UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI SASSARI
SCUOLA DI DOTTORATO
RIPRODUZIONE, PRODUZIONE, BENESSERE ANIMALE E SICUREZZA DEGLI ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE

Direttore Prof. Giovanni Garippa

INDIRIZZO: **Produzione e sicurezza degli alimenti di origine animale (XXII CICLO)**

(Coordinatore: Prof. Angelo Mario Cosseddu)

Caratterizzazione di *Staphylococcus aureus* isolato da formaggi ovini al latte crudo e profilo di antibiotico resistenza

Docente Guida
Dott. Christian Scarano

Correlatore
Dott. Salvatore Virdis

Direttore
Prof. Giovanni Garippa

Tesi di Dottorato di
Dott.ssa Francesca Cossu

ANNO ACCADEMICO 2008 - 2009

Indice

Introduzione 5

Gli stafilococchi tassonomia e classificazione 8

Diffusione 12

Principali caratteristiche morfologiche, biochimiche, metaboliche e fisiologiche. 14

Fattori di patogenicità 20

Adesine 21

Capsule 21

Proteina A 21

Fattore addensante 23

Coagulasi 23

Nucleasi 28

Stafilochinasi 28

Termonucleasi 29

Lipasi 30

Ialuronidasi 31

Emolisine 31

La leucocidina di Panton-Va1entine 34

Tossina esfoliativa epidermolitica 34

Enterotossine 35

Toxic Shock Syndrome (TSS) 41

Staphylococcus aureus come agente di tossinfezione alimentare nella filiera lattiero-casearia 45

Presenza di Staphylococcus aureus nella filiera lattiero casearia 49

Latte 49

Caseificazione 50
Formaggio 51
Evoluzione dell'antibiotico resistenza in Staphylococcus aureus 53
Meccanismo d'azione degli antibiotici 55
Fattori di antibiotico-resistenza 57
Scopo e piano della ricerca 63
Materiali e metodi 65
Prelievo dei campioni 65
Tecnologia di produzione di formaggi artigianali a latte crudo 66
Identificazione di Staphylococcus aureus 69
Determinazione dell'attività emolitica 70
Determinazione della coagulasi libera 70
Determinazione del clumping factor (coagulasi legata) 70
Determinazione della termonucleasi 71
Determinazione delle SEs (A-D) nei formaggi 71
Valutazione dell'antibiotico resistenza mediante il metodo della Minima Concentrazione Inibente (MIC) 72
Medium utilizzato 73
Predisposizione delle soluzioni dei principi attivi 73
Allestimento dell'inoculo di microrganismi 74
Caratterizzazione genotipica dei ceppi di S.aureus isolati 74
Ricerca dei fattori di virulenza 75
Estrazione del DNA totale 77
Estrazione del DNA 78
Diluizioni del DNA per la PCR 79

Amplificazione del DNA mediante PCR Multiplex 79
Elettroforesi dei prodotti di PCR 80
Studio di popolazione 81
Elettroforesi in Campo Pulsato (PFGE) 81
Risultati 83
Analisi microbiologiche, isolamento e identificazione 85
Antibiotico resistenza 85
Geni che codificano per le SEs e TSST-1 86
Altri fattori di patogenicità 87
Culster genici e profili di patogenicità 87
Discussione 89
Conclusioni 92
Tabelle 95
Figure 103
Bibliografia 107

Introduzione

Le conseguenze del largo impiego di antibiotici, sia nell'uomo che negli animali, rappresentano un problema sanitario di rilevante importanza per la salute pubblica. L'uso improprio di antibiotici, induce infatti l'insorgenza di batteri resistenti nella popolazione microbica dell'ospite (Aarestrup, F.M., 2005) e tale resistenza si estende tramite cloni batterici o anche orizzontalmente attraverso determinanti genetici mobili come plasmidi, trasposoni o integroni (Roberts, M.C., 2003). Queste sono le motivazioni che hanno indotto la Comunità Europea ad emanare la Direttiva Europea 2003/99/CE che considera l'antibiotico-resistenza alla stregua di una zoonosi trasversale.

Nell'azienda primaria per la produzione di latte, l'utilizzo di antibiotici a scopèo terapeutico è ritenuto la principale causa di selezione di ceppi che possono manifestare antibiotico-resistenza (Fthenakis, G.C., 1998; Goni et al., 2004). Sempre l'uso inappropriato e talvolta indiscriminato di questi farmaci è causa della presenza di residui di antibiotici nel latte e nei derivati destinati al consumo umano, aspetto che può avere analoghi effetti di selezione della resistenza nella popolazione batterica simbionte dell'uomo.

Nell'allevamento ovino gli antibiotici sono principalmente usati a scopo terapeutico al fine di ridurre e talvota prevenire i processi infiammatori a carico del parenchima mammario (Vautour E., et al. 2007).

Il diffondersi all'interno degli allevamenti di ceppi batterici che presentino resistenza agli antibiotici, è causa di preoccupazione della Sanità Pubblica in seguito alla possibilità di contagio dell'uomo, attraverso la catena alimentare (EFSA 2008). La diffusione nella catena alimentare di microrganismi caratterizzati da antibiotico-resistenza può verificarsi non solo in seguito alle contaminazioni che avvengono nella fase di produzione primaria, ma in tutte le fasi della filiera. Infatti è ampiamente documentata la possibilità di trasferimento di elementi genetici mobili che codificano per l'antibiotico-resistenza da parte di specie non patogene, o di interesse tecnologico, verso altre specie patogene (Resch et al., 2008). In stafilococchi coagulasi negativi (*S. equorum, S. succinus e S. xylosus*) e in batteri lattici utilizzati come *colture starter*, diversi autori descrivono la rilevazione di resistenza nei confronti di alcuni antibiotici (Mathur et al., 2005; Bernardeau et al., 2008). Microrganismi commensali sono anche stati individuati quali "*reservoir*" e vettori di geni di antibiotico-resistenza trasmissibili ai patogeni.

Staphylococcus aureus è in grado di provocare tossinfezioni alimentari, setticemia o infezioni, talora gravi, a carico dell'apparato respiratorio, cute e ossa (Le Loir Y., 2003). La severità delle infezioni è strettamente correlata ai fattori di virulenza che *S. aureus* può sintetizzare; inoltre, la patogenicità di alcuni ceppi è notevolmente aumentata dall'acquisizione di proprietà di antibiotico-resistenza. Infatti, circa un anno dopo la scoperta della penicillina venne segnalata la presenza di ceppi di *S. aureus* meticillino-resistenti. In particolare, i cloni di *S. aureus* meticillino-resistenti (MRSA) rappresentano una delle più temibili cause di infezione umana, in quanto questi cloni possono determinare elevati tassi di mortalità nei pazienti colpiti. I ceppi di *S. aureus*

divengono meticillino-resistenti in seguito all'acquisizione del gene *mecA*, codificante appunto per una particolare proteina denominata *Penicillin binding protein* (PBP2a). L'acquisizione di infezioni da MRSA è generalmente di tipo ospedaliero (HA-MRSA), proprio in conseguenza al quasi esculsivo uso nosocomiale della meticillina, tuttavia no è da escludersi anche la possibile infezione per via alimentare (FBA-MRSA), come descritto da alcuni Autori (Normanno. G., et al. 2007).

Esistono differenti stati di interazione tra *S. aureus* ed il suo ospite: infezione, stato di portatore o colonizzazione e contaminazione. *S. aureus* meticillino-resistente (MRSA) può essere presente in maniera continua o intermittente negli esseri umani sani e la colonizzazione rappresenta il principale fattore di rischio per l'infezione. Questa infatti, può presentare diversi livelli di virulenza da lieve a grave e, in alcuni casi, fatale. MRSA rappresenta oramai la causa principale di infezione nosocomiale in molti Paesi Europei, con ampie differenze di prevalenza e di politiche di controllo. Come riportato dall'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare, un numero limitato di ceppi di MRSA presenta una netta predominanza in specifiche aree geografiche. (EFSA marzo 2009).

Gli stafilococchi tassonomia e classificazione

Il genere *Staphylococcus* è rappresentato da microrganismi ubiquitari che possono essere reperiti nell'aria, nel suolo, nell'acqua e negli alimenti. Alcuni fanno parte della normale flora dell'uomo e degli animali, colonizzando cute, mucose e tratto intestinale. Sono batteri gram-positivi, immobili, aerobi facoltativi, fermentanti il glucosio e produttori di catalasi. Le cellule degli stafilococchi possono disporsi singolarmente o formare coppie, tetradi o grappoli irregolari, che all'osservazione microscopica appaiono come grappoli d'uva, da cui deriva il termine stafilococco, dal greco staphyle, grappolo d'uva. Il genere Staphylococcus era stato precedentemente inserito nella famiglia delle Micrococcaceae in base all'affinità morfologica, anche se persistevano numerose riserve legate alla differenza della struttura di base degli acidi nucleici. L'attuale classificazione è di seguito riportata:

Dominio	***Bacteria***
Phylum	*Firmicutes*
Classe	*Bacilli*
Ordine	*Bacillales*
Famiglia	*Staphyloccocaceae*
Genere	*Staphylococcus*

La patogenicità degli stafilococchi è correlata soprattutto con la capacità di produrre l'enzima coagulasi, che determina la sintesi della fibrina dal fibrinogeno. Una prima distinzione operata all'interno del genere considera due raggruppamenti: stafilococchi

coagulasi-positivi (SCP) e coagulasi-negativi (SCN). Gli Stafilococchi coagulasi-positivi comprese le specie maggiormente patogene per l'uomo e per gli animali e le specie produttrici di enterotossine, capaci di provocare tossinfezioni alimentari, necrolisi tossica e tossine causa della sindrome da shock tossico (TSST) (Tiecco G., 1992). Attualmente la capacità di produrre coagulasi rappresenta un metodo di caratterizzazione e non viene più correlato alla capacità patogena. Tale enzima è prodotto prevalentemente dallo *S. aureus*, e variabilmente da *S. hyicus, S. intermedius, S. delphini,* due subspecie di *S. scleiferi* e da *S. lutrae* recentemente isolato dalla lontra (Foster et al., 1997). Le specie elencate precedentemente, così come lo *S. aureus*, sono in grado di produrre enterotossine.

S. hyicus e S. intermedius vengono isolati solitamente da animali e sono in grado di produrre tossine esfoliative o esotossine (Sato et al., 1999; Burkett et al., 1998).

Le colture batteriche coagulasi-variabili, mostrano una debole o dubbia reazione ai test utilizzati per individuare la produzione di questo enzima, e richiedono quindi dei test addizionali quale la nucleasi stabile al calore (TNT) che è in grado di resistere alla temperatura di ebollizione dell'acqua. *S. schleiferi, S. hyicus e S. intermedius* risultano spesso positivi alla TNT.

Gli stafilococchi sono microrganismi catalasi-positivi, carattere questo che consente di differenziarli dagli streptococchi che non producono l'enzima catalasi. La catalasi può essere assente nei ceppi che crescono in condizioni anaerobiche (Jenesen, 1963) infatti alcuni autori (Schumacher-Perdreau et al., 1981) hanno isolato da processi patologici Stafilococchi catalasi negativi.

Gli stafilococchi sono stati classificati inizialmente come appartenenti a due sole specie. *S. aureus* raggruppava i ceppi solitamente patogeni e *S. albus* i ceppi non patogeni. La denominazione traeva origine dal colore delle colonie, rispettivamente giallo oro e bianche.

In seguito il genere *Staphylococcus* è stato suddiviso in 4 gruppi di specie sulla base delle relazioni filogenetiche, valutate in relazione a studi condotti sul DNA e di caratterizzazione fenotipica (Kloos et al., 1976; Schleifer et al., 1979; Kloos e Schleifer, 1981).

- Primo gruppo: caratterizzato dalla specie *S. epidermidis*, comprende le specie: *S. epidermidis, S. capitis, S. warneri, S. haemolyticus, S. hominis* e *S. saccharolyticus*.
- Secondo gruppo: caratterizzato della specie *S. saprophyticus* e risulta composto dalle specie: *S. saprophyticus, S. chonii e S. xylosus*.
- Terzo gruppo: caratterizzato della specie *S. simulans* è composto dalle specie: *S. simulans e S. carnosus*.
- Quarto gruppo: caratterizzato della specie *S. sciuri* comprende le specie *S. sciuri e S. lentus*.

Alcune specie tra loro scarsamente correlate non possono essere facilmente inserite nei 4 gruppi illustrati precedentemente e sono comprese in un altro gruppo a se stante, tra cui *S. aureus, S. auricolaris, S. intermedius, S. hyicus e S. caseolyticus*.

Le specie incluse nel genere Staphylococcus sono direttamente e inequivocabilmente collegate dal legame delle basi DNA/rRNA e dalla stabilità termica degli ibridi DNA/rRNA (Kilpper-Bälz e Sclileifer, 1981; Schleifer et al., 1982); inoltre gioca un ruolo

molto importante il legame tra DNA/DNA e la stabilità termica degli ibridi DNA/DNA (Meyer e Schleifer, 1978; Kloos et al., 1979, 1982, 1983; Schleifer et al., 1979; Kloos, 1980; Schleifer et al., 1982), l'analisi comparativa della sequenza (catalogazione) della frazione 16S dell'rRNA (Stackebrandt e Woese, 1979; Ludwig et al., 1984), le relazioni immunologiche (distanza) della loro catalasi (Rupprecht e Schleifer et al., 1979) e la loro fruttosio-1,6-bifosfato-aldolasi (Fischer et al., 1983).

Gli ibridi eterologhi, DNA/DNA tra differenti specie stafilococciche mostrano inoltre una bassa stabilità termica, con valori di $\Delta T_{m(e)}$ superiori a 13°C. Nell'ambito della microbiologia clinica umana viene correntemente utilizzata la tecnica di ibridazione DNA/DNA su micropiastre. Da studi effetuati nella clinica umana si è evidenziato che le 10 specie isolate più frequentemente erano rappresentate da *S. epidermidis, S. aureus, S. haemolyticus, S. caprae, S. simulans, S. hominis, S. capitis, S. saprophyticus, S. warneri e S. lugdunensis*. Da questo studio è risultato che i ceppi di *S. caprae* isolati dai campioni clinici, producevano acido da fruttosio e mannitolo, in contrasto con quanto affermato nel Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. A tale proposito i metodi tradizionali biochimici avevano identificato i ceppi su indicati come *S. haemolyticus e S. hominis* (Kawamura et al., 1998).

Alcuni tratti spaziatori intergenici di rDNA 16S-23S vengono utilizzati per l'identificazione dei ceppi stafilococcici attraverso metodiche basate sull'utilizzo della PCR. In uno studio compiuto su differenti ceppi stafilococcici, ciascuna specie presentava un pattern specifico 16S-23S formato da 8 frammenti provvisti di 104-771 bp, con l'eccezione della specie *S. warneri, S. caprae e S. piscifermentans* che presentano frammenti di maggiori o minori dimensioni. Poche specie mostrarono più

che un pattern, tranne lo *S. saprophyticus e lo S. aureus* che si dimostravano le specie più eterogenee con cinque differenti patterns per i differenti ceppi isolati appartenenti a queste due specie (Mendoza et al., 1998).

In un altro studio venivano differenziate le specie stafilococciche sulla base delle analisi degli enzimi di restrizione (Hinf o HaeIII) endonucleasici (REA) del DNA genomico seguita dall'elettroforesi su gel di agarosio. La REA di 19 isolati di *S. aureus* meticillina-resistenti (MRSA) e di 19 isolati di *S. aureus* meticillina-sensibili rivelava rispettivamente 8 e 14 pattern differenti; n.53 isolati di *S. epidermidis* venivano divisi in 39 gruppi sulle basi della REA pattern (Fujita, 1998).

Diffusione

Gli stafilococchi sono microrganismi ubiquitari, diffusi quindi nell'ambiente, su oggetti inerti (terreno, acqua, aria, polvere ecc.) e su esseri viventi. Fanno parte della flora normale dell'uomo e degli animali nei quali si ritrovano sulla cute, sulle mucose e nel tratto intestinale. Queste caratteristiche di ubiquitarietà e di grande diffusione, favoriscono l'elevata disseminazione, che come nel caso di *S. aureus* presentano un rilevante ruolo epidemiologico, infatti portatori asintomatici che operano nell'industria alimentare, possono diventare possibili fonti di contaminazione degli alimenti e delle materie prime da essi elaborate. Alcune specie sembrano avere localizzazione specifica in determinate parti del corpo, come nel caso di *S. capitis*, isolato frequentemente dal cuoio capelluto e dalla fronte dell'uomo.

Molte specie di Stafilococchi sono ospite-specifiche (*S. caprae, S. lutrae, S. delphini S. felis*). *S. aureus* viene isolato in molti animali marini e terrestri, nei quali è di normale riscontro nella flora batterica della cute oppure essere associato a processi infettivi ed infiammatori quali pustole, necrosi tossica dell'epidermide, osteomielite, meningite, endocardite, mastite, batteriemie, ascessi, infezioni urogenitali, sindromi tossiche da shock. Nell'uomo si registra una notevole prevalenza (>50%) di soggetti portatori sani di *S. aureus*, che colonizza in particolare la cavità nasale, la gola, il cuoio capelluto e le mani. Grazie alla necessità di doversi adattare a condizioni microambientali avverse, *S. aureus* ha sviluppato un elevato grado di resistenza alla disidratazione e agli stress osmotici. E' infatti capace di sopravvivere bene nell'aria, nella polvere e nell'acqua malgrado la mancanza di motilità e la sensibilità alle batteriocine e ad altri fattori inibitori di origine batterica (Havey et al., 2000).

Tra i batteri non sporigeni gli stafilococchi sono tra i più resistenti: possono sopravvivere a svariate condizioni ambientali avverse e sono relativamente resistenti al calore, all'essicamento e ai disinfettanti.

Le specie stafilococciche isolate dall'uomo includono: *S. epidermidis, S. aureus, S. hominis, S. haemolyticus, S. warneri, S. capitis, S. saccharolyticus, S. auricularis, S. simulans, S. saprophyticus, S. cohnii e lo S. xylosus*. Lo *S. epidermidis*, fra le specie di stafilococchi coagulasi negativi, è di comune riscontro sull'epidermide umana, dove costituisce fra il 65 e il 90% di tutti gli stafilococchi isolati complessivamente.

S. aureus richiede per lo sviluppo aerobico, amminoacidi e vitamine, inoltre per lo sviluppo anaerobico necessita di uracile e una fonte fermentabile di carbonio. Quindi *S. aureus* è in grado di svilupparsi in anaerobiosi, ma presenta un migliore sviluppo in

condizioni aerobiche. La temperatura ottimale per lo sviluppo è di +35°C, anche se questo può avvenire a temperature comprese tra +10°C e +45°C. Lo *S. equorum* si può differenziare dagli altri stafilococchi per il suo optimum di crescita alla temperatura di +30°C e l'assenza di crescita a temperature superiori a +37°C. Inoltre questa specie si sviluppa con difficoltà a +37°C. Il range di pH che permette la crescita degli stafilococchi è compreso tra 4,5 e 9,3, con l'optimum compreso tra 7,0 e 7,5. *S. epidermidis* può causare nell'uomo batteriemia, endocarditi, infezioni degli shunt medici, cateteri endovenosi, giunzioni protesiche ed infezioni del tratto urogenitale. *S. saprophyticus* è causa di una comune causa di infezioni dell' apparato urinario in donne giovani (Scott E. Martin, 2000). *S. intermedius e S. hyicus* sono agenti patogeni di notevole importanza rispettivamente in cani e nei suini. *S. chromogenes* viene isolato frequentemente dal latte di bovini affetti da mastite cronica e nel latte dei piccoli ruminanti affetti da mastiti sub-clinica con una prevalenza che si attesta nel 3.7% negli ovini allevati in Francia, nel 13.3% in quelli allevati in Spagna e nel 11.7% di quelli allevati in Sardegna (Berganier et al 1999).

Principali caratteristiche morfologiche, biochimiche, metaboliche e fisiologiche.

Sono rappresentati da cellule sferiche della dimensione di 0.5, 1.5 µm di diametro, si ritrovano occasionalmente singoli, in coppie e tetradi o in corte catene (costituite da tre a quattro cellule) o più frequentemente come raggruppamenti di forma irregolare simili a grappoli ottenuti da divisioni cellulari su piani diversi. La formazione di grappoli

si verifica con una maggiore frequenza durante la crescita su un mezzo solido. Non è in genere difficile identificare le colonie stafilococciche in terreno agarizzato. Nella maggior parte delle specie le colonie si presentano allargate, con diametro di 2-3 mm dopo 24 ore di incubazione a +35°C, o di 7 mm dopo 48-72 ore. Fanno eccezione alcuni ceppi di stafilococchi coagulasi-negativi o le cosiddette colonie "nane" di *S. aureus*. La maggior parte delle colonie stafilococciche sono opache e convesse, con consistenza cremosa, bianche o colorate con varie sfumature di pigmento giallo, specie dopo lunghe incubazioni o dopo essere state conservate a temperatura ambiente per alcuni giorni.

In agar-sangue alcuni ceppi provocano β-emolisi; il rapporto tra il diametro delle colonie rispetto all'area di emolisi è maggiore rispetto a quello delle colonie piccole o puntiformi di streptococchi. La produzione della coagulasi e la β-emolisi sono due caratteristiche strettamente associate; inoltre un'altra caratteristica differenziativa è data dalla capacità di fermentare il mannitolo, presente in *S. aureus* e *S. saprophyticus* ma non in *S. epidermidis*; infatti la maggior parte dei ceppi di *S. aureus*, a differenza dello *S. epidermidis*, può fermentare il mannitolo con formazione di acido e conseguentemente un'abbassamento del pH nel mezzo colturale.

Il mannitolo sale agar (MSA) è un terreno altamente selettivo per l'isolamento degli stafilococchi patogeni da colture miste. Questo terreno si basa sulla capacità degli stafilococchi di crescere in presenza di concentrazioni del 7,5% di NaCl e sulla capacità di *S. aureus* di fermentare il mannitolo. La crescita di tale batterio si evidenzia con la formazione di un alone giallo, che indica la produzione di acido.

Gli stafilococchi sono immobili e asporigeni; nelle colture giovani possono essere presenti delle capsule che sono genericamente assenti nelle fasi stazionarie cellulari. La pigmentazione cellulare su un mezzo non selettivo così come il Tryptone Soy Agar (TSA) varia da un colore bianco-crema all'arancio. La maggior parte dei ceppi stafilococcici sono considerati in base al rischio, sulla base di studi compiuti sulla collezione americana delle colture cellulari, con un codice categoria II (rischio potenziale). Lo *Staphylococcus hyicus* è considerato come un agente patogeno dal codice categoria IV (pericolo potenziale, rischio estremo).

Gli stafilococchi sono gram-positivi, la parete cellulare contiene peptidoglicani e acidi teicoici. La molecola di peptidoglicano è una catena glicanica composta regolarmente dall'alternanza dei residui di acido N-acetilmurammico e di N-acetilglucosammina collegati dai legami β-1,4 glicosidici. La lunghezza della catena media del disaccaride varia fra le 10 e le 65 unità secondo la specie batterica. I gruppi carbossilici di tutti i residui di acido N-acetilmurammico sono collegati dai legami ammidici al residuo N-terminale di L-alanina di un peptide L-alanil-γ-D-isoglutaminil-L-lisil-D-alanina. I peptidi vicini sono collegati dalla pentaglicina (occasionalmente esaglicina) con ponti che si estendono dal gruppo carbossilico della D-alanina di un peptide fino al ε-ammino gruppo del residuo della lisina del peptide successivo.

Il peptidoglicano forma una parete rigida che circonda la cellula. Gli stafilococchi sono generalmente resistenti all'attacco della lisozima-muramidasi, ma sono sensibili all'enzima litico endopeptidasi lisostafina (Schindler e Schuardt, 1964) che attaca i legami glicina-glicina presenti nei ponticelli interpeptidici del peptidoglicano.

Vi sono specie o ceppi che hanno quantità significative di L-serina o L-alanina oltre alla presenza di glicina nella parete cellulare peptidoglicanica; questi ceppi sono generalmente meno sensibili alla lisostafina rispetto a quelli con un interpeptide a ponte costituito da soli residui di glicina. Gli acidi teicoici sono polimeri elettricamente carichi in cui si ripetono le unità del ribitolo o del glicerolo che risultano legate attraverso i gruppi fosfodiestere. Gli acidi teicoici si trovano fra la parete cellulare e la membrana citoplasmatica. La loro funzione pare sia quella di mantenere correttamente l'ambiente ionico a cavallo della membrana citoplasmica. Egualmente questi contribuiscono alla carica superficiale della cellula stafilococcica.

Nella membrana dello *S. aureus* è stata ritrovata la presenza di un ATP-asi, e di diversi sistemi di trasporto, quali un'antiporto Na^+/H^+, un'antiporto eritromicina/H^+ e un'antiporto cloramfenicolo/H^+ (Kodama e coll., 1998).

Gli stafilococchi sono anaerobi facoltativi e ad eccezione della specie anaerobica *S. saccarolyticus*, crescono più rapidamente e più abbondantemente in condizione di aerobiosi. Sono di solito catalasi positivi. La maggior parte dei ceppi cresce in presenza del 10% di NaCl e a temperature comprese tra i 18 e i 40°C. Sono chemioorganotrofi con metabolismo respiratorio e fermentativo. Alcune specie hanno un metabolismo prevalentemente respiratorio o fermentativo (Wesley et al., 1980). Nel sistema di trasporto degli elettroni si possono trovare menaquinoni insaturi e citocromi a e b (anche i citocromi c nelle specie S. caseolyticus e S. sciuri). In diverse specie possono essere presenti pigmenti carotenoidi.

Possono produrre energia attraverso la glicolisi, lo scambio dell'esoso monofosfato e il ciclo degli acidi tricabossilici (Scott E. Martin, 2000). Utilizzano un'ampia varietà di

carboidrati, dai quali in condizioni di aerobiosi producono acido; in particolare molte specie producono acido lattico dalla fermentazione del glucosio e, in condizioni di aerobiosi, i prodotti principali del metabolismo batterico sono rappresentati dall'acido acetico e da anidride carbonica.

In condizione di anaerobiosi possono essere prodotte le forme D o L dell'acido lattico a partire dal glucosio. Il lattosio o il D-galattosio possono essere trasformati attraverso i percorsi metabolici del D-tagatosio-6-fosfato o di Leloir.

Per la determinazione delle specie di stafilococchi coagulasi-negativi sono necesssarie varie prove da eseguire in laboratorio come vari test enzimatici, la prova della fermentazione di vari zuccheri, la pigmentazione delle colonie, l'emolisi e la sensibilità alla novobiocina.

Sono stati recentemente identificati 13 stafilococchi coagulasi-negativi produttori di enterotossine. Di questi, sette sono novobiocina sensibili (Minima Concentrazione Inibente, MIC <1,6 μg/ml) e sei sono novobiocina resistenti (MIC ≥ 1,6 μg/ml).

Come risorse energetiche e fonte di carbonio vengono utilizzati i carboidrati e/o gli amminoacidi. Una certa varietà di amminoacidi può essere utilizzata aerobicamente con la produzione di acido. Per la maggior parte delle specie, il prodotto principale della fermentazione del glucosio è l'acido lattico; in aerobiosi i prodotti principali sono l'acido acetico e la CO_2. Diverse specie possiedono la fruttosio-1,6-bifosfato (FDP) aldolasi di classe I. Le richieste nutrizionali sono variabili. La maggior parte delle specie identificate richiede una fonte di azoto organico come particolari amminoacidi e vitamine del gruppo B. Altre possono crescere con $(NH_4)SO_4$ come fonte di azoto presente nel substrato. Per alcune specie che crescono in anaerobiosi possono essere

richieste differenti fonti di carbonio e/o uracile. Alcune specie sono sensibili alla novobiocina mentre altre sono tipicamente resistenti a questo antibiotico. Sono usualmente sensibili agli antimicrobici come i fenoli e loro derivati, salicilanilidi, carbanilidi, e alogeni (cloro e iodio) e loro derivati. Numerosi batteriofagi che hanno una gamma limitata o ampia di ospiti hanno fra questi gli stafilococchi. In alcune specie è stato dimostrato il trasferimento di caratteri genetici attraverso la trasformazione, trasduzione e contatto cellulare. Le popolazioni naturali normalmente vengono isolate dalla cute, ghiandole cutanee e mucose degli animali a sangue caldo. La gamma degli ospiti può essere ridotta o estesa in stretta dipendenza dalla specie o dalla sottospecie particolare. Alcuni microrganismi possono essere isolati da una varietà di prodotti di origine animale (per es. carne, latte, formaggio ecc.) e superfici ambientali (suolo, sabbia, polvere, aria e acqua). Alcune specie sono patogene opportuniste di umani e/o animali.

Alcune specie stafilococciche sono particolarmente temute nel campo delle industrie alimentari in quanto presentano resistenza ai composti dei sali quaternari di ammonio (QACs). Alcuni di questi ceppi sono stati analizzati per la determinazione dei geni responsabili di questo carattere (qacA/qacB, smr, qacG o qacH) e sono stati sottoposti all'identificazione. Le determinazioni di specie venivano effettuate su basi biochimiche (API STAPH) e mediante l'analisi comparativa delle sequenze dell'rRNA 16S e degli spaziatori intergenici tDNA. Gli isolati venivano in seguito caratterizzati per la resistenza fenotipica agli agenti antimicrobici quali antibiotici e disinfettanti. La resistenza all'ampicillina, penicillina G e coloranti all'antracene, erano più frequentemente riscontrate nei ceppi possessori dei geni qacA o qacB. Un solo

stafilococco QAC resistente portatore del gene smr ha mostrato la resistenza alla ampicillina, penicillina, tetraciclina, eritromicina e trimethoprim, inoltre nessuno stafilococco QAC resistente aveva prodotto delle enterotossine (Heir et al., 1999).

Gli stafilococchi presentano una differenza di caratteristiche relativa all' ambiente al quale si sono adattati. In uno studio riguardante la sensibilità di differenti ceppi di *S. aureus* isolati dal latte bovino di massa, dalle mani e dalle narici degli operatori addetti alla mungitura, si potevano osservare significative differenze riguardanti la sensibilità dei ceppi di *S. aureus* nei riguardi del fago bovino 42 D (Adesiyun e Romain, 1999).

L'identificazione di specie viene anche effettuata sulla base di caratteristiche fenotipiche, comprendenti la parete cellulare, la morfologia delle colonie, le proprietà molecolari, l'attività di vari enzimi, la produzione di acidi da differenti carboidrati, i prodotti del metabolismo del glucosio, la resistenza a determinati antibiotici, le richieste nutrizionali, la composizione degli acidi grassi cellulari, il fabbisogno di ossigeno, il sistema di trasporto degli elettroni e la sensibilità a certi fagi.

Fattori di patogenicità

Gli stafilococchi sono commensali della superficie corporea di animali a sangue caldo. Le patologie da essi causate includono le infezioni acute come la setticemia e tossiemie acute, così come le tossinfezioni alimentari da essi causate. Lo *S. aureus* è da tempo considerato il maggior patogeno tra le specie appartenenti al genere Staphylococcus, di seguito saranno considerate le caratteristiche di patogenicità, con alcuni riferimenti ad altre specie patogene appartenenti al genere Staphylococcus.

Adesine

Come gli altri batteri, anche gli stafilococchi possiedono specifiche proteine di superficie (adesine) che permettono loro di legarsi alle proteine della matrice cellulare come la laminina, la fibronectina e il collagene e inoltre alle superfici cellulari dell'ospite. La colonizzazione della cute umana come degli animali è una caratteristica comune in una varietà di malattie dermatologiche. *S. aureus*, ma anche alcuni SCN (Catalanotti et al., 1993), tra i quali *S. epidermidis, S. chromogenens, S. hominis, S. simulans e S. warneri*, sono in grado di produrre fattori di adesione, tra i quali il cosi detto slime che rappresenta un importante fattore di patogenicità (Matthews et al., 1991).

Capsule

Solo pochissimi ceppi di *S. aureus* possiedono capsule, spesso formate da acido glucosaminuronico, le capsule possono manifestarsi in vivo più spesso di quanto si possa dimostrare, ma questa struttura viene perduta durante la ripetuta sub-coltivazione. Il ceppo originario capsulato dà origine in modo reversibile a varianti non capsulate, ciò implica l'esistenza di un passaggio genotipico che potrebbe essere correlato con la perdita apparente della capsula durante la coltivazione.

Proteina A

Praticamente tutti i ceppi di *S. aureus* possiedono un costituente di superficie indicata come proteina A (42-Kd), legata in maniera covalente al peptidoglicano; una parte

viene anche liberata spontaneamente all'esterno delle cellule. La proteina A può indurre la sintesi di anticorpi specifici ed è in grado di reagire con la porzione anticorpale Fab. Inoltre la proteina A, presente sulla superficie batterica o in soluzione, interagisce in maniera aspecifica con la porzione Fc delle immunoglobuline di praticamente tutte le specie dei mammiferi. Tutte le sottoclassi delle IgG umane, eccetto le IgG3, alcune IgM e IgA2, sono adsorbite dagli stafilococchi; questa è un'utile procedura per quantificare i complessi antigene-anticorpo. Le interazioni in vivo tra la proteina A e Fc provocano numerosi effetti biologici: anafilassi locale e generalizzata negli animali; reazioni ponfo-eritematose nell'uomo; fenomeno di Arthus; attivazione del complemento sia per via alternativa che per via classica, con produzione di fattori chemiotattici; inibizione dell'attività degli anticorpi opsonizzanti a causa della competizione con i recettori F, dei fagociti; induzione della liberazione dell'istamina dai leucociti; proliferazione dei linfociti B ma non dei linfociti T. In seguito a studi compiuti attraverso l'utilizzo di tecniche molecolari sul gene del polimorfismo della cosiddetta regione X della proteina A, questo è stato considerato come un buon indicatore epidemiologico (Frènay et al., 1994). Il gene in questione contiene circa 2150 bp e presenta alcune regioni distinte funzionalmente: una regione che codifica per la porzione legante Fc, la cosiddetta regione X e la porzione C terminale, una sequenza richiesta per l'adesione alla parete cellulare (Guss et al., 1984; Frénay et al., 1994). La regione polimorfica X presenta, all'interno di essa, un numero variabile di ripetizioni di 24 bp. Differenti ceppi di *Staphylococcus aureus* meticillina resistente (MRSA) epidemici e non-epidemici per l'uomo, possono causare entrambi infezioni e presentano differenti patterns, possono essere distinti con successo attraverso l'analisi

di questa regione polimorfica (Frènay et al., 1994). La proteina A è stata identificata nel 93% dei ceppi di *S. aureus* isolati da infezioni intramammarie bovine (Poutrel e Ducelliez, 1979; Johne e Jarp, 1988).

In uno studio compiuto sulla produzione di proteine da parte di 119 ceppi di *S. aureus*, nella porzione genica che codifica per la proteina A, sono stati individuati 5, 4, 3 e 2 settori leganti le IgG. Un solo ceppo era privo del gene codificante per la proteina A. Sono state inoltre ritrovate delle differenze nel profilo della coagulasi fra il gruppo con 4 e con 5 settori leganti le IgG. In questi ceppi è stata osservata anche una differenza fra i due gruppi nel profilo delle produzioni delle tossine (Seki et al., 1998).

Fattore addensante

La maggior parte dei ceppi non capsulati di *S. aureus* forma aggregati quando è sospesa nel plasma o in soluzioni di fibrinogeno. Si pensa che il fattore di aggregazione sia una coagulasi di superficie.

Coagulasi

Fino ad alcuni anni fa, molti dei laboratori clinici differenziavano solamente lo *S. aureus* dagli stafilococchi coagulasi negativi (SCN).

I filtrati di colture di *S. aureus* coagulano il plasma di molte specie animali, ciò è dovuto alla produzione di un fattore di coagulazione del plasma detto coagulasi che viene considerato un marker standard di identificazione dello *S. aureus*. Tuttavia alcuni ceppi selvaggi appartenenti alla specie *S. aureus* (identificabili con l'ibridazione del DNA),

come pure i vari mutanti, risultano coagulasi negativi. Esistono 7 coagulasi antigenicamente diverse (Halpin-Dohnalek, 1989). Da alcuni ceppi coagulasi negativi viene prodotta una metalloproteinasi ad azione coagulasi-simile, che può interferire con la loro identificazione. In tali casi il differenziamento di specie può essere attuato mediante ibridazione del DNA o con altri criteri tassonomici. La coagulazione richiede l'interazione con un fattore coagulasi reattivo (CRF, Coagulase-Reacting-Factor) presente nel plasma, che è probabilmente un derivato della protrombina: un complesso coagulasi CRF trasforma il fibrinogeno in fibrina. Sebbene gli stessi fibrinopeptidi siano rilasciati allo stesso modo della trombina, questo processo differisce dalla normale coagulazione per il fatto che non sono richiesti i vari fattori accessori fra cui il $Ca2^{+}$; il coagulo inoltre è più friabile e non si retrae.

In passato la positività al test della coagulasi veniva considerata un indice della capacità dei ceppi di produrre enterotossine, ma è stato dimostrato che non tutti gli *S. aureus* coagulasi positivi risultano essere enterotossigeni (Halpin- Dohnalek, 1989)

La differenziazione tra stafilococchi coagulasi positivi viene eseguita di solito mediante il test della coagulasi in provetta che evidenzia la coagulasi stafilococcica extracellulare, o mediante il test su vetrino che evidenzia il "clumping factor" (coagulasi legata) presente sulla superficie della cellula batterica rappresentata da una proteina legante il fibrinogeno (Hartford et al., 1997).

La coagulasi libera è una proteina naturale e di essa sono stati identificati i differenti tipi antigenici. Gli stafilococchi positivi alla coagulasi hanno la capacità di indurre il plasma sanguigno a formare un grumo di fibrina. Questo enzima, prodotto dalla maggior parte dei ceppi virulenti, facilita la patogenicità stafilococcica determinando

una barriera di fibrina che sembra localizzare le lesioni acute stafilococciche. Tuttavia, l'importanza di questa barriera nell' infezione non è interamente chiara, soprattutto riguardo la patogenicità degli stafilococchi coagulasi-negativi. La coagulazione del sangue in vivo coinvolge l' interazione di un certo numero di componenti. Molto brevemente, un grumo è costituito dalla proteina plasmatica fibrinogeno che è presente in una forma solubile nel plasma che viene trasformato in una rete insolubile di materiale fibroso chiamata fibrina. La coagulasi stafilococcica si comporta convertendo il fibrinogeno in fibrina. L'enzima coagulasi determina la deposizione della fibrina attorno alle cellule stafilococciche così che essi possano evitare la fagocitosi da parte delle cellule del sistema immunitario.

Circa il 97% dei ceppi di *S aureus* di origine umana possiede sia la coagulasi legata che la coagulasi stafilococcica extracellulare. La proteina A si trova sulla superficie cellulare di circa il 95% dei ceppi di *S. aureus* isolati dall'uomo ed ha la proprietà di legare il frammento Fc delle immunoglobuline G (IgG).

Si è osservato che alcuni ceppi di S. aureus resistenti alla meticillina (MRSA) possono esprimere livelli di "clumping factor" e di proteina A inferiori alla soglia di rilevazione. E' stato inoltre dimostrato che tutti questi ceppi possiedono un polisaccaride capsulare. La capsula può mascherare sia la proteina A, che il "clumping factor" e quindi impedire l'agglutinazione. La proteina A e il "clumping factor" differiscono immunologicamente.

Uno dei motivi per il quale la coagulasi è ampiamente usata come indicazione positiva per l'identificazione degli stafilococchi è dovuta al fatto che la prova è di facile effettuazione e risulta molto valida. Le cellule del microrganismo sono mescolate con il

plasma di coniglio o umano disponibile in commercio (con aggiunta di citrato, ossalato o acido etilendiamminotetracetico, utilizzati per chelare il calcio presente richiesto in vivo nella coagulazione), utilizzando la metodica eseguita in provetta, o la tecnica del vetrino, eseguita su un vetrino da microscopio. Il vetrino o la provetta vengono incubati a 37 °C e osservati dopo 1 e 3 ore; qualsiasi grado di coagulazione, comunque leggero, viene considerato positivo. Una tecnica rapida per eseguire il test della coagulasi è quella proposta nel 1980, che prevede l'uso di particelle di lattice o globuli rossi di pecora sensibilizzati con fibrinogeno e plasma umano (Essers e Radebold, 1980). Il fibrinogeno legato alle particelle di lattice rivela la presenza di fattori aggreganti prodotti dallo stafilococco, mentre le immunoglobuline legate sulla superficie del lattice stesso rivelano la presenza della proteina A sulla parete dello *S. aureus*. Se una sospensione batterica e le particelle di lattice vengono messe a contatto, si produce una agglutinazione visibile. Tutti i test per la coagulasi "modificati" presentano una sensibilità del 92-99% e una specificità del 98-100% (Aldrige et al., 1984; Baker et al., 1981; Berke e Tilon, 1986; Brown, 1986; Jungkind et al., 1984; Myrick e Ellner, 1982; Pennel et al., 1984).

In uno studio compiuto sulla tipizzazione del gene coagulasi di 151 ceppi di *S. aureus* isolati da bovine affette da mastite mediante l'utilizzo della tecnica PCR, sono stati classificati sei tipi differenti, con il 73% degli isolati (110 ceppi) appartenenti al tipo 1 (Raimundo et al., 1999).

Alcuni ceppi di *S. aureus* coagulasi-negativi possono coagulare il plasma per la presenza di una proteasi attiva detta pseudocoagulasi (Bulanda et al., 1981), tuttavia anche alcuni ceppi coagulasi positivi possono produrre la pseudocoagulasi.

In uno studio condotto presso un reparto di batteriologia clinica della Facoltà di Medicina dell'Università di Varsavia, sono stati isolati 17 ceppi di *S. aureus* resistenti alla meticillina, che risultavano tutti negativi alla coagulasi libera e contemporaneamente positivi al "clumping factor" (CF), la proteina A e la termonucleasi. Tutti questi ceppi erano inoltre resistenti ad altri antibiotici quali la gentamicina, tetracicline e il macrolide-lincosamide-straptogramina B (Mynarczyk et al., 1998).

I gruppi fagici e il tipo di coagulasi presente nello *S. aureus* vengono anche esaminati simultaneamente per la determinazione di isolati agenti eziologici primari o secondari di malattie dermatologiche come l'impetigine (Kagami et al., 1997) e la *staphylococcal scalded skin syndrome* (SSSS). E' stata ritrovata una relazione tra i sierotipi che producevano la tossina esfoliativa (ET) e il tipo di coagulasi presente nei ceppi produttori di ET (Kanzaki et al., 1997).

I risultati di un'indagine compiuta sul polimorfismo genico di differenti ceppi di *S. aureus* isolato da allevamenti bovini di differenti aree geografiche, indicavano una differenza del profilo genotipico della coagulasi, relativamente alle differenti aree, inoltre soltanto alcuni genotipi prevalevano in ogni area geografica sottoposta ad analisi, inoltre, i genotipi predominanti erano più resistenti alle attività battericide dei neutrofili rispetto ai genotipi rari (Su et al., 1999).

Nucleasi

La nucleasi di *S. aureus* presenta un'attività sia endo- che esonucleasica tanto sul DNA che sull'RNA, con formazione di 3'-nucleotidi.

Per la determinazione della DNAasi possono essere utilizzati due tipi di test; il primo è basato sull'incorporazione del DNA nell'agar nutritivo. Dopo 18-24 ore di incubazione la presenza di batteri secernenti l'enzima può essere evidenziata ricoprendo la piastra con acido cloridrico diluito. L'acido precipita il DNA presente nel terreno e quindi le colonie che producono DNAasi vengono circondate da una zona chiara, nella quale il DNA ha subito una degradazione. Le aree nelle quali il DNA non è stato idrolizzato appaiono invece opache.

Il secondo test per la ricerca dei ceppi produttori di DNAasi è basato sull'aggiunta di Blu di Toluidina all'agar nutritivo. Nel caso in cui il batterio sia un produttore di DNAasi, la colorazione dell'area intorno alle colonie vira dal blu al rosa, indicando l'idrolisi del DNA. Benchè questo test possa essere d'aiuto nell'identificazione di ceppi scarsamente produttori di coagulasi, non può essere considerato così affidabile come il test della coagulasi per quanto riguarda l'identificazione dello *S. aureus* (Kloos e Jorgensen, 1981).

Stafilochinasi

La stafilochinasi, al pari della streptochinasi e della urochinasi, provoca lo scioglimento del coagulo attivando la conversione del proenzima plasminogeno nell'enzima fibrinolitico plasmina. Il suo gene è situato su un fago.

Termonucleasi

Alcuni ceppi di *S. aureus* producono una endonucleasi che rimane stabile dopo la bollitura a 100°C per 15 minuti (Gudding, 1983). L'enzima desossiribonucleasi prodotto da *S. aureus* è una proteina globulare a catena polipeptidica singola costituita da 149 amminoacidi, con peso molecolare 16,8 kDa (A.P.H.A., 1985). Per la sua attività richiede la presenza di ioni calcio, possiede attività ottimale a pH 8,6 e viene precipitata in coltura in presenza di solfato di ammonio (Bergdoll et al., 1967). La termonucleasi stafilococcica ha delle proprietà endo ed esonucleotidiche capaci di tagliare sia le molecole di DNA che di RNA. La produzione di tale Dnasi è inibita da condizioni di incubazione anaerobiche ed è stimolata dall'aerobiosi; possiede una "D-value" (tempo necessario per l'abbattimento del 90% dell'attività) di 16,6 minuti a 130°C (Bresciani e Ottaviani, 1984) e si può considerare resistente ad un riscaldamento per 20 minuti a 120°C (Caserio e Valcamonica, 1974). Un'enzima con analoghe caratteristiche di resistenza termica è prodotto esclusivamente da *S. aureus* anche se altre Dnasi similari sono prodotte da *S. epidermidis*, Micrococcus spp. e risultano termolabili o non completamente termostabili (Dnasi di Bacillus spp.) (Caserio e Valcamonica, 1974).

Alcuni ricercatori, lavorando su una larga varietà di ceppi di *S. aureus* isolati da alimenti hanno dimostrato una stretta relazione tra la produzione di enterotossine in episodi di tossinfezione alimentare e produzione di termonucleasi; da questo studio la quasi totalità dei ceppi enterotossici (98,3%) risultano produttori di termonucleasi (Cords e Tatini, 1973; Cunningham et al., 1956).

Tali osservazioni sono state confermate da altri ricercatori che hanno evidenziato la produzione di termonucleasi da parte di 238 ceppi enterotossigenici (95%) su 250 (De Felip et al., 1979; De Felip et al., 1977). E' stata anche dimostrata una stretta relazione tra il numero di cellule stafilococciche necessarie a produrre enterotossine e termonucleasi: per entrambe le proteine il livello soglia per ottenere l'attività specifica è di 10^5-10^6 cellule per grammo di alimento (Campanini, 1979; Emswiler-Rose et al., 1980; Erickson e Deibel, 1973).

Il tenore di acqua libera ed il pH sono fattori limitanti riguardanti la capacità di *S. aureus* di produrre enterotossine e termonucleasi. Una concentrazione di NaCl al 17% (aw 0,86) inibisce la produzione della termonucleasi (Lachica et al., 1972) e concentrazioni superiori al 10% di NaCl (aw 0,92-0,93) impediscono la produzione di enterotossine (Lachica et al., 1969). A pH molto acidi *S. aureus* produce la termonucleasi ma non le enterotossine.

Lipasi

Vengono saggiate testando la loro capacità di opacizzare l'agar al rosso d'uovo o di scindere i detergenti tipo Tween. Sembra che la produzione di lipasi sia un fattore che contribuisce alla sopravvivenza del microrganismo sulla cute, per via dell'azione battericida lipidica. La lipasi non è prodotta esclusivamente da *S. aureus*, ma può essere prodotta da differenti ceppi di SCN (Drouault et al., 2000; Vuong et al., 2000; Samuelson et al., 1999).

Ialuronidasi

S. aureus produce ialuronidasi oltre ad una o più proteasi; ne sono state identificate tre. La ialuronidasi depolimerizza l'acido ialuronico, sostanza fondamentale del tessuto connettivo. Un'enzima recentemente identificato elimina le proprietà tossiche degli acidi grassi degli stafilococchi attraverso il legame con il colesterolo.

Emolisine

Sono state attualmente identificate quattro diverse emolisine di natura proteica di *S. aureus*; tutte producono una marcata β-emolisi ma differiscono nella specificità di specie delle emazie e nel meccanismo d'azione. Un unico ceppo può produrre più di una emolisina. Oltre alle emazie, anche le cellule tissutali possono essere danneggiate. Alcune emolisine provocano infatti una necrosi localizzata ed hanno un effetto letale per gli animali da esperimento.

La emolisina-α (tossina-α) è la più importante tra quelle prodotte dai ceppi di *S. aureus* isolati dall'uomo. E' la più attiva verso i globuli rossi di coniglio; le emazie umane risultano resistenti a questa tossina mentre le piastrine e le colture cellulari vengono danneggiate. Negli animali da esperimento l'emolisina-α manifesta un'azione dermonecrotica se inoculata localmente. Risulta mortale se somministrata per via generale. Sembra che l'effetto principale sia lo spasmo della muscolatura liscia vasale. Agisce anche sul sistema nervoso centrale e causa ipertensione. La sua azione litica viene esplicata, in ordine di sensibilità sui globuli rossi di coniglio, di montone, di bovino e di capra; risultano pressochè insensibili gli eritrociti umani e del cavallo.

Il recettore specifico localizzato sulla membrana eritrocitaria risulta essere una sialoglicoproteina-α secreta come un monomero idrosolubile con peso molecolare di 34 kDa che, al contatto con un recettore di membrana, si ricompone per formare un canale eptamerico che penetra nella membrana (Gouaux, 1998; Olson et al., 1999).

Recenti studi dimostrano un'incremento di produzione dell'emolisina-α da parte di *S. aureus* in presenza di membrane liposomiche (Bortoleto et al., 1998). L'abbassamento del pH sulla superficie delle membrane biologiche riduce la stabilità dell'αHL (pore-forming α-hemolysin) che modula il tasso di formazione del poro (Bortoleto e Ward , 1999).

L'emolisina-β viene comunemente prodotta dai ceppi isolati da animali e solamente dal 10-20% dei ceppi isolati dall'uomo. E' un'emolisina "caldo-fredda"; i suoi effetti litici infatti non si manifestano completamente a meno che la miscela tossina-sangue (o le colture in agar-sangue) non venga mantenuta a basse temperature dopo essere stata incubata a 37°C. L'emolisina-β è una sfingomielinasi C che agisce in modo distruttivo sulle membrane di eritrociti o di altre cellule di mammiferi (Gaskin, 1997). Ha una massa molecolare relativa (Mr) di 30.000 e viene attivata dal Mg2+ e non dal Ca2+; essa scinde la sfingomielina in N-acilsfingosina e fosforilcolina. I globuli rossi di pecora, umani e di cavia contengono, nell'ordine, quantità decrescenti di sfingomielina e in modo altrettanto decrescente risultano sensibili alla emolisina-β. Questa emolisina si rivela citotossica per numerosi tipi di colture cellulari e tossica per gli animali da esperimento quando somministrata in dosi elevate. Inibisce la chemiotassi, distrugge le piastrine e ha azione necrotica sul tessuto mammario in fase di lattazione.

L'emolisina-γ è formata da due proteine basiche ad azione combinata (Kaneko et al., 1997), la proteina F (o H gamma I) e la H gamma II. La proteina F si lega per prima rispetto alla proteina H gamma II agli eritrociti umani dando origine all'emolisi (Kaneko et al., 1997).

I globuli rossi di coniglio, umani e di pecora sono sensibili a questa emolisina mentre non lo sono quelli di cavallo e di pollo. L'agar e altri polimeri solforati inibiscono l'emolisina-γ che pertanto non risulta attiva nelle piastre di agar-sangue. Anche il colesterolo e molti altri lipidi svolgono un'azione inibente. L'emolisina-γ al pari della α-emolisina e della leucocidina possono costituire dei pori transmembrana che portano alla lisi cellulare (Gouaux, 1997).

L'emolisina-δ è prodotta dalla maggior parte dei ceppi di *S. aureus* isolati dall'uomo e si presenta in forma di aggregati eterogenei di subunità con massa molecolare relativa (M_r) di 5000. E' una fosfolipasi che possiede azione dermonecrotica e potere emolitico nei confronti degli eritrociti umani, di scimmia, cavallo, cavia, ratto e topo. Svolge la sua azione disgregatrice, probabilmente come un tensioattivo diretto su vari tipi di cellule fra cui i globuli rossi, i leucociti, le colture cellulari di mammiferi e i protoplasti batterici; non è specie specifica. Recenti studi hanno dimostrato la produzione di una emolisina-δ da parte dello *S. lugdunensis* isolato in infezioni orali acute (You et al., 1999).

La leucocidina di Panton-Va1entine

Viene prodotta dalla maggior parte dei ceppi di *S. aureus* e agisce solamente sui leucociti polimorfonucleati e sui macrofagi dell'uomo e del coniglio. E' costituita da due componenti: F (fast) e S (slow). La componente S si lega al ganglioside GMI (il recettore della tossina del colera) attivando una fosfolipasi endogena A2 legata alla membrana. I prodotti che ne derivano fissano successivamente la componente F, formando un canale specifico per lo ione K^+ nella membrana, con conseguente citolisi. Questa molecola costituita da due componenti sembra che abbia un ruolo nell'apertura dei canali del Ca^{2+} (Baba Moussa et al., 1999).

Tossina esfoliativa epidermolitica

Provoca numerose lesioni dermatologiche. Questa proteina, relativamente termostabile e acidolabile ha una massa molecolare relativa (Mr) di 24.000 ; è prodotta da circa il 5% dei ceppi di *S. aureus* per la maggior parte appartenenti al gruppo fagico II. La tossina esfoliativa si trova sotto forma di due gruppi antigenici: il tipo B, che si presenta soprattutto nei ceppi del II gruppo fagico, è codificata da un plasmide; il tipo A, prodotto da ceppi di vari tipi fagici, è codificato dai cromosomi. Molti ceppi producono ambedue i tipi. La tossina agisce scindendo lo strato granuloso dell'epidermide, probabilmente per la separazione dei desmosomi che mantengono unite tra loro le cellule di questo strato. Recentemente sono state identificate tre differenti tossine esfoliative prodotte da *S. hyicus* isolati da 60 differenti allevamenti

suini e indicate come ExhA-, ExhB- e ExhC-, delle quali 2 erano differenziate dal punto di vista antigenico (Andersen, 1998).

Staphylococcal scalded skin syndrome è il termine utilizzato per una gamma di malattie dermatologiche neonatali causate dalle tossine esfoliative ETA ed ETB di *S. aureus*. Queste tossine sembrano avere un ruolo fondamentale come proteasi della serina (Ladhani et al., 1999).

Enterotossine

Le tossinfezioni alimentari di origine stafilococcica sono numerose e comunemente diffuse nel mondo; sono causate dall'ingestione di cibo contenente enterotossine prodotte da *Staphylococcus aureus* (SE) (Lotter e coll., 1977; Lepeyre, 1988; De Buyser, 1985).

Oltre al loro ruolo nel causare la tossinfezione alimentare, le enterotossine stafolococciche SEs presentano altre attività biologiche come ad esempio quelle superantigeniche (Kotb M., 1995).

L'enterotossina viene prodotta su un gran numero di substrati, ed in particolare sui prodotti maggiormente manipolati da parte dell'uomo che quindi rappresenta il maggiore diffusore di tali germi. La produzione dell'enterotossina richiede condizioni ambientali molto più restrittive di quelle per lo sviluppo del germe, questa caratteristica rende possibile, pertanto, lo sviluppo del germe senza la produzione di enterotossina. Anche se non esistono concordanze di opinioni è stato dimostrato che, affinchè si verifichi un fatto tossinfettivo nell'uomo, è necessario che l'alimento sia

fortemente contaminato da stafilococchi; la maggior parte dei ricercatori è dell'avviso che siano necessari $5x10^5$ o più stafilococchi per grammo di prodotto perché la produzione di enterotossina sia dimostrabile; tuttavia nella pratica sembra che per la sua produzione sia necessaria la presenza di cariche superiori a 10^6 cellule, anche se sono stati dimostrati casi di tossinfezione in cui il prodotto alimentare conteneva $5x10^4$ cellule/g.

Benchè *S. aureus* sia la specie maggiormente coinvolta nella produzione di diverse tossine extracellulari stabili al calore, responsabili dei sintomi della malattia (Bergdoll, 1989), differenti autori hanno descritto ceppi di Stafilococchi Coagulasi Negativi (SCN) enterotossigenici (Danielson e Hellberg, 1977; Marin e coll., 1992; Orden e coll., 1992; Vernozy e coll., 1996). La produzione di coagulasi è il criterio più comunemente usato per confermare la presenza di *S. aureus* negli alimenti (Baer e coll., 1976); in diversi studi infatti è stata trovata una correlazione tra la produzione di coagulasi e la enterotossigenicità (Burbianka, 1971; Wieneke, 1974).

Oltre a *S. aureus* altri ceppi di Stafilococchi Coagulasi Positivi (SCP) comprendenti le specie *S. intermedius* e *S. hyicus* vennero considerati produttori di enterotossine (De Buyser e coll., 1987; Hirooka e coll., 1988; Valle e coll., 1990).

Il 7% dei ceppi di SCN siano enterotossigenici, produttori di almeno una tra le tossine conosciute (Lotter e coll., 1977) e che le specie coinvolte siano *S. cohnii, S. epidermidis, S. saprophyticus, S. sciuri, S. warneri, S. chromogenes* e *S. lentus* (Bautista e coll., 1988; Morita e coll., 1979; Valle e coll., 1990; Cheng-Chun e coll., 1997).

Attualmente sono state identificate le enterotossine stafilococciche SEA, SEB, SEC1, SEC2, SEC3, SED, SEE(Halpìn-Dohnalek e Marth, 1989; Su e Worig, 1995; Munson et al.,

1998; McLauchlin et al., 2000), che producono il 95% delle intossicazioni alimentari (De Santis et al., 2005).

Nuove SE (dalla SEG alla SEQ e la SEU) recentemente sono state identificate e differenziate chimicamente e sierologicamente (Rosec and Gigaud 2002; Scherrer et al., 2004). Le tossine sono proteine dal peso molecolare di 26 36 kDa; sono singole catene proteiche costituite da polipeptidi contenenti grandi quantità di lisina, tirosina, acido aspartico e glutammico e caratterizzate dal contenuto di soli due residui di emicisteina e uno o due residui di triptofano. La composizione amminoacidica delle enterotossine SEA, SED e SEE e delle SEB e SEC1, SEC2 e SEC3 sono simili (Bergdoll, 1989). In tutti i tipi di tossine vi è solo una zona con una sequenza comune di oltre 4 residui amminoacidici che include il solo residuo istidina conservato. Le modificazioni chimiche di questi residui di istidina in ciascuna SEA (Stelma e Bergdoll, 1982) o SEB (Scheuber et al., 1985) hanno portato la perdita dell'attività emetica della tossina e ad un piccolo cambiamento della conformazione molecolare delle tossine; questo supporta l'ipotesi che il dominio conservato dell'istidina può essere associato con il sito attivo tossico. La produzione dei tipi SEB e SEC avviene sotto il controllo cromosomico-plasmidico e sono prodotte maggiormente alla fine della fase stazionaria di crescita come metaboliti secondari; SEA e SEE sono prodotte sotto il controllo cromosomico (SED è prodotta sotto il controllo plasmidico) e sono sintetizzate durante la fase logaritmica di crescita (Bergdoll, 1979). Queste differenze vengono evidenziate nella loro produzione in diversi tipi di alimenti. La maggior parte delle tossinfezioni alimentari sono causate dalle enterotossine A e D (Minor e Marth, 1976), che vengono prodotte negli alimenti ad un largo range di pH e aw rispetto alla B e C.

I biotipi umani di *S. aureus* producono più frequentemente enterotossine rispetto ai biotipi isolati da uccelli o altri animali (Isigi et al., 1992). Il tipo A è più frequente nei casi di tossinfezione; il tipo B è coinvolto solo occasionalmente ed è prodotto soprattutto dai ceppi isolati da processi morbosi, in genere a livello intestinale dell'uomo (Cibrowski e Je1jaszewicz, 1985). Anche le enterotossine C e D sono associate con fatti tossinfettivi. L'ordine di frequenza con cui queste enterotossine si rinvengono nei fenomeni tossinfettivi vede al primo posto l'enterotossina A seguita dalla D, quindi dalla C e B ed infine dal tipo E, la quale è solo raramente responsabile di fatti tossinfettivi. I sierotipi A e D causano più frequentemente intossicazioni alimentari probabilmente perché queste tossine possono essere prodotte in un più ampio intervallo di condizioni di crescita o in presenza di un numero inferiore di stafilococchi rispetto ad altri sierotipi. Molti ceppi di stafilococchi producono più di una tossina; è stato dimostrato infatti che molti ceppi isolati da episodi tossinfettivi sono in grado di produrre due o più tossine contemporaneamente. La produzione dell'enterotossina stafilococcica è influenzata anche dal pH. In differenti studi si è potuto osservare una produzione dell'enterotossina C da parte di ceppi patogeni di *S. aureus* isolati dall'ovino oltre che dalle carni e dalla mammella bovina. (Pisanu et al., 1987; Pisanu et al., 1988). Questo tipo di tossina è stata rinvenuta in forme di pecorino tipo Fiore Sardo che sono state causa di tossinfezione alimentare (Cosseddu A. M. et al., 1991). Le enterotossine SEA, SEB e SEC possono essere prodotte a valori di pH inferiori a 5, tuttavia l'optimum è compreso tra 6,8-7,2. Generalmente le temperature ottimali per la produzione delle enterotossine sono quelle ottimali per la crescita degli stafilococchi, tuttavia questa dipende anche dalla disponibilità dei nutrienti e dalle

condizioni ambientali; la crescita dei batteri non è necessariamente correlata con la produzione di enterotossine. Le tossine vengono prodotte nell'intervallo di temperature comprese tra 10-45 °C, tuttavia l'optimum è di 35-40 °C. La crescita di *S. aureus* e la produzione di tossina possono essere limitate da altri microrganismi per esempio, microrganismi saprofiti presenti negli alimenti crudi o fermentati. Comunque gli alimenti con una bassa aw come i prosciutti, gli insaccati e i prodotti di salumeria, le carni affumicate e i dolci con crema non supportano la crescita di questi batteri saprofiti e gli stafilococchi possono crescere senza ostacoli, se la temperatura di conservazione degli alimenti non lo impedisce.

Il cloruro di sodio è un elemento importante per la crescita e la produzione di enterotossina per il fatto che lo *S. aureus* può tollerare alte concentrazioni di questo sale. Generalmente la produzione di enterotossina è inibita da concentrazioni di sale superiori al 5% (Tranter e Brehm, 1990). *S. aureus* si sviluppa in substrati che presentano un'attività dell'acqua inferiore a 0,86 (equivalente a una soluzione 3,5 M di NaCl) (Scott, 1953). Per via della sua alta tolleranza osmotica, lo *S. aureus* risulta un problema molto importante negli alimenti a basso contenuto di umidità, dove esso può svilupparsi. Considerando la scarsa competizione da parte della flora microbica presente sull'alimento, può potenzialmente causare l'intossicazione alimentare. Poiché negli alimenti solitamente non si verifica l'abbassamento della aw, l'effetto della bassa aw sulla produzione dell'enterotossina da parte dello *S. aureus* è stato un soggetto di notevole interesse. Lo *S. aureus* può anche tollerare l'aggiunta di altre sostanze chimiche che hanno l'effetto di ridurre l'attività dell'acqua per cui gli altri microrganismi possono risultare inibiti.. La maggior parte delle tossine stafilococciche

ha mostrato resistenza alla proteolisi della tripsina, pepsina, chimotripsina e papaina. La resistenza di queste tossine verso gli enzimi proteolitici permette a queste di passare, senza perdita di attività, attraverso il tratto intestinale, nel quale stimolano l'emesi e la diarrea.

I primi sintomi della tossinfezione alimentare si manifestano dopo un periodo di incubazione che oscilla da 30' a 6 h, generalmente 2-3 ore dopo l'ingestione del cibo nel quale lo *S. aureus* si è sviluppato e ha prodotto l'enterotossina (Bergdoll, 1979; Minor e Marth, 1976). La sintomatologia è caratterizzata da salivazione, nausea, vomito, dolori e crampi addominali, diarrea, cefalea, dolori muscolari, sudorazione con brividi di freddo, prostrazione, polso debole e respirazione rallentata; in questi casi può essere necessario il ricovero in ospedale (Su et. al., 1997). La gravità della sintomatologia è in rapporto con la sensibilità individuale, con la concentrazione della tossina nell'alimento e con la quantità ingerita dello stesso. Un corto tempo di incubazione è indicativo di una severa intossicazione alimentare (Bergdoll, 1979).

La sintomatologia dura in genere uno due giorni e di regola si conclude con la guarigione, benchè sia necessario ripristinare la quantità dei fluidi corporei persi nella fase acuta per via del vomito e della diarrea profusa (Cibrowski e Jeljaszewicz, 1985). La morte è abbastanza rara e quando si verifica interessa soggetti debilitati, persone anziane o bambini. Non esistono trattamenti specifici; nei casi gravi si ricorre alla somministrazione di soluzioni saline per evitare il grave stato di disidratazione. Affinché si verifichi un fenomeno tossinfettivo da enterotossina stafilococcica è necessario che si abbiano particolari condizioni, quali:

- presenza di una fonte di contaminazione di S. aureus rappresentata prevalentemente dall'uomo o, in maniera meno importante, da animali;
- presenza di condizioni favorevoli per lo sviluppo del germe e per la produzione di tossina: substrato ricco di proteine, pH quasi neutro, scarsa flora contaminante. Glì alimenti più spesso coinvolti nei focolai di tossinfezione sono i cibi proteici cotti, i prodotti a ridotta aw, i formaggi;
- temperatura favorevole per lo sviluppo e la produzione di enterotossina;
- l'ingestione di una quantità sufficiente di enterotossina: oltre 100 ng per i soggetti sensibili.

Per la conferma di un episodio di tossinfezione sostenuto da enterotossina stafilococcica sono necessarie prove di laboratorio le quali devono evidenziare:

1) presenza di *S. aureus* in quantità superiore a 10^5/g di alimento, oppure di enterotossina preformata nell'alimento sospetto e nel vomito del soggetti colpiti;

2) isolamento dello stesso biotipo nelle feci e nel vomito del soggetto colpito e nell'alimento incriminato;

Toxic Shock Syndrome (TSS)

La sindrome da shock tossico (TSS) rappresentava una nuova malattia negli Stati Uniti d'America negli anni 80. Essa raggiunse l'attenzione dell'opinione pubblica per via della sorprendente relazione tra le giovani donne apparentemente sane che avevano contratto una forma acuta della malattia con caratteristiche sintomatiche differenti. Nel luglio del 1980 più di 120 casi per mese venivano riportati al *Center for Disease*

Control. La sintomatologia era caratterizzata da febbre alta, mal di testa, confusione e sviluppo di un rash eritematoso simile a quello provocato dalla febbre scarlatta; questi sintomi erano accompagnati da mal di gola, vomiti, diarrea e shock ipotensivo. Todd e collaboratori, nel 1978 descrissero la sintomatologia e identificarono *S. aureus* come l'agente eziologico della malattia. La maggior parte dei casi riportati nel 1980 coinvolgevano giovani donne e vi era una sorprendente associazione tra la malattia e il ciclo mestruale. L'utilizzo dei tamponi costituiva un significativo fattore di rischio (Anon, 1980). L'enfasi che si verificò in quel tempo nello scoprire questa correlazione tra la malattia, le mestruazioni e i tamponi, tendevano a oscurare la possibilità dell'esistenza di una TSS non mestruale. Così diversi casi, provocati anche questi da *S. aureus*, si verificarono sia tra individui di sesso maschile che femminile, associati con infezioni cutanee, aborti, infezioni post-chirurgiche causate da strumenti infetti. Correntemente la TSS non mestruale rappresenta il 40-50% dei casi descritti (Arbuthnott et al., 1990). La relazione tra il ceppo di *S. aureus* responsabile della malattia e la TSS, usualmente appartenente al gruppo fagico I o I+III è complessa. Esiste comunque un largo consenso, sul fatto che i molteplici effetti osservati nei pazienti con TSS sono indotti dalla toxic shock syndrome toxin-1, che fu per la prima volta prima descritta da Bergdoll e collaboratori (1981), quasi contemporaneamente a Schlievert e collaboratori (1981). Studi sierologici hanno rilevato una correlazione tra la comparsa di TSS e l'assenza di anticorpi specifici per la TSST-1: un numero superiore all'85% dei pazienti con TSS ha un titolo sierico anticorpale anti TSST- 1 inferiore che 1: 5 nella fase acuta.

La TSST- 1 è stata purificata e studiata in un certo numero di laboratori ed è stata clonata e sequenziata (Bloomster-Hautamaa et al., 1986).

La tossina ha un peso molecolare di 22 kDa Nel coniglio di oltre 8 mesi, ma non nei giovani conigli o negli animali da laboratorio, provoca effetti simili a quelli indotti dalla TSS nell'uomo. I conigli inizialmente sviluppano la febbre, congiuntiviti, difficoltà respiratoria, diarrea e letargia; in alcuni animali la malattia progredisce determinando un'estrema difficoltà respiratoria fino ad un fatale shock ipotensivo (de Azzavedo et al., 1984).

Cambiamenti patologici e cambiamenti chimici del sangue dei conigli affetti da tale malattia includono differenti caratteristiche rispetto alla TSS umana. Effetti patologici e clinici simili erano stati osservati quando ceppi di S. aureus produttori di TSST-1 si erano sviluppati in vivo in conigli infettati artificialmente (Arko et al; 1984 de Azzavedo et al, 1985).

Il ruolo chiave della TSST-1 nella patogenesi della TSS indotta sperimentalmente veniva stabilito da Rasheed et al. (1985) e de Azzavedo et al. (1985) i quali dimostrarono che ceppi non patogenici che hanno acquisito il gene della TSST-1 attraverso manipolazione genetica hanno anche acquisito la capacità di indurre alcuni sintomi della TSS nel coniglio. La molteplicità degli effetti che caratterizzano la TSS puntano verso un'azione indiretta della TSST-1 seguita dal rilascio di una sostanza mediatrice come l'interleuchina e TMF (Parsonett et al, 1985, Micusan et. al; 1986, de Azzavedo et al; 1988).

Occasionalmente alcuni ceppi isolati da casi clinici non hanno la capacità di produrre TSST-1; questo ha portato allo sviluppo della speculazione che altri fattori tossici oltre

che la TSST-1 (per es. l'enterotossina B) possono essere in grado di indurre cambiamenti fisiopatologici simili a quelli apportati dalla TSST-1.

Staphylococcus aureus come agente di tossinfezione alimentare nella filiera lattiero-casearia

Il primo caso documentato di intossicazione stafilococcica venne segnalato da Vaughan e Sternberg nel 1884, essi descrissero un episodio di malattia alimentare che coinvolse un gran numero di persone che avevano mangiato del formaggio (Dack, 1956). A quell'epoca, si riuscì soltanto ad appurare che il formaggio, esaminato al microscopio, conteneva una grande quantità di "*micrococchi*" e si dimostrò che un estratto dello stesso formaggio, somministrato a volontari, induceva gli stessi sintomi di malattia. Barber, nel 1914, segnalò un altro episodio di intossicazione da consumo di latte crudo munto da una vacca con mastite stafilococcica, ma fu soltanto nel 1930 che venne dimostrata sperimentalmente su volontari umani la correlazione esistente tra le tossine prodotte da *S. aureus* e la comparsa dei tipici sintomi di intossicazione. Da allora ad oggi, il ruolo di questo microrganismo come agente di tossinfezione alimentare è stato ampiamente documentato e l'intossicazione stafilococcica è una delle foodborne diseases oggi più frequenti nei paesi occidentali. Nell'uomo, la sintomatologia (nausea, vomito, crampi addominali, diarrea e, nei casi più marcati, cefalea e collasso) è relativamente lieve se confrontata col quadro sintomatologico dato da *Salmonella* spp., *E. coli* verocitossici e *Campylobacter* spp. e, di regola, il paziente guarisce in breve tempo senza particolari complicazioni. Tutto ciò fa sì che sovente gli episodi di intossicazione alimentare da stafilococchi non vengano registrati e giustifica il fatto che verosimilmente essi siano molto più numerosi di quanto non sia documentato. L'intossicazione alimentare nell'uomo è causata in particolare da

specifiche enterotossine (Arburthnott *et al*., 1990), proteine a basso peso molecolare (26 - 34 kDa) a catena lineare, con forte potere emetico, marcati effetti sul sistema immunitario ed effetto pirogeno (Fueyo *et al*., 2001). Sono molecole molto simili fra di loro come struttura ed attività biologica, ma si possono distinguere per la loro composizione antigenica. Su questa base si distinguono attualmente almeno 16 tipi di SE, dalla A alla E (SEA - SEE) , dalla G alla R (SEG – SER) e l'enterotossina U (SEU) (Su and Wong, 1995; Munson et al., 1998; Zhang et al., 1998; Fitzgerald et al., 2001; Orwin et al., 2001, 2002; Llewelyn and Cohen, 2002; Omoe et al., 2003; Letertre et al., 2003; Omoe et al., 2005; Fueyo et al., 2005; Thomas et al., 2006; Ono et al., 2008; Derzelle et al., 2009).

Inoltre si è appurato che della SEC esistono delle varianti antigeniche minori, denominate attualmente C1, C2 e C3 (Dinges *et al*., 2000). Si è ipotizzato che queste enterotossine siano sintetizzate da *S. aureus* in almeno due modi differenti. SEB e SEC vengono sintetizzate sotto controllo di un plasmide e di un cromosoma e vengono emesse soprattutto durante la fase di crescita stazionaria del batterio, come prodotti secondari del suo metabolismo. SEA e SEE, invece, sono sintetizzate sotto diretto controllo cromosomico e vengono prodotte durante la fase di incremento logaritmico del batterio (Bergdoll, 1979). Ciò spiegherebbe perché i casi di intossicazione stafiloccica provocati da SEA e SED siano in media più frequenti di quelli sostenuti da SEC e SEB. Inoltre, i biotipi umani di *S. aureus* sono in media più enterotossici di quelli presenti negli animali (Isigidi *et al*., 1992). In genere, un ceppo enterotossico di *S. aureus* produce un solo tipo antigenico di enterotossina, ma non è raro che alcuni ceppi possano sintetizzare contemporaneamente due o più tipi di enterotossina. Si

stima che almeno il 10% della popolazione umana risulti portatrice asintomatica di *S. aureus* nelle cavità rinofaringee e che circa l'1% di questi ceppi possa essere enterotossico, per cui i lavoratori e chi in ogni modo si trova a contatto con gli alimenti può costituire effettivamente una fonte di contaminazione in episodi di malattia alimentare. Simeão do Carmo e collaboratori (2002) descrivono un episodio di intossicazione stafilococcica verificatosi nello stato brasiliano di Minas Gerais, e sostenuto da latte crudo e formaggio tipico di quelle zone, verificatosi in febbraio e marzo 1999. In due episodi sono stati coinvolti nel complesso 378 persone: nel primo di essi, 50 persone si sono intossicate per consumo di un formaggio tipico, il Minas, manifestando vomito, diarrea, mal di testa, vertigini e brividi a distanza di appena 2 ore dall'ingestione. Nel secondo episodio sono state colpite 328 persone che lamentarono sintomi di diarrea e vomito dopo avere consumato del latte crudo. Le analisi hanno dimostrato che entrambi gli alimenti erano contaminati da *S. aureus*, ma nel formaggio si rinvennero $2{,}4x10^3$ ufc/g mentre nel latte si arrivava a oltre $2x10^8$ ufc/ml. Il ceppo isolato dal formaggio produceva tre differenti enterotossine (A, B, C) mentre il solo ceppo isolato nel latte era coagulasi-negativo e produceva enterotossine di tipo C e D. Il primo dei due episodi è stato attribuito alla contaminazione secondaria del formaggio da parte di un lavoratore, mentre per il latte si è chiamata in causa una mastite sub-clinica della vacca. Quest'ultimo caso indica, come è oramai noto, che anche i ceppi coagulasi-negativi sono in grado di produrre enterotossine e causare intossicazione alimentare nell'uomo, infatti come descritto da Vernozy-Rozand e coll. (1996), la produzione di enterotossine è stata dimostrata in ceppi di stafilococchi coagulasi negativi isolati da latte crudo di capra e da formaggi derivati. Questo studio

condotto su un totale di 187 ceppi, tutti coagulasi negativi e identificati come appartenenti alle specie *S. simulans*, *S. xylosus*, *S. capitis*, *S. equorum*, *S. lentus*, metteva in evidenza come 10 ceppi erano in grado di sintetizzare l'enterotossine E. Questi dati peraltro non sono i primi in assoluto; sin dal 1959 alcuni autori giapponesi avevano ipotizzato che anche alcuni ceppi di stafilococchi coagulasi-negativi potessero produrre enterotossine e la loro prima osservazione fu poi ripresa e confermata da almeno una decina di autori, tra i quali è opportuno citare almeno Valle e coll. (1990) che valutarono le caratteristiche di enterotossicità di 133 ceppi di stafilococchi isolati da cute, mucosa nasale e latte di capre sane, scoprendo che il 22% di questi risultava enterotossico (per lo più la tossina prodotta era la C). I francesi Vautor e coll. (2003) hanno condotto la genotipizzazione di 179 ceppi di *S. aureus* isolati da vari settori di 10 allevamenti di pecore da latte utilizzando la PFGE-PCR, comprendenti campioni di latte dopo mungitura, latte di massa, formaggi prodotti con lo stesso latte, mani e cavità nasali degli operatori, aria della sala mungitura e se presenti da ascessi cutanei delle pecore. I risultati ottenuti hanno evidenziato che in 9 dei 10 allevamenti i ceppi di *S. aureus* isolati presentavano lo stesso identico profilo genomico, o erano quanto meno correlati fra di loro. Con questa tecnica si è potuto, quindi, dimostrare una correlazione diretta tra processi infiammatori della mammella delle pecore, latte crudo e formaggi prodotti con quel latte, mentre rivestivano un ruolo secondario i ceppi isolati dalle narici degli operatori. Nella opinione della Commissione Europea (Health e Concumer Protection Directorate General) del 26-27 Marzo 2003, si evidenzia che il latte e i suoi derivati, costituiscono dal 1% al 9% (media 4,8%) delle intossicazioni da *S. aureus* in Europa.

Presenza di *Staphylococcus aureus* nella filiera lattiero casearia

Latte

Il lavoro condotto da un equipe partecipante al programma FAIR 95/0881, ha permesso di precisare la frequenza di differenti microrganismi responsabili delle mastiti cliniche e sub cliniche, nei piccoli ruminanti in Francia, Spagna e Sardegna. Questo studio ha permesso di mettere in evidenza come *S. aureus* rappresenti in Francia il 5,3% dei campioni positivi, in Spagna il 7,7% e in Sardegna lo 0,9% (D. Bergonier et al. 1998).

Nel latte i fattori che influenzano la crescita batterica e quindi la moltiplicazione di *S. aureus* in fase di raccolta e di stoccaggio sono la temperatura e il tempo di raffreddamento all'interno del tank (Bramley e McKinnon, 1990; Slaghuis, 1996).

Dos Santos et al. (1981) hanno valutato come il latte crudo destinato alla fabbricazione del formaggio Minas durante il trasporto non-refrigerato dalle aziende di produzione al caseificio presentava una carica batterica totale pari a $5x10^4$ ufc/ml. di cui il 45,2% erano rappresentato da *S. aureus*.

In un recente studio svizzero sul latte ovino di tank è stato osservato che *S. aureus* è presente nel 33% dei campioni di latte (Muehlherr et al., 2003) altri autori hanno rilevato che le concentrazioni medie di *S. aureus* nel latte di tank erano pari a $\log_{10}$ 2,64 ufc/ml, con livelli massimi di $3,60x10^3$ ufc/ml, (D.Scherrer et al. 2004). Fook Yee Chye et al. (2003), hanno evidenziato che in 360 allevamenti bovini, *S. aureus* era presente nel

60% dei campioni di latte esaminati con una concentrazione media di $12x10^3$ ufc/ml, altri autori come Holm et al. Nel 2004 ha messo in evidenza la presenza di *S. aureus* in concentrazioni medie pari a $5,7x10^3$ ufc/ml con range compreso tra $4,9x10^2$ e $1,7x10^5$.

La prevalenza di *S. aureus* nel latte di massa caprino era pari al 32% dei campioni analizzati (Muehlherr et al., 2003), mentre altri autori hanno rilevato che le concentrazioni medie di *S. aureus* nel latte di tank erano pari a 3,25 $\log_{10}$ ufc/ml, con livelli massimi di $2,20x10^4$ ufc/ml (D.Scherrer et al. 2004).

Caseificazione

Uno studio condotto da Jorgensen e collaboratori (2005) ha valutato la prevalenza di *S. aureus* lungo tutta la filiera di produzione di un formaggio a latte crudo bovino partendo dal latte di tank fino al formaggio a 10 settimane di stagionatura. Le concentrazioni erano pari a 355 ufc/mL nel latte di massa, 20 ufc/mL nello starter mesofili utilizzato nella caseificazione, 20 ufc/mL nello starter termofilo, 200 ufc/mL nel siero, $1,5x10^4$ ufc/mL nella cagliata, $6x10^3$ ufc/mL nel formaggio dopo 7 giorni di maturazione e assenza nel formaggio dopo 10 settimane di maturazione. Gli stessi risultati sono stati raggiunti in un altro lavoro prodotto in Sardegna sul formaggio a latte crudo a denominazione di origine protetta Fiore Sardo. I ricercatori hanno rilevato contaminazioni nel latte pari a 4,18±0,90 log ufc/ml, nel formaggio a 48h di maturazione 4,94±0,51 log ufc/g, nel formaggio a un mese di maturazione 3,21±1,22 log ufc/g, nel formaggio a tre mesi di maturazione 1,21±1,31 log ufc/g e nel formaggio

a sei e nove mesi di maturazione si è rilevata l'assenza di stafilococchi spp. (Cosentino et al. 2004).

Questo conferma come sia la fase iniziale della caseificazione (inizio caseificazione, formatura e acidificazione) il momento in cui si verifica un incremento della presenza di *S. aureus*. Infatti è al termine della fase di acidificazione che si raggiungono livelli medi più elevati, mentre nelle fasi successive le caratteristiche chimico-fisiche (pH, Aw) risultano più sfavorevoli e si assiste ad una riduzione della concentrazione del microrganismo. Infatti risualta essere la fase di acidificazione quella in cui eseguire i campionamenti nell'ambito dell'autocontrollo secondo quanto previsto dal Regolamento CEE n.2073/2005.

Formaggio

Il formaggio è un ecosistema molto complesso costituito da differenti fattori che influenzano in vario modo lo sviluppo di *S. aureus* e la conseguente produzione di enterotossine, tra questi fattori si ricordano la presenza di i fermenti lattici, l'utilizzo di starter nella tecnologia di produzione , le azioni meccaniche e fisiche, la precocità e l'intensità dell'acidificazione, le temperature di fabbricazione e di maturazione (Meyrand e Vernozy-Rozand, 1999).

De Luca e coll. (1997) hanno condotto un'indagine ad ampio raggio su vari prodotti lattiero-caseari per valutare la presenza di *S. aureus*. Gli autori hanno esaminato in complesso 135 campioni di differenti formaggi (34 di formaggi erborinati, 36 di

formaggi molli tipo cottage, 12 di formaggi a pasta filata freschi tipo mozzarella, e 53 di formaggi a pasta semidura del tipo Camembert). In totale i campioni positivi per *S. aureus* sono risultati essere il 16,3%; l'incidenza più elevata è stata riscontrata nei formaggi a pasta filata tipo mozzarella (25% dei campioni esaminati), seguiti dai formaggi semiduri (18,9% dei campioni) e poi da quelli erborinati (17,6% di positività), i formaggi molli sono risultati contaminati da *S. aureus* in percentuale pari al 8,3%. Nei 22 campioni positivi, la carica media del batterio è risultata pari a circa 2700 ufc/g.

Evoluzione dell'antibiotico resistenza in *Staphylococcus aureus*

Nel 1940, anno di introduzione della penicillina, tutti gli *S. aureus* isolati risultavano sensibili a questo antibiotico, ma in soli 5 anni il 50% degli isolati avevano acquisito la capacità di crescere in presenza di tale antibiotico grazie all'enzima β-lattamasi, codificato a livello plasmidico (Pitkala et al., 2007). Le β-lattamasi riescono ad essere espresse con una straordinaria flessibilità in relazione al bersaglio. E' sufficiente infatti una singola mutazione del gene che codifica per le β-lattamasi per mutare la specificità di substrato dell'enzima rendendolo atto a colpire il nuovo bersaglio, ovvero l'antibiotico di nuova generazione.

Nel 1959 la disponibilità di un nuovo farmaco, la meticillina aprì un nuovo capitolo nella terapia antibiotica, tutti i ceppi di *S. aureus*, inclusi i produttori di β-lattamasi risultavano sensibili a questa molecola. La resistenza alla meticillina venne segnalata per la prima volta nel 1961 da Jevons che rilevò tre ceppi di *S. aureus* meticillino-resistenti (MRSA) su uno screening di 5440 ceppi.

La meticillino-resistenza è associata alla produzione di una *Penicillin Binding Protein* (PBP) aggiuntiva (PBP2a) che può sostituire le altre PBP quando queste sono saturate dall' antibiotico.

Il determinante genetico *mec*, collocato su un trasposone, spesso non esprime il fenotipo a meno che la produzione di PBP2a non sia indotta dalla presenza di β-lattamici, di cloruro di sodio o in un ambiente mantenuto a temperatura di 30°C. In assenza di induzione, la resistenza può essere espressa o da tutte le cellule e in tal caso è detta costitutiva oppure da una parte della popolazione batterica e in tal caso è

denominata etero resistenza (Tomasz et al., 1994). La meticillino-resistenza, considerata originariamente come curiosità di laboratorio, ben presto assunse, con il passare del tempo, connotati drammatici a causa della diffusione e dei limiti che impone sulle opzioni terapeutiche per il trattamento delle infezioni da *S. aureus* meticillino- resistenti, (i ceppi meticillino-resistenti sono insensibili a tutti i β-lattamici). Attualmente in molti paesi, tra cui l'Italia, l'incidenza di ceppi MRSA supera il 40% (Gaynes et al., 1997).

Studi condotti da Ito e collaboratori hanno dimostrato che il gene che codifica per la resistenza alla meticillina è localizzato a livello della cassetta cromosomiale SCCmec (Noto et al., 2008). Quest'isola genomica è strutturalmente caratterizzata dalla presenza di tre tipi di *mec element*. Il tipo I, di 34 kb, isolato in un ceppo MRSA in Inghilterra, il tipo II, di 52 kb, isolato in Giappone ed il tipo III, di 66 kb, isolato nel 1985 in Nuova Zelanda (Duarte et al., 2002). Recentemente è stato individuato un quarto *mec element*, di dimensioni più piccole (20-24 kb), isolato in un'infezione nosocomiale di un reparto pediatrico (Oliveira et al., 2002).

Per ovviare ai fenomeni di antibiotico resistenza degli *S. aureus* MRSA si è ricorso negli ultimi tempi all'utilizzo di altri antibiotici glicopeptidici e in particolar modo vancomicina e teicoplanina. La vancomicina ha una lenta azione battericida dovuta a inibizione della sintesi della parete cellulare. L'azione è massima per i batteri in fase di crescita esponenziale. A tutt'oggi vancomicina e teicoplanina sono i farmaci di scelta per infezioni gravi provocate da germi gram positivi resistenti alle penicilline e alle cefalosporine e da *S. aureus* resistenti alla meticillina (Remington et al., 2000).

Meccanismo d'azione degli antibiotici

Gli agenti antimicrobici sono spesso classificati in base al loro principale meccanismo d'azione. Esistono cinque principali meccanismi d'azione:

1. interferenza nella sintesi della parete batterica (es. β-lattamici e glicopepetidi)
2. inibizione della sintesi delle proteine (es. macrolidi e tetracicline)
3. interferenza con la sintesi degli acidi nucleici (es. fluorochinoloni e rifampicina)
4. inibizione di una via metabolica (es. trimethoprim e sulfamidici)
5. distruzione della struttura della membrana batterica (polimixina)

I farmaci antibatterici che interferiscono nella sintesi della parete batterica includono i β-lattamici, ossia penicilline, cefalosporine, carbapenemi e monobattamici, e i glicopepetidi come la vancomicina e la teicoplanina (Neu HC., 1992; McManus MC., 1997). Il loro meccanismo d'azione si esplica con un'interferenza sull'enzima richiesto per la sintesi dello strato di peptidoglicano. Anche la vancomicina e la teicoplanina interferiscono con la sintesi della parete cellulare, ma agiscono attraverso un legame con i residui terminali di D-alanina della nascente catena di peptidoglicano, in modo tale da prevenire la formazione dei legami crociati necessari per la sintesi di una parete cellulare stabile (Tenover, 2006).

I macrolidi, gli aminoglicosidi, le tetracicline, il cloramfenicolo, streptogramine, e oxazolidinoni producono i loro effetti attraverso l'inibizione della sintesi delle proteine. I ribosomi batterici differiscono nella struttura rispetto a quelli delle cellule eucariotiche. Gli agenti antibatterici traggono vantaggio da queste differenze per inibire selettivamente la crescita batterica. I macrolidi, gli aminoglicosidi e le

tetracicline si legano alla sub-unità 30S del ribosoma, mentre il cloramfenicolo si lega alla sub-unità 50S (Tenover, 2006).

I fluorochinoloni esercitano la loro azione antimicrobica attraverso l'interferenza della sintesi del DNA e causando una rottura letale della doppia catena del DNA durante la fase di replicazione (Drlica K. et al.,1997) mentre i sulfonamidi e il trimetoprim (TMP) bloccano la via di sintesi dell'acido folico che, in ultima analisi, inibisce la sintesi del DNA (Yao J. et al., 2003; Petri WAJ. 2006).

La distruzione della struttura della membrana batterica può essere considerato un quinto meccanismo d'azione degli agenti antimicrobici, anche se ancora non ben conosciuto. In pratica le polimixine esercitano il loro effetto inibitorio incrementando la permeabilità della membrana batterica, e causando la fuoriuscita di componenti batteriche (Storm DR. et al., 1977). Il lipopeptide ciclico daptomicina inserisce apparentemente la sua coda lipidica nella membrana della cellula batterica, causando una depolarizzazione della membrana stessa ed eventualmente la morte del batterio (Carpenter et al., 2004).

Fattori di antibiotico-resistenza

I batteri possono manifestare la resistenza a farmaci antimicrobici attraverso una varietà di meccanismi. Alcune specie di batteri hanno una resistenza innata ad almeno una classe di agenti antibatterici; in questo caso, tutti i ceppi appartenenti a queste specie risultano ugualmente resistenti alle medesime classi di antibiotici. Di maggiore importanza è il caso dell' acquisizione di resistenza ex-novo attraverso una mutazione o attraverso l'acquisizione di geni di resistenza da altri microrganismi.

I geni di resistenza acquisiti potrebbero permettere al microrganismo di:

- produrre enzimi che distruggano il farmaco antibatterico;
- esprimere sistemi di efflusso che impediscano al farmaco di raggiungere il suo sito d'azione intracellulare;
- modificare il sito d'azione del farmaco;
- alterare la permeabilità della membrana batterica.

Il principale meccanismo di resistenza ai β-lattamici è quello della produzione di β-lattamasi, enzimi che inattivano l'antibiotico idrolizzando l'anello β-lattamico della molecola. Sono conosciute quattro classi di β-lattamasi che includono: la classe A delle penicillasi, la classe B delle metallo-β-lattamasi, la classe C delle cefalosporinasi e la classe D delle oxacillinasi.

Anche la resistenza batterica agli aminoglicosidi è principalmente basata su modificazioni chimiche che compromettono il legame con il loro sito target. È stata dimostrata l'esistenza di tre tipi di modificazioni catalizzate da altrettanti enzimi: O-

fofotransferasi (APH), O-adeniltransferasi (ANT) e N-acetiltransferasi (ACT) (Wright et al., 1998).

Il sistema delle pompe di efflusso permette ai batteri di far fuoriuscire l'agente antimicrobico dalla cellula batterica prima che riesca a raggiunger il suo sito d'azione e ad esercitare il suo effetto. Questo meccanismo di resistenza è più comunemente associato alle tetracicline (es: pompe TetA, TetB, TetK) e ai fluorochinoloni e viene utilizzato sia da batteri Gram-positivi che da Gram-negativi. I geni *tet* sono solitamente codificati da plasmidi o trasposoni, pertanto, la resistenza deriva dall'acquisizione di questi geni da fonti esterne al batterio (Trzcinski et al., 2000; Fluit et al., 2001; Ardic et al., 2005).

L'alterazione dei siti d'azione del farmaco impedisce l'interazione dell'antibiotico con il microrganismo e, prevenendo l'effetto batteriostatico/battericida, promuove la resistenza. Il più comune meccanismo di resistenza nei confronti dei macrolidi, per esempio, comporta la modificazione del loro sito d'azione sul ribosoma, attraverso la metilazione di un residuo di adenina nel dominio V della sub-unità 23S del rRNA (Schmitz et al., 2000).

La resistenza ai β-lattamici non mediata dalle β-lattamasi è dovuta alla presenza di un recettore specifico di memebrana. La resistenza alla meticillina in *Staphylocccus aureus* (MRSA) è generalmente dovuta ad una bassa affinità della "*penicillin-binding protein*" modificata (PBP2a), che virtualmente conferisce la resistenza a tutti i β-lattamici.

Il sito d'azione della vancomicina è costituito dai residui terminali di D-alanina della nascente catena di peptidoglicano, con conseguente interferenza nella formazione dei legami crociati del peptidoglicano. In questo caso la resistenza si esplica attraverso la

sintesi di un precursore anormale del peptidoglicano che presenta residui terminali alterati (es. D-ala-D-lac o D-ala-D-ser invece di D-ala-D-ala) con una bassa affinità per la vancomicina; questo tipo di resitenza è mediata dai prodotti del gene *van* (Cetinkaya et al., 2000).

Similmente, la resistenza ai fluorochinoloni è stata tradizionalmente attribuita a delle mutazioni che colpiscono il sito target di questi antibiotici.

I geni *tetL* e *tetM* determinano la resistenza alle tetracicline attraverso un poco conosciuto "meccanismo di protezione ribosomiale" che appunto determina un alterazione nel legame delle tetracicline con il recettore specifico sui ribosomi.

Affinché gli antibiotici esercitino la loro azione batteriostatica o battericida sui batteri, è necessario che raggiungano i loro target intracellulari. Per fare questo gli antibiotici devono, nei batteri Gram negativi, attraversare la pseudocapsula, che è una solida barriera alla permeabilità e, quindi, uno dei principali fattori di resistenza. Infatti, la presenza della pseudocapsula spiega, almeno in parte, la maggiore resistenza nei confronti di molti antimicrobici dei batteri Gram-negativi rispetto a quelli Gram-positivi.

L'innata resistenza di molti microrganismi Gram-negativi ai macrolidi può essere spiegata dalla limitata permeabilità della pseudocapsula a questa classe di antibiotici. Anche la resistenza acquisita ai β-lattamici di alcuni batteri Gram-negativi, è stata attribuita a modificazioni della pseudocapsula con conseguente riduzione della permeabilità.

L'importanza della pseudocapsula come fattore di antibiotico resistenza è evidenziata dall'osservazione che alterazioni di tale barriera, dovute ad agenti chimici, si traducono in una maggiore sensibilità del batterio agli antibiotici (Poole, 2002).

Fino a qualche tempo fa esistevano due teorie contrapposte che tentavano di spiegare l'origine dell'antibiotico-resistenza.

Una prima teoria è quella dell'induzione diretta dell'antibiotico sull'insorgere della resistenza del microrganismo, attraverso un adattamento di tipo fenotipico tramite attivazione di enzimi precedentemente soppressi (emersione).

La seconda è quella delle mutazioni spontanee da parte del microrganismo, determinate dalla pressione selettiva esercitata dall'antibiotico (selezione).

La velocità di moltiplicazione batterica, nonostante la frequenza delle mutazioni sia comunque relativamente bassa (una ogni 10^7-10^9 cellule batteriche), può spiegare la relativa facilità di comparsa dei microrganismi mutanti. La mutazione causa di resistenza può essere singola o può essere l'insieme di tante piccole mutazioni puntiformi. Ad esempio, nel caso in cui batteri quali *Escherichia coli* o *Staphylococcus aureus* vengano esposti alla rifampicina, può manifestarsi una mutazione dell'RNA polimerasi, che impedisce al farmaco di legarsi alla proteina.

Al fenomeno delle mutazioni si è poi aggiunto quello degli scambi genetici (genetic exchange) tra microrganismi. I geni (più frequentemente solo porzioni di DNA) vengono trasmessi da un batterio donatore ad uno ricevente, determinando in tal modo il fenomeno della ricombinazione genetica (incorporazione stabile di nuovi geni nel cromosoma della cellula ricevente). Tale fenomeno può avvenire attraverso meccanismi diversi: la trasformazione, la trasduzione e la coniugazione.

Con la “trasformazione”, la cellula batterica acquisisce nuovi caratteri ereditari dal DNA appartenente ad una cellula con diverso genotipo. Capita talvolta che la morte di una cellula batterica non porti alla distruzione del materiale genetico: in questo caso il DNA è rilasciato nell’ambiente circostante ed è in grado, tramite ricombinazione genetica, di guidare la sintesi di proteine specifiche nel caso in cui penetri e sia poi incorporato nel DNA di un altro batterio. In questo modo la cellula ricevente ottiene spesso nuovi caratteri fenotipici. La modificazione indotta è permanente, in altre parole è trasmessa alla discendenza. Tuttavia in natura il fenomeno della trasformazione è relativamente raro (una su 10^8 cellule batteriche). Fu Griffith che per primo, nel 1928, descrisse un caso di trasformazione nei pneumococchi. Questi ultimi risultano, infatti, resistenti alla penicillina proprio grazie al fenomeno della trasformazione (Spratt B.G., 1994).

La “trasduzione” consiste nella ricombinazione genetica dei batteri con trasferimento del carattere da un germe all’altro grazie ad un veicolo: il batteriofago (virus batterico in grado di infettare e lisare determinati batteri). Può infatti capitare che, durante l’infezione di un batterio da parte di un fago, il cromosoma della cellula ospite si frammenti in più parti, una delle quali può venire annessa al DNA fagico. In un secondo momento se il virione infetta un’altra cellula microbica può trasferire i geni precedentemente prelevati. Anche la frequenza della trasduzione è comunque relativamente bassa in natura (una su 10^6 cellule batteriche). La trasduzione è stata per la prima volta descritta da Zinder e Lederberg nel 1952 tra due ceppi di *Salmonella typhimurium*.

Il trasferimento di materiale cromosomico o extracromosomico può avvenire anche attraverso il contatto tra due microrganismi diversi per il meccanismo detto di "coniugazione" descritto per la prima volta nel 1946 da Lederberg e Tatum. Si tratta di un fenomeno, contrariamente ai precedenti, abbastanza frequente in natura, verificandosi una volta ogni 10^2 cellule batteriche. Tale processo avviene attraverso una struttura particolare del donatore (*sex pilus*) capace di mettere in comunicazione la cellula donatrice con quella ricevente. La cellula donatrice si differenzia dalla ricevente per la presenza di un plasmide (filamento circolare di DNA non cromosomiale) che porta l'informazione genetica necessaria per la sintesi del *sex pilus*.

È proprio la coniugazione a rappresentare il meccanismo con cui, più di frequente, oggi avvengono gli scambi genetici tra batteri che portano il gene per la resistenza nei confronti dei differenti antibiotici. Il fattore R genico possiede sia l'elemento R, gruppo di geni portatori dell'antibiotico-resistenza, sia l'elemento TF (*transfer factor*), gruppo di geni necessari per la coniugazione batterica (Datta, 1984), poiché in grado di codificare per la formazione del *sex pilus*. L'elemento R inoltre può esistere come tale, vale a dire senza l'elemento TF.

Scopo e piano della ricerca

Nella filiera del latte di pecora, ceppi di *Staphylococcus aureus* resistenti agli antibiotici, possono essere isolati dal latte crudo, dal secreto di animali con infezioni intramammarie (Goni P. et al 2004) e da prodotti caseari (Normanno G. et al 2007). Il presente lavoro si propone di valutare un protocollo per la caratterizzazione degli isolati di *S. aureus* e della loro resistenza agli antibiotici mediante tecniche fenotipiche e molecolari, isolati da campioni di cagliata di formaggi ovino a latte crudo dopo la fase di acidificazione. I campioni sono stati prelevati presso dieci minicaseifici aziendali con annessi allevamenti ovini presenti nel territorio della regione Sardegna durante le annate casearie 2007 e 2008. Sono stati analizzati 20 campioni (2 per ciascun caseificio) di 2 diversi lotti di produzione. Lo studio, svolto presso la Sezione di Ispezione degli Alimenti di Origine Animale della Facoltà di Medicina Veterinaria di Sassari, prevedeva preliminarmente la caratterizzazione fenotipica di *S. aureus* e successivamente la caratterizzazione genotipica attraverso la ricerca dei caratteristici fattori di virulenza ed i geni che codificano per le enterotossine (SEs), mediante metodiche di biologia molecolare. I campioni di cagliata sono stati sottoposti alla ricerca delle enterotossine stafilococciche (SEA-SED). È stata determinata la sensibilità in vitro nei confronti di alcuni antibiotici utilizzati in medicina umana e veterinaria attraverso la Minima Concentrazione Inibente (MIC) e la presenza dei rispettivi geni che codificano per tale resistenza (*ermA*, *blaZ*, *mecA*, *vanA* e *vanB*). Sui microrganismi

isolati è stato inoltre condotto uno studio di popolazione mediante l'ausilio dell'Elettroforesi in Campo Pulsato (PFGE).

Materiali e metodi

Prelievo dei campioni

Il prelievo dei campioni è stato eseguito presso dieci minicaseifici aziendali con annessi allevamenti ovini presenti nel territorio della regione Sardegna durante le annate casearie 2007-2008. Gli allevamenti erano così dislocati: quattro nella parte nord occidentale dell'isola, due nella provincia di Oristano, due nel Nuorese e uno nella provincia di Cagliari. È stata rilevata la tecnologia attraverso l'utilizzo di un apposita scheda,dove venivano riportate le fasi del processo e i dati dei parametri che sono stati monitorati (pH, temperature, utilizzo di starter, dimensioni del coagulo, tipo di salamoia). Le matrici alimentari su cui è stata eseguita la ricerca degli Stafilococchi Coagulasi Positivi (SCP) erano rappresentate da campioni di cagliata dopo la fase di acidificazione destinate alla produzione di formaggi al latte crudo. I campioni di cagliata, sono stati prelevati nel corso di due diversi campionamenti (due lotti) dopo aver monitorato per circa 6 ore il pH e la temperatura. I campioni di cagliata dopo il prelievo in azienda, venivano trasportati refrigerati presso i laboratori della sezione e qui immediatamente analizzati. Per la conta e l'isolamento di *S. aureus* la metodica utilizzata e la UNI EN ISO 6888-1 che utilizza il medium selettivo Baird Parker, la cui azione selettiva è dovuta alle sostanze in esso contenute , come il cloruro di litio ed il tellurito che inibiscono la crescita della flora microbica competitiva, laddove il piruvato e la glicina stimolano selettivamente la crescita degli stafilococchi. Il terreno prevede

inoltre l'aggiunta del Rabbit Plasma Fibrinogen (R.P.F.) che consente la rilevazione degli stafilococchi coagulasi positivi (S.C.P.) e quindi dello stesso *S. aureus* grazie alla presenza attorno alle colonie dei ceppi coagulasi positivi di precipitati sotto forma di un alone opaco di fibrina. Dopo aver spatolato il campione (o una sua diluizione decimale) uniformemente su tutta la superficie della piastra, questa viene posta ad incubare a +37 °C per 24 ore. Dopo l'incubazione, le colonie di *S. aureus* possono assumere colore grigio o nero (dovuto alla precipitazione del tellurito) circondate da un alone opaco di precipitazione della fibrina (coagulasi positivi).

Tecnologia di produzione di formaggi artigianali a latte crudo

Durante i campionamenti è stata rilevata la tecnologia di produzione di dieci formaggi artigianali a latte crudo, per similarità di tecnologia e strumentazione utilizzata descriveremmo la tecnologia dividendo i mini-caseifici in due gruppi omogenei.

Al primo gruppo appartengono sei mini-caseifici. Il latte della sera viene refrigerato e lavorato l'indomani mattina insieme al latte appena munto, il latte viene convogliato in caldaie in rame, in due caseifici(1 e 4) viene aggiunto uno starter rappresentato da un siero-innesto autoctono preparato in azienda, il latte viene portato ad una temperatura di coagulazione che varia dai 29°C fino ai 37°C, raggiunta la temperatura viene aggiunto il caglio, che in tre caseifici (1, 2 e 3) è rappresentato dal caglio di vitello in polvere, mentre gli altri tre (4, 5 e 6) utilizzano caglio di agnello liquido prodotto in azienda; il tempo di coagulazione (tempo di presa e indurimento) è compreso tra i 25 e

30 minuti, subito dopo inizia la rottura della cagliata, che avviene utilizzando uno spino in acciaio inox, fino ad ottenere dei coaguli della grandezza di un chicco di riso, successivamente in due caseifici (2 e 3) la cagliata viene riscaldata nuovamente per 10 minuti fino al raggiungimento della temperatura di 43-45°C, in tutti e sei i caseifici successivamente la cagliata ancora sotto siero viene abbassata con le mani verso il fondo della caldaia e si cerca di compattarla per poi essere tagliata in blocchi , successivamente la cagliata viene estratta con le mani e messa direttamente negli stampi, dopo di che le forme vengono più volte ribaltate e pressate manualmente in cinque caseifici, mentre in uno (2) le forme vengono pressate con un peso di 7 kg per 6-7 ore. La scottatura delle forme avviene in soli due caseifici (1 e 4) e consiste nel versare sulle forme della scotta molto calda (70-75°C), questa fase ha la funzione sia con in caldo di facilitare la sineresi, e anche quello di rendere la forma più liscia; in tre caseifici (1, 3 e 6) le forme passano alla fase di stufatura, vengono messe all'interno di un cassone all'interno del quale viene tenuta costante una temperatura di circa 40°C e dove rimangono per circa 3-4 ore. Dopo la fase di acidificazione e il raggiungimento di un pH ottimale di 5,3-5,5 le forme vengono messe in salamoia, rappresentata in tutti e sei i caseifici da una salamoia satura, le forme rimangono da 24 ore nei caseifici 1, 2 e 3, 48 ore nel caseificio 6 e 60 ore nei caseifici 4 e 5; dopo la salatura le forme vengono trasferite nella sala di affumicatura dove nei caseifici 4, 5 e 6 rimangono per 15 giorni, nel caseificio 1 per 7 giorni, mentre i caseifici 2 e 3 non fanno l'affumicatura; la successiva fase è rappresentata dalla stagionatura questa viene fatta generalmente in cantine dove non c'è il controllo delle temperature e dell'umidità, la stagionatura è

molto variabile nei diversi caseifici, varia dai 20 fino ai 50 giorni nei caseifici 2 e 3, circa due mesi nel caseificio 1 e superiore ai tre mesi nei caseifici 4, 5 e 6.

Al secondo gruppo appartengono invece gli altri quattro minicaseifici (7, 8, 9 e 10), il latte della sera viene raccolto nel tank a +4°C e lavorato insieme con quello della mattina appena munto, il latte viene convogliato in delle caldaie in acciaio, in un caseificio (7) viene aggiunto del latto-innesto prodotto nella stessa azienda, viene portato ad una temperatura di 35°C e viene aggiunto il caglio di agnello in pasta, il tempo di coagulazione è di 25-35 minuti, la rottura della cagliata avviene meccanicamente all'interno della caldaia con l'utilizzo della lira fino ad ottenere coaguli della grandezza di un chicco di riso, in un solo minicaseificio viene fatta la semicottura della cagliata portandola alla temperatura di 42°C, dopo di che la cagliata viene scaricata meccanicamente direttamente negli stampi e successivamente vengono più volte ribaltate, successivamente le forme vengono messe nei cassoni da stufatura, ad una temperatura di 38-40°C per tre ore circa. La fase successiva è la salatura, questa viene fatta con salamoia liquida per 12ore per kg, l'affumicatura viene fatta da tre caseifici (7, 9 e 10) per un tempo che va dai 10 fino ai 20 giorni; infine la stagionatura viene fatta per due mesi nel caseificio 7, mentre negli altri tre caseifici (8, 9 e 10) è superiore ai tre mesi, la stagionatura avviene in celle frigo a temperatura controllata di circa 10-15°C.

Identificazione di *Staphylococcus aureus*

Da ogni piastra di terreno selettivo Baird Parker + RPF con una conta delle colonie inferiore a 300 u.f.c sono stati isolati, dove presenti, almeno 5 colonie e riseminate in Brain Heart Infusion Agar (Oxoid) e identificate mediante:

- Procedure standard microbiologiche (caratteristiche di crescita delle colonie, forma, colore, catalasi, ossidasi e affinità alla colorazione di Gram).
- Caratterizzazione biochimico-enzimatica : attività emolitica in agar sangue di montone al 5%, la produzione della coagulasi libera (Coagulase plasma – EDTA bioMérieux, France,) e coagulasi legata o clumping factor (Staphylase test, bioMérieux, France), secondo le indicazioni della casa produttrice.
- Determinazione della termonucleasi.
- Prove biochimico-metaboliche del sistema miniaturizzato API ID 32 STAPH (bioMérieux, France) e successiva lettura e interpretazione automatica mediante MINI API (bioMérieux, France).
- Determinazione delle SEs (A-D) nei formaggi.
- I ceppi isolati venivano conservati in Brain Heart Infusion Broth (Oxoid) contenente il 15% di glicerolo a –80 °C.
- Valutazione dell'antibiotico resistenza mediante il metodo della Minima Concentrazione Inibente (MIC).
- Caratterizzazione genotipica.

Determinazione dell'attività emolitica

Venivano allestite delle subcolture su agar sangue (5% di sangue di montone) e poste ad incubare per 24-48 ore in termostato a +35 °C. L'emolisi veniva valutata sulle singole colonie a 24 ore e a 48 ore.

Determinazione della coagulasi libera

L'attività coagulasica veniva studiata utilizzando un kit (Coagulase plasm ethylenediaminetetracetic acid (EDTA, Difco) contenente plasma liofilizzato di coniglio. Il test veniva eseguito in provetta addizionando 0,1 mL di una brodo coltura dopo incubazione per una notte a +37 °C su BHI a 0,3 mL di plasma ricostituito con acqua distillata sterile. Dopo agitazione le provette venivano poste ad incubare in bagno termostatato a +37 °C ed esaminate dopo 30 min, 2, 4 e 24 ore. La coagulazione del plasma indicava la positività del test.

Determinazione del clumping factor (coagulasi legata)

Per questa determinazione venivano allestite delle subculture su piastre di Brain Heart Infusion Agar (BHIA, Oxoid, Basingstoke, UK), poste ad incubare per 24-48 ore a +37°C. Da ciascuna piastra venivano prelevate cinque colonie e spatolate su una goccia di reattivo (particelle di lattice blu sensibilizzate con fibrinogeno suino ed IgG di coniglio, anticorpi policlonali per il polisaccaride capsulare di S.aureus) posto su un apposito cartoncino (Staphylase test, bioMérieux, Lyon, France). L'agglutinazione delle particelle al lattice entro 20 secondi indicava la presenza della coagulasi legata.

Determinazione della termonucleasi

La produzione di una termonucleasi stabile al calore (TDNase) veniva determinata attraverso l'utilizzo di una metodica in piastra contenente blu di toluidina e DNA agar. Venivano prelevate una o più colonie da un isolamento primario mediante l'utilizzo di un'ansa sterile e si inoculavano in 2 ml di brodo sterile Brain Heart Infusion Broth (BHI, Oxoid, Basingstoke, UK) posto all'interno di tubi. Questi venivano incubati a +37 °C fino al raggiungimento di una certa torbidità. Successivamente parte della brodocoltura veniva lasciata a temperatura ambiente, mentre l'altra aliquota veniva posta a bagnomaria e lasciata per 15 min a temperatura di ebollizione. Su una piastra di Toloudine Blue Agar (Bio-rad, USA) venivano poi ricavate due file di pozzetti, una per saggiare la brodocoltura tal quale, per valutare la presenza di tossine termolabili e una per saggiare la brodo coltura dopo ebollizione, per valutare la presenza di tossine termostabili. In pratica, 20 µL di ciascun campione venivano inoculati nei pozzetti presenti nell'agar delle piastre insieme ad un controllo positivo fornito dal Kit (Biolife). La piastra veniva posta ad incubare a +37 °C per 4-6 ore. Venivano considerati positivi i campioni con un alone rosa che circondava ciascun pozzetto. Veniva inoltre valutata la dimensione dell'alone (diametro).

Determinazione delle SEs (A-D) nei formaggi

I campioni di formaggio che risultavano avere una conta di SCP >105 ufc/g venivano sottoposti alla ricerca delle enterotossine stafilococciche (SEA-SED) mediante l'utilizzo

del kit RPLA seguendo le indicazioni della casa produttrice (Oxoid, Basingstoke, UK). La sensibilità di determinazione di ciascuna tossina era di circa 0.5 ng/mL.

Valutazione dell'antibiotico resistenza mediante il metodo della Minima Concentrazione Inibente (MIC)

Per ogni microrganismo isolato è stata valutata la sensibilità nei confronti di ventidue antibiotici utilizzati sia in medicina umana che veterinaria, utilizzando il metodo della microdiluizione in brodo, attraverso la determinazione della MIC (minima concentrazione di antibiotico alla quale non si verifica una crescita visibile di microrganismi).

Gli antibiotici testati erano: ampicillina (AM); cefalotina (CF); cefoperazone (CFP); cloxacillina (OB); eritromicina (E); gentamicina (GN); kanamicina (K); novobiocina (NV); ofloxacina (OFX); oxacillina (OX); penicillina (P); rifampicina (RA); streptomicina (S); tetraciclina (TE); tobramicina (TM) e vancomicina (VA).

L'interpretazione dei dati ottenuti avveniva attraverso il confronto con i "breakpoints" raccomandati dal National Committe for Clinical Laboratory Standard (NCCLS, 2002).

Il breakpoint equivale alla "concentrazione limite" ossia al valore di MIC che permette di discriminare i ceppi sensibili dai ceppi resistenti. Per ogni antibiotico sono fissati due breakpoints: uno più basso che definisce la sensibilità (il ceppo è inibito a concentrazioni ≤ al breakpoint) e uno più alto che definisce la resistenza (il ceppo cresce a concentrazioni ≥ al breakpoint). Se la MIC è compresa tra i valori dei due breakpoints di sensibilità e di resistenza, il ceppo batterico viene definito "intermedio".

La MIC può essere espressa come MIC50 e MIC90. Questi valori indicano la concentrazione del farmaco in grado di inibire la crescita rispettivamente del 50% e del 90% dei ceppi batterici in esame (percentuali cumulative).

Medium utilizzato

Il medium utilizzato è il brodo Mueller-Hinton con una concentrazione corretta di cationi bivalenti (Ca2+ e Mg2+), indicato anche come CAMHB, Cation Adjusted Mueller Hinton Broth, (Oxoid, Basingstoke, UK). Il brodo viene preparato come indicato dalla casa produttrice e il pH deve essere compreso, a temperatura ambiente (+25 °C), tra 7,2 e 7,4. Successivamente il brodo viene autoclavato e portato a + 4 °C per una notte o tenuto in un bagno di ghiaccio se utilizzato lo stesso giorno. Ad un litro di brodo vengono infine addizionati 0,1 mL di una soluzione stock di Ca2+ e Mg2+ allo scopo di incrementare la concentrazione finale dei due ioni di 1 mg/L.

Predisposizione delle soluzioni dei principi attivi

La quantità dei principi attivi per la preparazione della soluzione madre è stata determinata adottando opportuni fattori di correzione in rapporto al grado di purezza dei chemioantibiotici. Ogni agente antimicrobico, sottoforma di polvere (Sigma-Aldrich-Fluka, MI, Italy), è stato pesato e diluito in un solvente appropriato (CLSI, 2006b; NCCLS, 2002a) così da ottenere 100 mL di una soluzione madre di antibiotico che avesse una concentrazione del principio attivo pari a 2,56 mg/mL (2560 μg/mL). Successivamente la soluzione madre di antibiotico veniva suddivisa in aliquote di 1,5 mL in provette sterili Eppendorf e conservata a – 80°C fino al suo utilizzo.

Da ogni soluzione madre, sono state preparate 12 diluizioni seriali in doppio utilizzando acqua deionizzata (solo per AMP e AMX il diluente era tampone fosfato, pH 6.0, 0,1 mol/L) in accordo con gli standard dei protocolli CLSI, la concentrazione finale dell'antibiotico in ciascun pozzetto era compresa fra 0,06 e 128 µg/mL.

Allestimento dell'inoculo di microrganismi

Ciascun ceppo batterico, conservato precedentemente a –80 °C, veniva riseminato due volte su Brain Heart Infusion Agar (BHIA, Oxoid, Basingstoke, UK) prima della preparazione dell'inoculo. Due o più colonie identiche venivano prelevate dalle piastre di BHIA, dopo essere state incubate per una notte a +30 °C, e sospese all'interno di provette di vetro in soluzione salina (0,85% w/v) in modo da raggiungere la densità di 0,5 gradi Mc Farland ($\simeq 10^8$ ufc/ml), misurata mediante l'utilizzo di un densimetro (fotometro portatile Densimat, bioMérieux, Lyon, France). Ogni sospensione è stata inoltre ulteriormente diluita 1:100 in in brodo sterile Cation Adjusted Mueller Hinton Broth (CAMHB; Oxoid, Basingstoke, UK) per raggiungere la concentrazione di inoculo adeguata ($\simeq 10^6$ ufc/ml). Cinquanta microlitri della sospensione finale sono stati inoculati nei pozzetti delle piastre microtiter, i quali, contenevano anche 50 µL di agente antimicrobico, così che la densità finale dell'inoculo all'interno di ciascun pozzetto raggiungesse $\simeq 5 \times 10^5$ ufc/ml. Come controllo di qualità sono stati usati i seguenti ceppi di referenza ATCC: Staphylococcus aureus ATCC 29213 e Enterococcus faecalis ATCC 29212.

Ciascuna piastra microtiter è stata poi posta in termostato all'interno di una camera umida ed incubata alla temperatura di 35±2 °C in ambiente aerobico per 16-20 ore. La

lettura delle micro piastre veniva eseguita mediante stereo microscopio (Olympus SZ61 ILST).

Per MIC si considerava la più bassa concentrazione di antibiotico in grado di inibire la crescita visibile del microrganismo. La sensibilità di ciascun ceppo batterico verso gli agenti antimicrobici è stata poi definita comparando le MICs con i "breakpoints" di riferimento (Thornsberry et al., 1997; CLSI, 2006a).

Caratterizzazione genotipica dei ceppi di S.aureus isolati

Questa fase della ricerca prevedeva, mediante l'allestimento di Multiplex PCR, la ricerca del gene gyr che codifica per la gyrasi, presente nel 99% degli *Staphylococcus aureus* (Stahilevitz J. et al. 2006), dei geni mecA, blaZ, ermA, vanA e vanB che codificano, rispettivamente, per la resistenza alla meticillina, β-lattamici, eritromicina e vancomicina e dei fattori di virulenza, nonché lo studio di popolazione, mediante Elettroforesi in Campo Pulsato (PFGE).

Ricerca dei fattori di virulenza

Sono stati ricercati 22 geni che codificano per altrettanti fattori di patogenicità. L'indagine è stata realizzata con la tecnica della Multiplex-PCR. I fattori di patogenicità studiati sono i seguenti:

- enterotossine (sea, seb, sec, sed ,see, seh, sek, sel, sem, seo, sep)
- tossina Shock Tossico (tst)
- esfoliatine (eta, etb, etd)
- leucocidina di Panton-Valentine (lukS-PV-lukF-PV)

- leucocidine LukE-LukD (lukD-lukE) e LukM (lukM)
- emolisine γ (hlg), γ variante (hlgv) e ß (hlb)
- fattore EDIN “epidermal cell differentiation inhibitor” (edinABC)
- alleli del sistema agr (agr1-4)
- resistenza alla meticillina (mecA)
- resistenza ai β-lattamici (blaZ)
- resistenza all’eritromicina (ermA)
- resistenza alla vancomicina (vanA e vanB)

Il gene gyrA che codifica per la girasi ed è presente nel 99% dei ceppi di S. aureus (Rainard P. et al., 2003) è stato amplificato per confermare l’identificazione di specie, controllare la qualità del DNA e verificare l’assenza di fattori che inibiscano la PCR.

Le sequenze degli oligonucleotide primers utilizzati per l’amplificazione dei geni di S. aureus gyr (gyrase) e agr (accessory gene regulator, I–IV) sono le seguenti: gyr AGTACATCGTCGTATACTATATGG (forward), ATCACGTAACAGTTCAAGTGTG (reverse); agrI GTCACAAGTACTATAAGCTGCGAT ; agrII TATTACTAATTGAAAAGTGGCCATAG; agrIII GTAATGTAATAGCTTGTATAATAATACCCA ; agrIV CGATAATGCCGTAATACCCG. I primers utilizzati per l’amplificazione dei geni che codificano per la resistenza all’eritromicina (ermA), meticillina (mecA), vancomicina (vanA e vanB) e per la produzione di β-lattamasi (blaZ) sono riportati in tabella 01. Le sequenze degli oligonucleotide primers utilizzati per l’amplificazione dei geni SEs (sea, seb, sec, sed, see, seh, sek, sel, sem, seo, sep) sono mostrate in tabella 02. I primers utilizzati per l’amplificazione dei geni tst (TSST-1), hlg e hlgv (haemolysin γ), hlb (haemolysin ß), lukE/D (leukocidins LukE/D),

lukF-PV e lukS-PV (PVL), lukM (leukocidin LukM), eta, etb ed etd (exfoliative toxin genes), EDIN (epidermal cell differentiation inhibitor gene), sono mostrati in tabella 03.

Estrazione del DNA totale

Lisi delle cellule

I ceppi dai quali si voleva estrarre il DNA venivano seminati su BHIA (oxoid, USA) e posti ad incubare a 37°C per 24 h. Osservato tale tempo di incubazione, si verificava la purezza dei ceppi e, prelevando alcune colonie con un'ansa sterile monouso, si allestivano delle brodocolture con Brain Heart infusion (BHI) (Oxoid, USA) poste ad incubare overnight a 37°C. Dopo l'incubazione, si procedeva all'estrazione del DNA con la tecnica standard che utilizza lisostafina, proteinasi K, fenolo e cloroformio (De Buyser M.L., et al., 1987) le brodocolture venivano miscelate al vortex, trasferite sterilmente in provette coniche da centrifuga e centrifugate per 10 minuti a 3000 rpm/min. Eliminato il surnatante, al pellet venivano aggiunti 500 µl di tampone Tris EDTA e, usando una pipettatrice con puntale munito di filtro, il campione veniva risospeso e poi trasferito in una provetta Eppendorf da 1.5 mL. Quindi a ciascuna provetta si aggiungevano 10µL di lisostafina (Sigma Aldrich, USA) alla concentrazione di 1.5 mg/mL e si agitava al vortex. Le provette venivano poste ad incubare in un termo mixer (Eppendorf, USA) a 37°C sino a quando il loro contenuto assumeva un aspetto più chiaro e denso e, all'apertura della provetta, si osservava la formazione di piccoli filamenti. Subito dopo, si aggiungevano a ciascun campione 5 µl di proteinasi K (Invitrogen, USA) alla concentrazione di 20 mg/mL. Dopo agitazione al vortex, le

provette venivano incubate per 60 minuti in un termo mixer (Eppendorf, USA) a 50°C e successivamente poste a –20°C (quando non era possibile procedere direttamente all'estrazione).

Estrazione del DNA

500 µl di una miscela fenolo/cloroformio/alcool iso-amilico (50:48:2) venivano aggiunti a ciascun campione; questo veniva poi agitato per inversione sino ad ottenere una miscela lattiginosa. Successivamente si centrifugava per 15 min a 10000 rpm/min. Al termine della centrifugazione il campione appariva suddiviso in tre fasi:

- una fase superiore contenente il DNA
- una fase intermedia contenente le proteine
- una fase inferiore contenente la miscela fenolo-cloroformio

Utilizzando una pipettatrice munita di puntale con filtro veniva gradualmente prelevata la sola fase superiore sino a recuperare la quantità massima possibile di DNA. Successivamente venivano aggiunti al campione 500µl di una miscela cloroformio/alcool iso-amilico (24:1). Dopo aver centrifugato per 15 minuti a 10000 rpm/min, si prelevava gradualmente la sola fase superiore cercando di recuperare la massima quantità possibile di DNA.

Si procedeva infine ad una centrifugazione rapida dei campioni (5 min) a 10000 rpm/min. Si prelevava il surnatante e con l'impiego di alcool assoluto refrigerato si determinava la precipitazione del DNA purificato; agitando delicatamente la provetta per inversione si formava un piccolo precipitato di DNA. Per completare l'estrazione le provette veniva poste a –20° C per 15 min.

Diluizioni del DNA per la PCR

I campioni venivano centrifugati a 7000 rpm/min per 5 minuti. Dopo centrifugazione il surnatante veniva eliminato avendo cura che il DNA rimanesse bene adeso alla parete della provetta lasciata poi asciugare a temperatura ambiente (rovesciata e appoggiata su carta assorbente) per circa 30 minuti. Successivamente, dopo aver aggiunto 100µl di H2O distillata sterile, ciascun campione di DNA veniva posto in un termomixer a 50° per 30 minuti.

Per effettuare le PCR i campioni dovevano essere diluiti 1/100; dapprima si predisponeva una diluizione 1/10 utilizzando 90µl di H_2O distillata sterile + 10µl di DNA puro e da questa si otteneva una diluizione 1/100 con 180 µl H_2O distillata sterile + 20 µl del DNA diluito 1/10.

Amplificazione del DNA mediante PCR Multiplex

Le Multiplex-PCR sono state eseguite secondo il protocollo messo a punto presso il Centre national de Référence des Staphylocoques (Vandenesch et al., 2003).

Le multiplex PCR erano condotte utilizzando il Thermal Cycler GeneAmp PCR System 9700 Applied Biositem; i reagenti venivano miscelati per formare le otto differenti mix secondo le modalità di seguito illustrate:

DNA diluito 1/100 5 µl, Tampone Taq senza MgCl2 (Eurobio) 10X 5 µl, MgCl2 (Eurobio) 50 mM 5 µl, dNTP (A, T, G, C) (Invitrogen) 1,25 mM 5 µl, primers forward e reverse (Invitrogen) 5 pm/µl 1,5 µl, Taq polymerase (Eurobio) 5 U/µl, 0,4 µl. Per la PCR n. 8 variava il quantitativo di Taq polimerasi da 0,4 a 0,3 µl ed il volume finale da 50 a 40 µl.

La reazione di amplificazione è stata eseguita rispettando i seguenti parametri di tempo-temperatura:

denaturation iniziale 94°C per 5 minuti, denaturation 94°C per 30 secondi, annealing 55°C per 30 secondi, extension 72°C per 30 secondi, extension finale 72°C per 7 minuti per un totale di 25 cicli.

Elettroforesi dei prodotti di PCR

Gli amplificati ottenuti con la PCR sono stati sottoposti ad elettroforesi su gel di agarosio (Invitrogen) all'1,5%. Com'è noto l'elettroforesi permette di separare molecole di DNA a differente peso molecolare sulla base della loro mobilità in campo elettrico. Il gel di agarosio veniva preparato sciogliendo l'agarosio in polvere nel tampone Tris Acetato EDTA (TAE) 1X. Quando la temperatura del gel raggiungeva i 55°C si aggiungevano 1 o 2 gocce (a seconda delle dimensioni del gel) di etidio bromuro e dopo miscelazione con piccoli movimenti rotatori il gel veniva deposto nell'apposito portagel.

Una volta completamente solidificato il gel veniva posto in una camera elettroforetica immerso nel tampone di corsa TAE 1X.

Si procedeva quindi a dispensare 5 µl di amplificato nei pozzetti collocando il marker 100 bp Ladder (Invitrogen) in uno o più pozzetti del gel. La corsa elettroforetica veniva eseguita a 90–100 Volt per almeno 45 minuti. Alla fine della corsa il gel veniva posto in un trans illuminatore ad ultravioletti (Gel DOC XR – BioRad) e tramite l'utilizzo del corrispondente programma Quantity One (BioRad) il risultato veniva visualizzato su

monitor e dopo acquisizione delle immagini del prodotto dell'elettroforesi queste venivano salvate e classificate in base al codice dei ceppi e al numero di PCR.

Studio di popolazione

I 100 ceppi rappresentativi dei differenti profili di patogenicità sono stati successivamente sottoposti ad Elettroforesi in Campo Pulsato (PFGE). Su sei ceppi non è stato possibile effettuare la lisi mediante la metodica utilizzata e di seguito descritta, per questa ragione non si ha il corrispondente profilo.

Elettroforesi in Campo Pulsato (PFGE)

Il principio della PFGE è di tagliare il DNA in frammenti, utilizzando un enzima di restrizione. L'applicazione di campi elettrici pulsati consente una migliore separazione dei frammenti in funzione del loro peso molecolare. Nel presente studio il DNA totale è stato digerito con l'enzima *SmaI* (Invitrogen). Per la migrazione dei frammenti di DNA su gel di agarosio allo 0,8%, è stato impiegato lo CHEF MAPPER DRIVE II (Biorad, USA). Utilizzando il software Gel Compar II (Applid Math), i pulsotipi ottenuti sono stati elaborati in un dendrogramma che metteva in evidenza la correlazione tra i diversi profili mediante il modello matematico l'Unweighted Pair Grouping by Mathematical Averaging (UPGMA) utilizzando il coefficiente di Pearson.

I campioni selezionati e il ceppo di referenza NCTC 8325, venivano seminati su piastre di BHIA (Oxoid) e incubati a +37 °C per 24 ore.

A partire dalle piastre seminate su BHIA (Oxoid), venivano allestite delle brodocolture ad elevata densità in brodo BHI (Oxoid) e poste in bagno termostatato a +37 °C in agitazione per almeno 2 ore.

Dopo incubazione le brodocolture venivano poste sotto ghiaccio per almeno 20 min per bloccare la crescita batterica. Le brodocolture venivano trasferite in provette coniche da centrifuga contenenti 100 µL di EDTA e centrifugate a 3000 rpm per 10 min. Dopo l'eliminazione del surnatante, il pellet veniva risospeso in 5 mL di tampone TNE e centrifugato a 3000 rpm per 10 min.

Eliminato il surnatante, il pellet veniva disciolto con le poche gocce di tampone TNEE rimaste nella provetta e, utilizzando il tampone EC, si eseguiva su un volume finale di 1 mL la lettura allo spettrofotometro ad una lunghezza d'onda di 560 nm sino ad ottenere una densità ottica (D.O.) di 2,0 - 2,1. Ottenuta la densità ottica desiderata, 115 µL di ciascun campione venivano prelevati dalla provetta, trasferiti in una seconda, e posti a bagnomaria a +55 °C.

Ai 115 µL di campione, venivano aggiunti 115 µL di low melt agarose (Bio-rad) e 10 µL di lisostafina (Sigma-Aldrich) alla concentrazione di 1,5 mg/mL.

I campioni venivano poi trasferiti nei plugs mods (Bio-rad,USA) e posti in frigo per 20 min per favorire la formazione di piccoli blocchi di agarosio, ciascuno contenente un campione. Ciascun blocco di agarosio veniva sezionato in due parti trasferite in una provetta Eppendorf contenete 1 mL di tampone EC e posta a incubare in termomixer (Eppendorf) a +37 °C per un ora.

Successivamente le 2 parti del blocco venivano trasferite in una provetta con 1 mL di tampone TE, 5 µL di proteinasi K (Invitrogen) alla concentrazione di 20 mg/mL e collocata in termomixer a +50 °C per 1 ora.

Ogni blocco, veniva poi trasferito in una provetta contenete 5 mL di tampone TE e lasciata per almeno una notte a 4°C. Infine si preparava la MasterMix contenente per campione 268 µL di acqua MilliQ sterile, 30 µL di tampone di attivazione dell'enzima *Re Act4* 10X (Invitrogen), 2 µL di enzima di restrizione *Sma*I 10U/µL (Invitrogen). Le provette contenti la miscela di reazione e il gel venivano infine poste in termomixer e incubate a +25 °C per 90 min. Dopo la preparazione del gel di agarosio (Bio-rad) allo 0,8% questo veniva uniformemente distribuito nell'apposito supporto per l' elettroforesi e lasciato solidificare per circa 30 min. Il gel veniva in seguito posto all'interno della camera elettroforetica in TBE 0.5X alla temperatura di +14 °C. L'apparecchio utilizzato per il presente studio è lo CHEF MAPPER DRIVE II (Bio-rad,USA). I diversi parametri per la corsa elettroforettica sono stati impostati come segue:

Block 1: 11 ore					
		angle	initial swicth time	final swicth time	ramping factor
State 1	6,0 volt/cm	+60.0°	5"	15"	linear
State 2	6,0 volt/cm	-60.0°	5"	15"	linear
Block 2: 11 ore					
		angle	initial swicth time	final swicth time	ramping factor
State 1	4,5 volt/cm	+60.0°	15"	45 "	linear
State 2	4,5 volt/cm	-60.0°	15"	45"	linear

In seguito alla corsa, il gel veniva colorato in una soluzione di bromuro di etidio (10 µg/mL) per 30 min, decolorato per 15 min e l'immagine veniva acquisita mediante il

trans illuminatore UV Gel Doc XR. I profili ottenuti, sono stati analizzati mediante software Bionumerics (Applied Math, Kortrijk, Belgium), utilizzando il UPGMA model ed il coefficiente di correlazione di Pearson (0.5% optimization setting). Ciò ha permesso di ottenere ed elaborare un dendrogramma riportante le percentuali di similitudine tra ceppi testati.

Risultati

Analisi microbiologiche, isolamento e identificazione

Tutti i campioni di cagliata sono risultati contaminati da SCP a concentrazioni di (media±DS) 4,8±1,0 log_{10} ufc/mL (range 2,3-6,4 log_{10} ufc/mL). In nessuno dei campioni di formaggio, con contenuto di SCP ≥ 10^5 ufc/mL (n=12) sono state rilevate le SEs (SEA-SED). I 100 SCP isolati sono stati identificati come *S. aureus* sulla base della presenza del gene *gyr* e del profilo biochimico-metabolico rilevato mediante sistema API ID 32STAPH (BioMérieux, Lyon, France). Tutti i ceppi isolati sono risultati produttori di TDNasi, coagulasi libera e legata. La determinazione del pattern di emolisi di *S. aureus* è risultata la seguente: β-emolisi (n. 23 ceppi), α-emolisi (n. 29 ceppi), α/β-emolisi (n. 19 ceppi) e mancanza di emolisi (n. 29 ceppi).

Antibiotico resistenza

In tabella 04a e 4b sono riportati i risultati relativi alla sensibilità nei confronti degli antibiotici testati, la MIC_{90}, la moda e il range delle MIC rilevate. Si è osservata completa sensibilità nei confronti degli antibiotici CF, CFP, E, GM, K, NV, OX, RA, S, TO e VA. Un totale di 26 ceppi sono risultati resistenti ad almeno uno degli antibiotici testati. Specificamente, gli isolati hanno mostrato resistenza nei confronti dell'AM (n. 20 ceppi; caseifici B, H, I ed L), P (n. 19 ceppi; ceseifici B, H, I ed L) e TE (n. 6 ceppi;

caseificio C). Un unico ceppo isolato da un campione proveniente dal caseificio L è risultato intermedio all'OFX e contemporaneamente resistente ad OB, AM e P. Nelle tabelle 8 e 5 sono riportati rispettivamente i risultati relativi ai clusters di appartenenza (1-35), alla rilevazione dei geni *agr* e alla resistenza agli antibiotici. La resistenza nei confronti dell'AM e P è risultata significativamente associata alla presenza del gene *blaZ* (P<0.001) e, i ceppi resistenti a questi antibiotici, appartenevano prevalentemente al gruppo *agrIII* (n. 10 isolati da campioni provenienti dai caseifici B, D ed H). La sensibilità nei confronti di altri antibiotici □-lattamici resistenti alle β-lattamasi, quali cefalosporine (CF e CFP) e penicilline semisintetiche (OX), è risultata pari al 100%, con la sola eccezione per la OB, alla quale un solo ceppo è risultato resistente. Nessun ceppo testato possedeva il gene *mecA* e nessun ceppo ha evidenziato resistenza nei confronti della E e VA, né è stata rilevata la presenza dei corrispettivi geni *ermA* e *vanA-B*.

Geni che codificano per le SEs e TSST-1

I risultati dell'analisi multiplex PCR relativa alla presenza dei geni codificanti le SEs, sono mostrati in tabella 06. Uno o più geni *se* e *tst* erano portati da 39 ceppi di *S. aureus* isolati dai campioni provenienti dai caseifici A, B, D, G ed H. Il gene *sea* rilevato in 10 ceppi di *S. aureus* isolati dai caseifici B (n=1) ed H (n=9), era associato contemporaneamente ai geni *sem* e *seo* in 7 ceppi, al gene *tst* in 6 ceppi e in un solo ceppo al gene *sel*. Il gene *sec* è stato rilevato in 23 ceppi isolati da campioni provenienti dai caseifici A, B e D. Negli stessi ceppi in cui è stato rilevato il gene *sec*, sono stati

contemporaneamente rilevati i geni *sel* e *tst*. In nessun ceppo sono stati rilevati i geni *seb*, *sed*, *see*, *sek* e *sep*.

Altri fattori di patogenicità

Tutti i ceppi isolati presentavano almeno uno dei geni codificanti per i fattori di patogenicità ricercati (tabella 7). La presenza dei geni *lukD/E* è stata rilevata in 74 ceppi (tabella 7). Il gene *lukM* è stato rilevato in 38 ceppi e, in 32 di questi, era associato ai geni *lukD/E.* I geni *edinA/B/C* sono stati rilevati in 31 ceppi. I geni *hlb*, *hlg* e *hlgv* sono stati rilevati rispettivamente in 52, 17e 75 ceppi. I geni *pvl*, *eta*, *etb* ed *etd*, non sono stati rilevati.

Culster genici e profili di patogenicità

In totale sono stati individuati n. 35 clusters mediante la PFGE (figura 2) e n. 36 differenti profili di patogenicità mediante la PCR (tabella 8). Sei ceppi isolati da campioni provenienti dal caseificio C non sono risultati tipizzabili mediante PFGE. Tali ceppi sono risultati resistenti alla TE, portavano il gene *hlb* e risultavano □-emolitici su agar sangue. In 58 ceppi isolati si ha omogeneità tra clusters e profili di patogenicità all'interno del medesimo caseificio e del medesimo lotto di produzione. Il caseificio ha un effetto significativo sia sui profili di patogenicità rilevati ($P<0.005$) che sui clusters ($P<0.005$). Il numero di questi ultimi, in ciascun caseificio, variava da 2 a 6, mentre i

profili di patogenicità rilevati, variavano da 1 (caseificio E) a 7. Nelle coppie di ceseifici I-L, F-H ed A-E, gli isolati presentavano rispettivamente i seguenti clusters genici omologhi: C3-C16, C12 e C26. Nei ceseifici F-L, A-D e C-E-I-L, sono stati rilevati, rispettivamente, i seguenti profili di patogenicità: P16-P18, P21 e P9. I patterns genici dei profili omologhi rilevati all'interno di due o più caseifici sono risultati i seguenti: *agrII*, *lukD/E* ed *hlgv* (P9); *agrIII*, *lukD/E*, *lukM*, *edinA/B/C, hlb* e *hlgv* (P16); *agrIII*, *lukD/E* e *lukM* (P18); *agrIII*, *sec*, *sel*, *tst*, *lukD/E*, *lukM, edinA/B/C, hlb* e *hlgv* (P21).

Discussione

Tutti i campioni di cagliata sono risultati contaminati da SCP a concentrazioni di (media±DS) 4,8±1,0 $\log_{10}$ ufc/mL (range 2,3-6,4 $\log_{10}$ ufc/mL) (O'Brien et al.,2009) e in 12/20 campioni, nei quali la concentrazione di *S. aureus* era $\geq 10^5$ ufc/g, la ricerca delle SEs (SEA-SED) non ha dato esito positivo. Non sono state rilevate differenze significative relative alla conta degli SCP nelle due differenti tipologie di produzione. Un elevato numero di ceppi di *S. aureus* produttori di α o α/β-emolisine su agar sangue (48 ceppi) o portanti il gene *hlb* (n=52) evidenziano l'origine ovina degli isolati (Hajek, 1978; Dinges, 2000). Una fonte di contaminazione da *S. aureus*, deriva dalle infezioni intramammarie, dove questo microrganismo risulta responsabile delle forme di mastite clinica e subclinica e viene isolato, in quest'ultima patologia, in percentuali comprese tra il 5,0% e il 27,6% dei patogeni presenti nel latte (Contreras et al., 2007). Come osservato in precedenti lavori effettuati su ceppi di *S. aureus* di origine ovina, l'allele *agrIII* (n=39) è quello rilevato con maggiore frequenza (De Santis et al., 2005; Vautor et al., 2007). Negli ultimi anni, la diffusione dell'antibiotico resistenza tra i batteri, inclusi gli stafilococchi, risulta in crescita e può rappresentare un rischio per la salute degli animali e dell'uomo. Il largo utilizzo di antibiotici in medicina veterinaria può determinare la resistenza dei microrganismi nei confronti degli antibiotici utilizzati in terapia umana (Schwarz & Chaslus-Dancla, 2001). Ceppi di *S. aureus* resistenti agli antibiotici AM, P, TE e OB, più frequentemente utilizzati negli allevamenti di ovini da latte (Yamaki et al., 2004), appartenevano ai gruppi *agrIII* (n=11), *agrII* (n=10) e *agrI*

(n=5), sono stati rilevati tra gli isolati dai caseifici B, C, H, I ed L. La corrispondenza tra il profilo di antibiotico resistenza e la presenza dei corrispondenti geni è risultata pari al 100% per gli antibiotici E, CF, CFP, OX, e VA, e al 97% per AM e P. Due ceppi *blaZ*+ sono risultati sensibili ad AM e P, mentre un ceppo *blaZ*- era resistente contemporaneamente ad AM, P e OB. Nella presente ricerca, come rilevato in precedenti studi condotti su ceppi isolati da pecore con mastite subclinica (De Santis et al., 2005), non sono stati rilevati Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), patogeni umani in forte crescita e responsabili di infezioni ospedaliere, resistenti alla maggior parte degli agenti antimicrobici più comunemente utilizzati come β-lattamici, aminoglicosidi, macrolidi e fluorochinoloni (Barrett, 2005). La presenza di un ceppo *mecA*- e *blaZ*- resistente alla OB, penicillina semisintetica resistente alle penicillinasi, potrebbe essere dovuta alla presenza di un'alterazione della Penicillin Binding Protein (PBP), non correlata alla PBP2a or 2' (Georgopapadakou, 1993). Sette ceppi provenienti dal caseificio H, oltre a possedere il gene *blaZ* e la relativa resistenza agli antibiotici AM e P, risultavano possedere i geni *sea*, *sem*, *seo* e *hlg*, profilo genico riconducibile a ceppi di *S. aureus* isolati dall'uomo. Il cluster genico *egc*, locus codificante per le enterotossine SEG, SEI, SEM, SEN e SEO, è stato evidenziato prevalentemente in ceppi di *S. aureus* isolati da pazienti umani (Jarraud et al., 2001; Mempel et al., 2003). In accordo con precedenti studi, la presenza del gene *sea* tra i ceppi di *S. aureus* isolati dal formaggio prodotto da latte ovino è rara ed è solitamente associata a tossinfezioni alimentari umane (Chen et al., 2004). La presenza del gene *sea* è stata rilevata in 10 ceppi di *S. aureus*, 9 dei quali non possedevano il gene che codifica per la □-emolisina, tossina prodotta prevalentemente dai ceppi di origine

animale, 8 di questi non possedevano i geni *lukD/E* e nessuno possedeva il gene *lukM* che codificano per le rispettive leucocidine e risultano caratteristici dei ceppi di *S. aureus* isolati dal latte (Hata et al., 2008; Vautor et al., 2009). I 10 ceppi con il gene *sea* erano inoltre resistenti contemporaneamente agli antibiotici AM e P e venivano isolati prevalentemente in campioni provenienti dalla seconda tipologia di caseifici. I ceppi di *S. aureus* di origine umana sono prevalentemente produttori delle enterotossine A, B ed E (SEA, SEB e SEE), mentre i ceppi di origine bovina, ovina e caprina risultano maggiormente produttori della SEC ospite-specifica (Marr et al.,1993; Valle et al., 1990; Larsen et al., 2000; EC, 2003; Hhl et al., 2004). Nella presente ricerca, il gene *sec* è stato rilevato sempre in associazione con i geni *sel* e *tst* che albergano sulla stessa isola (SaPIbov) di patogenicità (Fitzgerald et al., 2001). È stata evidenziata una elevata diversità dal punto di vista del profilo di patogenicità e dei clusters ottenuti mediante PFGE, sia all'interno di ciascun caseificio, sia tra i differenti caseifici. Solamente in un numero limitato di caseifici è stato possibile evidenziare *S. aureus* appartenenti allo stesso cluster. I ceppi non tipizzabili mediante PFGE provenivano dal caseificio C e risultavano resistenti alla TE, portavano il gene *hlb* e risultavano □-emolitici su agar sangue. Solamente in un caseificio (E) è stato evidenziato lo stesso profilo di patogenicità nei ceppi isolati in entrambi i lotti di produzione, mentre lo stesso profilo è stato rilevato in un solo lotto nei caseifici A (L2) e G (L1 ed L2). Nei caseifici B (L1), E (L1), F (L1) e G (L1 ed L2), tutti gli isolati dallo stesso lotto mostravano lo stesso cluster.

Conclusioni

La presenza di *S. aureus* è stata evidenziata in tutti i campioni di cagliata a concentrazioni talvolta superiori a quelle alle quali si osserva la produzione delle SEs, anche se queste ultime, non sono state ritrovate nei campioni di formaggio analizzati. Solamente un numero limitato di ceppi (n=26) risultava resistente ad almeno uno degli antibiotici testati. Gli isolati hanno mostrato resistenza prevalentemente nei confronti degli antibiotici β-lattamici sensibili alle penicillinasi, e della TE, antibiotici maggiormente utilizzati nel trattamento delle mastiti in medicina veterinaria, mentre non sono stati rilevati ceppi MRSA o resistenti agli altri antibiotici saggiati. È stata inoltre rilevata una notevole concordanza tra tecniche molecolari per la determinazione dei geni che codificano per l'antibiotico resistenza e le MIC rilevate. La presenza di alcuni profili di patogenicità comprendenti i geni *sec*, *sel*, *tst*, *hlb*, *lukE/D* e *lukM*, la produzione di □-emolisine su agar sangue e il profilo di antibiotico resistenza (mancanza del gene *mecA*) evidenzia la possibile origine animale dei ceppi isolati. L'elevata frequenza dell'allele *agrIII*, sulla base dei risultati ottenuti in precedenti ricerche, evidenzia inoltre l'origine ovina dei ceppi isolati. In altri casi è stata evidenziata la probabile origine umana dei ceppi, caratterizzati dalla presenza dei geni *sea*, *sem*, *seo* e *hlg*, oltre alla resistenza alle penicilline AM e P. Lo studio di popolazione effettuato mediante la PFGE ed il profilo di patogenicità hanno rivelato una notevole bio-diversità tra i ceppi di *S. aureus* isolati. La presenza di un ceppo di *S. aureus* con lo stesso profilo di patogenicità è stata rilevata esclusivamente nel

caseificio E, mentre gli stessi profili di patogenicità sono stati rilevati in un solo lotto nei caseifici B, E, F e G. Anche la presenza di clusters genici e profili di patogenicità affini tra isolati provenienti da differenti caseifici è molto limitata. Le metodiche utilizzate si integrano bene tra loro e si completano vicendevolmente, come è stato rilevato per i ceppi non tipizzabili mediante la PFGE, che risultavano resistenti alla TE, portavano tutti il gene *hlb* e risultavano □-emolitici su agar sangue. Variabili tecnologiche di produzione del formaggio, così come il tipo di latte (latte crudo o termizzato), la tipologia di starters utilizzata, la velocità e il livello di acidificazione finale (Meyrand & Vernozy-Rozand, 1999), possono influenzare il livello di contaminazione da *S. aureus* e conseguentemente la produzione di SEs (De Buyser et al., 2001). La presenza di ceppi di *S. aureus* di origine umana nei campioni di formaggio analizzati, desta notevole preoccupazione per via delle caratteristiche di patogenicità di questi microrganismi. Di notevole importanza risulta essere sicuramente la formazione del personale, a tutti i livelli della filiera lattiero casearia, compresa la produzione primaria. La tecnologia di produzione di formaggi a base di latte crudo, infatti, non presenta ostacoli in grado di limitare lo sviluppo di *S. aureus* se non attraverso la maturazione superiore ai due mesi. Risulta pertanto strategico partire con una corretta applicazione delle buone pratiche igieniche di lavorazione (GIP) e di produzione (GMP), già nella fase di mungitura, con attenzione allo stoccaggio in allevamento e il successivo trasporto refrigerato del latte. Solo attraverso la corretta applicazione di tutte queste procedure operative già in allevamento, si è in grado di ottenere una materia prima con ridotti livelli di contaminazione tali da non permettere

uno sviluppo in grado di supportare la produzione di enterotossine pericolose per il consumatore e di veicolare patogeni antibiotico resistenti.

Tabelle

Tabella 01 – elenco dei primers utilizzati per l'amplificazione dei geni che codificano per la resistenza all'eritromicina (ermA), meticillina (mecA), vancomicina (vanA e vanB) e per la produzione di β-lattamasi (blaZ)

Target gene	*Sequence (5' to 3')*	*Products size (bp)*
ermA	F:TCTAAAAAGCATGTAAAAGAA	640
	R:CTTCGATAGTTTATTAATATTAGT	
VanA	F:CATGACGTATCGGTAAAATC	732
	R:ACCGGGCAGRGTATTGAC	
VanB	F:ACGGAATGGGAAGCCGA	647
	R:TGCACCCGATTTCGTTC	
blaZ	F:TCAAACAGTTCACATGCC	792
	R:TTCATTACACTCTGGCG	
mecA	F:AAAATCGATGGTAAAGGTTGG	
	R:AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC	533

Tabella 02 – elenco dei primers utilizzati per l'amplificazione dei geni per le 13 enterotossine di *S. aureus* (SEs)

Primers	Sequence (5' to 3')	Products size (bp)
sea	F: GAAAAAAGTCTGAATTGCAGGGAACA R: CAAATAAATCGTAATTAACCGAAGGTTC	560
seb	F: ATTCTATTAAGGACACTAAGTTAGGGA R: ATCCCGTTTCATAAGGCGAGT	404
sec	F: CTTGTATGTATGGAGGAATAACAAAACATG R: CATATCATACCAAAAAGTATTGCCGT	275
sed	F: GAATTAAGTAGTACCGCGCTAAATAATATG R: GCTGTATTTTTCCTCCGAGAGT (22)	492
see	F: CAAAGAAATGCTTTAAGCAATCTTAGGC R: CACCTTACCGCCAAAGCTG	482
seh	F: CAATCACATCATATGCGAAAGCAG R: CATCTACCCAAACATTAGCACC	376
sek 1	ATGCCAGCGCTCAAGGC	134
sek 2	AGATTCATTTGAAAATTGTAGTTGATTAGCT	
sek 3	TGCCAGCGCTCAAGGTG	
sel	F: GCGATGTAGGTCCAGGAAAC R: CATATATAGTACGAGAGTTAGAACCATA	235
sem	F: CTATTAATCTTTGGGTTAATGGAGAAC R: TTCAGTTTCGACAGTTTTGTTGTCAT	300
seo	F: AGTTTGTGTAAGAAGTCAAGTGTAGA R: ATCTTTAAATTCAGCAGATATTCCATCTAAC	180
sep	F: GAATTGCAGGGAACTGCT R: GGCGGTGTCTTTTGAAC	182

Tabella 03 – elenco dei primers utilizzati per l'amplificazione dei geni che codificano per la TSST-1 (*tst*), emolisine (*hlg*, *hlgv* e *hlb*), leucocidine (*LukE/D*, *lukF-PV*, *lukS-PV* e *LukM*), esfoliatine (*eta*, *etb* ed *etd*) e fattore EDIN (epidermal cell differentiation inhibitor gene).

Primers	Sequence (5' to 3')	Products size (bp)
tst	F: TTCACTATTTGTAAAAGTGTCAGACCCACT R: TACTAATGAATTTTTTTATCGTAAGCCCTT	180
eta	F: ACTGTAGGAGCTAGTGCATTTGT R: TGGATACTTTTGTCTATCTTTTTCATCAAC	190
etb	F: CAGATAAAGAGCTTTATACACACATTAC R: AGTGAACTTATCTTTCTATTGAAAAACACTC	612
etd	F: CAAACTATCATGTATCAAGGATGG R: CCAGAATTTCCCGACTCAG	358
LuK E/D	F: TGAAAAAGGTTCAAAGTTGATACGAG R: TGTATTCGATAGCAAAAGCAGTGCA	269
Luk M	F: TGGATGTTACCTATGCAACCTAC R: GTTCGTTTCCATATAATGAATCACTAC	780
PVL	F: ATCATTAGGTAAAATGTCTGGACATGATCCA R: GCATCAASTGTATTGGATAGCAAAAGC	433
hlg	F: GTCAYAGAGTCCATAATGCATTTAA R: CACCAAATGTATAGCCTAAAGTG	535
hlgv	F: GACATAGAGTCCATAATGCATTYGT R: ATAGTCATTAGGATTAGGTVCACAAAG	390
hlb	F: GTGCACTTACTGACAATAGTGC R: GTTGATGAGTAGCTACCTTCAGT	309
edin AC	F: GATTTAGATGAGGCAACTAAATGGGG R: CAGCGTATTCTGTGCCTCTAGG	358
edin B	F: GACTTAGTTGAAGCTACTAAATGGGG R: CAGCATATTCTGTCCCTCTAGG	560
mec A	F: AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC R: AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC	533

Tabella 04 - Minima Concentrazione Inibente (µg/mL) nei confronti di *S. aureus* isolati da campioni di cagliata ovina

Antibiotico	MIC Breakpoints (µg/mL)	Sensibile	Intermedio	Resistente	MIC_{90} (µg/mL)	Moda (µg/mL)	Range (µg/mL)
Ampicillina	≤0,25 - ≥0,5	80	-	20	8,0	0,25	0,06 – 64,0
Cefalotina	≤8,0 - ≥32,0	100	-	-	1,0	0,25	0,06 – 4,0
Cefoperazone	≤16,0 - ≥64,0	100	-	-	8,0	4,0	1,0 – 16,0
Cloxacillina	≤2,0 - ≥4,0	99	-	1	0,5	0,5	0,25 – 32,0
Eritromicina	≤0,5 - ≥8,0	100	-	-	0,2	0,1	0,025 – 0,4
Gentamicina	≤4,0 - ≥16,0	100	-	-	0,5	0,12 – 0,25	0,06 – 2,0
Kanamicina	≤16,0 - ≥64,0	100	-	-	4,0	1,0	0,06 – 8,0
Novobiocina*	≤4,0 - ≥8,0	100	-	-	2,0	0,5	0,12 – 4,0
Ofloxacina	≤1,0 - ≥4,0	99	1	-	1,0	0,5	0,25 – 2,0
Oxacillina	≤2,0 - ≥4,0	100	-	-	0,5	0,5	0,06 – 2,0
Penicillina	≤0,25 - ≥0,5	81	-	19	4,0	0,06	0,06 – 64,0
Rifampicina	≤1,0 - ≥4,0	100	-	-	0,05	0,006	0,006 – 0,4
Streptomicina	≤8,0 - ≥16,0	100	-	-	4,0	2,0	0,06 – 8,0
Tetraciclina	≤4,0 - ≥16,0	94	-	6	4,0	1,0	0,06 – 64,0
Tobramicina	≤4,0 - ≥8,0	100	-	-	1,0	0,25	0,06 – 2,0
Vancomicina	≤2,0 - ≥4,0	100	-	-	2,0	1,0	0,5 - 2,0

(Breakpoints CLSI. 2006a; =*breakpoints Thornsberry et al.,1997)

Tabella 05 – caratterizzazione genotipica e sensibilità agli antibiotici dei ceppi di *S. aureus* testati, nei dieci caseifici per lotto di produzione.

Caseificio	lotto	*agr*	geni				Antibiotici							
			mecA	*blaZ*	*vanA-B*	*ermA*	AM	P	OX	CF	E	VA	OB	CFP
A	L1	III	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	L2		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B	L1	IV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	L2	III(4)-I(1)	-	+(1)	-	-	+(1)	+(1)	-	-	-	-	-	-
C	L1	I(3)-II(2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	L2	I(2)-II(3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	L1	III	-	+(1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	L2	I(4)-I(1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E	L1	II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	L2		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F	L1	I(1)-III(4)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	L2	III	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G	L1	I	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	L2	IV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H	L1	III	-	+(5)	-	-	+(5)	+(4)	-	-	-	-	-	-
	L2	I(1)-III(4)	-	+(3)	-	-	+(4)	+(4)	-	-	-	-	-	-
I	L1	II	-	+(1)	-	-	+(1)	+(1)	-	-	-	-	-	-
	L2		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L	L1	II(4)-III(1)	-	+(3)	-	-	+(4)	+(4)	-	-	-	-	+(1)	-
	L2	II	-	+(5)	-	-	+(5)	+(5)	-	-	-	-	-	-

Tabella 06 – caratterizzazione enterotossigenica dei ceppi di *S. aureus* testati, nei dieci caseifici per lotto di produzione.

Caseificio	lotto	*agr*	Geni Enterotossine											
			sea	*seb*	*sec*	*sed*	*see*	*seh*	*sek*	*sel*	*sem*	*seo*	*sep*	*tst*
A	L1	III	-	-	+(5)	-	-	-	-	+(5)	-	-	-	+(5)
	L2		-	-	+(5)	-	-	-	-	+(5)	-	-	-	+(5)
B	L1	IV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	L2	III(4)-I(1)	+(1)	-	+(3)	-	-	-	-	+(3)	-	-	-	+(3)
C	L1	I(3)-II(2)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	L2	I(2)-II(3)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	L1	III	-	-	+(5)	-	-	-	-	+(5)	-	-	-	+(5)
	L2	I(4)-I(1)	-	-	+(5)	-	-	-	-	+(5)	-	-	-	+(5)
E	L1	II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	L2		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F	L1	I(1)-III(4)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	L2	III	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G	L1	I	-	-	-	-	-	-	-	-	+(5)	+(5)	-	-
	L2	IV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H	L1	III	+(5)	-	-	-	-	-	-	-	+(5)	+(5)	-	+(2)
	L2	I(1)-III(4)	+(4)	-	-	-	-	-	-	+(2)	+(2)	+(2)	-	+(4)
I	L1	II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	L2		-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
L	L1	II(4)-III(1)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	L2	II	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabella 07 – caratterizzazione dei fattorim di patogenicità dei ceppi di S. aureus testati, nei dieci caseifici per lotto di produzione.

Caseificio	lotto	*agr*	Fattori patogenicità						
			pvl	*Luk_DE*	*lukM*	*edinABC*	*hlb*	*hlg*	*hlgv*
A	L1	III	-	+(5)	+(5)	+(3)	+(5)	-	+(5)
	L2		-	+(5)	+(5)	+(5)	+(5)	-	+(5)
B	L1	IV	-	-	-	+1	+(5)	-	-
	L2	III(4)-I(1)	-	+(2)	+(2)	+3	+4	+(1)	+(1)
C	L1	I(3)-II(2)	-	+(2)	+(2)	-	+4	+(2)	+(4)
	L2	I(2)-II(3)	-	+(3)	+(3)	-	+(5)	+(1)	+(4)
D	L1	III	-	+(5)	+(5)	+(5)	+(5)	-	+(5)
	L2	I(4)-I(1)	-	+(5)	+(5)	+(5)	+(5)	-	+(5)
E	L1	II	-	+(5)	-	-	-	-	+(5)
	L2		-	+(5)	-	-	-	-	+(5)
F	L1	I(1)-III(4)	-	+(5)	+(5)	+4	+(5)	-	+(5)
	L2	III	-	+(5)	+(5)	+4	+(3)	-	+(3)
G	L1	I	-	-	-	-	-	+(5)	-
	L2	IV	-	+(5)	-	-	+(5)	-	+(5)
H	L1	III	-	-	-	-	-	+(5)	-
	L2	I(1)-III(4)	-	+(3)	-	-	+(2)	+3	+(3)
I	L1	II	-	+(5)	-	-	-	-	+(5)
	L2		-	+(4)	-	-	+(1)	-	+(5)
L	L1	II(4)-III(1)	-	+(5)	+1	+1	+(1)	-	+(5)
	L2	II	-	+(5)	-	-	+(2)	-	+(5)

Tabella 08 – comparazione tra il profilo di patogenicità e i differenti cluster (35) riscontrati, nei dieci caseifici per lotto di produzione.

Caseificio	lotto	*agr*	Clusters	Profilo patogenicità
A	L1	III	20(3)-21(1)-26(1)	P20(2)-P21(3)
	L2		7(1)-28(4)	P21(5)
B	L1	IV	15(5)	P33(2)-P34(1)-P35(2)
	L2	III(4)-I(1)	5(1)-15(1)-25(3)	P22(1)-P23(1)-P24(1)-P26(1)-P35(1)
C	L1	I(3)-II(2)	17(1)-nt(4)	P1(1)-P2(2)-P8(1)-P9(1)
	L2	I(2)-II(3)	6(2)-18(1)-nt(2)	P3(1)-P4(1)-P8(3)
D	L1	III	23(2)-24(3)	P21(4)-P25(1)
	L2	I(4)-I(1)	23(1)-32(1)-33(3)	P7(4)-P21(1)
E	L1	II	19	P9(5)
	L2		2(1)-19(1)-26(3)	P9(5)
F	L1	I(1)-III(4)	5	P5(1)-P16(3)-P17(1)
	L2	III	12(1)-29(2)-30(1)-31(1)	P16(3)-P18(1)-P37(1)
G	L1	I	35	P6(5)
	L2	IV	34	P36(5)
H	L1	III	12(1)-13(1)-14(2)-27(1)	P28(3)-P31(2)
	L2	I(1)-III(4)	9(1)-12(2)-14(2)	P10(1)-P27(1)-P29(1)-P30(1)-P32(1)
I	L1	II	11(4)-16(1)	P9(4)-P11(1)
	L2		3(4)-4(1)	P9(3)-P12(1)-P13(1)
L	L1	II(4)-III(1)	3(1)-10(1)-16(2)-22(1)	P9(1)-P14(2)-P16(1)-P18(1)
	L2	II	1(4)-8(1)	P14(3)-P15(2)

Figure

Figura 01 – risultato della multiplex PCR per i geni *agr* I-IV.

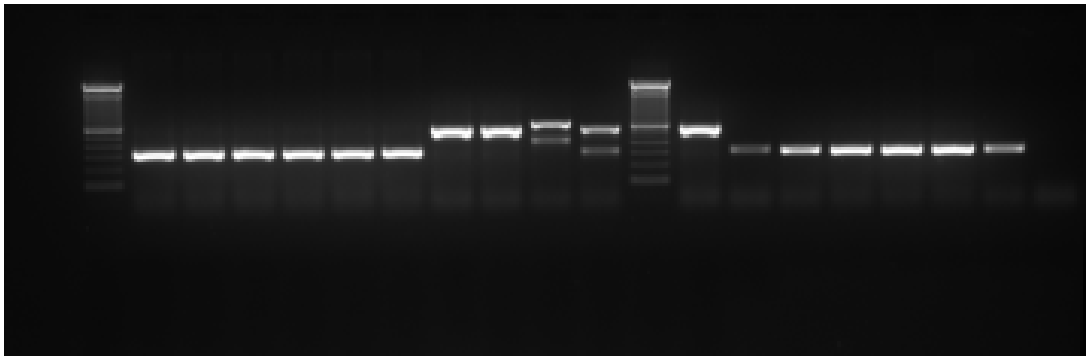


Figura 02 – risultato della multiplex PCR per i geni *mecA, gyrA, sea, tst.*

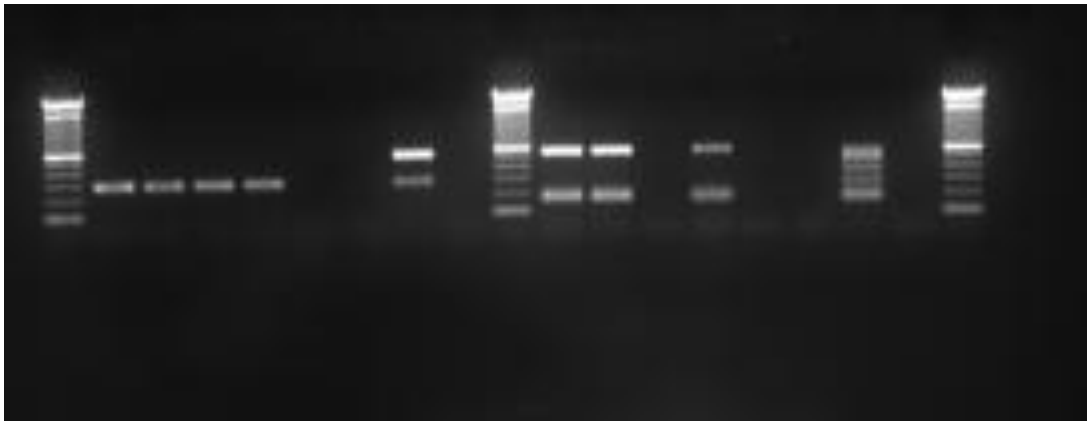


Figura 03 – risultato della multiplex PCR per i geni *seo* e *hlg.*

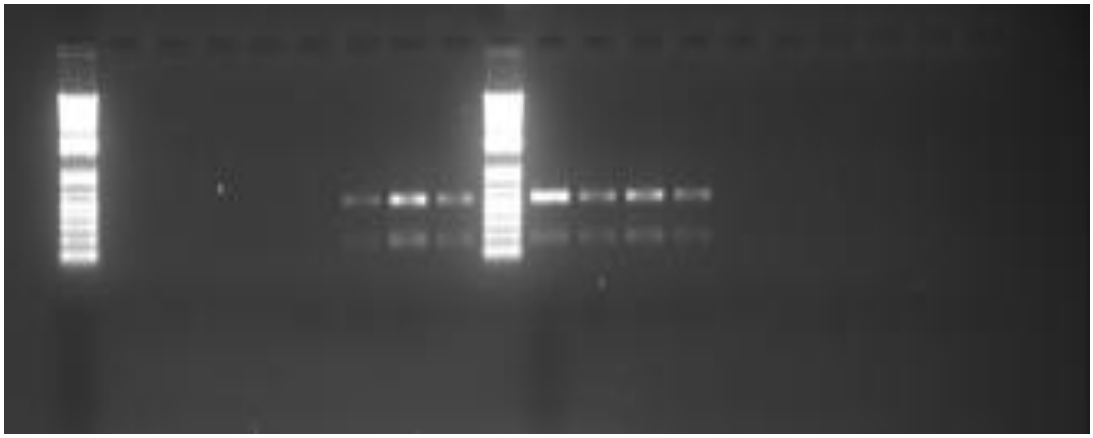


Figura 04a – Dendrogramma dei ceppi di *S. aureus*, con UPGMA model e Pearson correlaction coeficent.

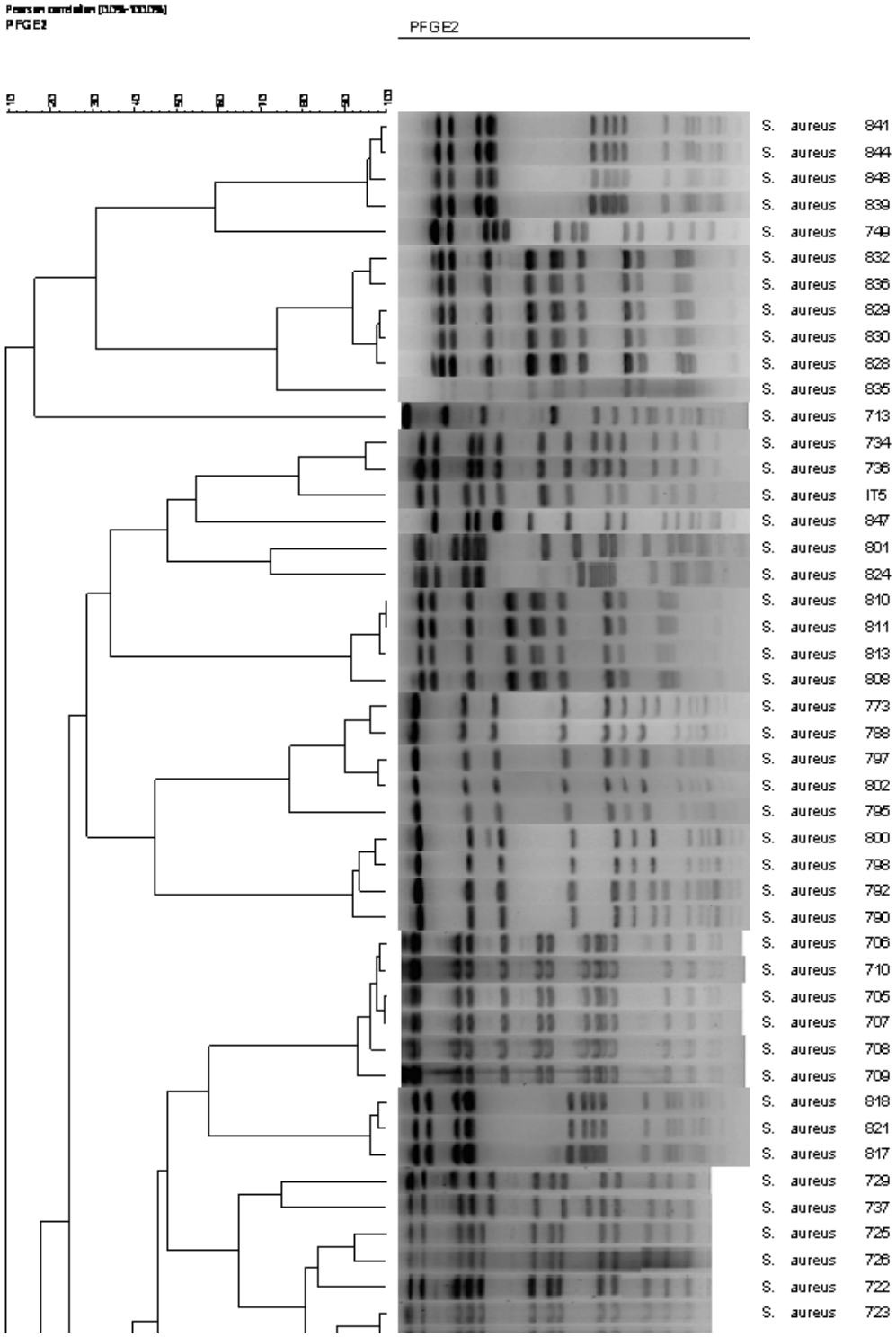
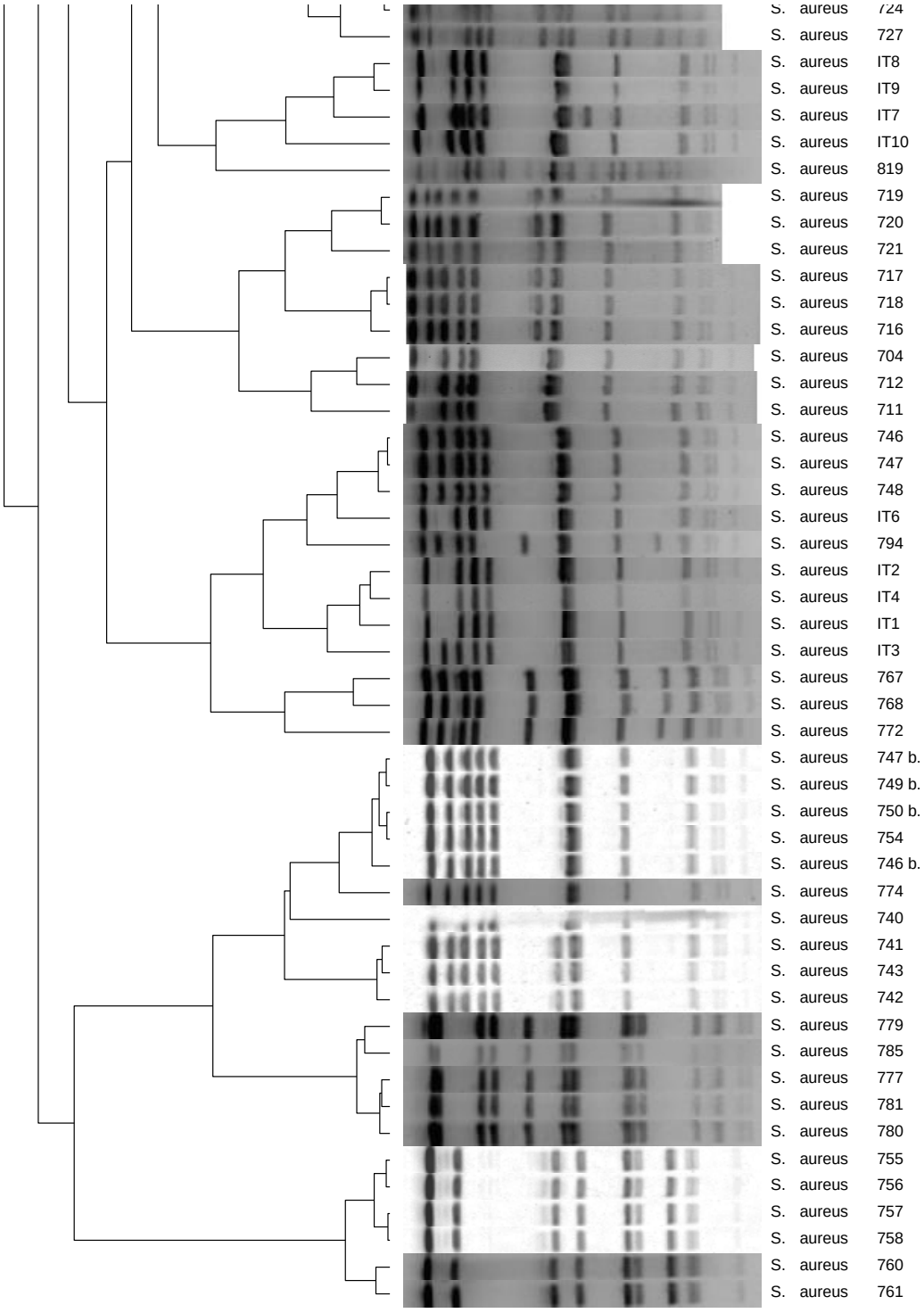


Figura 04b – Dendrogramma dei ceppi di *S. aureus*, con UPGMA model e Pearson correlaction coeficent.



Bibliografia

Aarestrup, F.M., 2005. Veterinary drug usage and antimicrobial resistance in bacteria of Adesiyun A. A., Romain H. T. (1999). Longitudinal study on the susceptibility to bacteriophages of Staphylococcus aureus strains isolated from dairy farms in Trinidad. Zentralbl. Veterinariarmed, 8, 567-581.

Aldrige K. E., Kogos C., Sanders C. V. (1984). Comparison of rapid identification assays for Staphylococcus aureus. J. Clin. Microbiol., 19, 703-704.

American Public Health Association (APHA) 4°Edizione. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Ed. Frances Pouch Downes Keith Ito.

Andresen L. O. (1998). Differentiation and distribution of three types of exfoliative toxin produced by Staphylococcus hyicus from pigs with exudative epidermitis. FEMS Immunol med. Microbiol., 20, 301-310.

Arburthnott J.P., Coleman D.C. e deAzavedo J.S. (1990) "Staphylococcal toxins in human disease". J. Appl. Bacteriol., Symposium Suppl: 101S-107S.

Arko R. J., Rasheed J. K., Broome C. V., Chandler F. W., Paris A. L. (19 84). A rabbit model of toxic shock syndrome: clinicopathological features. Journal of Infection, 8, 205-211.

Baba Moussa L., Werner S., Colin D. A., Mourey L., Pédelacq J. D., Samama J. P., Sanni A., Monteil H., Prévost G. (1999). Discoupling the Ca(2+)-activation from the pore-forming function of the bicomponent Panton-Valentine leucocidin in human PMNs. FEBS Lett, 461, 280-286.

Baer E. F., Gray R. J., Orth D. S. (1976). Methods for isolation and enumeration of Staphylococcus aureus. In: M. L. Speck (Editor), Compendium of Methods for Microbiological examination of Foods. APHA, Washington, pp. 374-385.

Baker J. S., Bormann M. A., Boudreau D. H. (1981). Evaluation of various rapid agglutination methods for the identification of Staphylococcus aureus. J. Clin. Microbiol., 14, 617-619.

Bautista L.P., Gaya P., Medina M., Nunez M. (1988). A quantitative study of enterotoxin production by sheep milk staphylococci. Appl. Environ. Microbiol. 54, 566-569.

Bautista L.P., Monserrat P. B., Manuel N. (1986). Seasonal variation and characterization of Micrococcaceae present in ewes' raw milk. Journal of Dairy Research, 53, 1-5.

Bergdoll M. S. (1979). Staphylococcal intoxications, pp. 443-494. In: H. Reimann and F. L. Bryan (ed.), Foodborne infections and intoxications, 2 nd ed. Academic Press, Inc., New York.

Bergdoll M. S. (1989). 'Staphylococcus aureus', in Doyle, M. P. (ed.) Food-borne Bacterial Pathogens, New York: Marcell Dekker: 464-525.

Bergdoll M. S., Crass B. A., Reiser R. F., Robbins, R.N., Davis J.P. (1981). A new staphylococcal enterotoxin F associated with toxic-shock-syndrome Staphylococcus aureus isolated. i 1017-1021.

Bergdoll M. S., Weiss K. F., Muster M. J. (1967). The produetion of of staphylococcal enterotoxin by a coagulase negative microrganism. Bacteriological Proceedings, 12.

Bergdoll M.S., Sclievert P.M. (1984). Toxic shock syndrome toxin. Lancet., ii: 691.

Bergonier D., Berthelot X., Romeo M., Contreras A., Coni V., De Santis E., Rolesu S., Barillet F., Lagriffoul G., Marco J. (1999). Frèquence des diffèrents germes responsables de mammittes cliniques chez les petits ruminants laitiers. 6th International Symposium on the Milking of Small Ruminants. Presentation Papers.

Bernardeau M, Vernoux JP, Henri-Dubernet S, Gueguen M, Safety assessment of dairy microorganisms: The Lactobacillus genus, International Journal of Food Microbiology, Volume 126, Issue 3, Contribution to the safety assessment of technological microflora found in fermented dairy products, 1 September 2008, Pages 278-285.

Bloomster-Hautamaa D. A., Kreiswirth B. N., Kornblum J. S., Novick R. P., Schlievert P. M. (1986). The nucleotide and partial amino acid sequence of TSST-I. J. Biol. Chem., 261, 15783-15786.

Bortoleto R. K., de Oliveira A. H., Ruller R., Arni R. K., Ward R. J. (1998). Tertiary structural changes of the alpha-hemolysin from Staphylococcus aureus on association with liposome membranes. Arch. Biochem. Biophys., 351, 47-52.

Bortoleto R. K., Ward R. J. (1999). A stability transition at mildly acidic pH hemolysin (alpha-toxin) from Staphylococcus aureus. FEBS Lett, 459, 438-442.

Bramley, A.J., and C.H. McKInnon. 1990. The microbiology of raw milk. Pages 163-208 in Dairy Microbiology, vol 1. R.K. Robinson, ed. Elsevier, London, Enngland.

Bresciani D., Ottaviani F. (1984). Ottimizzazione della tecnica di estrazione della termonucleasi stafilococcica dagli alimenti nel controllo routinario degli inquinamenti stafilococcici nell'industria alimentare. Il latte, Vol. IX, 122-124.

Bulanda M., Z. Wegrzynowicz, H. Brands, J. Jeljaszewicz, G. Pulverer and P.B. Heczko. (1981). Occurrence and characterization of staphylococcal strains showing pseudocoagulase activity. In J. Jeljaszewicz (Editor), Staphylococci and Staphylococcal infections, Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, New York, pp. 37-41.

Burbianka M. (1971). Enterotoxin production by Staphylococcus aureus strains from various sources. Exp. Epidemiol. Rev., XXV, 229-233.

Burkett G., Frank L. A. (1998). Comparison of production of Staphylococcus intermedius exotoxin among clinically normal dogs, atopic dogs with recurrent pyoderma, and dogs with a single episode of pyoderma. J. Am. Vet. Med. Assoc., 213, 232-234.

Campanini M. (1979). Influence of water activity on growth and survival of salmonella and staphylococci. In Proceedings of the International Meeting on Food Microbiology and Tecnology. Tabiano B. (Jarvis, B., Christian J. H. B., Michener H. D. eds.).

Caserio G., Valcamonica C. (1974). Procedimento standard mediante immunodiffusione per la ricerca delle enterotossine stafilococciche e dei ceppi enterotossici A e B. Boll. Ist.Sieroter Milanese, 53, 485-490.

Catalanotti P., Bruschini M., Ametrano G., De Paolis, Capasso C., Baroni A., Rossano F. (1993) Incidenza di ceppi di Staph. epidermidis slime positivi nelle congiuntiviti e dacriocistiti acute batteriche. Bollettino di Microbiologia ed indagini di laboratorio. 13, 5-10.

Cibrowski P., Jeljaszewicz J. (1985). Staphylococcal enzymes and virulence. Pp. 146-183. In I. A. Holder (ed.), Bacterial enzymes and virulence. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida.

Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006a. Document M7-A7. Wayne, PA, USA.

Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006b. Document M100-S16. Wayne, PA, USA.

Cords B. R., Tatini S. R. (1973). Applicability of heat stable Dnase assay for assessment of staphylococcal growth and the likely presence of enterotoxin in cheese. J Dairy Sci., 56, 1512-1519.

Cosentino Sofia, M. Barbara Pisano, Arianna Corda, M. Elisabetta Fadda and Carla Piras, 2004.Genotypic and technological characterization of enterococci isolated from artisanal Fiore Sardo cheese. Journal of Research (2004) 71 444-450.

Cosseddu A. M., Pisanu S., Mazzette R., De Santis E. P. L. (1991). Tossinfezione stafilococcica da formaggio pecorino. Atti SISVET, Vol. XLV, 739-742.

Cunningharn L., Catlin B. W., de Garilhe M.P., (1956). The oxiribonuclease of Micrococcus pyogenes. J. Am. Chem. Soc. 78, 4642-4645.

D.Scherrer, S. Corti, J.E. Muehlherr, C. Zweifel, R. Stephan 2004. Phenotypic and genotypic characteristic of Staphilococcus aureus isolates from raw bulk-tank samples of goats and sheep. Veterinary Microbiology 101 (2004) 101-107.

Dack G.M. (1956) Food Poisoning (3rd ed.), Chicago, University of Chicago Press .

Dairy Cows and Relationships with Macrorestriction Genomic Profiles. JOURNAL OF CLINICALMICROBIOLOGY, Mar. 2005, p. 1278–1284.

Danielsson M. L., Hellberg B. (1977). The biochemical activity of enterotoxin and nonenterotoxin producing Staphylococci. Acta Veterinaria Scandinavica, 18, 266-273.

De Azavedo J. C. S, Drumm A., Jupin C., Parant M., Alouf J. E., Arbuthnott J. P. (1988). Induction of tumor necrosis factor by staphylococcal toxic shock syndrome toxin-I. FEMS Microbiology Immunology, 47, 69-74.

De Azavedo J. C. S., Foster T. J., Hartigan P. J., Arbuthnott J. P., O'Reilly J., Kreiswirth B. N., Novick R. P. (1985). Expression of the cloned toxic shock syndrome toxin gene (tst) in vivo with a rabbit uterine model. Infection and Immunity, 50, 304-309.

De Azavedo J. C., Hartigan P. J., Arbuthnott J. P. (1984). Toxins in relation to staphylococcal toxic shock syndrome. In Proceedings of the FEMS Workshop Conference on Bacterial Protein Toxins ed. Alouf J. E., Fehrenbach F., Freer J. H., Jeljaszewicz J. Pp. 331-338. London: Academic Press.

De Buyser M. L., Dilasser F., Hummel R., BergdolI M. S. (1987). Enterotoxin and toxic shock syndrome toxin- 1 production by staphylococci isolated from goat's milk. Int. J Food Microb., 5, 301-309.

De Buyser, M. L, B. Dufour, M. Maire et V. Lafarge (2001). Implication of milk and milk products in food-borne diseases in France and in different industrialised countries. Int. J. Food Microbiol., 67, 1-17.

De Buyser, M. L., Janin F., Dilasser F. (1985). Contamination of ewe cheese with Staphylococcus aureus study of an outbreak of food poisoning. In The Staphylococci . pp. 677-678 (Ed. J. Jeljaszewiez). Stuttgart: Fischer (Zentralblanfir Bakteriologie Mikrobiologie und Hygiene, Abt. 1, Suppl. 14).

De Felip G., Carloni M. B., De Simone C. (1979). Studies ori detection of staphylococcal thermonuclease in foods and culture media. (In Proceedings of the International Meeting ori Food Microbiology and Tecnology. Tabiano B., Jarvis, B., Christian J. H. B., Michener H. D. eds.).

De Felip G., Toti L., De Simone C. (1977). Ricerca delle termonucleasi stafilococciche in alimenti di varia natura. Ann. Sclavo, 19, 5.

De Luca G., Zanetti F., Stampi S.,1997. Staphilococcus aureus in dairy products in the Bologna area. Int. J. Food Microbiol. 1997 Apri.15; 35(3): 267-270.

De Santis, E., Mureddu, A., Mazzette, R., Scarano, C., Bes, M., 2005. Detection of enterotoxins and virulence genes in Staphylococcus aureus strains isolated from sheep with subclinical mastitis. In: Hogeveen, H. (Ed.), Mastitis in Dairy Production. Current knowledge and future solutions, pp. 504–510.

Dinges M.M., Orwin P.M. and Schlievert M. (2000) “Exotoxins of Staphylococcus aureus”. Clin.Microbiol. Rev., 13, 16-34.

Directive 2003/99/EC of the European Parliament and of the Council of 17 November 2003.

Dos Santos, E. C. et C. Genigeorgis (1981). Potential for presence and growth of Staphylococcus aureus in Brazilian Minas cheese whey. J. Food Prot., 44, (3), 185-188.

Dos Santos, E. C., C. Genigeorgis et T. B. Farver (1981). Prevalence of Staphylococcus aureus in raw and pasteurized milk used for commercial manufacturing of Brazilian Minas cheese. J. Food Prot., 44, (3), 172-176.

Drouault S., Corthier G., Ehrlich S. D., Renault P. (2000). Expression of the Staphylococcus hyicus lipase in Lactococcus lactis. Appl Environ Microbiol, 66, 588-598.

Duarte C. Oliveira, Alexander Tomasz, Hermínia de Lencastre, 2002. Secrets of success of a human pathogen: molecular evolution of pandemic clones of meticillin-resistant Staphylococcus aureus
The Lancet Infectious Diseases, Volume 2, Issue 3, Pages 180-189.

European Food Safety Authority EFSA- Assessment of the Public Health significance of meticillin resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in animals and foods. 5 March 2009.

Emswiler-Rose B. S., Johnston R. W., Harris M. E., Lee W. H. (1980). Rapid detection of staphylococcal thermonuclease on casing of naturally contaminated fermented sausages. Appl. Environ. Microbiol, 40, 13-18.

Erickson A., Deibel R. H. (1973). Production and heat stability of staphylococcical nuclease. Appl. Microbiol, 25,332-336.

Essers L., Radebold K. (1980). Rapid and reliable identification of Staphylococcus aureus by latex agglutination test. J. Clin Microbiol, 12, 641-643.

European Food Safety Authority EFSA- Foodborne antimicrobial resistance as a biological hazard, 9 July 2008.

Fisher S., Tsugita A., Kreutz B., Scheifer K.H. (1983). Immunochemical and protein-chemical studies of the class I fructose-1, 6 diphosphate aldolases from staphylococci. Int. J. Syst. Bacteriol. 33, 443-450.

Fitzgerald, J.R., Monday, S., Foster, T.J., Bohach, G.A., Hartigan, P.J., Meaney, W.J., Smyth, C.J., 2001. Characterization of a putative pathogenicity island from bovine Staphylococcus aureus encoding multiple superantigens. J. Bacteriol. 183, 63–70.

Fleischer B. (1989). Bacterial toxins and probes for the T-cell antigen receptor. Immunology Today, 10, 262-264.

Fook Yee Chye, Aminah Abdullah, Mohd Khan Ayob 2003. Bacteriological quality and safety of raw milk in Malaysia. Food Microbiology 21 (2004) 535-541.

Foster G., Roos H. M., Hutson R. A., Collins M. D. (1997). Staphylococcus lutrae sp. nov., a New Coagulase-Positive species isolated from otters. Int. J Syst. Bacteriol. 47, 3.

Frénay H. M. E., Theelen J. P. G., Schouls L. M., Vanderbroucke-Grauls C. M. J. E., Verhoef J., van Leeuwen W. J., Mooi F. R. (1994). Discrimination of epidemic and non-epidemic methicillin-resistant Staphylococcus aureus strains on the basis of protein A gene polymorphism. J. Clin. Mícrobiol., 32, 846-847.

Fthenakis G.G., 1998. Susceptibility to antibiotics of staphylococcal isolates from cases of ovine or bovine mastitis in Greece. Small Ruminant Research 28 9–13.

Fueyo J.M., Martin M.C., Gonzáles-Hevia M.A. e Mendoza M.C. (2001) "Enterotoxin production and DNA fingerprinting in Staphylococcus aureus isolated from human and food samples. Relations between genetic types and enterotoxins". Int. J. Food Microbiol., 67 (1-2), 139-145.

Fueyo JM, Mendoza MC, Rodicio MR, Muniz J, Alvarez MA, Martin MC (2005) Cytotoxin and pyrogenic toxin superantigen gene profiles of Staphylococcus aureus associated with subclinical mastitis in dairy cows and relationships with macrorestriction genomic profiles. J Clin Microbiol 43:1278– 1284.

Fujita S. (1998). Genotyping of isolates of bacteria and candida. Rinsho Byori, 46, 26-32.

Gaskin D. K, Bohach G. A., Schlievert P. M., Hovde C. J. (1997). Purification of Staphylococcus aureus beta-toxin: comparison of three isoelectric focusing methods. Protein Expr Purif, 9, 76-82.

Gaynes R. Culver D. National Nosocomial Infection Surveillance (NNIS), 1997. System Nosocomial methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in the United States, 1975-1996 In Procedings of the 35th, annual meeting of the Infectious Diseases Society of America (San Francisco) Alexandria VA: IDSA, 206.

Goñi P., Vergara Y., Ruiz J., Albizu I., Vilab J., Gómez-Lusa R., 2004. Antibiotic resistance and epidemiological typing of Staphylococcus aureus strains from ovine and rabbit mastitis. International Journal of Antimicrobial Agents 23 (2004) 268–272.

Gouaux E. (1998). alpha-Hernolysin from Staphylococcus aureus: an archetype of beta-barrel channel-forming toxins. J. Struct Biol, 121, 110-22.

Gouaux E., Hobaugh M., Song L. (1997). Alpha-Hernolysin, gamma-hemolysin, and leukocidin from Staphylococcus aureus: distant in sequence but similar in structure. Protein Sci, 6, 2631-2635.

Gudding R. (1983). Differentiation of staphylococci on the basis of nuclease properties. J. Clin. Microbiol., 18, 1098-1101.

Guss B., Uhlén M., Nilsson B., Lindberg M., Sjóquist J., Sjódahl J. (1984). Region X, the cellwall-attachment part of staphylococcal protein A. European Journal of Biochemistry, 138, 413-420.

Halpin-Dohnalek, M.I., Marth, E.H., 1989. Staphylococcus aureus:production of extracellular compounds and behavior in foods—a review. Journal of Food Protection 52, 267–282.

Hartford O., Francois P., Vaudaux P., Foster T. J. (1997). The dipeptide repeat region of the fibrinogen-binding protein (clumping factor) is required for functional expression of the fibrinogen-binding domain on the Staphylococcus aureus cell surface. Mol. Microbiol., 25, 1065-1076.

Harvey J., Gilmour A. (2000) Academic Press. Staphylococcus aureus. Department of Agricolture and Food Scienze Centre, Belfast, Northern Ireland, UK. In. Enciclopedia of Microbiology Food .vol.III. p.2066.

Heir E., Sundheirn G., Holck A. L. (1999). Identification and caracterization of quaternary ammonium compound resistant staphylococcì from the food industry. Int. J. Food Microbiol., 48, 211-219.

Holm C., L. Jepsen, M. Larsen, and L. Jespersen 2004. Predominant Microflora of Downgraded Danish Bulk Tank Milk. J. Dairy Sci. 87,1151-1157.

Isigidi B.K., Mathieu A.-M., Devriese L.A., Godard C. e van Hoof J. (1992) "Enterotoxin production in different Staphylococcus aureus biotypes isolated from food and meat plants". J. Appl. Bacteriol., 72: 16-20.

Jensen, J. (1963). Apocatalase of catalase-negative staphylococci. Science, 141, 45-46.

Johne B., Jarp J. (1988). A rapid assay for protein A in Staphylococcus aureus strains, using immunomagnetic monosized polymer particles. Acta Pathologica, Microbiologica, Immunologica Scandinavica, 96, 43-49.

Jørgensen, H. J., T. Mørk, and L. M. Rørvik. 2005. The occurrence of Staphylococcus aureus on a farm with small-scale production of raw milk cheese. J. Dairy Sci. 88:3810–3817.

Jungkind D. J., Thoran N. J., Corman K. E. (1984). Comparison of two commercially available test methods with conventional coagulase test for identification of Staphylococcus aureus. J. Clin. Microbiol., 19, 191-193.

Kagami K., Murakami M., Takeshita S. (1997). Antibacterial sensitivity, phage group an coagulase type of Staphylococcus aureus isolated from bullous impetigo. Kansenshogaku Zasshi., 71, 1108-1112.

Kaneko J., Ozawa T., Tomita T., Kamio Y (1997). Sequential binding of Staphylococcal gamma-hemolysin to human erythrocytes and complex formation of the hemolysin on the cell surface. Biosci. Biotechnol. Biochem., 61, 846-851.

Kanzaki H., Ueda M., Morishita Y, Akiyama H., Arata J., Kanzaki S. (1997). Producibility of exfoliative toxin and staphylococcal coagulase types of Staphylococcus aureus strains isolated from skin infections and atopic dermatitis. Dermatology, 195, 6-9.

Kawarnura Y, Hou X. G., Sultana F., Hirose K., Miyake M., Shu S. E., Ezaki T. (1998). Distribution of Staphylococcus species among human clinical specimens and emended description of Staphylococcus caprae. J. Clin. Microbiol., 36, 2038-2042.

Kilpper-Bälz R., Schleifer K. H. (1981). DNA- RNA hybridization studies among staphylococci and some others gram-positive bacteria. FEMS Microbiol. Lett., 10, 357-362.

Kloos W. E. (1980). Natural population of the genus Staphylococcus. Annu. Rev. Microbiol. 34, 159-592.

Kloos W. E., Jorgensen J. H. (1981). Staphylococci. In Starr M. P., Stolp H., Trouper H. G., Balows A. (1981). The Prokaryote. A Handbook on Habitats, Isolation and Identification of Bacteria, 4th ed., pp. 243-253. New York, Springer-Verlag.

Kloos W.E. , Scheifer K.H. (1975 b). Simplified scheme for routine identification of human staphylococcus species. J. Clin. Microbiol. 1, 82-88.

Kloos W.E. , Wolfshohl J. F. (1979). Evidence for deoxyribonucleotide sequence divergence between sthaphylococci living on human and other primate skin. Curr. Microbiol. 3, 167-172.

Kloos W.E. , Wolfshohl J. F. (1982). Identification of Staphyloccus species with the API STAPH-IDENT system. J. Clin. Microbiol. 16, 509-516.

Kloos W.E. , Wolfshohl J. F. (1983). Deoxyribonucleotide sequence divergence between Sthaphylococcus cohnii supspecies population living on primate skin. Curr. Microbiol. 8, 115-121.

Kloss W. E., Musselwhite M. S., Zimmermann R. J. (1976). A comparison of the distribution of Staphylococcus species on human and animal skin. In Jeljaszewicz (Editor), Staphylococci and Staphylococcal Disease. Gustav Fisher Verlag, Stuttgard, New York, pp. 967-973.

Kloss W. E., Scleifer K. H. (1981). The genus Staphylococcus. In Starr, Stolp, Trüper, Balows, and Schlegel (Editors). The Prokaryotes. A handboook on habitats, isolation, and identification of bacteria. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, pp. 1548-1569.

Kotb M. (1995). Bacterial pyrogenic enterotoxins as superantigens. Clin. Microbiol, Rev., 8, 411-426.

Kristiansand S, Norge, pp. 166–175 (in Norwegian).

Lachica R. V F., Weiss K. F., Deibel R. H. (1969). Relationships among coagulase, enterotoxin, and heatstable deoxyribonuclease production of Staphylococcus aureus. Appl. Microbiol, 18, 126-127.

Lachica R. V. F., Hoeprich P. D., Riemann H. P. (1972). Tolerance of staphylococcal thermonuclease to stress. Appl. Microbiol, 23, 994-997.

Ladhani S; Poston SM; Joannou CL; Evans RW (1999). Staphylococcal scalded skin syndrome: exfoliative toxin A (ETA) induces serine protease activity when combined with A431 cells. Acta Paediatr, 88, 776-779.

Lapeyre C., Janin F., Kaveri S. V (1988). Indirect double sandwich E.L.I.S.A. using monoclonal antibodies for detection of staphylococcal enterotoxins A, B, C, e D in food samples. Food Microbiology., 5, 25-31.

Le Loir, Y., Baron, F., Gautier, M., 2003. Staphylococcus aureus and food poisoning. Genetics and Molecular Research 2 (1), 63–76.

Letertre C, Perelle S, Dilasser F, Fach P (2003) Identification of a new putative enterotoxin SEU encoded by the egc cluster of Staphylococcus aureus. J Appl Microbiol 95:38–42.

Llewelyn M, Cohen J (2002) Superantigens: Microbial agents that corrupt immunity. Lancet Infect Dis 2:156– 162.

Lotter L. P., Genigeorgis C. A. (1977). Isolation of coagulase-positive variants from coagulase negative enterotoxigenic staphylococci. Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt I; Orig. Reihe A, 239, 18-30.

Ludwig W., Schleifer K.H., Stackebrandt E. (1984). 16S rRNA Analisys of Listeria Monocytogenes and Brochothrix thermosphacta. FEMS Microbiol. lett. 25: 199-204.

Marin M. E., Rosa M. C., Cornejo 1. (1992). Enterotoxigenicity of Staphylococcus strain isolated from Spanish dry-cured hams. Appl. Environ. Microbiol, 58, 1067-1069.

Mathur S, Singh R, Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria--a review, International Journal of Food Microbiology, Volume 105, Issue 3, 15 December 2005, 281-295.

Mathur S., Singh R., 2005. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review. International Journal of Food Microbiology 105 (2005) 281– 295.

Matthews KR, Oliver SP, King SH (1991). Expression of glycocalyx by coagulase-negative Staphylococcus species isolated from bovine milk. J Appl Bacteriol, 70, 227-732.

Mendoza M., Meugnier H., Bes M., Etienne J., Freney J. (1998). Identification of Staphylococcus species by 16S-23S rDNA intergenic spacer PCR analysis. Int. J. Syst. Bacteriol., 48, 1049-1055.

Meyer S.A. e Schleifer K. H. (1978). Deoxyribonucleic acid reassociation in the classification of coagulase positive staphylococci. . Arch. Microbiol. 117, 183-188.

Meyrand, A. et C. Vernozy-Rozand (1999). Croissance et entérotoxinogenèse de Staphylococcus aureus dans différents fromages. Rév. Méd. Vét., 150, (7), 601-616.

Meyrand, A., C. Vernozy-Rozand, C. Gonthier, C. Mazuy, S. Ray-Gueniot, G. Jaubert, G. Perrin, C. Lapeyre et Y. Richard (1999b). Main differences in behavior and enterotoxin production of Staphylococcus aureus in two different raw milk cheese. Rév. Méd. Vét., 150, (3), 271-278.

Miller K. L, Zelt S. C., Bae J. H. (199 1). Glycine betaine and proline are the principal compatible solutes of Staphylococcus aureus. Curr. Microbiol, 23, 131-137.

Minor T. E., Marth E. H. (1976). Staphylococci and their significance in foods. Elselvier Scientific Publishing Co., New York, NY.

Muehlherr, J.A., Zweifel, C., Corti, S Blanco, J.E., Stephan, R., 2003. Microbiological quality of bulk-tank raw milk of goat and ewe in Switzerland. J.Dairy Sci. 86, 3849-3856.

Munson S. H., Tremaine M. T., Betley M. J., Welch R. A. (1998). Identification and caracterization of staphylococcal enterotoxins types G and I from Staphylococcus aureus. Infect. Immun., 66, 3337-3348.

Mynarczyk G., Kochman M., Lawrynowicz M., Fordymacki P., Mynarczyk A., Jeljaszewicz J. (1998). Coagulase-negative variants of methicillin-resistant Staphylococcus aureus subsp. Aureus starains isolated from hospital specimens. Zentralbl Bakteriol., 288, 373-381.

Myrick B. A., Ellner P. D. (1982). Evaluation of the lattex slide agglutination test for identification of Staphy1ococcus aureus. J. Clin. Microbiol., 15, 275-277.

Normanno, G., Corrente, M., La Salandra, G., Dambrosio, A., Quaglia, N.C., Parisi, A., Greco, G., Bellacicco, A.L., Virgilio, S., Celano, G.V., 2007. Methicillin-resistant Staphylococcus aureus (MRSA) in foods of animal origin product in Italy. Int. J. Food Microbiol. 117, 219–222.

Noto M. J., Fox P. M., and ArcherG. L., 2008. Spontaneous Deletion of the Methicillin Resistance Determinant, mecA, Partially Compensates for the Fitness Cost Associated with High-Level Vancomycin Resistance in Staphylococcus aureus. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 1221-1229, Vol. 52, No. 4.

O'Brien M., Hunt K., McSweeney S., Jordan K., 2009. Occurrence of foodborne pathogens in Irish farmhouse cheese. Food Microbiology 26 910–914.

Oliveira D. C. and de Lencastre H., 2002. Multiplex PCR Strategy for Rapid Identification of Structural Types and Variants of the mec Element in Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. Antimicrobial Agents And Chemotherapy, 2155–2161.

Olson R., Nariya H., Yokota K, Kamio Y, Gouaux E. (1999). Crystal structure of staphylococcal LukF delineates conformational changes accompanying formation of a transmembrane channel. Nat. Struct Biol, 6, 134-40.

Omoe, K., Hu, D.L., Takahashi-Omoe, H., Nakane, A., Shinagawa, K., 2003. Identification and characterization of a new staphylococcal enterotoxin-related putative toxin encoded by two kinds of plasmids. Infect. Immun. 71, 6088–6094.

Omoe, K., Imanishi, K., Hu, D.L., Kato, H., Fugane, Y., Abe, Y., Hamaoka, S.,Watanabe, Y., Nakane, A., Uchiyama, T., Shinagawa, K., 2005. Characterization of novel staphylococcal enterotoxin-like toxin type P. Infect. Immun. 73, 5540–5546.

Ono, H.K., Omoe, K., Imanishi, K., Iwakabe, Y., Hu, D.L., Kato, H., Saito, N., Nakane, A., Uchiyama, T., Shinagawa, K., 2008. Identification and characterization of two novel staphylococcal enterotoxins types S and T. Infect. Immun. 76, 4999–5005.

Orden J. A., Goyache J., Hernandez J., Domenesch A., Suarez G., Gomez-Lucia E. (1992). Production of staphylococcal enterotoxins and TSST l by coagulase negative Staphy1ococci isolated from ruminant mastitis. J. Vet. Med., B., 39, 144-148.

Orwin, P.M., Leung, D.Y., Donahue, H.L., Novick, R.P., Schlievert, P.M., 2001. Biochemical and biological properties of staphylococcal enterotoxin K. Infect. Immun. 69, 360–366.

Orwin, P.M., Leung, D.Y., Tripp, T.J., Bohach, G.A., Earhart, C.A., Ohlendorf, D.H., Schlievert, P.M., 2002. Characterization of a novel staphylococcal enterotoxin like superantigen, a member of the group V subfamily of pyrogenic toxins. Biochemistry 41, 14033–14040.

Parsonet J., Hickman R. K, EardIey D. D., Pier G. B. (1985). Induction of human interleukin-1 by toxic shock syndrome toxin- 1. Journal of Infectous Diseases, 151, 514-522.

Pennel D. R., Rott-Petri J. A., Kurzynski T. A. (1984). Evaluation of three commercial agglutination tests for identification of Staphy1ococcus aureus. J. Clin. Microbiol., 20, 614-617.

Pitkala A., Salmikivi L., Bredbacka P., Myllyniemi A.L., and Koskinen M. T., 2007. Comparison of Tests for Detection of β-Lactamase-Producing Staphylococci. Journal of Clinical Microbiology, 2031–2033.

Poutrel B., Ducelliez M. (1979). Evaluation of three rapid tests for identification of Staphy1ococcus aureus isolated in bovine milk. Annales de Recherches Vétérinaires, 10, 125-129.

Raimundo O., Deigton M., Capstick J., Gerraty N. (1999). Molecular typing of Staphy1ococcus aureus of bovine origin by polymorphysms of the coagulase gene. Vet. Microbiol., 66, 275-284.

Regolamento della Commissione (CE) N. 2073/2005. Gazzetta Ufficiale dell'Unione europea L 338/1 del 22.12.2005.

Remington JS. 2000. Strategies for the successful treatment of gram-positive bacterial infections. Clinicla Infection Disease; 31, S150-151.

Roberts, M. C. 2003. Tetracicline therapy: update. Cli. Infect. Dis. 36 : 462-467.

Rupprecht N, Schleifer K.H. (1979). A comparative immunological study of catalases from coagulase -positive staphylococci. Arch. Microbiol. 120: 53-56.

Samuelson P., Cano F., Robert A., Stahl S. (1999). Engineering of a Staphylococcus carnosus surface display system by substitution or deletion of a Staphylococcus hyicus lipase propeptide. FEMS Microbiol Lett, 179, 131-139.

Sato H., Watanabe T., Murata Y, Ohtake A., Nakamura M., Aizawa C., Saito H., Maehara N. (1999). New exfoliative toxín produced by a plasmid-carrying strain of Staphylococcus hyicus. Infect Immun, 67, 4014-4018.

Scherrer D., S. Corti, J.E. Muehlherr, C. Zweifel, R. Stephan (2004). Phenotypic and genotypic characteristic of Staphilococcus aureus isolates from raw bulk-tank samples of goats and sheep. Veterinary Microbiology 101 101-107.

Scheuber P. H., Golecki J. R., Kickofen F., ScheeI D., Beck G., hammer D. K. (1985). Skin reactivity of unsensitised monkeys upon challenge with staphylococcal enterotoxin B: a new approach for investigating the site of toxic action. Infect. Immun., 50, 869-876.

SchindIer C. A., Schuhardt V. T. (1964). Lysostaphin: a new bacteriolytic agent for the staphylococcus. Proc. Nat. Acad. Sci., 51, 414-421.

Schleifer K. H., Meyer S. A., Rupprecht M. (1979). Relatedness among coagulase- negative staphylococci. Deoxyribonucleic acid reassociation and comparative immunological studies. Arch. Microbiol., 122, 93-101.

Schleifer K.H., Kilpper-Balz R., U. Fischer U., Faller A., Endl J. (1982). Identification of "Micrococcus candidus" ATCC 14852 as a strain of Staphylococcus epidermidis and of "Micrococcus caseolyticus" ATCC 13548 and Micrococcus varians ATCC 29750 as members of a new species, Staphylococcus caseolyticus. Int J. Syst. Bacteriol. 32, 15-20.

Schlievert PM, Shands KN, Dan BB, Schmid GP, Nishimura RD (1981). Identification and characterization of an exotoxin from Staphylococcus aureus associated with toxic-shock syndrome. J Infect Dis, 143, 509-16.

Schumacher - Perdreau, F., G. Peters and M. Kocur. (1981). Chemical and physiological properties of a catalase-negative Staphylococcus aureus strain. In Fischer Verlag, Stuttgart, New York, pp. 61-65.

Scott E. Martin. (2000) Academic Press. Staphylococcus. Departement of Food Science and Human Nutrition, University of Illinois,Urbana,US. In. Enciclopedia of Microbiology Food. vol.III. p.2062-2064.

Scott W. J. (1953). Water relations of Staphylococcus aureus at 30 °C. Aust. J. Biol. Sci., 6, 549-564.

Seki K., Sakurada J., Seong H. K., Murai M., Tachi H., Ishii H, Masuda S. (1998). Occurrence of coagulase serotype among Staphylococcus aureus strains isolated from healthy individuals special reference to correlation with size of protein-A gene. Microbiol. Immunol., 42, 407-409.

Silvane Derzelle, Francoise Dilasser, Manon Dunquenne, Veronique Deperrois (2009) Differential temporal expression of the staphylococcal enterotoxins genes during cell growth. Food Microbiology 26 896–904.

Simeã do Carmo L., SouzaDias R ., Roberto Linardi V., Josè de Sena M., Aparecidados Santos D., Eduardo de Faria M., Castro Pena E., Jett M. and Guilherme Heneine L. (2002) Food poisoning due to enterotoxigenic strains of Staphylococcus present in Minas cheese and rawmilk in Brazil. FoodMicrobiology, 2002, 19,9-14.

Slaghius, B.(1996). Sources and significance of contaminansts on different levels of raw milk production. Pages 19-27 in Bacteriological Quality of raw milk. Int . Dairy Fed., Brussels, Belgium.

Stackebrandt E., Woese C.R. (1979). A phylogenetic dissection of the family Micrococcaceae. Curr. Microbiol. 2: 317-322.

Stelma G. N., Bergdoll M. S. (1982). Inactivation of staphylococcal enterotoxin A by chemical modification. Biochem. Biophys. Res. Commun, 105, 121-126.

Structural Types and Variants of the mec Element in Methicillin-Resistant Staphylococcus aureus. Antimicrobial Agents And Chemotherapy, 2155–2161.

Su C., Herbelin C., Frieze N., Skardova 0., Sordillo L. M. (1999). Coagulase gene polimorphism of Staphylococcus aureus isolates from dairy cattle in different geographical areas. Epidemiol. Infect., 122, 329-336.

Su Y C., Wong A. C. L. (1995). Identification and purification of a new staphylococcal enterotoxin, H. Appl. Environ. Microbiol., 61, 1438-1443.

Su Y C., Wong A.C.L (1997). Current perspectives on detection of staphylococcal enterotoxins. J. Food Prot., 60, 195-202.

Su, Y.-C., Wong, A.C.L., (1995). Identification and purification of a new staphylococcal enterotoxin. H. Appl. Environ. Microbiol. 61, 1438–1443.

Thomas, D.Y., Jarraud, S., Lemercier, B., Cozon, G., Echasserieau, K., Etienne, J., Gougeon, M.L., Lina, G., Vandenesh, F., (2006). Staphylococcal enterotoxin-like toxins U2 and V, two new staphylococcal superantigens arising from recombination within the enterotoxin gene cluster. Infect. Immun. 74, 4724–4734.

Thornsberry Clyde, Penny Ogilvie, James Kahn, Yolanda Mauriz, and the Laboratory Investigator Group. (1997). Surveillance of antimicrobial resistance in Streptococcus pneumoniae, Haemophilus influenzae, and Moraxella catarrhalis in the United States in 1996–1997 respiratory season. Diagnostic Microbiology and Infectious Disease, Volume 29, Issue 4, December 1997, Pages 249-257.

Tiecco G.F. (1992). Microbiologia degli alimenti di origine animale. Ed. Agricole, Bologna.

Todd, E., R. Szabo, H. Robern, T. Gleeson, C. Park et D. Clark (1981). Variation in counts, enterotoxin levels and TNase in Swiss-type cheese contaminated with Staphylococcus aureus. J. Food Prot., 44, (11), 839-848.

Todd, J., Fishaut, M., F & Welch, T. (1978). Toxic Shock Syndrome associated with phage group 1 staphylococci. Lancet ii, 1116-1118.

Tomasz A., Lancaster H., de Jonge BLM., Matthews PR. (1994). Molecular aspects of methicillin-resistance in S.aureus. Journal of Antimicrobial Chemotherapy, 33:7-24.

Tranter H. S., Brehm R. D. (1990). Production, purification and identification of the staphylococcal enterotoxins. J. Appl. Bacteriol. Supplement: 109-122.

Valle J., Gomez-Lucia, Piriz S., Goyache J., Orden LA., Vadillo S. (1990). Enterotoxin production by staphylococci isolated from healty goats. Appl. Environ. Microbiol., 56, 1323-1326.

Vandenesch F, Naimi T, Enright MC, Lina G, Nimmo GR, Heffernan H, Liassine N, Bes M, Greenland T, Reverdy ME, Etienne J., (2003) Community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus carrying Panton-Valentine leukocidin genes : worldwide emergence. Emerg Infect Dis. (accepté pour publication).

Vautor E., Abadie G., Guibert J.-.M., Huard C., Pépin M. 2003. “Genotyping of Staphylococcus aureus isolated from various sites on farms with dairy sheep using pulsed-field gel electrophoresis”. Vet. Microbiol., 96, 69-79.

Vautor E., Carsenti-Dellamonica H., Sabah M., Mancini G., Pepin M., Dellamonica P., 2007. Characterization of Staphylococcus aureus isolates recovered from dairy sheep farms (agr group, adherence, slime,

resistance to antibiotics). Small Ruminant Research 72 197–199.

Vernozy-Rozand C., Mazuy C., Prevost G., Lapeyre C., Bes M., Brun Y., Fleurette J. (1996). Enterotoxin production by coagulase negative staphylococci isolated from goats' milk and cheese. Int. J Food Microbiol., 30, 271-280.

Vernozy-Rozand, C., A. Meyrand, C. Mazuy, M.-L. Delignette-Muller, G. Jaubert, G. Perrin, C. Lapeyre et Y. Richard (1998). Behaviour and enterotoxin production by Staphylococcus aureus during the manufacture and ripening of raw goats' milk lactic cheeses. J. Dairy Res., 65, 273-281.

Vuong C., Gótz F., Otto M. (2000). Construction and characterization of an agr deletion mutant of Staphylococcus epidermidis. Infect Immunol., 68, 1048-1053.

Wesley E. Kloos and Karl Heinz Schleifer. (1984). Staphylococcus aureus.In Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams& Wilkins. Vol. II p.1013-1015.

Wieneke A. A. (1974). Enterotoxin production by strains of Staphylococcus aureus isolated from foods and human beings. J. Hyg. Camb., 73, 255-262.

You Y. O., Kim K. J., Min B. M., Chung C. P. (1999). Staphylococcus lugdunensis: a potential pathogen in oral infection. Oral. Surg. Oral. Med. Oral. Pathol. Oral. Radiol. Endod., 88, 297-302.

Zhang, S., Iandolo, J.J., Stewart, G.C., 1998. The enterotoxin D plasmid of Staphylococcus aureus encodes a second enterotoxin determinant (sej). FEMS Microbiol. Lett. 168, 227–233. 904 S. Derzelle et al. / Food Microbiology 26 (2009) 896–904.

Ringraziamenti

Arrivata al termine di questo lavoro desidero ringraziare ed esprimere la mia riconoscenza nei confronti di tutte le persone che, in modi diversi, mi sono state vicine in questi tre anni di Scuola di Dottorato.

I miei più sentiti ringraziamenti vanno a chi mi ha seguito durante il lavoro sul campo, in laboratorio e la stesura della tesi:

- Prof. Enrico De Santis, per la fiducia fin da subito dimostratami, per avermi seguito durante lo svolgimento di questo lavoro, ma non solo, con consigli e confronti che mi hanno aiutato ad intraprendere, ogni volta, le scelte più appropriate.
- Dott. Salvatore Virdis, per tutti gli insegnamenti nel lavoro in laboratorio, di cui ora posso fare tesoro, per la sua determinazione nel portare a termine il lavoro e per il suo indispensabile contributo nella scrittura della tesi.
- Dott. Christian Scarano, per aver contribuito alla mia formazione e crescita professionale. Per la disponibilità e pazienza che mi ha dedicato durante l'intera esperienza di dottorato e nella correzione della tesi.
- Dott. Vincenzo Spanu, per la continua disponibilità, per i suoi suggerimenti durante la conclusione di questo percorso formativo, per il suo paziente e prezioso contributo nella parte del lavoro di biologia molecolare.
- Myriam Carta, per essere stata una grande collaboratrice, preziosa e instancabile.
- Allevatori e produttori, per la loro disponibilità e perché senza il loro faticoso, ma anche appassionante lavoro, non avrei avuto i prodotti su cui lavorare.

Ringrazio inoltre:

- La Sezione di Ispezione degli Alimenti di O.A., dove ho trovato la serenità necessaria durante questi anni, grazie alla disponibilità dei colleghi con cui ho collaborato o semplicemente conosciuto, con cui ho scambiato qualche pensiero, qualche idea e più di una risata.
- Per ultimi, ma di certo non per importanza, ringrazio la mia famiglia e gli amici che mi hanno sempre sostenuto e incoraggiato, anche in qualche momento di sconforto.