

ALESSANDRA MARTUCCIELLO - SERENA ASTARITA
 ANNA RUGGIA - DOMENICO ALFANO
 CARMELO MORENA - GIORGIO GALIERO
 Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno,
 Sezione di Salerno - Centro di Referenza Nazionale sull'Igiene
 e le Tecnologie dell'allevamento e delle produzioni bufaline
 Via delle Calabrie 14 - 84131 Fuorni - SA - Italia

PRESENZA DI *SALMONELLA* SPP., *CAMPYLOBACTER* SPP. ED *ESCHERICHIA COLI* O157 IN MOZZARELLA DI BUFALA CAMPANA

A survey on *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp.,
 and *Escherichia coli* O157 presence in Campania buffalo mozzarella
 cheese by real-time PCR

Parole chiave: mozzarella, bufalo, real-time PCR
 Key words: mozzarella cheese, buffalo, real-time PCR

INTRODUZIONE

La mozzarella di bufala campana è un prodotto DOP (Regolamento CE 1107, 12 giugno 1996). Il disciplinare di produzione non prevede l'utilizzo di latte sottoposto a pastorizzazione. Come per tutti i derivati ottenuti a partire da latte crudo, il rischio che microrganismi patogeni possano ritrovarsi nel prodotto può divenire concreto se l'intero processo di produzione e trasformazione del latte non viene sottoposto a controlli e verifiche nei suoi punti critici.

La bufala mediterranea è un importante reservoir di *Salmonella* spp. ed *Escherichia coli* verocitotossici, sierotipo O157 in particolare (Galiero *et al.*, 2005). Tali microrganismi vengono eliminati attraverso le feci ed è possibile che contaminino il latte durante le operazioni di mungitura ed entrino nella catena di trasformazione.

Campylobacter coli e *Salmonella* spp. sono stati più volte isolati da mozzarella di bufala prodotta nel sud Italia (Galiero *et al.*, 2005; De Carlo *et al.*, 1999) a dimostrazione del fatto che talvolta i processi produttivi di filiera non sono adeguatamente posti sotto controllo.

Quindi, al fine di accertare eventuali rischi per il consumatore, abbiamo deciso di avviare un monitoraggio teso a verificare l'eventuale presenza di alcuni patogeni causa di tossinfezioni alimentari nella mozzarella di bufala campana. A tale scopo ci siamo avvalsi di una tecnica biomolecolare (real-time polymerase chain reaction) utilizzando kit del commercio (Warnex™ Diagnostic Inc.). In estrema sintesi il test identifica il DNA del microrganismo target attraverso una serie di steps quali preparazione e arricchimento dei campioni, estrazione e rivelazione del DNA del patogeno. Durante

SUMMARY

Real-time Polymerase Chain Reaction (PCR) kits were used to detect *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., and *Escherichia coli* O157 in 93 samples of cow buffalo mozzarella cheese produced in the Salerno province. Results on all samples were negative. All screened dairy producers well proved to properly manage all critical points of the production chain: the end consumer microbiological hazard with respect to the monitored pathogens is minimized.

SOMMARIO

Questo lavoro ha avuto come obiettivo la ricerca di *Salmonella* spp., *Campylobacter* spp., *Escherichia coli* O157 in 93 campioni di mozzarella di bufala proveniente da caseifici locali nella provincia di Salerno. I campioni sono stati analizzati utilizzando kit del commercio basati sulla real-time polymerase chain reaction (PCR).

Tutti i campioni sono risultati negativi. Le aziende oggetto del campionamento dimostrano di avere sotto controllo i punti critici della filiera produttiva, rendendo così minimo il rischio microbiologico per il consumatore rispetto ai patogeni considerati.

la fase di rivelazione, il DNA del microrganismo ricercato viene amplificato e rivelato attraverso l'utilizzo di specifici primers e sonde molecolari (becons). Le sonde molecolari consistono di un'unica sequenza che permette l'identificazione del patogeno con un alto livello di specificità. Esse presentano una struttura a forcina che contiene una sequenza complementare al DNA target. Ad alte temperature, la struttura a forcina rimane chiusa e non emette fluorescenza. Durante la fase di annealing la temperatura si abbassa e la sonda molecolare subisce un cambiamento della conformazione. Quando si legano al loro target, le sonde molecolari emettono un segnale fluorescente che è proporzionale alla quantità di DNA patogeno amplificato. In caso di assenza del patogeno target nel campione analizzato, non viene evidenziato nessun segnale fluorescente. La lettura finale, eseguita mediante strumentazione automatica, si avvale di uno specifico software. I vantaggi della metodica risiedono nell'estrema rapidità dei tempi di ricerca rispetto alle metodiche colturali di tipo tradizionale, nella specificità del test che per i patogeni considerati è dichiarata essere superiore al 99%, nel limite di rilevazione che è dichiarata essere inferiore all'1% e nella opportunità data dalla strumentazione dedicata, di condurre simultaneamente 3 differenti ricerche microbiche.

MATERIALI E METODI

Nel corso del 2007, attraverso prelievi casuali presso caseifici siti nella provincia di Salerno sono stati collezionati 93 campioni

di mozzarella di bufala campana. I campionamenti sono stati effettuati a cadenza mensile per quattro mesi consecutivi a partire da gennaio.

Tutti i campioni dopo opportuna preparazione sono stati sottoposti ad una fase di omogeneizzazione ed arricchimento in specifici brodi. Per avviare il processo di evidenziazione di *Salmonella* spp. è stato utilizzato Nutrient Broth (Oxoid) con incubazione a 35°C per 18-24 ore; per la ricerca di *E. coli* O157 si è utilizzato Tryptic Soy Broth (Oxoid) che è stato posto ad incubare a 35°C per 18-24 ore; infine Bolton Broth (Oxoid) con incubazione a 35°-37°C per 4 ore e a 42°C per ulteriori 44 ore, è stato utilizzato per la ricerca di *Campylobacter* spp. Si è proceduto poi alle fasi successive per eseguire la PCR in real-time a partire da 1 mL di ciascun brodo di arricchimento, utilizzando specifici kit del commercio per ciascuno dei patogeni presi in considerazione, attenendosi al protocollo indicato dalla casa produttrice (Warnex Diagnostics Inc.).

RISULTATI

La totalità dei campioni sottoposti ad esame è risultata negativa per i patogeni da noi ricercati.

DISCUSSIONE

In base ai risultati ottenuti appare palese che, nonostante non sia previsto un processo di pastorizzazione, le caratteristiche microbiologiche della materia prima utilizzata, la temperatura e i tempi previsti per filatura e

formatura, nonché l'implementazione dei piani di autocontrollo e il sistema qualità applicato lungo l'intera filiera delle aziende prese in considerazione, permettono di ottenere un prodotto sostanzialmente privo di significativi pericoli sanitari. Il comparto produttivo mostra confortanti progressi rispetto ad analoghe indagini condotte nel passato, segno che tutte le recenti norme introdotte, non ultime quelle del c.d. pacchetto igiene frutto del recepimento di leggi comunitarie, hanno spinto le industrie di trasformazione a migliorare i loro standard produttivi trascinandolo in questo processo la filiera nel suo complesso. E tutto ciò è ancora più significativo se si considera che tale prodotto, vanto della gastronomia italiana ed esportato in tutto il mondo, il più delle volte viene lavorato all'interno di piccole imprese artigianali e a carattere familiare, per le quali le risorse da investire in adeguamenti strutturali, acquisizione di nuove tecnologie, formazione del personale e quant'altro necessario a migliorare la qualità del prodotto, sono inevitabilmente limitate.

BIBLIOGRAFIA

- De Carlo E., Morena C., Supino T., Galiero G. "Ricerca di *Salmonella* sp. in mozzarella di bufala e di vacca mediante PCR" Industrie Alimentari XXXVIII, 386: 1285-1286 (1999).
- Galiero G., Conedera G., Alfano D., Caprioli A. "Isolation of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 from water buffalo (*Bubalus bubalis*) in Southern Italy" Vet. Rec. 156:382-383 (2005).
- Galiero G., Ruggia A., Morena C., Palazzo M.A. "Isolamento di *Campylobacter* termotolleranti da derivati del latte di bufala" Atti 3° Congresso Nazionale sull'allevamento del Bufalo 12-15 ottobre 2005, pp. 45 (2005).