

VENDITA DIRETTA DI LATTE CRUDO: VALUTAZIONE DI *E. SAKAZAKII*, *COXIELLA BURNETII* E *M. PARATUBERCULOSIS* NELL'ESPERIENZA PIEMONTESE

RAW MILK AT VENDING MACHINES: EVALUATION OF *E. SAKAZAKII*, *COXIELLA BURNETII* AND *M. PARATUBERCULOSIS* IN PIEDMONT EXPERIENCE

Gallina S.¹, Bianchi D.M.¹, Fontana E.², Gennero M.S.³, Dalmasso A.⁴,
Civera T.⁴, Bottero M.T.⁴, Decastelli L.¹

(¹) S.C. Controllo Alimenti e Igiene delle Produzioni, IZS Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino

(²) Sezione di Novara, IZS Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Novara

(³) Laboratorio Sierologia, IZS Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino

(⁴) Settore di Ispezione degli Alimenti di Origine Animale, Facoltà Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Torino, Grugliasco

SUMMARY

Italian consumers changed their food habits in the last period; the increase of raw milk consuming is also related to the high number of self service vending machines that have been authorized, particularly in Northern Italy. According to national rules on raw milk hygienic conditions, the most important bacteria are checked by Veterinary Services; the aim of this study was to investigate some emerging or re-emerging hazards in raw milk at vending machines. For this reason 100 raw milk samples were collected and analyzed in order to detect *E. sakazakii*, *Coxiella burnetii* and *M. avium subsp paratuberculosis*. One milk sample resulted to be positive with PCR method for *E. sakazakii* (no cultural confirmation was possible); 49% of samples resulted positive for the presence of *Coxiella burnetii* specific DNA, and 5% of milk samples came out positive to the presence of *M. paratuberculosis* antibodies with ELISA methods.

KEY WORDS

Raw milk at vending machines, *E. sakazakii*, *Coxiella burnetii*, *M. paratuberculosis*

INTRODUZIONE

Le abitudini alimentari hanno subito di recente alcuni sostanziali cambiamenti modificando, nell'ultimo decennio, il tradizionale paniere alimentare. Questi cambiamenti riflettono in parte la moderna società cosmopolita (basti pensare, per esempio, al consumo di piatti etnici e di preparazioni o prodotti "esotici"); in altri casi, le modifiche alle abitudini alimentari sono dettate dalle nuove esigenze delle famiglie che trascorrono sempre meno tempo in casa e, avendo poco tempo per cucinare, preferiscono ali-

menti ready-to-eat, piatti precotti, congelati o refrigerati. Accanto alle scelte alimentari di tipo sociale o dettate dalla frenesia della vita moderna, si affaccia prepotente anche una tipologia di consumo alimentare cosiddetto "emozionale", per cui il ritorno al naturale, al biologico, al non trattato fa parte di una rievocazione del passato che affascina il consumatore moderno.

All'interno di questa spinta emozionale si inserisce il recente fiorire di distributori automatici di latte crudo che, a fine 2008, vede autorizzati oltre 1100 erogatori sul territorio nazionale (circa 110 in

Piemonte). I criteri microbiologici che il latte crudo deve soddisfare sono contenuti nel Reg. CE 853/2004 (1) che stabilisce indicazioni specifiche in materia di alimenti di origine animale. Inoltre, la cessione diretta di latte crudo mediante macchine erogatrici è disciplinata in dettaglio dalla Intesa Stato Regioni del 25 gennaio 2007 (2). Tale Intesa prevede una serie di controlli microbiologici da effettuare in autocontrollo e da parte degli organi di controllo ufficiale, al fine di garantire standard ottimali per ciò che riguarda le caratteristiche igienico-sanitarie del prodotto e di perseguire un elevato livello di protezione per il consumatore.

In questo lavoro vengono riportati i risultati di un progetto di ricerca che ha voluto indagare la prevalenza di patogeni emergenti o riemergenti (*E. sakazakii*, *Coxiella burnetii* e *M. avium* subsp *paratuberculosis*) valutando la positività in campioni di latte prelevati alle macchine erogatrici.

MATERIALI E METODI

Nell'ambito del progetto di ricerca volta a valutare la prevalenza di *E. sakazakii*, *C. burnetii* e *M. paratuberculosis*, sono stati analizzati 100 campioni di latte crudo prelevati al distributore presenti sul territorio della Regione Piemonte. Il prelievo presso il distributore è avvenuto in unica aliquota costituita da un'unica unità campionaria.

Come descritto in tabella 1 per la ricerca di *E. sakazakii* sono stati impiegati 3 diversi metodi. Il primo di questi è una tecnica end-point PCR (3) che prevede l'amplificazione di un frammento del gene 16 S (952pb) specifico per *E. sakazakii*. Inoltre è stato applicato un saggio in real-time PCR con l'utilizzo di un kit commerciale: entrambi i metodi sono stati applicati ai campioni di latte previa incuba-

zione della matrice con BPW (Buffered Peptone Water – Oxoid) in rapporto 10:90, per 18±2 ore a 37 °C. Per l'esecuzione delle analisi volte a determinare la positività per *C. burnetii* e *M. paratuberculosis* si sono applicati i protocolli suggeriti dalle ditte produttrici dei kit commerciali, ai quali si rimanda per ulteriori dettagli.

Le analisi sono state effettuate presso i laboratori Sierologia e Controllo Alimenti (sedi di Torino e Novara) dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta presso e presso il Dipartimento di Patologia animale (Settore di Ispezione degli alimenti di origine animale) dell'Università degli Studi di Torino.

RISULTATI

Per quanto riguarda la ricerca di *E. sakazakii* un campione ha presentato l'amplificato atteso (952 pb) solamente mediante end-point PCR, identificazione confermata anche mediante sequenziamento. Il kit commerciale in real-time PCR per l'identificazione di *E. sakazakii* non ha permesso di identificare nessun campione positivo così come l'isolamento microbiologico con metodo ISO.

Dei 100 campioni sottoposti ad analisi con kit Real-time PCR per il rilevamento di *Coxiella burnetii*, 49 sono risultati positivi. Tra questi 49 campioni positivi è presente anche il campione già positivo per *E. sakazakii*. Non è stato possibile includere nello studio metodi biologici di isolamento su colture cellulari di *C. burnetii* e pertanto i campioni positivi non sono stati confermati con altro metodo.

Il kit per la ricerca di anticorpi anti-paratuberculosis ha permesso di identificare 5 campioni di latte positivi (5%).

Tabella 1: metodi analitici impiegati per l'analisi dei campioni relativamente alla ricerca di microrganismi extra piano di monitoraggio

Analisi	Metodo utilizzato	
<i>E. sakazakii</i>	End-point PCR	Hassan et al., 2007
	Realt-time PCR	TaqMan@AppliedBiosystem
	Isolamento microbiologico	ISO 22964
<i>C. burnetii</i>	Real-time PCR	TaqVet™ LSI France
<i>M. paratuberculosis</i>	ELISA	Pourquier ®

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

Ad oggi, secondo quanto previsto dal Reg. CE 2073/05 (4) e successive modifiche (5), *E. sakazakii* è un criterio microbiologico per gli alimenti in polvere per lattanti; anche per tale motivo i lavori presenti in bibliografia sono incentrati su tali matrici, mentre pochi studi si riferiscono a latte alimentare. Tuttavia, in uno studio condotto su latte di tank nel 1999 (6) sono state rilevate percentuali di positivi del tutto in linea con i dati ottenuti nel corso della nostra ricerca. *E. sakazakii* è stato identificato solo mediante PCR e non è stato possibile isolarlo con il metodo ISO, probabilmente per una minore sensibilità dei metodi microbiologici rispetto a quelli di biologia molecolare o alla presenza di forme vitali ma non coltivabili.

Per ciò che riguarda *Coxiella burnetii* non esistono ad oggi requisiti normativi che ne impongano la ricerca nella matrice latte e in altre matrici alimentari. Inoltre, in considerazione del quadro clinico modesto o dell'assenza di sintomi eclatanti, è un patogeno raramente ricercato anche in ambito di sanità animale e la sua ricerca è limitata a casi in cui è forte il sospetto diagnostico o laddove vi siano indagini epidemiologiche legate ad isolamento in endocarditi in umana. La ricerca di *Coxiella burnetii*, inoltre, presenta notevoli difficoltà metodologiche; l'isolamento, infatti, risulta indaginoso e richiede laboratori attrezzati per l'allestimento di colture cellulari. Dalla bibliografia, recenti lavori svolti presso l'IZS Lombardia e Emilia Romagna sulla medesima matrice latte, hanno evidenziato dati in linea con i nostri risultati, con percentuali di positività dal 40% al 47% (7-8). Tuttavia elevate percentuali di positività per *Coxiella* nei campioni di latte rappresentano un potenziale rischio per la salute pubblica al quale per altro si associano episodi di infezioni umane solo in casi sporadici; questa discrepanza può essere legata al fatto che l'infezione umana comporta sintomi simil influenzali e quasi sempre autolimitanti; solo in alcuni casi si osservano gravi endocarditi, che impongono spesso interventi di sostituzione delle valvole cardiache. In relazione agli elevati valori di positività riscontrati sarebbe opportuno approfondire lo studio confermando le positività in PCR con tecniche di isolamento su coltura cellulare. Per quanto riguarda *M. paratuberculosis*, la sensibilità del metodo utilizzato nel progetto risulta essere non elevatissima (40%; IF 95%: 26%-55%), come già evidenziato da precedenti lavori bibliografici (9). Nonostante tali performance il kit ha rilevato un 5% di positività; la reale prevalenza del *M. paratuberculosis* non è disponibile in quanto le

aziende fornitrici dei distributori automatici non dispongono di esiti analitici relativi ad indagini pregresse per l'isolamento del batterio da materiale fecale o per la ricerca anticorpale da siero. Dati bibliografici riportano percentuali di positività discordanti con valori che vanno da 0.7% di positività per indagini eseguite con metodi di biologia molecolare (7) a 47% per indagini eseguite con metodiche immunoenzimatiche (10). Gli studi ad oggi presenti tendono ad associare il *M. avium sub. paratuberculosis* all'insorgenza del morbo di Chron nell'uomo con conseguente ileite cronica; sebbene questa correlazione non sia ancora stata univocamente confermata, l'argomento pare degno di ulteriori approfondimenti, anche in relazione alla termoresistenza del microrganismo.

In conclusione il quadro che appare dallo studio risulta confortante per la bassa prevalenza di *E. sakazakii* mentre, le elevate positività riscontrate per *C. burnetii*, necessitano di un approfondimento ulteriore per chiarire l'effettivo rischio per il consumatore relativamente alla dose infettante e alla presenza di microrganismi vivi e vitali.

In ultimo pare opportuno segnalare come le scarse positività rilevate per *M. paratuberculosis* potrebbero essere oggetto di valutazioni aggiuntive; infatti, la scarsa sensibilità della metodica disponibile potrebbe sottostimare la reale prevalenza del batterio. La succitata termoresistenza di *M. paratuberculosis*, riportata anche da altri autori (11), inoltre, potrebbe rendere inefficace l'applicazione dell'OM (12), che impone il consumo previa bollitura, non essendo il trattamento termico in grado di eliminare il patogeno.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Reg. (CE) n. 853/2004 Regolamento del Parlamento europeo e del Consiglio che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale.
- 2) Intesa, ai sensi dell'articolo 8, comma 6, della legge 5 giugno 2003, n° 131, tra il Governo, le regioni e le Province autonome di Trento e di Bolzano in materia di vendita diretta di latte crudo per l'alimentazione umana. Rep. N. 5/C5R del 25 gennaio 2007.
- 3) Hassan A, Akinedena O, Kressa C, Estuningsihb S, Schneider E and Usleber E. "Characterization of the gene encoding the 16S rRNA of *Enterobacter sakazakii* and development of a species-specific PCR method" *International Journal of Food Microbiology* 116 (2007) 214-220.

- 4) Reg. (CE) n. 2073/2005 della Commissione del 15 novembre 2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari.
- 5) Reg (CE) N. 1441/2007 della Commissione del 5 dicembre 2007 che modifica il regolamento (CE) n. 2073/2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari
- 6) Jayarao BM, Wang L. A Study on the Prevalence of Gram-Negative Bacteria in Bulk Tank Milk. *Journal of Dairy Science* Vol. 82, 1999, No. 12 2620-2624
- 7) Bertasi B, Maccabiani G, Titola M, Daminelli P, Boni P. Presenza di *Coxiella burnetii* e *M. paratuberculosis* nel latte crudo: monitoraggio mediante tecniche di biologia molecolare. *Atti X Congresso Nazionale SIDiLV*, 2008, pag 103-104.
- 8) Magnino S, Vicari N, Boldini M, Rosignoli C, Nigrelli A, Andreoli G, Pajoro M, Fabbi M. Rilevamento di *Coxiella burnetii* nel latte di massa di alcune aziende bovine lombarde. *Large Animal Review*, 2009; 15: 3-6.
- 9) Arrigoni N, Bellelli GL, Cammi G, Taddei R, Pravettoni D, Belloli A, Tamba. Diagnosi di paratuberculosis bovina: valutazione di un test ELISA del commercio di siero di latte di animali infetti in forma subclinica. *Atti VI Congresso Nazionale SIDiLV*, 2004, pag 167-168
- 10) Nielsen SS, Thamsborg SM, Houec H, Bitscha V. Bulk-tank milk ELISA antibodies for estimating the prevalence of paratuberculosis in Danish dairy herds. *Preventive Veterinary Medicine* Volume 44, Issues 1-2, 29 March 2000, Pages 1-7.
- 11) Grant IR, Ball HJ, Michael T., Rowe MT. Incidence of *Mycobacterium paratuberculosis* in Bulk Raw and Commercially Pasteurized Cows' Milk from Approved Dairy Processing Establishments in the United Kingdom. *Applied and Environmental Microbiology*, May 2002, p. 2428-2435, Vol. 68, No. 5
- 12) Ordinanza Ministeriale 10/12/2008: "Misure urgenti in materia di produzione, commercializzazione e vendita diretta di latte crudo per l'alimentazione umana". *Gazzetta Ufficiale Repubblica Italiana* n. 10, del 14/01/2008.

Finanziamento Ricerca Corrente 2007 (IZS PLV03/2007)
"Valutazione del rischio per il consumatore legato alla presenza di *Coxiella burnetii* ed *Enterobacter sakazakii* in latte crudo e in formaggi freschi a latte crudo"