

ESCHERICHIA COLI O157 IN ALCUNI ALIMENTI: RISULTATI DEL PRIMO CICLO DEL PIANO DI MONITORAGGIO 2011 IN REGIONE PIEMONTE

Escherichia coli O157 in foodstuffs: first year results of monitoring plan in Piedmont region, 2011

Barbaro Antonio^{1*}, Rubinetti Francesca¹, Gallina Silvia², Adriano Daniela², Mogliotti Paola³, Fontana Ettore⁴, Maurella Cristiana¹, Chiavacci Laura¹, Decastelli Lucia².

*Corresponding author Tel: (+39) 0112686346; Fax: (+39) 0112485831. E-mail: antonio.barbaro@izsto.it
Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta

¹S.C. Epidemiologia e Osservatorio Epidemiologico, Torino, Italia

²S.C. Controllo Alimenti e Igiene delle Produzioni, Torino, Italia

³S.S. Sezione Asti e Centro Apistico Regionale, Asti, Italia

⁴S.S. Sezione Novara, Novara, Italia

ABSTRACT

A total of 260 food samples were examined for the presence of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157 (STEC O157). Samples were collected between May 2011 and September 2011 in Piedmont region and included 120 minced meat and meat preparation (hamburger and meat balls) and 180 soft and semi-soft cheeses made from raw milk with less than 60 days of ripening. Samples were collected at retail level. All samples were tested using an Enzyme Linked Fluorescent Assay (ELFA) (AFNOR BIO 12/8 - 07/00), with kit VIDAS® ECO (bioMérieux); if positive, the samples have been tested with VIDAS® ICE and spread onto selective media to allow the growth of the strains. If present, all the strains have been tested to detect the genes encoding the pathogen factors (stx1, stx2 and eae). STEC O157 was not detected in any products. This survey on the presence of STEC O157 in foodstuffs provided data, demonstrating a low prevalence of the pathogen in our Region.

Keywords: *E. coli* O157, Dairy products, Meat preparation, Survey, STEC

INTRODUZIONE

La direttiva CE 2003/99 sulle misure di sorveglianza delle zoonosi e degli agenti zoonotici, recepita nell'ordinamento nazionale con il Decreto Legislativo n. 191 del 04/04/2006, indica, tra gli agenti zoonotici da sottoporre a sorveglianza, i ceppi di *E. coli* produttori di verocitotossine (VTEC), anche noti come Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC). Questi ceppi vengono suddivisi in STEC O157 e STEC non-O157.

L'European Food Safety Authority (EFSA) nel report annuale "The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010" riporta 4000 casi confermati di infezione da *E. coli* (STEC), evidenziando un trend in aumento dei casi umani di infezione nell'Unione Europea dal 2008; il maggior numero di positività si riscontra soprattutto in bovini e carni

bovine, ma è possibile il riscontro del microorganismo anche in altre specie e prodotti derivati (EFSA, 2012).

La maggior parte dei casi umani di tossinfezione da *E. coli* è sostenuta da ceppi del sierotipo STEC O157 ma, è riportato un aumento dei casi ascrivibili a sierotipi STEC non O157 quali O26, O111, O103 e O145 (EFSA, 2009). I ruminanti, e principalmente il bovino, sono considerati i principali reservoir per le infezioni umane sostenute da STEC O157; questi ceppi raramente causano malattia negli animali, motivo per cui i bovini possono essere eliminatori asintomatici. I ceppi STEC sono capaci di indurre nell'uomo quadri sintomatologici estremamente variabili: il quadro clinico può evolvere da una lieve diarrea di tipo acquoso, in colite emorragica, eventualmente complicata dalla sindrome emolitico-uremica (SEU). La fascia di età più colpita risulta essere quella costituita dai bambini e dagli anziani. La prevalenza di infezione risulta

bassa, ma, vista la gravità delle patologie cui da esito, sono considerate tra le più importanti malattie a trasmissione alimentare (MTA) (EFSA, 2007).

Al fine di approfondire le conoscenze relative alla diffusione di STEC O157 in alcune tipologie di alimenti, la regione Piemonte ha attivato uno specifico piano di monitoraggio.

In questo lavoro sono riportati i risultati del primo ciclo di campionamento.

MATERIALI E METODI

Per valutare la presenza di STEC O157 sul territorio piemontese, si è deciso di strutturare un piano di monitoraggio *ad hoc*; poiché il bovino è considerato il maggior serbatoio naturale di STEC O157, si è deciso di concentrare l'attività di campionamento su alimenti prodotti con carne o latte di questa specie e, in particolar modo, su matrici che per modalità di consumo spesso legate al territorio, come ad esempio carne macinata da consumarsi cruda, o di produzione, come i formaggi a latte crudo, possono rappresentare un pericolo per il consumatore. Il monitoraggio è stato quindi indirizzato ad alimenti quali carni macinate, preparazioni di carni (hamburger e polpette), e formaggi a pasta molle e semi-molle con stagionatura inferiore a 60 giorni prodotti con latte crudo.

È stato impostato uno studio di prevalenza così articolato:

1. Formaggi a pasta molle e semi-molle ottenuto da latte crudo vaccino: N=240 (P=2%; errore massimo tollerato=1,77%; livello di confidenza=95%)
2. Carne macinata destinata ad essere consumata cruda e preparazioni di carni (polpette e hamburger): N=360 (P=2%; errore massimo tollerato=1,45%; livello di confidenza=95%).

Il piano è stato articolato in due cicli: il primo da eseguirsi nel periodo maggio-ottobre 2011, il secondo nel periodo maggio-ottobre 2012.

La numerosità campionaria programmata per il primo ciclo è stata il 50% di ciascuna tipologia dei campioni totali previsti; ad ogni Azienda Sanitaria Locale (ASL) piemontese sono stati assegnati 25 campioni da prelevare in fase di commercializzazione scegliendoli in modo casuale. Tutte le informazioni caratterizzanti il singolo prelievo sono state riportate su un verbale *ad hoc*. Il campione è stato ripartito in 4 o 5 aliquote e ogni aliquota era costituita da 5 unità campionarie di almeno 50 grammi di prodotto. Nel caso di alimento prossimo alla scadenza o con una shelf-life inferiore a 8 giorni è stato effettuato un campionamento in aliquota unica con analisi unica e irripetibile, in accordo

a quanto previsto dal Regolamento (CE) 882/2004.

Le analisi di laboratorio prevedevano un protocollo articolato in due fasi distinte:

1. ricerca di *E. coli* O157: applicazione di una metodica ELFA (enzyme linked fluorescent assay), seguendo quanto previsto dal protocollo AFNOR BIO 12/8 - 07/00 mediante l'utilizzo dell'apparecchiatura miniVIDAS e del un kit VIDAS® ECO (bioMérieux); in caso di positività si procede all'immunoconcentrazione con il kit VIDAS® ICE (bioMérieux) e al successivo isolamento microbiologico su terreni selettivi (SMAC e CT-SMAC), secondo quanto previsto dalla norma ISO 16654.
2. ricerca fattori di patogenicità: a tal fine si utilizzano metodi di biologia molecolare sui ceppi identificati come *E. coli* O157 nella fase analitica precedente. La ricerca dei fattori di patogenicità consiste nell'utilizzo di una metodica in Real Time PCR (metodo fornito dal CRL per gli *E. coli* - ISS) per valutare la presenza dei geni codificanti per la produzione delle tossine (*stx1* e *stx2*) e, qualora uno dei due fosse risultato positivo, dell'intimina (*eae*). Sono considerati positivi (*E. coli* O157 verocitotossici) i ceppi che presentano almeno uno dei geni per la produzione delle tossine e il gene per l'intimina.

RISULTATI

Sono stati prelevati e consegnati presso i laboratori controllo alimenti dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta 260 campioni: 60 carni macinate, 122 preparazioni di carni e 78 formaggi a latte crudo.

Cinque campioni sono risultati positivi con metodo VIDAS® ECO ma da nessuno di questi sono state isolate colonie caratteristiche dopo immunoconcentrazione; in assenza di isolamento di *E. coli* O157, quindi, non è stato possibile testare i campioni per la ricerca dei fattori di patogenicità con il metodo biomolecolare.

Sono stati effettuati l'87% dei campioni previsti; non avendo riscontrato alcuna positività, allo stato attuale si può affermare che l'eventuale livello di contaminazione batterica nelle matrici oggetto di studio non sarebbe superiore all'1,14%.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

Poco si sa sulla prevalenza di malattia nell'uomo in Italia ed Europa, anche a causa di una sottostima dovuta ai casi meno gravi che

spesso non sono registrati come malattia o in cui l'agente eziologico non è riconosciuto. I bassi livelli di contaminazione degli alimenti, riportati in Italia e in Europa dai dati bibliografici disponibili (Kousta, 2010; Conedera, 2004; Stampi, 2004; Coia, 2001), sono verosimilmente legati alla mancanza di piani di monitoraggio specifici strutturati.

Per il territorio piemontese, causa la mancanza di dati epidemiologici pregressi, è stato difficile individuare la prevalenza attesa di contaminazione nelle matrici alimentari oggetto di studio.

Il quadro che emerge dai risultati della prima fase del piano di monitoraggio in Piemonte è confortante per l'assenza di riscontri di ceppi di *E. coli* O157. Se i risultati, a conclusione del piano di monitoraggio, dovessero essere in linea con quelli attuali, si potrà sostenere che il livello di contaminazione dei prodotti "indagati" sia trascurabile.

Tuttavia poiché anche altri sierogruppi di *E. coli*, indicati come "STEC non O157" sono in grado di produrre verocitotossine e di causare malattia nell'uomo, per verificare l'eventuale ruolo di questi patogeni, il nostro Istituto ha in uso dal 2012 la metodica validata e accreditata per la ricerca di altri sierogruppi (*E. coli* O26, O111, O103 e O145) che sarà utilizzata per i campioni analizzati nel 2012.

BIBLIOGRAFIA

1. Coia JE., Johnston Y., Steers NJ., Hanson MF. A survey of the prevalence of *Escherichia coli* O157 in raw meat, raw cow's milk and raw-milk cheeses in south-east Scotland. (2001). INT J FOOD MICROBIOL, Volume 66, Issues 1-2, 21 May 2001, Pages 63-69
2. 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 Original Research Article. INT J FOOD MICROBIOL, Volume 96, Issue 1, 1 October 2004, Pages 67-73
3. EFSA (European Food Safety Authority), 2007 Monitoring of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) and identification of human pathogenic VTEC types. Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards. The EFSA Journal (2007); 579, 8-61
4. EFSA (European Food Safety Authority), 2009. Technical specifications for the monitoring and reporting of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) on animals and food (VTEC surveys on animals and food). The EFSA Journal 2009; 7(11):1366
5. EFSA (European Food Safety Authority), 2012. European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010. The EFSA Journal 2012; 10(3):2597 [442 pp.
6. Kousta M, Mataragas M, Skandamis P., Drosinos E. H. (2010). Prevalence and sources of cheeses contamination with pathogens at farm and processing levels Review Article. Food Control, Volume 21, Issue 6, June 2010, Pages 805-815
7. Stampi S., Caprioli A., De Luca G., Quaglio P., Sacchetti R., Zanetti F.. Detection of *Escherichia coli* O157 in bovine meat products in northern Italy. (2004). INT J FOOD MICROBIOL, Volume 90, Issue 3, 1 February 2004, Pages 257-262