

SUMMARY

Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 is a well recognized cause of severe disease in human beings. The results of a recent survey indicate that Mediterranean water buffalo reared in Italy could be considered as a natural reservoir of *E. coli* O157. Since buffalo farming is an important business activity in some areas of southern Italy, further studies were needed to evaluate the occurrence of *E. coli* O157 contamination in mozzarella cheese. It has been therefore carried out a survey by sampling a total of 510 buffalo mozzarella cheese. All the samples were tested for the presence of *E. coli* O157 using a sensitive procedure based on ISO/DIS 16654:1999 (then ISO 16654:2001) which includes an immunomagnetic separation step. This pathogen was not detected in any of the tested samples. This results are somehow reassuring about *E. coli* O157 contamination in this typical product of the Italian gastronomy.

SOMMARIO

Escherichia coli O157 verocitotossico (VTEC O157) è causa di importanti patologie umane. Recenti indagini hanno accertato che la bufala mediterranea allevata in Italia può rappresentare un importante reservoir naturale del patogeno. Poiché l'allevamento del bufalo rappresenta una realtà economica importante in alcune aree dell'Italia meridionale, sono necessari ulteriori studi al fine di valutare la possibile contaminazione della mozzarella con questo patogeno. A tale scopo è stato condotto un monitoraggio mediante il campionamento di 510 mozzarelle di bufala campana. I prodotti sono stati sottoposti ad analisi microbiologica per la ricerca di *E. coli* O157 basata sulla ISO/DIS 1664:1999 (poi ISO 16654:2001) che prevede l'immunoseparazione magnetica. In nessun campione è stato possibile mettere in evidenza la presenza di questo patogeno. Tali risultati rassicurano sulla possibile contaminazione da *E. coli* O157 in questo tipico prodotto della gastronomia italiana.

G. GALIERO - C. MORENA

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno - Centro di Referenza Nazionale sull'Igiene e le tecnologie dell'allevamento e delle produzioni bufaline - Via delle Calabrie 27 - 84132 Fuorni - SA - Italia

G. CONEDERA

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie - Via Bassa del Cuc 4 - 33084 Cordenons - PN - Italia

A. CAPRIOLI

Istituto Superiore di Sanità - Viale Regina Elena 299 - 00161 Roma - Italia

Indagine sulla presenza di *Escherichia coli* O157 in mozzarella di bufala campana

A survey on Escherichia coli O157 presence in Campania buffalo mozzarella cheese

Parole chiave: *Escherichia coli* O157, mozzarella, bufalo

Key words: *Escherichia coli* O157, mozzarella cheese, buffalo

INTRODUZIONE

Escherichia coli O157 produttore di Verocitotossine (VTEC O157) è un patogeno a valenza zoonosica che può essere causa di gravi patologie umane quali la colite emorragica e la sindrome uremico emolitica (Griffin e Tauxe, 1991). Il tratto gastrointestinale dei ruminanti, bovini in particolare, rappresenta il principale reservoir di questo patogeno (Armstrong *et al.*, 1996). L'infezione dall'animale all'uomo può essere veicolata attraverso contatto diretto (Parry *et al.*, 1995), contatto con acqua e terreno contaminati (Coia, 1998; Tozzi *et al.*, 2001) o mediante consumo di carne e latte non sottoposti ad adeguato trattamento termico (Griffin e Tauxe, 1991; Armstrong *et al.*, 1996). Recenti indagini (Galiero *et al.*, 2004) condotte in allevamenti del sud Italia, hanno consentito di stabilire che la bu-

fala mediterranea, rappresenta un importante reservoir del microrganismo avendo riscontrato in questa specie animale, esaminando soggetti di 6-18 mesi, percentuali di escrezione fecale sovrapponibili a quelle osservate nel bovino in Italia e in altri Paesi. Alla luce di questi recenti risultati, al fine di accertare eventuali rischi per il consumatore, abbiamo deciso di avviare un monitoraggio su vasta scala ricercando *E. coli* O157 mediante immunoseparazione magnetica in campioni di mozzarella di bufala campana pronta per la commercializzazione.

MATERIALI E METODI

Il campionamento di mozzarella ha avuto inizio nel maggio del 2000 e si è

concluso nel dicembre del 2003. Complessivamente sono stati prelevati 510 campioni. I caseifici monitorati sono stati complessivamente 20, per ognuno di essi si è proceduto a campionare, nel corso del tempo, da un minimo di 15 sino ad un massimo di 35 mozzarelle, in base alle diverse capacità produttive dei singoli caseifici. Tutte le industrie casearie sottoposte ai campionamenti erano localizzate nella provincia di Salerno.

Per l'isolamento di *E. coli* O157 si è utilizzata una metodica basata sulla norma ISO/DIS 1664:1999 (poi ISO 16654:2001).

In breve, 25 g di prodotto vengono aggiunti a 225 mL triptone soya broth (Oxoid) con aggiunta di novobiocina, omogeneizzati in stomacher ed incubati a 41,5°C. Dopo 6 e 18-24 ore di incubazione, i brodi sono sottoposti a immunoseparazione magnetica utilizzando Dynabeads anti-*E. coli* O157 (Dyna) rispettando le indicazioni fornite dal produttore. Al termine del processo di concentrazione, 50 µL vengono inoculati in MacConkey agar al sorbitolo (SMAC, Oxoid) e SMAC supplementato con cefixime e tellurito (CT-SMAC, Oxoid). Dopo incubazione a 37°C per 18-24 ore, le colonie non fermentanti il sorbitolo, sono saggiate con test di agglutinazione per *E. coli* O157 (*E. coli* O157 latex test kit, Oxoid). Eventuali colonie positive vengono confermate come *E. coli* mediante test biochimici del commercio. La produzione di VT viene determinata mediante saggio su cellule VERO (Caprioli *et al.*, 1992) mentre la PCR è utilizzata per la ricerca dei geni codificanti per VT1, VT2 ed intimina secondo Russmann *et al.* (1995) e Karch *et al.* (1993), rispettivamente.

RISULTATI

Tutti i 510 campioni saggiati mediante il metodo microbiologico sopra riportato, hanno dato esito negativo.

DISCUSSIONE

La recente segnalazione che la bufala mediterranea allevata in Italia, rappresenta un importante reservoir di *E. coli* O157, ha portato a considerare anche questa specie nella diffusione di tale patogeno. Non va pertanto sottovalutato il rischio di contaminazione di pascoli e acque con deiezioni provenienti dagli allevamenti infetti, né la possibilità di accidentale contaminazione del latte e dei suoi derivati lungo la filiera produttiva. In assenza di specifici dati di letteratura, questa indagine è stata condotta proprio al fine di verificare la possibilità di contaminazione da *E. coli* O157 dei derivati del latte di bufala.

La mozzarella di bufala campana è un prodotto DOP (Regolamento CE 1107, 21 giugno 1996). Il disciplinare di produzione, non prevedendo alcun trattamento termico del latte per la fabbricazione di questa tipica pasta filata, ha reso, di fatto, molto delicato l'intero processo di trasformazione, il quale deve necessariamente sottostare a una serie di controlli e rigorose verifiche nei suoi punti critici. In assoluto la fase più importante ai fini del risanamento igienico del prodotto, è la filatura; infatti la pasta, al termine di questo passaggio, deve raggiungere 58°-65°C per via dell'aggiunta alla cagliata di acqua a 80°-95°C in un rapporto 1/1 (Addeo, 2004). Il rispetto, durante tutto il processo di filatura, di queste condizioni di temperatura e rapporto acqua/cagliata, è la garanzia per una produzione ineccepibile dal punto di vista igienico sanitario, sempre che non si verificano problemi di contaminazione post-filatura.

La presente indagine, svolta nell'arco di tre anni con prelievo di 510 campioni di mozzarella di bufala in 20 diversi caseifici, ha dimostrato l'assenza di contaminazione da *E. coli* O157 di tutti i prodotti esaminati. Ciò porta a considerare come un'attenta applicazione delle procedure di autocontrollo aziendale, una adeguata formazione delle maestranze e una tec-

nologia produttiva che da tempo può contare su attrezzature e macchine industriali moderne e facilmente sanificabili, possano nel loro insieme rappresentare uno strumento adeguato per prevenire i rischi di contaminazione da *E. coli* O157 della filiera produttiva.

La presente indagine è stata finanziata dal Ministero della Salute nell'ambito del progetto di Ricerca corrente IZS VE 001/98.

BIBLIOGRAFIA

- Addeo F. (2004) "Mozzarella di bufala campana Consorzio per la Tutela del formaggio Mozzarella di Bufala Campana" pp. 171-231.
- Armstrong G.L., Holligsworth J., Morris J.G. jr (1996) "Emerging foodborne pathogens: *Escherichia coli* O157:H7 as a model of entry of a new pathogen into the food supply of the developed country" *Epidemiol. Rev.* 18:29-51.
- Caprioli A., Luzzi I., Rosmini F., Pasquini P., Cirrincione R., Gianviti A., Matteucci M.C., Tizzoni G. (1992) "Hemolytic-uremic syndrome and verocytotoxin-producing *Escherichia coli* infection in Italy" *J. Infect. Dis.* 166:154-158.
- Coia J.E. (1998) "Clinical, microbiological and epidemiological aspects of *Escherichia coli* O157 infection" *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 20:1-9.
- Galiero G., Conedera G., Alfano D., Caprioli A. (2004) "Isolation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from water buffalo (*Bubalus bubalis*) in southern Italy" *Vet. Rec.* in corso di stampa.
- Karch H., Bohm H., Schmidt H., Gunzer F., Aleksic S., Heesemann J. (1993) "Clonal structure and pathogenicity of Shiga-like toxin production, sorbitol fermenting *Escherichia coli* O157:H7" *J. Clin. Microbiol.* 25: 289-300
- Griffin P.M., Tauxe A.V. (1991) "The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157:H7, other enterohemorrhagic *E. coli* and the associated haemolytic uremic syndrome". *Epidemiol. Rev.* 13:60-98.
- Parry S.M., Salmon R.L., Willshaw G.A., Cheasty T., Lund L.J., Wearden P., Quoraishi A.H., Fitzgerald T. (1995) "Haemorrhagic colitis in child after visit to farm visitor centre" *Lancet* 346:572.
- Russmann H., Kothe E., Schmidt H., Franke S., Harmesen D., Caprioli A., Karch H. (1995) "Genotyping of Shiga-like toxin genes in non-O157 *Escherichia coli* strains associated with haemolytic uremic syndrome" *J. Med. Microbiol.* 42:404-410.
- Tozzi A.E., Goriotti S., Caprioli A. (2001) "Epidemiology of human infections by *Escherichia coli* O157 and other verocytotoxin-producing *E. coli*" In Duffy G., Garvey P., McDowell, D (Eds.) *Verocytotoxigenic Escherichia coli* Food Nutrition Press INC pp. 161-179.