catena si procede con lo scuoiamento, con utilizzo dei coltelli dall'interno verso l'esterno, in modo da ridurre la contaminazione dovuta al contatto tra la superficie esterna dell'animale e la parte interna della carcassa. È importante sterilizzare spesso gli strumenti immergendoli in acqua ad almeno 82°C, lavare le mani e toelettare le superfici imbrattate accidentalmente. I lavoratori responsabili di questa fase non devono in alcun modo entrare in contatto con le carni durante le successive lavorazioni (Ce.I.R.S.A., 2007; Reg. CE 853/2004, allegato III, capitolo IV).

Durante e dopo l'eviscerazione si deve evitare la fuoriuscita del contenuto del tubo digerente (Reg. CE 853/2004, allegato III, capitolo IV), considerato materiale ad alto rischio per la contaminazione delle carni, specialmente se dovessero rompersi i visceri che lo contengono

(Ce.I.R.S.A., 2007). Se letame e contenuto del tubo digerente vengono depositati in macello è necessario un reparto speciale riservato a tal fine (Reg. CE 853/2004; Reg. CE 1009/2009).

All'interno degli impianti di macellazione, le carcasse bovine possono essere sezionate in mezzene e queste ultime possono essere divise, a loro volta, in un massimo di tre pezzi, perché, da regolamento, le successive operazioni devono svolgersi presso i laboratori di sezionamento. Le diverse procedure devono essere organizzate in modo da prevenire o minimizzare le contaminazioni. Nel caso di laboratori riconosciuti per il sezionamento di specie animali differenti si deve garantire che non si corra il rischio di reciproche contaminazioni (Reg. CE 853/2004, allegato III, capitolo V-VII).

I laboratori di sezionamento che lavorano carni di ungulati domestici devono:

- essere costruiti in modo da evitare la contaminazione delle carni, garantendo il costante avanzamento delle operazioni e la separazione dei diversi lotti di produzione;
- avere due magazzini separati per carni confezionate e non confezionate, a meno che non vengano lavorate in momenti differenti per evitare qualsiasi contaminazione;
- avere locali di sezionamento attrezzati per garantire il rispetto dei requisiti di igiene durante le operazioni di sezionamento e disosso;
- avere lavabi muniti di rubinetti ad uso del personale che manipola carni non protette;
- essere provvisti di strutture di disinfezione per gli attrezzi da lavoro, con acqua a temperatura non inferiore a 82°C, o altri metodi con effetto equivalente

(Reg. CE 853/2004, allegato III, sezione 1, capitolo III).

Dopo la mezzenatura si deve svolgere il controllo finale della contaminazione visibile, in particolare osservando le zone maggiormente a rischio, quindi i garretti, l'area che circonda l'ano, lo scamone (nel quarto posteriore, costituito dalla parte terminale del muscolo lombare e da quella prossimale della coscia), il collo e la punta del petto. Se in queste zone, o in altre, si rileva la presenza di materiale fecale, peli o bile, si deve eseguire la toelettatura, ossia l'asportazione dell'area imbrattata, previo lavaggio di mani e avambracci dell'operatore e sanificazione del coltello da utilizzare (Ce.I.R.S.A., 2007).

Infine, il raffreddamento della mezzena (o dei tagli da essa ricavati) deve essere eseguito senza ritardi e con attrezzature che consentano il raggiungimento della temperatura prevista al cuore del prodotto nel minor tempo possibile (Reg. CE 853/2004, allegato III, capitolo V-VII).

Il Reg. CE 853/2004 impone che le carcasse di ungulati siano refrigerate subito dopo l'ispezione *post mortem* e che venga garantita una temperatura al cuore non superiore a 7°C.

Inoltre il regolamento stabilisce che queste temperature dovrebbero essere raggiunte prima del trasporto ed essere mantenute costanti anche durante il trasporto stesso (EFSA, 2014). Tuttavia, un recente regolamento (Regolamento UE 2017/1981) ritiene più importante il raggiungimento della temperatura di 7°C alla superficie delle mezzene, piuttosto che al cuore, visti i tempi lunghi necessari perché la temperatura si abbassi. In questi casi, se il tempo di trasporto non supera le sei ore, è sufficiente che la temperatura superficiale delle mezzene raggiunga i 7°C e che la temperatura interna del mezzo di trasporto non superi i 6°C. Per trasporti più lunghi, comunque inferiori a 60 ore, la temperatura interna e superficiale delle mezzene non devono superare, rispettivamente, i 15°C e 4°C, con una temperatura ambiente massima del mezzo di trasporto pari a 3°C.

Carcasse e frattaglie non devono venire in contatto con pavimento, pareti o strutture, e nemmeno con altre carcasse, frattaglie o visceri (Reg. CE 853/2004, allegato III, capitolo IV).

Il personale che lavora in macello deve disporre di un'adeguata formazione in materia di rischi, punti critici di controllo, misure correttive e di prevenzione in modo da garantire una produzione degli alimenti che rispetti tutti i criteri volti alla tutela del consumatore, oltre che salvaguardare gli stessi lavoratori dai rischi delle zoonosi (Regolamento 852/2004, allegato II, capitolo XII).

Gli OSA gestori di macelli devono sempre verificare la presenza delle informazioni sulla catena alimentare (ICA) e richiederle se non sono presenti. Non possono essere macellati animali giunti in macello in assenza delle ICA, ovvero di informazioni sullo status sanitario dell'azienda di provenienza, e del territorio regionale, le condizioni di salute dell'animale, i medicinali somministrati ed i trattamenti eseguiti, le relazioni delle ispezioni *ante* e *post mortem* sugli animali della stessa azienda di provenienza (Reg. CE 853/2004). Tuttavia, nelle ICA non sono presenti dati sulla contaminazione da STEC nei bovini inviati al macello, in quanto non esiste a livello nazionale un piano di monitoraggio sugli STEC negli allevamenti di bovini. Questa carenza richiede, da parte dell'OSA, il massimo sforzo per rispettare le norme igieniche in fase di macellazione, a prescindere dallo stato sanitario dell'animale in relazione agli STEC.

L'ispezione delle carni dovrebbe andare sempre più nella direzione "risk-based", cioè basata sul rischio. Pertanto dovrebbe basarsi sulle informazioni relative alla catena alimentare (ICA), dall'azienda agricola al macello, nonché sugli *harmonised epidemiological indicators* (HEI) relativi ai principali agenti patogeni e contaminanti chimici presenti nella carne. Gli HEI sono stati identificati da EFSA per i principali rischi biologici relativi al consumo di alimenti



(Nastasijević et al., 2020). Sono definiti come indicatori epidemiologici i dati relativi alla prevalenza o concentrazione del pericolo in una determinata fase della catena alimentare o una misura indiretta del pericolo (come le verifiche) che si correla con il rischio per la salute umana causato dal pericolo" (EFSA, 2013). Gli indicatori dovrebbero aiutare a classificare gli allevamenti e i macelli in base al grado di rilevanza per la salute pubblica dei pericoli ad essi associati e costituire la base per la definizione di obiettivi specifici basati sui pericoli effettivamente presenti. Per quanto riguarda i bovini gli HEI sono relativi a *Salmonella*, STEC, *Taenia saginata* e *Mycobacterium bovis*. Gli indicatori possono essere applicati a livello nazionale o regionale, a livello di macelli e/o allevamenti, a seconda della situazione epidemiologica del paese. Per quanto riguarda STEC sono proposti otto HEI nelle carni bovine (Tabella 9).

Indicatori (animali/ categoria alimentare)	Fase della catena di produzione della carne	Metodi analitici / diagnostici	Campioni
HEI 1: pratiche che aumentano il rischio di introdurre STEC in azienda (politica di acquisto, accesso al pascolo, accesso all'acqua di superficie)	Allevamento	Controllo	Non applicabile
HEI 2: pratiche e condizioni dell'azienda	Allevamento	Controllo	Non applicabile
HEI 3: stato dei gruppi di bovini comprendenti animali da macellare entro un mese, nei confronti di STEC	Allevamento	Microbiologia	Pool di feci o terreno
HEI 4: Condizioni del trasporto e della stalle di sosta	Trasporto e stalle di sosta	Controllo	Non applicabile
HEI 5: ispezione visiva della pulizia del mantello degli animali nelle stalle di sosta (gradi di pulizia)	Macello	Ispezione visiva	Non applicabile
HEI 6: STEC patogeni sugli animali in arrivo (dopo il dissanguamento e prima dello scuoiamento)	Macello	Microbiologia	Tampone su pelle
HEI 7: STEC patogeni sulle carcasse prima del congelamento	Macello	Microbiologia	Tampone su carcasse
HEI 8: STEC patogeni sulle carcasse dopo il congelamento	Macello	Microbiologia	Tampone su carcasse

**Tabella 9:** HEI nella filiera del bovino, secondo EFSA (2013)

I macelli differiscono tra loro anche per le tecnologie, le strumentazioni, le pratiche igieniche e la preparazione del personale, tali da giustificare le diverse performance riguardanti l'igiene

e la contaminazione da STEC sulle carcasse. Attualmente la categorizzazione dei macelli è basata sulla verifica del sistema HACCP e dei criteri di igiene di processo (conteggio delle colonie aerobiche, delle *Enterobatteriacee* e presenza di *Salmonella* sulle carcasse prima della refrigerazione). Non esiste, ad oggi, un criterio di igiene di processo fissato specificatamente per STEC, ma si ritiene che le misure messe in atto nel macello per prevenire la contaminazione da *Salmonella* possano contrastare anche la contaminazione da STEC (Antic et al., 2021).

#### 7.4. Prevenzione per il confezionamento

Le misure per la prevenzione della contaminazione degli alimenti con STEC sono relative anche al corretto stoccaggio dei prodotti e alle corrette temperature dell'eventuale trattamento termico (Allocati et al., 2013).

I materiali utilizzati per il confezionamento e l'imballaggio dei prodotti alimentari non devono costituire fonte di contaminazione e devono essere immagazzinati in modo da non essere esposti a rischio di contaminazione. Le operazioni di confezionamento e imballaggio devono essere effettuate in modo da evitare di contaminare i prodotti, garantendo l'integrità dei recipienti e una facile pulizia (Reg. 852/2004, Cap. X).

#### 7.5. Prevenzione per il consumatore

Le caratteristiche degli STEC consentono di sopravvivere all'interno di matrici alimentari fino ad un pH  $\geq 3,8$  e ad una concentrazione di NaCl  $\leq 8,5\%$  (Jay et al. 2005).

Nonostante le misure preventive in ambito di allevamento, macello e confezionamento, il consumatore può comunque essere esposto al rischio di contaminazione da STEC tramite il consumo di alimenti, in particolare crudi o poco cotti (EFSA, 2011b). Il microrganismo viene inattivato da un processo di cottura efficace, cioè raggiungendo una temperatura di 75°C al cuore del prodotto (IZS delle Venezie, 2014). Un'altra attenzione fondamentale è quella di evitare la cross-contaminazione, ovvero la diffusione dei batteri dalla carne cruda ad alimenti pronti per il consumo.

Il consumatore dovrebbe, inoltre, essere informato correttamente sul pericolo rappresentato dagli STEC, in modo che si eviti la somministrazione di carne bovina cruda alle persone a maggior rischio (bambini in età prescolare, anziani, immunodepressi), si presti attenzione alle

cross-contaminazioni e si esegua sempre una buona igiene delle mani dopo essere entrati in contatto con la carne cruda (EFSA, 2011b).

## 8. Conclusioni

Sulla base dei dati epidemiologici disponibili nei report EFSA e ECDC, più volte citati nel presente elaborato, STEC risulta un patogeno di estrema importanza dal punto di vista delle infezioni umane in diversi stati europei ed extra-europei, soprattutto per quanto riguarda la gravità di alcune manifestazioni cliniche, come la colite emorragica o la sindrome emolitico uremica.

In riferimento al ruolo delle carni bovine e dei prodotti a base di carne nella tossinfezione da STEC nell'uomo, la letteratura fornisce numerosi dati in relazione a diversi focolai verificatisi nel corso degli anni. È quindi accertata l'importanza della trasmissione degli STEC dal bovino, che è considerato il più importante animale serbatoio, all'uomo tramite il consumo di prodotti alimentari.

Tuttavia, nonostante i regolamenti della Comunità Europea rendano obbligatorio osservare buone pratiche igieniche durante la macellazione degli animali ed i processi di lavorazione delle carni e che vada applicato il sistema HACCP per il controllo dei pericoli biologici durante tali fasi, non esistono, ad oggi, criteri microbiologici riferiti agli STEC nelle carni. Tali criteri sono presenti nel Reg. CE 2073/2005 solo in merito ai semi germogliati, responsabili del più grande focolaio di tossinfezione da STEC mai segnalato in Europa e verificatosi nel 2011 in Germania e alcuni Paesi limitrofi, ma attualmente decisamente meno importanti dei prodotti di origine bovina nella tossinfezione da STEC in tutti i Paesi europei. Appare evidente come l'assenza di un criterio microbiologico riferibile alle carni bovine rappresenti una grave carenza per la prevenzione di questa importante tossinfezione. Tuttavia, in alcuni Paesi del Nord Europa sono in atto sistemi di controllo degli STEC in allevamento o in macello, che tendono a sopperire a tali carenze legislative. Tali piani di controllo, che prendono in considerazione gli animali reservoir in allevamento e le loro carcasse in macello, potrebbero fornire garanzie sanitarie di tutta la filiera, a tutela della salute umana e a sostegno della fiducia del consumatore, e dovrebbero essere prese ad esempio per tutti gli altri Paesi dell'unione Europea.

## Bibliografia

- Ammerman Nicole C., Beier-Sexton Magda and Azad Abdu F. (2008). Growth and Maintenance of Vero Cell Lines. *Curr Protoc Microbiol. Appendix–4E*. doi: 10.1002/9780471729259.mca04es11
- Antic Dragan, Houf Kurt, Michalopoulou Eleni, Blagojevic Bojan (2021). Beef abattoir interventions in a risk-based meat safety assurance system. *Meat Science vol.182*
- Arancia Silvia, Babsa Susan, Brambilla Gianfranco, Chiani Paola, Ferreri Clarissa, Galati Fabio, Maugliani Antonella, Michelacci Valeria Minelli, Fabio, Morabito Stefano, Scalfaro Concetta, Tozzoli Rosangela (2016). Risultati del 17° test inter-laboratorio nazionale (PT17) sull'identificazione della presenza di ceppi di *E. coli* produttori di Shiga tossina (STEC) in campioni di alimenti. EU Reference Laboratory for *E. coli* (ISS)
- Barth Stefanie A., Weber Michael, Schaufler Katharina, Berens Christian, Geue Lutz and Menge Christian (2020). Metabolic Traits of Bovine Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* (STEC) Strains with Different Colonization Properties. doi: 10.3390/toxins12060414
- Belotserkovsky Ilia and Sansonetti Philippe J. (2018). *Shigella* and Enteroinvasive *Escherichia coli*. *Current Topics in Microbiology and Immunology book series* (CT MICROBIOLOGY, volume 416)
- Beutin L., Geier D., Steinruck H., Zimmermann S. and Scheutz F. (1994). Prevalence and Some Properties of Verotoxin (Shiga-Like Toxin) producing *Escherichia coli* in seven different species of healthy domestic animals. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 31, pp 2483-2488.
- Bin Liu, Axel Furevi, Andrei V Perepelov, Xi Guo, Hengchun Cao, Quan Wang, Peter R Reeves, Yuriy A Knirel, Lei Wang, Göran Widmalm (2020). Structure and genetics of *Escherichia coli* O antigens. *FEMS Microbiology Rev* 44(6), pp 655-683. doi: 10.1093/femsre/fuz028
- Blagojevic Bojan, Nesbakken Truls, Alvseike Ole, Vågsholm Ivar, Antic Dragan, Johler Sophia, Houf Kurt, Meemken Diana, Nastasijevic Ivan, Pinto Madalena Vieira, Antunovic Boris, Georgiev Milen, Alban Lis (2021). Drivers, opportunities, and challenges of the European risk-based meat safety assurance system. *Food Control*, Vol. 124
- Boisen N., Østerlund Mark T., Joensen Katrine G., Santiago Araceli E., Mandomando Inacio, Cravioto Alejandro, Chattaway Marie A., Gonyar Laura A., Overballe-Petersen

- Søren, Stine O. Colin, Rasko David A., Scheutz Flemming, Nataro James P. (2020). Redefining enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC): Genomic characterization of epidemiological EAEC strains. *PLoS neglected tropical diseases*, Vol. 14(9)
- Brusa Victoria, Restovich Viviana, Galli Lucia, Teitelbaum David, Signorini Marcelo, Brasesco Hebe, Londero Alejandra, Garcia Diego, Padola Nora Lia, Superno Valeria, Sanz Marcelo, Petrolì Sandra, Costa Magdalena, Bruzzone Mariana, Sucari Adriana, Ferreghini Marcela, Linares Luciano, Suberbie German, Rodriguez Ricardo, Leotta Gerardo A. (2017). Isolation and characterization of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from beef carcasses, cuts and trimmings of abattoirs in Argentina. doi: 10.1371/journal.pone.0183248
  - Bruyand M., Mariani-Kurkdjian P., Gouali M., de Valk H., King L.A., Le Hello S., Bonacorsi S., Loirat C. (2017). Hemolytic uremic syndrome due to Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection. *Médecine et Maladies Infectieuses*, Vol. 48, Issue 3, pp 167-174
  - Bustamante Ana V., Sanso Andrea M., Parma Alberto E. and Lucchesi Paula M.A. (2012). Subtyping of STEC by MLVA in Argentina. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. doi: 10.3389/fcimb.2012.00111
  - Byrne L., Jenkins C., Launder N., Elson R. and Adak G. K. (2015). The epidemiology, microbiology and clinical impact of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* in England, 2009–2012. *Epidemiology and Infection*. doi: 10.1017/S0950268815000746
  - Caprioli A., Morbato S., Brugère H., Oswald E. (2005). Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* emergine issues on virulence and models of transmission. *Veterinary Research*, Vol. 36, pp 289-311
  - Ce.I.R.S.A. (Centro Interdipartimentale Ricerca e documentazione Sicurezza Alimentare) (2007). Manuale generale per le piccole imprese di macellazione. A cura di: Goi Roberta, Sattanino Giuseppe, Piovesan Francesca e Griglio Bartolomeo
  - Cheng et al. (2016). Phenotypic H-Antigen Typing by Mass Spectrometry Combined with Genetic Typing of H Antigens, O Antigens, and Toxins by Whole-Genome Sequencing Enhances Identification of *Escherichia coli* Isolates. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 54(8), pp 2162-2168. doi: 10.1128/JCM.00422-16
  - Choi HyeLim, Hwang Bo Kyoung, Kim Bong-Soo and Choi Sang Ho (2020). Influence of pathogen contamination on beef microbiota under different storage temperatures. *Food Research International*, Vol.132

- Cieslak Palul R., Noble Sulsan J., Maxsoni Daniil J., Empex Lonnie C., Rav'enholt Otto, Legarca Gretcheni, Tuttle Jessica, Dovle Michael P, Barrett Timothv J., Wells Jox G., McNamara Anin Marie, and Griffiin Patricia M. (1997). Hamburger-Associated *Escherichia coli* O157:H7 Infection in Las Vegas: A Hidden Epidemic. *American Journal of Public Health*, Vol. 87, pp 176-180. doi: 10.2105/ajph.87.2.176
- Coipan Claudia E., Friesema Ingrid H., van den Beld Maaïke J.C., Bosch Thijs, Schlager Sabine, van der Voort Menno, Frank Christina, Lang Christina, Fruth Angelika and Franz Eelco (2022). Sporadic Occurrence of Enteroaggregative Shiga Toxin–Producing *Escherichia coli* O104:H4 Similar to 2011 Outbreak Strain. *Emerging Infectious Diseases*, Vol. 28, pp 1890-1894
- Croxen Matthew A., Law Robyn J., Scholz Roland, Keeney Kristie M., Wlodarska Marta, Finlay B. Brett (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 26(4), pp 822-880
- Decision No 1082/2013/EU of the European Parliament and of the Council of 22 October 2013 on serious cross-border threats to health and repealing Decision No 2119. OJ L 293, 5.11.2013, p. 1–15.
- Decisione n. 1082/2013, European Surveillance System (TESSy)
- Denamur E., Clermont O., Bonacorsi S., Gordon D. (2020). The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology* 2021, Vol. 19, pp 37-54. doi: 10.1038/s41579-020-0416-x.
- Dormedy E. S., Brashears M. M., Cutter C. N. and Burson D. E. (2000). Validation of Acid Washes as Critical Control Points in Hazard Analysis and Critical Control Point Systems. *Journal of Food Protection*, Vol. 63, pp 1676-1680. doi: 10.4315/0362-028x-63.12.1676
- ECDC (2020). Shiga toxin/verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (STEC/VTEC) infection. Annual epidemiological report for 2018.
- EFSA (2007). Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards on a request from EFSA on monitoring of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) and identification of human pathogenic VTEC types. *EFSA Journal* 579, 1-61.
- EFSA (2011a). Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) O104:H4 2011 outbreaks in Europe: Taking Stock. *EFSA Journal*, 9(10):2390

- EFSA (2013). Technical specifications on harmonised epidemiological indicators for biological hazards to be covered by meat inspection of bovine animals. *EFSA Journal*, 11(6):3276.
- EFSA (2014). Scientific Opinion on the public health risks related to the maintenance of the cold chain during storage and transport of meat. Part 1 (meat of domestic ungulates). *EFSA Journal* 2014;12(3):3601
- EFSA (2019). Pathogenicity assessment of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the public health risk posed by contamination of food with STEC. *EFSA Journal* 2020;18(1):5967
- EFSA (2020). Scientific Opinion on the pathogenicity assessment of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the public health risk posed by contamination of food with STEC. *EFSA Journal* 2020;18(1):5967, pp 105
- Elder R.O., Keen J.E., Siragusa, G.R., Barkocy-Gallagher G.A., Koohmaraie M. and Laegreid W.W. (2000). Correlation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 prevalence in feces, hides, and carcasses of beef cattle during processing. *Proceedings of the National Academies of Sciences* 97, pp 2999-3003.
- Elliott S.J., O'Connell C.B., Koutsouris A, Brinkley C, Donnenberg M.S, Hecht G, Kaper J.B. (2002). A gene from the locus of enterocyte effacement that is required for enteropathogenic *Escherichia coli* to increase tight-junction permeability encodes a chaperone for EspF. *Infection and Immunity*, 70 (5), pp 2271-7.
- Erickson Stephen, Gil Jose, and Nguyen Minh (2021). PhageDx™ *E. coli* O157:H7 Assay in Ground Beef Level 3 Modification to Add 375 g Beef Trim and New Method Procedure for 25g Ground Beef: AOAC Performance Tested Method<sup>SM</sup> 081601. *Journal of AOAC International*, 104(5), pp 1338-1343
- Estrada-Garcia T, Navarro-Garcia F. (2012). Enteroaggregative *Escherichia coli* pathotype: a genetically heterogeneous emerging foodborne enteropathogen. *FEMS immunology & medical microbiology* 66, pp 281–298
- Fairbrother J.M. Nadeau É. (2006). *Escherichia coli*: on-farm contamination of animals. *Revue Scientifique et Technique*, pp 555-569
- FAO/WHO STEC EXPERT GROUP (2019). "Hazard identification and characterization: criteria for categorizing Shiga toxin-producing *Escherichia coli* on a risk basis". *Journal of Food Protection*, Vol. 82, n. 1, pp 7-21. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-18-291



- Farfán-García Ana Elvira, Ariza-Rojas Sandra Catherine, Vargas-Cárdenas Fabiola Andrea y Vargas-Remolina Lizeth Viviana (2016). Virulence mechanisms of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Revista chilena de infectología*, vol.33, n.4
- Fatima Rawish and Aziz Muhammad (2022). Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Bookshelf ID: NBK519509
- Ferens Witold A. and Hovde Carolyn J. (2011). *Escherichia coli* O157:H7: Animal Reservoir and Sources of Human Infection. *Foodborne Pathogens and Disease*, Vol. 8, pp 465-487
- Fisher Fabienne Beatrice, Saucy Apolline, Schmutz Claudia and Mausezahl Daniel (2020). Do changes in STEC diagnostics mislead interpretation of disease surveillance data in Switzerland? Time trends in positivity, 2007 to 2016. *Eurosurveillance*, Vol. 25, Issue 33
- Franzin, Fernanda M. and Marcelo P. Sircili (2015). “Locus of enterocyte effacement: a pathogenicity island involved in the virulence of enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* subjected to a complex network of gene regulation”. *Bio Med Research International*: 534738. doi:10.1155/2015/534738
- Food Standard Agency (2004) – Read Meat Safety & Clean Livestock. Appendix 1: Cleanliness Classification of Livestock
- Gomes Tânia A.T., Elias Waldir P., Scaletsky Isabel C.A., Guth Beatriz E.C., Rodrigues Juliana F., Piazza Roxane M.F., Ferreira Luís C.S., Martinez Marina B (2016). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Brazilian journal of microbiology*, 47, Suppl.1, pp 3-30
- Hancock Dale, Besser Tom, Lejeune Jeff, Davis Margaret, Rice Dan (2001). The control of VTEC in the animal reservoir
- Hardin M.D., Acuff G.R., Lucia L.M., Oman J.S., and Savell J.W. (1995). Comparison of methods for decontamination from beef carcass surface. *Journal of Food Protection*. 58, 368-374.
- Hicks S, Candy DC, Phillips AD. (1996). Adhesion of enteroaggregative, *Escherichia coli* to pediatric intestinal mucosa in vitro. *Infection and Immunity*, Vol. 64, pp 4751–4760.
- ISO 13136:2012, International Organization for Standardization. Microbiology of food and animal feed — Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens — Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups

- Istituto Superiore di Sanità (ISS) (2021). Laboratorio Nazionale di Riferimento per l'*Escherichia coli*
- Jang J., Hur H.-G., Sadowsky M.J., Byappanahalli M.N., Yan5 T.and Ishii S. (2017). Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications—a review. *Journal of Applied Microbiology*, Volume 123, Issue 3, pp 570-581
- Jay M.T., Loessner M.J., Golden D.A., Modern food microbiology (2005). *SPRINGER*, ISBN: 0-387-23180-3
- Johanson L., Underdal B., Grosland K., Whelehan O.P., and Roberts T.A. (1983). A Survey of the hygienic quality of beef and pork carcasses in Norway. *Acta Veterinaria Scandinavica* 25, pp 1-13.
- Kang Sanga, Ravensdale Joshua T., Coorey Ranil, Dykes Gary A., Barlow Robert S. (2020). Changes in STEC and bacterial communities during enrichment of manufacturing beef in selective and non-selective media. *Food Microbiology*, Vol. 96
- Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL (2004). *Pathogenic Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology* 2, pp 123-140
- Kaper J. B. and O'Brien Alison D. (2014). Overview and Historical Perspectives. doi: 10.1128/microbiolspec.EHEC-0028-2014
- Khalid Myda and Andreoli Sharon (2019). *Extrarenal manifestations of the hemolytic uremic syndrome associated with Shiga toxin-producing Escherichia coli (STEC HUS)*. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)*, 34(12), pp 2495-2507.
- Kitanov Petko M. and Willms Allan R. (2018). Probability of *Escherichia coli* contamination spread in ground beef production. *Mathematical Biosciences and Engineering*, Vol, 15, Issue 4, pp 1011-1032. doi: 10.3934/mbe.2018045
- Kolenda Rafał, Burdukiewicz Michał and Schierack Peter (2015). A systematic review and meta-analysis of the epidemiology of pathogenic *Escherichia coli* of calves and the role of calves as reservoirs for human pathogenic *E. coli*. *Frontier in Cellular and Infection Microbiology*, doi: 10.3389/fcimb.2015.00023
- Konowalchuk J., Speirs J.I. and Stavric (1977). Vero Response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*, 18(3), pp 775-779. doi: 10.1128/iai.18.3.775-779.1977
- Kot Barbara (2019). Antibiotic Resistance Among Uropathogenic *Escherichia coli*. *Polish Journal of Microbiology*, 68(4), pp 403-415. doi: 10.33073/pjm-2019-048
- La Placa Michele (2005). *Principi di microbiologia medica*, X edizione

- Li Baoguang, Liu Huanli, Wang Weimin (2017). Multiplex real-time PCR assay for detection of *Escherichia coli* O157:H7 and screening for non-O157 Shiga toxin-producing *E. coli*. *MBC Microbiology*, Vol. 17
- Decreto Dirigente Unità Organizzativa 2016 n.2188, Linee di indirizzo per la valutazione del grado di pulizia dei bovini portati al macello - BUR Lombardia
- Liu Yang, Tian Songhai, Thaker Hatim and Dong Min (2021). Shiga Toxins: An Update on Host Factors and Biomedical Applications. *Toxins (Basel)*, Vol. 13(3).
- Loconsole Daniela, Giordano Mario, Centrone Francesca, Accogli Marisa, Casulli Daniele, De Robertis Anna Lisa, Morea Anna, Quarto Michele, Parisi Antonio, Scavia Gaia, Chironna Maria and Bloody Diarrhea Apulia Working Group (2020). Epidemiology of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections in Southern Italy after Implementation of Symptom-Based Surveillance of Bloody Diarrhea in the Pediatric Population. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, Vol. 17(14)
- Loconsole Daniela, Giordano Mario, Laforgia Nicola, Torres Diletta, Santangelo Luisa, Carbone Vincenza, Parisi Antonio, Quarto Michele, Scavia Gaia, Chironna Maria and Bloody Diarrhea Apulia Working Group (2019). Case-management protocol for bloody diarrhea as a model to reduce the clinical impact of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections. Experience from Southern Italy. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases* 39(3), pp 539-547
- Lorusso V., Normanno G., Dambrosio A., Carosielli L., Carrabs G., Loiudice C., Rella A., Celano G.V. (2009). *Escherichia coli* O26 in raw buffalo milk: preliminary results. *Italian Journal of Food Safety*
- McCabe Evonne, Burgess Catherine M., Lawal Dolapo, Whyte Paul, Duffy Geraldine (2018). An investigation of shedding and super-shedding of Shiga toxigenic *Escherichia coli* O157 and *E. coli* O26 in cattle presented for slaughter in the Republic of Ireland. *Zoonoses Public Health*, Vol. 66, pp 83-91
- Mellata M, Johnson JR, Curtiss R. (2018). *Escherichia coli* isolates from commercial chicken meat and eggs cause sepsis, meningitis and urinary tract infection in rodent models of human infections. *Zoonoses Public Health*, Vol. 65, pp 103–113.
- Menge (2020). The Role of *Escherichia coli* Shiga Toxins in STEC Colonization of Cattle. *Toxins (Basel)*, Vol. 12, pp 607
- Meyer, K. F. (1931). The protective measures of the State of California against botulism.

*Journal of Preventive Medicine*, Vol. 5, pp 261–293.

- Morabito Stefano, Minelli Fabio and Tozzoli Rosangela (2021). Integrated Approach for the Diagnosis of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* Infections in Humans. *Methods in Molecular Biology*, Vol. 2291
- Mylius Maren, Dreesman Johannes, Pulz Matthias, Pallasch Gerhard, Beyrer Konrad, Claußen Katja, Allerberger Franz, Fruth Angelika, Lang Christina, Prager Rita, Flieger Antje, Schlager Sabine, Kalhöfer Daniela, Mertens Elke (2018). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O103:H2 outbreak in Germany after school trip to Austria due to raw cow milk, 2017 – The important role of international collaboration for outbreak investigations. *International Journal of Medical Microbiology*, Vol. 308, Issue 5, pp 539-544
- Nam-Hee Kim, Tae Jin Cho and Min Suk Rhee (2017). Current Interventions for Controlling Pathogenic *Escherichia coli*. *Advances in Applied Microbiology*, Vol. 100, pp 1-47
- Nastasijević Ivan, Vesković Slavica, Milijašević Milan (2020). Meat safety: Risk based assurance systems and novel technologies. *Meat Technology*, Vol. 61, n.2
- Nataro, J. P. & Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews*, Vol. 11, pp 142–201
- Newell D.G. and La Ragione R.M. (2017), Enterohaemorrhagic and other Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC): Where are we now regarding diagnostics and control strategies? *Transboundary and Emerging Diseases*, Vol. 65, Suppl. 1, pp 49-71
- Óhaiseadha C., Hynds P. D., Fallon U. B., O'Dwyer J. (2016). A geostatistical investigation of agricultural and infrastructural risk factors associated with primary verotoxigenic *E. coli* (VTEC) infection in the Republic of Ireland, 2008-2013. *Epidemiology and Infection*, Vol. 145, Issue 1, pp 95-105
- Organizzazione Mondiale della Sanità (2008). Foodborne disease outbreaks: guidelines for investigation and control
- Osemwowa Etinosa, Omoruyi Iyekhoetin Matthew, Kurittu Paula, Heikinheimo Annamari, Fredriksson-Ahomaa Maria (2021). Bacterial quality and safety of raw beef: A comparison between Finland and Nigeria. *Food Microbiology*, Vol. 100

- Palmela Carolina, Chevarin Caroline, Xu Zhilu, Torres Joana, Sevrin Gwladys, Hirten Robert, Barnich Nicolas, Ng Siew C, Colombel Jean-Frederic (2017). Adherent-invasive *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. *BMJ Journals, GUT*, Vol. 67, Issue 3
- Perna Angelica, Hay Eleonora, Contieri Marcella, De Luca Antonio, Guerra Germano, Lucariello Angela (2019). Adherent-invasive *Escherichia coli* (AIEC): Cause or consequence of inflammation, dysbiosis, and rupture of cellular joints in patients with IBD? *Journal of Cellular Physiology*, Vol. 235, Issue 6, pp 5041-5049
- Piscopo A. (2017), La decontaminazione superficiale delle carcasse. La pagina Scientifica, n.6
- Prescott, S. C. (1920). What should be the basis of the control of dehydrated foods? *American Journal of Public Health*, Vol. 10, pp 324–326.
- Qadri Firdausi, Svennerholm Ann-Mari, Faruque A S G, Sack R Bradley (2005). Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. *Clinical microbiology reviews*, Vol. 18(3), pp 465-83
- Reg. (CE) n. 1009/2009 del consiglio del 24 settembre 2009 relativo alla protezione degli animali durante l'abbattimento
- Regolamento (CE) n. 2073/2005 della Commissione del 15 Novembre 2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari
- Reg. (CE) n. 852/2004 del parlamento europeo e del consiglio del 29 aprile 2004 sull'igiene dei prodotti alimentari
- Reg. (CE) n. 853/2004 che stabilisce norme in materia di igiene per gli alimenti di origine animale
- Reg. (UE) n. 101/2013 della commissione del 4 febbraio 2013 relativo all'utilizzo di acido lattico per ridurre la contaminazione microbiologica delle carcasse di bovini
- Reg. (UE) n. 1474/2015 della commissione del 27 agosto 2015 relativo all'utilizzo di acqua calda riciclata per eliminare la contaminazione microbiologica superficiale delle carcasse
- Reg. (UE) n. 209/2013 della commissione dell'11 marzo 2013 che modifica il regolamento (CE) n. 2073/2005 per quanto riguarda i criteri microbiologici applicabili ai germogli e le norme di campionamento per le carcasse di pollame e la carne fresca di pollame

- Riley Lee W. (2022), Distinguishing Pathovars from Nonpathovars: *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*, Vol. 8, n. 4
- S.I. No. 707/2003 - Infectious Diseases (Amendment) (N. 3) Regulations 2003
- Subashchandrabose Sargurunathan and Mobley Harry L. T. (2015). Virulence and Fitness Determinants of Uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology Spectrum*, Vol. 3
- Tatara Alexander M. (2022). Modeling viral infection with tissue engineering: COVID-19 and the next outbreaks. *Tissue Engineering*, pp 647-667
- Denamur E., Tenaillon O, Skurnik D, Picard B (2010). The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*, Vol. 8(3), pp 207-17
- Tuttle J., Gomez T., Doyle M. P., Wells J. G., Zhao T., Tauxe R. V. and Griffin P. M. (1999). Lessons from a large outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 infections: insights into the infectious dose and method of widespread contamination of hamburger patties. *Epidemiology and Infection*, Vol. 122(2), pp 185-192
- Valilis Evangelia, Ramsey Alison, Sidiq Saad, DuPont Herbert L. (2018). Non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*—A poorly appreciated enteric pathogen: Systematic review. *International Journal of Infectious Diseases*, Vol. 76, pp 82-87
- Vishram Bhavita, Jenkins Claire, Greig David R., Godbole Gauri, Carroll Kevin, Balasegaram Sooria and Byrne Lisa (2021). The emerging importance of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* other than serogroup O157 in England. *Journal of Medical Microbiology*, Vol. 70
- Wasteson Yngvild (2001). Zoonotic *Escherichia coli*. *ACTA Veterinaria Scandinavica*, Vol. 43
- Werber Dirk, Krause Gérard, Frank Christina, Fruth Angelika, Flieger Antje, Mielke Martin, Schaade Lars and Stark Klaus (2012). Outbreaks of virulent diarrheagenic *Escherichia coli* - are we in control? *BMC Medicine*, Vol. 10
- Wilson, G. S. (1933). The necessity for a safe milk-supply. *Lancet*, Vol. 2, pp 829–832.
- Yang Y, Yao F, Zhou M, Zhu J, Zhang X, Bao W, Wu S, Hardwidge PR, Zhu G (2013). F18ab *Escherichia coli* flagella expression is regulated by acyl-homoserine lactone and contributes to bacterial virulence. *Veterinary Microbiology*, Vol. 165(3-4), pp 378-83
- Yoo S.H., Jeong H., Kwon S.-K., Kim J.F. (2009). Genomics, Biological Features, and Biotechnological Applications of *Escherichia coli* B: Is B for better. *Systems Biology and Biotechnology of Escherichia coli*, Springer, pp 1-17

- Zavarella Maurizio (2009). *Escherichia coli*, una scoperta continua. Collaboratori: Sambri Vittorio, Miragliotta Luisa, Caroli Federica, Ravizzola Giuseppe, Mioni Renzo, Catania Salvatore, Mulari Riccardo, Conedera Gabriella, Tagliabue Silvia, D'Incau Mario. Edito a cura della Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche – Brescia.

## Sitografia

- Ce.I.R.S.A (Centro Interdipartimentale di Ricerca e Documentazione sulla Sicurezza Alimentare) (2006). Latte crudo: pericolo per i consumatori o bevanda genuina?
- Ce.I.R.S.A (Centro Interdipartimentale di Ricerca e Documentazione sulla Sicurezza Alimentare) (2008). Positività da E.Coli O157: H7 nel latte crudo
- EFSA (2011b). Consigli sanitari per la prevenzione delle malattie diarroiche, in particolare in relazione al batterio *Escherichia coli* produttore della tossina Shiga (STEC)- detto anche *E. coli* produttore di verotossina (VTEC) o *E. coli* enteroemorragico (EHEC). <https://www.efsa.europa.eu/it/press/news/110601a>