



---

**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MESSINA**

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE VETERINARIE**

**Dottorato di ricerca in Scienze Veterinarie**

**Coordinatore: Prof. Adriana Ferlazzo**

*Curriculum:*

**Sanità pubblica veterinaria e sicurezza alimentare**

**Caratterizzazione igienico-sanitaria di latte e prodotti lattiero caseari  
ovini siciliani: sviluppo di un modello sperimentale per la rapida  
identificazione dell'antibiotico resistenza in ceppi ESBL mediante  
tecnologia MALDI-TOF MS**

**Tesi di:**

**Dott.ssa Stefania MAROTTA**

**Tutor:**

**Ch.ma Prof.ssa Graziella ZIINO**

**Co-tutor:**

**Ch.mo Prof. Alessandro GIUFFRIDA**

## ABSTRACT

In Sicily, the ovine livestock production has strong traditional connotations, with an almost exclusively extensively character. Moreover, the dairy branch is an important part of the ovine sector and shows several critical issues. Unfortunately, we have little informations about the hygienic sanitary quality of ovine dairy products. The aim of the study was to perform a microbiological characterization of ovine milk, ricotta and tuma from different Sicilian districts, using rapid and high reliability technologies, in order to collect data on the microbiological quality of local products. For this purpose, the prevalence of isolated strains belonging to the Family of *Enterobacteriaceae* has been evaluated, along with their identification with mass spectrometry techniques. Finally, all identified strains were tested for the phenotypic expression of ESBL (Extended spectrum  $\beta$ -lactamase) production. Then, the ESBL positive strains were selected for the elaboration of an experimental model. This work lead to the implementation of the mass spectra database with Superspectra highly specific for the phenotypic expression of ESBL. Data collected during the study revealed poor hygienic-sanitary conditions of the dairy products. Milk samples showed a mean value of  $6.4 \pm 1.4$  Log CFU/ml for Aerobic mesophilic count and  $3.8 \pm 1.8$  CFU/ml for *Enterobacteriaceae* count. Same considerations can be made for ricotta and tuma samples, in which, in addition to those two parameters, also Staphylococcal charges resulted unsatisfactory, with a mean value of  $3.9 \pm 1.3$  Log CFU/g and  $3.8 \pm 1.5$  Log CFU/g respectively. In one sample of ricotta was also detected *Listeria monocytogenes* with a charge of 3.3 Log CFU/g. Among the isolated strains belonging to the family of *Enterobacteriaceae* (n.355), *Hafnia alvei*

reported the highest prevalence in all the samples (40.3%), followed by *E. coli* (13.2%), *Citrobacter* spp (10.1%) and other enterobacteria in lower percentage. Considering the phenotypical exhibition of antibiotic resistance, the 70% of strains resulted ESBL+, with different expression rates depending on the species. Finally, 5 samples of ESBL + and ESBL - strains for species (*Hafnia alvei*, *E. coli*, *E. cloacae*, *K. oxytoca*) were selected in order to generate mass spectra that were analyzed for peaks similarities. The results of this comparing algorithm have conducted to a new hierarchical clustering of the samples and to the implementation of the data set with new Superspectra ESBL+ and ESBL-, that allowed both the rapid identification at the genus level and the ESBL expression of each sample. The reliability of our model ranged from 50% to 80% of correct identifications; so mass spectrometry could be routinely employed in microbiological diagnostics as novel, time-saving and cost-reducing tool.

**INDICE**

|  |  |
|--|--|
| <b>1 ALLEVAMENTO OVINO</b> .....   |  |
| 1.1 Allevamento ovino in Italia .....  |  |
| 1.2 Allevamento ovino in Sicilia .....   |  |
| 1.3 Latte e prodotti lattiero caseari .....  |  |
| 1.4 La fase commerciale .....  |  |
| <b>2 PROBLEMATICHE IGIENICO-SANITARIE LEGATE ALLA FILIERA<br/>OVINA</b> .....            |  |
| 2.1 Tossinfezioni alimentari .....   |  |
| 2.1.1 <i>Escherichia coli</i> STEC (shiga-toxing producing <i>E. coli</i> ) .....        |  |
| 2.1.2 <i>Campylobacter</i> .....   |  |
| 2.1.3 <i>Salmonella</i> .....  |  |
| 2.1.4 <i>Listeria monocytogenes</i> .....  |  |
| 2.1.5 Tossina stafilococcica .....   |  |
| <b>3 L'ANTIBIOTICO RESISTENZA</b> .....  |  |
| 3.1 I sistemi di sorveglianza .....  |  |
| 3.2 Trasmissione dell' AMR dall'animale all'uomo e tipologie di batteri resistenti ..... |  |
| 3.3 Enterobatteri produttori di $\beta$ -lattamasi a spettro esteso (ESBL) .....         |  |

|          |   |
|----------|---|
| 3.4      | ESBL negli animali e negli alimenti.....          |
| 3.4.1    | Pollame .....                                     |
| 3.4.2    | Suini .....                                       |
| 3.4.3    | Bovini.....                                       |
| 3.4.4    | Ovi-caprini .....                                 |
| <b>4</b> | <b>SCOPO DELLA TESI .....</b>                     |
| <b>5</b> | <b>MATERIALI E METODI .....</b>                   |
| 5.1      | Campionamento .....                               |
| 5.1.1    | Latte di massa .....                              |
| 5.1.2    | Formaggi e ricotta.....                           |
| 5.2      | Analisi microbiologiche.....                      |
| 5.2.1    | Analisi quantitativa .....                        |
| 5.2.1.1  | Stazione di preparazione .....                    |
| 5.2.1.2  | Stazione di lettura .....                         |
| 5.2.2    | Analisi qualitativa .....                         |
| 5.3      | Identificazione .....                             |
| 5.3.1    | MALDITOF-MS.....                                  |
| 5.4      | Espressione fenotipica di Enterobatteri ESBL..... |
| 5.4.1    | Screening: terreno cromogeno .....                |

---

|  |  |
|--|--|
| 5.4.2 Conferma: test di combinazione .....   |  |
| 5.5 Analisi proteomica e confronto degli spettri.....  |  |
| 5.6 Analisi statistica.....  |  |
| <b>6 RISULTATI E DISCUSSIONE .....</b>   |  |
| 6.1 Caratterizzazione microbiologica del latte di massa.....                                   |  |
| 6.2 Caratterizzazione microbiologica di ricotta fresca ovina .....                             |  |
| 6.3 Caratterizzazione microbiologica di tuma ovina .....                                       |  |
| 6.4 Considerazioni igienico-sanitarie sui prodotti lattiero caseari .....                      |  |
| 6.4.1 Latte .....  |  |
| 6.4.2 Ricotta.....   |  |
| 6.4.3 Tuma .....   |  |
| 6.5 Identificazione dei ceppi appartenenti alla famiglia delle <i>Enterobacteriaceae</i> ..... |  |
| 6.5.1 Ceppi isolati dal latte .....  |  |
| 6.5.2 Ceppi isolati dalla ricotta .....  |  |
| 6.5.3 Ceppi isolati dalla tuma .....   |  |
| 6.5.4 Considerazioni di carattere epidemiologico .....   |  |
| 6.6 Espressione fenotipica di Enterobatteri ESBL.....  |  |
| 6.6.1 Screening su terreno cromogeno.....  |  |
| 6.6.2 Conferma fenotipica con test di combinazione.....  |  |

|   |  |
|---|--|
| 6.6.3 Diffusione dell'AMR in base alla provenienza .....  |  |
| 6.6.4 Distribuzione dell'AMR tra i ceppi .....  |  |
| 6.6.5 Considerazioni sulla presenza di <i>Enterobacteriaceae</i> ESBL+ nei prodotti lattiero<br>caseari ovini ..... |  |
| 6.6.6 Analisi proteomica dei ceppi ESBL+ ed ESBL- .....   |  |
| 6.6.6.1 Validazione dei risultati .....   |  |
| <b>7 CONCLUSIONI</b> .....  |  |

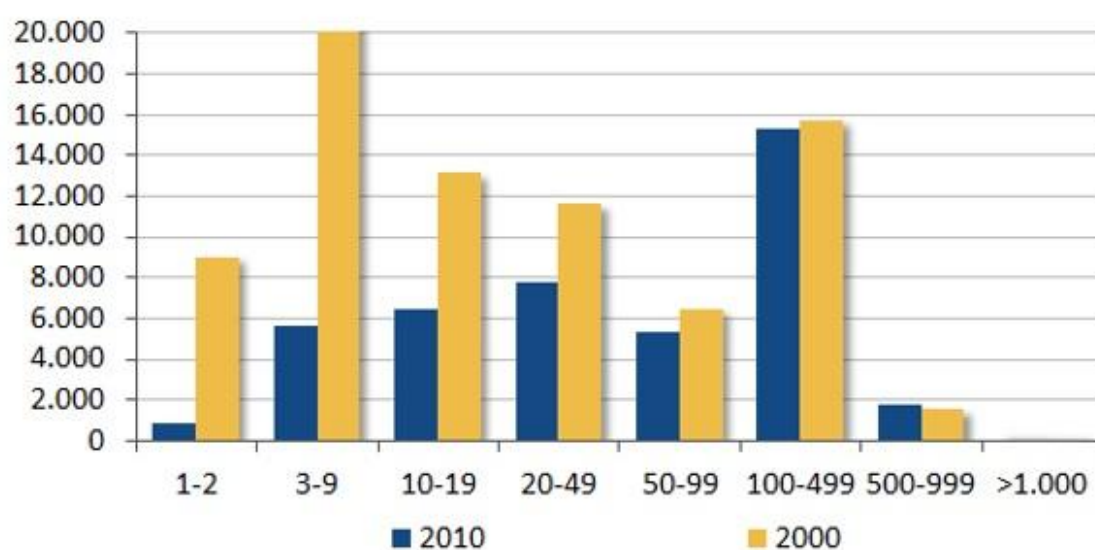
## **1. ALLEVAMENTO OVINO**

### **1.1 Allevamento ovino in Italia**

L'allevamento ovi-caprino in Italia conta un patrimonio di oltre 7,5 milioni di capi di cui oltre 5,7 milioni sono ovini (ISTAT, 2011). Trattasi dunque di una realtà importante nel panorama zootecnico nazionale, diffusa, peraltro sull'intero territorio italiano dalle zone alpine a quelle aride e sub-aride dell'Italia meridionale ed insulare. L'allevamento ovino rappresenta per la zootecnia italiana una potenzialità importante non solo dal punto di vista economico (carne, latte e derivati, lana) ma anche sociale ed ambientale; come presidio del territorio, controllo di aree interne esposte all'abbandono, ecc. Il comparto potrebbe esprimere un contributo certamente più incisivo al bilancio agroalimentare nazionale, ma è frenato da carenze strutturali, organizzative, commerciali sanitarie e dalla competitività delle produzioni comunitarie ed extracomunitarie di lana e carne. Il patrimonio ovi-caprino nazionale al 2000, era stato stimato di 6.810.389 capi (di cui 4.433.675 pecore da latte, 1.663.148 cosiddette "altre pecore" non da latte e 713.566 "altri ovini" agnelli maschi e femmine di età inferiore ad 1 anno, agnelloni, castrati, montoni, femmine di oltre 1 anno che non hanno mai partorito). I caprini censiti erano 923.755, allevati in 48.611 aziende. Secondo i dati del precedente Censimento, il numero di aziende che allevava ovini era già in diminuzione (-40,5%), così come il numero di quelle che allevavano caprini (-46,8%). Con i dati dell'ultimo Censimento, riferiti al 2010, si assiste ad un'ulteriore contrazione del 3,2% del comparto ovi-caprino rispetto al 2000 (ISTAT, 2011).

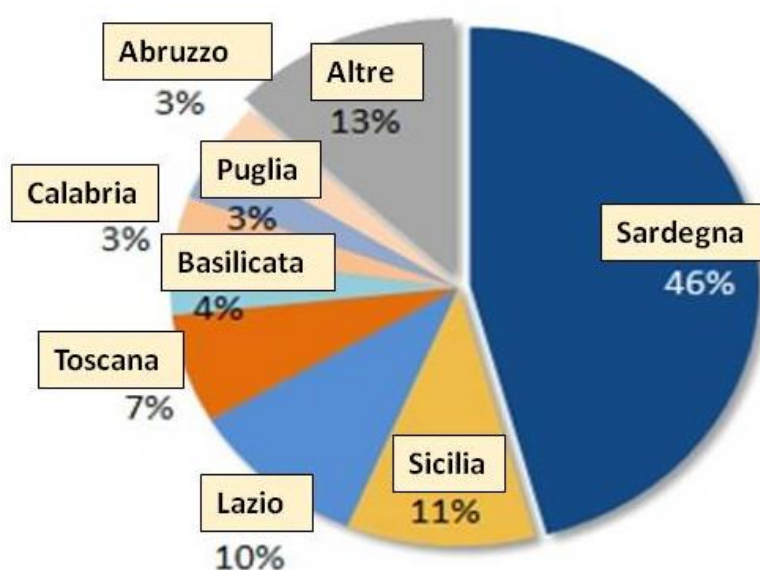


L'analisi dei dati sulle dimensioni aziendali rivela, come anche in questo comparto, le aziende di piccole dimensioni siano diminuite in misura maggiore rispetto a quelle medio-grandi, mentre si registra addirittura un lieve aumento per quelle con superficie maggiore a 100 ha. (Figura 1)



**Figura 1.** Consistenza del patrimonio ovino al 2000 vs 2010. Il calo interessa soprattutto le aziende sotto i 10 capi

Di conseguenza, il numero di capi si è generalmente ridotto anche se c'è stato un certo recupero degli stessi da parte delle aziende maggiori. Benché in termini percentuali la consistenza degli ovini abbia subito una flessione di circa il 22% (diminuzione di minore entità rispetto ad altri comparti come quello bovino) i capi si sono ridotti di quasi 2 milioni. Sardegna, Lazio, Sicilia, Toscana, Puglia, Calabria, Abruzzo, Campania e Basilicata (di cui le principali sono Sardegna, Lazio, Sicilia e Toscana) sono confermate come le regioni più rappresentative dell'allevamento, sia come numero di capi totale, che come numero medio di capi per azienda (Anagrafe Nazionale Zootecnica-Statistiche, 2017) (Figura 2).



**Figura 2.** Distribuzione del patrimonio ovino per Regione, dati aggiornati al 2017

L'ovicoltura si è differenziata sul territorio nazionale in relazione alle tradizioni, all'ambiente, alla capacità di corrispondere alle nuove esigenze produttive e commerciali. In Italia, come in tutti i paesi mediterranei, la produzione principale fornita dall'allevamento è il latte per la caseificazione, mentre la produzione di carne è tipica dei paesi dell'Europa del nord (es. Regno Unito ed Irlanda). Per quanto riguarda la produzione di latte ovino, si configurano tre diverse condizioni (ISMEA, 2016).

- 1) La Sardegna è tra le regioni al mondo con più alta concentrazione d'allevamento, ma strategie commerciali inadeguate hanno indebolito l'immagine di formaggi tradizionali di pregio, prodotti in grande quantità per il prevalente sbocco su mercati d'esportazione. La progressiva riduzione delle protezioni comunitarie pone obiettivi di differenziazione delle impostazioni produttive e commerciali e di spostamento sul mercato interno di rilevanti volumi di prodotto.
- 2) Lazio e Toscana, hanno ormai superato l'impostazione tradizionale della pastorizia, grazie anche ad un favorevole contesto infrastrutturale e a condizioni di mercato migliori rispetto a quelle delle regioni meridionali.
- 3) In Sicilia e in altre regioni meridionali, che pure possono vantare numerose produzioni tipiche, la trasformazione avviene in notevole misura (circa 90%) in azienda, originando circuiti commerciali corti, locali, senza l'attivazione di una qualche strategia di valorizzazione e di commercializzazione.

La grande maggioranza del latte ovino prodotto in Italia viene destinato alla produzione di pecorino. Le aziende industriali produttrici di formaggi ovinici in Italia, sono circa 145; esse trasformano circa il 75% del latte ovi-caprino di produzione

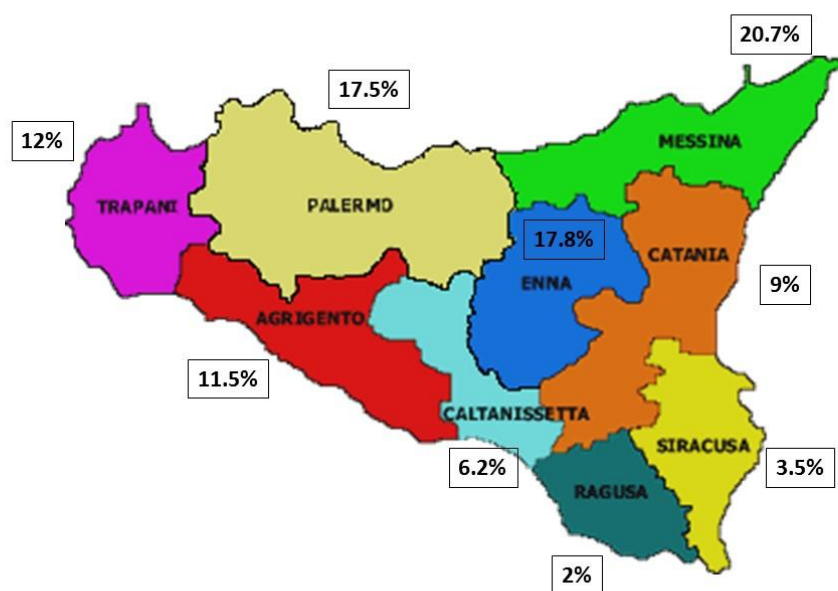
nazionale (ISMEA, 2016). Per la maggior parte si tratta di aziende di piccole dimensioni. Di queste, circa 70 sono situate in Sardegna, circa 30 in Toscana e circa 15 nel Lazio. Sardegna, Lazio, Toscana e Sicilia sono le regioni in cui si sono concentrati gli allevamenti ovini e gli stabilimenti per la produzione di formaggi derivati. Le altre regioni meridionali si distinguono per la produzione fortemente frammentata e realizzata per la quasi totalità direttamente in azienda. La maggior parte degli operatori sono imprese private di proprietà familiare o cooperative. Relativamente al comparto carni, ovine e caprine, la produzione nel 2003 è stata di 78.000 tonnellate per un valore di 415.000.000€ (Anagrafe Nazionale Zootecnica-Statistiche, 2017). Tuttavia, dal punto di vista territoriale un'attività economica deve essere valutata per la rilevanza che essa riveste nell'economia locale: in determinate aree del Paese l'allevamento ovi-caprino, sicuramente poco importante in termini assoluti e strutturalmente arretrato, è rilevante per il peso che assume rispetto alle altre produzioni agroalimentari, oppure per occupazione (per la mancanza di reali alternative). Va tuttavia notato che, sebbene il consumo di carni ovi-caprine in Italia mostri un declino di circa il 30% tra il 1990 ed il 2000, la produzione nazionale sul consumo incide solo per il 65% segno evidente che vi sarebbe spazio ulteriore per la produzione nazionale di carne (ISMEA, 2016). Purtroppo, l'impulso all'allevamento degli ovini da carne in Italia è frenato dai minori costi delle carni prodotte in paesi più specializzati in questo senso (Gran Bretagna) o in paesi con costi di produzione e valori fondiari molto più bassi dei nostri (paesi dell'Europa dell'Est). Inoltre, in Italia, il consumo è tuttora fortemente legato alla tradizione, per cui circa l'80% delle carni

ovi-caprine viene consumato stagionalmente (nel periodo pasquale e natalizio). Normalmente il prodotto più apprezzato in Italia, l'agnello leggero, viene prodotto proprio in questo periodo.

## **1.2 Allevamento ovino in Sicilia**

In Sicilia, la zootecnia incide per il 15% sul totale della produzione agricola locale, rappresentando quindi un settore “consistente” dell'agricoltura regionale, soprattutto in termini di reddito (Schiliro, 2006). La Sardegna risulta la regione leader nell'allevamento ovi-caprino con oltre 3 milioni di capi, pari al 46% dell'intero patrimonio nazionale, segue la Sicilia con quasi l'11% dell'intero patrimonio ovi-caprino italiano (Figura 2). In Sicilia, al 31 Marzo 2017, i dati ISTAT ricavati da censimenti regionali rivelano un totale di 11.601 allevamenti ovi-caprini di cui 8.601 strettamente ovini. Nello specifico, gli allevamenti ovini e caprini presenti nella regione hanno fatto registrare una consistenza del bestiame pari ad oltre 1.029.060 di cui 895.121 ovini e poco meno di 133.939 caprini (Anagrafe Nazionale Zootecnica – Statistiche, 2017). Nell'Isola, il comparto ovi-caprino assume ancora forti connotazioni di tipo tradizionale, con un carattere quasi esclusivamente di tipo estensivo. Tali allevamenti sono localizzati generalmente nelle zone interne e svantaggiate di montagna, dove la pastorizia rappresenta spesso la più importante fra le fonti di reddito disponibili, poiché in grado di utilizzare le risorse marginali che il territorio offre. La tecnica di allevamento maggiormente praticata è quella stanziale ed

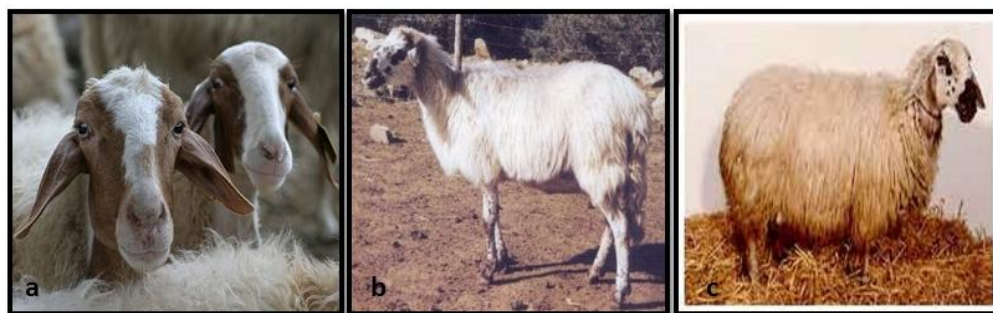
estensiva, con una particolare diffusione dell'allevamento di tipo brado, che influenza anche l'attività di trasformazione che risulta estremamente frammentata. Per quanto riguarda il numero di capi ovini, la consistenza maggiore si registra in provincia di Messina con un'incidenza del 20,7% (146.397 capi); seguono Enna con 125.722 capi ed un'aliquota del 17,8% e Palermo con il 17,5% pari a 123.841 capi allevati. Altre province rappresentative risultano: Trapani (12%), con 85.177 capi, Agrigento (11,5%), con 81.361 capi, Catania (9%), con 63.840 capi e Caltanissetta che con 44.310 capi allevati intercetta un'aliquota pari al 6,2%; meno rilevante risulta la consistenza di ovini nelle province di Siracusa (3,5%) e di Ragusa (2%) (Anagrafe Nazionale Zootecnica – Statistiche, 2017). (Figura 3)



**Figura 3.** Distribuzione del patrimonio ovino siciliano per provincia

Le razze più rappresentate sono la Pinzirita, la Comisana, la Valle del Belice e la Barbaresca, anche se, in realtà, il maggior numero di animali è verosimilmente rappresentato da tipi genetici intermedi, che si sono originati nel tempo a causa della introduzione di arieti Comisani, Sardi, e della Valle del Belice su una popolazione di Pinzirita. Ogni razza o tipo genetico ha comunque una sua area di diffusione: la Valle del Belice nella omonima area geografica a cavallo tra le province di Agrigento e Trapani ma in forte espansione per via delle sue caratteristiche produttive e della sua adattabilità; la Comisana nelle aree di pianura e rivierasche e la Pinzirita nelle aree montane delle province di Palermo e Messina ed in tutto l'entroterra dell'Isola. Infine, ovini di razza Barbaresca, sono allevati in purezza in rari nuclei diffusi in varie parti della Sicilia, anche se a forte rischio di estinzione a causa dell'inquinamento genetico.

(Figura 4)



**Figura 4.** Razze ovine allevate in Sicilia. a) Pinzirita. b) Comisana. c) Barbaresca

### **1.3 Latte e prodotti lattiero caseari**

La filiera del latte ovino e caprino, con una produzione pari a circa 64 milioni di euro, ha contribuito per l'1,9% alla produzione agricola regionale e per il 37% di quella del comparto lattiero caseario (Regione Siciliana, 2003). Una buona fetta della zootecnia invece, si svolge nelle aree interne svantaggiate e di montagna. Si tratta di frequente di allevamenti tradizionali di tipo semi-estensivo; le aziende, di piccole dimensioni, sono lontane dal mercato, sia in termini di capacità produttiva sia in termini strutturali (con strutture e condizioni igienico-sanitarie talvolta inadeguate) che organizzativi. La diffusione di aziende scarsamente specializzate e di piccole dimensioni è dettata dalle condizioni ambientali difficili, in genere carenti di risorse foraggere, ove il ricorso al pascolo rappresenta spesso l'unica fonte di alimentazione. Accanto a queste realtà produttive, nelle aree costiere e di pianura, si trovano allevamenti stanziali di tipo intensivo. Negli ultimi anni, si è registrato un sensibile abbassamento dell'età media degli allevatori, da cui è derivato un ricambio generazionale che ha favorito il processo di adeguamento degli allevamenti alle attuali norme igienico-sanitarie, anche se va rilevato che su questo versante molto lavoro deve essere ancora fatto. Per quanto riguarda il latte ovino e caprino, la quasi totalità è destinata alla trasformazione in prodotti lattiero caseari (ISMEA, 2016). Tuttavia, è necessario fare una precisazione, in quanto, la trasformazione del latte, in prevalenza, viene realizzata direttamente nell'azienda agricola con metodi di lavorazione di tipo artigianale, spesso non adeguati alle norme igienico-sanitarie vigenti ed incapaci di fornire produzioni omogenee sia in termini di pezzatura che di caratteristiche organolettiche. Queste produzioni pertanto,



vengono veicolate prevalentemente verso il mercato locale. Le problematiche organizzative e strutturali che gravano sul comparto lattiero-caseario siciliano determinano una scarsa attitudine all'export del settore. La produzione lattiero casearia infatti, è destinata al mercato locale o al più nazionale (Regione Siciliana, 2003). Tra i prodotti derivati siciliani, maggiormente commercializzati, ricordiamo oltre la ben nota ricotta ovina (fresca, salata affumicata), alcuni formaggi certificati a marchio DOP (Denominazione di Origine Protetta) quali il Pecorino siciliano, il Piacentinu Ennese, la Vastedda della valle del Belice. A questi si affiancano altri prodotti a marchio P.A.T. (Prodotti Agroalimentari Tradizionali) quali il Belicino, la Caciotta degli Elimi, il Canestrato, il Cofanetto, l'Ericino, formaggio di Santo Stefano di Quisquina, il Maiorchino, il Pecorino rosso, la Tuma, il Primo sale, il Secondo sale (ottenuti da varie fasi di stagionatura del pecorino) (MPAAF, 2014). (Figura 5)



**Figura 5.** Prodotti lattiero caseari. a) Pecorino siciliano DOP. b) Tuma. c) Ricotta fresca.

#### **1.4 La fase commerciale**

La filiera del latte ovi-caprino presenta problemi di scarsa integrazione verticale e organizzazione. A differenza del latte bovino, per il latte ovino non sempre si giunge ad un accordo interprofessionale, sul prezzo alla stalla tra produttori e trasformatori. Spesso le trattative sono difficoltose o assenti. Una buona parte delle imprese casearie private curano in proprio la distribuzione del prodotto lungo i diversi canali commerciali. Tuttavia, si registrano non poche difficoltà per le imprese cooperative in quanto la fase di distribuzione viene sovente ceduta a terzi consentendo in taluni casi di assumere i connotati di un oligopolio. Da parte dell'industria privata viene prestata maggiore cura alle fasi post produttive individuate come fattori chiave di successo. L'export viene attivato per via diretta dalle singole imprese o da commercianti esportatori, che si avvalgono di intermediari per la concentrazione dell'offerta. La filiera del latte ovi-caprino trova importanti limiti al suo sviluppo anche per carenze di flussi di informazioni verso e dagli operatori. Secondo i dati ISMEA, nel 2015 sono stati prodotte 397.510 tonnellate di latte ovino a fronte di 65.520 tonnellate di formaggi ovini. Rispetto al 2014 si è registrata una flessione del 22% della vendita di prodotti della filiera ovina in generale, dovuto al calo degli acquisti domestici di formaggi e carni ovine; con un aumento, tuttavia, del 3,8% sulle esportazioni del Pecorino italiano verso Paesi esteri con spinta al rialzo delle quotazioni di mercato dei formaggi pecorini, grazie ai maggiori volumi inviati prevalentemente negli USA (ISMEA, 2016). A fronte delle stime, una serie di fattori, possono giocare a vantaggio delle produzioni ovine italiane per lo sviluppo futuro dei mercati. Basti pensare alle

risorse a sostegno alla diversificazione del reddito (energie rinnovabili, trasformazione aziendale, vendita diretta) e multifunzionalità (agriturismo, fattorie didattiche, ecc.). A questi vanno associati la crescente attenzione del consumatore verso produzioni legate al territorio (es. turismo enogastronomico) e lo sviluppo di nuove fasce di consumo per la carne, presenza di etnie differenti e approccio dei giovani (es. per lo street food). Infine, l'espansione della domanda internazionale di formaggi, nei paesi "nuovi consumatori" (es. Cina) promette delle buone prospettive di espansione del mercato per gli anni a venire.

## **2. PROBLEMATICHE IGIENICO-SANTARIE LEGATE ALLA FILIERA OVINA**

I prodotti alimentari derivanti dalla filiera ovina sono stati ritenuti, per diversi anni, meno rischiosi per il consumatore rispetto a quelli, ad esempio della filiera avicola e suina. In realtà, le già menzionate difficoltà legate al settore ovi-caprino quali l'utilizzo di tecniche artigianali spesso desuete e legate alla tradizione, la scarsa disponibilità di fondi e sussidi e l'arretratezza sociale di determinare aree rurali, rendono abbastanza complicato tenere sotto controllo la qualità igienico sanitaria della filiera ovina e garantire il rispetto dei parametri imposti dal pacchetto igiene. Come ben noto, gli operatori del settore primario devono rispettare quanto previsto dal Reg. CE 852/04 e relative prescrizioni. In particolare gli OSA hanno l'obbligo di:

- mantenere livelli adeguati di pulizia degli impianti utilizzati per la produzione primaria e per le operazioni associate;
- mantenere livelli adeguati di pulizia ed igiene degli animali allevati;
- utilizzare acqua potabile o pulita;
- assicurare che il personale addetto alla manipolazione dei prodotti alimentari sia in buona salute e informato sui rischi sanitari;
- prevenire la contaminazione da parte di animali e insetti nocivi;
- immagazzinare e gestire i rifiuti e le sostanze pericolose;
- prevenire l'introduzione e la propagazione di malattie pericolose per l'uomo;
- usare correttamente i medicinali veterinari.

Nello specifico, per il comparto latte, gli allevatori produttori di latte crudo e colostro devono attenersi a quanto prescritto dal Reg CE 1662/06, e quindi, fornire una materia prima che non presenti rischi di trasmissione all'uomo di agenti patogeni e di sostanze indesiderate. L'OSA è tenuto, inoltre, a verificare in forma preventiva, ed attraverso un programma di sorveglianza continua, lo stato sanitario del gregge, in particolare per quanto attiene a zoonosi (es. brucellosi) e a patologie in grado di contaminare il latte (es. mastiti). L'allevatore è altresì, responsabile della presenza nel latte di residui di trattamenti medicinali, quali antibiotici ed antiparassitari. Ciò implica la necessità di porre maggiore attenzione all'uso del farmaco, rispettando scrupolosamente i tempi di sospensione prescritti. Per quanto riguarda i limiti imposti dalla legge. Il tenore di germi a 30 °C (per ml), come criterio igienico-sanitario per il latte crudo di ovini e caprini, dipende dalla destinazione del latte. Per il latte crudo destinato a subire trattamenti termici il valore deve essere  $\leq 1500000$  UFC/ml. Per il latte crudo destinato alla lavorazione mediante un processo che non comporti alcun trattamento termico la soglia di tolleranza scende a  $\leq 500\ 000$  UFC/ml (Reg. CE 853/04).

## **2.1 Tossinfezioni alimentari**

I processi produttivi inerenti gli alimenti di origine ovina potrebbero apparire “critici” da diversi punti di vista; basti pensare alla macellazione di tali animali per i quali le fasi di scuoiamento potrebbero risultare fortemente contaminanti la superficie della carcassa. Bisogna, inoltre, ricordare che la muscolatura di detti animali non va incontro ad un'

intensa acidificazione post-mortale, cosa che, ovviamente, potrebbe favorire lo sviluppo di batteri patogeni (Devine et al., 1993). Considerazioni simili potrebbero essere effettuate per quanto riguarda i prodotti lattiero caseari, visto che il latte ovino risulta più frequentemente e maggiormente inquinato da batteri di contaminazione fecale (Bencini and Pulina, 1997). Questo aspetto va messo in relazione all'elevato livello di contaminazione del vello, così come dalla minore frequenza di impiego della mungitura meccanica per la raccolta del latte ovino. Alla luce di tali osservazioni le problematiche microbiologiche legate al consumo di prodotti di origine ovina sono molteplici. Per il comparto lattiero caseario, diversi patogeni alimentari sono stati, infatti, ritenuti responsabili di episodi tossinfettivi quali: *E. coli* STEC (shiga-toxing producing *E. coli*), *Campylobacter* termofili (*C. coli*, *C. lari*, *C. jejuni*), *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus* enterotossigeno (Verraes et al., 2015), di cui qui di seguito si riportano brevemente alcune informazioni.

### **2.1.1. *Escherichia coli* STEC (shiga-toxing producing *E. coli*)**

Gli *Escherichia coli* verocitotossici (STEC-Shiga Toxing *Escherichia coli*) sono un gruppo di *E. coli* entero-emorragici in grado di produrre delle tossine denominate verocito-tossine. Tali germi sono i principali responsabili di malattia nei paesi industrializzati, con circa 73.000 casi d'infezione e quasi 600 morti ogni anno negli Stati Uniti. Oltre 50 sierotipi causano malattia; tuttavia il sierogruppo principalmente responsabile è O157:H7. L'ingestione di una carica batterica irrisoria ( $< 10^2$  UFC) può

causare la malattia che si associa prevalentemente al consumo di carne di manzo cruda o poco cotta, di latte non pastorizzato, di succhi di frutta contaminati e di verdura cruda. La forma clinica si manifesta a carico dell'intestino crasso dopo un periodo di incubazione di 3-4 giorni durante i quali comincia a comparire diarrea non sanguinolenta. Circa al terzo giorno compaiono forti dolori addominali accompagnati da diarrea emorragica. I ceppi STEC sono in grado di secernere le tossine Stx-1 (identica alla tossina di *Shigella*) ed Stx-2 (60% di analogia alla tossina di *Shigella*). Entrambe le tossine sono codificate da fagi lisogeni con una subunità A e cinque subunità B, in grado di legarsi al recettore Gb3 degli enterociti. Il legame con quest'ultimo promuove l'internalizzazione della subunità A nella cellula bersaglio, bloccando la sintesi proteica. La distruzione degli enterociti, accompagnata da una diminuzione della capacità di assorbimento, comporta la presenza di una diarrea molto liquida e sanguinolenta. Parimenti, la produzione di Stx-2 si associa spesso alla sindrome emolitico-uremica (SEU) caratterizzata da danno renale acuto, anemia emolitica e piastrinopenia. Tale sindrome compare in più del 10% delle persone infettate ed è causa di danno renale acuto soprattutto in bambini ed anziani e nel 3-5% può essere fatale. Infatti Stx-2 è in grado di legarsi con maggior affinità al Gb3 espresso dalle cellule renali, provocandone la distruzione. Inoltre le tossine Stx sono in grado di stimolare la produzione di TNF- $\alpha$  e interleuchina-6 che, oltre a sostenere il quadro infiammatorio, promuovono l'esposizione del recettore Gb3. La maggior parte dei casi di infezione riportati nell'uomo, in tutto il mondo, sono dovuti al sierotipo O157; è stato tuttavia rilevato un aumento dei casi di infezione da altri sierotipi quali O26, O111, O103 e O145 (EFSA, 2016). In Italia, sono stati isolati stipiti VTEC O157 dal latte ovino con

una prevalenza pari allo 0,6% dei campioni esaminati. Tale percentuale, seppur esigua, suggerisce che le pecore possano contribuire, al mantenimento ed alla diffusione di *E. coli* produttori di verocitotossine sul nostro territorio (Nuvoloni et al., 2003; Rubini et al., 1999). A conferma di ciò, sulla base dei dati epidemiologici derivanti dall'ultimo rapporto dell'EFSA sulle zoonosi, emerge un maggior interessamento degli alimenti di origine ovina in episodi tossinfettivi, rispetto agli anni passati, legati principalmente ad un aumento dei casi di infezione da *E. coli* STEC, che interessano varie matrici alimentari, quali latte, formaggi, carni ecc.. (Otero et al., 2017; Hanlon et al., 2017). La percentuale di ovini positivi si aggira intorno al 18.5% della popolazione analizzata, rispetto all'8.3 % dei bovini e suini positivi (EFSA, 2016). L'identificazione di pratiche di gestione atte a ridurre l'escrezione di *E. coli* O157:H7 da parte del bestiame può ridurre il rischio di esposizione umana al patogeno. Tuttavia, ci sono molti fattori che interagiscono contemporaneamente in allevamento e che, di conseguenza, rendono difficile manipolare l'ecologia dei patogeni di origine alimentare, come *E. coli* O157:H7. Mentre alcuni fattori come la dimensione della mandria sono risultati ininfluenti, altri hanno invece dimostrato di svolgere un ruolo nell'aumento o diminuzione dell'escrezione di *E. coli* patogeni nelle feci. La stagionalità, ad esempio, sembra giocare un ruolo importante, in tal senso. L'eliminazione attraverso le feci seguirebbe, infatti, un andamento stagionale, con un picco nella stagione calda; osservazione in linea con la maggior parte dei casi segnalati, con tassi di prevalenza più elevati tra il mese di Giugno ed Ottobre rispetto al periodo compreso tra Dicembre e Marzo (La Ragione et al., 2009). Questi dati suggeriscono che i fattori ambientali, come il freddo, possono limitare la trasmissione e la diffusione del



batterio. Anche l'età dell'animale sembra essere un fattore significativo nell'epidemiologia di *E. coli* O157:H7. Animali giovani hanno dimostrato di essere più suscettibili alla colonizzazione da parte del patogeno. In generale, l'eliminazione fecale di *E. coli* O157:H7 è più comune nei soggetti da 2 a 24 mesi di età, piuttosto che nei bovini adulti, grazie ad una maggiore suscettibilità dei giovani alla colonizzazione da parte del patogeno (Hancock et al., 1997).

### **2.1.2. *Campylobacter***

Il genere *Campylobacter* comprende diverse specie di batteri termo tolleranti, microaerofili (crescono a temperature comprese tra i 37 °C e i 42°C, in presenza di poco ossigeno), responsabili di "campilobatteriosi" nell'uomo e negli animali. Le specie responsabili di infezione sono riconducibili a tre generi: *C. lari*, *C. coli*, e *C.jejuni* che risultano variamente diffusi in natura. Il principale serbatoio è rappresentato dal tratto intestinale di animali selvatici e domestici. Gli uccelli, soprattutto il pollame, sono gli ospiti più comuni, ma anche bovini, ovini e suini rappresentano importanti reservoir (Milnes et al., 2008; Zweifel et al., 2009; Stanley and Jones; 2003). Episodi epidemici di infezione da *Campylobacter* sono stati associati prevalentemente al consumo di acqua o latte contaminati, alimenti a rischio consumati crudi e, occasionalmente, a carne di pollo. La trasmissione del *Campylobacter* attraverso il latte può essere facilmente controllata tramite la pastorizzazione, mentre la contaminazione dell'acqua può essere ridotta con un sicuro sistema di potabilizzazione. Carni di maiale e di ruminanti sono generalmente

considerate a basso rischio, tuttavia le frattaglie crude di questi animali sono a rischio piuttosto elevato di trasmissione. Anche i prodotti freschi, se consumati crudi, possono essere veicolo di infezione; quindi, per ridurre al minimo la diffusione del *Campylobacter*, è indispensabile incrementare l'applicazione di misure di prevenzione, come le Gap (Good Agriculture Practices) e le Ghp (Good Handling Practices), ed evitare l'impiego di acqua contaminata per l'irrigazione dei campi e il lavaggio degli alimenti. Nei casi sporadici, la principale via di trasmissione è la carne di pollame, a rischio di contaminazione durante la manipolazione sia da parte dei produttori sia da parte dei consumatori. Le conoscenze sulle vie di contaminazione del pollo sono ancora incomplete, ma i fattori maggiormente correlati alla diffusione del *Campylobacter* sono la stagione, l'età del pollame, le modalità di somministrazione dei mangimi, i trasferimenti dei capi da un allevamento a un altro, le condizioni di trasporto del pollame, l'acqua e i medicinali somministrati agli animali. La contaminazione della carne avviene durante la macellazione, attraverso il contatto con il materiale fecale o tramite il contenuto intestinale degli animali in macellazione. Il lavaggio della carne dopo la macellazione riduce il rischio di contaminazione, così come il congelamento dei prodotti alimentari. Misure di controllo in tutti i settori della catena alimentare, dalla produzione alla preparazione domestica del cibo, contribuiscono a ridurre il rischio di infezione. A questo proposito è utile promuovere le norme igieniche di base sia durante le fasi di preparazione, che durante la conservazione del cibo. Il periodo di incubazione della campylobatteriosi varia da un giorno a una settimana, a seconda dei casi. I sintomi sono solitamente leggeri o moderati e consistono in diarrea, dolori addominali, febbre, mal di

testa, nausea e vomito. La loro durata varia generalmente da uno a sette giorni, ma nel 20% dei casi circa, può superare la settimana. Manifestazioni più gravi della malattia si verificano in meno dell'1% dei pazienti, solitamente in soggetti molto anziani o molto giovani, ed includono meningiti, endocarditi e aborti settici. Pazienti con deficit di immunoglobuline possono presentare infezioni gravi, prolungate e ricorrenti. Il tasso di mortalità è basso, ma per i pazienti più vulnerabili (bambini, anziani e immunocompromessi) le conseguenze della malattia possono essere molto gravi. La campylobatteriosi è stata associata a diverse sequele croniche che includono artrite reattiva, infiammazioni a carico di fegato e reni e la sindrome di Guillain-Barré, caratterizzata da manifestazioni neurologiche. A causa della mancanza di caratteristiche cliniche specifiche, la campylobatteriosi è difficile da distinguere dalle altre patologie gastrointestinali. Una diagnosi definitiva può essere effettuata solo attraverso l'analisi microbiologica di campioni clinici. Benché la campylobatteriosi rappresenti la zoonosi più frequentemente riportata in Europa negli ultimi anni, ancora pochi sono i dati a disposizione sul ruolo dei prodotti della filiera ovina come fonte di infezione (Fox et al., 2017; Christidis et al., 2016).

### **2.1.3. *Salmonella***

I batteri appartenenti al genere *Salmonella* sono responsabili della seconda zoonosi più diffusa in Europa, la "salmonellosi". La *Salmonella* è presente in natura con più di 2000 varianti (i cosiddetti sierotipi) ma i ceppi più frequentemente diffusi nell'uomo e nelle

specie animali, in particolare in quelle allevate per la catena alimentare, sono *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*. Le infezioni che ne conseguono si distinguono in forme tifoidee (*S. Typhi* e *S. Paratyphi*, responsabili della febbre tifoide e delle febbri enteriche in genere), in cui l'uomo rappresenta l'unico serbatoio del microrganismo, e forme non tifoidee, causate dalle cosiddette *Salmonelle* minori (come *S. Typhimurium* e la *S. Enteritidis*), responsabili di forme cliniche a prevalente manifestazione gastroenterica. Le *Salmonelle* non tifoidee sono una delle cause più frequenti di tossinfezioni alimentari nel mondo industrializzato. Sono responsabili di oltre il 50% del totale delle infezioni gastrointestinali e del 45.7% (*S. Enteritidis*) e del 15.8%, (*S. Typhimurium*) dei casi accertati di malattia nell'uomo, nell'anno 2015 (EFSA, 2016). I principali serbatoi dell'infezione sono l'uomo e gli animali. L'infezione si trasmette per via oro-fecale, attraverso l'ingestione di cibi o bevande contaminate o per contatto, attraverso la manipolazione di oggetti. I principali veicoli di trasmissione della salmonella sono rappresentati da: alimenti, acqua contaminata, piccoli animali domestici. Gli alimenti contaminati rappresentano uno dei veicoli più importanti di diffusione dell'infezione nell'uomo. Tuttavia, per poter causare la malattia è necessaria la colonizzazione massiva dell'agente patogeno nell'alimento prima dell'ingestione. La contaminazione degli alimenti può avvenire al momento della loro produzione, durante la preparazione, oppure dopo la cottura a causa di una manipolazione non corretta degli alimenti. In particolare, sono da considerarsi alimenti a rischio: uova crude (o poco cotte) e derivati a base di uova, latte crudo e derivati del latte crudo (compreso il latte in polvere), carne e derivati (specialmente se poco cotti), preparati per dolci, creme, gelato, frutta e verdura

contaminate durante il taglio. Veicoli dell'infezione sono anche superfici e utensili, e qualsiasi alimento manipolato da persone infette, con scarsa attenzione all'igiene personale. La gravità delle manifestazioni cliniche varia dai semplici disturbi del tratto gastrointestinale (febbre, dolore addominale, nausea, vomito e diarrea) fino a forme cliniche più gravi (batteriemie o infezioni focali a carico per esempio di ossa e meningi) che si verificano soprattutto in soggetti predisposti. I sintomi della malattia possono comparire tra le 6 e le 72 ore dall'ingestione di alimenti contaminati (ma più comunemente si manifestano dopo 12-36 ore) e si protraggono per 4-7 giorni. Nella maggior parte dei casi la malattia ha un decorso benigno e non richiede l'ospedalizzazione, ma talvolta l'infezione può aggravarsi al punto tale da rendere necessario il ricovero. Le salmonellosi nell'uomo possono anche causare lo stato di portatore asintomatico. Sono particolarmente suscettibili all'infezione da salmonella i soggetti:

- affetti da acloridria (disfunzione dell'apparato digerente, consistente nell'assenza di acido cloridrico nel succo gastrico) e da malattie neoplastiche
- in terapia con farmaci anti-acido, in pregressa o concomitante terapia antibiotica ad ampio spettro, e/o in terapia immunosoppressiva
- che hanno subito interventi chirurgici a carico dell'apparato gastrointestinale.

La gravità della malattia è in relazione al sierotipo infettante, al numero di microrganismi ingeriti e a fattori di resistenza del paziente. In particolare, a livelli di acidità gastrica ridotti corrispondono maggiori probabilità di manifestare diarrea. Ai

germi che non vengono neutralizzati dalla secrezione acida dello stomaco l'intestino umano risponde con una reazione infiammatoria che provoca il fenomeno diarroico. Soggetti a rischio sono anziani, bambini e donne in gravidanza, ma anche individui affetti da anemia falciforme e Hiv. Per questi ultimi l'infezione da salmonella si manifesta anche con ricorrenti episodi di setticemia non tifoidea. Benché i dati a nostra disposizione sia scarsi riguardo il ruolo degli alimenti di origine ovina come veicolo di tossinfezione alimentare, è ormai da anni accertato il ruolo dei piccoli ruminanti come serbatoio del patogeno. (Kebede et al., 2016; Amagliani et al., 2016)

#### **2.1.4. *Listeria monocytogenes***

*Listeria monocytogenes* è un batterio Gram +, asporigeno, aerobio-anaerobio facoltativo, mobile a 28°C per la presenza di flagelli peritrichi (da 1 a 5), catalasi positivo ma ossidasi negativo. Il microrganismo cresce in un range di temperatura molto largo (tra i + 3 C e i 45 C) con un optimum tra i 30°C e i 38°C. Presenta buona resistenza a varie condizioni di pH (tra 4,4 e 9,6) e temperatura; caratteristiche che lo rendono un pericoloso contaminante per gli alimenti, anche se conservati in a temperature di refrigerazione. La sua denominazione deriva dal quadro di monocitosi ematica tipico dell'infezione da esso provocata, la listeriosi. È un parassita intracellulare, che riesce a evadere efficacemente dal fagosoma. Possiede, infatti, una peculiare proteina con attività enzimatica polimerizzante l'actina (ActA): il batterio si crea una "coda" di actina che gli dà la propulsione necessaria a superare la membrana

plasmatica della cellula ospite, passando così direttamente nella cellula adiacente. La listeriosi è una seria tossinfezione, prevalentemente a trasmissione alimentare. Nei Paesi occidentali, la malattia si sta rivelando sempre più un importante problema di sanità pubblica. Seppur relativamente rara, infatti, si può manifestare con un quadro clinico severo e tassi di mortalità elevati soprattutto in soggetti fragili (YOPI) quali neonati (young), anziani (old), donne gravide (pregnant) e adulti immunocompromessi (immuno-compromised). *L. monocytogenes* è un microrganismo ubiquitario, molto diffuso nell'ambiente: si trova comunemente nel suolo, nell'acqua, nella vegetazione e nelle feci di numerose specie animali, senza che questi mostrino sintomi apparenti. Può contaminare qualunque livello della catena di produzione e consumo degli alimenti. Gli alimenti principalmente associati all'infezione da listeriosi comprendono: pesce, carne e verdure crude, latte non pastorizzato e latticini come formaggi molli e burro, cibi trasformati e preparati RTE (Ready to eat) inclusi hot dog, carni fredde tipiche delle gastronomie, insalate preconfezionate, panini, pesce affumicato. Più raramente le infezioni possono verificarsi attraverso il contatto diretto con animali, persone o l'ambiente contaminato. La listeriosi può assumere diverse forme cliniche, dalla gastroenterite acuta febbrile più tipica delle tossinfezioni alimentari, che si manifesta nel giro di poche ore dall'ingestione (ed è autolimitante nei soggetti sani), a quella invasiva o sistemica. Le donne in gravidanza di solito manifestano una sindrome simil-influenzale con febbre e altri sintomi non specifici. Tuttavia, le infezioni contratte in gravidanza possono comportare serie conseguenze sul feto (morte fetale, aborto, parto prematuro, o listeriosi congenita). In adulti

immuno-compromesse e anziani, la listeriosi può causare meningiti, encefaliti, gravi setticemie. Queste manifestazioni cliniche sono trattabili con antibiotici, ma la prognosi nei casi più gravi è spesso infausta. L'incubazione media è di 3 settimane (ma può prolungarsi fino a 70 giorni). A tal proposito uno dei criteri microbiologici di sicurezza alimentare introdotto con il Reg. Ce 2073/2005 e successive modificazioni, riguarda proprio i limiti di accettabilità per l'immissione sul mercato di alimenti che possono o meno essere terreno favorevole alla replicazione di *L. monocytogenes*. I dati epidemiologici riportano un aumento dell'incidenza di animali positivi soprattutto tra bovini, ovini e caprini (EFSA,2016). Diversi prodotti della filiera ovina possono rappresentare un substrato ideale per la replicazione del patogeno e quindi veicolo di contaminazione e diffusione dello stesso, quali carni crude o poco cotte, latte crudo, formaggi freschi o poco stagionati, latticini (ricotta) (Schoder et al., 2011; Spanu et al., 2012; Spanu et al., 2015).

#### **2.1.5. Tossina stafilococcica**

Il genere *Staphylococcus* include cocchi gram-positivi, asporigeni, aerobi facoltativi e immobili. Sono microrganismi ubiquitari e presenti a livello della cute e del nasofaringe in soggetti spesso portatori sani. Le enterotossine prodotte da alcuni ceppi di *Staphylococcus aureus* enterotossigeni sono un'importante causa di intossicazione alimentare. Sono un gruppo eterogeneo di proteine globulari a catena singola, termostabili (fino a 30 minuti a 121° C), solubili in acqua e in soluzioni saline, stabili



in un range di pH tra 3 – 9, resistenti a enzimi proteolitici e irradiazioni . Se ne conoscono sierologicamente molti tipi, ma i più presenti sono 5 designati in A, B, C, D ed E; il tipo C presenta tre sottotipi: C1, C2 e C3. La tossina più frequente è la A ma alcuni ceppi di *S. aureus* possono produrre anche due o più enterotossine contemporaneamente. La capacità di adattarsi e di sopravvivere in habitat diversi, tra cui numerosi alimenti, rende *S. aureus* una delle cause più frequenti di malattia a trasmissione alimentare nel mondo. Le matrici alimentari maggiormente a rischio sono il latte, il latte in polvere e prodotti derivati, i prodotti lattiero-caseari ed in generale i cibi ricchi di grassi, la carne tritata, i prodotti RTE. La contaminazione degli alimenti avviene o a partire dalle materie prime o a seguito della manipolazione nelle fasi di preparazione. La pastorizzazione elimina le cellule di *S. aureus* ma non inattiva le enterotossine poiché sono termostabili. La patologia tipica che i soggetti manifestano è la gastro-enterite con sintomi quali: vomito, diarrea, febbre, dolori addominali e mal di testa che possono insorgere anche poche ore (1 o 2) dopo l'ingestione dell'alimento. La presenza di  $10^5$  -  $10^6$  UFC/g di *S. aureus* è ritenuta indispensabile affinché possa essere prodotta una quantità sufficiente di enterotossine per dare origine ad una intossicazione: le dose scatenante necessaria rimane comunque estremamente ridotta. Il Regolamento CE 2073/2005 richiede che sia effettuata la ricerca di enterotossine stafilococciche nei formaggi, nel latte in polvere e nel siero di latte in polvere. Inoltre la normativa prevede che venga effettuata la determinazione delle enterotossine stafilococciche anche nel caso in cui, si rilevino valori di Stafilococchi coagulasi positivi  $> 10^5$  UFC/g nei seguenti alimenti:

- formaggi a base di latte crudo;
- formaggi a base di latte sottoposto a trattamento termico a temperatura inferiore quella della pastorizzazione e formaggi stagionati a base di latte o siero di latte sottoposto a pastorizzazione o a trattamento termico a temperatura più elevata;
- formaggi a pasta molle non stagionati (formaggi freschi) a base di latte o siero di latte sottoposto a pastorizzazione o a trattamento termico a temperatura più elevata. Per questi prodotti è altresì fissato il limite di  $10^2$  UFC/g per gli Stafilococchi coagulasi positivi come indicatori di igiene del processo; superato il quale sono necessarie azioni correttive.

I prodotti ovini quali latte e suoi derivati sono substrati ideali per la colonizzazione da parte di *S. aureus* enterotossigeno così come ampiamente dimostrato dai numerosi studi condotti soprattutto sul nostro territorio. Alimenti quali formaggi poco stagionati e latticini prodotti con latte ovino sono infatti responsabili di importanti episodi di intossicazione (Basanisi et al., 2016; Bianchi et al., 2014; Vitale et al., 2015)

### **3. L'ANTIBIOTICO RESISTENZA**

La scoperta degli antibiotici e, più in generale, degli antimicrobici in medicina umana e veterinaria, ha rappresentato un importantissimo traguardo per il miglioramento delle condizioni di salute dell'uomo e degli animali. Infatti, lo sviluppo e l'impiego degli antibiotici, a partire dalla seconda metà del XX secolo, ha rivoluzionato l'approccio al trattamento e alla prevenzione delle malattie infettive e delle infezioni ritenute in passato incurabili. I primi antimicrobici furono scoperti attorno agli anni '30 e, parallelamente con loro, nacque anche l'antibiotico-resistenza: Nel corso degli anni si è infatti riscontrato che, dopo una prima sensibilità al farmaco, i batteri iniziarono a manifestare una certa resistenza al trattamento terapeutico. Questo fenomeno definito, appunto, antimicrobico-resistenza (AMR), indica la capacità del microrganismo di sopravvivere e moltiplicarsi, nonostante venga in contatto con l'antibiotico specifico, in una quantità e concentrazione tale da eliminare microrganismi simili. Pertanto, l'uso eccessivo o inappropriato di antibiotici è stato collegato alla comparsa e diffusione di germi resistenti alla loro azione, con conseguente perdita di efficacia delle terapie e gravi rischi per la salute pubblica. Malgrado siano state investite risorse ed energie al fine di aumentare la conoscenza dei meccanismi di resistenza e nella ricerca di molecole sempre più efficaci, la comparsa di resistenze agli antibiotici è al momento più veloce dello sviluppo di nuove molecole. Oggi questa problematica è diventata una vera e propria priorità di sanità pubblica a livello mondiale, non soltanto per le importanti implicazioni cliniche (aumento della morbilità, letalità, durata della malattia, possibilità di sviluppo di complicanze, possibilità di epidemie), ma anche per

la ricaduta economica delle infezioni da batteri antibiotico-resistenti, dovuta al costo aggiuntivo richiesto per l'impiego di farmaci e di procedure più costose, per l'allungamento delle degenze in ospedale e per eventuali invalidità. Negli ultimi anni, questo fenomeno sta aumentando notevolmente e rende necessaria una valutazione dell'impatto in sanità pubblica, specifica per patogeno, per antibiotico e per area geografica. Ogni microrganismo è infatti causa di malattie di severità e incidenza diversa e nei suoi confronti possono essere disponibili pochi o molti chemioterapici efficaci o anche altre forme di prevenzione primaria come la vaccinazione. Inoltre la comparsa di patogeni resistenti contemporaneamente a più antibiotici (*multidrug resistance*) riduce ulteriormente la possibilità di un trattamento efficace. È da sottolineare che questo fenomeno riguarda spesso infezioni correlate all'assistenza sanitaria, che insorgono e si diffondono all'interno di ospedali e altre strutture sanitarie. Il problema della resistenza agli antibiotici è complesso poiché fondato su molteplici fattori: l'aumentato uso di questi farmaci (incluso l'utilizzo non appropriato), la diffusione delle infezioni ospedaliere da microrganismi antibiotico-resistenti (e il limitato controllo di queste infezioni), un aumento dei viaggi internazionali e quindi una maggiore diffusione dei ceppi. L'uso continuo degli antibiotici aumenta la pressione selettiva favorendo l'emergere, la moltiplicazione e la diffusione dei ceppi resistenti. L'Organizzazione Mondiale della Sanità e l'Unione Europea hanno sottolineato più volte l'importanza di questa materia e hanno indicato una serie di provvedimenti specifici, volti a contenere il diffondersi della resistenza antimicrobica attraverso un uso prudente degli agenti antibiotici nell'uomo e negli

animali. La Comunità Europea con la direttiva 2003/99/CE, art. 7. impone a ciascun stato membro la messa in atto di sistemi di monitoraggio finalizzati a ottenere dati comparabili relativi alla diffusione dell'antibiotico-resistenza nei batteri zoonotici. Un'efficace riduzione del fenomeno non può essere conseguita solo attraverso misure a livello nazionale, ma richiede, difatti, una strategia comune e un'azione coordinata a livello internazionale. Recentemente, il Parlamento europeo, in parere congiunto con tutte le agenzie europee che operano nel settore, ha lanciato il "Piano d'azione europeo sulla resistenza agli antibiotici 2011-2015", una serie di importanti azioni strategiche per la mitigazione, la prevenzione ed il controllo, al fine di preservare l'efficacia degli antibiotici, ed assicurare che rimangano uno strumento efficace per combattere le malattie, sia nell'uomo che negli animali. L'Unione Europea è intervenuta emanando diversi provvedimenti legislativi atti a regolamentare l'uso degli antibiotici in veterinaria; vietandone ad esempio l'impiego come promotori di crescita e limitando l'uso di farmaci basati sui medesimi principi attivi in medicina umana e veterinaria, dove l'impiego dell'antibiotico deve essere giustificato da una puntuale diagnosi a fronte di un antibiogramma, che rappresenta uno strumento essenziale per garantire che la molecola prescelta sia efficace per curare il soggetto malato (Commissione Europea, 2011).

### **3.1. I sistemi di sorveglianza**

Una recente indagine ha stimato che nel mondo, nel 2050, le infezioni batteriche causeranno circa 10 milioni di morti all'anno, superando ampiamente i decessi per tumore (8,2 milioni), diabete (1,5 milioni) o incidenti stradali (1,2 milioni) con una previsione di costi che supera i 100 trilioni di dollari (O'Neill, 2016). In Europa si verificano annualmente 4 milioni di infezioni da germi antibiotico-resistenti che causano oltre 37.000 decessi e sono responsabili di un significativo assorbimento di risorse (sanitarie e non) che ammontano a circa 1,5 miliardi di euro l'anno. In Italia la resistenza agli antibiotici si mantiene tra le più elevate in Europa e risulta, nella maggior parte dei casi, al di sopra della media europea. Nel nostro Paese ogni anno, dal 7% al 10 % dei pazienti va incontro a un'infezione batterica multi-resistente con migliaia di decessi. Le infezioni correlate all'assistenza colpiscono ogni anno circa 284.100 pazienti causando circa 4.500-7.000 decessi (ECDC/EFSA/EMA, 2017). L'importanza del fenomeno e la sua diffusione a livello mondiale, hanno dato origine all'attivazione di numerosi sistemi di sorveglianza, basati sulla raccolta dei dati di laboratorio a livello locale o nazionale. Per rendere omogenei e interpretabili i dati raccolti da questi sistemi e favorire il confronto tra varie realtà nel 1998 l'Unione europea ha deciso di finanziare una rete di sorveglianza europea EARSS (European Antimicrobial Resistance Surveillance System) che coinvolgesse diverse reti di sorveglianza nazionali. Da gennaio 2010 la sorveglianza dell'antibiotico-resistenza europea ha assunto proprietà istituzionali diventando una rete europea dei sistemi di sorveglianza nazionali della resistenza antimicrobica (EARSS-NET), coordinata e

finanziata dall'ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control) che, attraverso un sistema informativo, denominato TESSy (The European Surveillance System), raccoglie i dati attraverso la trasmissione di file basandosi su specifiche ereditate dal precedente progetto europeo EARSS (ECDC, 2016). L'EFSA opera in stretta collaborazione con altre agenzie dell'UE coinvolte nel campo come il Centro europeo per la prevenzione e il controllo delle malattie (ECDC) e l'Agenzia europea dei medicinali (EMA). L'EFSA controlla e analizza la situazione relativa alla resistenza agli antimicrobici negli alimenti e negli animali in tutta l'Europa. L'Autorità è assistita nelle sue attività dalla task force per la raccolta dei dati sulle zoonosi: una rete paneuropea di rappresentanti nazionali degli Stati membri dell'UE, di altri Paesi partecipanti all'attività di segnalazione nonché dell'Organizzazione mondiale della sanità (OMS) e dell'Organizzazione mondiale per la salute animale (OIE). Alla luce dei dati raccolti dagli Stati membri dell'UE, l'EFSA elabora, in collaborazione con l'ECDC, la relazione sintetica annuale dell'Unione europea sulle zoonosi, sui focolai di origine alimentare e sulla resistenza agli antimicrobici, che illustra l'andamento della situazione in Europa. L'EFSA pubblica inoltre relazioni sulle indagini di riferimento riguardanti la prevalenza della resistenza agli antimicrobici nell'UE in specifiche popolazioni di animali e fornisce linee guida alle autorità nazionali in merito alle modalità di svolgimento delle attività di monitoraggio e segnalazione. I gruppi di esperti scientifici dell'EFSA revisionano le relazioni annuali e formulano raccomandazioni sulle misure di prevenzione e riduzione. L'EFSA, l'ECDC, l'EMA e il Comitato scientifico della Commissione europea sui rischi sanitari emergenti e

nuovi (SCENIHR) hanno pubblicato inoltre un parere scientifico congiunto sulla resistenza agli antimicrobici, in cui è trattato in particolare il tema delle infezioni che possono essere trasmesse dagli animali e dagli alimenti all'uomo (zoonosi). Tale report rivela come negli ultimi anni ci sia stato un aumento significativo dei livelli di AMR in diversi patogeni alimentari direttamente proporzionale all'assunzione di antimicrobici sia da parte dell'uomo che degli animali. (ECDC/EFSA/EMA, 2017). In Italia, nel 1999 l'Istituto Superiore di Sanità ha istituito il progetto pilota di sorveglianza dell'antibiotico-resistenza AR-ISS. Dal 2001 AR-ISS si è evoluto in un vero e proprio sistema di sorveglianza sentinella con caratteristiche uniche in Italia, in quanto non è finanziata dall'industria farmaceutica, coinvolge numerosi laboratori su tutto il territorio nazionale ed è continuativa nel tempo. Il protocollo AR-ISS risponde alle esigenze informative di EARS-NET (Istituto Superiore di Sanità, 2007). AR-ISS raccoglie i dati riguardanti l'antibiotico-resistenza in un selezionato gruppo di batteri isolati da infezioni invasive di sicura rilevanza clinica (batteriemie o meningiti diagnosticati da laboratori ospedalieri) e che rappresentano sia infezioni acquisite in ambito comunitario (*Streptococcus pneumoniae*) sia infezioni associate all'assistenza sanitaria (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecium* e *E. faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* e *K. oxytoca*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*). Per ogni microorganismo l'attenzione è posta prevalentemente su alcuni antibiotici o classi di antibiotici particolarmente significativi in terapia o per il monitoraggio dell'andamento dell'antibiotico-resistenza. Oltre all'iniziativa nazionale AR-ISS, da segnalare che



alcune Regioni (Emilia Romagna, Lombardia) hanno istituito sistemi di sorveglianza regionali sul fenomeno dell'antibiotico resistenza.

### **3.2. Trasmissione dell' AMR dall' animale all'uomo e tipologie di batteri resistenti**

La resistenza (o la multi resistenza) può trasmettersi dagli animali all'uomo attraverso:

1. il contatto diretto con gli animali portatori (*trasferimento diretto*)
2. il consumo degli alimenti
3. lo scambio di materiale genetico (*geni di resistenza o plasmidi*).

Nel secondo caso, i batteri patogeni presenti negli animali allevati possono diventare resistenti agli antibiotici somministrati durante la crescita e, successivamente, trasferire tale resistenza all'uomo attraverso gli alimenti di origine animale. Ciò rappresenta una problematica emergente per la salute pubblica ed in particolare, la resistenza diventa rischiosa quando si tratta di germi portatori di zoonosi. Nel terzo caso, per lo stesso meccanismo, batteri generalmente non pericolosi, possono sviluppare antibiotico-resistenza nell'animale portatore. Si tratta dei cosiddetti "batteri indicatori", es. *Enterococcus spp.* ed *E. coli* che, essendo microrganismi ubiquitari, sono isolabili in quasi tutti gli ambienti, compresa la flora enterica dei soggetti sani (animali e uomo). Pur non essendo patogeni, in caso di terapia antibiotica sono comunque esposti agli effetti del farmaco, cosa che li rende in grado di assumere un

certo grado di resistenza e veicolarla a microrganismi invece patogeni, responsabili cioè di malattia nell'uomo. De Been *et al.* (2014) hanno valutato l'epidemiologia sia nell'uomo che nell'animale di *E. coli* resistenti utilizzando tutta la sequenza del genoma. I risultati suggeriscono fortemente l'esistenza di plasmidi che trasportano la resistenza facilitando la trasmissione di geni tra i diversi bacini. Gli autori hanno scoperto che ceppi di *E. coli* geneticamente non correlati, isolati sia dall'uomo che da fonti animali, trasportano plasmidi quasi identici che codificano determinanti di resistenza alle cefalosporine di 3<sup>a</sup> generazione. I dati suggeriscono che la resistenza alle cefalosporine è diffusa principalmente attraverso il trasferimento di elementi genetici mobili tra animali ed esseri umani. Proprio per questa loro caratteristica, è opportuno monitorarli come indicatori per rilevare la presenza di eventuali resistenze. I batteri multi-resistenti indicatori più rilevanti per la salute pubblica appartengono alle due grandi categorie degli Enterobatteri ESBL e degli MRSA (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*).

### **3.3. Enterobatteri produttori di Beta Lattamasi a spettro Esteso (ESBL)**

L'acronimo ESBL sta per Extended Spectrum Beta-Lactamase; si tratta di enzimi prodotti da batteri Gram negativi, mediati da plasmidi, capaci di idrolizzare (inattivare) l'anello  $\beta$ -lattamico di un'importante categoria di antibiotici. I  $\beta$ -lattamici sono farmaci che impediscono la sintesi della parete cellulare dei batteri, interferendo nella formazione dei legami peptidici tra le molecole di peptidoglicano. Il primo  $\beta$ -

lattamico, molto conosciuto per il suo grande utilizzo nella seconda guerra mondiale, è la penicillina, scoperta negli anni '30. Nel corso degli anni, nuovi  $\beta$ -lattamici sono stati sviluppati in risposta all'insorgere di resistenze nei batteri. I batteri produttori di ESBL sono, infatti, in grado di inattivare tutte le penicilline ma anche le cefalosporine di terza e quarta generazione (cefotaxime, ceftazidime, cefepime). In base alle proprietà biochimiche e alla struttura molecolare le EBSL sono così classificate:

- *Mutanti TEM e SHV*, diffuse soprattutto negli anni '90, idrolizzano le cefalosporine, identificabili con le comuni penicillinasi plasmide-mediate delle *Enterobacteriaceae*. Sono note oltre 100 di queste varianti, tra queste, la TEM-1 è la beta-lattamasi più comunemente riscontrata nei batteri Gram-negativi. Fino al 90% della resistenza all'ampicillina in *E. coli* è dovuta alla presenza di TEM-1. La beta-lattamasi SHV-1 è rinvenuta più frequentemente in *K. pneumoniae* ed è responsabile fino al 20% della resistenza mostrata in questa specie (Cooksey et al., 1990; Harada et al., 2008).
- *Tipi CTX-M*, diffusisi rapidamente negli ultimi anni. Questi enzimi sono stati così chiamati per la loro maggiore attività contro il cefotaxime. Tali mutanti si sono sviluppati separatamente, attraverso lo spostamento e la mutazione delle  $\beta$ -lattamasi cromosomiche di *Kluyvera* spp. Sono note oltre 80 varianti. Si trovano spesso in *E. coli* e sono stati individuati in alcuni ceppi di *S. typhimurium* e *S. enterica*, ma sono stati descritti anche in altre specie di *Enterobacteriaceae* (Harada et al., 2008).

- *Tipi OXA*. Le beta-lattamasi tipo OXA conferiscono resistenza all'ampicillina e alla cefalotina e sono inoltre caratterizzate da elevata attività idrolitica contro l'oxacillina e la cloxacillina. Gli ESBL di tipo OXA sono stati trovati principalmente in ceppi di *P. aeruginosa* isolati in Turchia e Francia (Gür et al., 2008).
- *Tipi AmpC*. Le  $\beta$ -lattamasi di tipo AmpC sono tipicamente codificate nel cromosoma di molti batteri Gram-negativi tra cui le specie *Citrobacter*, *Serratia* e *Enterobacter* dove la sua espressione è di solito indotta. La particolarità, che rende poi così difficile identificare la presenza di una di queste  $\beta$ -lattamasi e quindi del gene, è che non viene inibita dall'acido clavulanico, a differenza di altre  $\beta$ -lattamasi a spettro esteso, dando così risultati falsamente negativi (Bush et al., 1995).
- *Altri Tipi*. Meno diffuse sono altre varianti quali VEB, PER, GES e IBC, trovate principalmente in *P. aeruginosa* e in un numero limitato di siti geografici. Non sono al momento considerate un problema.

Le ESBL sono state dimostrate in quasi tutte le *Enterobacteriaceae*; condizione particolarmente temibile, dal punto di vista clinico, per l'elevata resistenza, e, dal punto di vista epidemiologico, per la capacità di sostenere epidemie nosocomiali. A questo si aggiunge la frequente espressione di una resistenza multipla anche nei confronti di chinolonici, aminoglicosidi e soprattutto di carbapenemi quali imipenem, meropenem ed ertapenem. Difatti, l'isolamento di *Enterobacteriaceae* resistenti ai carbapenemi è stato riportato a livello mondiale come conseguenza di acquisizione di

geni portatori dell'enzima carbapemenasi (CPE) (Queenan e Bush, 2007). Il primo carbapemenasi-produttore tra gli enterobatteri è stato identificato nel 1993 e da allora si è assistito in una progressiva diffusione di ceppi CRE (Carbapenem Resistant *Enterobacteriaceae*) (Naas e Nordmann, 1994; Jacob et al., 2013). Gli Enterobatteri produttori di carbapenemasi, inoltre, hanno spesso acquisito resistenze verso altri antibiotici non betalattamici, rimanendo spesso sensibili soltanto a poche molecole, quali: la tigeciclina, le polimixine, la fosfomicina e la nitro-furantoina. Tali batteri rappresentano un pericolo notevole per la sanità pubblica per diversi motivi. Gli Enterobatteri sono molto frequentemente causa di infezioni, in ambito sia ospedaliero che comunitario, e la progressiva diffusione di CRE renderebbe problematico il trattamento di un numero elevato di pazienti. In più, la mortalità attribuibile alle infezioni da CRE è elevata, pari al 20-30% potendo arrivare al 70% nelle batteriemie (Carmeli et al., 2010; Mouloudi et al., 2010)

### **3.4. ESBL negli animali e negli alimenti**

Come già accennato, L'EFSA annualmente raccoglie i dati dai 27 Paesi dell'Unione Europea sulla resistenza agli antibiotici in microrganismi isolati da uomo, animali ed alimenti e insieme all'ECDC e all'EMA li elabora e li divulga in un report annuale congiunto. Le infezioni causate da batteri resistenti agli antimicrobici provocano circa 25 000 decessi all'anno nell'UE. Lo stretto rapporto animale-uomo nella circolazione e mantenimento dei ceppi batterici resistenti è confermato dagli ultimi dati

epidemiologici che rivelano come la resistenza ai chinoloni, utilizzati per curare la salmonellosi e la campilobatteriosi nell'uomo, sia connessa all'avvenuto uso di antibiotici negli animali. L'uso di cefalosporine di terza e quarta generazione nell'uomo per la cura di infezioni causate da *E. coli* e da altri batteri è connesso alla resistenza a questi antibiotici nell'*E. coli* rinvenuta nell'uomo. Il rapporto mostra, inoltre, che la resistenza di *Salmonella* è alta in tutta l'UE. Particolarmente preoccupante è il fatto che alcuni tipi di *Salmonella* comuni negli esseri umani, come la *Salmonella Typhimurium* monofasica, presentino un'elevatissima multi-farmacoresistenza. I livelli di resistenza agli antimicrobici in Europa continuano a variare per regione geografica, con i Paesi dell'Europa settentrionale ed occidentale che hanno generalmente livelli di resistenza inferiori a quelli dell'Europa meridionale e orientale. I Paesi in cui sono state intraprese azioni per ridurre, sostituire e rimodulare l'uso degli antimicrobici negli animali mostrano, difatti, livelli più bassi di resistenza e una tendenza alla diminuzione (ECDC/EFSA/EMA, 2017). Accanto a questa azione di monitoraggio costante, diversi sono gli sforzi volti a monitorare l'andamento delle resistenze anche e soprattutto nei germi indicatori. A tale riguardo, l'EFSA ha pubblicato una valutazione nella quale il gruppo BIOHAZ ha esaminato i rischi per la salute pubblica di ceppi batterici produttori di beta-lattamasi a spettro esteso (ESBL) e beta-lattamasi AmpC (AmpC) isolati da alimenti e animali da produzione. Il gruppo di esperti scientifici BIOHAZ ha analizzato i fattori di rischio che contribuiscono all'incidenza, all'emergenza e alla diffusione dei batteri produttori di ESBL/AmpC ed è giunto alla conclusione che l'uso di antimicrobici in generale (e

non soltanto quelli legati alle cefalosporine) costituisce un fattore di rischio per la diffusione di questo tipo di ceppi batterici resistenti. Gli esperti hanno concluso che la riduzione dell'uso generalizzato di antimicrobici negli animali da produzione alimentare dovrebbe avere un'elevata priorità nell'UE, dal momento che questi ceppi batterici sono spesso resistenti a molti altri farmaci veterinari di uso comune. Il gruppo di esperti scientifici ha altresì suggerito di introdurre miglioramenti negli attuali programmi dell'UE di sorveglianza e monitoraggio della resistenza agli antimicrobici causata da enzimi ESBL/AmpC (EFSA, 2011).

#### **3.4.1. Pollame**

Dal 2000 sono sempre più frequenti in Europa e nel mondo segnalazioni della presenza di *Salmonella* ed *E. coli* che producono ESBL/AmpC negli animali e negli alimenti. Questi ceppi batterici resistenti sono stati rinvenuti in tutti i principali animali produttori di alimenti, più spesso nei polli vivi e nella carne di pollo, nelle uova e in altri prodotti a base di pollame. Un recente studio ha messo in evidenza un crescente aumento della resistenza agli antibiotici tra i ceppi di batteri patogeni nel pollame (Dan et al., 2015).

### **3.4.2. Suini**

L'Italia registra uno dei tassi di resistenza più alti per i campioni di suini analizzati. La resistenza ad antibiotici comunemente utilizzati nei farmaci veterinari è stata riscontrata nel 60% degli *E. coli* dei campioni provenienti da allevamenti suini con un tenore del 40% per gli ESBL (contro una media del 31,9% negli altri 27 paesi Ue)

### **3.4.3. Bovini**

In Italia sono stati registrati circa l'80% di *E. coli* ESBL positivi in vitelli di allevamento (la media dei grandi paesi produttori è del 36,8%). Nell'ambito del monitoraggio annuale UE su animali e alimenti, è stata rilevata per la prima volta una resistenza agli antibiotici carbapenemici in 29,4 % di *E. coli* rinvenuti in vitelli. I carbapenemi sono di solito l'opzione terapeutica finale per pazienti infettati da batteri resistenti agli altri antibiotici disponibili (ECDC/EFSA/EMA, 2017).

### **3.4.4. Ovi-caprini**

Per quanto riguarda il comparto ovi-caprino non sono presenti dati epidemiologici sulla percentuale di animali ed alimenti in cui vengano isolati enterobatteri o patogeni resistenti in EU. Tuttavia, già da diversi anni, la presenza di tali ceppi in questi animali da allevamento è stata accertata. Il lavoro di Lerma et al., 2014, ad esempio, ha analizzato la resistenza agli antibiotici nel microbioma intestinale della capra e



dell'agnello al macello. Questi autori hanno identificato un'abbondanza di geni portatori di AMR (tetracicline, sulfonammidi e *beta*-lattamici) sui tamponi eseguiti sulle superfici delle carcasse. La distribuzione e la vasta presenza di determinanti genetici crea grande preoccupazione, poiché, anche se la macellazione e le operazioni di movimentazione della carne seguono rigorosamente le buone pratiche igieniche, esiste il rischio di contaminazione con batteri antibiotico-resistenti sia sulle superfici che nei prodotti finiti. In aggiunta, è stato ormai accertato il ruolo degli ovini come portatori di *Enterobacteriaceae* ESBL, ma non abbiamo informazioni sulla presenza di tali ceppi in prodotti derivati quali latte, latticini e formaggi (Aliasadi and Dastmalchi, 2016).

#### 4. SCOPO DELLA TESI

Considerando le già enunciate difficoltà che riguardano il comparto ovino e la mancanza di informazioni complete e dettagliate sulla qualità igienico-sanitaria dei prodotti di filiera, lo scopo della tesi è stato così articolato:

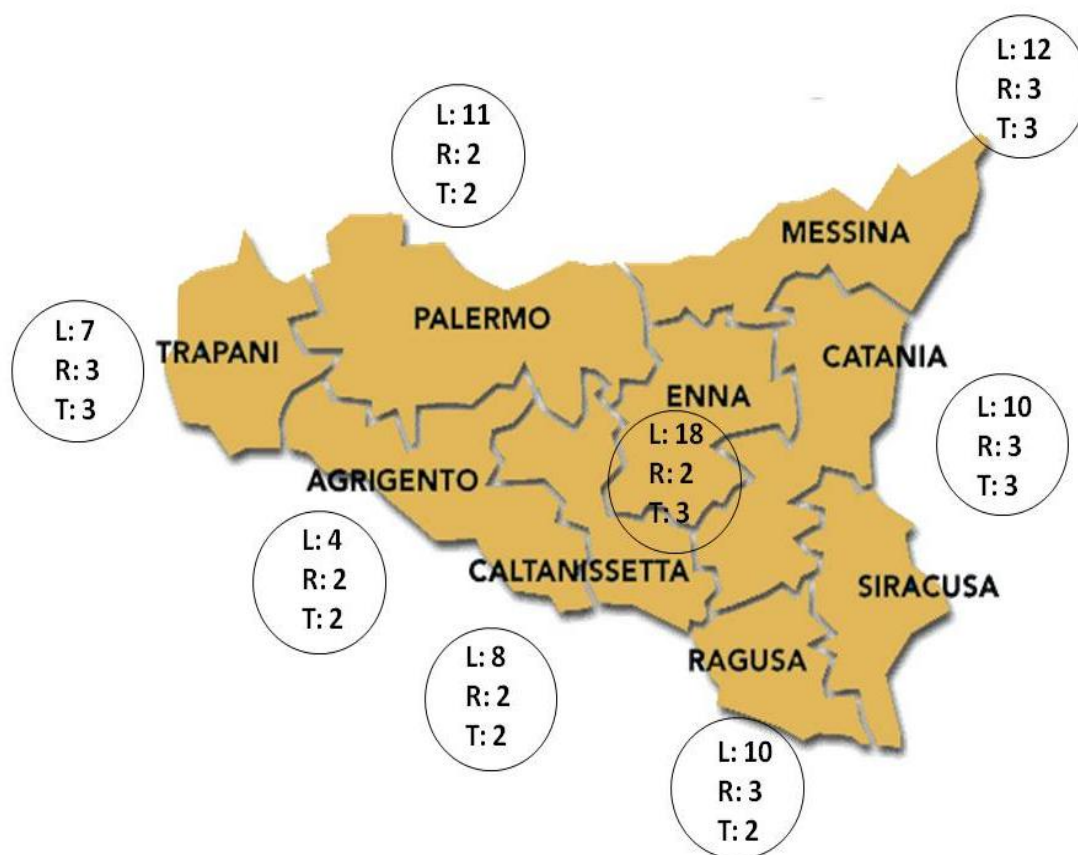
- Caratterizzazione microbiologica del latte di massa ovino siciliano e dei prodotti da esso derivati, tenendo conto dei principali parametri microbiologici come indicatori igienici confrontandoli, laddove stabiliti, con i limiti di legge. Ricerca di patogeni alimentari impiegando nuove e rapide tecniche di rilevazione microbiologica in grado di fornire risultati in 24h, riducendo nettamente i tempi di indagine, rispetto ai metodi tradizionali. Isolamento ed identificazione di ceppi appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* attraverso la spettrometria di massa, al fine di valutare le specie batteriche di origine fecale maggiormente interessate nella colonizzazione dei prodotti ovini.
- Valutazione della presenza ed eventuale prevalenza di *Enterobacteriaceae* ESBL produttrici in latte e prodotti lattiero caseari, utilizzando un nuovo approccio basato sull'analisi proteomica degli spettri generati dai singoli ceppi. A tale proposito, è stata avviata un'analisi comparativa dei picchi m/z dei ceppi risultati ESBL+ per verificare se l'espressione fenotipica di tali germi, apportasse dei cambiamenti sulla parete cellulare, che in termini di proteomica si traducono in una variazione degli spectra. Tali variazioni, se presenti, venivano analizzate dal software per verificare la presenza di picchi

comuni ed evidenziare le eventuali similitudini o differenze significative tra i vari ceppi. Lo scopo ultimo dell'analisi era quello di poter inserire, in via sperimentale, per ciascun ceppo, un Superspectra ESBL+, ed uno ESBL- che consentiva simultaneamente l'identificazione ed una valutazione della potenziale antibiotico resistenza del ceppo, abbattendo tempistiche e costi di analisi.

## 5. MATERIALI E METODI

### 5.1 Campionamento

Nel periodo compreso tra dicembre 2014 e giugno 2016 venivano raccolti un totale di 120 campioni provenienti da aziende presenti sul territorio siciliano come riportato in Figura 6 e Tabella 1. Dal campionamento veniva esclusa la provincia di Siracusa per le difficoltà riscontrate nel reperire allevamenti ovini.



**Figura 6.** Distribuzione dei campioni nelle varie province. L=Latte, R=Ricotta, T=Tuma

---

| <b>Latte</b> | <b>Ricotta</b> | <b>Tuma</b> | <b>Provincia</b> |
|--------------|----------------|-------------|------------------|
| 12           | 3              | 3           | Messina          |
| 10           | 3              | 3           | Catania          |
| 11           | 2              | 2           | Palermo          |
| 10           | 3              | 2           | Ragusa           |
| 7            | 3              | 3           | Trapani          |
| 4            | 2              | 2           | Agrigento        |
| 18           | 2              | 3           | Enna             |
| 8            | 2              | 2           | Caltanissetta    |
| <b>80</b>    | <b>20</b>      | <b>20</b>   | <b>TOT 120</b>   |

---

**Tabella 1.** Distribuzione dei campioni in base alla provenienza

### **5.1.1 Latte di massa.**

Per il presente studio sono stati raccolti 80 campioni di latte ovino di massa provenienti da altrettanti allevamenti dislocati in diverse province siciliane. Per ciascun allevamento venivano raccolti dati sul numero di capi, il tipo di allevamento e la produzione. Ciascun campione veniva raccolto in appositi contenitori sterili dalle cisterne di raccolta, appena dopo la mungitura, trasportato in laboratorio in condizioni di refrigerazione (4°C) e processato entro un'ora dall'arrivo.

### **5.1.2 Formaggi e ricotta.**

Un totale di 40 campioni di cui 20 di ricotta fresca ovina e 20 di tuma sono stati prelevati da diversi punti vendita della grande distribuzione sul territorio siciliano. Ciascun campione veniva trasportato in laboratorio a temperatura di refrigerazione (4°C).

## **5.2 Analisi microbiologiche**

### **5.2.1 Analisi quantitativa.**

Ciascun campione veniva processato per i seguenti parametri quantitativi: CMT (Carica mesofila totale), Conta ENT (*Enterobacteriaceae*), Conta STAPH C+ (Conta Stafilococchi coagulasi positivi), Conta YM (Lieviti e Muffe). Per le singole conte è stato utilizzato il sistema automatizzato TEMPO<sup>®</sup> (Biomérieux, Firenze, Italia) che fornisce risultati accurati e richiede tempi di preparazione molto brevi, rispetto ai protocolli standard internazionali comunemente utilizzati. Il sistema consta di due stazioni di lavoro per l'esecuzione dell'analisi e relativa lettura. La conta delle ENT veniva effettuata secondo lo standard internazionale (ISO 21528-2:2004), così da poter procedere all'isolamento delle colonie, direttamente dal terreno selettivo impiegato, Violet Red Bile Glucose Agar (VRBGA, Biolife, Italia).

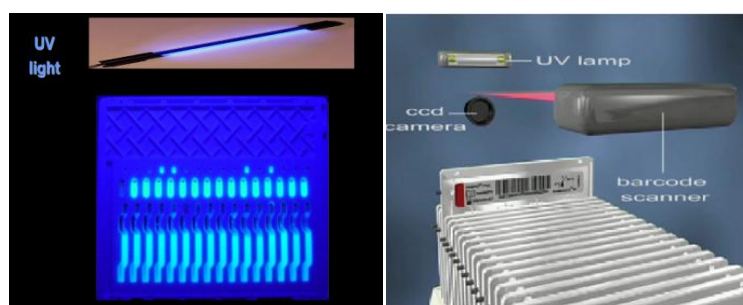
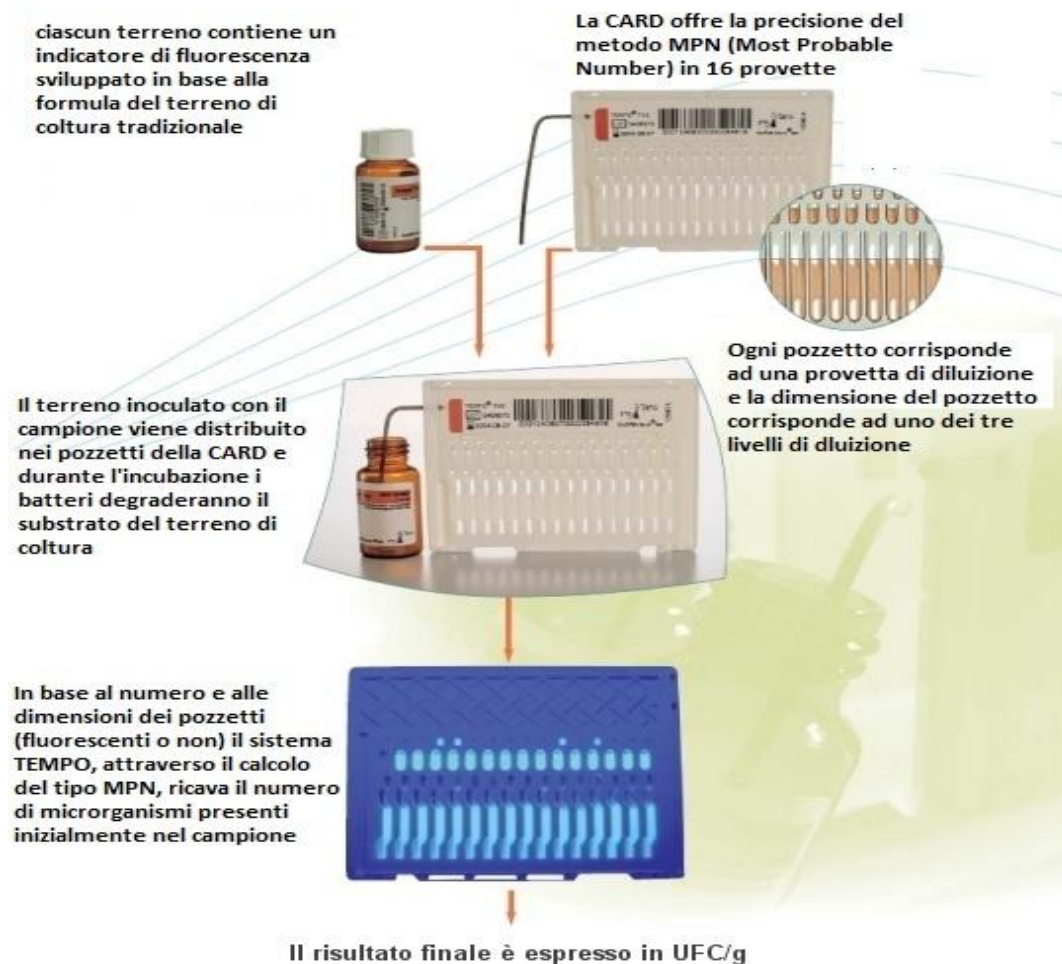
#### **5.2.1.1 Stazione di preparazione.**

Per ciascun campione venivano utilizzati un vial contenente terreno selettivo liofilizzato e una TEMPO<sup>®</sup> card inocolata con un quantitativo ben definito della sospensione contenete il campione mescolato al terreno (Figura 7). I terreni di coltura consentono una rapida crescita batterica e contengono un indicatore fluorescente che viene utilizzato dopo incubazione per la lettura del risultato. La card TEMPO<sup>®</sup> è una miniaturizzazione del metodo del numero più probabile (MPN) che comprende 16x3 provette in un unico

consumabile. Ciascun pozzetto veniva riempito per capillarità e successivamente la card veniva incubata alla temperatura stabilita per ciascun parametro.

#### **5.2.1.2 Stazione di lettura**

Per valutare il numero di UFC/g o ml nel prodotto iniziale, dopo incubazione, la card veniva inserita in un lettore a fluorescenza che valuta il numero e le dimensioni dei pozzetti positivi (fluorescenti o non fluorescenti). Lo strumento utilizza metodi statistici per calcolare il numero di microrganismi presenti nel campione iniziale. Figura 7

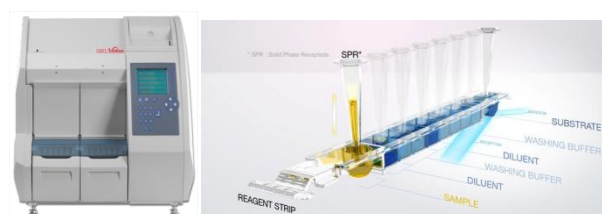


**Figura 7-** Flusso di lavoro delle stazioni di preparazione e lettura del sistema automatizzato TEMPO®



### 5.2.2 Analisi qualitativa.

Ciascun campione veniva analizzato per la ricerca qualitativa di *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes*. Per tale indagine è stato impiegato lo strumento mini VIDAS® (Biomérieux, Firenze, Italia), analizzatore multiparametrico per immunoanalisi, basato sui principi della tecnologia ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay), il quale è in grado di analizzare fino a 12 campioni contemporaneamente riducendo così tempo e costi di analisi. Ciascun test Mini VIDAS® è un mono-test pronto all'uso costituito da un cono che agisce sia da pipetta che da fase solida per la reazione, essendo rivestito da antigeni e anticorpi specifici nella superficie interna; ed una cartuccia che contiene tutti i reattivi richiesti per la reazione (Figura 8). Un'aliquota del campione pre-aricchito viene posta nella striscia. Gli antigeni, se presenti, (campione positivo), si legano agli anticorpi posti all'interno dei coni. Un substrato fluorescente (4-Metilumbelliferile fosfato) viene quindi convertito in un prodotto fluorescente (4-Metil-umbelliferone). L'intensità della fluorescenza viene misurata a 450 nm dallo scanner ottico ed analizzata automaticamente dal sistema informatico dello strumento che fornisce, per ogni campione, un valore del test. Questo valore è poi confrontato con dei valori di riferimento interni (soglie) ed ogni risultato viene espresso come positivo o negativo.



**Figura 8.** Mini VIDAS® e cartuccia associata al singolo test

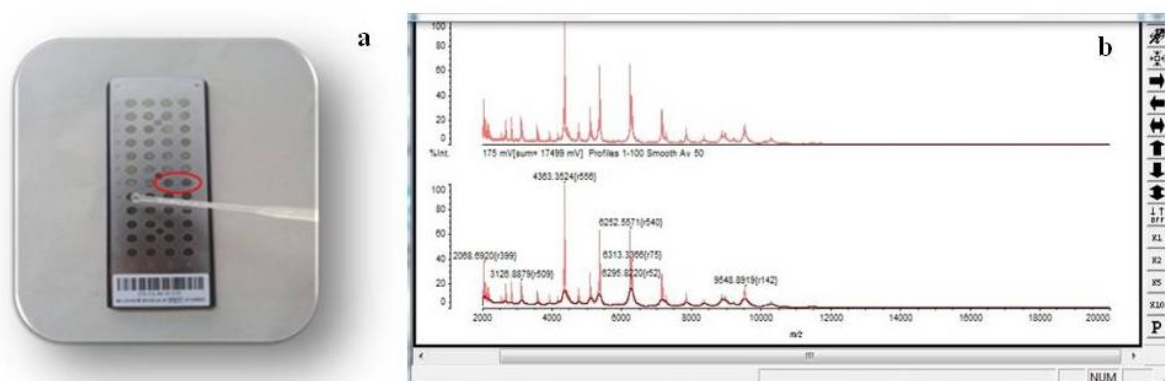
### 5.3 Identificazione.

Da ciascuna piastra di terreno selettivo per la ricerca delle *Enterobacteriaceae* (VRBGA, Biolife, Italia), venivano prelevate 5 colonie sospette. Le colonie confermate come appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, in accordo al metodo ISO 21528-2:2004, venivano successivamente sottoposte ad identificazione grazie alla spettrometria di massa con tecnologia MALDI-TOF MS (matrix assisted laser desorption/ionisation – time of flight mass spectrometry).

#### 5.3.1 MALDITOF-MS.

Tale tecnica è basata su un metodo di desorbimento/ionizzazione che permette di studiare in maniera semplice ed altamente produttiva molecole non volatili quali proteine e acidi nucleici. La tecnologia di ionizzazione si basa sull'eccitazione delle molecole del campione (nel nostro caso la parete cellulare batterica) con un raggio laser per produrne la vaporizzazione e la ionizzazione. Nella sorgente il campione viene mescolato ad una matrice in grado di assorbire le frequenze emesse dalla sorgente laser che viene utilizzata per l'eccitazione. Un piccolo volume della miscela (1-2 µl) viene depositato in uno dei pozzetti scavati sulla superficie del target. La sorgente viene messa sotto vuoto e quindi, in sequenza, i pozzetti vengono investiti da un raggio laser pulsato. Le molecole della matrice assorbono l'energia della radiazione incidente che è sufficiente a portarle dalla fase di solido amorfo alla fase di vapore. In questo processo di vaporizzazione della matrice anche le molecole di soluto (peptide) vengono trascinate in fase vapore. Gli ioni

peptidici in fase vapore sono sottoposti ad un forte campo elettrico che li accelera verso la griglia (tubo di volo), superata la quale entrano nell'analizzatore. Qui le molecole vengono analizzate in base al loro rapporto m/z (massa/carica), generando uno spettro che risulta unico per la specie batterica, come un'impronta digitale. Nel nostro caso, una piccola quantità di cellule intere di una singola colonia cresciuta overnight in terreno non selettivo Tryptic soy agar (TSA) + 5% sangue di montone (Biolife, Italia) veniva depositata direttamente in uno spot della piastrina (Figura 9a). Si procedeva quindi all'aggiunta di 1 µl di matrice CHCA ( $\alpha$ -cyano-4-hydroxycinnamic acid). In ciascuna piastrina veniva caricato anche il germe di riferimento, rappresentato da un ceppo di *E. coli* ATTC 8739 che funge da controllo interno. La rilevazione veniva effettuata in modalità lineare positiva ad una frequenza del laser di 50 Hz ed un range di Massa da 2.000-20.000 Da. Per ciascun campione venivano acquisiti e processati 100 spettri di massa di cui si effettuava una media per ottenerne lo spettro di massa finale (Figura 9b). L'analizzatore si interfacciava ad un programma SARAMIS Premium<sup>TM</sup> (Spectral Archive And Microbial Identification System, database version 4.10, bioMérieux, Firenze, Italia) che dispone di un database contenente 25000 spettri di riferimento per specie batteriche e fungine. I risultati dell'identificazione erano visualizzati con un codice colore a seconda della percentuale di identità (dal verde 99.9% al bianco 70%).

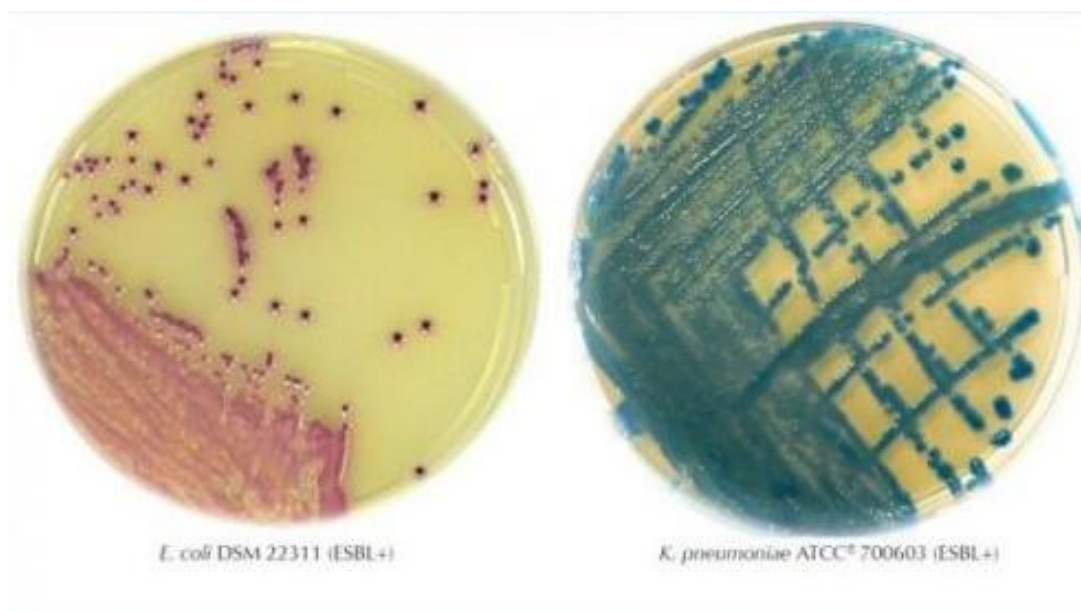


**Figura 9.** a) Piastrina contenente i pozzetti utilizzati per caricare i campioni, il cerchio rosso evidenzia i due spot riservati al campione standard. b) Esempio di spettro generato dopo processazione del campione (*E. coli* standard)

## 5.4 Espressione fenotipica di Enterobatteri ESBL

### 5.4.1 Screening: terreno cromogeno.

Ciascun ceppo identificato veniva sottoposto ad un test di screening per la produzione di ESBL (CLSI, 2016). A tal proposito sono state utilizzate delle piastre già pronte di un terreno cromogeno specifico per l'identificazione di ceppi ESBL produttori (Chromatic™ ESBL, Liofilchem, Francia). La selettività del terreno è dovuta alla presenza di una miscela di antibiotici inibitori nei confronti dei batteri Gram-positivi, dei funghi e dei batteri Gram negativi sensibili alle cefalosporine di terza o quarta generazione. La differenziazione batterica è ottenuta con una miscela di composti cromogeni atti ad evidenziare le attività enzimatiche specifiche di ciascuna specie. I ceppi venivano seminati sulla superficie dell'agar ed incubati in atmosfera aerobica a 37°C per 18-24 ore. Dopo l'incubazione si osservava l'eventuale crescita ed il colore delle colonie. Venivano considerati negativi i ceppi che non presentava una crescita visibile o se quest'ultima risultava incolore. *E. coli* ESBL + crescevano di colore rosa/malva; *Klebsiella* spp, *Enterobacter* spp, *Serratia* spp ESBL + di colore verde-blu; *Proteus* spp ESBL + marrone (Figura 10).



**Figura 10** Esempi di crescita su terreno cromogeno. a) *E. coli* ESBL+ con tipica colorazione malva. b) *K. pneumoniae* ESBL+ con colorazione verde-blu

#### 5.4.2 Conferma: test di combinazione.

Per la conferma fenotipica è stato applicato uno dei protocolli suggeriti da Luzzaro et al., (2007). Il test di combinazione consiste nel saggiare un  $\beta$ -lattamico da solo ed in presenza di un inibitore delle  $\beta$ -lattamasi, in modo da valutare il recupero dell'attività del  $\beta$ -lattamico in presenza dell'inibitore. Il test può essere eseguito col metodo della diffusione da disco o con metodi che determinano la MIC. Per quanto riguarda la diffusione da disco, il Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) raccomanda di eseguire il test secondo la metodica standard di diffusione in agar e considerare significativo per la produzione di ESBL un aumento di 5 mm del diametro dell'alone di inibizione per ciascuno degli antibiotici  $\beta$ -lattamici testati in combinazione con acido

clavulanico rispetto al  $\beta$ -lattamico saggiato da solo (CLSI, 2016). Il metodo di combinazione ha il vantaggio di essere standardizzato ed è quello raccomandato dal CLSI per confermare la produzione di ESBL in *E. coli*, *Klebsiella* spp. e *P. mirabilis*. Per garantire la massima sensibilità del test, il CLSI suggerisce di saggiare sia il ceftazidime che il cefotaxime, da soli ed in combinazione con acido clavulanico. Infatti, con enzimi ad attività strettamente cefotaximasica (ad esempio CTXM-1) il test può risultare positivo solo utilizzando il cefotaxime, mentre con enzimi ad attività strettamente ceftazidimasica (ad esempio TEM-26) il test può risultare positivo solo utilizzando il ceftazidime. Abbiamo ritenuto opportuno utilizzare gli stessi criteri anche per le altre specie di enterobatteri saggiati. Ciascun ceppo positivo allo screening iniziale su terreno cromogeno veniva inoculato in provette contenenti Brain Heart Infusion broth (BHI broth, Biolife, Italia) ed incubato per 18-24h in modo da ottenere una torbidità pari almeno allo 0.5 della scala Mc Farland. Le brodo-colture venivano poi seminate sulla superficie di piastre di Ø 90 mm di Mueller-Hinton agar (Biolife, Italia). Una volta asciutte, venivano posizionati sulla superficie dell'agar inoculato dei dischetti antibiodati del Ø 6mm contenenti i seguenti antibiotici: Cefotaxime (CTX) 30 $\mu$ g, Cefotaxime + Acido Clavulanico (CTL) 40  $\mu$ g, Ceftazidime (CAZ) 30 $\mu$ g, Ceftazidime + Acido Clavulanico (CAL) 40  $\mu$ g. Dopo incubazione delle piastre a 37°C per 18-24h, si procedeva alla lettura degli aloni (Bauer et al., 1966).

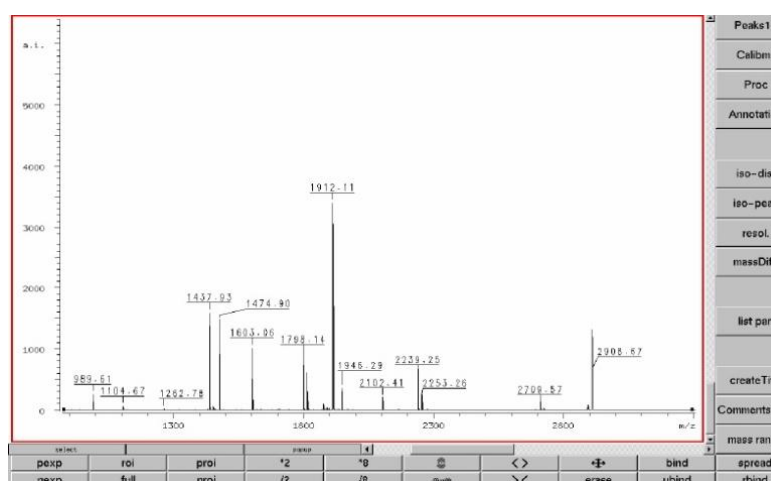
## 5.5 Analisi proteomica e confronto degli spettri

Con il termine Proteomica si indica l'insieme delle proteine codificate da un determinato genoma, ovvero si intende l'insieme delle tecnologie e degli approcci utilizzati per lo studio delle proteine. La proteomica rappresenta, dunque, la disciplina che si occupa dello studio, ovvero dell'analisi su larga scala, del proteoma di un sistema biologico vivente in determinate condizioni ambientali. Lo scopo principale della proteomica è colmare il divario tra le informazioni che derivano dalla sequenza del genoma e il fenotipo della cellula tramite lo studio dei prodotti genici e delle loro interazioni. Poiché le proteine sono deputate alla maggior parte dei processi biologici degli organismi, la spettrometria di massa (MS), grazie alla sua elevata sensibilità e specificità, è stata riconosciuta come uno strumento indispensabile per gli studi di proteomica. I profili spettrali ottenuti con questa tecnologia, possono essere processati con opportuni software di indagine statistica per l'identificazione di segnali differenzialmente espressi nelle popolazioni di studio, consentendo l'elaborazione di modelli specifici. L'analisi proteomica può essere effettuata su tutti i tipi di molecole e particelle investigate, quindi anche sulle cellule batteriche. Il programma di riconoscimento Saramis Premium<sup>TM</sup> (Biomerieux, Firenze, Italia) è dotato di un data base contenente SuperSpectra elaborati da spettri di massa di ceppi isolati ed identificati da metodi ampiamente validati come la fenotipizzazione biochimica, l'analisi della frazione 16sRNA o il Multi-Locus Sequence Typing (MLST). Ogni SuperSpectrum deriva da una serie di spettri di riferimento, ricavati da almeno 15 isolati individuali di una determinata specie batterica. Gli spettri, a loro volta, provengono da germi con tempi di crescita diversi e differenti terreni di isolamento, per



garantire affidabilità e riproducibilità. Questa tecnica può essere usata per identificare cambiamenti nella popolazione microbica nel tempo, o per creare nuovi SuperSpectra che rappresentano una particolare categoria o ceppo ambientale. Il procedimento appena descritto è stato adottato, nel nostro studio, nell'analisi degli spettri dei ceppi risultati fenotipicamente positivi alla produzione di ESBL. Il software Saramis Premium<sup>TM</sup> è in grado di elaborare le informazioni fornite dallo spettrofotometro, ovvero gli spettri da esso generati (mass fingerprint) e di compararli con il database in dotazione in modo da individuare una corrispondenza con gli spettri in memoria. Tale programma offre, inoltre, la possibilità di implementare il data base da parte dell'operatore e quindi di inserire nuovi Superspectra di riferimento, offrendo nuove possibilità per il raggruppamento gerarchico (clustering) dei ceppi identificati, elaborando una serie di dendogrammi. A tale scopo, per ciascuna specie batterica, venivano selezionati 5 ceppi ESBL+ e 5 ceppi ESBL-. Ogni ceppo veniva seminato in triplo su due terreni differenti: VRBGA e TSA + 5% di sangue di montone (Biolife, Italia), fino ad ottenere 30 spettri per specie e fenotipo da confrontare per il clustering. Tutti gli spettri acquisiti sono stati processati secondo la tecnica standard già illustrata. Le peak lists (liste dei picchi) venivano poi esportate nel database SARAMIS per ulteriori analisi. Per ogni tipologia di microrganismo, tutte e 30 le repliche ottenute venivano confrontate per individuare i picchi in comune tra almeno 25 dei 30 campioni comparati (Kallow et al., 2010) (Figura 11). Questo passaggio serviva a ridurre la variabilità tecnica tra gli isolati, dovuta all'operatore. Per ciascun ceppo e fenotipo analizzato sono stati elaborati dei Superspectra specifici così come suggerito da Veenemans et al., 2016. Tali file, inseriti nell'albero tassonomico del database

SARAMIS, venivano posizionati in cartelle all'interno della classificazione delle singole specie (es. *Hafnia alvei*, *E. coli* ecc.), in modo che con un unico passaggio era possibile individuare non soltanto la specie, ma anche la categoria fenotipica di resistenza (ESBL+ o ESBL -).



**Figura 11** Esempio di peak list generata dall'analisi proteomica degli spettri di un campione di *Hafnia alvei* ESBL+

## 5.6 Analisi statistica

Applicazioni di statistica inferenziale, quali l'ANOVA ad una via ed il t-test, sono state usate per verificare la presenza di differenze significative tra le cariche microbiche dei campioni analizzati (XLSTAT, Addinsoft). Il livello di significatività è stato fissato per  $p < 0.05$ . Le cariche batteriche sono state convertite in Log UFC/g o ml per semplificare l'espressione dei risultati. L'analisi statistica dei picchi di massa/intensità veniva effettuata mediante l'algoritmo di comparazione applicato dal software Saramis Premium<sup>TM</sup>.

## 6. RISULTATI E DISCUSSIONE

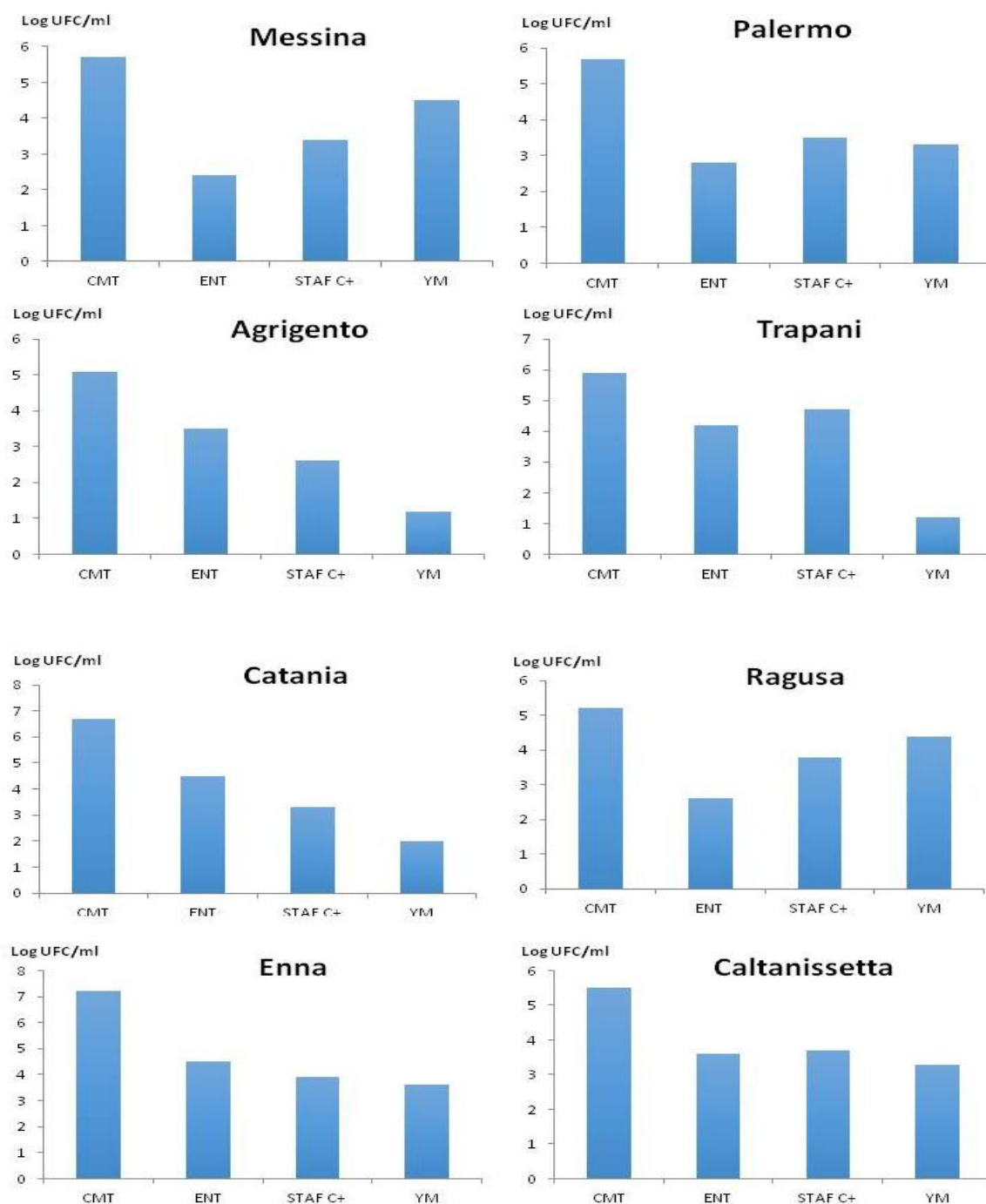
### 6.1 Caratterizzazione microbiologica del latte di massa

Tutti gli allevamenti da cui provenivano i campioni praticavano la pastorizia allo stato semibrado e per la maggior parte (90%) si trattava di aziende con una sola attitudine produttiva (latte) e solo alcune (10%) erano caratterizzate da duplice attitudine con la produzione di agnelli e agnelloni da carne, oltre che di latte destinato alla caseificazione. La Tabella 2 e la Figura 12, illustrano i valori medi riportati per ciascuno dei parametri microbiologici investigati nelle varie province. Considerando la CMT il valore medio del latte di massa campionato si attestava intorno ai  $6.4 \pm 1.4$  Log UFC/ml, poco al di sopra dei limiti stabiliti dal Reg Ce 853/04 che impone una soglia massima di 6.2 Log UFC/ml per il latte crudo destinato a subire trattamenti termici. Valori che risulterebbero inaccettabili nel 66% dei casi, laddove il latte crudo venisse utilizzato per lavorazioni che non comportino alcun trattamento termico successivo. Considerando la distribuzione dei campioni in base alla provenienza, il latte delle provincie di Enna e Catania, presentava i valori medi significativamente ( $p < 0.05$ ) più alti rispettivamente di 7.2 e 6.7 Log UFC/ml. Per le restanti provincie il tenore di germi mesofili si mostrava entro valori accettabili ( $p < 0.05$ ). Per quanto concerne le *Enterobacteriaceae*, il loro valore medio era di  $3.8 \pm 1.8$  Log UFC/ml; ed anche in questo caso, il valori medi più alti, sono stati rinvenuti nei campioni provenienti dalle provincie di Catania (4.5 Log UFC/ml) ed Enna (4.5 Log UFC/ml) L'andamento degli enterobatteri in tali campioni riflette in modo significativo ( $p < 0.05$ ) l'andamento della CMT, rivelando per tali parametri una correlazione positiva.

Per gli STAF C+ il valore medio della totalità dei campioni era di  $3.6 \pm 0.9$  Log UFC/ml, attestandosi su valori abbastanza soddisfacenti. Tra tutti i campioni quelli della provincia di Trapani mostravano un valore significativamente più alto rispetto alle altre province ( $p < 0.05$ ) di 4.7 Log UFC/ml, quasi borderline considerando la soglia di 5.0 Log UFC/ml per la produzione di enterotossine stafilococciche. Infine, il valore medio per la conta di YM era di  $4.3 \pm 2.2$  Log UFC/ml, carica quasi interamente costituita da Lieviti, compresi in parte nella flora autoctona del latte. La ricerca dei patogeni ha dato esito negativo in tutti campioni.

|               | <b>CMT</b>     | <b>ENT</b>     | <b>STAF C+</b> | <b>YM</b>      | <b>Salmonella</b> | <b>L. monocytogenes</b> |
|---------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-------------------|-------------------------|
| Messina       | 5.7±1.5        | 2.4±1.6        | 3.4±0.5        | 4.5±1.7        | -                 | -                       |
| Palermo       | 5.7±1.3        | 2.8±1.9        | 3.5±1.3        | 3.3±2.4        | -                 | -                       |
| Agrigento     | 5.1±4.1        | 3.5±4.9        | 2.6±0.8        | 1.2±1.7        | -                 | -                       |
| Trapani       | 5.9±1.7        | 4.2±1.1        | 4.7±0.6        | 2.0±0.0        | -                 | -                       |
| Catania       | 6.7±0.4        | 4.5±1.2        | 3.3±0.8        | 4.4±2.2        | -                 | -                       |
| Ragusa        | 5.2±1.2        | 2.6±1.5        | 3.8±1.2        | 3.6±1.4        | -                 | -                       |
| Enna          | 7.2±1.0        | 4.5±1.4        | 3.9±0.9        | 5.7±1.1        | -                 | -                       |
| Caltanissetta | 5.5±1.3        | 2.6±1.3        | 3.7±1.1        | 3.3±2.5        | -                 | -                       |
| <b>TOT</b>    | <b>6.4±1.4</b> | <b>3.8±1.8</b> | <b>3.6±0.9</b> | <b>4.3±2.2</b> | -                 | -                       |

**Tabella 2. Latte di massa ovino.** Valori medi  $\pm$  dev standard delle cariche microbiologiche di latte di massa espressi in Log UFC/ml



**Figura 12.** Distribuzione delle cariche microbiologiche in latte di massa ovino nelle provincie di Messina, Palermo, Agrigento, Trapani, Catania, Ragusa, Enna, Caltanissetta. Per ciascun parametro sono illustrati i valori medi in Log UFC/ml

## **6.2 Caratterizzazione microbiologica di ricotta fresca ovina**

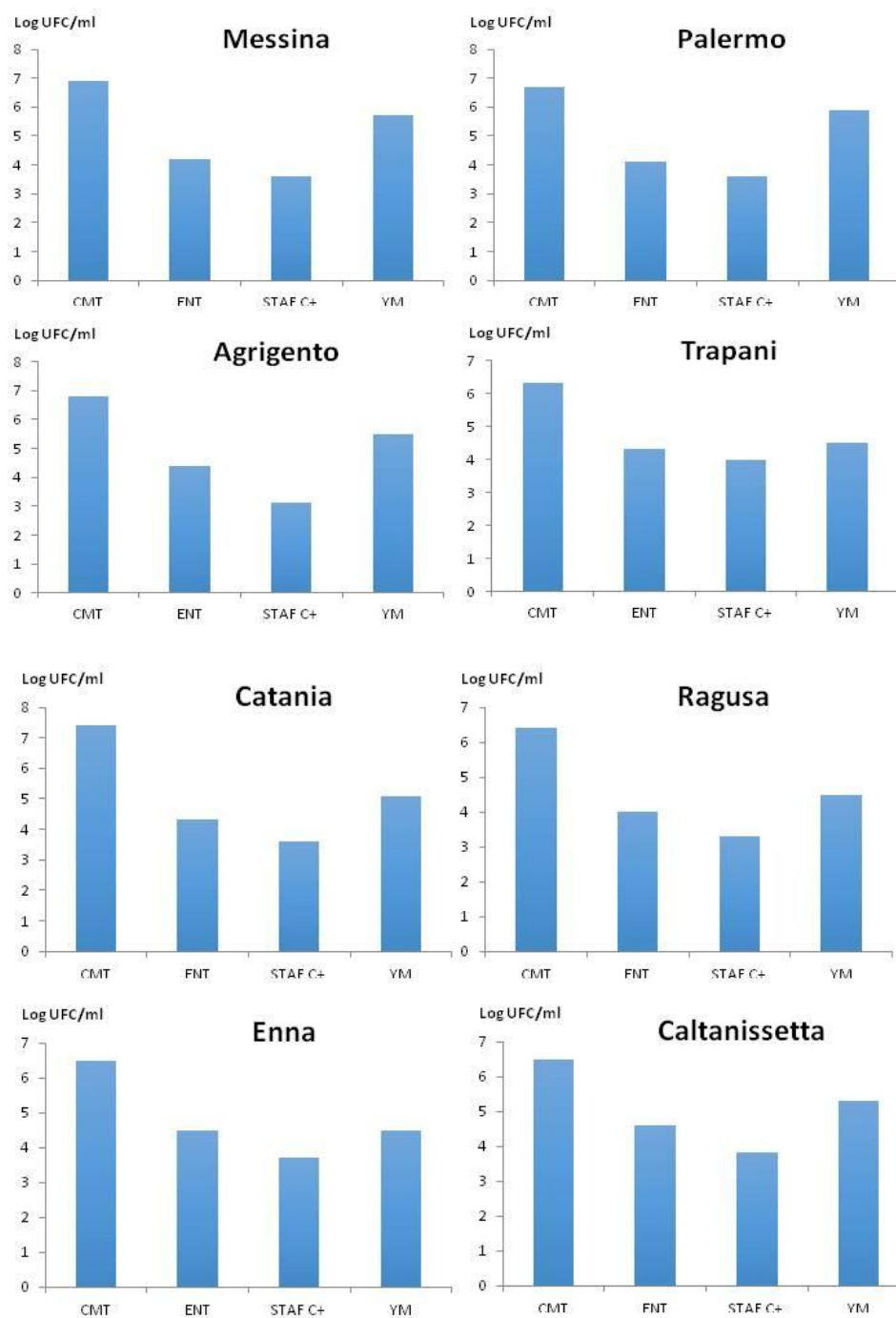
La tabella 3 e la figura 13 riassumono i risultati dei campioni di ricotta distribuiti tra le varie provincie. La CMT presentava un valore medio totale di  $6.7 \pm 1.3$  Log UFC/g. I prodotti provenienti dalle provincie di Catania e Messina rivelavano le cariche medie significativamente ( $p < 0.05$ ) più alte, rispettivamente di 7.4 e 6.9 Log UFC/g. Per le restanti provincie si registravano valori medi oscillanti tra 6.3 e 6.8 Log UFC/g. Per la CMT, non esistono limiti fissati come per il latte crudo, ma in vista dell'applicazione delle buone prassi igieniche diversi Comuni e Regioni hanno delineato delle linee guida sui limiti microbiologici. Sulla base di questi, per la ricotta valori accettabili si attesterebbero, infatti, tra i 6.0 e i 7.0 Log UFC/g, più o meno in linea con i nostri risultati, ad eccezione che per la provincia di Catania in cui i valori medi superano di poco il limite di accettabilità (Ce.I.R.S.A, 2011). La conta di ENT mostrava un valore medio totale di  $4.2 \pm 2.1$  Log UFC/g, mentre la distribuzione in base alla provenienza evidenziava i valori medi più alti ( $p < 0.05$ ) per i campioni della provincia di Enna (4.5 Log UFC/g) e Caltanissetta (4.6 Log UFC/g); tutti gli altri oscillavano tra i 4.0 ed i 4.4 Log UFC/g. Discorso simile per gli STAF C+ che presentavano un valore medio di  $3.9 \pm 1.3$  Log UFC/g, con picchi di 4.6 e 4.0 Log UFC/g, rispettivamente per i campioni delle provincie di Palermo e Trapani. Valori decisamente al di sopra del limite fissato dal Reg CE 2073/05 e successive modificazioni ( $1.0 \leq \text{Log ufc/g} < 2.0$ ). Infine, il tenore di YM, benché non considerato un criterio cogente è parimenti da tenere in considerazione per la valutazione igienica di tali prodotti. In altri paesi Europei, come la Francia, sono state stilate delle linee guida sui limiti microbiologici per Lieviti e Muffe anche per

questa tipologia di latticini freschi, secondo cui i prodotti risultano accettabili se le cariche oscillano tra i 2.0 ed i 3.0 Log UFC/g (FCD, 2009). Anche in questo caso, i nostri campioni superano di molto i limiti di riferimento, rivelando un tenore medio di  $5.8 \pm 1.0$  Log UFC/g, con punte di 6.2 e 5.9 Log ufc/g per i campioni delle provincie di Ragusa e Palermo. Per quanto riguarda i criteri di sicurezza alimentare investigati, tutti i campioni risultavano negativi per la ricerca di *Salmonella* spp, mentre un campione risultava positivo per la ricerca di *L. monocytogenes*. Si è proceduto alla conta del patogeno, che presentava una carica di 3.3 Log UFC/g, nettamente al di sopra dei limiti imposti dal Reg. CE 20173/05 e successive modificazioni che, per gli alimenti pronti che costituiscono terreno favorevole alla crescita di *Listeria monocytogenes*, diversi da quelli destinati ai lattanti e a fini medici speciali, impone l'assenza in 25 gr, prima che gli alimenti non siano più sotto il controllo diretto del produttore; oppure un limite di 100 UFC/g per i prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità. Quest'ultimo criterio vale anche per gli alimenti pronti che non costituiscono terreno favorevole alla crescita del patogeno.

|               | <b>CMT</b>     | <b>ENT</b>     | <b>STAF C+</b> | <b>YM</b>      | <i>Salmonella</i> | <i>L. monocytogenes</i> |
|---------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-------------------|-------------------------|
| Messina       | 6.9±1.3        | 4.2±1.2        | 3.6±2.2        | 5.7±1.1        | -                 | -                       |
| Palermo       | 6.7±2.4        | 4.1±3.0        | 4.6±0.8        | 5.9±0.6        | -                 | -                       |
| Agrigento     | 6.8±1.5        | 4.4±2.3        | 3.1±0.9        | 5.5±1.4        | -                 | -                       |
| Trapani       | 6.3±1.7        | 4.3±3.9        | 4.0±1.8        | 5.7±1.4        | -                 | -                       |
| Catania       | 7.4±0.8        | 4.3±0.7        | 3.6±0.6        | 5.1±0.6        | -                 | +                       |
| Ragusa        | 6.4±1.2        | 4.0±1.5        | 3.3±1.2        | 6.2±1.4        | -                 | -                       |
| Enna          | 6.5±1.5        | 4.5±1.7        | 3.7±1.7        | 5.8±2.1        | -                 | -                       |
| Caltanissetta | 6.5±1.9        | 4.6±1.3        | 3.8±1.9        | 5.3±2.5        | -                 | -                       |
| <b>TOT</b>    | <b>6.7±1.3</b> | <b>4.2±2.1</b> | <b>3.9±1.3</b> | <b>5.8±1.0</b> | -                 | -                       |

**Tabella 3. Ricotta ovina** Valori medi ± dev standard delle cariche microbiologiche di ricotta espressi in Log UFC/g





**Figura 13.** Distribuzione delle cariche microbiologiche in ricotta fresca ovina nelle provincie di Messina, Palermo, Agrigento, Trapani, Catania, Ragusa, Enna, Caltanissetta. Per ciascun parametro sono illustrati i valori medi in Log UFC/ml

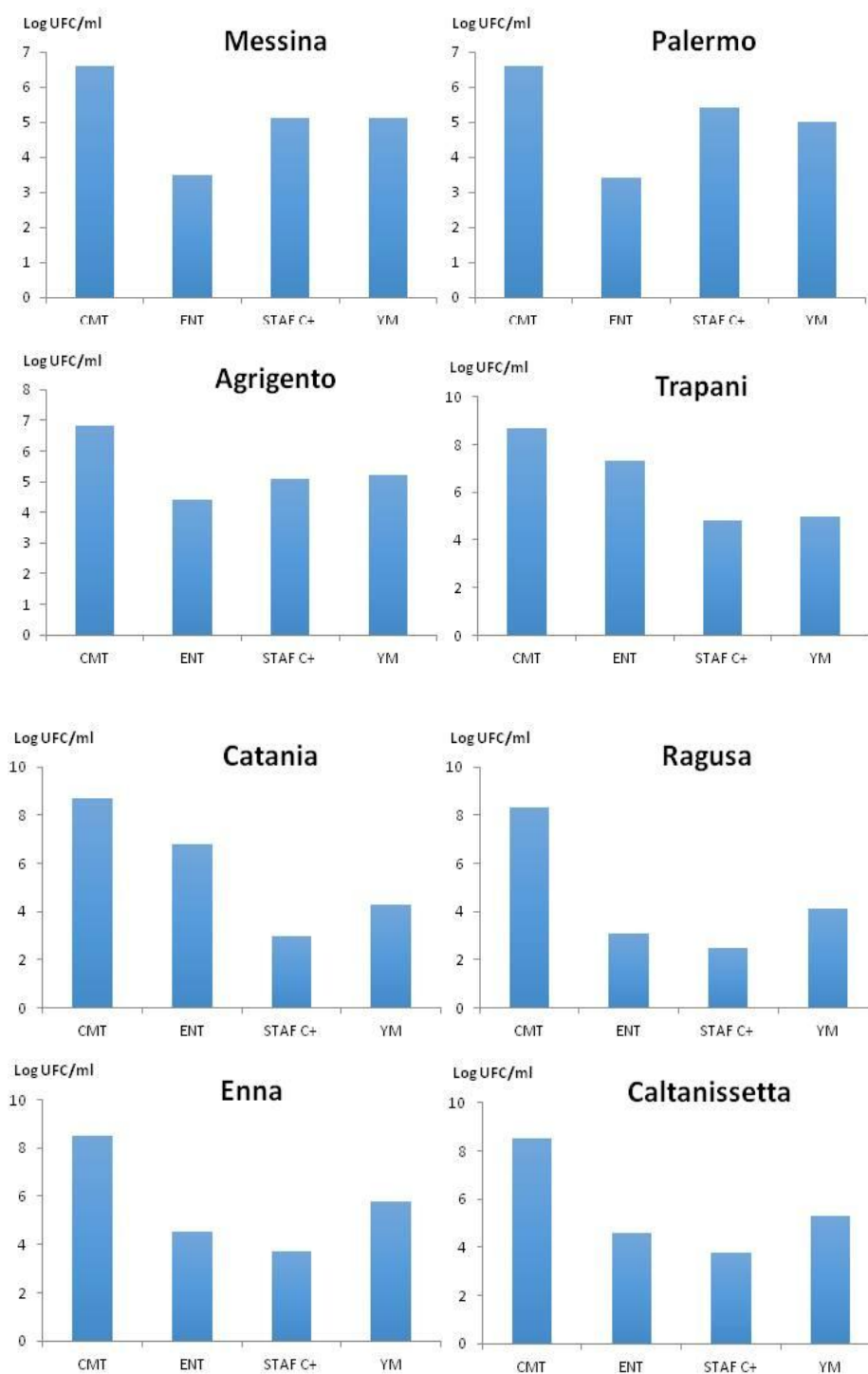
### 6.3 Caratterizzazione microbiologica di tuma ovina.

I campioni analizzati presentavano un valore medio totale per la CMT di  $8.0 \pm 1.3$  Log UFC/g. Trattandosi di formaggio fresco, valgono gli stessi criteri utilizzati per la ricotta, per cui, tali valori risultano decisamente non soddisfacenti se paragonati con le tabelle elaborate dal Ce.I.R.S.A, che fissa i limiti di accettabilità tra i 6.0 ed i 7.0 Log UFC/g. Come mostrato in Tabella 4 ed in Figura 14 solo i campioni provenienti dalle provincie di Messina, Palermo ed Agrigento presentavano valori oscillanti tra i 6.6 ed i 6.8 Log UFC/g significativamente più bassi degli altri ( $p < 0.05$ ), ma comunque oltre i già menzionati limiti. La conta delle *Enterobacteriaceae*, presentava un valore medio di  $4.8 \pm 2.3$  Log UFC/g. Si registravano valori medi massimi di 7.3 e 6.8 Log UFC/g per i prodotti della provincia di Trapani e Catania, decisamente non accettabili. Per gli STAF C+ vale il criterio microbiologico imposto dal Reg CE 2073/05 e successive modificazioni per il quale non bisogna superare la soglia dei 3.0 Log UFC/g. I formaggi analizzati avevano un valore medio di  $3.8 \pm 1.5$  Log UFC/g, con valori di 4.8 Log UFC/g significativamente più alti ( $p < 0.05$ ) per i campioni raccolti nella provincia di Trapani; quasi tutti non accettabili secondo i criteri igienici fissati. Contrariamente, solo i campioni della provincia di Ragusa e Catania con i valori medi più basso di 2.5 e 3.0 Log UFC/g ( $p < 0.05$ ) rispettivamente, potevano considerarsi soddisfacenti. Infine, la conta di YM mostrava un valore medio di  $4.8 \pm 1.2$  Log UFC/g, considerato ancora una volta non soddisfacente per gli stessi criteri presi in considerazione precedentemente per la ricotta (tra i 2.0 ed i 3.0 Log UFC/g). Tutti i campioni risultavano negativi per la ricerca dei

patogeni. Il pH dei nostri campioni presentava un valore medio di  $5.17 \pm 0.19$  ed un aW di  $0.98 \pm 0.00$ , quindi in linea con i parametri produttivi standard.

|               | <b>CMT</b>     | <b>ENT</b>     | <b>STAF C+</b> | <b>YM</b>      | <b>Salmonella</b> | <b>L. monocytogenes</b> |
|---------------|----------------|----------------|----------------|----------------|-------------------|-------------------------|
| Messina       | 6.6±1.3        | 3.5±1.2        | 5.1±2.0        | 5.1±1.5        | -                 | -                       |
| Palermo       | 6.6±2.4        | 3.4±2.0        | 5.4±0.6        | 5.0±1.4        | -                 | -                       |
| Agrigento     | 6.8±1.5        | 4.4±2.3        | 5.1±0.7        | 5.2±1.7        | -                 | -                       |
| Trapani       | 8.7±2.5        | 7.3±0.5        | 4.8±1.8        | 5.0±1.4        | -                 | -                       |
| Catania       | 8.7±0.3        | 6.8±0.6        | 3.0±1.4        | 4.3±0.2        | -                 | -                       |
| Ragusa        | 8.3±0.3        | 3.1±2.0        | 2.5±0.8        | 4.1±0.7        | -                 | -                       |
| Enna          | 8.5±1.5        | 4.5±1.7        | 3.7±1.7        | 5.8±2.1        | -                 | -                       |
| Caltanissetta | 8.5±1.9        | 4.6±1.3        | 3.8±1.9        | 5.3±2.5        | -                 | -                       |
| <b>TOT</b>    | <b>8.0±1.4</b> | <b>4.8±2.3</b> | <b>3.8±1.5</b> | <b>4.8±1.2</b> | -                 | -                       |

**Tabella 4. Tuma ovina** Valori medi  $\pm$  dev standard delle cariche microbiologiche di tuma espressi in Log UFC/g



**Figura 14.** Distribuzione delle cariche microbiologiche in ricotta tuma ovina nelle provincie di Messina, Palermo, Agrigento, Trapani, Catania, Ragusa, Enna, Caltanissetta. Per ciascun parametro sono illustrati i valori medi in Log UFC/ml

## 6.4 Considerazioni igienico-sanitarie sui prodotti lattiero caseari

### 6.4.1 Latte

I risultati da noi ottenuti si mostrano in linea con quelli riportati da precedenti lavori sulla qualità microbiologica di latte ovino crudo. In particolare, un'indagine condotta sulle caratteristiche organolettiche e microbiologiche di latte ovino siciliano dimostra come le popolazioni microbiche risentano della stagionalità del periodo di raccolta con valori per la CMT oscillanti tra i 5.46 ed i 5.70 Log UFC/ml (con picchi maggiori rilevati nei mesi estivi); risultati molto simili a quelli riportati dai nostri campioni in cui il valore medio per la CMT si attestava intorno ai  $6.4 \pm 1.4$  Log UFC/ml (Todaro et al., 2014). Ancora, uno studio simile condotto in Europa dell'est sulla qualità igienico sanitaria di latte e formaggi freschi ovini, sottolinea come la scarsa qualità della materia prima, per la quale si misuravano cariche con livelli di CMT di 7 Log UFC/ml, sia responsabile delle altrettanto scarse condizioni microbiologiche dei prodotti derivati (Levkov et al., 2014). Considerazione a parte merita la popolazione microbiologica di YM. Ben poco si conosce, infatti, di queste popolazioni microbiche, descritte prevalentemente nei formaggi. In realtà la conoscenza delle comunità fungine che colonizzano il latte crudo di pecora è una questione particolarmente rilevante, poiché diverse specie sono direttamente coinvolte nella maturazione dei formaggi determinandone l'aroma tipico. Nei nostri campioni, infatti, YM costituiscono una popolazione rilevante della microflora del latte con un valore medio di 4.2 Log UFC/ml. È ormai accertato che tali microrganismi vengano trasferiti direttamente dal latte crudo ai prodotti derivati. D'altra parte, lieviti e muffe sono spesso coinvolti in fermentazioni anomale ed episodi di spoilage, con

conseguenti perdite economiche e gravi rischi per la salute dei consumatori (Panelli et al., 2014). In linea generale è possibile individuare tra le principali cause di un aumento della CMT e degli indicatori di igiene, la non corretta sanificazione (pulizia e disinfezione) delle attrezzature deputate all'estrazione, trasporto e stoccaggio del latte e/o le anomalie funzionali del sistema di refrigerazione. Nel caso dei batteri presenti sulla cute della mammella, quelli di origine naturale hanno una bassa influenza sulla CMT del latte, mentre quelli provenienti dall'ambiente di stabulazione e presenti su capi con capezzoli e mammelle molto sporche influiscono significativamente sulla conta batterica del latte, soprattutto se si pratica una tecnica di mungitura inadeguata (es. mancata asciugatura, uso eccessivo di acqua, uso di tovagliette non disinfettate) ed un utilizzo non corretto dei filtri del latte. In definitiva sia la tecnica di mungitura, sia il sistema di lavaggio rappresentano importanti punti critici su cui eseguire una accurata indagine, senza ovviamente tralasciare un'attenta verifica delle modalità e dei tempi di refrigerazione del latte. Discorso a parte va fatto per i patogeni potenzialmente responsabili di episodi tossinfettivi. Nessuno dei campioni analizzati ha mostrato positività per la ricerca di *Salmonella* e *L. monocytogenes*. La nostra attenzione è stata incentrata sulla ricerca dei patogeni che più frequentemente possono essere rinvenuti nella materia prima ed eventualmente persistere nelle successive fasi di lavorazione. Come osservato da Amagliani et al., (2016), *Salmonella* è stata rinvenuta con una prevalenza del 16% tra le aziende produttrici di latte ovino campionate. Percentuale da non sottovalutare, considerando che nella maggior parte dei casi la materia prima veniva destinata alla produzione di formaggi a base di latte crudo. Analogamente, il patogeno *L.*

*monocytogenes* è sempre più frequentemente isolato nei prodotti lattiero caseari anche se con indici di prevalenza relativamente bassi (Murru et al, 2009). Nonostante ciò, la preoccupazione epidemiologica risiede nella resistenza e sopravvivenza del germe anche in presenza di stressors o condizioni ambientali sfavorevoli (pH, temperatura, ecc.). E' stata infatti accertata una correlazione positiva tra la persistenza del patogeno negli ambienti della produzione primaria e la comparsa dello stesso nel latte (Schoder et al., 2011).

#### **6.4.2 Ricotta**

I risultati da noi ottenuti per la CMT e la conta di ENT, di 6.7 e 4.2 Log UFC/g, rispettivamente, confermano come il processo di produzione della ricotta potrebbe presentare diverse criticità, che stanno alla base della scarsa qualità igienico-sanitaria del prodotto finito. Così come osservato in precedenza da Scintu et al., (2001) in campioni di ricotta fresca ovina in Sardegna, le elevate cariche microbiche riscontrate sono strettamente correlate alle caratteristiche intrinseche del prodotto. Se dal punto di vista organolettico la ricotta può essere paragonata ad un formaggio fresco, tecnologicamente non lo è, poiché è prodotta a partire da siero (e non da latte) e ciò comporta delle differenze anche dal punto di vista microbiologico, a causa delle sue principali caratteristiche: scarsa o assente salatura e debole acidità. I campioni di ricotta analizzati mostravano, infatti, un valore medio per pH ed aW rispettivamente di  $6.51 \pm 0.20$  e  $0.99 \pm 0.01$ . La materia prima di partenza, il siero residuo dalla caseificazione, viene

trattato termicamente a temperature superiori a 80°C, cosa che dovrebbe garantire, almeno inizialmente, la sua sicurezza igienica. Ma sono le successive fasi di produzione quelle che possono costituire il maggiore rischio di natura igienica. Se le analizziamo, ci si può facilmente rendere conto di come la ricotta sia un latticino molto deperibile e particolarmente soggetto a subire contaminazioni di tipo ambientale. Il suo valore di pH intorno a 6.0, l'elevata acqua libera, la scarsa o nulla salatura fanno sì che nella ricotta si possano sviluppare un gran numero di batteri, compresi quelli patogeni, soprattutto quando non vengono applicate corrette temperature durante le fasi di commercializzazione e conservazione. Come per molti prodotti lattiero-caseari freschi, la qualità della materia prima è importante per contenere il rischio associato alla presenza di microrganismi dannosi nel prodotto finito, ma sono le successive fasi di sgrondo, raffreddamento e confezionamento quelle a maggior rischio di contaminazione. A volte, per facilitare l'affioramento, viene impiegato siero di latte non pastorizzato che contribuisce all'aumento delle popolazioni microbiche e può essere vettore di germi patogeni o alteranti. Dopo la fase di affioramento dello siero, la ricotta deve essere rapidamente estratta dalla scotta residua: operazione questa che è prevalentemente manuale nelle piccole produzioni artigianali che caratterizzano il nostro territorio. Essendo un prodotto che non presenta ostacoli efficaci alla moltiplicazione microbica e non essendo previsti successivi trattamenti termici prima della commercializzazione, è di fondamentale importanza l'applicazione di buone norme di processo e un'accurata igiene di produzione. La salubrità e la conservabilità della ricotta fresca sono soggette infatti alle condizioni in cui avvengono le fasi successive alla raccolta del coagulo, e in particolare:



il drenaggio della scotta (lento o rapido), le modalità di confezionamento (a caldo o a freddo), l'eventuale pastorizzazione della ricotta prima del confezionamento a caldo (processo industriale). Il coagulo viene lasciato affiorare e consolidare per un periodo variabile tra i 5 e i 20 minuti al termine dei quali si procede all'operazione di estrazione. Se questa viene effettuata manualmente, come avviene nelle piccole produzioni artigianali, si utilizza un mestolo forato o una spannarola. Il coagulo viene quindi posto in fiscelle (cestini) in plastica forate per favorire il drenaggio della scotta, operazione che può richiedere da qualche decina di minuti ad alcune ore. Dal punto di vista microbiologico e igienico questa fase è uno dei principali punti critici della produzione. La situazione di criticità massima si ha quando la ricotta posta nelle fiscelle viene lasciata a temperatura ambiente a terminare lo sgrondo su superfici di drenaggio per tempi prolungati, prima di essere posta nelle celle frigorifere. Il raffreddamento lento, dalla temperatura di estrazione a quella ambientale, può consentire infatti lo sviluppo di un gran numero di specie microbiche, sia quelle termoresistenti sopravvissute che quelle di origine ambientale presenti nella zona di produzione. A ciò si aggiungono anche i pericoli relativi all'aspetto igienico, quando le superfici di contatto, gli utensili e i contenitori non vengono correttamente sanificati, contribuendo in tal modo al grado di contaminazione della ricotta. Completata la fase di drenaggio e raffreddamento, la ricotta di produzione artigianale può essere venduta direttamente, sfusa e senza ulteriore stoccaggio. Questo costituisce un ulteriore potenziale rischio per il consumatore, poiché il prodotto può venire contaminato durante il trasporto e la vendita al dettaglio, cosa che, oltre al pericolo igienico, abbrevia fortemente la sua shelf-life ad un massimo di 24-48 ore. In queste fasi

sono quindi importanti sia la pulizia dei mezzi di trasporto che il mantenimento di corrette temperature di refrigerazione, che devono essere mantenute per tutto il periodo della commercializzazione. Quindi, solo una gestione attenta del processo produttivo e buone norme igieniche di lavorazione possono consentire che la ricotta fresca venga consumata con tranquillità. Al fine di una maggiore valorizzazione del prodotto, anche in termini di allungamento della shelf-life, si deve porre particolare attenzione a tutte le fasi della filiera produttiva. A tale scopo, sono state postulate varie ipotesi tecnologiche, tra cui il confezionamento in atmosfera modificata (MAP). Diverse prove sono state condotte su campioni di ricotta ovina sarda e siciliana (Mancuso et al., 2014; Venusti et al., 2016). Nonostante il confezionamento in MAP e le condizioni igieniche di partenza, decisamente migliori rispetto ai nostri campioni, la shelf-life della ricotta fresca risultava significativamente influenzata dalle buone pratiche igieniche di produzione applicate durante la lavorazione, il confezionamento e la conservazione. I risultati mostrano, infatti, che la durabilità della ricotta fresca ovina potrebbe essere estesa per 7-14 giorni a seconda del grado di gestione dell'igiene e della produzione raggiunto dal caseificio. Viceversa, la durabilità estesa di prodotti refrigerati, soprattutto con una bassa o nulla presenza di microflora competitiva, espone il prodotto alla crescita di microrganismi patogeni e alteranti; problematica di non poco conto. Ricordiamo infatti, che in uno dei nostri campioni è stata isolata *L. monocytogenes*, con una carica di 3.3 Log UFC/g, potenzialmente pericolosa per il consumatore. Benché negli ultimi anni la frequenza del suo isolamento risulti alquanto bassa in prodotti lattiero caseari freschi, diversi sono gli episodi tossinfettivi segnalati in tutto il mondo a seguito del consumo di tali alimenti

(Verraes et al., 2015) La moltiplicazione del patogeno è infatti ostacolata da diversi fattori quali le condizioni fisico-chimiche del prodotto, la presenza di un'adeguata microflora competitiva o la produzione di batteriocine. Venendo a mancare tali fattori *L. monocytogenes*, in virtù delle ottime capacità di sopravvivenza, è in grado di replicarsi facilmente. Infine, nessuno dei nostri campioni risultava positivo per la ricerca di *Salmonella*, benché sia ormai confermato il ruolo dei latticini come fonte di episodi sporadici di salmonellosi (Sandri et al., 2003).

#### 6.4.3 Tuma

La tuma ovina, altro non è che la risultante di una prima fase di lavorazione del pecorino stagionato, prodotta a partire da latte crudo intero. Durante la lavorazione il latte viene portato alla temperatura di 37°-39°C, viene poi aggiunto caglio di agnello in pasta che fa coagulare il latte in 40-60 minuti. La cagliata viene quindi rotta alle dimensioni di chicco di riso utilizzando un attrezzo detto "rotula" o anche "rotella". Viene poi aggiunta acqua calda a 70°C in proporzione di un decimo del volume dell'intera massa, così da innalzare la temperatura fino ai 40°C. Quindi, la massa caseosa viene fatta riposare sul fondo della caldaia per una decina di minuti, in modo da favorire l'addensamento del coagulo e poi estratta e suddivisa in caratteristici canestri cilindrici di giunco o vimini detti "fascetti", che danno alla forma finale del Pecorino la caratteristica superficie rugosa per i disegni degli intrecci. Segue una pressatura manuale della cagliata nei canestri che vengono poi rivoltati per favorire l'asciugatura. La fase successiva prevede la scottatura della massa

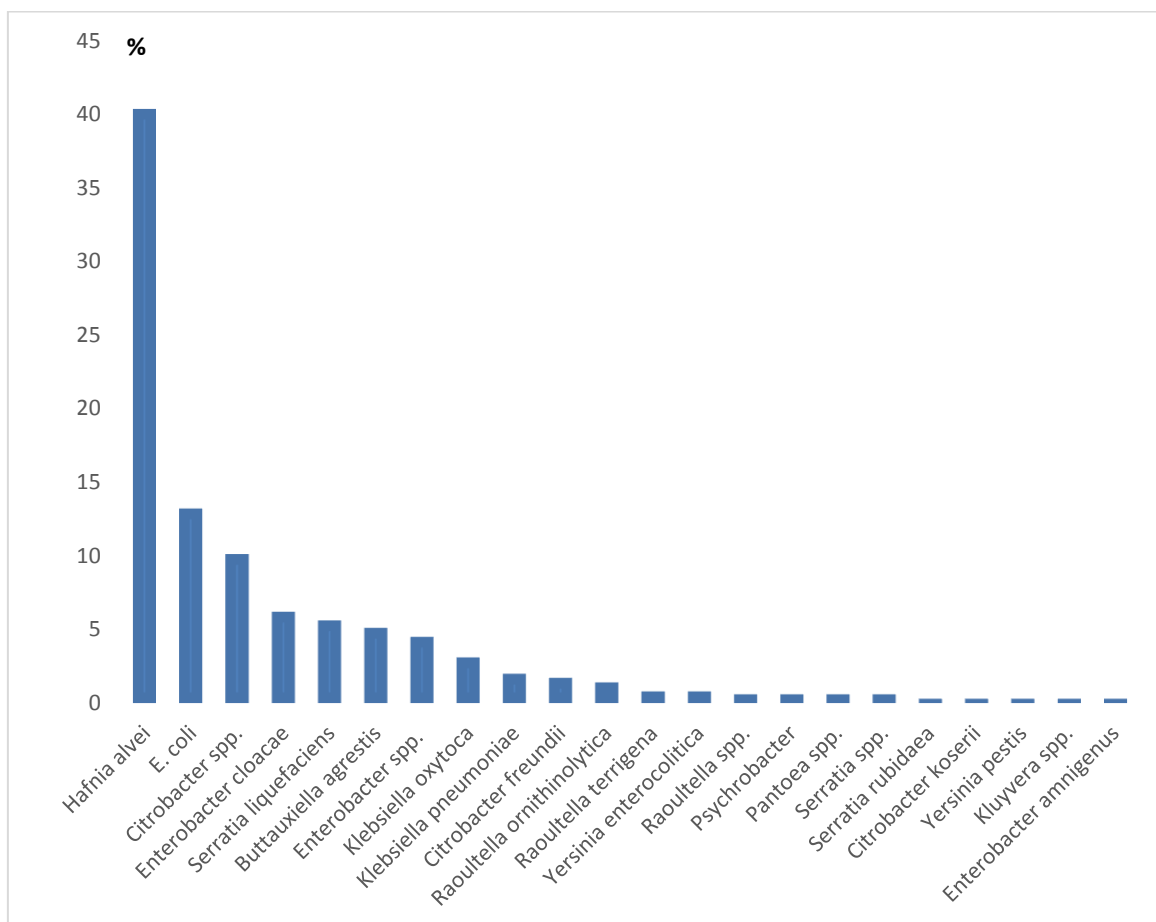
caseosa ancora dentro i canestri, che avviene per immersione degli stessi in siero scaldato a temperatura di 80-90°C, per una durata di 3h e comunque fino a quando la cagliata non abbia raggiunto la temperatura di 40°C. Quindi, le forme vengono estratte dal siero lasciate ad asciugare e fatte rassodare per circa due giorni. La tuma è il prodotto finito, non stagionato, nè salato. Le scarse condizioni igieniche rilevate nei nostri campioni di tuma con una CMT media pari a 8.0 Log UFC/g, sono da rintracciare nei processi di lavorazione artigianale del prodotto e nella qualità della materia prima. Come è stato rilevato per altri formaggi a base di latte ovino crudo, la buona riuscita del prodotto e le caratteristiche che individuano univocamente un formaggio tipico, dipendono essenzialmente dall'impiego di un latte di elevata qualità microbiologica e dalle tecniche di lavorazione (Mormile et al., 2013). La lavorazione della tuma prevede, infatti, temperature relativamente basse (40°C), ragion per cui la qualità igienico-sanitaria del latte crudo risulta fondamentale. Sulla base dei valori riscontrati nel latte di massa da noi analizzato è evidente come il punto critico "Materia Prima", dovrebbe essere monitorato al di là di quanto specificato nella Normativa. Tale attività di sorveglianza dovrebbe espletarsi mediante un controllo del benessere e dello stato di salute degli animali in allevamento, delle condizioni igieniche di mungitura e delle caratteristiche organolettiche, associato a valutazioni chimico-fisiche quali la misurazione del pH, la temperatura, la conta delle cellule somatiche, ecc. In questo tipo di produzioni, ristrette ad un determinato ambito territoriale, tale controllo risulta di non difficile realizzazione, consentendo di valutare rapidamente l'idoneità del latte alla successiva trasformazione. Relativamente alle temperature di stoccaggio, se da un lato la sosta del latte a temperature

ambientali per un periodo di 12-24 ore notoriamente favorisce la proliferazione dei batteri lattici necessari alle successive fasi di caseificazione, parimenti potrebbe comportare un eccessivo sviluppo di altri microrganismi, tra cui gli Enterobatteri, i cui valori sono risultati essere decisamente alti nei nostri campioni, con una media di 4.8 Log UFC/g. Certamente un punto critico durante il processo produttivo è rappresentato dall'acidificazione della cagliata che deve raggiungere valori quanto più prossimi al pH di 5.3, in modo da limitare la replicazione microbica. Altrettanto importante nella tecnologia di produzione è il monitoraggio della "maturazione in Scotta", in quanto questa fase potrebbe avere, in termini igienici, un notevole impatto sul prodotto, al pari della stagionatura, e quindi meritevole di controlli sensoriali e fisico-chimici quali il pH, la curva tempo/ temperatura, i cui limiti andrebbero certamente stabiliti anche sulla base delle specifiche esperienze maturate dai produttori. Infine, non meno importanti risultano le contaminazioni post-lavorazione negli ambienti di lavoro e vendita (utensili, personale non correttamente formato, ambienti insalubri ecc...) che espongono il prodotto ad ulteriori rischi microbiologici, quali l'eventuale produzione di tossine stafilococciche, considerando, l'elevato tenore medio di STAC C+ rilevato nei prodotti pari a 3.8 Log UFC/g. Non meno importante da valutare, anche l'eventuale presenza di patogeni, che nei nostri campioni ha dato sempre esito negativo. Se certamente per i formaggi a base di latte crudo, quali il pecorino, la vasta gamma di popolazioni microbiche rinvenute è alla base delle caratteristiche intrinseche del prodotto (aroma, sapidità, trama ecc.), allo stesso tempo, l'elevato tenore in germi, soprattutto di enterobatteri, come nei prodotti da noi analizzati, pone questa categoria di formaggi fortemente a rischio per la colonizzazione e

replicazione dei patogeni quali la *Salmonella*. Quest'ultima è stata infatti, isolata in campioni di pecorino abruzzese in cui le cariche delle *Enterobacteriaceae* (3-4 log UFC/g) risultavano in linea con quelle da noi rilevate (Chaves-López et al., 2006). Lo stesso dicasi per *L. monocytogenes*, la cui persistenza nelle linea di produzione dei formaggi riguarda prevalentemente le aree di lavaggio, salatura e maturazione, esponendo il prodotto a molteplici fonti di contaminazione (Ibba et al., 2013)

### 6.5 Identificazione dei ceppi appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*

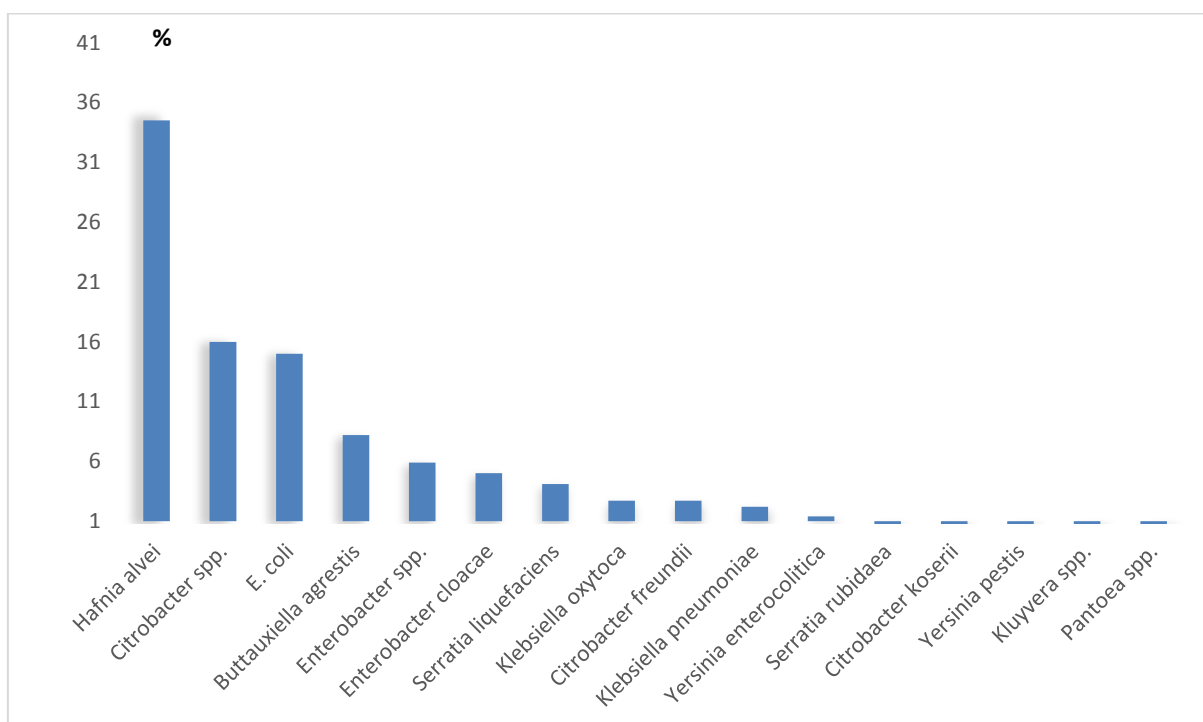
Da tutti i campioni (latte, ricotta e formaggi) sono stati isolati ed identificati 355 ceppi appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*. I ceppi risultavano così distribuiti: (143) 40.3% *Hafnia alvei*; (47) 13.2% *E. coli*; (39) 10.1% *Citrobacter* spp.; (22) 6.2% *Enterobacter cloacae*; (20) 5.6% *Serratia liquefaciens*; (18) 5.1% *Buttauxiella agrestis*; (16) 4.5% *Enterobacter* spp.; (11) 3.1% *Klebsiella oxytoca*; (7) 2.0% *Klebsiella pneumoniae*; (6) 1.7% *Citrobacter freundii*; (5) 1.4% *Raoultella ornithinolytica*; (3) 0.8% *Raoultella terrigena*; (3) 0.8% *Yersinia enterocolitica*; (2) 0.6% *Raoultella* spp.; (2) 0.6% *Psychrobacter* spp.; (2) 0.6% *Pantoea* spp.; (2) 0.6% *Serratia* spp.; (1) 0.3% *Serratia rubidaea*; (1) 0.3% *Citrobacter koserii*; (1) 0.3% *Yersinia pestis*; (1) 0.3% *Kluyvera* spp.; (1) 0.3% *Enterobacter amnigenus* (Figura 15).



**Figura 15.** Distribuzione dei ceppi identificati appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* isolati dalla totalità dei campioni analizzati.

### 6.5.1 Ceppi isolati dal latte.

Un totale di 220 ceppi, confermati come appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, sono stati identificati con la tecnologia MALDI-TOF. Tra questi la prevalenza più alta del 34.5% è stata attribuita alla specie *H. alvei*, seguita da *Citrobacter* spp. con il 16.0%, da *E. coli* con il 15.0% e da *B. agrestis* con l'8.2%. In percentuale minore sono stati identificati *Enterobacter* spp (5.9%) ed *E. cloacae* (5.0%). Infine, con prevalenza dal 4.1% allo 0.5%, sono stati identificati *S. liquefaciens*, *K. oxytoca*, *K. pneumoniae*, *S. rubidaea*, *C. freundii*, *C. koserii*, *Y. enterocolitica*, *Y. pestis*, *Kluyvera* spp., *Pantoea* spp (Figura 16).

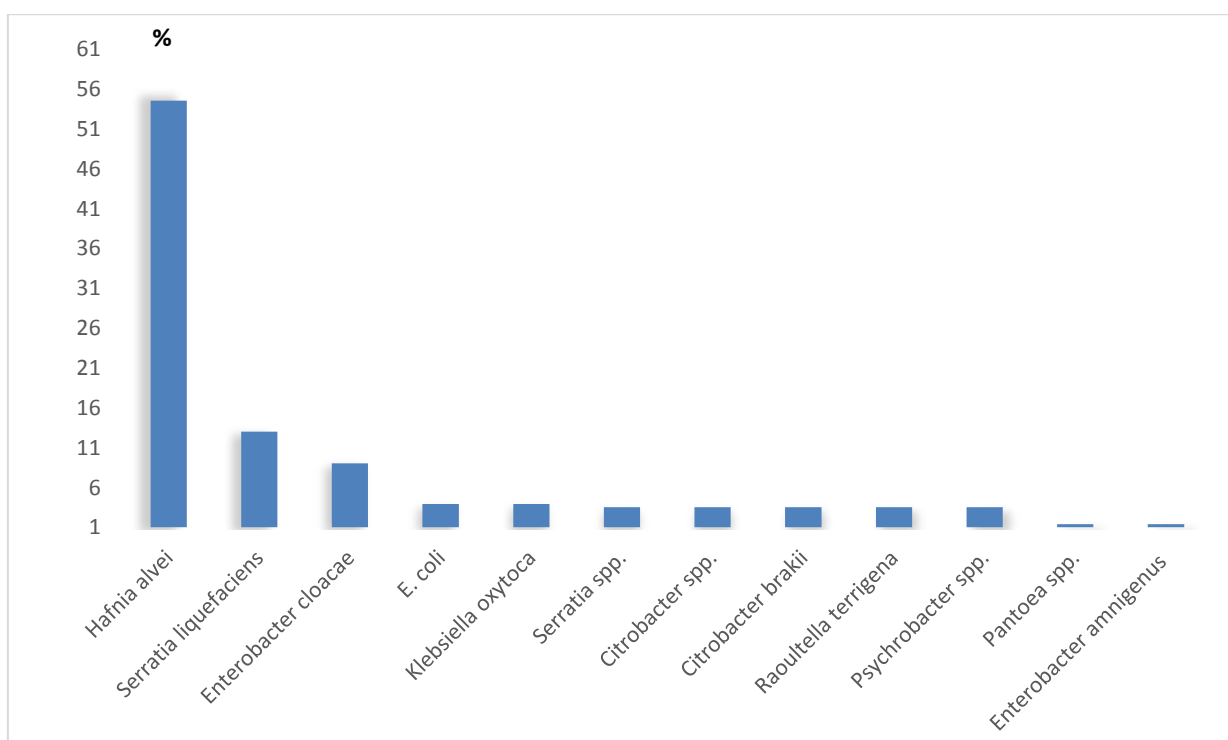


**Figura 16.** Distribuzione dei ceppi identificati appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* isolati da latte ovino



### 6.5.2 Ceppi isolati dalla ricotta.

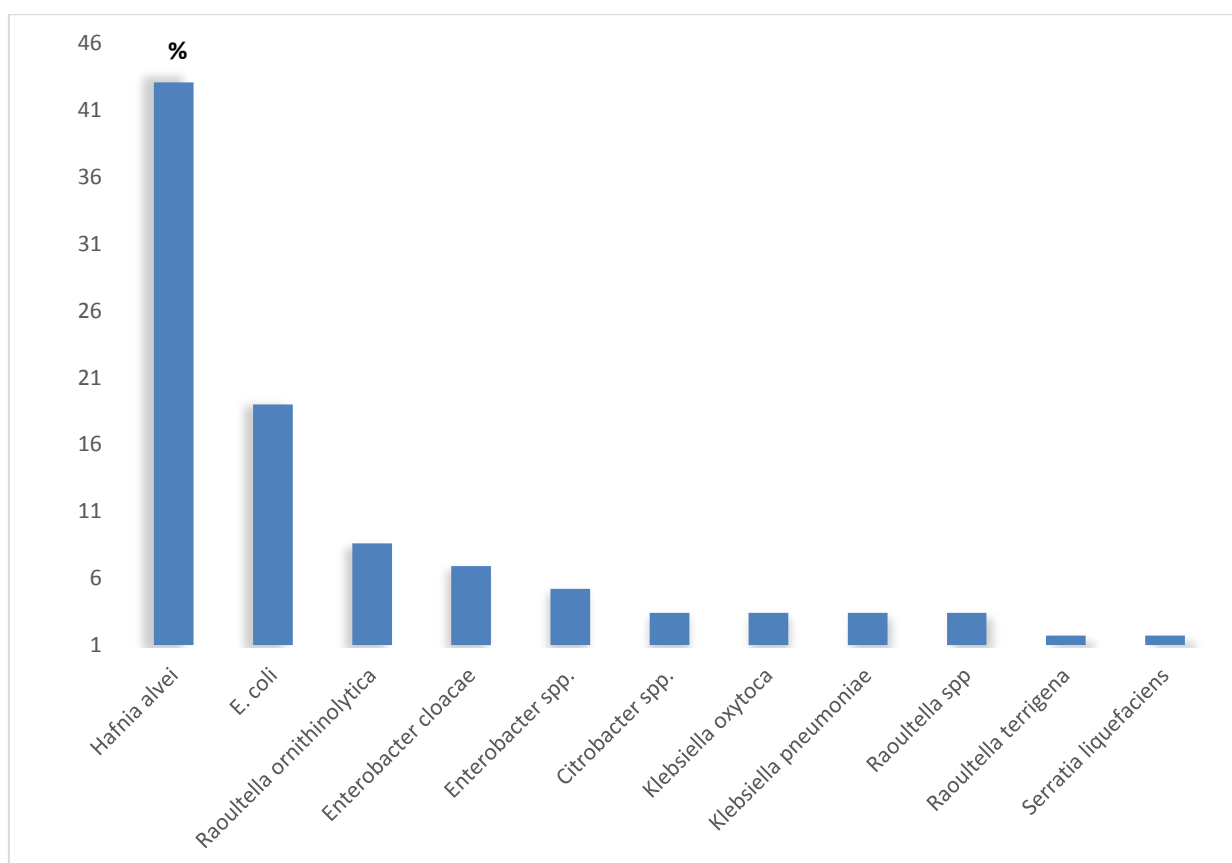
Trai i 77 ceppi di Enterobatteri isolati ben il 54.5% (42) apparteneva alla specie *Hafnia alvei*; confermandosi il batterio maggiormente isolato. Seguiva *S. liquefaciens* con il 13.0% (10) ed *E. cloacae* con il 9%. In piccole percentuali sono stati isolati *E. coli* e *K. oxytoca* (3.9%). Altri ceppi presentavano una prevalenza tra il 3.5% e l'1.3% (*Serratia* spp., *Citrobacter* spp., *C. brakii*, *R. terrigena*, *Psychrobacter* spp., *Pantoea* spp., *E. aminigenus*) (Figura 17)



**Figura 17.** Distribuzione dei ceppi identificati appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* isolati da ricotta ovina

### 6.5.3 Ceppi isolati dalla tuma.

Un totale di 58 ceppi sono stati isolati dai campioni di tuma ovina. Di questi il 43.1% veniva identificato come *Hafnia alvei*, il 19.0% come *E. coli* e l'8.6% come *R. ornithinolytica*. *E. cloacae* rappresentava il 6.9% della flora batterica isolata, mentre *Enterobacter* spp. il 5.2%. Infine, *Citrobacter* spp., *K. oxytoca*, *K. pneumoniae*, *Raoultella* spp., rappresentavano il 3.4%; *R. terrigena* e *S. liquefaciens* venivano identificate nell' 1.7% del totale (Figura 18).



**Figura 18.** Distribuzione dei ceppi identificati appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae* isolati da tuma ovina

#### 6.5.4 Considerazioni di carattere epidemiologico

Alla luce di quanto esposto il germe isolato con maggiore prevalenza tra la famiglia delle *Enterobacteriaceae* è risultato, sia nel latte che nei prodotti derivati, *Hafnia alvei*. Al genere *Hafnia* appartengono batteri Gram negativi ritenuti fino a poco tempo fa dei semplici commensali non patogeni dell'apparato gastro-enterico dell'uomo e dei mammiferi domestici. Negli ultimi anni, il loro sempre più frequente isolamento in prodotti di origine animale ha richiamato l'interesse scientifico soprattutto nei confronti della specie *Hafnia alvei* responsabile di infezioni opportunistiche, riportate in medicina umana e veterinaria, soprattutto nei soggetti immuno-compromessi, (Padilla et al., 2015; Litrenta and Oetgen, 2017). Precedenti studi dimostravano come, tra le *Enterobacteriaceae* isolate in latte crudo ovino, *Hafnia alvei*, avesse una prevalenza del 6.5% (Gaya et al., 1987). Percentuale di molto inferiore a quella rinvenuta nei campioni da noi analizzati (34.5%) ed in altri studi sulla flora psicrofila del latte di massa bovino (29.4%), destinato alla produzione di formaggi a lunga stagionatura (Decimo et al., 2014). L'aumento della prevalenza del ceppo *Hafnia alvei* nel corso degli anni è da ricollegare alla progressiva resistenza acquisita ed alla possibilità di moltiplicarsi anche a temperature di refrigerazione; configurandosi come un ceppo psicrofilo a pieno titolo, grazie alla sua capacità di replicarsi anche a temperature di circa 2°C (Ridell and Korkeala, 1997). Inoltre, Chen et al., (2011) dimostravano come il latte rappresenti un terreno estremamente favorevole alla replicazione del batterio; responsabile di episodi di spoilage in latte UHT a temperature di refrigerazione. Lo stesso studio sviluppava un modello predittivo di crescita microbica, attribuendo ad *Hafnia alvei* un tasso di crescita

maggiore rispetto alla specie *Pseudomonas*, germe alterante per eccellenza. Parimenti, la sua alta prevalenza nella ricotta e nei formaggi, confermano l'elevata diffusione del batterio anche negli ambienti di trasformazione del latte. In alcuni tipi di formaggi, a media o lunga stagionatura, è stato ipotizzato l'utilizzo di ceppi di *Hafnia alvei* come microflora accelerante il processo di maturazione. Tuttavia, è stata rilevata, da parte del germe, un'elevata attività lipolitica e la produzione di ammine biogene che concorrono al rapido deterioramento del prodotto (Ristagno et al., 2013). Le restanti specie batteriche, identificate tra le *Enterobacteriaceae* del latte, rispecchiano la microflora già investigata in precedenza per il latte ovino crudo (*E. coli*, *Citrobacter*, ecc..) ad eccezione della specie *Buttauxiella agrestis* che nei campioni analizzati compare con una prevalenza dell'8.2%, fino ad ora mai rilevata. Si tratta di un ceppo rinvenuto normalmente come contaminante del suolo e delle acque, caratterizzato da una buona resistenza alle condizioni sfavorevoli (Dabert et al., 2013). La sua presenza nel latte di massa ovino potrebbe essere collegata al livello di contaminazione degli ambienti di mungitura e lavorazione della produzione primaria; non essendo stato isolato nei prodotti derivati, ma soltanto nel latte crudo. Per quanto riguarda la ricotta, si rilevava un'alta prevalenza di *E. cloacae* e *S. liquefaciens*, che può essere conseguenza sia delle cattive condizioni igieniche degli ambienti di lavorazione che della scarsa qualità della materia prima (Cosentino and Palmas, 1997). Nella tuma ovina, accanto al genere *Enterobacter* ed *E. coli*, *R. ornithinolytica* risultava tra le specie isolate con maggiore frequenza (8.6%). Tale microrganismo veniva un tempo classificato nel genere *Klebsiella*, per le strette analogie fenotipiche e genetiche. Seppur considerato un commensale, non patogeno, del tratto

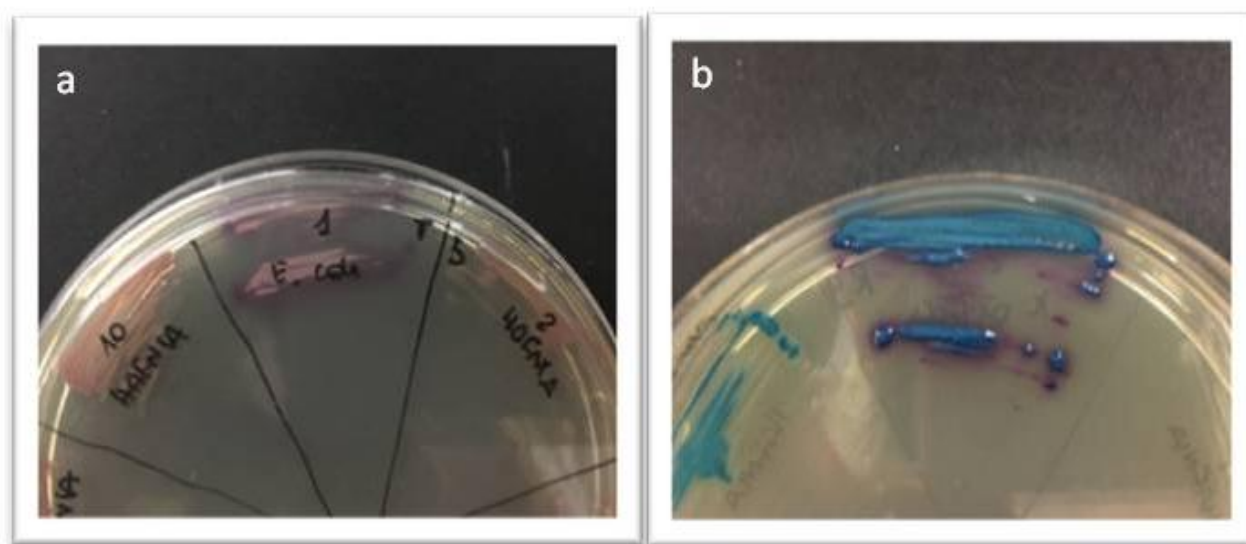
gastro-enterico, e quindi un comune germe di contaminazione ambientale, sono sempre più frequenti i casi di infezioni a volte complicati in batteriemie, causati da questo microrganismo, che lo configurano come un patogeno emergente a tutti gli effetti (Seng et al., 2016). Infine la compresenza a vario titolo di germi come *Serratia* spp., *K. oxytoca*, *K. pneumoniae*, *Citrobacter*, *Pantoea* spp., *Psychrobacter* spp., nei prodotti derivati, rispecchia il livello di contaminazione degli ambienti di trasformazione del latte e parimenti, come accennato in precedenza, la qualità della materia prima impiegata.

## 6.6 Espressione fenotipica di Enterobatteri ESBL

### 6.6.1 Screening su terreno cromogeno.

Tutti i ceppi identificati (n. 355) sono stati sottoposti allo screening per la valutazione dell'espressione fenotipica di enzimi ESBL. Tra questi, 31 ceppi venivano esclusi dal test di conferma, poiché, presentavano assenza di crescita o crescita incolore allo screening iniziale effettuato con il terreno cromogeno. Per molti ceppi testati, la casa produttrice non forniva indicazioni sulla morfologia ed il colore delle colonie positive, eccezione fatta per *E. coli* (crescita malva) *Klebsiella* spp, *Enterobacter* spp, e *Serratia* spp (crescita verde). Per tutti gli altri microrganismi si riscontravano colorazioni variabili. In particolare, alcuni ceppi di *Hafnia alvei* mostravano una colorazione malva, mentre altri verde-blu; indipendentemente dal fatto che risultassero positivi o meno al test di conferma. *Citrobacter* spp, presentava una crescita con colorazione malva, così come *Kluyvera* spp; di contro i ceppi di *Raoultella* spp., *Buttauxiella* spp. e *Psychrobacter* spp.,

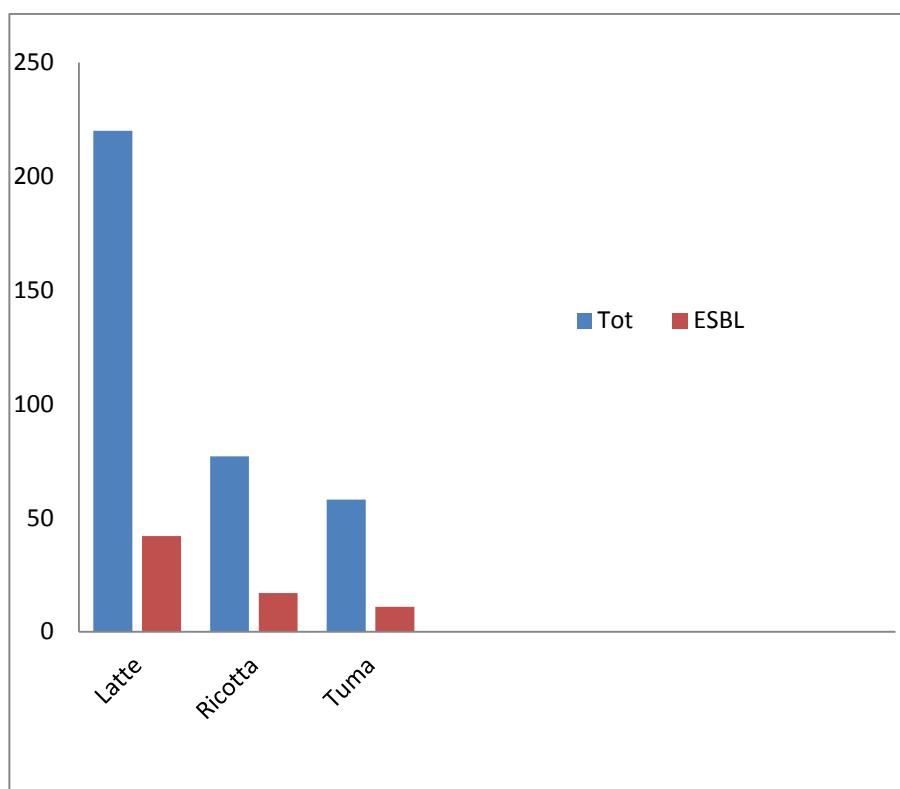
crecevano con colonie di colore verde-blu. Dei 324 ceppi risultati positivi al terreno cromogeno, solamente 70 sono stati confermati come ESBL produttori dal test combinato; rivelando un tasso elevato del 78.4% (254) di falsi positivi, per il terreno cromogeno utilizzato, probabilmente dovuto ad una sovra-produzione da parte di alcune *Enterobacteriaceae* di cefalosporinasi o penicillasi cromosomiali (Reglier-Poupet et al., 2008) (Figura 19).



**Figura 19.** a) colorazione malva espressa da ceppi ESBL+ appartenenti alle specie *E. coli* ed *Hafnia alvei*. b) Colorazione verde-blu espressa occasionalmente da alcuni ceppi di *Hafnia alvei* ESBL+

### 6.6.2 Conferma fenotipica con test di combinazione.

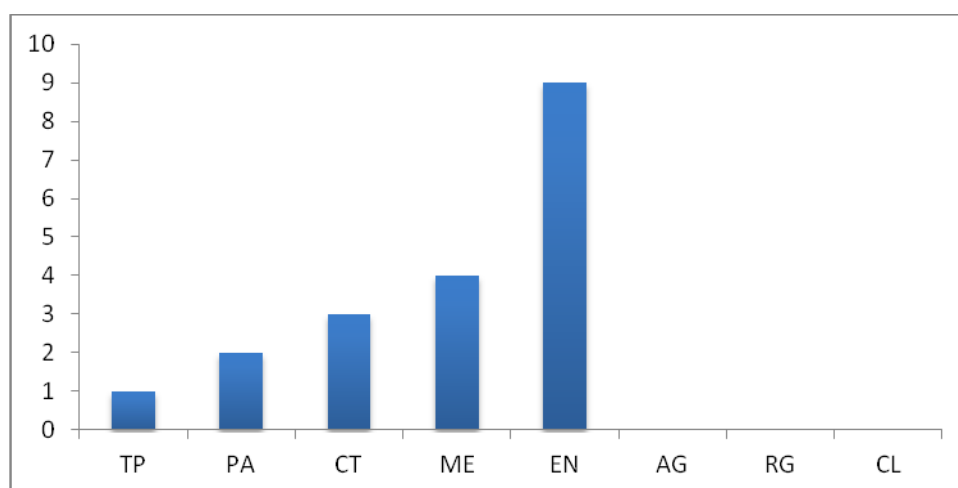
Il test combinato ha confermato un totale di 70 ceppi ESBL produttori, ovvero il 19.7% della totalità dei ceppi identificati. In particolare, dei 220 ceppi provenienti da latte di massa, il 19% (42) risultavano positivi al test; stessa percentuale di positività è stata individuata per i ceppi provenienti dalla tuma (11); mentre per i ceppi isolati dalla ricotta ovina, la positività per ESBL saliva al 22% (17) (Figura 20).



**Figura 20.** Tasso di positività per ESBL, distribuita in base alla tipologia di campioni

### 6.6.3 Diffusione dell'AMR in base alla provenienza

Delle 80 aziende da cui provenivano altrettanti campioni di latte di massa ben il 24.0% (19) risultava positivo per la presenza di enterobatteri ESBL produttori. Inoltre, il tasso di positività risultava distribuito su quasi tutto il territorio siciliano oggetto di campionamento, considerando che delle 19 aziende positive, 1 era della provincia di Trapani, 2 della provincia di Palermo, 3 della provincia di Catania, 4 della provincia di Messina e 9 della provincia di Enna. Nessuna positività è stata riscontrata nelle aziende delle provincie di Agrigento, Ragusa e Caltanissetta (Figura 21).

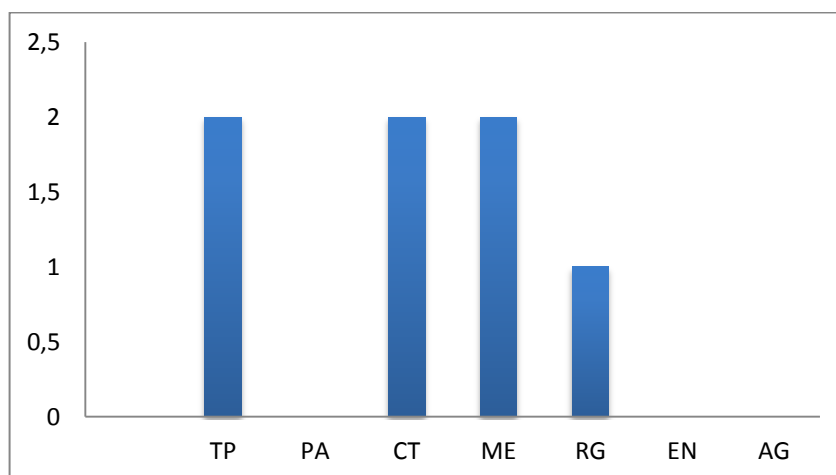


**Figura 21.** Distribuzione dei ceppi ESBL + in base alla provincia di provenienza dei campioni di latte di massa

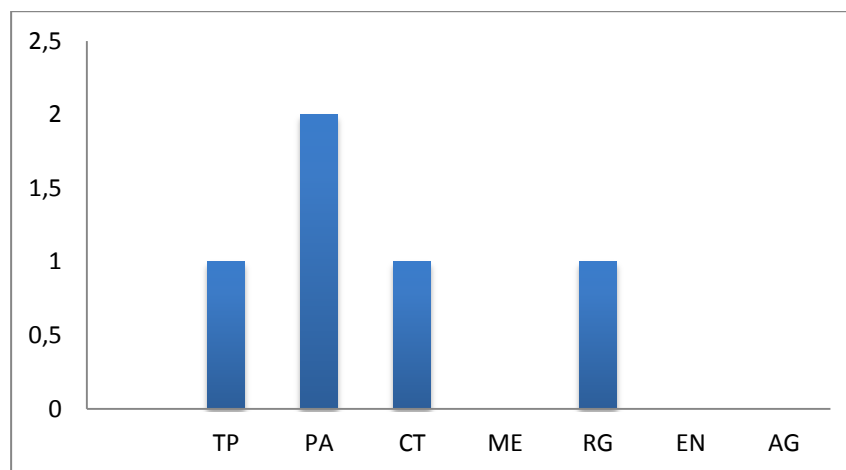
Per quanto riguarda la ricotta, dei 20 campioni analizzati il 35% (7) albergava enterobatteri ESBL +, tra quelli delle provincie di Trapani, Catania, Messina e Ragusa (Figura 22). Infine, il 25% (5) dei 20 campioni di tuma, presentava germi antibiotico resistenti, distribuiti tra le provincie di Trapani, Palermo, Catania e Ragusa (Figura 23).



Considerando la totalità dei campioni, solo la provincia di Caltanissetta non presentava positività per germi ESBL produttori.



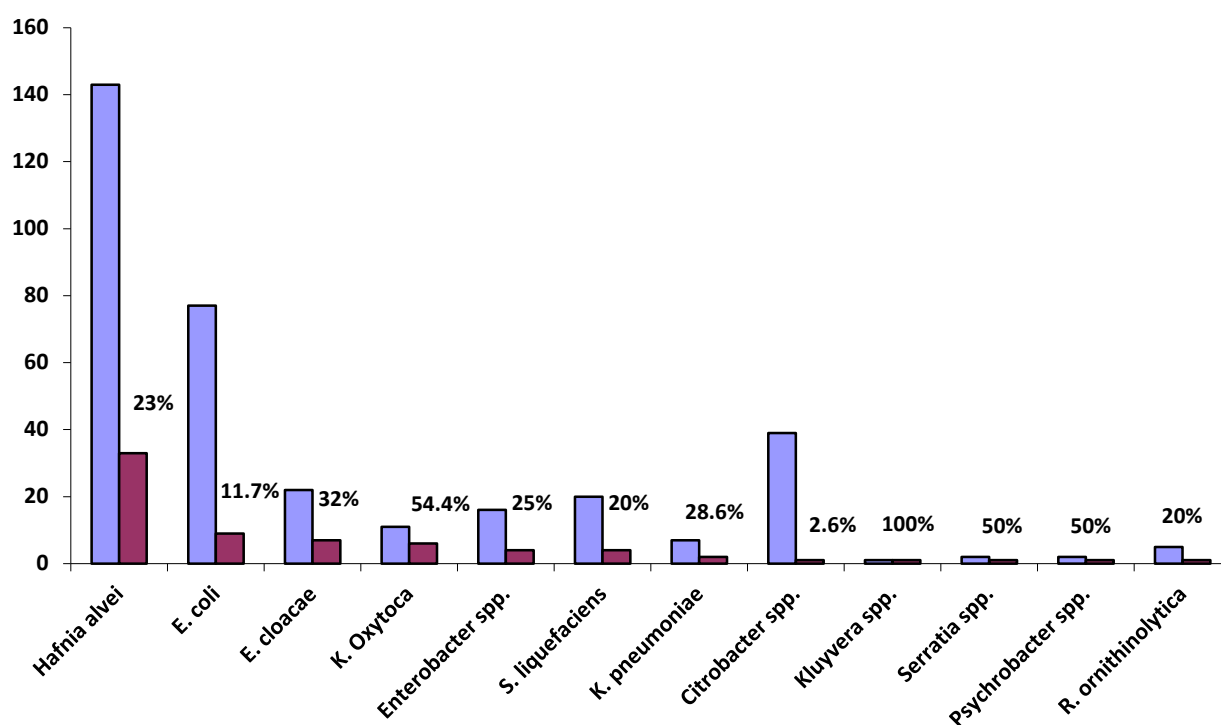
**Figura 22** Distribuzione dei ceppi ESBL + in base alla provincia di provenienza dei campioni di ricotta



**Figura 23.** Distribuzione dei ceppi ESBL + in base alla provincia di provenienza dei campioni di tuma

### 6.6.4 Distribuzione dell'AMR tra i ceppi.

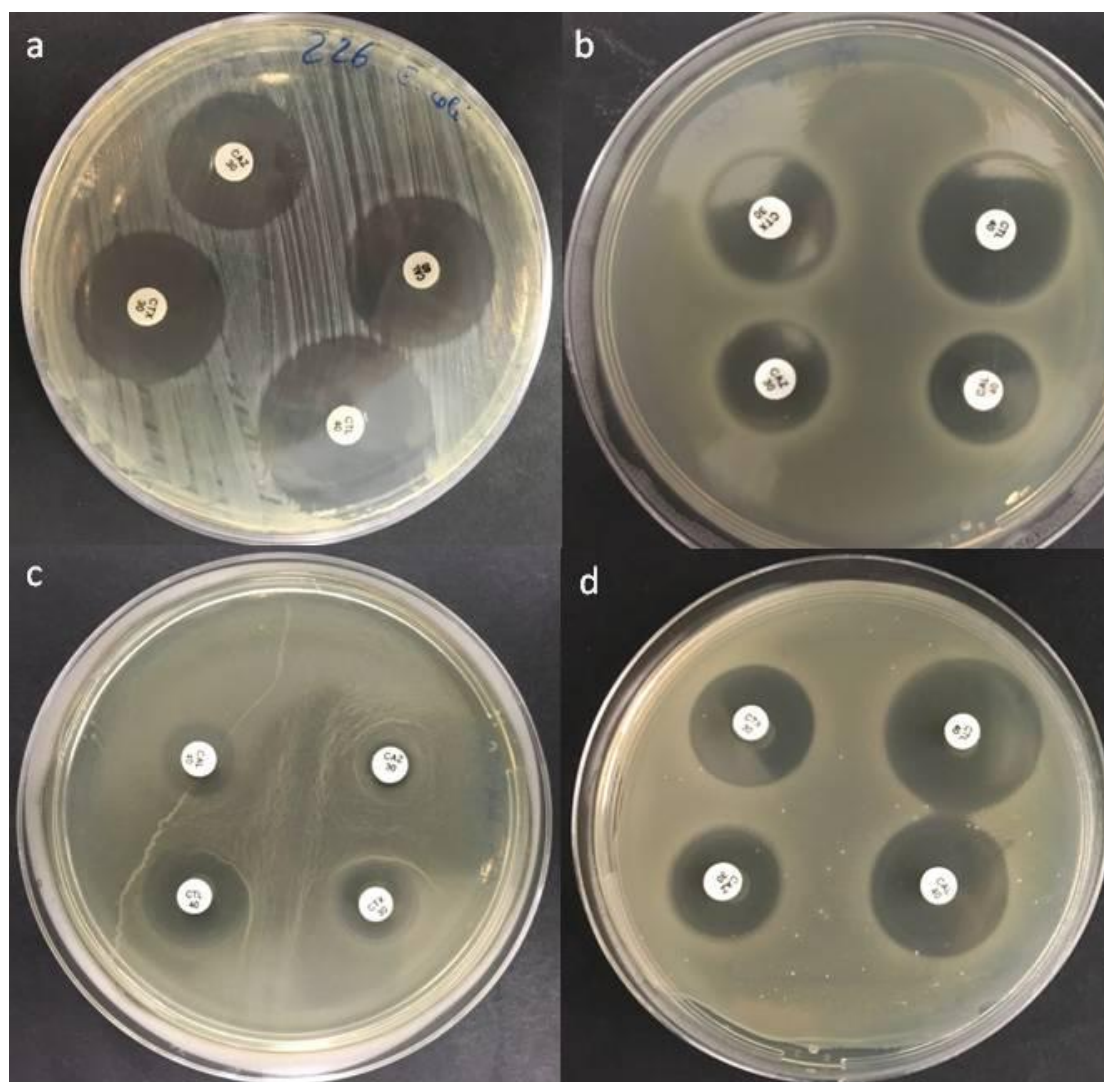
I 70 ceppi che mostravano positività alla produzione di  $\beta$ -lattamasi a spettro esteso erano così distribuiti: 47.1% (33) *H. alvei*; 13% (9) *E. coli*; 10% (7) *E. cloacae*; 8.6% (6) *K. oxytoca*; 5.7 % (4) *Enterobacter spp* e *S. liquefaciens*; 2.6% (2) *K. pneumoniae*; 1.4% (1) *Citrobacter spp*, *Kluyvera spp.*, *Serratia spp.*, *Psychrobacter spp.* e *R. ornithinolytica*. Per ciascun ceppo il tasso di positività per ESBL è mostrato in Figura 24



**Figura 24.** Tasso di positività per ESBL espresso come la percentuale di ceppi con fenotipo positivo tra tutti gli isolati della stessa specie

Benchè *Hafnia alvei* risulti il germe più frequentemente isolato il suo tasso di positività per ESBL si mantiene intorno al 23%. È ben nota la sua resistenza alle cefalosporine ed in particolare la sua attività ceftazidimica (Thomson et al., 1993) (Figura 25). Inoltre, recentemente, sono stati riportati i primi casi di ceppi naturalmente resistenti alla colistina, antibiotico polimixinico di vecchia generazione, tornato in uso per il trattamento di infezioni da germi Gram negativi multi-resistenti; quindi, considerato come ultima scelta nel trattamento delle infezioni più insidiose (Jayol et al., 2017). Ceppi resistenti alla colistina sono noti da tempo, ma recentemente è stato scoperto che il gene *mcr-1*, portatore di tale resistenza, è collocato su un plasmide che lo rende potenzialmente trasferibile da batterio a batterio, anche tra specie diverse, e quindi più diffusibile (Liu, Y.Y., et al., 2016). Stesso discorso vale per *E. coli*, il cui tasso di resistenza nei nostri campioni risultava dell'11.7%. Diversi studi riportano negli ultimi anni una presenza sempre maggiore di *E. coli* ESBL/AmpC +, così come riportato anche dagli ultimi report EFSA, in cui le segnalazioni di ceppi multi-resistenti aumentano in modo esponenziale nel corso degli anni ma, le fonti si limitano soltanto a campioni provenienti da animali vivi (feci) ed alle carni da essi derivate. Secondo questi dati, i ceppi di *E. coli* isolati sono spesso associati ad elevati livelli di resistenza a molteplici antibiotici. In particolare, si registra spesso una resistenza a molecole quali cefepime, cefotaxime e ceftazidime, con percentuali variabili dall'80 al 90% (EFSA, 2016). Non abbiamo ancora informazioni sufficienti sui prodotti lattiero caseari, tanto meno sul latte di massa ovino e suoi derivati (Geser et al., 2012). Nel nostro studio, il rinvenimento di *E. coli* ESBL+ riguardava principalmente i ceppi CTX (Ceftazidime) resistenti (Figura 25); in linea con i risultati

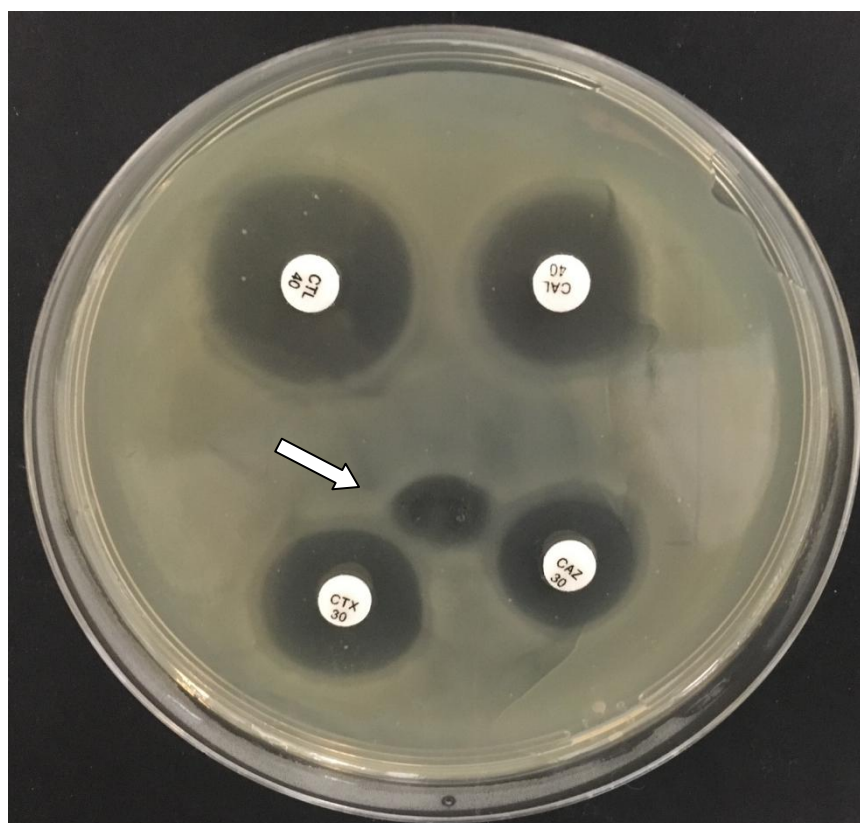
ottenuti da altri laboratori riguardo la caratterizzazione genetica, secondo cui i genotipi più frequentemente associati all'AMR in *E. coli* sono espressi dai geni TEM-1 e CTX-M1 (Österberg et al., 2016).



**Figura 25.** Risultati del test di combinazione, per due ceppi di *E. coli* ( a e b) e due di *Hafnia alvei* (c e d) con evidente attività ceftazidimica: l'alone di inibizione misurato attorno al disco CTL è > 5mm rispetto a quello rilevato attorno al CTX

*Enterobacter* mostrava nei nostri campioni un tasso di positività dal 25% (*E. cloacae*) al 32%, abbastanza elevato, considerando che la prevalenza dei genotipi resistenti in animali da reddito è stata valutata intorno al 69%, confermando l'elevato rischio di trasmissione dagli animali all'uomo attraverso la catena alimentare (Haenni et al., 2016). Il genere *Klebsiella* presentava un tasso di ESBL produttori del 26.8% per *K. pneumoniae* e del 54.5% per *K. oxytoca*, decisamente molto alto ed in accordo ai risultati riportati da altri studi. I ceppi di *Klebsiella* ESBL+ portano spesso determinanti di resistenza nei confronti di fluorochinoloni, cotrimossazolo e aminoglicosidi, ciò significa che questi microrganismi sono in rapida evoluzione in risposta alla pressione selettiva creata dall'uso degli antibiotici, e ciò si traduce in un problema di notevole rilievo clinico ed epidemiologico (Miragliotta et al., 2009). La situazione diventa ancora più preoccupante considerando che il genere *Klebsiella* rappresenta uno dei patogeni opportunisti più diffusi in infezioni nosocomiali ad esito infausto (Tuon et al., 2011). Parimenti, il germe *R. ornithinolytica* (un tempo classificato come *Klebsiella*) ha mostrato un tasso di positività del 20%, rilievo alquanto preoccupante data la natura ubiquitaria del germe, considerato un commensale di contaminazione ambientale. Sono recentissime, infatti, le prime segnalazioni di multi resistenza in ceppi di *R. ornithinolytica* isolati da alimenti, che si configurano quindi, come un veicolo per il mantenimento e la trasmissione della microflora resistente all'interno della piramide alimentare (Luo et al., 2017). Discorso a parte va fatto per *kluivera* spp. dal cui genoma si è verificata, negli anni passati, la diffusione a tutte le specie di enterobatteri suscettibili, di diversi cluster della mutazione CTX-M (Cantón et al., 2012). La bassa frequenza di isolamento del germe nei nostri

campioni, pari al 1.4%, viene però compensata da un elevato tasso di positività (100%) per ESBL (figura 26). Si tratta quindi di un germe commensale occasionalmente presente nel latte ovino, dotato però di un elevato potenziale diffusivo per la resistenza alle cefalosporine.



**Figura 26.** Esito del test di combinazione per la specie *Kluyvera* spp. in cui è evidente una multipla resistenza ad entrambe le molecole testate (CTX e CAZ). La freccia indica l'area di inibizione dovuta all'azione sinergica due antibiotici.

### **6.6.5 Considerazioni sulla presenza di *Enterobacteriaceae* ESBL+ nei prodotti lattiero caseari ovini.**

Scarsi sono ancora i dati presenti in letteratura sulla presenza di ESBL in latte ovino, per cui risulta difficile effettuare una vera e propria comparazione con le casistiche nazionali ed internazionali. Al contrario, diversi sono gli studi condotti sulla presenza di germi ESBL produttori in latte bovino, per lo più provenienti da nazioni extra europee, mentre sono ancora molto esigue le segnalazioni rilasciate dagli stati membri riguardo la presenza di enterobatteri ESBL + in latte crudo (Sudarwanto et al., 2015). Tuttavia, è stata condotta un'indagine interessante sulla presenza di tali batteri nelle aziende produttrici di latte massale in Germania (Odenthal et al., 2016). Dallo studio emergeva che il 9.5% delle aziende campionate, risultava positivo per l'isolamento di germi ESBL produttori. Percentuale di molto inferiore rispetto a quella descritta per il latte ovino siciliano del 24%, in cui, alle scarse condizioni igieniche della materia prima, si associa un tasso di antibiotico resistenza certamente preoccupante. A tal proposito, sarebbero da investigare accuratamente le tecniche di allevamento, i trattamenti a cui vengono sottoposti i singoli capi, nonché le fonti di contaminazione esogena del latte (acqua, attrezzi, personale, ecc.); che influiscono non poco al mantenimento ed alla persistenza di alcuni ceppi particolarmente resistenti. Parimenti, poche informazioni sono state raccolte sulla presenza di ESBL in formaggi prodotti con latte ovino e da questi dati, seppur parziali, emerge un'elevata percentuale di germi produttori di  $\beta$ -lattamasi a spettro esteso, confermando come l'intera filiera di produzione del latte ovino risulti un elemento critico nella diffusione e nel mantenimento di ceppi resistenti o addirittura

multi-resistenti; nonché una via di trasmissione dell'antibiotico resistenza dagli alimenti al consumatore finale (Vrabec et al., 2015).

#### 6.6.6 Analisi proteomica dei ceppi ESBL + ed ESBL -

Sulla base dei risultati ottenuti, sono stati selezionati 5 ceppi ESBL+ per ciascuna delle seguenti specie: *Hafnia alvei*, *E. coli*, *E. cloacae*, *K. oxytoca*. Per le restanti specie di ESBL produttori individuate, il numero esiguo dei ceppi, non ha permesso un confronto significativo e quindi lo sviluppo di un modello robusto. Lo stesso numero di isolati è stato selezionato per i ceppi ESBL- di ciascuna specie. Seguendo il nostro protocollo sperimentale, si ricavavano un totale di 30 spettri per specie e per fenotipo di resistenza. L'algoritmo applicato dal software consentiva l'analisi dei picchi dati dal rapporto m/z (massa/intensità) di ciascun campione (Figure 27-30). Effettuando una comparazione statistica si andavano ad individuare, nelle repliche dei vari campioni, i picchi che mostravano sovrapposizione o affinità di range. Al termine della comparazione, si procedeva al clustering dei ceppi ed infine all'inserimento di un nuovo Superspectra da inserire nel database. Abbiamo così inserito i seguenti Superspectra: *Hafnia alvei* ESBL+ ed *Hafnia alvei* ESBL-; *E. coli* ESBL+ ed *E. coli* ESBL-, *E. cloacae* ESBL+ ed *E. cloacae* ESBL-, *K. oxytoca* ESBL + e *K. oxytoca* ESBL -



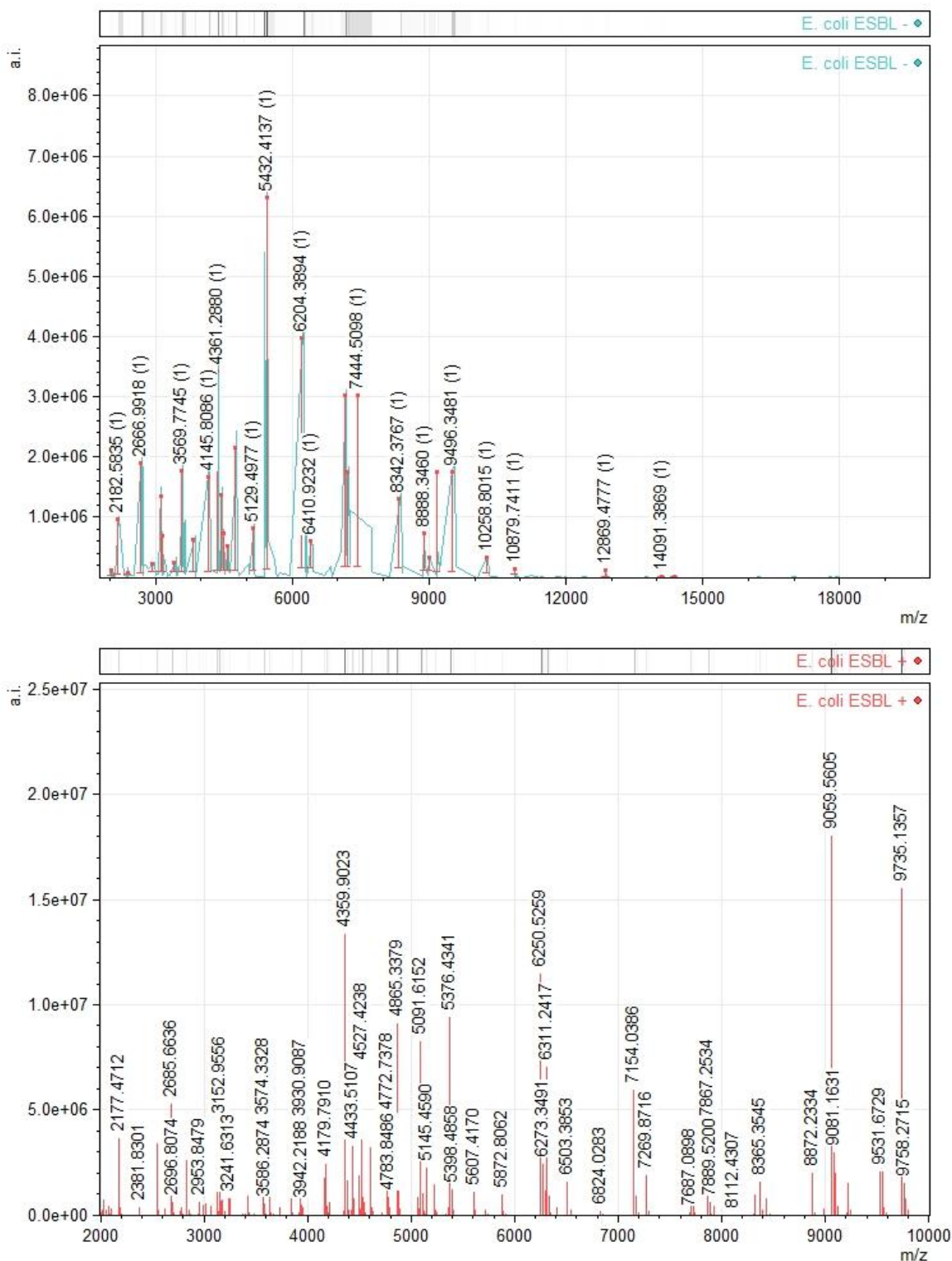
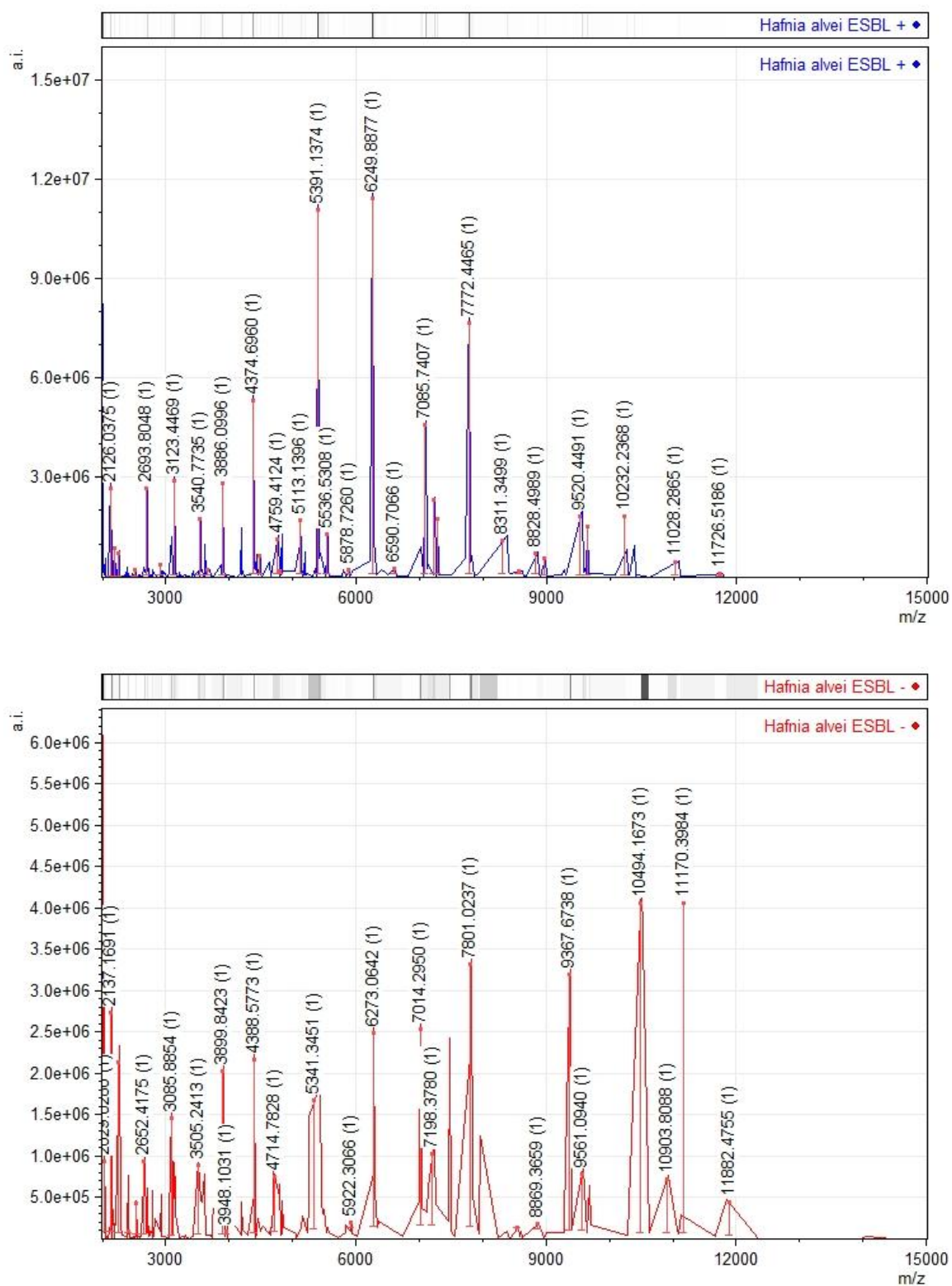
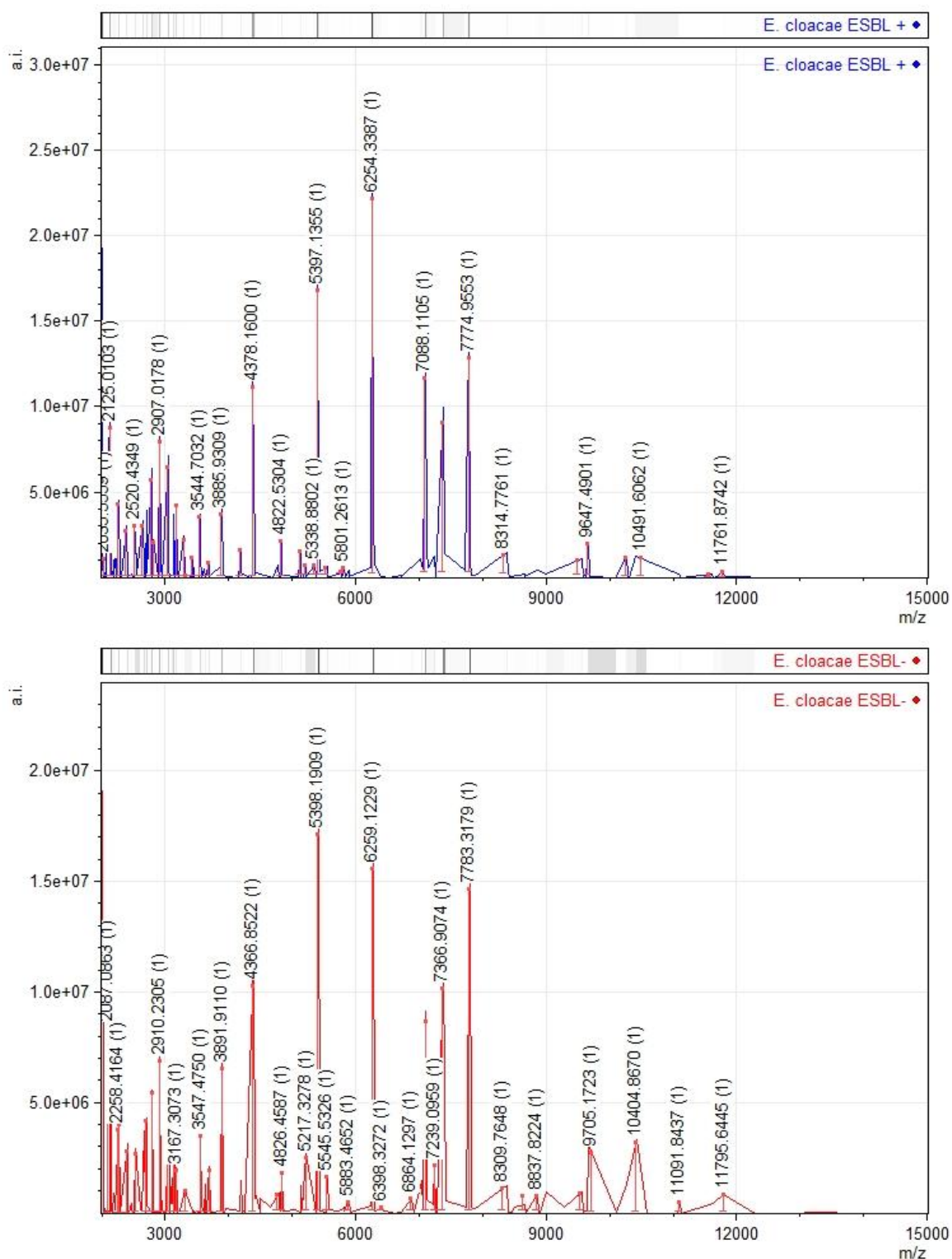


Figura 27. Picchi caratteristici dell'espressione fenotipica ESBL+ o - per ceppi *E. coli*



**Figura 28.** Picchi caratteristici dell'espressione fenotipica ESBL+ o - per ceppi *H. alvei*



**Figura 29.** Picchi caratteristici dell'espressione fenotipica ESBL+ o - per ceppi *E. cloacae*

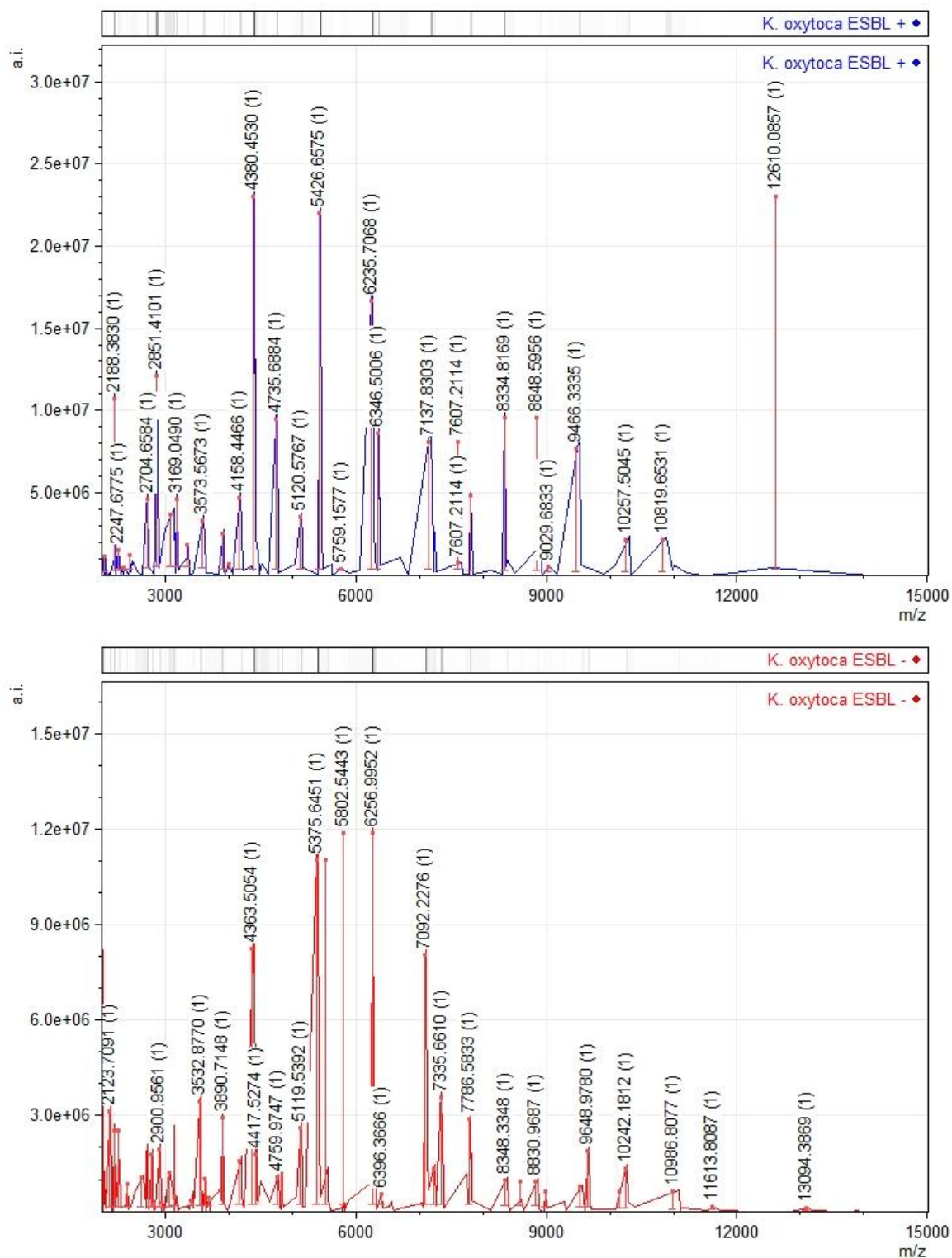


Figura 30. Picchi caratteristici dell'espressione fenotipica ESBL+ o - per ceppi *K. oxytoca*

### 6.6.6.1 Validazione dei risultati

Per verificare l'affidabilità e la robustezza del modello da noi elaborato, abbiamo ristestato i ceppi i cui spettri erano stati utilizzati per l'elaborazione dei modelli di riferimento. Seguendo le medesime procedure di preparazione dei campioni, il livello di affidabilità dell'identificazione andava dal 92% al 99.9%. Per la validazione del metodo sono stati invece saggiati 10 dei ceppi per specie appartenenti alla ceppoteca dell'Unità di Ispezione degli alimenti di origine animale dell'Università di Messina. I ceppi venivano contemporaneamente testati per l'espressione fenotipica della produzione di ESBL, con le metodiche già enunciate. Per ciascun modello sperimentale abbiamo raccolto le seguenti percentuali di corretta identificazione: 80% *Hafnia alvei* (ESBL+), 70% *Hafnia alvei* (ESBL-), 60% *E. coli* (ESBL+), 60% *E. coli* (ESBL-), 50% *E. cloacae* (ESBL +), 60% *E. cloacae* (ESBL-), 70% *K. oxytoca* (ESBL+), 70% *K. oxytoca* (ESBL -). I ceppi che non venivano riconosciuti come ESBL+ o ESBL-, venivano però identificati fino al livello di specie con un matching del 100%. I risultati ottenuti rivelano un discreto livello di performance per i modelli sviluppati, soprattutto per quanto riguarda la specie *Hafnia alvei*. Aumentando il numero dei campioni positivi e negativi da analizzare, sarà certamente possibile implementare e migliorare il clustering dei ceppi e quindi, i Superspectra di riferimento.

L'utilizzo della spettrometria di massa per la valutazione della resistenza agli antibiotici è una realtà consolidata ed in forte crescita. In particolare, precedenti lavori sviluppavano delle procedure sperimentali basate sul monitoraggio diretto dell'attività enzimatica delle  $\beta$ -lattamasi (Sparbier et al., 2012; Kostrzewa et al., 2013; Li et al., 2014). Tali protocolli,

però, prevedevano l'impiego di un periodo di incubazione caratteristico di contatto tra il germe potenzialmente resistente e l'antibiotico target, durante il quale si verificava la scissione dell'anello  $\beta$ -lattamico. Tale attività enzimatica apportava delle variazioni rilevabili nell'analisi proteomica della molecola. Il nostro approccio, invece è nettamente di tipo microbiologico e incentrato sulle caratteristiche espresse dai singoli germi. Studi proteomici e genomici della struttura esterna della membrana di batteri Gram negativi hanno individuato, infatti, un sistema complesso di componenti cellulari (porine, lipopolisaccaridi, pompe ioniche, ecc..) responsabili dell'AMR attraverso la regolazione della diffusione dei diversi antibiotici (Davin-Regli et al., 2008). La tecnologia MALDI-TOF MS è stata utilizzata con successo, nell'identificazione delle proteine periplasmatiche di membrana, rilevando livelli di espressione differenti in isolati resistenti, rispetto ai corrispondenti isolati sensibili. Gli studi proteomici hanno quindi, permesso di costruire un database completo di proteine batteriche per studi comparativi che forniscono informazioni sui ruoli di varie componenti cellulari nella resistenza agli antibiotici (Xu et al., 2006; Hrabák et al., 2013). Il nostro approccio, bastato sugli stessi principi proteomici appena descritti, si proponeva più in generale, l'analisi dei picchi generati dalle predette molecole in modo da poter effettuare una classificazione gerarchica dei ceppi, così come proposto da Egli et al., (2015) e Veenemans et al., (2016). I dati da noi raccolti mostravano una percentuale di corrette identificazioni che andava dal 50% all' 80%. Tali risultati risentono fortemente della variabilità biologica cui sono soggetti i sistemi viventi. Le proteine registrate come picchi negli spettri di massa subiscono infatti, variazioni nella loro espressione in funzione di diversi fattori esogeni

(condizioni ambientali, stressors ecc..), ed endogeni (espressione genomica, mutazioni, filogenetica). Questi fattori, così come la variabilità operatore-dipendente e quella dovuta ai diversi terreni di coltura impiegati, influenzano le prestazioni della tipizzazione, che possono essere certamente migliorate aumentando il numero di ceppi utilizzati per costruire i modelli di riferimento. Questo è l'obiettivo che ci prefissiamo nel tempo.

## **7. CONCLUSIONI**

I dati da noi raccolti offrono uno spaccato significativo delle condizioni igienico-sanitarie del comparto lattiero caseario ovino siciliano, con importanti risvolti dal punto di vista epidemiologico oltre che socio-economico. Tale filiera, in Sicilia, è infatti decisamente corta; la materia prima subisce pochi passaggi e trasformazioni, prima di giungere al consumatore finale tramite circuiti locali. Fatta eccezione per alcune specialità DOP o di nicchia, per cui è previsto un piccolo mercato di esportazione, si tratta generalmente di prodotti consumati a livello locale. Questa condizione si riflette anche sulle scarse condizioni igienico-sanitarie dei prodotti evidenziate dal nostro studio, dal quale emerge come il comparto ovino seppur legato ad una solida e robusta tradizione, risenta dell'arretratezza socio-economica e resti così legato a vecchie pratiche di produzione e trasformazione della materia prima. Certamente l'implementazione del sistema HACCP, il rispetto delle GMP e delle GHP insieme ad una politica di sostegno ed innovazione, renderebbero il settore maggiormente competitivo, aumentando il livello igienico e la qualità dei prodotti. Analoghe considerazioni possiamo fare dal punto di vista

epidemiologico, per quel che riguarda l'elevato tasso di resistenza alle cefalosporine individuato nei nostri campioni. Dai risultati raccolti, possiamo affermare che i prodotti alimentari (nel nostro caso il latte ovino ed i suoi derivati) si configurino come importanti vettori di AMR. Seppur i dati comparativi a nostra disposizione per i prodotti di origine ovina siano scarsi, è ormai ampiamente associato come l'AMR sia un'emergenza sanitaria di portata mondiale. Le strategie per una "One Health Medicine", prevedono infatti la cooperazione ed un'integrazione multidisciplinare volte alla progressiva limitazione nell'utilizzo di antibiotici in tutti i settori. Tale approccio olistico, è volto a limitare l'esposizione dei microrganismi alle sostanze verso cui sviluppano resistenza ma non limita certamente il mantenimento e la diffusione di tali germi all'interno della catena alimentare o nei vari ecosistemi. A tale scopo, soltanto l'applicazione delle corrette prassi igieniche può ridurre la loro diffusione negli ambienti di produzione primaria, così come in quelli di lavorazione e trasformazione dei prodotti. L'impiego della spettrometria di massa nella tipizzazione specie specifica e fenotipica dei germi, si è, infine, rivelato un ottimo strumento diagnostico in grado di ridurre i tempi ed i costi di lavorazione. Anche se in termini di accuratezza la tipizzazione MALDI-TOF risulta certamente inferiore al sequenziamento genetico, la rapida acquisizione dello spettro di un campione (fino ad un massimo di 1 minuto) è un grande vantaggio rispetto alle tecniche di biologia molecolare. Può infatti essere impiegata per uno screening preliminare dei ceppi e quindi rappresentare un grande vantaggio per la microbiologia diagnostica. I successivi sviluppi e perfezionamenti delle tecniche di spettrometria di massa insieme all'indagine proteomica renderanno la metodica ancora più affidabile nel tempo.



## BIBLIOGRAFIA

- Aliasadi, S., & Dastmalchi Saei, H. (2015). Fecal carriage of *Escherichia coli* harboring extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) genes by sheep and broilers in Urmia region, Iran. *Iranian Journal of Veterinary Medicine*, 9(2), 93-101.
- Amagliani, G., Petruzzelli, A., Carloni, E., Tonucci, F., Foglini, M., Micci, E., Ricci, M., Di Lullo, S., Rotundo, L. & Brandi, G. (2016). Presence of *Escherichia coli* O157, *Salmonella* spp., and *Listeria monocytogenes* in raw ovine milk destined for cheese production and evaluation of the equivalence between the analytical methods applied. *Foodborne pathogens and disease*, 13(11), 626-632.
- Anagrafe Nazionale Zootecnica Statistiche. Disponibile all'indirizzo:  
[http://statistiche.izs.it/portal/page?\\_pageid=73,12918&\\_dad=portal&\\_schema=PORTAL&op=view\\_rep&p\\_liv=R&p\\_sigla\\_liv=190&p\\_report=plet\\_rep\\_r2\\_ovi&p\\_anno=2017](http://statistiche.izs.it/portal/page?_pageid=73,12918&_dad=portal&_schema=PORTAL&op=view_rep&p_liv=R&p_sigla_liv=190&p_report=plet_rep_r2_ovi&p_anno=2017)
- Basanisi, M. G., Nobili, G., La Bella, G., Russo, R., Spano, G., Normanno, G., & La Salandra, G. (2016). Molecular characterization of *Staphylococcus aureus* isolated from sheep and goat cheeses in southern Italy. *Small Ruminant Research*, 135, 17-19.
- Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C., & Turck, M. (1966). Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American journal of clinical pathology*, 45(4), 493.

- Bencini, R., & Pulina, G. (1997). The quality of sheep milk: a review. *Australian journal of experimental agriculture*, 37(4), 485-504.
- Bianchi, D. M., Gallina, S., Bellio, A., Chiesa, F., Civera, T., & Decastelli, L. (2014). Enterotoxin gene profiles of *Staphylococcus aureus* isolated from milk and dairy products in Italy. *Letters in applied microbiology*, 58(2), 190-196.
- Bush, K., Jacoby, G. A., & Medeiros, A. A. (1995). A functional classification scheme for beta-lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 39(6), 1211.
- Cantón, R., González-Alba, J. M., & Galán, J. C. (2012). CTX-M enzymes: origin and diffusion. *Frontiers in microbiology*, 3.
- Carmeli, Y., Akova, M., Cornaglia, G., Daikos, G. L., Garau, J., Harbarth, S., Rossolini, G. M., Souli, M. & Giamarellou, H. (2010). Controlling the spread of carbapenemase-producing Gram-negatives: therapeutic approach and infection control. *Clinical microbiology and infection*, 16(2), 102-111.
- Ce.I.R.S.A. (2011). Linee guida per l'analisi del rischio nel campo della microbiologia degli alimenti. Progetto regionale "Analisi del rischio microbiologico legato al consumo di alimenti finalizzato alla riduzione dei costi analitici". *Direzione Sanità della Regione Piemonte* n.780 del 18 Ottobre 2011
- Chaves-López, C., De Angelis, M., Martuscelli, M., Serio, A., Paparella, A., & Suzzi, G. (2006). Characterization of the Enterobacteriaceae isolated from an artisanal Italian ewe's cheese (Pecorino Abruzzese). *Journal of Applied Microbiology*, 101(2), 353-360.

- Chen, T. R., Wei, Q. K., & Chen, Y. J. (2011). *Pseudomonas* spp. and *Hafnia alvei* growth in UHT milk at cold storage. *Food Control*, 22(5), 697-701.
- Christidis, T., Pintar, K. D. M., Butler, A. J., Nesbitt, A., Thomas, M. K., Marshall, B., & Pollari, F. (2016). *Campylobacter* spp. Prevalence and Levels in Raw Milk: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Journal of food protection*, 79(10), 1775-1783.
- CLSI. (2016). Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twenty-first Informational Supplement *M100-S26*, 2016. Wayne, PA, USA CLSI
- Commissione Europea. (2011) Piano d'azione di lotta ai crescenti rischi di resistenza antimicrobica (AMR). Bruxelles. Disponibile all'indirizzo: <http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=COM:2011:0748:FIN:IT:PDF>
- Cooksey, R., Swenson, J., Clark, N., Gay., & Thornsberry, C. (1990). Patterns and mechanisms of beta-lactam resistance among isolates of *Escherichia coli* from hospitals in the United States. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 34(5), 739-745.
- Cosentino, S., & Palmas, F. (1997). Hygienic conditions and microbial contamination in six ewe's-milk-processing plants in Sardinia, Italy. *Journal of Food Protection*, 60(3), 283-287.
- Cravero M., Griglio B., Marro S., Ariello D., Gatto S., Grifoni F., Caputo M., Leonardi C., Vaghi D., Nebbia P., Lomonaco S., Civera T., Maurella C., Ru G., Negro M. (2014). *Escherichia coli* O157 e altri VTEC: quadro epidemiologico e

indicazioni operative per l'autorità competente per la sicurezza alimentare.

*Veterinary and food*, 1, 5-12

- Dabert, P., Pourcher, A. M., Hécart, A. J., Cotinet, P., Ziebal, C., Le Roux, S., Morau, R. & Kempf, I. (2013, June). Persistence of fluoroquinolones and of ciprofloxacin resistant *Enterobacteriaceae* in soil after poultry manure application. In *15th International Conference of the Network of Recycling of Agricultural, Municipal and Industrial Residues in Agriculture (RAMIRAN): " Recycling of organic residues for agriculture: from waste management to ecosystem services"*.
- Dan, S. D., Tabaran, A., Mihaiu, L., & Mihaiu, M. (2015). Antibiotic susceptibility and prevalence of foodborne pathogens in poultry meat in Romania. *The Journal of Infection in Developing Countries*, 9(01), 035-041.
- Davin-Regli, A., Bolla, J. M., James, C. E., Lavigne, J. P., Chevalier, J., Garnotel, E., & Molitor, A. (2008). Membrane permeability and regulation of drug "influx and efflux" in enterobacterial pathogens. *Current drug targets*, 9(9), 750-759.
- de Been, M., Lanza, V. F., de Toro, M., Scharringa, J., Dohmen, W., Du, Y., Hu, J., Lei, Y., Li, N., Tooming-Klunderud, A., Heederik, D. J., Fluit, A. C., Bonten, M. J. N., Willems, R. J. L., de la Cruz, F., van Schaik, W. (2014). Dissemination of cephalosporin resistance genes between *Escherichia coli* strains from farm animals and humans by specific plasmid lineages. *PLoS genetics*, 10(12), e1004776.

- Decimo, M., Morandi, S., Silveti, T., & Brasca, M. (2014). Characterization of gram-negative psychrotrophic bacteria isolated from Italian bulk tank milk. *Journal of food science*, 79(10).
- Decreto del Presidente della Repubblica 54/97: Norme sanitarie per la produzione -commercializzazione di latte e prodotti derivati.
- Devine, C. E., Graafhuis, A. E., Muir, P. D., & Chrystall, B. B. (1993). The effect of growth rate and ultimate pH on meat quality of lambs. *Meat science*, 35(1), 63-77.
- Direttiva 2003/99/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 17 novembre 2003, sulle misure di sorveglianza delle zoonosi e degli agenti zoonotici, recante modifica della decisione 90/424/CEE del Consiglio e che abroga la direttiva 92/117/CEE del Consiglio
- ECDC. (2016). Antimicrobial resistance (AMR) reporting protocol 2016 European Antimicrobial Resistance Surveillance Network (EARS-Net) surveillance data for 2015. Disponibile all'indirizzo: [https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/healthtopics/antimicrobialresistanceandconsumption/antimicrobial\\_resistance/publicationsdocuments/Documents/2016-EARS-Net-reporting-protocol.pdf](https://ecdc.europa.eu/sites/portal/files/media/en/healthtopics/antimicrobialresistanceandconsumption/antimicrobial_resistance/publicationsdocuments/Documents/2016-EARS-Net-reporting-protocol.pdf)
- ECDC/EFSA/EMA (2017). Second joint report on the integrated analysis of the consumption of antimicrobial agents and occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from humans and food-producing animals. *EFSA Journal* 2017;15(7):4872 [135 pp.].

- EFSA (2011). Scientific Opinion on the public health risks of bacterial strains producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases and/or AmpC  $\beta$ -lactamases in food and food-producing animals. *EFSA Journal* 2011;9(8):2322 [95 pp.].
- EFSA. (2016) EU summary report on zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks 2015. *EFSA Journal* 2016;14(12):4634 [231 pp.]
- Egli, A., Tschudin-Sutter, S., Oberle, M., Goldenberger, D., Frei, R., & Widmer, A. F. (2015). Matrix-assisted laser desorption/ionization time of flight mass-spectrometry (MALDI-TOF MS) based typing of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing *E. coli*—a novel tool for real-time outbreak investigation. *PloS one*, 10(4), e0120624.
- FCD. (2009) Federacion de Commerce et la Distribution.. Critères microbiologiques applicables à partir de 2010 aux marques de distributeurs, marques premiers prix et matières premières dans leur conditionnement initial industriel. Disponible all' indirizzo: <http://www.qualtech-groupe.com/wp-content/uploads/2012/10/FCD-criteres-process-31-10-09.pdf>
- Fox, P. F., Guinee, T. P., Cogan, T. M., & McSweeney, P. L. (2017). Pathogens in Cheese and Foodborne Illnesses. In *Fundamentals of Cheese Science* (pp. 681-713). Springer US.
- Gaya, P., Medina, M., & Nuntez, M. (1987). *Enterobacteriaceae*, coliforms, faecal coliforms and salmonellas in raw ewes' milk. *Journal of Applied Microbiology*, 62(4), 321-326.

- Geser, N., Stephan, R., & Hächler, H. (2012). Occurrence and characteristics of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) producing Enterobacteriaceae in food producing animals, minced meat and raw milk. *BMC veterinary research*, 8(1), 21.
- Gur, D., Gulay, Z., Akan, O. A., Aktas, Z., Kayakan, C. B., Kakici, O., Erac, B., Gultekin, M., Unal, N., Uysal, S. (2008). Resistance to newer beta-lactams and related EBSL types in gram-negative nosocomial isolates in Turkish hospitals: results of the multicenter HITIT study. *Mikrobiyoojil Bulteni* 42: 537-544
- Haenni, M., Saras, E., Ponsin, C., Dahmen, S., Petitjean, M., Hocquet, D., & Madec, J. Y. (2016). High prevalence of international ESBL CTX-M-15-producing *Enterobacter cloacae* ST114 clone in animals. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 71(6), 1497-1500.
- Hancock, D. D., Besser, T. E., Rice, D. H., Herriott, D. E., & Tarr, P. I. (1997). A longitudinal study of Escherichia coli O157 in fourteen cattle herds. *Epidemiology & Infection*, 118(2), 193-195.
- Hanlon, K. E., Miller, M. F., Guillen, L. M., Echeverry, A., Dormedy, E., Cemo, B., Branham, L. A., Sanders, S. & Brashears, M. M. (2018). Presence of Salmonella and Escherichia coli O157 on the hide, and presence of Salmonella, Escherichia coli O157 and Campylobacter in feces from small-ruminant (goat and lamb) samples collected in the United States, Bahamas and Mexico. *Meat Science*. 135, 1-5.

- Harada, S, Hishii, Y. & Yamaguchi K. (2008). Extended spectrum beta-lactamases: implication for the clinical laboratory and therapy. *Korean Journal of Laboratory Medicine*, 28: 401-412
- Hrabák, J., Chudáčková, E., & Walková, R. (2013). Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight (MALDI-TOF) mass spectrometry for detection of antibiotic resistance mechanisms: from research to routine diagnosis. *Clinical microbiology reviews*, 26(1), 103-114.
- Ibba, M., Cossu, F., Spanu, V., Viridis, S., Spanu, C., Scarano, C., & De Santis, E. P. (2013). *Listeria monocytogenes* contamination in dairy plants: evaluation of *Listeria monocytogenes* environmental contamination in two cheese-making plants using sheeps milk. *Italian Journal of Food Safety*, 2(2), 31.
- ISAT, 2011. Censimento dell'agricoltura: dati provvisori. Disponibile all'indirizzo: <https://www.istat.it/it/archivio/32618>
- ISMEA. Settore ovi-caprino. Schede di settore. Disponibile all'indirizzo: <http://www.ismeamercati.it>
- ISO 21528-2:2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal methods for the detection and enumeration of *Enterobacteriaceae* -- Part 2: Colony-count method. *International Organization for Standardization*, Ginevra.
- Jacob, J. T., Klein, G. E., Laxminarayan, R., Beldavs, Z., Lynfield, R., Kallen, A. J., Ricks, P., Edwards, J., Srinivasan, A., Fridkin, S., Rasheed, K. J., Lonsway, D., Bulens, S., Herrera, R., McDonald, C. L., Patel, J., Limbago, B., Bell, M. &



- Cardo, D. (2013). Vital signs: carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. *Morbidity and mortality weekly report*, 62(9), 165-169.
- Jayol, A., Saly, M., Nordmann, P., Ménard, A., Poirel, L., & Dubois, V. (2017). *Hafnia*, an enterobacterial genus naturally resistant to colistin revealed by three susceptibility testing methods. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 72, 2507–2511.
  - Kallow, W., Erhard, M., Shah, H. N., Raptakis, E., & Welker, M. (2010). MALDI-TOF MS for microbial identification: years of experimental development to an established protocol. *Mass spectrometry for microbial proteomics*, 255-276.
  - Kebede, A., Kemal, J., Alemayehu, H., & Habte Mariam, S. (2016). Isolation, Identification, and Antibiotic Susceptibility Testing of Salmonella from Slaughtered Bovines and Ovines in Addis Ababa Abattoir Enterprise, Ethiopia: A Cross-Sectional Study. *International journal of bacteriology*, 2016.
  - Kostrzewa, M., Sparbier, K., Maier, T., & Schubert, S. (2013). MALDI-TOF MS: an upcoming tool for rapid detection of antibiotic resistance in microorganisms. *PROTEOMICS-Clinical Applications*, 7(11-12), 767-778.
  - La Ragione, R. M., Best, A., Woodward, M. J., & Wales, A. D. (2009). *Escherichia coli* O157: H7 colonization in small domestic ruminants. *FEMS microbiology reviews*, 33(2), 394-410.
  - Lerma, L. L., Benomar, N., Knapp, C. W., Galeote, D. C., Gálvez, A., & Abriouel, H. (2014). Diversity, distribution and quantification of antibiotic

- resistance genes in goat and lamb slaughterhouse surfaces and meat products. *PloS one*, 9(12), e114252.
- Levkov, V., Srbinovska, S., & Gjorgovska, N. (2014). Microbiological and chemical characteristics of traditional ewe's milk cheese from Mariovo region. *Mljekarstvo/Dairy*, 64(3).
  - Li, B., Guo, T., Qu, F., Li, B., Wang, H., Sun, Z., Li, X., Gao, Z., Bao, C., Zhang, C., Li, X. & Mao, Y. (2014). Matrix-assisted laser desorption ionization: time of flight mass spectrometry-identified models for detection of ESBL-producing bacterial strains. *Medical science monitor basic research*, 20, 176.
  - Litrenta, J., & Oetgen, M. (2017). *Hafnia alvei*: A new pathogen in open fractures. *Trauma Case Reports*, 8, 41-45.
  - Liu, Y. Y., Wang, Y., Walsh, T. R., Yi, L. X., Zhang, R., Spencer, J., Doi, Y., Tian, G., Dong, B., Huang, X., Yu, L. F., Gu, D., Ren, H., Chen, X., Lv, L., He, D., Zhou, H., Liang, Z., Liu, J. H. & Shen J. (2016). Emergence of plasmid-mediated colistin resistance mechanism MCR-1 in animals and human beings in China: a microbiological and molecular biological study. *The Lancet infectious diseases*, 16(2), 161-168.
  - Luo, J., Yao, X., Lv, L., Doi, Y., Huang, X., Huang, S., & Liu, J. H. (2017). Emergence of mcr-1 in *Raoultella ornithinolytica* and *Escherichia coli* Isolates from Retail Vegetables in China. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 61(10), e01139-17.

- Luzzaro, F., Gesu, G., Pagani, L., & Rossolini, G. M. (2007). Diagnostica delle  $\beta$ -lattamasi a spettro esteso (ESBL) nelle *Enterobacteriaceae*: problemi e raccomandazioni nella realtà epidemiologica italiana. *Microbiologia Medica*, 22(4).
- Mancuso, I., Cardamone, C., Fiorenza, G., Macaluso, G., Arcuri, L., Miraglia, V., & Scatassa, M. L. (2014). Sensory and microbiological evaluation of traditional ovine ricotta cheese in modified atmosphere packaging. *Italian journal of food safety*, 3(2).
- Milnes, A. S., Stewart, I., Clifton-Hadley, F. A., Davies, R. H., Newell, D. G., Sayers, A. R., Cheasty, T., Cassar C., Ridley, A., Cook, A. J., Evans, S. J., Teale, C. J., Smith, R. P., McNally, A., Toszeghy, M., Futter, R., Kay, A. & Paiba, G. A. (2008). Intestinal carriage of verocytotoxigenic *Escherichia coli* O157, *Salmonella*, thermophilic *Campylobacter* and *Yersinia enterocolitica*, in cattle, sheep and pigs at slaughter in Great Britain during 2003. *Epidemiology & Infection*, 136(6), 739-751.
- Miragliotta, G., Di Taranto, A., De Nittis, R., Antonetti, R., Del Prete, R., & Mosca, A. (2009). ESBL-producing *E. coli* and *K. pneumoniae*: prevalence and antimicrobial susceptibility. *Microbiologia Medica*, 24(3).
- Mormile, A., Scarano, L., Ariano, A., Murru, N., Vollano, L., & Anastasio, A. (2013). Microbial characteristics of Conciato Romano: an artisanal cheese made from raw sheep's milk. *Italian Journal of Food Safety*, 2(3), 46.

- Mouloudi, E., Protonotariou, E., Zagorianou, A., Iosifidis, E., Karapanagiotou, A., Giasnetsova, T., Tsioka, A., Roilides, E., Sofianou, D. & Gritsi-Gerogianni, N. (2010). Bloodstream infections caused by metallo- $\beta$ -lactamase/*Klebsiella pneumoniae* carbapenemase-producing *K. pneumoniae* among intensive care unit patients in Greece: risk factors for infection and impact of type of resistance on outcomes. *Infection Control & Hospital Epidemiology*, 31(12), 1250-1256.
- MPAAF, 2014. Ministero delle Politiche Agricole Alimentari e Forestali del 5 giugno 2014. Quattordicesima revisione dell'elenco nazionale dei prodotti agroalimentari tradizionali. *GU n. 141* n. 48 del 20/06/2014, S.O.
- Murru, N., Barile, M., Tozzi, M., Ceres, C., Aprea, G., & Cortesi, M. L. (2009). Evaluation of *listeria monocytogenes* in raw buffalo milk during primary production. *Italian Journal of Food Safety*, 1(4), 49-52.
- Nuvoloni, R., Pedonese, F., Di Nardo, N., & Gerardo, B. (2003). Presenza di *Escherichia Coli* O157: H7 in latte ovino prodotto in Toscana. *Annali della Facoltà di Medicina veterinaria*, 56, 89-96.
- O'Neill, J., (2016). The review on antimicrobial resistance. Disponibile: [https://amrreview.org/sites/default/files/160518\\_Final%20paper\\_with%20cover.pdf](https://amrreview.org/sites/default/files/160518_Final%20paper_with%20cover.pdf)
- Odenthal, S., Akineden, Ö., & Usleber, E. (2016). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase producing Enterobacteriaceae in bulk tank milk from German dairy farms. *International journal of food microbiology*, 238, 72-78.

- Österberg, J., Wingstrand, A., Jensen, A. N., Kerouanton, A., Cibin, V., Barco, L., Denise, M., Aabo, S. & Bengtsson, B. (2016). Antibiotic resistance in *Escherichia coli* from pigs in organic and conventional farming in four European countries. *PloS one*, 11(6), e0157049.
- Otero, V., Sánchez, S., Herrera-León, S., Rodríguez-Calleja, J. M., Otero, A., García-López, M. L., & Santos, J. A. (2017). Detection and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) in bulk tank ewes' milk and sheep farm environment. *Small Ruminant Research*. 154, 110-114
- Padilla, D., Acosta, F., Ramos-Vivas, J., Grasso, V., Bravo, J., El Aamri, F., & Real, F. (2015). The pathogen *Hafnia alvei* in veterinary medicine: a review. *Journal of Applied Animal Research*, 43(2), 231-235.
- Panelli, S., Brambati, E., Bonacina, C., & Feligini, M. (2014). Updating on the fungal composition in Sardinian sheep's milk by culture-independent methods. *Journal of Dairy Research*, 81(2), 233-237.
- Queenan A. M. & Bush K. Lack of evidence so far for carbapenemase-producing *Enterobacteriaceae* in food-producing animals in Switzerland. *Schweizer Archiv für Tierheilkunde*, Volume 155, Number 7/July 2013,417-419
- Rapporti ISTISAN 07/53 Disponibile al: <http://www.iss.it/binary/publ/cont/07-53.1203428775.pdf>. Istituto Superiore di Sanità AR-ISS: sistema di sorveglianza dell'antibiotico-resistenza basato su laboratori sentinella (2003-2005). AR-ISS 2007, v, 65 p.

- Regione Siciliana. 2003. La Filiera Lattiero–Casearia In Sicilia. OSEAAS: Osservatorio sull’Economia del Sistema Agro Alimentare della Sicilia, rapporto 2003
- Reglier-Poupet, H., Naas, T., Carrer, A., Cady, A., Adam, J. M., Fortineau, N., Poyart, C. & Nordmann, P. (2008). Performance of chromID ESBL, a chromogenic medium for detection of Enterobacteriaceae producing extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Journal of medical microbiology*, 57(3), 310-315.
- Regolamento (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
- Regolamento (CE) n. 1662/2006 della Commissione, recante modifica del Regolamento (CE) n. 853/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale. *G.U.U.E. 18 novembre 2006, n. L 32*
- Regolamento (CE) n. 2073/2005, della Commissione del 15 novembre 2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari.
- Regolamento (CE) N. 852/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004, sull'igiene dei prodotti alimentari.
- Regolamento (CE) N. 853/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004, che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale.

- Ridell, J., & Korkeala, H. (1997). Minimum growth temperatures of *Hafnia alvei* and other *Enterobacteriaceae* isolated from refrigerated meat determined with a temperature gradient incubator. *International journal of food microbiology*, 35(3), 287-292.
- Ristagno, D., Bunka, F., & McSweeney, P. L. H. (2013). Effect of *Hafnia alvei* on Cheddar cheese ripening. Evaluation of microbial adjuncts and their effect on the ripening of, cheddar cheese. *PhD Thesis, University College Cork*.
- Rubini, S., Cardeti, G., Amiti, S., Manna, G., Onorati, R., Caprioli, A., & Morabito, S. (1999). Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157 in sheep milk. *The Veterinary Record*, 144(2), 56.
- Sandri, G., Montanari, G. B., Chesini, M., & Mosconi M.C. (2003) Indagini su di un episodio di Tossinfezione alimentare da *Salmonella enteritidis* verificatosi in una azienda agrituristica del Veronese. *Azienda Sanitaria Locale ULSS n. 22 di Bussolengo (VR) Dipartimento di Prevenzione Servizio Igiene degli Alimenti e della Nutrizione. ARPAV-DAP di Verona Unità operativa di biologia*
- Schiliro, D. A. (2006). Analisi tecnico-economica sugli allevamenti ovi-caprini in Sicilia. *Ricerche nell'ambito delle attività istituzionali dell'Osservatorio sul Sistema dell'Economia Agroalimentare della Sicilia (OSEAAS). Catania*.
- Schoder, D., Melzner, D., Schmalwieser, A., Zangana, A., Winter, P., & Wagner, M. (2011). Important vectors for *Listeria monocytogenes* transmission at farm dairies manufacturing fresh sheep and goat cheese from raw milk. *Journal of Food Protection*, 74(6), 919-924.

- Scintu, M. F., Pirisi, A., Piredda, G., Deriu, A., Riu, G. & Pes, M. (2001). Caratteristiche microbiologiche e fisico-chimiche della ricotta ovina fresca prodotta in Sardegna. *Atti del 36° Simposio Internazionale di Zootecnia, "Prodotti di origine animale: qualità e valorizzazione del territorio"*, Portonovo (Ancona).
- Seng, P., Boushab, B. M., Romain, F., Gouriet, F., Bruder, N., Martin, C., Pagsteianelli, F., Bernit, E., Le Treut Y. P., Thomas, P., Papazian, L., Raoult, D. & Stein, A. (2016). Emerging role of *Raoultella ornithinolytica* in human infections: a series of cases and review of the literature. *International Journal of Infectious Diseases*, 45, 65-71.
- Spanu, C., Scarano, C., Spanu, V., Penna, C., Viridis, S., & De Santis, E. P. L. (2012). *Listeria monocytogenes* growth potential in Ricotta salata cheese. *International dairy journal*, 24(2), 120-122.
- Spanu, C., Scarano, C., Ibba, M., Spanu, V., & De Santis, E. P. L. (2015). Occurrence and traceability of *Listeria monocytogenes* strains isolated from sheep's milk cheese-making plants environment. *Food Control*, 47, 318-325.
- Spärbier, K., Schubert, S., Weller, U., Boogen, C., & Kostrzewa, M. (2012). Matrix-assisted laser desorption ionization–time of flight mass spectrometry-based functional assay for rapid detection of resistance against  $\beta$ -lactam antibiotics. *Journal of clinical microbiology*, 50(3), 927-937.
- Stanley, K., & Jones, K. (2003). Cattle and sheep farms as reservoirs of *Campylobacter*. *Journal of applied microbiology*, 94(s1), 104-113.



- Sudarwanto, M., Akineden, Ö., Odenthal, S., Gross, M., & Usleber, E. (2015). Extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)–producing *Klebsiella pneumoniae* in bulk tank milk from dairy farms in Indonesia. *Foodborne pathogens and disease*, 12(7), 585-590.
- Thomson, K. S., Sanders, C. C., & Washington, J. A. (1993). Ceftazidime resistance in *Hafnia alvei*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 37(6), 1375-1376.
- Todaro, M., Bonanno, A., & Scatassa, M. L. (2014). The quality of Valle del Belice sheep's milk and cheese produced in the hot summer season in Sicily. *Dairy Science & Technology*, 94(3), 225-239.
- Tuon, F. F., Kruger, M., Terreri, M., Pentead-Filho, S. R., & Gortz, L. (2011). *Klebsiella* ESBL bacteremia-mortality and risk factors. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 15(6), 594-598.
- Veenemans, J., Welker, M., van Belkum, A., Saccomani, M. C., Girard, V., Pettersson, A., Verhulst, C., Kluytmans-Vandenbergh M., & Kluytmans, J. (2016). Comparison of MALDI-TOF MS and AFLP for strain typing of ESBL-producing *Escherichia coli*. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 35(5), 829-838.
- Venusti, M., Sardo, D., Denanni, G., Brancazzu, S., Serra, S., Sicilia, M., De Santis, E., Scarano, C., Spanu, C., Pala, C., Spanu, V., Cossu, F., Casti, D., Lamon, S., Marrocu, E., Mocci, A. M., Marras, M., Tedde, F., Cuccu, M., & Porcu, A. (2016). Valutazione della shelf-life di ricotta ovina fresca confezionata

- in atmosfera protettiva o modificata. *Agenzia Laore Sardegna, Dipartimento di Medicina Veterinaria Università degli Studi di Sassari, Agenzia Agris Sardegna.*
- Verraes, C., Vlaemyneck, G., Van Weyenberg, S., De Zutter, L., Daube, G., Sindic, M., Uyttendaele, M. & Herman, L. (2015). A review of the microbiological hazards of dairy products made from raw milk. *International Dairy Journal*, 50, 32-44.
  - Vitale, M., Scatassa, M. L., Cardamone, C., Oliveri, G., Piraino, C., Alduina, R., & Napoli, C. (2015). Staphylococcal food poisoning case and molecular analysis of toxin genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from food in Sicily, Italy. *Foodborne pathogens and disease*, 12(1), 21-23.
  - Vrabec, M., Lovayová, V., Dudriková, K., Gallo, J., & Dudriková, E. (2015). Antibiotic resistance and prevalence of *Enterococcus* spp. and *Escherichia coli* isolated from bryndza cheese. *Italian Journal of Animal Science*, 14(4), 3968.
  - Xu, C., Lin, X., Ren, H., Zhang, Y., Wang, S., & Peng, X. (2006). Analysis of outer membrane proteome of *Escherichia coli* related to resistance to ampicillin and tetracycline. *Proteomics*, 6(2), 462-473.
  - Zweifel, C., Zychowska, M. A., & Stephan, R. (2004). Prevalence and characteristics of Shiga toxin-producing *Escherichia coli*, *Salmonella* spp. and *Campylobacter* spp. isolated from slaughtered sheep in Switzerland. *International journal of food microbiology*, 92(1), 45-53.