

ENTEROBACTER SAKAZAKII: UN PATOGENO
EMERGENTE ASSOCIATO AL CONSUMO DI LATTE
FORMULATO IN POLVERE
PER LA PRIMA INFANZIA (REVIEW)

ENTEROBACTER SAKAZAKII: AN EMERGING PATHOGEN
ASSOCIATED WITH CONSUMPTION OF POWDERED INFANT
FORMULA (REVIEW)

FRANCESCA PEDONESE ⁽¹⁾, LINDA SARTINI ⁽²⁾, ROBERTA NUVOLONI ⁽¹⁾,
CARLO D'ASCENZI ⁽¹⁾, SALVO RINDI ⁽¹⁾

RIASSUNTO

Enterobacter sakazakii è un batterio patogeno opportunista responsabile di forme di infezione neonatale (soprattutto meningite ed enterocolite necrotizzante) in molti casi mortali. In base a recenti studi il germe ha dimostrato un'ampia diffusione, essendo stato isolato da svariate categorie di alimenti oltre che da campioni ambientali provenienti da industrie alimentari di vario tipo, da ambiente domestico ed ospedaliero e da insetti, anche se un'associazione diretta tra l'infezione ed il consumo di un alimento è stata più volte dimostrata soltanto nel caso di utilizzo di formulazioni a base di latte in polvere per la prima infanzia. A questo riguardo la presenza di una carica anche modesta del germe in tale tipologia di alimenti è sufficiente a determinare il rischio di infezione in bambini nei primi mesi di vita, soprattutto se nati sotto peso o immunodepressi. L'utilizzo di metodiche di laboratorio che siano in grado di individuare anche la presenza di piccole cariche di *E. sakazakii* nell'alimento va associato ad un ampliamento delle conoscenze relative alle caratteristiche del batterio ed alla sua diffusione nell'ambiente e nelle materie prime utilizzate. In questo lavoro si passano in rassegna i vari studi effettuati sui casi clinici e sulle caratteristiche epidemiologiche, di patogenicità e di resistenza di *E. sakazakii*, con particolare riguardo alle possibilità di sviluppare strategie di controllo del rischio derivante dalla presenza di questo patogeno nel latte formulato in polvere per la prima infanzia.

Parole chiave: *Enterobacter sakazakii*, patogeno alimentare, patogenicità opportunistica, latte formulato in polvere per la prima infanzia.

SUMMARY

Enterobacter sakazakii is a Gram-negative, non-spore-forming bacterium belonging to the *Enterobacteriaceae* Family. This opportunistic pathogen has been associated with sporadic ca-

⁽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.

ses or small outbreaks of sepsis, meningitis and necrotizing enterocolitis especially in neonates and infants, with a mortality rate of 40-80%. The micro-organism has been recently isolated from various food processing environments, foods, hospital equipment, households and also from the guts of insects. On the basis of these findings it appears to be widespread in the environment, however its presence in powdered infant formula milk for use with newborn babies is of particular concern, considering that the association between *E. sakazakii* infection and powdered infant formula consumption has been demonstrated in many cases. Even low levels of *E. sakazakii* in such products can lead to a development of infection, given the potential for multiplication during the preparation and holding time prior to consumption of reconstituted formula. For these reasons further studies are needed to gain a better understanding of the ecology of the organism and of ways to reduce its levels in reconstituted powdered infant formula. In this article the available scientific information on *E. sakazakii* is reviewed with special respect to the public health impact determined by this emerging foodborne pathogen.

Key words: *Enterobacter sakazakii*, foodborne pathogen, opportunistic pathogenicity, milk-based powdered infant formula.

INTRODUZIONE

Enterobacter sakazakii è un bacillo Gram-negativo asporigeno appartenente alla Famiglia delle *Enterobacteriaceae*, patogeno opportunista. Il primo caso di meningite neonatale attribuito a questo germe, inizialmente considerato un ceppo pigmentato di *E. cloacae*, risale al 1961. Da allora il microrganismo è risultato responsabile di un numero crescente sia di casi sporadici che di piccoli focolai di infezione in neonati e bambini nati prematuri. I serbatoi dell'infezione e le modalità di trasmissione necessitano di essere pienamente chiariti, tuttavia rimane innegabile il coinvolgimento delle formulazioni a base di latte in polvere per la prima infanzia, a livello delle quali la presenza di *E. sakazakii* può essere dovuta sia a contaminazioni post-pastorizzazione a livello di industria produttrice che a contaminazioni sopraggiunte al momento della preparazione per il consumo finale del prodotto, anche in considerazione delle caratteristiche di elevata resistenza del germe all'essiccamento e di capacità di produrre biofilm in grado di aderire tenacemente ad utensili e contenitori di uso abituale. A dispetto del ruolo di patogeno occasionale di *E. sakazakii*, la particolare gravità delle manifestazioni cliniche, unita all'alto tasso di mortalità ed alla particolare categoria di pazienti implicata spiegano l'esigenza di mettere in atto rigorose misure di controllo del rischio ad esso correlato. A questo riguardo, vista l'importanza del coinvolgimento di una tipologia alimentare di origine animale nel determinismo dell'infezione, tale problematica di salute pubblica rientra a pieno titolo tra le specifiche competenze del veterinario igienista. In questa sede vengono esposte le conoscenze attuali su *E. sakazakii*, sulla base della letteratura sull'argomento ad oggi pubblicata.

CARATTERISTICHE MICROBIOLOGICHE

I microrganismi appartenenti al Genere *Enterobacter* sono caratterizzati dalla forma

bastoncellare allungata, sono mobili in quanto dotati di flagelli peritrichi, anaerobi facoltativi e generalmente ossidasi negativi, fermentano il glucosio con produzione di acido e gas, sono positivi alla reazione di Voges-Proskauer, alle reazioni della β -glucosidasi e di assimilazione del citrato, negativi al test del rosso metile. La specie tipo del Genere è *E. cloacae*, dal quale *E. sakazakii* si differenzia sul piano fenotipico principalmente per la produzione di una pigmentazione gialla visualizzabile in coltura (Richard, 1984).

Proprio sulla base di tale caratteristica, *E. sakazakii* era stato originariamente ascritto alla specie *E. cloacae* come “*E. cloacae* giallo-pigmentato”. Nel 1984 Farmer e coll. hanno proposto l’elevazione a livello di specie sulla base di differenze individuate con il metodo della DNA ibridazione, oltre che in base a reazioni biochimiche ed appunto alla produzione di colonie giallo-pigmentate.

Le altre caratteristiche biochimiche che possono essere utilizzate per distinguere fenotipicamente le due specie sono rappresentate dall’assenza di attività fermentativa sul D-sorbitolo e dalla mancata produzione di ossidasi e fosfoamidasi da parte di *E. sakazakii*, unitamente alla sua capacità di produrre α -glucosidasi e Tween 80 esterasi ed infine alla presenza di un’attività DNAsica ritardata (Lehner & Stephan, 2004).

Per quanto riguarda la sua coltivazione in laboratorio, *E. sakazakii* cresce facilmente sui comuni terreni di coltura, producendo pigmento giallo in particolare su Trypticase Soy Agar, Brain Heart Infusion Agar e Agar Sangue dopo 24-48 ore di incubazione; il pigmento giallo è più evidente dopo incubazione a 25°C piuttosto che a 37°C. Dopo subcoltura si possono osservare due tipi di colonie morfologicamente diversi: colonie dentellate, rugose e asciutte e colonie lisce. Non è noto se questo diverso aspetto sia correlato a variazioni di virulenza o a differenze fenotipiche o genotipiche (Lehner & Stephan, 2004).

CARATTERISTICHE DI RESISTENZA E FATTORI DI VIRULENZA

Per quanto riguarda la resistenza di *E. sakazakii* alle basse temperature, il limite inferiore di sviluppo è 5,5°C. Questo dato è importante per quanto riguarda la possibilità di moltiplicazione del germe nel latte formulato in polvere conservato mediante refrigerazione in ambiente domestico od ospedaliero, una volta ricostituito, anche se a questa temperatura *E. sakazakii* presenta un tempo di duplicazione piuttosto lungo, quantificato in circa 10 ore (Iversen e coll., 2004b). A temperatura ambiente invece il tempo di duplicazione è risultato di 40 minuti nelle condizioni saggiate da Nazarowec-White e Farber (1997); secondo Havelaar e Zwietering (2004) questi valori sarebbero tali da determinare il rischio di infezione da *E. sakazakii* anche in presenza di cariche iniziali bassissime del germe nel latte ricostituito.

Iversen e coll. (2004b) hanno studiato la capacità di *E. sakazakii* di crescere su vari terreni di coltura non selettivi e in latte in polvere ricostituito a diverse temperature, rilevando in tutti i ceppi esaminati la capacità di svilupparsi in un range tra 6 e 45°C.

Nazarowec-White e Farber (1997) hanno riscontrato in *E. sakazakii* una maggiore

termotolleranza rispetto alla maggior parte delle *Enterobacteriaceae*, anche se in ogni caso non sufficiente a garantirne la sopravvivenza alla pastorizzazione. Breeuwer e coll. (2003) hanno parimenti studiato la resistenza al calore di diversi ceppi di *E. sakazakii*, individuando però un valore D a 58°C pari a 0,39-0,60 minuti, paragonabile a quello di altre *Enterobacteriaceae* e comunque inferiore a quello riportato da Nazarowec-White e Farber (1997).

Dato che *E. sakazakii* non sarebbe capace di sopravvivere alla pastorizzazione, la contaminazione avverrebbe piuttosto durante i processi di disidratazione e confezionamento degli alimenti. A questo riguardo è importante sottolineare che il microrganismo dimostra un'alta resistenza all'essiccamento, in quanto sopravvive anche a bassi valori di a_w quali quelli del latte in polvere, a causa dell'effetto protettivo determinato dal trealosio, che funge da stabilizzante di membrana (Breeuwer e coll., 2003).

Un'altra caratteristica di resistenza fondamentale è la tolleranza allo stress osmotico, studiata dagli stessi Autori testando la capacità di alcuni ceppi di *E. sakazakii* di sopravvivere in presenza di elevate concentrazioni di sorbitolo; in particolare la resistenza risulta massima quando il microrganismo è in fase stazionaria, mentre si riduce quando è in fase di moltiplicazione.

Particolarmente interessante è inoltre la capacità di *E. sakazakii* di produrre una sostanza capsulare viscosa che determina la formazione di una pellicola sulle superfici di attrezzature e recipienti con cui il microrganismo viene a contatto e dove può quindi permanere. A questo riguardo Iversen e coll. (2004b) hanno verificato la capacità di alcuni ceppi di *E. sakazakii* di aderire a superfici di silicone, lattice, policarbonati, acciaio, evidenziando la minore produzione di biofilm sull'acciaio rispetto alle altre superfici, sulle quali quindi il microrganismo aderisce con maggiore facilità. Inoltre i ceppi capsulati, benché non si siano dimostrati i più termoresistenti, almeno in questa prova, si sono rivelati capaci di formare pellicole più dense, con una maggiore concentrazione di cellule batteriche, su silicone, lattice e policarbonati rispetto al ceppo tipo non capsulato. Si tratta di materiali abitualmente usati nella fabbricazione di contenitori e utensili per il latte in polvere e per il prodotto ricostituito, sui quali *E. sakazakii*, già presente nel latte in polvere, può raggiungere cariche notevoli qualora i tempi di contatto siano sufficientemente lunghi.

I fattori di virulenza relativi alla patogenicità di *E. sakazakii* sono poco noti; alcuni ceppi producono sostanze simili ad enterotossine o dimostrano un effetto citotossico. Tuttavia tra i diversi ceppi studiati vi sono differenze sostanziali ed alcuni sembrano privi di caratteristiche correlabili con la patogenicità. Pagotto e coll. (2003) hanno condotto una ricerca sulla produzione di esotossine da parte di *E. sakazakii* in considerazione del fatto che l'infezione si contrae con ogni probabilità per ingestione ed il batterio è geneticamente correlato in maniera stretta con *E. cloacae*, di cui è nota la capacità di produrre esotossine. Le prove per la produzione di enterotossine sono state condotte su tre linee cellulari e su topini lattanti infettati per via orale e per via intraperitoneale; i 18 ceppi di *E. sakazakii* testati, a parte il ceppo type ATCC 29544, provenivano da latte in polvere e da campioni clinici. Sono risultati in grado di produrre enterotossine 3 ceppi su 9 di origine clinica e uno su 8 di origine alimentare; la totalità dei ceppi è risultata letale alla dose di 10^8 unità formanti colonia (UFC)

per soggetto per via intra peritoneale, ma solo due ceppi sono risultati letali per via orale. Ciò può essere spiegato ipotizzando un meccanismo di inattivazione a livello gastrico o intestinale, il che si accorda con la maggiore patogenicità dimostrata da questo batterio nei confronti di neonati, in particolare debilitati e/o prematuri.

DATI EPIDEMIOLOGICI E MANIFESTAZIONI CLINICHE

A partire dal 1961, quando Urmenyi e Franklin riportarono il primo caso riconosciuto di meningite neonatale sostenuta da questo microorganismo, sono stati segnalati vari casi di infezioni neonatali. I microrganismi del genere *Enterobacter* sono comunemente considerati patogeni opportunisti e raramente causano patologie negli individui sani; tuttavia *E. sakazakii* si è reso responsabile di focolai con un alto tasso di mortalità in neonati e bambini nati prematuri (Farber, 2004).

Nazarowec-White e Farber (1997) hanno raccolto i dati relativi alla casistica di infezioni neonatali da *E. sakazakii* registrando casi sporadici e focolai sia in Stati Uniti e Canada che in vari Stati europei. Il numero di casi documentati fino al 2002 (Farber, 2004) non supera la sessantina, tuttavia è assai probabile che la cifra sia notevolmente sottostimata in quanto molti laboratori clinici non effettuano test per questo microorganismo e sistemi ufficiali di controllo non sono applicati in molti Paesi, in particolare in quelli in via di sviluppo, dove l'uso di latte in polvere come sostituto del latte materno è andato crescendo negli ultimi anni.

Dalla casistica delle infezioni da *E. sakazakii*, la popolazione maggiormente a rischio per queste infezioni è costituita da: bambini nati dopo meno di 36 settimane di gestazione, che rimangono ad altissimo rischio fino ad un'età di 4-6 settimane dopo il termine di gravidanza; bambini immunodepressi di qualsiasi età (in particolare sieropositivi per il virus HIV); bambini nati a termine di gravidanza ospedalizzati in unità neonatali intensive.

Riguardo alle forme cliniche, *E. sakazakii* è responsabile di forme gravi di setticemia, meningite neonatale ed enterocolite necrotizzante in neonati prematuri, oltre a sostenere in rari casi forme di batteriemia ed osteomielite in adulti (Center for Food Safety and Applied Nutrition, 2002). Lai (2001) riporta una casistica di infezioni decisamente maggiore in neonati e bambini rispetto agli adulti, nei quali non si segnalano casi mortali e interessamento del sistema nervoso centrale, che invece avviene nei neonati, nei quali *E. sakazakii* dimostra uno spiccato tropismo per il sistema nervoso centrale le cui basi non sono state ancora spiegate. Frequentemente si osserva meningite esitante in ventricolite, ascessi cerebrali e formazione di cisti, con sviluppo di idrocefalo. Il tasso di mortalità riportato si aggira sul 40-80% e spesso i bambini giungono a morte entro pochi giorni; in molti casi i soggetti sopravvissuti presentano gravi conseguenze neurologiche quali idrocefalo, tetraplegia, ritardo nello sviluppo neurologico (Farber, 2004). Un'altra manifestazione clinica dell'infezione neonatale consiste nello sviluppo di colite necrotizzante, anch'essa conseguente al consumo di latte in polvere ricostituito e caratterizzata da necrosi intestinale

e *pneumosis intestinalis* (Lehner & Stephan, 2004), in alcuni casi associata alla meningite (Muytjens e coll., 1988).

Himehright e coll. (2002), in base al programma di sorveglianza U.S. FoodNet 2002 sulle infezioni sostenute da *E. sakazakii* in bambini sotto un anno di età, stimano la casistica di infezione in 1 su 100.000 soggetti, mentre nei bambini nati sotto peso si arriva a 8,7 su 100.000 soggetti.

FONTI E MODALITÀ DI TRASMISSIONE

Le fonti e le modalità di trasmissione di questo microrganismo non sono ad oggi completamente chiarite. Dal momento che *E. sakazakii* non è un normale abitante della flora intestinale degli animali e dell'uomo, si suppone una diffusione soprattutto a livello ambientale, nelle acque, nei vegetali, nel suolo, trasportato da insetti e roditori; da queste fonti potrebbe giungere a contaminare gli alimenti (Iversen & Forsythe, 2003). Come riportato da Kandhai e coll. (2004), tuttavia, *E. sakazakii* non è stato isolato da acque di superficie, suolo, fango, legno in decomposizione, granaglie, letame di avicoli, roditori, bovini, latte bovino non trattato, ma da miscelatori e spazzole per la pulizia dei contenitori per il latte, oltre che da vari alimenti, come formaggi, carne macinata, salsicce, verdura. Inoltre gli stessi Autori hanno isolato il germe da campioni ambientali provenienti da diverse industrie alimentari (produttrici di latte in polvere, cioccolato, cereali, farina di patate, pasta, spezie) e da ambiente domestico; esso è stato infine reperito a livello di apparato digerente di insetti (Hamilton e coll., 2003).

Il batterio è stato anche isolato da feci ed urine di neonati asintomatici (WHO, 2004), mentre i soggetti ammalati rimangono eliminatori dello stesso attraverso le feci fino a 18 settimane (Block e coll., 2002). In essi il microrganismo è risultato isolabile da diversi distretti organici, ad esempio gola, tratto rettale, aspirati tracheali, ma non dal sangue nel caso riportato da Arseni e coll. (1987), riguardante 11 neonati, di cui 4 presentanti sintomi di sepsi ad esito mortale, ricoverati presso un'unità di terapia intensiva neonatale in Grecia.

Stoll e coll. (2004) riportano i dati raccolti durante un monitoraggio effettuato in 19 centri ospedalieri e di ricerca negli Stati Uniti. Nel periodo 1998-2001, campioni di sangue e liquido cefalo-rachidiano sono stati prelevati subito dopo la nascita da 10.660 bambini nati sotto peso (401-1.500 g) e sottoposti ad esame batteriologico: in un solo caso è stato isolato *E. sakazakii*. La particolare cura con cui vengono seguite le norme igienico-sanitarie nella preparazione del latte in polvere per neonati ricostituito nelle strutture in esame è stata considerata alla base della bassa percentuale di rilevamento del germe. In molti casi di infezione neonatale riportati da altri Autori infatti la fonte più probabile di infezione è rappresentata da strumenti, utensili e contenitori utilizzati per la preparazione e la conservazione del latte, colonizzati dal germe: Block e coll. (2002) riportano dei casi di infezione avvenuti in un ospedale di Gerusalemme, in cui il batterio responsabile, una variante nitrato-negativa di *E. sakazakii*, è stato isolato

dal latte ricostituito e dagli utensili utilizzati, ma non dal latte in polvere. Biering e coll. (1989) riportano d'altra parte tre casi di infezione neonatale, di cui uno mortale e gli altri due con esito di danni cerebrali gravi, in cui l'isolamento di *E. sakazakii* è avvenuto sia dai neonati ammalati che da un neonato sano e contemporaneamente lo stesso batterio non è stato isolato da campioni ambientali, ma dal latte in polvere.

Rimane comunque poco chiaro perché le infezioni sostenute da *E. sakazakii* riguardino quasi esclusivamente i neonati ed i bambini prematuri, e siano associate al consumo di latte in polvere, la cui contaminazione non è stata ancora univocamente spiegata con chiarezza sulla base dell'individuazione certa del serbatoio del microorganismo. Sembrano in ogni caso da escludere sia la trasmissione diretta tra neonato e neonato che l'infezione di origine ambientale (WHO, 2004). Mentre per i primi isolamenti veniva ipotizzata soprattutto un'infezione a livello del canale del parto, casi di infezione in soggetti nati con taglio cesareo hanno portato ben presto a prendere in considerazione altre ipotesi, principalmente appunto una contaminazione del latte in polvere sostituito del latte materno. A tale proposito Muytjens e coll. (1988) hanno riportato la presenza di *Enterobacteriaceae* nel 52,2% dei campioni di latte in polvere raccolti in 35 diversi paesi; nel 14% dei casi, 20 campioni su 141, è stato isolato *E. sakazakii*.

Successivamente numerosi studi condotti su casi di infezione neonatale in unità ospedaliere intensive hanno verificato la presenza del microorganismo sia come agente eziologico che come contaminante del latte formulato in polvere consumato dai soggetti colpiti, dimostrando la correlazione statistica tra i due eventi e la correlazione fenotipica e genotipica tra i ceppi isolati dalle diverse fonti. In alcuni casi inoltre è stata dimostrata la presenza del microorganismo, oltre che nell'alimento consumato, anche in confezioni di latte formulato in polvere non aperte precedentemente e appartenenti allo stesso lotto di produzione (WHO, 2004).

A questo proposito è opportuno ricordare che i preparati in polvere sostituiti del latte materno umano non sono prodotti sterili: durante la lavorazione vengono trattati termicamente, ma senza raggiungere temperature tali da garantire la sterilità commerciale. Sono invece sterili i prodotti concepiti per i neonati prematuri o nati sotto peso commercializzati sotto forma liquida; tuttavia i prodotti cosiddetti "di transizione" che vengono comunemente usati per i neonati prematuri o sotto peso dopo la dimissione dall'ospedale sono disponibili in commercio sia come polvere non sterile che come forma liquida sterile. Altri tipi di latte per neonati infine sono disponibili solo in polvere (Center for Food Safety and Applied Nutrition, 2002).

Non bisogna infine trascurare il fatto che l'ambiente gastrico dei neonati, in particolare dei soggetti prematuri, è meno acido di quello degli adulti ed anche livelli bassi di contaminazione del latte in polvere (inferiori a 3 UFC/100 g) possono ugualmente dare luogo all'infezione. È chiaro che carenze igieniche e prolungato stoccaggio del prodotto ricostituito a temperature maggiori di quelle di refrigerazione portano ad un aumento della carica a livello di fase di utilizzo finale del prodotto, tuttavia anche in assenza di carenze igieniche ed osservando le buone pratiche di lavorazione possono residuare basse cariche in relazione alla presenza del germe negli ambienti di lavorazione, probabilmente sufficienti in determinate condizioni a causare malattia (WHO, 2004).

METODI DI ISOLAMENTO

Il metodo classico di isolamento di *E. sakazakii* indicato dalla Food and Drug Administration (Center for Food Safety and Applied Nutrition, 2002) prevede una fase di pre-arricchimento in acqua peptonata tamponata con incubazione *overnight* a 36°C, seguita da una fase di arricchimento in brodo EE (Enterobacteriaceae Enrichment Broth) incubato alle stesse condizioni. Successivamente viene effettuata la semina su Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA), da cui devono essere prelevate 5 colonie tipiche da trasferire su Tryptone Soy Agar (TSA), con incubazione a 25°C per 48-72 ore per osservare la produzione di pigmento giallo. L'identificazione viene completata con l'esecuzione di prove biochimiche tramite sistemi miniaturizzati e di eventuali test addizionali come il saggio della produzione di DNasi extracellulare ritardata su Tolidine Blue Agar e della produzione di α -glucosidasi. Tale schema di isolamento è reso poco efficace dallo sviluppo contemporaneo di altre *Enterobacteriaceae* che possono impedire o mascherare quello di *E. sakazakii*. Ne consegue la possibilità di risultati falsi negativi (Iversen e coll., 2004a).

Data la necessità di eseguire ricerche su vasta scala riguardo alla presenza di questo microrganismo in prodotti industriali quale appunto il latte formulato in polvere per neonati, sono stati messi a punto dei metodi di isolamento più efficaci e rapidi. Leuschner e coll. (2004) hanno sviluppato un terreno differenziale per l'isolamento di *E. sakazakii* basato sulla presenza dell'enzima α -glucosidasi. Il terreno è caratterizzato dall'aggiunta al Nutrient Agar standard di un substrato per il suddetto enzima, il 4-metil-umbelliferil- α -D glucoside, la cui metabolizzazione da parte del germe determina la formazione di un prodotto fluorescente a luce UV, per cui *E. sakazakii* sviluppa con formazione di colonie pigmentate di giallo e fluorescenti a luce UV. Per l'isolamento di *E. sakazakii* da campioni di alimenti il metodo prevede comunque una fase di pre-arricchimento ed una di arricchimento selettivo come nel metodo classico.

Iversen e coll. (2004a) hanno sviluppato un terreno cromogenico per l'isolamento selettivo di *E. sakazakii* anch'esso basato sulla presenza dell'enzima α -glucosidasi, caratteristico del microrganismo. Il substrato è in questo caso costituito da 5-bromo-4-cloro-3-indolil- α -D-glucopiranoside, che viene idrolizzato dal batterio ad un pigmento di colore blu indaco: le colonie che si sviluppano appaiono quindi di colore blu-verde. Il terreno, chiamato DFI dalle iniziali dei tre ricercatori, Druggan, Iversen e Forsythe, prodotto commercialmente, rappresenta una valida alternativa al metodo classico su VRBGA e TSA, permettendo di individuare la presenza del microrganismo in tempi inferiori di due giorni, dal momento che il periodo di incubazione necessario è di 24 ore contro le 48-72 ore necessarie a dare pigmentazione gialla su TSA. Iversen e Forsythe (2004) hanno inoltre dimostrato che rispetto al metodo convenzionale l'utilizzo del terreno DFI ridurrebbe la possibilità di falsi negativi, soprattutto per quanto riguarda la ricerca di *E. sakazakii* in alimenti in polvere.

Per tipizzare i ceppi di *E. sakazakii* isolati è possibile utilizzare in combinazione tra loro diversi metodi fenotipici e genotipici (Clark e coll., 1990). In particolare

metodiche di biologia molecolare sono state messe a punto o sono oggetto di ricerca (Lehner e coll., 2004; Seo & Brackett, 2005). Lo scopo è quello di ottenere sistemi di identificazione rapida del germe e di caratterizzazione dei ceppi isolati in diversi tipi di substrati, quali alimenti, ambiente, campioni clinici.

STRATEGIE DI CONTROLLO DEL RISCHIO DA UTILIZZO DI LATTE FORMULATO IN POLVERE PER NEONATI

Il rischio da *E. sakazakii* connesso con il consumo di latte formulato in polvere si caratterizza per l'elevata patogenicità che questo microrganismo manifesta nei soggetti sensibili. In questi contesti anche cariche molto contenute hanno dimostrato la capacità di produrre l'infezione. Fatta questa premessa, sotto il profilo della prevenzione, la gestione del rischio alimentare può agire su due ambiti: sul prodotto, attraverso azioni di prevenzione applicate durante il processo di produzione e nel corso delle operazioni di preparazione precedenti il consumo; sull'informazione agli utilizzatori del prodotto.

Riguardo al primo ambito, dalla produzione al consumo del prodotto, i punti critici sono essenzialmente quattro: la contaminazione di materie prime, quali latte crudo e altri ingredienti utilizzati per la produzione del latte formulato in polvere; l'applicazione del trattamento termico di risanamento; le fasi produttive successive al trattamento termico, nelle quali il prodotto è esposto a ricontaminazione batterica; le fasi di ricostituzione ed eventuale conservazione precedenti il consumo.

Relativamente alla contaminazione del latte, i dati in nostro possesso sono ancora insufficienti per caratterizzare la presenza di *E. sakazakii*, anche se le indagini ad oggi eseguite escludono contaminazioni elevate. Tuttavia, la diffusione del microrganismo è tale da dover necessariamente includere fra le materie prime a rischio tanto il latte quanto tutti gli altri ingredienti potenzialmente esposti all'ambiente esterno.

Il trattamento termico risulta il momento più importante ai fini del risanamento del prodotto. La termoresistenza di *E. sakazakii* è tale da consentire nelle condizioni ordinarie di pastorizzazione del latte la completa distruzione della carica contaminante. Nelle fasi della produzione successive al trattamento di pastorizzazione non sussistono più condizioni che determinano l'inattivazione del microrganismo, ed anzi, durante queste fasi, il prodotto risulta esposto ad eventuali ricontaminazioni provenienti tanto dall'ambiente di produzione, quanto da eventuali ingredienti aggiunti (Iversen & Forsythe, 2003). Ne consegue che la garanzia di sicurezza del prodotto finito possa essere sostenuta solo attraverso la totale esclusione della contaminazione microbica successiva al risanamento termico. Un tale risultato comporta l'impiego esclusivo di ingredienti sterili e l'utilizzo di ambienti confinati ad alto filtro biologico.

Per quanto riguarda la fase di ricostituzione precedente il consumo, si tratta di un punto particolarmente importante, considerato che l'ambiente ospedaliero o domestico espone il prodotto non soltanto a potenziali contaminazioni, ma anche a proliferazione dei microrganismi presenti. A tale proposito appare auspicabile un'opera di educazione diretta tanto al personale dei reparti neonatali, quanto a coloro che utilizzano il

prodotto in ambiente domestico. Nel contesto della strategia di prevenzione infatti particolare importanza è rivestita dal momento informativo. Infine, in assenza di garanzie di sterilità assoluta sul prodotto al momento del consumo, l'unico strumento di prevenzione veramente efficace risulterebbe l'esclusione dell'utilizzo per i soggetti sensibili.

In conclusione, sulla base di quanto raccolto nel rapporto tecnico stilato nel 2004 a cura di FAO e WHO sui microrganismi patogeni ritenuti più importanti per il latte in polvere per neonati (WHO, 2004), è auspicabile che vengano sviluppate ricerche in modo più ampio e organico, con il fine di chiarire gli elementi di caratterizzazione del rischio utili alla definizione di precise misure di prevenzione. Per quanto riguarda in particolare la situazione italiana, anche se ad oggi non si segnalano casi clinici, mancano indagini ad ampio raggio che analizzino in maniera precisa il grado di esposizione al rischio, accertando il livello di contaminazione degli alimenti, delle industrie alimentari e degli ambienti ospedalieri e domestici.

BIBLIOGRAFIA

- ARSENI A., MALAMOU-LADAS E., KOUTSIA C., XANTHOU M., TRIKKA E. (1987). Outbreak of colonization of neonates with *Enterobacter sakazakii*. J. Hosp. Infect., 9: 143-150.
- BIERING G., KARLSSON S., CLARCK N.C., JONSDOTTIR K.E., LUDVIGSSON P., STEINGRIMSSON O. (1989). Three cases of neonatal meningitis caused by *Enterobacter sakazakii* in powdered milk. J. Clin. Microbiol., 27: 2054-2056.
- BLOCK C., PELEG O., MINSTER N., BAR-OZ B., SIMHON A., ARAD I., SHAPIRO M. (2002). Cluster of neonatal infections in Jerusalem due to an unusual biochemical variant of *Enterobacter sakazakii*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 21: 613-616.
- BREEUWER P., LARDEAU A., PETERZ M., JOOSTEN H.M. (2003). Dessiccation and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii*. J. Appl. Microbiol., 95: 967-973.
- CENTER FOR FOOD SAFETY AND APPLIED NUTRITION, United States Department of Health and Human Services, United States Food and Drug Administration (2002). Health professional letters on *Enterobacter sakazakii* infections associated with use of powdered (dry) infant formulas in neonatal intensive care units. <http://vm.cfsan.fda.gov/~dms/inf-ltr3.html>
- CLARK N.C., HILL B.C., O'HARA C.M., STEINGRIMSSON O., COOKSEY R.C. (1990). Epidemiologic typing of *Enterobacter sakazakii* in two neonatal nosocomial outbreaks. Diagn. Microbiol. Infect. Dis., 13: 467-472.
- FARBER J.M. (2004). *Enterobacter sakazakii*-new foods for thought? Lancet, 363: 5-6.
- FARMER J.J.III, DAVIS B.R., HICKMAN-BRENNER F.W., McWHORTER A., HUNTLEY-CARTER G.P., ASBURY M.A., RIDDLE C., WATHEN-GRADY H.G., ELIAS C., FANNING G.R., STEIGERWALT A.G., O'HARA C., MORRIS G.K., SMITH P.B., BRENNER D.J. (1984). Biochemical identification of new species and biogroups of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimens. J. Clin. Microbiol., 21: 46-76.
- HAMILTON J.V., LEHANE M.J., BRAIG H.R. (2003). Isolation of *Enterobacter sakazakii* from midgut of *Stomoxys calcitrans*. Emerg. Infect. Dis., 9: 1355-1356.
- HAVELAAR A.H., ZWIETERING M. (2004). On the risk of *Enterobacter sakazakii* in infant

- milk formula. *Trends Food Sci. Technol.*, 15: 99-100.
- HIMELRIGHT I., HARRIS E., LORCH V., ANDERSON M., JONES T., CRAIG A., KUEHNERT M., FORSTER T., ARDUINO M., JENSEN B., JERNIGAN D. (2002). *Enterobacter sakazakii* infections associated with the use of powdered infant formula. Tennessee, 2001. *J. Am. Med. Ass.*, 287: 2204-2205.
- IVERSEN C., FORSYTHE S. (2003). Risk profile of *Enterobacter sakazakii*, an emergent pathogen associated with infant milk formula. *Trends Food Sci. Technol.*, 14: 443-454.
- IVERSEN C., FORSYTHE S. (2004). Isolation of *Enterobacter sakazakii* and other *Enterobacteriaceae* from powdered infant formula milk and related products. *Food Microbiol.*, 21: 771-777.
- IVERSEN C., DRUGGAN P., FORSYTHE S. (2004a). A selective differential medium for *Enterobacter sakazakii*, a preliminary study. *Int. J. Food Microbiol.*, 96: 133-139.
- IVERSEN C., LANE M., FORSYTHE S.J. (2004b). The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* grown in infant formula milk. *Lett. Appl. Microbiol.*, 38: 378-382.
- KANDHAIM.C.,REIJM.,GORRISL.G.M.,GUILLAUME-GENTILO.,VANSCHOTHORST M. (2004). Occurrence of *Enterobacter sakazakii* in food production environments and households. *Lancet*, 363: 39-40.
- LAI K.K. (2001). *Enterobacter sakazakii* infections among neonates, infants, children, and adults. Case reports and a review of the literature. *Medicine*, 80: 113-122.
- LEHNER A., STEPHAN R. (2004). Microbiological, epidemiological, and food safety aspects of *Enterobacter sakazakii*. *J. Food Prot.*, 67: 2850-2857.
- LEHNER A., TASARA T., STEPHAN R. (2004). 16 rRNA gene based analysis of *Enterobacter sakazakii* strains from different sources and development of a PCR assay for identification. *BMC Microbiol.*, 4: 43-49.
- LEUSCHNER R.G.K., BAIRD F., DONALD B., COX L.J. (2004). A medium for the presumptive detection of *Enterobacter sakazakii* in instant formula. *Food Microbiol.*, 21: 527-533.
- MUYTJENS H.L., ROELOFS-WILLEMSE H., JASPAR G.H.J. (1988). Quality of powdered substitutes for breast milk with regard to members of the family *Enterobacteriaceae*. *J. Clin. Microbiol.*, 26: 743-746.
- NAZAROWEC-WHITE M., FARBER J.M. (1997). *Enterobacter sakazakii*: a review. *Int. J. Food Microbiol.*, 34: 103-113.
- PAGOTTO F.J., NAZAROWEC-WHITE M., BIDAWID S., FARBER J.M. (2003). *Enterobacter sakazakii*: infectivity and enterotoxin production *in vitro* and *in vivo*. *J. Food Prot.*, 66: 370-375.
- RICHARD C. (1984). Genus *Enterobacter* in KRIEG N. R. and HOLT J.G. (Editors) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Baltimore, USA, 1984.
- SEO K.H., BRACKETT R.E. (2005). Rapid, specific detection of *Enterobacter sakazakii* in infant formula using a real-time PCR assay. *J. Food Prot.* 68 (1): 59-63.
- STOLL B.J., HANSEN N., FANAROFF A.A., LEMONS J.A. (2004). *Enterobacter sakazakii* is a rare cause of neonatal septicaemia or meningitis in VLBW infants. *J. Pediatr.*, 144: 821-823.
- URMENYI A.M.C., FRANKLIN A.W. (1961). Neonatal death from pigmented coliform infection. *Lancet*, 1: 313-315.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION (2004). *Enterobacter sakazakii* and other microorganisms in powdered infant formula: meeting report, Microbiological Risk Assessment Series, No. 6. <http://www.who.int/foodsafety/publications/micro/mra6>.