

PREVALENZA DI *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* IN FORMAGGI OVINI A LATTE CRUDO E PROFILO ENTEROTOSSIGENICO

PREVALENCE OF STAPHYLOCOCCUS AUREUS STRAINS IN RAW SHEEP MILK CHEESE AND ENTEROTOXIGENIC PROFILE

Spanu V., Spanu C., Cossu F., Viridis S., Scarano C., De Santis E.P.L.

Sezione Ispezione degli Alimenti di Origine Animale, Dipartimento di Biologia Animale – Sassari

SUMMARY

The aim of the present study was to investigate the prevalence of *S. aureus* in raw sheep milk cheese and to assess the enterotoxigenic profile of the isolated strains. N.16 raw milk sheep cheese, collected from 8 artisan dairies, were analyzed to detect the presence of Coagulase Positive Staphylococci (CPS). In the frame of Regulation (EC) No 2073/2005 cheese samples were tested for the presence of staphylococcal enterotoxins (SEs) when a CPS count $>10^5$ cfu/g was detected. CPS isolates identified as *S. aureus* were analyzed using multiplex PCR for the detection of classical (*sea-see*) and enterotoxins-like (*seh, sek, sel, sem, seo, sep*) genes. *S. aureus* was recovered in all cheese samples and in 50% with levels $>10^5$ cfu/g. 14 strains carried at least one of the genes coding for enterotoxins. In none of the cheese samples SEs were detected. Although a correct acidification (pH 5.1-5.4 at 6 hours) was observed in dairies using natural starter culture, in cheese samples obtained from these dairies, CPS counts were greater ($P<0.05$) as compared with those where starter culture were not used. This result might be related to the main role of microbial competition on the control of *S. aureus* in early stage of cheesemaking. Further research is needed to better understand the effect of lactic acid bacteria competition on the growth of *S. aureus*.

KEYWORDS

S. aureus, raw milk sheep cheese, RPLA, enteroxins

INTRODUZIONE

Staphylococcus aureus (SA) può pervenire nel latte crudo in seguito ad infezioni intramammarie o a contaminazioni che derivano dalla cute e dalle mucose degli animali, dall'ambiente di allevamento, dagli operatori e dagli impianti di mungitura e raccolta (1). La moltiplicazione di SA e la produzione di tossine può verificarsi nel latte crudo non adeguatamente refrigerato o nelle prime fasi della caseificazione, per la presenza di condizioni favorevoli legate alla temperatura, al pH e all' a_w (2). Le tecnologie impiegate nella produzione artigianale di formaggi a latte crudo consentono un limitato controllo del rischio di incremento numerico di SA. Oltre all'assenza di un trattamento del latte mediante calore, la caseificazione non prevede, in genere, l'impiego di starter e della camera calda (3).

Studi condotti sulla prevalenza del patogeno lungo tutta la filiera di produzione di formaggi ovini, vaccini e caprini, hanno dimostrato che il livello di SA aumenta a partire dal latte crudo fino al raggiungimento del pH finale del formaggio, per poi diminuire progressivamente durante il periodo di stagionatura (4, 5). I dati sulla prevalenza di SA, si riferiscono soprattutto a ricerche condotte sui formaggi vaccini, mentre sono scarsi quelli riguardanti i formaggi a base di latte ovino. In uno studio condotto su 100 campioni di formaggio ovino, la prevalenza di SA si attestava intorno al 60%. In circa il 25% dei campioni le concentrazioni di SA erano comprese tra 10^5 e 10^6 ufc/g, e solo il 2,8% degli isolati produceva SEs (6). Livelli di contaminazione superiori a 10^5 ufc/g sono compatibili con la produzione di enterotossine stafilococciche (SEs) nell'alimento. Il Reg. CE 2073/2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti ali-

mentari, include gli Stafilococchi Coagulasi Positivi (SCP) tra gli indicatori di igiene di processo e prevede la ricerca delle SEs nei formaggi con livelli di contaminazione $>10^5$ ufc/g. La pericolosità di SA è condizionata dalla capacità di produrre le SEs, esotossine termostabili filogeneticamente correlate fra loro (7). Le SEs appartengono alla famiglia delle tossine pirogeniche ad attività superantigenica (PTSAgs), poiché stimolano la proliferazione di linfociti T non specifici (8). Oltre alle SEs classiche (SEA-SEE), che hanno rilevanza epidemiologica come agenti di malattia trasmessa da alimenti, sono state descritte altre tossine (SEs-like), con struttura e attività enterotossica simile (9). L'attività delle SEs si esplica entro 2-6 ore dall'ingestione dell'alimento contaminato, con sintomi a livello dell'apparato gastroenterico caratterizzati da nausea, diarrea, dolori addominali e, in alcuni casi, vomito. I prodotti lattiero caseari sono responsabili del 5-7% dei casi di malattia alimentare associata alla presenza di SEs preformate (10). In questi casi nei formaggi la SEA era prevalente, seguita dalla SED, in prodotti a base di latte vaccino, e dalla SEC, in quelli ottenuti da latte ovino e caprino (11, 12). Normalmente la patologia è autolimitante e si risolve in 24-48 ore dopo la comparsa dei sintomi. Occasionalmente, soprattutto in neonati e in soggetti anziani o immunodepressi, l'intossicazione risulta più severa e può richiedere l'ospedalizzazione (13). Lo scopo del presente lavoro è stato quello di determinare la prevalenza di SA in formaggi ovisi a latte crudo prodotti in caseifici artigianali della Sardegna e, nei campioni con SCP $>10^5$ ufc/g, la presenza delle enterotossine stafilococciche A-D. Negli isolati è stato inoltre definito il profilo enterotossigenico, mediante la ricerca dei geni *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seh*, *sek*, *sel*, *sem*, *seo* e *sep*.

MATERIALI E METODI

La ricerca è stata condotta su 16 campioni di formaggio a latte crudo di pecora provenienti da 8 caseifici artigianali della Sardegna. I campioni, rappresentativi di due differenti lotti di produzione per ciascun caseificio, venivano prelevati dopo 6 ore dall'inizio della formatura, fase in cui generalmente si riscontra il numero di SA più elevato (14). I caseifici selezionati erano annessi all'azienda zootecnica e la tecnologia di trasformazione faceva riferimento a quella tradizionale del Fiore Sardo. Le maggiori differenze rilevate riguardavano l'utilizzazione di siero innesso in 5 degli 8 caseifici. Presso ciascun caseificio si è proceduto a rilevare i dati tecnologici. Sono stati inoltre monitorati il pH e la temperatura del formaggio a partire dalla fase di formatura e nelle 6 ore successive (acidifica-

zione), mediante data-logger muniti di sonda (pH340i/SET, WTW, Germany). I campioni di formaggio sono stati trasportati refrigerati presso i laboratori e, successivamente, sottoposti ad analisi. Da ciascun campione venivano prelevati sterilmente 25 g di prodotto, posti in busta sterile e addizionati con 225 mL (1:10) di Buffered Peptone Water (BPW, Oxoid, UK). I campioni venivano sottoposti ad omogeneizzazione peristaltica (stomacher, PBI) per 3' e, dall'omogenato ottenuto, venivano allestite delle diluizioni decimali seriali in BPW. Di ciascuna diluizione, 0,1 mL venivano seminati su terreno selettivo agarizzato Baird-Parker+Rabbit Plasma Fibrinogen (BP+RPF, bioMérieux, France) per l'isolamento e la conta degli SCP, in accordo a quanto previsto dalla norma ISO di riferimento (15). Dopo incubazione a $+37$ °C per 24 ore veniva eseguita la conta delle colonie e, da ciascuna piastra risultata positiva, venivano isolate 2 colonie con caratteristiche tipiche. Su ciascun ceppo isolato venivano eseguiti test preliminari, quali: colorazione di Gram, catalasi, coagulasi libera (bioMérieux, France), legata (Oxoid, UK), TDNasi (Bio-Rad, USA), emolisi su agar sangue. I ceppi con caratteristiche riferibili agli SCP venivano identificati mediante test biochimico-metabolici (API ID 32Staph, bioMérieux, France). I ceppi identificati sono stati stoccati a -80 °C in Brain Heart Infusion broth (BHI, Oxoid, UK) addizionato con glicerolo (15% v/v). Sui campioni di formaggio con valori di SCP $>10^5$ ufc/g è stata effettuata la ricerca delle enterotossine SEA-SED mediante SET-RPLA (Oxoid, UK) secondo le indicazioni della casa produttrice. La sensibilità di determinazione per ciascuna tossina ricercata era $\approx 0,5$ ng/mL. Dopo estrazione del DNA, su ciascun isolato è stata eseguita una PCR di conferma per l'identificazione di specie mediante amplificazione della sub-unità *gyrA*, specifica per SA. Mediante multiplex PCR è stata effettuata la ricerca dei geni *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seh*, *sek*, *sel*, *sem*, *seo* e *sep* che codificano per le corrispondenti SEs. Gli amplificati ottenuti sono stati sottoposti ad elettroforesi su gel di agarosio (Bio-Rad, USA) all'1,5%. Dopo colorazione con bromuro di etidio, i gel venivano visualizzati mediante trans-illuminatore UV Gel-Doc XR e analizzati con il corrispondente software Quantity One (Bio-Rad, USA). È stata inoltre condotta l'analisi statistica mediante il test "t" di Student per confrontare le medie dei valori di pH e di SCP dei formaggi ottenuti con e senza siero innesso. Un modello lineare generalizzato è stato utilizzato per studiare l'effetto dei fattori caseificio e lotto di produzione sulla conta degli SCP. Tutte le analisi sono state condotte mediante il software Statgraphics Centurion XVI.

RISULTATI

Nei 16 campioni di formaggio analizzati è stata rilevata la presenza degli SCP in concentrazioni (media±DS) di $4,78 \pm 1,05 \log_{10} \text{ ufc/g}$, con range compreso tra 2,9 e $6,4 \log_{10} \text{ ufc/g}$. I valori di SCP e di pH ad inizio e a fine acidificazione, sono riportati in tabella 01. Negli 8 caseifici il pH alla formatura e alle 6 ore (media±DS) era, rispettivamente, pari a $6,61 \pm 0,13$ e $5,65 \pm 0,57$. Il pH rilevato alle 6 ore è risultato inferiore ($P < 0,01$) nei 5 caseifici che utilizzavano il sieroinnesto (tabella 02).

Sulla conta degli SCP il modello lineare generalizzato non ha evidenziato differenze in relazione al caseificio di provenienza ($P > 0,05$) e al lotto di produzione ($P > 0,05$). I livelli di contaminazione da SCP erano $> 10^5 \text{ ufc/g}$ nel 50% dei campioni analizzati. In questi formaggi le SEs A-D sono risultate non rilevabili. I 32 ceppi isolati da colonie con caratteristiche riferibili agli SCP, sono stati identificati come SA, in base al profilo biochimico-metabolico ed alla presenza del gene *gyrA*. Tutti gli isolati producevano TDNasi, coagulasi libera e legata. I ceppi mostravano 4 differenti pattern di emolisi: α -emolisi (n. 7), β -emolisi (n. 10), α/β -emolisi (n. 8), assenza di attività emolitica (n. 7). Dei 32 ceppi isolati 12 (37,5%) non portavano nessuno dei geni ricercati. In base alla presenza di uno o più geni che codificano per le SEs sono stati individuati 3 differenti profili enterotossigenici, P1 (*sec+sel*), P2 (*sem+seo*) e P3 (*sea+seo+sem*). I risultati relativi alla presenza dei geni che codificano per le SEs sono mostrati in tabella 03.

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

SA rappresenta uno dei principali agenti di malattia alimentare associata al consumo di formaggi, in particolare a latte crudo e prodotti in caseifici artigianali (16). La prevalenza di SA rilevata nel presente lavoro era pari al 100% dei campioni analizzati. AA hanno evidenziato, in formaggi a latte crudo ovino, una frequenza di isolamento compresa fra il 60-100% (12, 17). Tipicamente, durante la caseificazione, diverse fasi concorrono a mitigare il rischio associato alla presenza e moltiplicazione di SA nel formaggio, quali il trattamento termico del latte, l'utilizzo degli starter e l'acidificazione. Nel latte crudo, in caso di raffreddamento e refrigerazione non appropriati, e nel formaggio nelle prime 24 ore, si realizzano le condizioni di rischio più elevato. Nella fase iniziale della caseificazione si svolgono, con equilibri poco definiti, complesse interazioni di numerosi fattori, quali temperatura, pH e attività dell'acqua. Il rapido incremento numerico della microflora lattica

svolge un fondamentale ruolo di competizione microbica verso i patogeni e, successivamente, determina l'acidificazione della cagliata in seguito alla produzione di acido lattico. Nel corso della stagionatura le modificazioni che intervengono sulle caratteristiche chimico-fisiche del formaggio e delle temperature, creano condizioni che assicurano un efficiente controllo della crescita di SA e, più frequentemente, determinano la sua riduzione numerica (18). I valori medi di SCP sono risultati più elevati nei caseifici che utilizzavano l'innesto. Il ruolo esercitato sul controllo di SA da parte della competizione microbica e dalla riduzione del pH è tutt'ora oggetto di discussione. AA hanno dimostrato come l'azione della stessa coltura starter, utilizzata in differenti concentrazioni, non determina differenze significative sui livelli di SA alle 24 ore (19). Gli stessi autori evidenziano che differenze sono rilevabili solo dopo la salagione. In altri lavori non è stata riscontrata una relazione stretta tra azione acidificante dello starter ed il numero di SA (5). Inoculi con starter a basso potere acidificante si sono dimostrati infatti ugualmente efficienti nel controllare la moltiplicazione del patogeno (20). Anche i risultati della presente ricerca evidenziano come sia necessario approfondire lo studio dell'azione di competizione della microflora lattica. Infatti tra i caseifici artigianali inclusi in questo studio alcuni utilizzavano un sieroinnesto da colture naturali mentre in altri non era previsto l'impiego di starter. Nei primi il potere acidificante degli starter è evidenziato dall'evoluzione del pH, con valori alle 6 ore che risultavano soddisfacenti (5,1-5,4). Nei formaggi per i quali non venivano utilizzati starter il pH è risultato sensibilmente più elevato (6,1-6,4). Il numero dei SCP era più elevato ($P < 0,05$) nei formaggi ottenuti con impiego di sieroinnesto.

BIBLIOGRAFIA

1. Vautor, E., Abadie, G., Guibert, J.M., Huard, C., Pépin, M. (2003). Genotyping of *Staphylococcus aureus* isolated from various sites on farms with dairy sheep using pulsed-field gel electrophoresis. *Veterinary Microbiology*, 96, 69-79.
2. Delbes, C., Alomar, J., Chougui, N., Martin, J.F., Montel, M.C. (2006). *Staphylococcus aureus* Growth and Enterotoxin Production during the Manufacture of Uncooked, Semihard Cheese from Cows' Raw Milk. *Journal of Food Protection*, 69(9), 2161-2167.
3. Food Standard Australia New Zealand (2009). *Microbiological Risk Assessment of Raw Milk Cheeses*.
4. Pisano, M.B., Fadda, M E., Deplano, M., Corda, A., Casula, M. and Cosentino, S.

- (2007). Characterization of Fiore Sardo cheese manufactured with the addition of autochthonous cultures. *Journal of Dairy Research*, 74, 255-261.
5. Jakobsen, R.A., Heggebø, R., Sunde, E.B., Skjervheim, M. (2011). *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in Norwegian raw milk cheese production. *Food Microbiology*, 28, 492-496.
 6. Ertas, N., Gonulalan, Z., Yildirim, Y., Kum, E. (2010). Detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxins in sheep cheese and dairy desserts by multiplex PCR technique. *International Journal of Food Microbiology*, 142, 74-77.
 7. Balaban, N., Rasooly, A. (2000). Staphylococcal enterotoxins. *International Journal of Food Microbiology*, 61, 1-10.
 8. Becker, K., Friedrich, A.W., Lubritz, G., Weilert, M., Peters G., and von Eiff, C. (2003). Prevalence of Genes Encoding Pyrogenic Toxin Superantigens and Exfoliative Toxins among Strains of *Staphylococcus aureus* Isolated from Blood and Nasal Specimens. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(4), 1434-1439.
 9. Lina, G., Bohach, G.A., Nair, S.P., Hiramatsu, K., Jouvin-Marche, E., and Mariuzza, R. (2004). Standard Nomenclature for the Superantigens Expressed by *Staphylococcus*. *The Journal of Infectious Diseases*, 189, 2334-2336.
 10. European Commission Health & Consumer Protection Directorate-General (2003). Staphylococcal Enterotoxins in milk products, particularly cheeses.
 11. Morandi, S., Brasca, M., Lodi, R., Cremonesi, P., Castiglioni, B. (2007). Detection of classical enterotoxins and identification of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from milk and dairy products. *Veterinary Microbiology*, 124, 66-72.
 12. Argudín, M.Á., Mendoza, M.C. and Rodicio, M.R. (2010). Food Poisoning and *Staphylococcus aureus* Enterotoxins. *Toxins*, 2, 1751-1773.
 13. Le Loir, Y., Baron, F., and Gautier, M. (2003). *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genetic Molecular Research*, 2(1), 63-76.
 14. Scarano, C., Usai, G., Viridis, S., Cossu, F., Pilo, A.L., De Santis, E.P.L. (2007). Attività enterotossigenica e profilo di patogenicità in *S. aureus* isolato nel corso della produzione di formaggi di pecora al latte crudo. LXI Convegno Nazionale Società Italiana Delle Scienze Veterinarie, Salsomaggiore Terme (Pr) 26-29 Settembre.
 15. UNI EN ISO 6888-1/2 (2004). Microbiology of Food and Animal Feeding Stuff-Horizontal Method for the Enumeration of Coagulase-Positive Staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species): Technique Using Baird-Parker Agar Medium. International Organisation for Standardisation, Geneva.
 16. Jarraud, S., Mougel, C., Thioulouse, J., Lina, G., Meugnier, H., Forey, F., Nesme, X., Etienne, J., and Vandenesch, F., 2002. Relationships between *Staphylococcus aureus* Genetic Background, Virulence Factors, *agr* Groups (Alleles), and Human Disease. *Infection and Immunity* 70, 631-641.
 17. Tekinşen, K.K., Özdemir, Z. (2006). Prevalence of foodborne pathogens in Turkish Van otlu (Herb) cheese. *Food Control*, 17, 707-711.
 18. Valero, A., Pérez-Rodríguez, F., Carrasco, E., Fuentes-Alventosa, J.M., García-Gimeno, R.M., Zurera, G. (2009). Modelling the growth boundaries of *Staphylococcus aureus*: Effect of temperature, pH and water activity. *International Journal of Food Microbiology*, 133, 186-194.
 19. Gomez-Lucia, E., Goyache, J., Blanco, J.L., Vadillo, S., Garayzabal, J.F.F., Suarez, G. (1987). *Staphylococcus aureus* growth and survival during curding of Manchego type cheese produced with normal and subnormal starter activity. *Z Lebensm Unters Forsch*, 184, 304-307.
 20. Charlier, C., Cretenet, M., Even, S., Le Loir, Y. (2009). Interactions between *Staphylococcus aureus* and lactic acid bacteria: An old story with new perspectives. *International Journal of Food Microbiology*, 131, 30-39.

Tabella 01. Valori medi per caseificio del pH all'inizio della formatura, del pH dopo 6 ore e degli SCP (\log_{10} ufc/g) in 2 lotti di produzione.

Caseificio	A ¹	B ¹	C	D	E ¹	F ¹	G ¹	H
pH alla formatura	6,87 5,27	6,54 5,24	6,65 6,12	6,67 6,46	6,65 5,13	6,42 5,40	6,50 5,20	6,60 6,39
pH a 6 ore	5,27	5,24	6,12	6,46	5,13	5,40	5,20	6,39
SCP ^a	5,4	5,5	4,8	3,4	5,5	5,0	6,4	3,9

^aStafilococchi Coagulasi Positivi; ¹caseifici che utilizzavano il sieroinnesto.

Tabella 02. Confronto dei valori di pH all'inizio della formatura, pH dopo 6 ore e SCP (\log_{10} ufc/g) in relazione all'uso del sieroinnesto.

	campioni		siero-innesto		p-value
	n.	si	n.	no	
pH alla formatura acidificazione ¹	10	6,60±0,17	6	6,64±0,04	ns
pH a 6 ore acidificazione ¹	10	5,25±0,10	6	6,32±0,18	<0,01
SCP ^a	10	5,21±0,95	6	4,05±0,81	<0,05

^aStafilococchi Coagulasi Positivi

Tabella 03. Geni codificanti per le SEs in 32 ceppi di SA isolati da 8 casefici.

Caseificio	SEs SEs-like										
	sea	seb	sec	sed	see	seh	sek	sel	sem	seo	sep
A	-	-	4/4	-	-	-	-	4/4	-	-	-
B	-	-	2/4	-	-	-	-	2/4	-	-	-
C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D	-	-	2/4	-	-	-	-	2/4	-	-	-
E	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
G	-	-	-	-	-	-	-	-	2/4	2/4	-
H	4/4	-	-	-	-	-	-	-	4/4	4/4	-

Ricerca eseguita con finanziamento della Fondazione Banco di Sardegna anno 2010 e in parte con finanziamento RAS "Programma Operativo FSE Sardegna 2007-2013, Legge Regionale 7 agosto 2007, N.7 Promozione della ricerca e dell'innovazione tecnologica in Sardegna".