

PRESENZA DI *ESCHERICHIA COLI* O157:H7 IN LATTE OVINO PRODOTTO IN TOSCANA

ESCHERICHIA COLI O157:H7 DETECTION IN TUSCAN EWES' MILK

ROBERTA NUVOLONI ⁽¹⁾, FRANCESCA PEDONESE ⁽¹⁾, NOEMI DI NARDO ⁽²⁾,
BRUNO GERARDO ⁽¹⁾

RIASSUNTO

Escherichia coli O157:H7 è un sierotipo enteroemorragico responsabile di colite emorragica e sindrome emolitico-uremica nell'uomo. La principale via di trasmissione del patogeno si realizza attraverso il consumo di alimenti di origine animale ed in particolare di origine bovina. Per quanto riguarda il latte ed i prodotti derivati è ormai noto il ruolo del latte vaccino non pastorizzato nella trasmissione dell'infezione, mentre non esistono segnalazioni di casi provocati da consumo di latte ovino e derivati. Tuttavia l'isolamento di *E. coli* O157:H7 da latte ovino è stato effettuato anche in Italia, seppure con percentuali di positività molto basse. In considerazione del fatto che in Toscana esiste una notevole tradizione di produzioni lattierocasearie a latte crudo, è stata effettuata una ricerca con una metodica di immunoseparazione magnetica al fine di valutare la presenza di *E. coli* O157:H7 in 60 campioni di latte di massa proveniente da altrettante greggi della provincia di Pisa, dove la mungitura viene effettuata manualmente. Nessuno dei campioni in esame ha evidenziato la presenza di *E. coli* O157:H7. Nonostante il ridotto numero di campioni esaminati non permetta di trarre conclusioni statisticamente significative, il mancato isolamento di *E. coli* O157:H7 da campioni di latte ovino può essere considerato comunque interessante, vista la scarsità di dati reperibili in bibliografia sul ruolo epidemiologico svolto da questo prodotto.

Parole chiave: *Escherichia Coli* O157:H7, latte ovino, immunoseparazione magnetica.

SUMMARY

Escherichia coli O157:H7 is an enterohemorrhagic strain that has developed the ability to cause serious gastrointestinal and systemic disease in humans, such as hemorrhagic colitis, haemolytic uremic syndrome and thrombocytopenic purpura. An increasing variety of foods of animal origin has been associated with outbreaks involving this microorganism. Cattle are a major reservoir of *E. coli* O157:H7 and an important source

⁽¹⁾Dipartimento di Patologia Animale, Profilassi ed Igiene degli Alimenti, Direttore Prof. Giovanni Braca.

⁽²⁾ Collaboratore esterno.

Il lavoro spetta in parti uguali agli Autori.

of human infection. Undercooked ground beef and unpasteurised cow milk are considered to be common vehicles of the pathogen transmission, whereas no cases related to consumption of ewes' milk or cheese are reported. However the isolation of *E. coli* O157:H7 from ewes' milk has been registered also in Italy, even if rarely. Considering that in Tuscany typical cheeses and dairy products are often prepared with raw ewes' milk, a research was carried out in order to evaluate the presence of *E. coli* O157:H7. Sixty samples of raw milk from sheep herds of the province of Pisa, where manual milking is prevalent, were analysed using an immunomagnetic separation method. No colonies of *E. coli* O157:H7 were isolated from the samples. In spite of the restricted number of samples, our findings are interesting because the epidemiological role of ewe's milk remains to be established.

Key words: *Escherichia Coli* O157:H7, ewes' milk, immunomagnetic separation.

INTRODUZIONE

Negli ultimi anni, tra i batteri patogeni emergenti, hanno acquisito particolare importanza gli *Escherichia coli* produttori di verocitotossine (VTEC), causa di colite emorragica (CE) e sindrome emolitico-uremica (SEU) nell'uomo.

Il primo ceppo VTEC ad essere associato a malattia enterica fu il sierotipo O157:H7 nel 1982 (Riley et al., 1983; Wells et al., 1983). Successivamente sono stati isolati altri sierotipi VTEC responsabili di malattia nell'uomo (Bocchietto et al., 1998; Bonardi et al., 2000 a).

Le infezioni da *E. coli* VTEC sono un tipico esempio di malattie enteriche trasmesse dagli alimenti; ormai segnalate in tutte le parti del mondo, costituiscono oggi un serio problema di salute pubblica. Negli Stati Uniti l'incidenza dei casi di infezione da *E. coli* O 157:H7 è di circa 20.000 l'anno, con 100-200 casi mortali. Il 40% degli episodi è dovuto al consumo di carne macinata (hamburger), mentre i restanti casi sono attribuiti a latte e succhi di frutta non pastorizzati, yogurt, prodotti a base di carne e verdure (Caserio & Caserio, 2001).

In Italia fin dal 1988 è stato attivato un sistema di sorveglianza nazionale delle infezioni da VTEC e dal 1988 al 1998 sono stati registrati 180 casi di infezione, per lo più dovuti al sierogruppo O157, ma anche ai sierogruppi O26, O111 e O103 (Bonardi et al., 2000 a). Nei primi anni '90 sono stati segnalati due focolai epidemici di SEU da *E. coli* O 157 e O111, ma in entrambi i casi non è stato individuato l'alimento sospetto (Caprioli et al., 1994; Tozzi et al., 1994). Sempre nel

nostro Paese, in occasione di alcuni casi di SEU, è stato possibile risalire anamnesticamente al consumo di carne macinata nei dieci-quindici giorni precedenti la comparsa dei sintomi, senza tuttavia avere la certezza del legame epidemiologico con l'infezione da VTEC (Caprioli et al., 1990; Caprioli et al., 1994).

Poiché il bovino rappresenta il principale serbatoio naturale del germe a livello intestinale, gli alimenti di origine bovina sono ritenuti la principale fonte di contagio per l'uomo, come dimostrano numerose ricerche epidemiologiche (Borczyk et al., 1987).

Scarse sono invece le indagini volte ad evidenziare questo microrganismo in altre specie animali e nei loro prodotti derivati. *E. coli* O 157:H7 è stato isolato da suini, pecore, uccelli ed altri animali (Nataro & Kaper, 1998). Molti Autori riportano l'isolamento di tale microrganismo dal contenuto intestinale di pecore e capre (Beutin et al., 1996; Chapman et al., 1996; Kudva et al., 1997). In Italia Pepe et al. (1998) hanno evidenziato la presenza di *E. coli* O 157:H7 nel 2,9% delle carcasse ovine esaminate, confermando le percentuali di positività già riscontrate da altri Autori negli USA ed in altri Paesi europei (Doyle & Schoeni, 1987; Heuvelink et al., 1998).

Per quanto riguarda il latte ed i prodotti derivati è ormai noto il ruolo del latte vaccino non pastorizzato, più volte implicato nella trasmissione dell'infezione (CDCS, 1998; CDCS, 1999; Allerberger et al., 2001). Una delle prime segnalazioni risale ad un focolaio di tossinfezione da *E. coli* O157:H7 dovuto all'ingestione di latte crudo somministrato ad un bambino in età prescolare in visita ad una fattoria, dalle cui vacche da latte fu isolato lo stesso fagotipo epidemico (Borczyk et al., 1987). Nel 1999 l'11% dei casi totali di infezioni da *E. coli* O157:H7 segnalati in Inghilterra e Galles sono stati provocati da consumo di prodotti lattiero-caseari a base di latte vaccino non pastorizzato (CDCS, 2000). In Italia Bonardi et al. (1998), in un'indagine per la ricerca di tale microrganismo nel latte vaccino destinato alla produzione del Parmigiano Reggiano ed in altri prodotti a base di latte (panna di affioramento e burro), hanno isolato un solo ceppo di *E. coli* O157:H7 (pari allo 0,8% dei campioni esaminati), sprovvisto di geni per la codificazione delle verocitotossine e per l'adesione alle cellule dell'epitelio intestinale, quindi uno stipite apatogeno. Nel corso di una seconda indagine, mirata alla ricerca di microrganismi patogeni nel latte bovino crudo e nella panna di affioramento, sono

stati esaminati per *E. coli* O157:H7 80 campioni risultati tutti negativi (Bonardi et al., 2000 b). Altre indagini svolte nel nostro Paese hanno portato all'isolamento di ceppi verocitotossici dai filtri del latte, ma non dal latte bovino crudo (Amisano et al., 1997).

Anche il latte di capra ed i prodotti caseari derivati sono stati talvolta associati all'insorgenza di tossinfezione da *E. coli* O157:H7 nell'uomo (Bielaszewska et al., 1997; Caprioli & Tozzi, 1998; Allerberger et al., 2001), mentre ad oggi non esistono segnalazioni di casi provocati da consumo di latte ovino e suoi derivati. In Grecia Dontorou et al. (2003), nel corso di un'indagine volta a verificare la presenza di tale microrganismo in alcuni prodotti di origine animale, hanno isolato un ceppo di *E. coli* O157:H7 verocitotossico da latte ovino (pari all'1% dei campioni esaminati). Infine è importante segnalare i risultati di un'indagine condotta da Rubini et al. (1999) in latte ovino prodotto nel Lazio. Dai 314 campioni di latte esaminati sono stati isolati 2 ceppi di *E. coli* O157:H7, entrambi provvisti di gene codificante l'adesione alle cellule epiteliali intestinali (*eae* gene), uno produttore di verocitossina 1 (VT1) e verocitossina 2 (VT2), appartenente al fagotipo 21 e l'altro produttore di sola VT2, appartenente al fagotipo 4.

Il riscontro di *E. coli* O157:H7 nel latte ovino, oltre a confermare il ruolo di questa specie come serbatoio di tale microrganismo, introduce il problema della possibile contaminazione dei prodotti lattiero-caseari tradizionali italiani, frequentemente preparati proprio a partire da latte crudo. La necessità di svolgere ulteriori indagini sulla presenza di *E. coli* O157:H7 nel latte ovino è motivata anche dal fatto che alcuni studi sperimentali hanno dimostrato la sua capacità di sopravvivere al pH acido di alcuni prodotti lattiero-caseari fermentati (Massa et al., 1997), durante la lavorazione in un formaggio fresco spagnolo (Kasrazadeh & Genigeorgis, 1995) e nel Cheddar dopo 60 giorni di maturazione (Reitsma & Henning, 1996).

Al fine di contribuire ad una valutazione della reale situazione epidemiologica nel nostro Paese approfondendo le conoscenze sul ruolo svolto dal latte ovino nella diffusione di *E. coli* O157:H7, abbiamo ritenuto interessante verificare la presenza di tale microrganismo nel latte prodotto da alcune greggi della provincia di Pisa.

MATERIALI E METODI

Sono stati analizzati 60 campioni di latte ovino di massa provenienti da altrettante greggi di razza Sarda e Massese della provincia di Pisa. Presso la maggior parte delle aziende prese in esame la mungitura viene effettuata manualmente.

Per la ricerca di *Escherichia coli* O157, 25 ml di latte di ogni campione sono stati aggiunti a 225 ml di modified-Tryptone Soya Broth (Oxoid, Basingstoke, England) contenente novobiocina (20 mg/l) e posti ad incubare a 37°C per 20-24 ore. È stata quindi prelevata un'aliquota pari a 1 ml di brodocoltura, che è stata addizionata a 20 µl di Dynabeads® M-280 anti-*E. coli* O157 (Dynal, Oslo, Norway) e sottoposta a separazione immunomagnetica utilizzando il rotore magnetico Dynal® Sample Mixer MX-3 e il concentratore magnetico Dynal MPC®-E-1. Il complesso finale Dynabeads®-microrganismi, ottenuto secondo le indicazioni del produttore, è stato sospeso in 100 µl di PBS-Tween e seminato per strisciamento su Sorbitol Mac Conkey Agar addizionato di Cefixime-Tellurite Supplement (SMAC-CT) (Oxoid) e su Sorbitol Mac Conkey Agar addizionato di acido 5-bromo-4-cloro-3-indolil-, -D-glucuronico (SMAC-BCIG) (Oxoid) con incubazione a 37°C per 18-20 ore. Su entrambi i terreni sono state considerate presuntivamente riferibili a *E. coli* O157 le colonie incolori sorbitolo- e -,glucuronidasi-negative. Tali colonie sono state sottoposte alla prova di Mackenzie con reattivo di Kovacs previa incubazione a 37°C per 48 ore in Tryptose Broth (Oxoid). Gli stipiti risultati indolo-positivi (*E. coli*) sono stati successivamente sottoposti alla prova di agglutinazione al lattice con Dry Spot *E. coli* O157 Latex Test (Oxoid) e infine nel caso di positività a questa prova, al saggio con il siero anti-H7 (*E. coli* H Antiserum H7, Difco Laboratories, Detroit, MI, USA).

Come controllo positivo è stato impiegato il ceppo ATCC 35150 di *E. coli* O157:H7 (Oxoid).

RISULTATI E DISCUSSIONE

Dei 60 campioni in esame, 23 (38,3%) hanno evidenziato sviluppo di colonie sospette per *E. coli* O157:H7.

In seguito all'esecuzione dei test di conferma, tutti i campioni si sono però dimostrati negativi in quanto nessuna delle colonie è risultata appartenere al sierotipo O157:H7.

Nonostante il ridotto numero di campioni esaminati non permetta di trarre conclusioni statisticamente significative, il mancato isolamento di *E. coli* O157:H7 da campioni di latte ovino può essere considerato comunque interessante, vista la scarsità di dati reperibili in bibliografia sul ruolo epidemiologico svolto da questo prodotto. Si deve infatti ricordare che esistono solo due segnalazioni, in Italia ed in Grecia, relative all'isolamento di *E. coli* O157:H7 da latte ovino, oltretutto con percentuali di positività estremamente basse; inoltre altre indagini per la ricerca di tale microrganismo nel latte ovino hanno avuto esito negativo (Little & De Louvois, 1999; Rubini et al., 1999; Dontorou et al., 2003).

È importante sottolineare che il latte ovino ed i suoi derivati non sono mai stati riconosciuti responsabili della trasmissione di tale microrganismo all'uomo. L'assenza di casi di tossinfezione da *E. coli* O157:H7 da consumo di latte ovino e derivati potrebbe essere collegata sia alle basse percentuali di contaminazione del latte, sia alla mancata sopravvivenza del microrganismo nei prodotti derivati.

Nella filiera latte il principale fattore di controllo per questo microrganismo è sicuramente rappresentato dal trattamento di pastorizzazione, che se correttamente eseguito, è in grado di distruggere sia il batterio che le sue tossine. Per il latte ovino si deve però considerare il fatto che, soprattutto nella nostra Regione, sono molto diffusi i prodotti artigianali a base di latte crudo; in questi formaggi dovrebbe essere valutata la resistenza del microrganismo durante le varie fasi di produzione.

Un altro fattore da considerare riguarda le metodiche utilizzate per il rilevamento del microrganismo oggetto dell'indagine. Infatti, come è stato evidenziato da alcuni Autori, i tradizionali metodi microbiologici in alcuni casi non hanno permesso di evidenziare *E. coli* O157:H7 da campioni di origine ovina (carne, formaggi), risultati invece positivi con l'impiego di metodiche più sensibili, che consentono di evidenziare basse concentrazioni del patogeno in presenza di livelli elevati di contaminazione (Pepe et al., 1998).

Da quanto sopra esposto emerge che solo ulteriori indagini potranno effettivamente chiarire il ruolo epidemiologico del latte ovino e dei suoi derivati nella trasmissione di *E. coli* O157:H7 all'uomo.

BIBLIOGRAFIA

- ALLERBERGER F., WAGNER M., SCHWEIGER P., RAMMER H.P., RESCH A., DIERICH M.P., FRIEDRICH A.W., KARCH H. (2001). Infezioni da *E. coli* O157:H7 e latte non pastorizzato. *Eurosurveillance Month.*, 6: 147-151.
- AMISANO G., CAMELLO S., PIOVANO B. (1997). *E. coli* O157:H7 in milk filters. *Notiziario I.S.S.*, 10 (3) (Suppl. 1): 3.
- BEUTIN L., KNOLLMANN-SCHANBACHER G., RIETSSCHEL W., SEEGER H. (1996). Animal Reservoirs of *E. coli* O157:H7. *Vet. Rec.*, 139: 70-71.
- BIELASZEWSKA M., JANDA J., BLAHOVA K., MINARIKOVA H., JIKOVA E., KARMALI M.A., et al. (1997). Human *E. coli* O157:H7 infection associated with the consumption of unpasteurized goat's milk. *Epidemiol. Infect.*, 119: 299-305.
- BOCCHIETTO E., CANTONI C., MAROSSÌ L., MILANESI A. (1998). Ricerca di *E. coli* O157:H7 e di sierogruppi contenenti il gene eae mediante PCR. *Ind. Alim.*, 37: 1401-1405.
- BONARDI S., BOTTARELLI A., ZARENGHI L., FONI E., MORABITO S., MAGGI E. (1998). Isolamento di *E. coli* O157:H7 e O111 in prodotti lattiero-caseari di origine bovina. *Atti VIII Conv. Naz. A.I.V.I.*, 8: 277-280.
- BONARDI S., CHIAVARO E., MAGGI E. (2000 a). Confronto tra IMS e VIDAS-ICE per la ricerca di *E. coli* O157:H7 in latte e panna. *Ind. Alim.*, 39: 1123-1126.
- BONARDI S., PIZZIN G., LUCIDI L., ZARENGHI L. (2000 b). Ricerca di Salmonella enterica, Listeria spp. ed *E. coli* O157:H7 in latte crudo e panna non pastorizzata in provincia di Parma. *Atti S.I.S. Vet.*, 56: 347-348.
- BORCZYK A.A., KARMALI M.A., LIOR H., DUNCAN L.M.C. (1987). Bovine reservoir for verotoxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. *Lancet*, 1: 98.
- CAPRIOLI A., EDEFONTI A., BACCHINI M., LUZZI I., ROSMINI F., GIANVITI A., MATTEUCCI M.C., PASQUINI P. (1990). Isolation in Italy of a Verotoxin-producing strain of *E. coli* O157:H7 from a child with haemolytic-uraemic syndrome. *Eur. J. Epidemiol.*, 6: 102-104.
- CAPRIOLI A., LUZZI I., ROSMINI F., RESTI C., EDEFONTI A., PERFUMO F., FARINA C., GOGLIO A., GIANVITI A., RIZZONI G. (1994) Community-wide outbreak of haemolytic-uraemic syndrome associated with non Verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.*, 169: 208-211.
- CAPRIOLI A., TOZZI A.E. (1998). *E. coli* O157 and other shiga toxin-producing *E. coli*. ASM Press, Washington DC, 38.
- CASERIO G., CASERIO S. (2001). Presenza di *E. coli* O157:H7 in prodotti alimentari. *Ind. Alim.*, 40: 27-28.
- CDCS (1998). Communicable disease report. *CDR Weekly*, 8 (19): 167.
- CDCS (1999). Communicable disease report. *CDR Weekly*, 9 (13): 116.
- CDCS (2000). Communicable disease report. *CDR Weekly*, 10 (19): 171.
- CHAPMAN P.A., SIDDON C.A., MALO A.T., HARKIN M.A. (1996). Lamb products as a potential source of *E. coli* O157. *Vet. Rec.*, 139 (17): 427-428.
- DONTOROU C., PAPADOPOULOU C., FOLIOUSSIS G., ECONOMOU V., APOSTOLOU I., ZAKKAS G., SALAMOURA A., KANSOUZIDOU A., LEVIDIOU S. (2003). Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from foods in Greece. *Intern. J. Food Microbiol.*, 82 (3): 273-279.

- DOYLE M.P., SCHOENI J.L. (1987). Isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from retail fresh meats and poultry. *Appl. Environ. Microbiol.*, 53 (10): 2394-2396.
- HEUVELINK A.E., VAN DEN BIGGELAAR F.L.A.M., de BOER E., HERBES R.G., MELCHERS W.J.G., HUIS in Tveld J.H.J., MONNENS L.A.H. (1998). Isolation and characterization of Verocytotoxin-producing *E. coli* O157 strains from Dutch cattle and sheep. *J. Clin. Microbiol.*, 36: 878-882.
- KASRAZADEH M., GENIGEORGIS C. (1995). Potential growth and control of *Escherichia coli* O157:H7 in soft hispanic type cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, 25 (3): 289-300.
- KUDVA I.T., HATFIELD P.G., HOVDE C.J. (1997). Characterization of *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga toxin-producing *E. coli* serotypes isolated from sheep. *J. Clin. Microbiol.*, 35 (4): 892-899.
- LITTLE C.L., DE LOUVOIS J. (1999). Health risks associated with unpasteurized goats' and ewes' retail sale in England and Wales. A PHLS Dairy Products Work Group Study. *Epidemiol. Infect.*, 122 (3): 403-408.
- MASSA S., ALTIERI C., QUARANTA V., DE PACE R. (1997). Survival of *E. coli* O157:H7 in yoghurt during preparation and storage at 4°C. *Letters Appl. Microbiol.*, 24: 347-350.
- NATARO J.P., KAPER J.B. (1998). Diarrheagenic *E. coli*. *Clin. Microbiol. Rev.*, 11: 142-201.
- PEPE T., DI FINIZIO A., SARLI T.A., CORTESI M.L. (1998). Ricerca di *E. coli* O157:H7 in carcasse ovine. *Atti S.I.S. Vet.*, 56: 373-374.
- REITSMA C., HENNING D. (1996). Survival of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture and curing of Cheddar cheese. *J. Food Protect.*, 59 (5): 460-464.
- RILEY L.W., REMIS R.S., HELGERSON S.D., MCGEE H.B., WELLS J.G., DAVIS B.R., et al. (1983). Haemorrhagic colitis associated with a rare *E. coli* serotype. *N. Engl. J. Med.*, 308: 681-685.
- RUBINI S., CARDETI G., AMITI S., MANNA G., ONORATI R., CAPRIOLI A., MORABITO S. (1999). Verocytotoxin-producing *E. coli* O157:H7 in sheep milk. *Vet. Rec.*, 9: 56.
- TOZZI A.E., NICCOLINI A., CAPRIOLI A., LUZZI I., MONTINI G., ZACCHELLO G., GIANVITI A., PRINCIPE F., RIZZONI G. (1994). A community outbreak of haemolytic-uraemic syndrome in children occurring in a large area of Northern Italy on a period of several months. *Epidemiol. Infect.*, 113: 209-219.
- WELLS J.G., DAVIS B.R., WACHSMUTH I.K., RILEY L.W., REMIS R.S., SOKOLOV R., MORRIS G.K. (1983). Laboratory investigation of haemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *J. Clin. Microbiol.*, 18: 512-520.