

Caratterizzazione di ceppi di *Staphylococcus aureus* isolati da alimenti destinati all'uomo

Elisabetta Di Giannatale, Vincenza Prencipe, Alfreda Tonelli,
Cristina Marfaglia & Giacomo Migliorati

Riassunto

E' stata condotta un'indagine per valutare la contaminazione da *Staphylococcus aureus* di alcune categorie di alimenti di origine animale. Dei 350 prodotti esaminati il 14,0% è risultato contaminato da *S. aureus*, con prevalenze variabili a seconda del gruppo di alimenti considerato: 19,3% per i preparati di carne fresca; 13,3% formaggi freschi; 3,6% per i prodotti di pasticceria e 7,7% per le preparazioni gastronomiche. I ceppi di *S. aureus* isolati sono stati sottoposti a conferma dell'identificazione della regione 16S rDNA e successivamente sottoposti al test di agglutinazione inversa al lattice (SET-RPLA, Oxoid) per individuare quelli enterotossigeni. I risultati sono stati confrontati con i dati ottenuti sottoponendo gli stessi ceppi alla ricerca dei geni codificanti le enterotossine (SE) *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see*, *seg*, *seh*, *sei* e la *Toxic Shock Syndrome Toxin-1* (TSST-1). Al test RPLA (8/49) il 16,3% dei ceppi sono risultati produttori di enterotossine mentre alla PCR (24 /49) il 48,97% sono risultati portatori di uno o più geni per la produzione di SE e, quindi, potenzialmente enterotossigeni.

Parole chiave

Alimenti, Enterotossine, Italia, Polymerase chain reaction, Reverse latex agglutination test, RPLA, Sicurezza, *Staphylococcus aureus*.

Introduzione

Lo *Staphylococcus aureus* è uno degli agenti batterici frequentemente identificato come causa di tossinfezione alimentare. In Europa,

tra il 1993 ed il 1998, i focolai tossinfettivi causati da *S. aureus* hanno fatto registrare percentuali variabili tra 0,9% (Olanda) e 13,6% (Francia). In Italia l'1,8% delle tossinfezioni notificate nel 1998 sono state attribuite a questo microorganismo. Negli USA è stato stimato che ogni anno si verificano 185.000 casi di tossinfezione da enterotossine stafilococcica di cui 1750 soggetti ospedalizzati e 2 decessi (12, 29).

L'ampia diffusione di soggetti portatori di *S. aureus* (superiore al 30-50% della popolazione), la contaminazione dell'alimento o di un suo ingrediente durante la manipolazione, la permanenza del prodotto a temperature non idonee e la capacità del microorganismo di svilupparsi in un ampio spettro di condizioni di pH, di acqua libera e concentrazione di Cloruro di sodio e quindi su una vasta gamma di prodotti alimentari, rappresentano le principali caratteristiche epidemiologiche che creano le condizioni idonee per l'insorgere di tossinfezione da *S. aureus*.

Dalle indagini condotte in occasione di focolai tossinfettivi, è emerso che la carne ed i prodotti a base di latte, sono risultate le matrici più frequentemente coinvolte (18, 30). E' basilare, nella determinazione della contaminazione di prodotti alimentari, la valutazione dello stato sanitario degli animali destinati alla produzione degli alimenti sia come soggetti portatori sia come infetti (18). Il latte crudo è noto come veicolo per la trasmissione di microrganismi patogeni con un alto numero di campioni positivi per *S. aureus*. In letteratura sono riportati dati contrastanti: Oliver *et al.*

(24) riportano una percentuale di latte crudo contaminato da *S. aureus* del 27,4-37% nei caseifici; D'Amico *et al.* (10) hanno riportato bassi livelli percentuali di isolamento.

I criteri di tolleranza attualmente in vigore sulla presenza *S. aureus* e relative tossine nei formaggi freschi e nella carne sono stabiliti nel regolamento (CE) 1441/2007 (8). Gli alimenti comunemente associati all'intossicazione stafilococcica sono carne (manzo, maiale e pollo) e prodotti a base di carne (prosciutto e salumi), insalate, paste alla crema e prodotti lattiero-caseari.

In Italia, nel biennio 2000-2002 è stato condotto uno studio in cui sono stati esaminati 9.869 campioni di alimenti di origine animale prelevati presso punti vendita distribuiti su tutto il territorio nazionale. Di questi, 19,7% è risultato contaminato da *S. aureus*. Anche in questo caso i prodotti carnei e lattiero caseari sono risultate le matrici più frequentemente contaminate (rispettivamente il 23,1% ed il 20,7%). Altre preparazioni, come i prodotti di pasticceria (3,5%), le paste alimentari (7,6%) e le preparazioni gastronomiche (6,4%) hanno invece mostrato un ruolo secondario (13).

Un ruolo rilevante nella contaminazione indiretta dei prodotti da *S. aureus* è svolto dalle superfici di lavoro e dalle attrezzature impiegate nella preparazione degli alimenti; uno studio finalizzato a valutare le condizioni igieniche di lavorazione degli alimenti in una struttura di catering ha rilevato che il 25 % dei campioni di superfici prelevati è risultato contaminato da *S. aureus* e, nella stessa struttura, il 71,7% dei prodotti pronti per il consumo, manipolati dopo trattamento termico, risultava contaminato (19).

L'azione patogena di questo microrganismo è determinata dalla capacità di alcuni ceppi di sintetizzare una o più enterotossine (SEs). La percentuale di ceppi enterotossigeni è stata stimata essere circa il 25 % dei ceppi isolati (18), tuttavia i dati derivanti dalle indagini condotte su alimenti forniscono valori superiori e comunque variabili in relazione alla SE considerata. In uno studio condotto in Italia il 45,2% dei ceppi isolati dai prodotti carnei è risultato produttore di enterotossine: SEC

(51,5%), SEA (30,3%) e in misura minore SEB e SED. Il 59,9% dei ceppi isolati da prodotti lattiero caseari sono risultati produttori di enterotossina: SEA (26,7%), SEC (28,1%) SED (25,8%), SE (A, D) (28,8%) (13).

La produzione di SE può iniziare a partire da basse concentrazioni batteriche ($10^3/g$) e dopo tempi di incubazione di 2 ore a 37°C e nell'uomo i sintomi si possono manifestare, per ingestione di quantità di tossina molto piccola (0,5 ng/ml) (2). Una delle principali proprietà delle SE è rappresentata dalla termoresistenza. Questa caratteristica può essere esaltata da condizioni chimico fisiche dell'alimento (pH, concentrazione di cloruro di sodio) che possono determinare il mantenimento dell'attività biologica anche dopo trattamenti termici di sterilizzazione industriale (2, 18).

Alcuni ceppi di *S. aureus* sono in grado di produrre una o più esoproteine addizionali quali la *toxic shock syndrome toxin-1* (TSST-1) (11, 21, 23, 26, 27). Questa sindrome nell'uomo determina un'alterazione del sistema immunitario e l'azione patogenetica è scatenata dall'induzione del rilascio massivo di citochine, dallo stato di ipersensibilità ad endotossine autoprodotte dall'organismo e dal danno vascolare determinato sia dalla liberazione di sostanze vasoattive sia dall'azione diretta della tossina sull'endotelio (11).

La TSST-1 è stata identificata come causa di lesioni riscontrate in neonati deceduti per morte infantile acuta, o in forme cardiache diagnosticate in soggetti affetti dalla sindrome di Kawasaki; negli Stati Uniti la TSST-1 è stata identificata come la causa di una forma infantile di cardiopatia acquisita (11). Alcuni autori hanno ipotizzato un ruolo della TSST-1 nella patogenesi delle mastiti stafilococciche bovina e ovicaprina sulla base dell'identificazione di ceppi di *S. aureus* portatori del gene *tst* e produttori di tossina sia da soggetti con manifestazioni cliniche che subcliniche. L'azione patogenetica non è stata ancora definita anche se si attribuisce alla TSST-1 la capacità di agire come superantigene nei confronti del sistema immunitario mammario (30).

Questo studio rappresenta il resoconto della valutazione del livello di contaminazione da *S. aureus* di alcune categorie di alimenti di origine animale e della caratterizzazione dei ceppi enterotossigeni, non epidemiologicamente correlati, con un metodo basato sulla *Polymerase Chain Reaction* (PCR) per l'identificazione dei geni codificanti la produzione delle SE (17, 20) e TSST-1 (3, 4, 14, 28). Sulla scorta di tali informazioni sono stati confrontati i risultati ottenuti con la PCR circa la presenza nei ceppi in esame dei geni codificanti le enterotossine, con i dati ottenuti dall'applicazione del test di agglutinazione al lattice (RPLA) per la rilevazione della tossina prodotta *in vitro* dagli stessi.

Materiali e metodi

Campionamento

Nell'arco di un anno, sono stati esaminati 350 campioni di alimenti selezionati per la loro facile reperibilità e perché di largo consumo tra i quali carni, formaggi freschi, prodotti di pasticceria e preparazioni gastronomiche.

I prodotti sono stati prelevati in Abruzzo presso rivendite al dettaglio e trasferiti rapidamente in condizioni di refrigerazione al laboratorio che ha eseguito le prove

Numerazione di *Staphylococcus aureus*

La numerazione di *Stafilococchi coagulasi positivi* è stata eseguita secondo le modalità operative riportate nella seconda parte della ISO 6888:1999. Al termine del periodo di incubazione a 37°C, le colonie tipiche sono state subcolturate su triptycase soy broth (TSA, Biolife Italiana, Milano) e sottoposte al test al lattice Staphylect plus (Oxoid, Basingstoke) per l'identificazione di *S. aureus*, secondo quanto previsto dal metodo AOAC 995.12:2000. L'identificazione biochimica è stata successivamente completata in micro-metodo con il sistema API Staph (BioMérieux, Marcy l'Étoile) secondo le indicazioni del produttore.

Identificazione dei ceppi con 16SrDNA e rilevazione dei geni codificanti le Ses

I ceppi di *S. aureus* isolati dagli alimenti sono stati confermati in PCR con l'identificazione della regione 16SrDNA (14, 15). Le sequenze oligonucleotidiche dei primers per la regione 16SrDNA sono riportate in Tabella I e concordano con le sequenze di DNA pubblicate via BLAST (www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide).

Produzione e identificazione delle enterotossine

I ceppi identificati e confermati come *S. aureus* sono stati saggiati per la produzione di enterotossine SEA, SEB, SEC, SED (SEA-SED). Dopo inoculo in *Brain Infusion Broth* (Oxoid) e crescita a 37°C per 24 h, la brodocoltura è stata esaminata con il test *Reverse Passive Latex Agglutination* (SET-RPLA, Oxoid, Inghilterra) in accordo con le istruzioni del produttore.

Le sequenze dei geni *sea* (5), *seb* (16), *sec* (7), *sed* (5), *see* (9), *seg* (22), *seh* (25), *sel* (6), *tst* (4) sono stati sintetizzati dal Laboratoires Europio (Francia) e utilizzati senza ulteriori purificazioni.

Per l'identificazione di geni *sea*, *seb*, *sec*, *sed*, *see* e *tst* sono state eseguite PCR singole secondo quanto descritto in letteratura (1).

Per *seh*, *seg*, *sei* e per la regione 16SrDNA è stata inoltre effettuata una PCR multiplex con i seguenti cicli di amplificazione: denaturazione per 1 min. a 94°C, annealing dei primers per 1 min. a 55°C ed estensione dei primers di 2 min. a 72°C. Sono stati eseguiti 35 cicli di amplificazione utilizzando un Thermal Cycler GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Carlsband, California).

Per la rilevazione dei prodotti PCR, ogni campione, rappresentato da 10 µl di amplificato in 2 µl di tampone (Soluzione Gel Loading, concentrazione 1-6x, Sigma, St Louis, Missouri) è stato sottoposto a corsa elettroforetica in gel di agarosio al 2% (Agarose MP, Roche, Indianapolis, Indiana) a 100 Volt per

Tabella I
Sequenze nucleotidiche dei primers scelti per la rilevazione dei geni codificanti per le tossine dello *Staphylococcus aureus* e per l'identificazione con 16SrDNA

Gene ^(a)	Nome del primer	Sequenza del primer	Accesso GenBank No.	Location	bp	Ceppi di riferimento	Rif.
<i>sea</i>	SEA1	TTGAAAACGGTTAAAACGAA	M18970	490-590	120	3102TE	5
	SEA2	GAACCTTCCCATCAAAAACA					
<i>seb</i>	SEB1F2	GCAGAGAGTCAACCAGATCC	M11118	322-341	624	ATCC ^(b) 14458	11
	SEB2F2	TGGTGCAGGCATCATGTCAT					
<i>sec</i>	SEC1	GACATAAAAGCTAGGAATT	M28364	559-578	256	ATCC ^(b) 19095	7
	SEC2	AAATCGGATTAACATTATCC					
<i>sed</i>	SED1	CTAGTTGGTAATATCTCCT	M28521	332-353	317	ATCC ^(b) 23235	5
	SED2	TAATGCTATATCTTATAGGG					
<i>see</i>	SEE1	TAGATAAAGTAAAACAAGC	M21319	491-510	170	ATCC ^(b) 27664	9
	SEE2	TAACITACCGTGGACCCTTC					
<i>tst</i>	TST-3	AAGCCCTTTGTTGCTTCGG	J02615	51-69	444	ATCC ^(b) 33586	14, 20
	TST-6	ATCGAACTTTGGCCATACTTT					
<i>seg</i>	SEG1	CGT CTC CAC CTG TTG AAG G	AF064773	317-335	327	CCUG ^(c) 39423	17
	SEG2	CCA AGT GAT TGT CTA TTG TCG					
<i>seh</i>	SEH1	CAA CTG CTG ATT TAG CTC AG	U11702	245-264	360	ATCC ^(b) 51811	17
	SEH2	GTC GAA TGA ATC TCT AGG					
<i>sei</i>	SEI1	CAA CTC GAA TTT TCA ACA GGT AC	AF064774	325-347	465	CCUG ^(c) 39423	17
	SEI2	CAG GCA GTC CAT CTC CTG					
<i>16S rDNA</i>	5'-3' F 5'-3' R	TAGATGGATCCGCGC CTTAATGATGGCAACTAAGC	AF146368	145-159 1061-1042	916	NA	15
Controllo negativo						<i>S. epidermidis</i>	-
						ATCC 14990	

bp base pair
NA non applicabile

(a) sequenza nucleotidica: fonte bibliografica
(b) American type culture collection, USA
(c) culture collection, University of Göteborg, Svezia

1 ora. Per la stima del peso dei frammenti ottenuti, è stato utilizzato uno standard di peso molecolare per 50-2000 bp (Amplisize™ Molecular Ruler, Biorad, Hercules, USA).

Come verifica delle condizioni applicate nella fase di estrazione, amplificazione e rilevazione dei prodotti di PCR sono stati impiegati ceppi di *S. aureus* di riferimento specifici per le sequenze oligonucleotidiche dei geni codificanti le tossine ricercate.

Risultati

In Tabella I sono riportati i ceppi di riferimento portatori di geni codificanti per le diverse tossine di *S. aureus* e 16S rDNA utilizzati e le sequenze nucleotidiche dei primers scelti per la rilevazione dei geni codificanti per le tossine mentre in Tabella II sono riportati i ceppi di referenza utilizzati per la rilevazione in PCR

dei geni codificanti per enterotossine stafilococciche.

Livelli di contaminazione da *Staphylococcus aureus* degli alimenti esaminati

Dei 350 campioni di alimenti esaminati, 49 (14%) sono risultati contaminati da *S. aureus*. Tra le matrici esaminate, i preparati di carne fresca hanno rappresentato 19,3% dei campioni positivi (Tabella III), e comprendevano le carni fresche, contaminate nel 30% dei casi, e i preparati a base di carne fresca (insaccati) contaminati nel 16,7% (Tabella III). Nella Figura 1 sono riportate le frequenze di contaminazione da *S. aureus* nei campioni di carne fresca e insaccati freschi. Per le carni fresche i livelli di contaminazione sono risultati variabili da 5 UFC/g a 720 UFC/g

Tabella II

Ceppi utilizzati per la ricerca con PCR dei geni codificanti SE e per la produzione e identificazione delle SE con SET-RPLA

Ceppi di riferimento	Enterotossine identificate con SET-RPLA	Geni codificanti enterotossine identificati con PCR
<i>S. aureus</i> 310 2TE	SEA	<i>sea</i>
<i>S. aureus</i> ATCC 14458	SEB	<i>seb</i>
<i>S. aureus</i> ATCC 19095	SEC	<i>sec</i>
<i>S. aureus</i> ATCC 23235	SED	<i>sed</i>
<i>S. aureus</i> ATCC 27664	SEE	<i>see</i>
<i>S. aureus</i> ATCC 33586	-	<i>tst</i>
<i>S. aureus</i> ATCC 51811	-	<i>seh</i>
<i>S. aureus</i> CCUG 39423	-	<i>seg+sei</i>

SET-RPLA *staphylococcal enterotoxins test - reversed passive latex agglutination*

SEA enterotossina stafilococcica A

SEB enterotossina stafilococcica B

SEC enterotossina stafilococcica C

SED enterotossina stafilococcica D

SEE enterotossina stafilococcica E

Tabella III

Ripartizione dei prodotti di carne e formaggi freschi e risultati dei test positivi

Prodotti	N° di campioni esaminati	N° di campioni positivi per <i>Staphylococcus aureus</i>	Percentuale di isolamento
Carni fresche (macinati, carni avicole)	40	12	30,0
Prodotti a base di carne (insaccati freschi)	162	27	16,7
Totale prodotti di carne fresca	202	39	19,3
Formaggio fresco ovino	9	3	33,3
Formaggio fresco bovino	21	1	4,8
Totale formaggi freschi	30	4	13,3
Prodotti di pasticceria (paste alla crema)	55	2	3,6
Prodotti gastronomici (timballo)	13	1	7,7
Prodotti ittici (mitili)	50	3	6,0
Totale prodotti	350	49	14,0

mentre per gli insaccati sono state osservate contaminazioni da 30 UFC/g a 2900 UFC/g.

Il 13,3% dei campioni di formaggi freschi sono risultati contaminati, la contaminazione è risultata del 33,3% per i formaggi freschi ovini e del 4,8% per il formaggio fresco bovino (Tabella III). Per i formaggi freschi i livelli di contaminazione sono risultati compresi tra 750 UFC/g e 2800 UFC/g. In Tabella III si riportano le percentuali dei ceppi portatori di geni codificanti per tossine stafilococciche. La distribuzione dei livelli di contaminazione, con riferimento ai limiti fissati dalla normativa

vigente per questa categoria di prodotti e le concentrazioni di *S. aureus* necessarie per la produzione di enterotossine, sono riportate in Tabella IV e V e Figura 1.

In Figura 2 si riporta un esempio di pattern elettroforetico in PCR multiplex per la visualizzazione del 16SrDNA e dei geni *seg*, *sec* e *sei*.

Identificazione dei ceppi enterotossigeni

Al Set RPLA, dei 49 ceppi di *S. aureus* isolati, 8 (16,3%) sono risultati produttori di SE. La

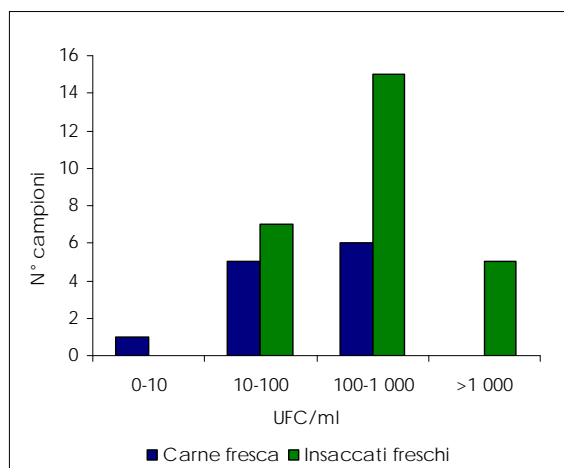


Figura 1
Frequenza dei livelli di contaminazione da *Staphylococcus aureus* nei campioni di carni fresche

percentuale di alimenti contaminata da ceppi enterotossigeni è pertanto risultata del 2,3% (1 alla tossina A e 7 alla tossina C).

Alla PCR 18 ceppi isolati dai preparati di carne sono risultati positivi alla presenza di uno o più geni codificanti enterotossina:

- 4 sec
- 1 sei+sec
- 1 sec+seh
- 9 seg+sei
- 1 sec+sei+seg
- 1 sea+seg+sei
- 1 tst+seg+sei.

Nella Tabella VI sono state riportate le percentuali dei ceppi codificanti per tossine stafilococciche.

Dei 4 ceppi isolati da formaggi, 1 solo ceppo è risultato positivo alla PCR (sea).

Discussione e conclusioni

Dei 350 campioni di prodotti alimentari, prelevati presso punti vendita al dettaglio ed appartenenti alle categorie di alimenti di maggior diffusione, 49 (14%) sono risultati contaminati da *S. aureus*. I risultati ottenuti sono leggermente inferiori a quanto riportato in uno studio condotto su territorio nazionale nel periodo 2000-2002 per la ricerca di *S. aureus* in alimenti di origine animale, la differenza è probabilmente dovuta al fatto che fra gli alimenti nel nostro studio, non è incluso il latte crudo (13). Gli alimenti che con maggior frequenza sono risultati contaminati da *S. aureus* sono stati i preparati di carne e i formaggi freschi (rispettivamente 19,3% e 13,3%).

Non essendo stati eseguiti, per ogni prelievo, il numero di unità campionarie previste dalla normativa, i risultati sono stati valutati prendendo come riferimento il limite inferiore "m" (definito dalla norma di riferimento vigente) per il quale il prodotto che rispetta tale limite è ritenuto "soddisfacente". Come valore superiore degli intervalli di contaminazione considerati, è stato proposto 1000 UFC/g o ml (a seconda della natura solida o liquida del prodotto analizzato) che corrisponde alla concentrazione di *S. aureus* in cui alcuni autori segnalano produzione di SE (2). Dei campioni di carne fresca esaminati, solo 11,1% è risultata conforme ai limiti e quindi inferiore a 100 UFC/g mentre il 18,5% ha presentato una carica superiore a 1000 UFC/g, livello tra l'altro ritenuto idoneo per la produzione di tossine SE (2) mentre per i preparati di carne (insaccati) non sono stati riscontrato campioni con cariche superiori a 1000 UFC/g (Tabella V).

Tabella IV

Distribuzione dei livelli di contaminazione da *Staphylococcus aureus* riscontrati nei campioni positivi di latte e formaggi (i valori sono espressi in UFC/g per i campioni solidi e UFC/ml per i liquidi)

Matrice	0-10 ^(a)	10-100 ^(b)	100-1 000	>1 000 ^(c)
Formaggio fresco ovino	0	0	2 (50%)	1 (25%)
Formaggio fresco bovino	0	0	0	1 (25%)

(a) limite "m" di accettabilità per i formaggi freschi secondo il CE/1441/2007

(b) limite "M" di accettabilità per i formaggi freschi secondo il CE/1441/2007

(c) livello di contaminazione da *S. aureus* per la produzione di SE (2)

Tabella V

Distribuzione dei livelli di contaminazione da *Staphylococcus aureus* riscontrati nei campioni di carne fresca e preparati di carne (i valori sono espressi in UFC/g)

Matrice	0-100 ^(a)	100-1 000 ^(b)	>1 000 ^(c)
Carne fresca	3 (11,1%)	19 (70,4%)	5 (18,5%)
Insaccati freschi	6 (50%)	6 (50%)	0

(a) limite "m" di accettabilità per le carni macinate secondo il CE/1441/2007

(b) limite "M" di accettabilità per le carni macinate secondo il CE/1441/2007

(c) livello di contaminazione da *S. aureus* per la produzione di SE (2)

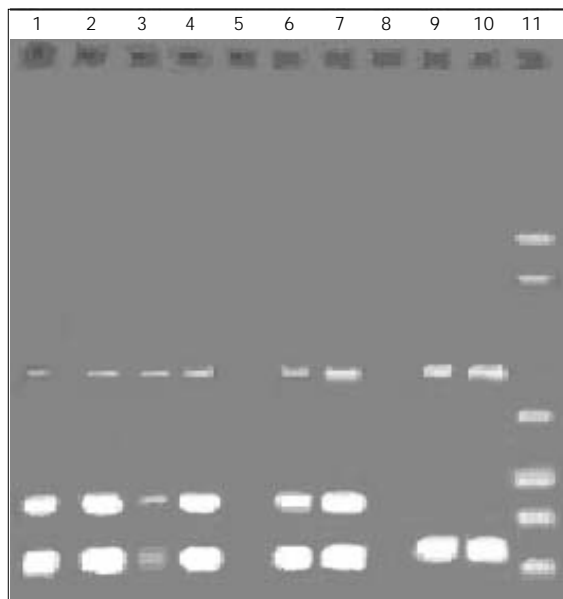


Figura 2

Pattern elettroforetico in gel di agarosio di prodotti amplificati con PCR multiplex di geni *seg* (327 bp), *seh* (360 bp), *sei* (465 bp) e 16SrDNA (916 bp)

Linee da 1 a 4: campioni diluiti e ripetuti di ceppi di *S. aureus* isolati da prodotti di carne positivi per *sei* e *seg*

Linea 5: campione bianco (controllo negativo)

Linea 6 e 7: campioni di *S. aureus* CCUG 39423 positivi per *sei* e *seg* a differenti concentrazioni

Linee da 8 a 10: campioni ripetuti e diluiti di ceppi di *S. aureus* isolati da molluschi positivi per *sei* e *seg*

Linea 11: standard peso molecolare

Per quanto riguarda invece i formaggi freschi, nessun campione è risultato contaminato con livelli superiori ai limiti previsti dalla legislazione vigente ma il 25% dei campioni è risultato avere una carica >1000 UFC/g, che è il limite del livello di contaminazione da *S. aureus* proposto in letteratura per la produzione di enterotossina stafilococcica.

Il numero di ceppi enterotossigeni isolati è risultato del 2,3%, dato sovrapponibile a quello

nazionale (2,9%); le tossine maggiormente presenti sono risultate la enterotossina C (7/8) e la enterotossina A (1/8).

Con il metodo PCR, 24/49 dei ceppi isolati (48,9%), sono risultati potenzialmente enterotossigeni e di questi 18 sono stati isolati da preparati di carne fresca e uno da formaggi freschi. Oltre geni relativi alle tossine A-D (*sea*, *seb*, *sec*, *sed*) sono stati evidenziati anche i geni *seg*, *seh*, *sei* e *tst* che codificano la produzione delle enterotossine G, H, I e TSST che non rilevabili al test SET-RPLA.

I 18 ceppi tossigeni isolati da preparati di carne hanno dimostrato di essere portatori di geni codificanti SE. In particolare 8 ceppi possedevano almeno un gene codificante le SE (*sea* o *sec*), 11 due geni codificanti le SE (*sei+sec*; *sec+seh*; *seg+sei*) e 3 ceppi 3 geni codificanti le SE (*sea+seg+sei*; *sec+seg+sei*; *tst-seg-sei*). Il ceppo tossigeno isolato da formaggio alla PCR è risultato positivo per il gene *sea*. Gli altri 5 ceppi tossigeni derivavano da prodotti di pasticceria preparati gastronomici e molluschi e sono risultati positivi per i geni *seg* e *sei*.

Confrontando i risultati del test RPLA per la rilevazione delle enterotossine A-D con la presenza del corrispettivo gene in PCR si è osservato che per 8 ceppi (16,3% del totale ceppi) c'è stata piena corrispondenza fra i risultati. Infatti al set RPLA 1 ceppo è risultato produttore di tossina A e 7 di tossina C; negli stessi in PCR sono stati evidenziati rispettivamente il gene *sea* e *sec*. Alla PCR è però risultati che in realtà 10 ceppi (20,4%) risultavano possedere il gene per enterotossine A-D. Tale discordanza potrebbe essere spiegata con una mancata espressione o una produzione di enterotossina in quantità inferiore al limite di rivelazione del test RPLA che è di 1 ng/ml.

Tabella VI
Percentuale di ceppi portatori di geni codificanti tossine stafilococciche

Prodotti	No. di ceppi esaminati	Ceppi tossigeni	Percentuale dei positivi sul totale esaminato
Prodotti di carne fresca	39	18	46,2
Formaggi freschi	4	1	33,3
Altri prodotti	6	5	83,3
Totale	49	24	48,97

In definitiva, per le tossine rilevabili con il set RPLA, si è ottenuta una buona correlazione fra due metodi, così come riportato anche da altri autori (30).

Anche se il legislatore ha individuato in *S. aureus* un importante fattore di rischio, come risulta dai numerosi provvedimenti normativi che prescrivono la ricerca e la numerazione del germe in diversi alimenti destinati all'uomo, nella normativa vigente relativa alla qualità igienico sanitaria degli alimenti è prevista la ricerca delle tossine stafilococciche solo in caso di superamento dei limiti prefissati e per un numero esiguo di tipologie di prodotti. Il numero di cellule di *S. aureus* può, tuttavia, non essere un indicatore della presenza di enterotossine nel prodotto dato che non tutti i ceppi producono enterotossine e che il microorganismo può non essere più vitale ma aver prodotto enterotossina che permane nell'alimento oppure l'enterotossina prodotta può essere presente in quantità inferiore al limite di rilevazione dei metodi disponibili in commercio.

Dallo studio emerge la presenza diffusa di ceppi di *S. aureus* portatori di geni codificanti tossine diverse da quelle identificabili con metodi tradizionali. Per queste tossine, di cui non è ancora noto il reale significato della loro presenza negli alimenti e l'effettivo impatto

che esse potrebbero avere come causa di tossinfezioni alimentari da *S. aureus* nell'uomo, è necessario effettuare ulteriori studi, affiancando metodi tradizionali e metodi molecolari.

L'impiego di tecniche innovative per l'individuazione di geni codificanti la produzione di enterotossine, in aggiunta ai metodi classici di rilevazione, permetterebbe di identificare ceppi portatori di geni che potrebbero produrre, nelle condizioni idonee, tossine anche diverse da quelle tradizionalmente note, che potrebbero essere in grado di determinare patologie nell'uomo. L'alta percentuale di campioni di formaggio prodotto con latte di pecora, positivi per enterotossina stafilococcica, sottolinea la necessità di migliorare la gestione degli animali in azienda, in particolare l'attuazione di specifici programmi di monitoraggio per ridurre le mastiti subcliniche le quali sono alla base della contaminazione del latte. Una effettiva riduzione dei livelli di contaminazione potrebbe essere conseguito attraverso il miglioramento delle procedure igienico sanitarie.

Bibliografia

1. Aarestrup F.M., Ahrens P., Madsen M., Pallesen L.V., Poulsen R.L. & Westh H. 1996. Glycopeptide susceptibility among Danish *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates of animal and human origin and PCR identification of genes within the VanA cluster. *Antimicrob Agents Chemother*, **40**, 1938-1940.
2. Balaban N. & Rasooly A. 2000. Staphylococcal enterotoxins. *Int J Food Microbiol*, **61**, 1-10.
3. Bayles K.W. & Landolo J.J. 1989. Genetic and molecular analyses of the gene encoding staphylococcal enterotoxin D. *J Bacteriol*, **171**, 4799-4806.

4. Becker K., Roth R. & Peters G. 1998. Rapid and specific detection of toxigenic *Staphylococcus aureus*: use of two multiplex PCR enzyme immunoassays for amplification and hybridization of staphylococcal enterotoxin genes, exfoliative toxin genes and toxic shock syndrome toxin 1 gene. *J Clin Microbiol*, **36**, 2548-2553.
5. Betley M.J. & Mekalanos J.J. 1988. Nucleotide sequence of the type A staphylococcal enterotoxin gene. *J Bacteriol*, **170**, 34-41.
6. Blomster-Houtamaa D.A., Kreiswirth B.N., Kornblum J.S., Novick R.P. & Schlievert P.M. 1986. The nucleotide and partial amino acid sequence of toxic shock syndrome toxin-1. *J Biol Chem*, **261**, 15783-15786.
7. Bohach G.A. & Schlievert P.M. 1987. Nucleotide sequence of the staphylococcal enterotoxin C1 gene and relatedness to other pyrogenic toxins. *Mol Gen Genet*, **209**, 15-20.
8. Commissione della Comunità Europea (CCE) 2007. Commissione (CE) del Regolamento N°. 1441/2007 del 5 dicembre 2007 che modifica il Regolamento (CE) N°. 2073/2005 sui criteri microbiologici per alimenti. *Off J*, **L 322**, 07.12/2007,12-13 (eurlex.europa.eu/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2007:322:0012:0029:en:pdf ultimo accesso 12 aprile 2011)
9. Couch J.L., Soltis M.T. & Betley M.J. 1988. Cloning and nucleotide sequence of the type E staphylococcal enterotoxin gene. *J Bacteriol*, **170**, 2954-2960.
10. D'Amico D.J., Groves E. & Donnelly C.W. 2008. Low incidence of foodborne pathogens of concern in raw milk utilized for farmstead cheese production. *J Food Prot*, **71** (8), 1580-1589.
11. Dinges M.M., Orwin P.M. & Schlievert M.P.M. 2000. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Rev*, **13** (1), 16-34.
12. Europea Commissione (EC) 2003. Opinione della Commissione Scientifica sulle misure veterinarie relative alla salute pubblica sulle enterotossine stafilococciche, soprattutto nei formaggi (adottato il 26-27 marzo 2003). EC, Directorate C – Opinione Scientifica, Unità C2 – Gestione della commissione scientifica, cooperazione scientifica e reti, Brussell, 73 pp (ec.europa.eu/food/fs/sc/scv/out61_en.pdf ultimo accesso 15 aprile 2011).
13. Firinu A., Virgilio S., Mula G., Poggio A., Zuccon F. & Sias S. 2003. *Staphylococcus aureus* in alimenti di origine. Presenza e caratterizzazione enterotossica. *Industrie Alimentari*, **XLII**, 613-623.
14. Hiramatsu K. 1995. Molecular evolution of MRSA. *Microbiol Immunol*, **39**, 531-543.
15. Jaffe R.I., Lane J.D., Albury S.V. & Niemeyer D.M. 2000. Rapid extraction from and direct identification in clinical samples of methicillin-resistant staphylococci using the PCR. *J Clin Microbiol*, **38** (9), 3407-3412.
16. Jones C.L. & Khan S.A. 1986. Nucleotide sequence of the enterotoxin B gene from *Staphylococcus aureus*. *J Bacteriol*, **166**, 29-33.
17. Larsen H.D., Huda A., Eriksen N.H.R. & Jensen N.E. 2000. Differences between Danish bovine and human *Staphylococcus aureus* isolates in possession of superantigens. *Vet Microbiol*, **76**, 153-162.
18. Le Loir Y., Baron F. & Gautier M. 2003. *Staphylococcus aureus* and food poisoning. *Genet Mol Res*, **2** (1), 63-76 (www.funpecrp.com.br/gmr/year2003/vol1-2/sim0009_full_text.htm accessed on 18 May 2011).
19. Lo Nostro A., Pesavento G., Tempestini E. & Gariboldi A. 2003. Circolazione dei ceppi tossigenici di *S. aureus* in alimenti e superfici in un'azienda di catering. In Atti Conferenza Nazionale La Stafilococchi aurei e loro tossine nella catena alimentare: patologie, prevenzione, ricerche analitiche, 12 giugno, Bologna. Oxioid, Bologna, 105-110.
20. Marrack P. & Kappler J. 1990. The staphylococcal enterotoxins and their relatives. *Science*, **248**, 705.
21. Mehrotra M., Wang G. & Johnson W.M. 2000. Multiplex PCR for detection of genes for *Staphylococcus aureus* enterotoxins, exfoliative toxins, toxic shock syndrome toxin 1, and methicillin resistance. *J Clin Microbiol*, **38** (3), 1032-1035.
22. Monday S.R. & Bohach G.A. 1999. Use of multiplex PCR to detect classical and newly described pyrogenic toxin genes in staphylococcal isolates. *J Clin Microbiol*, **37**, 3411-3414.
23. Munson S.H., Tremaine M.T., Betley M.J. & Welch R.A. 1998. Identification and characterization of staphylococcal enterotoxin types G and I from *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun*, **66**, 3337.
24. Oliver S.P., Boor K.J., Murphy S.C. & Murinda S.E. 2009. Food safety hazards associated with consumption of raw milk. *Foodborne Pathog Dis*, **6** (7), 793-806.
25. Omoe K., Ishikawa M., Shimoda Y., Hu D.L., Ueda S. & Shinigawa K. 2002. Detection of *seg*, *seh*, and *sei* genes in *Staphylococcus aureus* isolates and determination of the enterotoxin productivities of *S. aureus* isolates harboring *seg*, *seh*, or *sei* genes. *J Clin Microbiol*, **40** (3), 857-862.

26. Orwin P.M., Leung D.Y.M., Donahue H.L., Novick R.P. & Schlievert P.M. 2001. Biochemical and biological properties of staphylococcal enterotoxin K. *Infect Immun*, **69**, 360-366.
27. Orwin P.M., Leung D.Y.M., Tripp T.J., Bohach G.A., Earhart C.A., Ohlendorf D.H. & Schlievert P.M. 2002. Characterization of a novel staphylococcal enterotoxin-like superantigen, a member of the group V subfamily of pyrogenic toxins. *Biochemistry*, **41**, 14033-14040.
28. Ottaviani F. & Ottaviani M. 2003. Interazioni tra Stafilococchi e variabili dei processi alimentari: applicazioni di ecologia microbica degli alimenti. In Atti Conferenza Nazionale La Stafilococchi aurei e loro tossine nella catena alimentare: patologie, prevenzione, ricerche analitiche, 12 giugno, Bologna. Oxoid, Bologna, 17-28.
29. Wieneke A.A., Roberts D. & Gilbert R.J. 1993. Staphylococcal food poisoning in the United Kingdom, 1969-1990. *Epidemiol Infect*, **110**, 519-531.
30. Zschöck M., Botzler D., Blöcher S., Sommerhäuser J. & Hamann H.P. 2000. Detection of genes for enterotoxins (*ent*) and toxic shock syndrome toxin-1 (*tst*) in mammary isolates of *Staphylococcus aureus* by polymerase chain reaction. *Int Dairy J*, **10**, 569-574.