



STAPHYLOCOCCUS AUREUS METICILLINO RESISTENTE (MRSA) IN LATTE E FORMAGGI OVINI PRODOTTI IN UN'AZIENDA LAZIALE CON ANNESSO CASEIFICIO

G. GIANGOLINI, N. MARRI, G. GIACINTI, D. SAGRAFOLI, C. BOSELLI, A. TAMMARO, E. BOVI, S. AMATISTE

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana "M. Aleandri" - Via Appia Nuova, 1411 - Roma
Centro di Referenza Nazionale per la Qualità del Latte e dei Prodotti derivati degli Ovini e dei Caprini (C.Re.L.D.O.C.)

Parole chiave: *S. aureus* MRSA, ovini, latte, formaggio.

INTRODUZIONE

Staphylococcus aureus è una delle cause più frequenti di mastite. Nell'allevamento ovino è spesso responsabile di mastiti cliniche ma può causare anche forme subcliniche benché meno diffuse rispetto a quelle sostenute da Stafilococchi coagulasi negativi. La presenza di animali infetti è una delle principali fonti di contaminazione del latte e dei suoi derivati.

S. aureus è il principale responsabile di intossicazione alimentare, determinata dalla possibile produzione di enterotossine eventualmente presenti nel prodotto finito (Carfora et al. 2015). Di attuale rilevanza per la salute pubblica è l'esistenza di ceppi di *S. aureus* resistenti alla meticillina (MRSA Methicillin Resistant *Staphylococcus aureus*) che, se presenti negli alimenti di origine animale, potrebbero interessare tutta la catena alimentare. Pochi studi riportano la prevalenza di MRSA nel latte di pecora (Feßler et al., 2012) ma la sua presenza sembra contenuta (Pexara et al., 2015). In Italia ed in particolare nel Lazio è tradizione produrre formaggi di pecora a latte crudo risultando evidente l'importanza che assume la qualità microbiologica della materia prima.

MATERIALI E METODI

Nell'anno 2015, è stata riscontrata la presenza di *S. aureus* MRSA in 2 formaggi di 2 e 10 giorni di stagionatura, prodotte da un caseificio aziendale ovino della provincia di Roma. I formaggi venivano prodotti giornalmente dal latte di 287 pecore di razza Sarda. La caseificazione era eseguita con latte crudo, utilizzando caglio in pasta acquistato dal commercio e senza l'uso di starter. In seguito alla positività riscontrata nei formaggi è stato prelevato il latte di massa per la ricerca quantitativa di *S. aureus* e qualitativa di MRSA.

Successivamente sono stati eseguiti i seguenti campionamenti:

- 574 campioni di latte di emimammella da tutte le pecore in lattazione (n.287)
- 1 campione di latte di massa al momento del campionamento del latte di emimammella
- 19 tamponi: dai gruppi prendicapezzolo in pre-mungitura (n.3), sulle superfici di lavorazione (n.7), sulle assi di stagionatura (n.4); inoltre sono stati esaminati tamponi oro-faringei autoprelevati (n.5) dei 2 mungitori e dei 3 addetti alla produzione del formaggio.

Il latte di emimammella è stato prelevato in pre-mungitura previa disinfezione del capezzolo mediante clorexidina.

E' stata monitorata la presenza di *S. aureus* mediante il campionamento del latte di massa ogni 7 giorni e del latte dei nuovi soggetti che entravano in produzione.

I campioni di formaggio e latte sono stati analizzati entro 24 ore dal prelievo.

L'esame microbiologico dei campioni di emimammella è stato eseguito mediante semina in Agar Sangue. Dai campioni di latte di massa e formaggio è stata eseguita la ricerca e numerazione degli Stafilococchi coagulasi positivi (SCP) tramite Baird-Parker agar plus rabbit plasma fibrinogen in accordo con la ISO 6888-2:1999, Amd1:2003.

Un numero di colonie da 2 a 5 di SCP sono state confermate mediante PCR per la ricerca del gene *Fem*. Gli isolati di *S. aureus* sono stati testati per la resistenza alla meticillina tramite test di sensibilità alla Cefoxitina per lo screening fenotipico di MRSA in accordo con quanto indicato da Clinical Laboratory Standard Institute (CLSI).

Gli MRSA sono stati identificati genotipicamente tramite il protocollo di Multiplex PCR per il rilevamento dei geni *FemA* (132 bp) e *MecA* (163 bp) proposto da Mehrotra M. et al., 2000. Dai campioni di latte di emimammella sono state determinate le cellule somatiche mediante Fossomatic™ FC (Foss Electric).

RISULTATI E CONSIDERAZIONI

Il contenuto di *S. aureus* nei formaggi è risultato di $1,5 \times 10^2$ e $1,4 \times 10^4$ UFC/g, rispettivamente nei formaggi di 2 e 10 giorni. Il controllo del latte di massa ha evidenziato una concentrazione di *S. aureus* di $1,5 \times 10^2$ UFC/ml. Tutti gli *S. aureus* testati sono risultati fenotipicamente e genotipicamente MRSA.

Dai 574 campioni di latte di emimammella è stato isolato MRSA da un solo campione con una prevalenza a livello di allevamento di 0,35% (1/287). Il numero delle cellule somatiche del latte di emimammella positivo ad MRSA è risultato di 29.429.000 cell/ml mentre nell'emimammella controlaterale il numero di cellule somatiche era di 1.950.000 cell/ml.

Da 45 campioni appartenenti a 38 soggetti è stato isolato Stafilococco coagulasi negativo con un numero di cellule somatiche minimo di 147.000 cell./ml e massimo di 32.249.000 cell./ml con una media geometrica di 2.355.000 cell/ml.

Dai 19 tamponi eseguiti, MRSA è risultato presente da un'asse di stagionatura e dai tamponi oro-faringei di un mungitore e del proprietario che si occupava sia della mungitura che della caseificazione.

Nel latte di massa, prelevato contemporaneamente al latte di emimammella, è stata riscontrata la presenza di *S. aureus* nella misura di $1,8 \times 10^2$ UFC/ml.

In seguito ai risultati dei campionamenti eseguiti è stata allontanata la pecora che eliminava MRSA.

I campionamenti del latte di massa, di emimammella e formaggio, successivi all'allontanamento della pecora ed eseguiti ogni settimana per un mese, non hanno più evidenziato la presenza di MRSA (MRSA <10 UFC/ml).

I risultati ottenuti evidenziano che pur avendo riscontrato una bassa prevalenza di MRSA a livello di allevamento la loro presenza nei formaggi è risultata elevata. E' importante quindi adottare misure di controllo a livello di allevamento al fine di ridurre la diffusione di *S. aureus* e nello specifico di MRSA nella catena alimentare.

METHICILLIN-RESISTANT STAPHYLOCOCCUS AUREUS (MRSA) ISOLATED FROM RAW OVINE MILK AND CHEESE PRODUCED IN A DAIRY FARM OF LAZIO REGION

KEY WORDS: *S. AUREUS* MRSA, SHEEP, MILK, CHEESE.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Carfora V, Caprioli A, Marri N, Sagrafoli D, Boselli C, Giacinti G, Giangolini G, Sorbara L, Dottarelli S, Battisti A, Amatiste S (2015) Enterotoxin genes, enterotoxin production, and methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products in Central Italy. *Int Dairy J* 42:12–15
- 2) Feßler, T.A., R.G. Olde Riekerink, A. Rothkamp, K. Kadlec, O.C. Sampimon, T.J. Lam, and Schwarz S., 2012. Characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* CC398 obtained from humans and animals on dairy farms. *Vet. Microb.* 160: 77–84.
- 3) Mehrotra M., Wang G., Johnson W.M., 2000. Multiplex PCR for detection of Genes for *Staphylococcus aureus* Enterotoxins, Esfoliative Toxins, Toxic Shock Syndrome Toxin 1, and Methicillin resistance. *Journal of Clinical Microbiology.* 38. 1032-1035.
- 4) Pexara A., Solomakos N., Sergelidis D., Angelidis A. S., Gavaris A., 2015. Occurrence and antibiotic resistance of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* in raw ovine and caprine milk in Greece. *Dairy Sci. and Technol.* 10.1007/s13594-015-0272-z