

# ISOLAMENTO DI *E. COLI* O157 DA CARCASSE DI VITELLI A CARNE BIANCA

## ESCHERICHIA COLI O157 IN WITHE VEAL CALVES CARCASSES

Colavita G.<sup>1</sup>, Paoletti M.<sup>1</sup>, Conter M.<sup>2</sup>, D'Orio V.<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agro-Alimentari Ambientali e Microbiologiche – Università del Molise - Campobasso.

<sup>2</sup> Dipartimento di Produzioni Animali, Biotecnologie Veterinarie, Sicurezza e Qualità degli Alimenti - Università di Parma.

<sup>3</sup> Dipartimento di Scienze degli Alimenti - Università degli Studi di Teramo.

### SUMMARY

During 2006 one hundred and three white veal calves slaughtered at an abattoir in Isernia (Italy) were examined for *E. coli* O157 intestinal carriage and carcass contamination, using Immuno-Magnetic Separation (IMS) and multiplex PCR. Faecal material before slaughtering and carcass samples, using sponge-bag, were collected. *E. coli* O157 isolates were found in 10 (9,71%) faecal and 9 (8,7%) carcass samples. PCR analysis showed that all the strains from faecal and from carcass samples carried *eaeA*, *hlyA* and *stx2* genes, while five strains *stx1* gene. The results confirm that the slaughter practices can largely influence the rate of *E. coli* O157 carcasses contamination and suggest that white veal calves meat could be an important risk for human health.

### Key words

*Escherichia coli* O157, white veal calves, carcass.

### INTRODUZIONE

Insieme a Germania e Francia, l'Italia è uno dei primi tre mercati per il consumo di carni di vitello a carne bianca (4 kg/pro capite/anno). Nel nostro Paese si alleva circa 1/5 dei 6 milioni di capi prodotti annualmente nella UE. Al vitello a carne bianca vengono riconosciute qualità nutrizionali e organolettiche, che ne fanno un alimento richiesto soprattutto per bambini e anziani, considerati il basso tenore in grasso e in colesterolo, la tenerezza, la digeribilità e il colore chiaro delle masse muscolari. Quest'ultima caratteristica è dovuta ad una alimentazione fatta essenzialmente con latte o mangimi sostitutivi carenti in ferro, che induce uno stato di anemia, con un colore più chiaro delle carni, molto apprezzato dal consumatore.

In Europa e particolarmente in Olanda, i vitelli vengono raccolti da numerose aziende, soprattutto

da latte, e concentrati in grandi allevamenti. Per vitello a carne bianca si intende il giovane bovino allevato fino al peso di 230 – 250 kg, di età non superiore agli 8 mesi e con una alimentazione composta quasi esclusivamente da sostitutivi del latte (latte ricostituito). Per il carattere intensivo dell'allevamento e per la tipica carenza di ferro nella dieta, i vitelli sono più sensibili alle malattie, soprattutto respiratorie e gastroenteriche, per cui vengono sottoposti a programmi di profilassi antibiotica di routine. Sono allevati prevalentemente maschi di razze da latte o a duplice attitudine e vitelle di razze da carne, poco adatti a fornire elevate quantità di carne con le tradizionali tecniche di produzione del vitellone. In questi ultimi anni, sempre più frequentemente gli animali provengono dai Paesi dell'est Europa, in particolare dalla Polonia.

In Italia, la commercializzazione di questo tipo di carne avviene prevalentemente attraverso la

grande distribuzione (super-ipermercati).

Rispetto al passato, la normativa sul benessere dei vitelli (D.Lgs. 331/98), al fine di limitare le condizioni di anemia, obbliga alla presenza di una certa quantità di fibra nella razione, che comporta l'attivazione del rumine, con una possibile modificazione dell'ambiente gastroenterico, più simile a quello dei vitelli con regime alimentare normale. Inoltre, le stesse norme vietano la stabulazione in box singoli e prevedono l'allevamento in gruppo, in "box multipli", il che comporta però anche una maggiore possibilità di diffusione degli agenti patogeni tra gli animali.

Se abbastanza nutrita è la bibliografia relativa alla diffusione di *E. coli* O157 nelle carni bovine in genere, pochi sono i dati circa la diffusione di questo microrganismo nelle carni di vitelli a carne bianca.

Tra gli *E. coli* VTEC, quelli enteroemorragici (EHEC) sono responsabili di gravi forme di malattia nella specie umana, in quanto possono causare una Colite emorragica e una Sindrome emolitica uremica (SEU); tra essi il sierotipo O157 è il più diffuso. Fattori di virulenza sono: la capacità di produrre l'intimina, verocitotossine (VT1 -VT2) e una enteroemolisina. Come per la maggior parte delle infezioni a veicolo alimentare, i bambini e gli anziani sono maggiormente a rischio. In particolare, i bambini sotto i 5 anni sono a maggiore rischio di sviluppo di SEU.

Anche se il microrganismo è stato isolato da diverse specie animali tra cui suini, ovini, volatili, ecc, il bovino rappresenta il principale serbatoio.

Considerato che le fasce di consumatori di vitello a carne bianca sono quelle più a rischio per l'infezione da *E. coli* EHEC, abbiamo ritenuto interessante effettuare la ricerca in particolare del sierotipo O157.

## MATERIALI E METODI

La ricerca *E. coli* O157 è stata eseguita, nel 2006, su vitelli a carne bianca, di età media di 8 mesi e 250-280 kg di peso vivo, provenienti da allevamenti siti nelle province di Caserta, Frosinone, Isernia e macellati in un macello a riconoscimento CE.

A ogni visita al macello, mediamente 6 soggetti, scelti con criterio random tra i vitelli macellati in una stessa giornata, sono stati sottoposti a prelievo delle feci, direttamente dall'ampolla rettale e immediatamente prima dell'abbattimento. Dopo la macellazione, sulle carcasse degli stessi soggetti, sono stati effettuati tamponi con *sponge-bag*. Complessi-

vamente sono stati esaminati 103 campioni di feci e 103 tamponi da carcasse.

**Analisi microbiologica** – Per la ricerca di *E. coli* O157, 25g di feci sono stati omogenati in 225ml di TSB modificato, addizionato di novobiocina (20mg/l) e incubato a 37 °C/6 ore. Dopo opportuna agitazione, i campioni sono stati sottoposti a Separazione Immuno Magnetica (IMS), con biglie magnetiche adsorbite ad anticorpi per EHEC O157 (Dynabeads *E. coli* O157, Oxoid) secondo le istruzioni d'uso, con l'accortezza di aggiungere una fase in più al ciclo di lavaggio, per ridurre il più possibile l'interferenza del grasso presente sulle *sponge-bag* dopo il campionamento. L'isolamento è stato effettuato in doppio, seminando 50 l di coltura su Chromogenic *E. coli* O157 Agar (Biolife) e 50 l su CR-Sorbitol MacConkey Agar (Oxoid), addizionati con cefexime tellurite, in piastre di ø 12 mm. Le colture sono state incubate a 37 °C/24 ore. Le colonie sospette sono state purificate in sub-colture, su entrambi i terreni e quelle tipiche sono state poi testate con *E. coli* O157 *Latex agglutination assay* (Oxoid).

**PCR** - I ceppi di *E. coli* O157 risultati positivi all'agglutinazione sono stati sottoposti a multiplex PCR per la ricerca dei geni codificanti: *stx1* (shiga toxin1), *stx2* (shiga toxin2), *eaeA* (intimina) e *hlyA* (enteroemolisina) (8). L'estrazione del DNA è stata effettuata mediante *High Pure PCR Template Preparation Kit* (Roche), secondo le istruzioni d'uso. I primers impiegati (Erogenetec - Seraing, Belgio) sono riportati nella tabella n. 1. Come controlli positivi sono stati utilizzati i ceppi ATCC 35150 *E. coli* O157:H7 e NCTC 12900 *E. coli* O157: H7 VT.

Tabella n. 1: primers utilizzati nella multiplex PCR, per la tipizzazione dei ceppi di *E. coli* O157 isolati dalle feci e dalle carcasse di vitelli a carne bianca.

| Primers usati per la PCR:             | Prodotti attesi |
|---------------------------------------|-----------------|
| hlyAF 5'-GCATCATCAAGCGTACGTTCC-3';    | 534 pb          |
| hlyAR 5'-AATGAGCCAAGCTGGTTAAGCT-3';   |                 |
| eaeAF 5'-GACCCGGCACAAGCATAAGC-3';     | 384 pb          |
| eaeAR 5'-CCACCTGCAGCAACAAGAGG-3';     |                 |
| stx1F 5'-ATAAATCGCCATTTCGTTGACTAC-3'; | 180 pb          |
| stx1R 5'-AGAACGCCCACTGAGATCATC-3';    |                 |
| stx2F 5'-GGCACTGTCTGAACTGCTCC-3';     | 225 pb          |
| stx2R 5'-TCGCCAGTTATCTGACATTCTG-3'.   |                 |

## RISULTATI

Le analisi microbiologiche e l'agglutinazione hanno portato ad identificare complessivamente 19 ceppi riferibili ad *E. coli* O157, di cui 10 (9,71%) dalle feci e 9 (8,7%) dalle carcasse. In 2 vitelli, il germe è stato isolato sia dalle feci che dalla carcassa. La tipizzazione mediante multiplex PCR ha con-

sentito di confermare tutti i 19 ceppi come *E. coli* O157. Tutti i ceppi identificati codificano per: *eaeA*, *hlyA* e *stx2*, mentre solo 5 per *stx1* (tabella n.2). In riferimento alla provenienza, *E. coli* O157 è stato riscontrato almeno una volta in tutti e tre gli allevamenti di provenienza dei vitelli, anche se con una maggiore frequenza negli animali provenienti dalla provincia di Caserta.

Tabella n. 2: risultati della tipizzazione dei ceppi di *E. coli* O157, mediante multiplex PCR. \* ceppi isolati sia della feci, che dalla carcassa dello stesso soggetto.

| N. | Ceppo      | feci | carcasse | <i>eaeA</i> | <i>hlyA</i> | <i>Stx1</i> | <i>Stx2</i> |
|----|------------|------|----------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| 1  | 9 S        | -    | +        | +           | +           | +           | +           |
| 2  | 12 F       | +    | -        | +           | +           | +           | +           |
| 3  | 13 S       | -    | +        | +           | +           | -           | +           |
| 4  | 14 F       | +    | -        | +           | +           | +           | +           |
| 5  | 15 F       | +    | -        | +           | +           | +           | +           |
| 6  | 16 S       | -    | +        | +           | +           | +           | +           |
| 7  | 24 S       | -    | +        | +           | +           | -           | +           |
| 8  | 30 F       | +    | -        | +           | +           | -           | +           |
| 9  | 32 F       | +    | -        | +           | +           | -           | +           |
| 10 | 56 F       | +    | -        | +           | +           | -           | +           |
| 11 | 66 S       | -    | +        | +           | +           | -           | +           |
| 12 | 73 S       | -    | +        | +           | +           | -           | +           |
| 13 | 74 S*      | -    | +        | +           | +           | -           | +           |
| 14 | 74 F*      | +    | -        | +           | +           | -           | +           |
| 15 | 75 S       | -    | +        | +           | +           | -           | +           |
| 16 | 76 F*      | +    | -        | +           | +           | -           | +           |
| 17 | 76 S*      | -    | +        | +           | +           | -           | +           |
| 18 | 77 F       | +    | -        | +           | +           | -           | +           |
| 19 | 85 F       | +    | -        | +           | +           | -           | +           |
| 20 | ATCC 35150 |      |          | +           | +           | +           | +           |
| 21 | NCTC 12900 |      |          | +           | +           | -           | -           |

## CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

In uno studio condotto in Canada (3) su 62 vitelli a carne bianca, campionati ripetutamente, sono risultati positivi solo 2 soggetti, pari al 3,2% e i ceppi isolati sono risultati produttori di entrambe le tossine VT1 e VT2.

In base ai pochi dati disponibili, la prevalenza di EHEC nei vitelli a carne bianca e nelle loro carcasse risulta compresa tra 0 e 0,5% (1, 4, 6) e si ipotizza che questi bassi valori siano riconducibili al frequente utilizzo di alimenti medicati, in questa

particolare tipologia di allevamento. Invece, la prevalenza di *E. coli* O157, nei vitelloni macellati nel nostro Paese, oscilla tra 0 e 17%, mentre risulta abbastanza contenuta nei prodotti carnei, come ad esempio, nelle carni macinate (1, 2). Il dato sensibilmente superiore, da noi registrato nelle feci e sulle carcasse dei vitelli a carne bianca, anche se non ci consente di fare raffronti più ampi, potrebbe essere ragionevolmente ricondotto alle modifiche apportate nel regime alimentare degli animali, come effetto della normativa sul benessere dei vitelli, che prevedendo la presenza di fibra nella razione, com-

porta lo sviluppo del ruminale e un ambiente gastroenterico abbastanza simile a quello dei vitelloni. Inoltre, anche il fatto che le stesse norme impongono l'allevamento in "box multipli", porta ad una maggiore possibilità di diffusione del microrganismo tra i vitelli, che possono incrementare il loro tasso di eliminazione del germe, anche in seguito allo stress da trasporto al macello. La sensibile presenza di *E. coli* O157 nelle carcasse da noi esaminate, può essere ricondotta sia alla elevata prevalenza nelle feci dei vitelli, sia ad una carenza di igiene nella macellazione, che evidentemente gioca un ruolo fondamentale nel controllo della contaminazione delle carni (2, 6, 7). Il dato relativo ad una maggiore frequenza di *stx2* rispetto a *stx1*, nei ceppi da noi isolati, potrebbe essere messa in relazione alla provenienza estera dei vitelli, in accordo con studi che hanno evidenziato una diversa distribuzione geografica dei ceppi isolati dai bovini (5). Anche se è necessario ampliare la casistica dei dati, quelli da noi ottenuti inducono a ritenere che il rischio *E. coli* O157 possa essere piuttosto elevato, se si considera che questo tipo di carni è particolarmente consumato da fasce sensibili, come bambini ed anziani.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Bonardi S., Maggi E., Bottarelli A., Pacciarini M.L., Ansuini A., Vellini G., Morabito S., Caprioli A. (1999). Isolation of Verocytotoxin-producing *E. coli* O157:H7 from cattle at slaughter in Italy. *Vet. Microbiol.*, 67, 203-211.
- 2) Cantoni C., Gaidella L. (2002). *Escherichia coli* O157: una temibile zoonosi alimentare veicolata dai bovini. *Atti della Soc. Ital. di Buiatria*, 34, 301-303.
- 3) Cristancho L., Johnson R.P., McEwen S.A., Gyles L. (2008). *Escherichia coli* O157:H/ and other Shiga toxin-producing *E. coli* in with veal calves. *Veterinary Microbiology*, 126, 200-209.
- 4) Conedera G., Dalvit P., Martini M., Galero G., Gramaglia M., Goffredo E., Loffredo G., Morabito S., Ottavini D., Paterlini F., Pezzetti G., Pisanu M., Semprini P., Caprioli A. (2004). Verocytotoxin-producing *E. coli* O157 in minced beef and dairy productions in Italy. *International Journal of Food Microbiology*, 96, 67-73.
- 5) Giammanco G.M., Sarina Pignato S., Francine Grimon F., Patrick A.D. Grimont P.A.D., Caprioli A., Morabito S., Giammanco S. (2002). Characterization of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* O157:H7 Isolated in Italy and in France. *J Clin Microbiol.* 40 (6), 2711-2715
- 6) Heuvelink, A.E., Van Den Biggelaar F.L.A.M., De Boer E., Herbes R.G., Melchers W. J.G., Huis In 't Veld J.H.J., Monnens L.A.H. (1998). Isolation and characterization of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 strains from Dutch cattle and sheep. *J. Clin. Microbiol.* 36:878-882
- 7) McEvoy J.M., Doherty A.M., Sheridan J.J., Thomson-Carter F.M., Garvey P., McGuire L., Blaire I.S., McDowal D.A. (2000). The prevalence and spread of *E. coli* O157:H7 of commercial beef abattoir. *Journal of Applied Microbiology*, 95, (2), 256.
- 8) Normanno G., Parisi A., Dambrosio A., Quaglia N.C., Montagna D., Chiocco D., Celano G.V. (2004). Typing of *Escherichia coli* O157 strains isolated from fresh sausage. *Food Microbiol.* 21, 79-82.