

# *Escherichia coli* O26 IN LATTE CRUDO DI BUFALA: RISULTATI PRELIMINARI

## *Escherichia coli* O26 IN RAW BUFFALO MILK: PRELIMINARY RESULTS

Lorusso V<sup>1</sup>, Normanno G.<sup>1</sup>, Dambrosio A.<sup>1</sup>, Carosielli L.<sup>2</sup>, Carrabs G.<sup>3</sup>, Loiudice C.<sup>4</sup>, Rella A.<sup>5</sup>, Celano G.V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento Sanità e Benessere degli Animali, Facoltà di Medicina Veterinaria, (BA); <sup>2</sup> ASL FG/3 Foggia; <sup>3</sup> ASL LT/1 Latina; <sup>4</sup> ASL BA/3- Altamura (BA); <sup>5</sup> ASL BA-DSS n.5-Consutorio familiare

### SUMMARY

*Escherichia coli* O26 is considered to be one of the most important food-borne pathogen. In this study, 120 buffalo milk samples collected in Lazio and in Apulia regions were tested for the presence of *E. coli* O26. One buffalo milk sample (0,8%) tested positive for *E. coli* O26; the isolate was positive at the verocytotoxicity test and it showed resistance properties to different antimicrobial classes. These preliminary results highlight the need to monitor the foods of animal origin used for production and eaten by a wide range of persons, respect VTEC organism.

### Key words

*E. coli* O26, VTEC, buffalo milk.

### INTRODUZIONE

Le infezioni umane causate da ceppi verocitotossici di *Escherichia coli* (VTEC), in particolare da *E. coli* O157:H7, rappresentano un importante problema sanitario nei paesi sviluppati (9); queste infezioni sono trasmesse all'uomo principalmente per via alimentare e gli alimenti potenziali veicolo d'infezione sono soprattutto carne, latte e prodotti derivati (10). Negli ultimi decenni il quadro epidemiologico di queste infezioni sta gradualmente mutando: si assiste all'emergere di infezioni causate da sierotipi VTEC non-O157 soprattutto dei sierogruppi O26, O111 e O145 (14). In Italia sono riportati diversi clusters di infezione causate da questi sierotipi (5); un importante focolaio, con un caso fatale, è occorso nella provincia di Salerno nel 2005 e pur non essendo stato possibile risalire con certezza alla fonte d'infezione, dalle indagini caso-controllo il con-

sumo di latticini locali è risultato il fattore comune di rischio (12). Prendendo spunto da questo episodio e dalla letteratura internazionale sull'argomento, abbiamo ritenuto interessante valutare la presenza di *E. coli* O26 in campioni di latte crudo di bufala (*Bubalus bubalis*) prodotto in Lazio e Puglia.

### MATERIALI E METODI

Nel periodo settembre 2006 - luglio 2007 sono stati analizzati 120 campioni di latte bufalino (ca 1000 mL), prelevati da aziende site in provincia di Bari (1 azienda), Foggia (5 aziende) e Latina (10 aziende). I campioni sono stati trasportati in laboratorio in stato di refrigerazione e subito analizzati.

Venticinque mL di ciascun campione sono stati omogeneizzati in 225 mL di EC broth (Oxoid), addizionato con 25 mg/L di novobiocina (Oxoid S.p.a.,

Milan, Italy) (7) per 1 min quindi incubato in agitazione (52 rpm) a 42 °C per 18 h. Un mL della brodcultura ottenuto da ogni campione è stato sottoposto a separazione immunomagnetica (SIM), utilizzando microsferi superparamagnetiche in polistirene, EPEC/VTEC O26 (Dynal Biotech-Oxoid). Cento ml del prodotto della SIM sono stati seminati su due piastre di terreno Cefixime Tellurite-Ramnhose MacConkey agar (CT-RMAC), ottenuto aggiungendo al MacConkey agar base (Difco-BD, Le Pont de Claix, France) 10 mg/l di ramnosio (Fluka, Steinheim, Germany), 0.05 mg/l di cefixime e 2.5 mg/l di potassium tellurite (Oxoid) quindi incubate a 37 °C per 24 h.

Cinque colonie con caratteri morfologici riconducibili a *E. coli* O26 sono state trapiantate su Tryptone Soya Agar (TSA) (Oxoid) e, dopo sviluppo a 37 °C per 24 h, sottoposte a test di conferma mediante colorazione gram, test dell'ossidasi (Oxoid), prova dell'indolo e infine sottoposte a identificazione biochimica mediante sistema miniaturizzato API 20E (bioMerieux, Marcy l'Etoile, France). Le colonie identificate come *E. coli* sono state ulteriormente caratterizzate per il rilievo dell'antigene somatico O26 tramite test sierologico di agglutinazione al lattice (Oxoid). I ceppi di *E. coli* risultati positivi al test al lattice sono stati sottoposti alle prove di seguito riportate.

In seguito all'allestimento di una brodcultura di 24 ore d'età dei ceppi in esame, il filtrato è stato sottoposto al test di verocitossicità su monostrati di cellule VERO di 24 h di età sviluppati a 37 °C in presenza del 5% di CO<sub>2</sub> in piastre microtitre con *Minimal Essential Medium* di Dulbecco (D-MEM, Sigma-Aldrich), supplementato con 10% siero fetale bovino (Cambrex Bio Science Verviers, Belgium). Ogni ceppo batterico è stato inoculato in 10 ml di Brain Heart Infusion (Oxoid) ed incubato a 37 °C per 24 h; dopo centrifugazione a 12000 g per 5 minuti, il surnatante è stato filtrato (0.45 µm), quindi dopo esser stato diluito serialmente per raddoppio, inoculato sui monostrati cellulari. Dopo 24 e 48 h di incubazione a 37 °C in presenza del 5% di CO<sub>2</sub>, i monostrati sono stati osservati utilizzando un microscopio rovesciato.

Gli isolati di *E. coli* O26 sono stati testati per la valutazione della sensibilità nei confronti di 19 molecole antibiotiche usando il metodo della diffusione in agar sul terreno Mueller-Hinton (Oxoid), secondo quanto previsto dal Clinical and Laboratory Standard Institute (2). Sono stati impiegati i seguenti dischi antibiotici: Amoxicillina (25 mg), Ampicillina (25 mg), Cefalotina (30 mg), Cloramfenicolo (30 mg), Ciprofloxacina (5 mg), Colistina solfato (10 mg), Co-

trimoxazolo (25 mg), Doxicillina (30 mg), Enrofloxacin (5 mg), Eritromicina (15 mg), Flumequine (30 mg), Gentamicina (10 mg), Kanamicina (30 mg), Acido Nalidixico (30 mg), Neomicina (30 mg), Spiramicina (100 mg), Teicoplanina (30 mg), Tetraciclina (30 mg), Vancomicina (30 mg) (Liofilchem- Teramo; Mast Diagnostics-MAST GROUP Ltd, Merseyside, U.K.).

## RISULTATI

*E. coli* O26 è stato isolato da 1 campione di latte di bufala (0,8 %). Il ceppo isolato è risultato positivo al test di verocitossicità e ha mostrato proprietà di resistenza nei confronti di Vancomicina, Teicoplanina, Spiramicina, Ampicillina, Eritromicina e sensibilità verso Acido Nalidixico, Amoxicillina, Cefalotina, Tetraciclina, Flumequine, Enrofloxacin, Kanamicina, Gentamicina, Colistina solfato, Cotrimossazolo, Cloramfenicolo, Ciprofloxacina, Doxicillina.

## CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

Le infezioni a veicolo alimentare causate dai ceppi VTEC rappresentano un importante capitolo della sicurezza microbiologica degli alimenti in quanto possono essere in grado di provocare malattie gravi come la colite emorragica e la sindrome emolitica uremica (11). In particolare, nell'ambito delle patologie causate da VTEC, le infezioni da *E. coli* O26 sono sempre più frequentemente diagnosticate in Europa ed in Italia; a fronte dell'emergere di queste infezioni non sono disponibili nella letteratura scientifica dati utili a comprendere il ciclo epidemiologico di queste infezioni, né ad effettuare una soddisfacente analisi del rischio alimentare. Questa problematica risulta più evidente se si analizzano i dati riguardanti il comparto lattiero-caseario rispetto a quello carneo: se si escludono i lavori di Galiero e collaboratori (6) e di Astarita e altri (1), particolarmente carenti risultano le informazioni sulla presenza e la caratterizzazione di ceppi VTEC non-O157 nel latte crudo di bufala. Un campione (0,8 %) dei 120 analizzati nella nostra indagine è risultato contaminato da *E. coli* O26; il ceppo isolato si è dimostrato potenzialmente patogeno in quanto munito di capacità di sintesi di verocitossine. Questo dato andrebbe tenuto in considerazione in una ipotetica formulazione dell'analisi dei pericoli del flusso di processo della mozzarella di bufala in quanto carenze igieniche o inefficacia dei tratta-

menti termici potrebbero comportare una sopravvivenza del germe nel prodotto finito; tuttavia, un'importante indagine volta alla valutazione della presenza di *E. coli* O157 in mozzarella di bufala ha fornito risultati costantemente negativi da oltre 500 campioni analizzati (3). Infatti, è bene sottolineare che le procedure codificate dal disciplinare di produzione della mozzarella di bufala riportano l'impiego di acqua bollente da utilizzare nella fase di filatura della cagliata e che è stato dimostrato in challenge tests che queste temperature sono efficaci nell'inattivare *E. coli* O157 (13): è ragionevole supporre che siano in grado di inattivare anche i germi conspecifici del sierogruppo O26. Tornando alle caratteristiche dell'isolato nella nostra indagine, il ceppo in questione ha manifestato un pattern di antimicrobico-resistenza, risultando resistente a 3 classi di antibiotici: questi risultati sono in accordo con quanto riportato in una precedente indagine condotta su carne macinata di bovino (8; 4) mentre appaiono in contrasto con i risultati ottenuti da Walsh e coll. sulla frequenza del fenomeno rilevata in ceppi di *E. coli* O26 isolati da campioni clinici e di provenienza veterinaria (15). Ulteriori studi si rendono necessari per meglio definire la prevalenza di ceppi VTEC non-O157 e di altri agenti di tossinfezione alimentare in latte di bufala ed il loro potenziale impatto sulla salute pubblica.

## BIBLIOGRAFIA

- 1) Astarita, S., Martucciello, A., Alfano, D., Caprioli, A., Scavia, G., Iovane, G., Galiero, G. (2007). *Escherichia coli* O26 una tossinfezione alimentare emergente. Ruolo del bufalo mediterraneo quale reservoir animale del microrganismo. *Large Animal Review* 13, 247-248.
- 2) CLSI (Clinical and Laboratory Standard) formerly National Committee on Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (2003). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Tests. Approved standard. NCCLS document M2-A8. P.A. Wayne: National Committee on Clinical Laboratory Standards.
- 3) Conedera, G., Dalvit, P., Martini, M., Galiero, G., Gramaglia, M., Goffredo, E., Loffredo, G., Morabito, S., Ottaviani, D., Paterlini, F., Pezzotti, G., Pisanu, M., Semprini, P., Caprioli, A. (2004). Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in minced beef and dairy products in Italy. *International Journal of Food Microbiology* 96(1), 67-73.
- 4) Dambrosio, A., Lorusso, V., Quaglia, N.C., Parisi, A., La Salandra, G., Virgilio, S., Mula, G., Lucifora, G., Celano, G.V., Normanno, G. (2007). *Escherichia coli* O26 in minced beef: Prevalence, characterization and antimicrobial resistance pattern. *International Journal of Food Microbiology* 118, 218-222.
- 5) Enter-net Italia. Rete Internazionale di Sorveglianza per le infezioni Enteriche da Salmonella e da VTEC O157. Pagina web: <http://www.simi.iss.it/Enternet/index.asp>.
- 6) Galiero, G., Conedera, G., Alfano, D., Caprioli A. (2005). Isolation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in southern Italy. *The Veterinary Record* 156, 382-383.
- 7) Hara-kudo, Y., Konuma, Y., Nakagawa, H., Kumagai H., Kumagai S. (2000). *Escherichia coli* O26 detection from foods using an enrichment procedure and an immunomagnetic separation method. *Letters in Applied Microbiology* 30, 151-154.
- 8) Lorusso, V., Dambrosio, A., Quaglia, N.C., Normanno, G., La Salandra, G., Basanisi, M., Lucifora, G., Celano, G.V. (2008). "Presenza di ceppi multi-drug resistant di *Escherichia coli* O26 in carne macinata bovina". *Industrie alimentari XLVII*, Gennaio, 7-11.
- 9) Nataro, J.P., Kaper, J.B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* 1 (1), 142-201.
- 10) Normanno, G., Parisi, A., Dambrosio, A., Quaglia, N.C., Montagna, C.O., Chiocco, D., Celano, G.V. (2004). Typing of *Escherichia coli* O157:H7 isolated from fresh sausage. *Food Microbiology* 21, 79-82.
- 11) Normanno, G. (2007). Current status on the etiology, epidemiology, food safety implications and control measures in *Escherichia coli* O157:H7 infections. In: *Food Microbiology Research Trends*, cap. IV, pp. 131-154, Nova-science Publisher, U.S., N.Y.
- 12) Scavia, G., Botta, A., Ciofi degli Atti, M.L., Di Fluri, G., Ferretti, A., Galero, G., Marziano, M.L., Merla, R., Minelli, F., Montini, G., Pecoraio, C., Pizzuti, R., Tozzi, A.E., Trani, A.M., Caprioli, A. (2005). Episodio epidemico di sindrome emolitico uremica (SEU) associata a infezione da *Escherichia coli* O26, in provincia di Salerno, p 73-74. In Caprioli, A., Luzzi, I., Lana, S. (Eds.) Sorveglianza e prevenzione delle infezioni gastroenteriche. Atti del V Workshop Nazionale ENTER-NET: Sistema di sorveglianza delle infezioni enteriche, Italia.
- 13) Spano, G., Goffredo, E., Beneduce, L., Tarantino D., Dupuy, A., Massa, S. (2003). Fate of *Escherichia coli* O157:H7 during the manufacture of Mozzarella cheese. *Letters in Applied Microbiology* 36(2), 73-6.
- 14) Tozzi, A.E., Caprioli, A., Minelli, F., Gianviti, A., De Petris, L., Edefonti, A., Montini, G., Ferretti, A., De Palo, T., Gaido, M., Tizzoni, G. and the Hemolytic Uremic Syndrome Study Group (2003). Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections associated with Hemolytic Uremic Syndrome, 1988-2000. *Emerging Infectious Diseases* 9(1), 106-108.
- 15) Walsh, C., Duffy, G., O'Mahony, R., Fanning, S., Blair, I.S., McDowell, D.A. (2006). Antimicrobial resistance in Irish isolates of verocytotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC). *International Journal of Food Microbiology* 109, 173-178.