

# DETERMINAZIONE DEL BIOSIEROTIPO E DEI CARATTERI DI VIRULENZA IN STIPITI DI *Yersinia enterocolitica* ISOLATI DA SUINI MACELLATI

## CHARACTERIZATION OF BIOSEROTYPE AND DETECTION OF VIRULENCE FACTORS IN *Yersinia enterocolitica* STRAINS ISOLATED FROM SLAUGHTERED PIGS

FIGAROLLI B.M.<sup>1</sup>, GRADASSI M.<sup>1</sup>, BONARDI S.<sup>2</sup>, D'INCAU M.<sup>1</sup>,  
ALBORALI G. L.<sup>1</sup>, TAGLIABUE S.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna, Brescia

<sup>2</sup> Sezione di Spezione degli Alimenti di Origine Animale, Università di Parma

**Parole chiave:** *Yersinia enterocolitica*, biosierotipo, fattori di virulenza, suino pesante, macello, zoonosi

**Key words:** *Yersinia enterocolitica*, bioserotype, virulence factors, fattening pigs, slaughterhouse, zoonosis

**Riassunto.** Lo scopo della presente indagine sperimentale è stato quello di valutare biosierotipo e caratteri di patogenicità di ceppi di *Yersinia enterocolitica* isolati da suini pesanti macellati in uno stabilimento sito in Lombardia nel periodo compreso tra Gennaio 2006 e Febbraio 2009. In totale sono stati caratterizzati 69 ceppi di *Yersinia* spp., di cui 37 (53,6%) sono stati identificati come *Y. enterocolitica*. Di questi, 32 (46,4%) sono risultati appartenenti al biotipo 1A e 5 (7,2%) al biosierotipo 4/O:3. È stata inoltre rilevata la presenza di specie di origine ambientale (*Y. frederiksenii*, *Y. mollaretii*, *Y. bercovieri*, *Y. kristensenii* e *Y. intermedia*). I 37 ceppi di *Y. enterocolitica* sono stati sottoposti a PCR per la ricerca dei geni di virulenza *yadA*, *ail*, *inv*, *ystA* and *ystB*. Dei 5 stipiti di *Y. enterocolitica* 4/O:3, uno è risultato positivo per il gene *yadA*, e 4 per il gene *ail*. Tuttavia, la PCR multiplex applicata per la ricerca dei geni *inv*, *ystA* e *ystB* non ha fornito esiti definitivi e pertanto non è stato possibile stabilire la reale presenza di tali geni nei ceppi patogeni e non patogeni di *Y. enterocolitica*.

**Abstract.** The aim of this study was to characterize the bioserotype and to investigate the presence of virulence factors in *Yersinia enterocolitica* strains isolated from fattening pigs, selected in one abbatoir of Northern Italy, during the three-year period January 2006 - February 2009. Sixty-nine *Yersinia* spp. strains were subjected to biochemical and serological typing: thirty-two *Y. enterocolitica* isolates (46.4%) belonged to biotype 1A and five (7.2%) to bioserotype 4/O:3. Environmental strains of *Yersinia* spp. were also detected (*Y. frederiksenii*, *Y. mollaretii*, *Y. bercovieri*, *Y. kristensenii* e *Y. intermedia*). The thirty-seven *Y. enterocolitica* strains were subjected to polymerase chain reaction (PCR) analysis to detect the presence of the *yadA*, *ail*, *inv*, *ystA* and *ystB* virulence genes. Only one *Y. enterocolitica* strain of bioserotype 4/O:3 carried *yadA* gene and four *Y. enterocolitica* strains of bioserotype 4/O:3 carried *ail* gene. The results of multiplex PCR analysis for the detection of the *inv*, *ystA* and *ystB* genes were not definitive and it was not possible to establish the real presence of these virulence genes in *Y. enterocolitica* pathogenic and non-pathogenic strains.

### INTRODUZIONE

*Yersinia enterocolitica* è un importante agente di zoonosi di origine alimentare (Direttiva 2003/99/CE), considerato dall'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) la terza causa di

malattia gastrointestinale trasmessa da alimenti in Europa, dopo *Campylobacter* spp. e *Salmonella* spp. (1). I Paesi del Nord Europa sono i più colpiti; in genere si registrano focolai sporadici, che si sviluppano in ambito familiare e che sono correlati alle abitudini alimentari. La trasmissione di *Y. enterocolitica* avviene attraverso l'ingestione di alimenti contaminati, in particolare la carne di suino cruda o poco cotta. La più comune manifestazione clinica è la gastroenterite, generalmente autolimitante, che colpisce in particolare i bambini. Nei soggetti adulti è possibile osservare forme extraintestinali di origine autoimmunitaria, quali artrite, eritema nodoso e sindrome di Reiter (2). Il suino pesante è considerato il principale serbatoio asintomatico dei biosierotipi 4/O:3 e 2/O:9 patogeni per l'uomo, che si localizzano a livello di amigdale e di contenuto ciecale.

La contaminazione delle carni suine avviene principalmente al macello, in quanto vi afferrisce un elevato numero di capi, provenienti da aziende suinicole caratterizzate da condizioni sanitarie e sistemi di gestione diversi tra loro e dove le carcasse vengono ampiamente manipolate. Le operazioni di eviscerazione, escissione della testa ed asportazione del pacchetto intestinale e del retto, se eseguite in maniera scorretta, favoriscono la diffusione del microorganismo attraverso il contenuto intestinale (feci) o gli organi della cavità orale (tonsille), portando alla contaminazione della carcassa. La carente applicazione di norme di corretta prassi igienica negli ambienti di lavorazione durante le operazioni di sezionamento, macinazione, rifilatura delle carni aumenta ulteriormente il rischio di contaminazione dei prodotti derivati (3; 4; 5; 6; 7).

## MATERIALI E METODI

**Campionamento.** I campioni di contenuto ciecale sono stati prelevati da 1440 suini pesanti del peso compreso tra i 150 ed i 180 Kg, afferenti da 33 aziende, presso uno stabilimento di macellazione sito in Lombardia, nel periodo compreso tra Gennaio 2006 e Febbraio 2009 e sono stati inviati all'IZSLER di Brescia. La metodica di prelievo (formazione di pool costituiti dal materiale intestinale di 5 soggetti ciascuno) non ha permesso di impostare studi di prevalenza, che quindi non rientrano nella presente indagine.

**Isolamento ed identificazione.** I campioni di contenuto ciecale sono stati sottoposti ad arricchimento a freddo in Acqua Peptonata Tamponata (APT) e posti ad incubare a temperatura di refrigerazione ( $5\pm 3^{\circ}\text{C}$ ) per 10 giorni.

Trascorso il periodo di incubazione, gli arricchimenti, sottoposti a trattamento di alcalinizzazione con KOH allo 0,5%, sono stati seminati su terreno CIN agar (Cefsulodina-Irgasan-Novobiocina), selettivo per *Yersinia* e su terreno MacConkey, selettivo per le Enterobatteriacee. Le piastre sono state incubate a  $30\pm 1^{\circ}\text{C}$  per 24-48 ore. Una volta eseguita la piastratura, gli arricchimenti sono stati nuovamente incubati per altri 10 giorni e successivamente seminati sui terreni sopra citati. Tale procedura è stata ripetuta fino ad un massimo di tre volte. Le colonie riconducibili morfologicamente a *Yersinia* sono state sottoposte a test di prima identificazione (tabella 1).

**Tabella 1.** *Esito delle prove di conferma*

**Table 1.** *Results of identification tests*

TEST	ESITO
Gram	Negativo
Catalasi	Positivo
Ossidasi	Negativo
H <sub>2</sub> S	Negativo
Gas dal glucosio	Negativo
Glucosio	Positivo
Lattosio	Negativo
Ureasi	Positivo
Idrolisi dell'esculina	Negativo
Mobilità a $26^{\circ}\text{C}\pm 1$	Positivo
Mobilità a $37^{\circ}\text{C}\pm 1$	Negativo
Enterotube™ II (BBL Enterotube™ II, BD)	

I ceppi identificati come appartenenti al genere *Yersinia* spp. sono stati stoccati a -20°C, in cryotubes contenenti terreno Tripticase Soy Broth (TSB) addizionato del 10% di glicerolo.

**Determinazione del biosierotipo.** Le prove di tipizzazione biochimica e sierologica sono state condotte su 69 ceppi identificati in precedenza come *Yersinia* spp. Il ceppo da tipizzare, scongelato, è stato seminato in brodo Brain Heart Infusion (BHI) ed incubato a 30±1°C per 24-48 ore. Si è proceduto quindi alla piastratura della coltura batterica su MacConkey agar, incubato a 30±1°C per 24 ore, per ottenere colonie isolate, da sottoporre a colorazione di Gram per verificarne la purezza ed a trapianto in terreno Kligler Iron Agar, per valutare la mancata produzione di gas e di idrogeno solforato (H<sub>2</sub>S), dopo incubazione a 30±1°C per 48-72 ore. La subcoltura ottenuta su Kligler è stata in parte stoccata a -20°C ed in parte destinata alla tipizzazione biochimica ed a quella sierologica, mediante agglutinazione rapida su vetrino, utilizzando i sieri del commercio O:1,2; O:3, O:5; O:8; O:9 (*Yersinia enterocolitica* ANTISERA SET, Denka Seiken Co., LTD.). Il profilo biochimico è stato determinato ricorrendo a prove in macrometodo, secondo lo schema di Wauters (8) (lipasi TW80, esculina ESC, pirazinamidasi PYR, indolo IND, salicina SAL, sorbosio SORB, trealosio TRE, xilosio XIL, nitrati NIT, ornitina ORN, Voges-Proskauer VP, melibiosio MEL, raffiniosio RAF, ramnosio RHA, saccarosio SAC e mucato MUC) e in micrometodo (API 20E e API 50CHE, bioMérieux), alla temperatura di 30±1°C. La lettura delle prove in macrometodo è stata eseguita ad intervalli di 24-48-72 ore, fino a 7 giorni. I sistemi miniaturizzati API 20E e API 50CHE sono stati letti a 24 ore e, dopo aggiunta dei reattivi necessari, a 48 ore.

**Determinazione dei fattori di virulenza.** I geni codificanti per i fattori di virulenza di *Y. enterocolitica*, determinati mediante PCR sono stati *yadA*, *ail*, *inv*, *ystA*, *ystB* e descritti in tabella 2.

**Tabella 2.** Fattori di virulenza di *Y. enterocolitica*  
**Table 2.** *Y. enterocolitica* virulence factors

LOCALIZZAZIONE	GENE	PROTEINA CODIFICATA	FUNZIONE
<b>PLASMIDICA</b>  Plasmide pYV (70 kb)	<i>yadA</i>	<i>Yersinia</i> adhesin (YadA)	Adesione alle cellule dell'epitelio intestinale; inibizione dell'attivazione del sistema del complemento (9, 10, 11).
<b>CROMOSOMIALE</b>	<i>inv</i>	Invasina (Inv)	Adesione e invasione degli enterociti; penetrazione del batterio nelle placche del Peyer (12).
	<i>ail</i>	Attachment Invasion Locus (Ail)	Resistenza all'attività battericida del siero (11, 13).
	<i>ystA</i> (stipiti patogeni)	Enterotossina (Yst)	Il ruolo nell'induzione della diarrea è controverso, ma sembra favorire l'accumulo di fluidi nel lume intestinale (14, 15).
	<i>ystB</i> (stipiti non patogeni)		

L'estrazione del DNA batterico è stata eseguita a partire dalla coltura batterica pura, coltivata in brodo, dopo 24 ore di incubazione. La successiva reazione di PCR è stata eseguita su un volume finale di 50 µl, costituito da 5 µl di DNA e 45 µl di Master Mix, composta da tampone Taq Buffer 10 X (Fermentas), MgCl<sub>2</sub> 25 mM (Fermentas), dNTPs 10 mM (Eppendorf), Taq Polymerase 5 U/µl (Fermentas). Le quantità dei singoli reagenti utilizzati per la preparazione della Master Mix variano a seconda del protocollo applicato. Per ogni PCR sono stati utilizzati controlli positivi in numero variabile, a seconda del gene ricercato.

**Ricerca del gene plasmidico *yadA*.** Per l'amplificazione del gene plasmidico *yadA* (238 bp) sono stati impiegati i seguenti primers (Sigma Genosys): *21-mer* forward (5'-CAG TAT TGA CCAAAA CCA GGC-3') e *17-mer* reverse (5'-TGT CGA GGT TAC AAG TC-3'). Il programma di PCR utilizzato segue le impostazioni descritte nel protocollo di Blais e Philippe (16).

**Ricerca del gene cromosomiale *ail*.** Per l'amplificazione del gene cromosomico *ail* (315 bp) sono stati impiegati i seguenti primers: *ail*-forward (5'-TAA TGT GTA CGC TGC GAG-3') ed *ail*-reverse (5'-GAG GTC TTA CTT GCA CTG-3'). Il programma di PCR utilizzato segue, invece, le impostazioni descritte nel protocollo di Thoerner e collaboratori (17).

**Ricerca dei geni cromosomiali *inv*, *ystA* e *ystB*.** La PCR multiplex messa a punto per la ricerca dei geni cromosomici *inv* (183 bp), *ystA* (79 bp) e *ystB* (146 bp), utilizza le seguenti coppie di primers: *inv*-forward (5'-CGG TAC GGC TCA AGT TAA TCT G-3') e *inv*-reverse (5'-CCG TTC TCC AAT GTA CGT ATC C-3'); *ystA*-forward (5'-ATC GAC ACC AAT AAC CGC TGA G-3') e *ystA*-reverse (5'-CCA ATC ACT ACT GAC TTC GGC T-3'); *ystB*-forward (5'-GTA CAT TAG GCC AAG AGA CG-3') e *ystB*-reverse (5'-GCA ACA TAC CTC ACA ACA CC-3'). Anche in questo caso, il programma di PCR utilizzato segue le impostazioni descritte nel protocollo di Thoerner e collaboratori (17).

**Corsa elettroforetica.** I diversi prodotti PCR sono stati separati in gel di agarosio al 2%, in tampone TAE 50X, ad un voltaggio di 90 V per 90 minuti, per i geni *yadA* ed *ail*. Per la rilevazione dei prodotti PCR *inv*, *ystA*, *ystB* è stato impostato un voltaggio di 70 V per 3 ore. Il gel è stato colorato con bromuro di etidio e l'amplificato è stato visualizzato ai raggi UV. Per verificare le dimensioni dei frammenti amplificati è stato utilizzato il marker MassRuler™ DNA Ladders, Low Range, ready-to-use (Fermentans), che permette di visualizzare bande comprese tra 1031 bp e 80 bp.

## RISULTATI

**Determinazione del biosierotipo.** Le prove di tipizzazione biochimica e sierologica hanno permesso di definire correttamente la specie, il biotipo e il sierotipo dei 69 ceppi batterici, identificati in fase di primo isolamento come *Yersinia* spp. La biotipizzazione ha identificato 32 ceppi di *Y. enterocolitica* biotipo 1A (46,38%), 5 ceppi di *Y. enterocolitica* biotipo 4 (7,25%), 23 ceppi di *Y. frederiksenii* (33,34%), 5 ceppi di *Y. mollaretii* (7,25%), 2 ceppi di *Y. bercovieri* (2,90%), 1 ceppo di *Y. kristensenii* (1,45%) e 1 ceppo di *Y. intermedia* (1,45%) (tabelle 3 e 4). La tipizzazione sierologica ha fornito i seguenti risultati: 35 ceppi (50,72%) non hanno mostrato reattività nei confronti dei sieri testati e sono stati definiti non agglutinanti (N.A.); 2 ceppi (2,90%) hanno reagito con il siero O:1,2; 2 ceppi (2,90%) hanno presentato reazione crociata nei confronti dei sieri O:1,2 e O:3; 14 ceppi (20,29%) sono risultati positivi al siero O:3; 9 ceppi (13,04%) sono risultati positivi al siero O:5; 5 (7,25%) ceppi hanno reagito con il siero O:8; 2 ceppi (2,90%) hanno dato reazione crociata ai sieri O:8 e O:9 (tabella 5). In tabella 6 viene dettagliata la correlazione tra il biotipo ed il sierotipo dei ceppi di *Y. enterocolitica* isolati. Nello specifico, 17 ceppi di *Y. enterocolitica* biotipo 1A sono risultati non agglutinanti (N.A.); 1 ceppo di *Y. enterocolitica* biotipo 1A ha reagito con il siero O:1,2; 9 ceppi di *Y. enterocolitica* biotipo 1A hanno reagito con il siero O:5; 5 ceppi di *Y. enterocolitica* biotipo 1A hanno reagito con il siero O:8. Nessun ceppo di *Y. enterocolitica* 1A ha reagito con i sieri O:3 e O:9. Tutti i ceppi identificati come *Y. enterocolitica* biotipo 4 sono risultati positivi al siero O:3. Gli esiti della tipizzazione sierologica condotta sugli stipti di *Y. frederiksenii*, *Y. mollaretii*, *Y. bercovieri*, *Y. kristensenii* e *Y. intermedia* non sono stati riportati, in quanto irrilevanti in questo studio.

**Tabella 3. Biotipizzazione dei ceppi di *Yersinia* spp.**  
**Table 3. Characterization of *Yersinia* spp. strains**

SIGLA	<i>Y. enterocolitica</i> 1A	<i>Y. enterocolitica</i> 4	<i>Y. frederiksenii</i>	<i>Y. bercovieri</i>	<i>Y. mollaretii</i>	<i>Y. intermedia</i>	<i>Y. kristensenii</i>
TW80	+	-	+/-	-	-	+	+/-
ESC	+	-	+	+/-	+/-	+	+/-
PYR	+	-	+	+	+	+	+
IND	+	-	+/-	-	-	+	+/-
SAL	+	-	+	+/-	+/-	+	-
SOR	+	+	+	-	+	+	+
TRE	+	+	+	+	+	+	+
XIL	+	-	+	+	+	+	+
NIT	+	+	+	+	+	+	+
ORN	+	+	+	+	+	+	+
VP	+	+	+	-	-	+	-
MEL	-	-	-	-	-	+/-	-
RAF	-	-	-	-	-	+/-	-
RHA	-	-	+	-	-	+/-	-
SAC	+	+	+	+	+	+	-
MUC	-	-	+	+	+	+	+/-

**Tabella 4. Specie di *Yersinia* spp. isolate**  
**Table 4. *Yersinia* spp. strains**

Specie	Freq.	Percent. (%)	Cum.
<i>Y. bercovieri</i>	2	2.90	2.90
<i>Y. enterocolitica</i> 1A	32	46.38	49.28
<i>Y. enterocolitica</i> 4	5	7.25	56.52
<i>Y. frederiksenii</i>	23	33.34	89.86
<i>Y. intermedia</i>	1	1.45	91.30
<i>Y. kristensenii</i>	1	1.45	92.75
<i>Y. mollaretii</i>	5	7.25	100.00
Totale	69	100.00	

**Tabella 5. Sierotipi di *Yersinia* spp. identificati**  
**Table 5. *Yersinia* spp. serotypes**

Specie	Freq.	Percent. (%)	Cum.
N.A.	35	50.72	50.72
O:1,2	2	2.90	53.62
O:1,2-O:3	2	2.90	56.52
O:3	14	20.29	76.81
O:5	9	13.04	89.86
O:8	5	7.25	97.10
O:8-O:9	2	2.90	100.00
Totale	69	100.00	

**Tabella 6.** Sierotipizzazione di *Y. enterocolitica*  
**Table 6.** Serotyping of *Y. enterocolitica*

<i>Y. enterocolitica</i>	SIEROTIPO						
		NA	O:1,2	O:3	O:5	O:8	O:9
Biotipo	1A	17	1	/	9	5	/
	4	/	/	5	/	/	/

**Determinazione dei fattori di virulenza.** La ricerca dei fattori di virulenza è stata condotta sui 37 ceppi identificati come *Y. enterocolitica*. Come riassunto in tabella 7, un solo ceppo di *Y. enterocolitica* biosierotipo 4/O:3 è risultato positivo al gene plasmidico *yadA* (Figura 1), mentre quattro ceppi di *Y. enterocolitica* biosierotipo 4/O:3 ed un ceppo identificato come *Y. enterocolitica* biosierotipo 1A/O:5 sono risultati positivi al gene cromosomiale *ail* (Figura 2 e 3). La PCR multiplex per la ricerca dei geni cromosomiali *inv*, *ystA*, *ystB* non ha dato risultati attendibili.

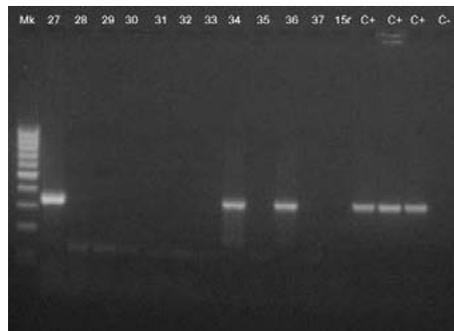
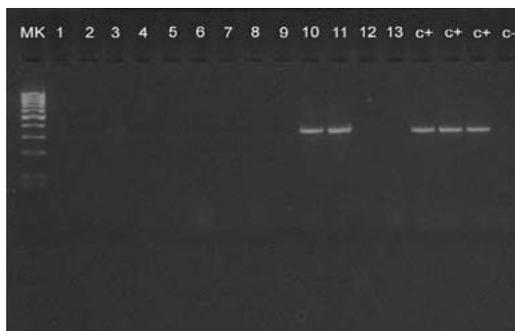
**Figura 1.** PCR positiva per la ricerca del gene *yadA* (238 pb)

**Picture 1.** Positive PCR for the detection of *yadA* gene (238 pb)



**Figura 2 e 3.** PCR positiva per la ricerca del gene *ail* (351 pb)

**Picture 2 and 3.** Positive PCR for the detection of *ail* gene (351 pb)



**Tabella 7.** Esiti ottenuti in PCR per la ricerca dei geni di virulenza

**Table 7.** PCR results for the detection of virulence genes

<i>Y. enterocolitica</i>		Geni di virulenza	
biotipo	sierotipo	<i>yadA</i>	<i>ail</i>
4	O:3	1	4
1A	O:5	negativo	1

## DISCUSSIONE

*Y. enterocolitica* è una specie batterica piuttosto complessa dal punto di vista della classificazione in biotipi e sierotipi. Per questa ragione la biotipizzazione, associata alla sierotipizzazione, sebbene indaginosa, è ancora oggi necessaria per distinguere in maniera chiara stipiti patogeni e non patogeni. Tuttavia, esistono difficoltà in ambito diagnostico, legate soprattutto alla fase di isolamento del microrganismo. In questo studio, la bassa percentuale di ceppi patogeni di *Y. enterocolitica* 4/O:3 (7,25%) e l'assenza di isolati appartenenti al biosierotipo 2/O:9, in contrasto con l'elevata percentuale di stipiti non patogeni riferibili al biotipo 1A (46,38%) ed alle specie di origine ambientale (46,39%), è imputabile in primo luogo al mancato prelievo delle amigdale, sede d'elezione per la ricerca dei biosierotipi patogeni. Inoltre, l'utilizzo dell'arricchimento a freddo in fase di isolamento, che sfrutta la capacità di *Y. enterocolitica* di crescere a 4°C, sebbene ampiamente utilizzato, presenta limiti notevoli, quali i lunghi tempi di risposta e soprattutto la capacità di favorire la crescita di stipiti non patogeni. In bibliografia, sono state, quindi, proposte metodiche alternative che prevedono l'isolamento a partire da uno striscio diretto del campione su terreni selettivi CIN o SSDC (Salmonella-Shigella Deoxycholate Calcium chloride) (18) e l'impiego di brodi di arricchimento (Peptone Sorbitolo e Sali Biliari PSB, Irgasan, Ticarcillina, Chlorate ITC, bile-ossalato-sorbosio BOS) posti ad incubare a temperature più elevate (22-25°C), al fine di migliorare la sensibilità analitica soprattutto nei confronti degli stipiti patogeni di *Y. enterocolitica* presenti in un campione policontaminato (2).

L'applicazione di protocolli PCR per la ricerca del gene plasmidico *yadA* e per i geni cromosomiali *ail*, *inv*, *ystA*, *ystB* ha permesso di valutare i caratteri di virulenza dei ceppi di *Y. enterocolitica* isolati dai suini. La presenza del gene *yadA*, principale indicatore di patogenicità, in un solo ceppo di *Y. enterocolitica* 4/O:3 è spiegabile in quanto il plasmide è un elemento genetico instabile, che viene facilmente perso dal microrganismo sottoposto a ripetute semine su terreni colturali. La mancata rilevazione del gene *yadA* non deve quindi essere interpretata come assenza di patogenicità del ceppo in esame, ma come un possibile esito falsamente negativo (19; 2). Il rilevamento del gene *ail* negli altri 4 stipiti di *Y. enterocolitica* 4/O:3 conferma quanto stabilito da altri autori, secondo i quali la presenza di tale frammento cromosomiale è un buon indicatore della patogenicità (13; 16; 20). La presenza del gene *ail* in un ceppo di *Y. enterocolitica* 1A/O:5 indica, invece, la possibile presenza di mutazioni inattive nel genoma di stipiti non patogeni.

L'applicazione della PCR multiplex per la ricerca dei geni di virulenza *inv*, *ystA* e *ystB* ai ceppi isolati in questo studio non ha permesso di affermare con certezza se gli stipiti patogeni biosierotipo 4/O:3 e i non patogeni biosierotipo 1A presentassero o meno tali geni.

## CONCLUSIONI

I risultati ottenuti in questo studio servono essenzialmente per approfondire le conoscenze sulle caratteristiche dei ceppi di *Y. enterocolitica* isolati dal contenuto intestinale di suini macellati nel nostro paese, con particolare riferimento alla determinazione dei caratteri associati alla virulenza. Tuttavia si ritiene indispensabile la stesura di protocolli di isolamento più sensibili che, affiancati a metodiche di biologia molecolare idonee all'individuazione dei geni cromosomiali *inv*, *ystA* e *ystB*, rendano possibile lo studio approfondito dei caratteri di patogenicità di tali microrganismi. Tali strumenti migliorerebbero le potenzialità diagnostiche e renderebbero più semplice lo studio di eventuali focolai tossinfettivi di yersiniosi umana dovuti al consumo di prodotti carnei di origine suina.

## RINGRAZIAMENTI

Si rivolge un particolare ringraziamento al personale tecnico del Reparto di Batteriologia dell'IZSLER per il supporto e la collaborazione offerta.

Questa indagine sperimentale è stata condotta nell'ambito del Progetto di Ricerca Corrente PRC2007007 "Indagine sui principali patogeni enterici del suino in accrescimento con potenziale risvolto zoonosico", in corso presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia ed Emilia Romagna (IZSLER).

## BIBLIOGRAFIA

1. EFSA (European Food Safety Authority) (2009). Technical specifications for harmonised national surveys on *Yersinia enterocolitica* in slaughter pigs. *EFSA Journal*, **7** (11): 1374
2. Savin C., Carniel E. (2008). Les diarrhées d'origine bactérienne: le cas de *Yersinia enterocolitica*. *Revue Francophone des Laboratoires*, **400**: 49-58
3. Andersen J.K., Sørensen R., Glensbjerg M. (1991). Aspect of the epidemiology of *Yersinia enterocolitica*: a review. *Int. J. Food Microbiol.*, **13**: 231-238
4. de Boer E., Nouws J.F.M. (1991). Slaughter pigs and pork as a source of human pathogenic *Yersinia enterocolitica*. *Int. J. Food Microbiol.*, **12**: 375-378
5. Fredriksson-Ahomaa M., Hallanvuo S., Korte T., Siitonen A., Korkeala H. (2001). Correspondence of genotypes of sporadic *Yersinia enterocolitica* bioserotype 4/O:3 strains from human and porcine source. *Epidemiol. Infect.*, **127**: 37-47
6. Bowman A.S., Glendening C., Wittum T.E., LeJeune J.T., Stich R.W., Funk J.A. (2007). Prevalence of *Yersinia enterocolitica* in different phases of production on swine farms. *J. Food Prot.*, **70** (1): 11-16
7. Laukkanen R., Ortiz Marti P., Siekkinen K.M., Ranta J., Maijala R., Korkeala H. (2009). Contamination of carcasses with human pathogenic *Yersinia enterocolitica* 4/O:3 originates from pigs infected on farms. *Foodborne Pathog. Dis.*, **6** (6): 681-688
8. Wauters G., Kandolo K., Janssens M. (1987). Revised biogrouping scheme of *Yersinia enterocolitica*. In: *Contrib. Microbiol. Immunol.* Karger, Basel 1987, **9**: 14-21
9. China B., Sory M.P., N'Guyen B.T., De Bruyere M., Cornelis G.R. (1993). Role of YadA protein in prevention of opsonization of *Yersinia enterocolitica* by C3b molecules. *Infect. Immun.*, **61** (8): 3129-3136
10. Cornelis G.R., Boland A., Boyd A.P., Geuijen C., Iriarte M., Neyt C., Sory M.P., Stainier I. (1998). The virulence plasmid of *Yersinia*, an antihost genome. *Microbiol. Molec. Biol. Rev.*, **62** (4): 1315-1352
11. Biedzka-Sarek M., Venho R., Skurnik M. (2005). Role of YadA, Ail, and lipopolysaccharide in serum resistance of *Yersinia enterocolitica* serotype O:3. *Infect. Immun.*, **73** (4): 2232-2244
12. Grass I.G.A., Bohn E., Müller Y., Bühler O.T., Autenrieth I.B. (2003). Interaction of *Yersinia enterocolitica* with epithelial cells: invasion beyond invasion. *Int. J. Med. Microbiol.*, **293** (1): 41-54
13. Bliska J.B., Falkow S. (1992). Bacterial resistance to complement killing mediated by the Ail protein of *Yersinia enterocolitica*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**: 3561-3565
14. Delor I., Kaeckenbeek A., Wauters G., Cornelis G.R. (1990). Nucleotide sequence of *yst*, the *Yersinia enterocolitica* encoding the heat-stable enterotoxin, and the prevalence of the gene among pathogenic and non-pathogenic *Yersinia*. *Infect. Immun.*, **58**: 2983-2988
15. Ramamurthy T., Yoshino K., Huang X., Balakrish Nair G., Carniel E., Maruyama T., Fukushima H., Takeda T. (1997). The novel heat-stable enterotoxin subtype gene (*ystB*) of *Yersinia enterocolitica*: nucleotide sequence and distribution of the *yst* genes. *Microb. Pathog.*, **23**: 189-200

16. Blais B.W., Phillippe L.M. (1995). Comparative analysis of *yadA* and *ail* polymerase chain reaction methods for virulent *Yersinia enterocolitica*. *Food Control*, **6** (4): 211-214
17. Thoerner P., Kingombe C.I.B., Bögli-Stuber K., Bissig-Choisat B., Wassenaar T.M., Frey J., Jemmi T. (2003). PCR detection of virulent genes in *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis* and investigation of virulence gene distribution. *Appl. Environ. Microbiol.*, **69** (3): 1810-1816
18. Van Damme I., Habib I., De Zutter L. (2010). *Yersinia enterocolitica* in slaughter pig tonsils: enumeration and detection by enrichment versus direct plating culture. *Food Microbiol.*, **27**: 158–161
19. Fredriksson-Ahomaa M., Korkeala H. (2003). Low occurrence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in clinical, food and environmental samples: a methodological problem. *Clin. Microbiol. Rev.*, **16** (2): 220-229
20. Platt-Samoraj A., Ugorski M., Szweda W., Szczerba-Turek A., Wojciech K., Procajlo Z. (2006). Analysis of the presence of *ail*, *ystA* and *ystB* genes in *Yersinia enterocolitica* strains isolated from aborting sows and aborted fetuses. *J. Vet. Med. B.*, **53**: 341-346