



Caratterizzazione molecolare di ceppi di *Pseudomonas fluorescens* isolati in Umbria da prodotti lattiero caseari - Molecular characterization of *Pseudomonas fluorescens* strains isolated from dairy products in Umbria (Italy)

Cibotti S., Zicavo A., Dionisi A. M., Farneti S., Carfora V., Valiani A., Scuota S.

Abstract In the year 2010, there was an alert due to the presence of abnormal colorations in dairy products, caused by the presence of a gram-negative bacterium, identified as *Pseudomonas fluorescens*. In this paper we report the results of analysis on samples tested, with particular regard to the molecular analysis performed on strains isolated in order to assess their genetic correlation

Riassunto Nell'estate 2010, si è verificata un'allerta in seguito alla presenza di colorazioni anomale in prodotti lattiero-caseari causate dalla presenza di un batterio gram-negativo, identificato come *Pseudomonas fluorescens*. In questo lavoro si riportano i risultati dell'attività di laboratorio sui campioni esaminati presso la sede di Perugia dell'IZS Umbria e Marche e l'analisi molecolare eseguita sui ceppi isolati al fine di valutare la loro correlazione genetica.

Introduzione

Pseudomonas fluorescens è un batterio bastoncellare Gram negativo, strettamente aerobio, catalasi positivo, largamente diffuso in natura, in particolare nel suolo, nelle acque superficiali e nella vegetazione (Hindson e Winter, 2002). La specie appartiene anche alla flora del cavo orofaringeo umano e viene isolata con una certa frequenza in ambiente ospedaliero, particolarmente in soggetti debilitati e da infezioni post-trasfusionali e respiratorie (Gershman et al., 2008; Po-Ren et al., 1998). Il germe possiede ottime capacità di adattamento a varie situazioni ambientali e di resistenza ai comuni disinfettanti, caratteristica che gli consente di sopravvivere e moltiplicarsi anche negli ambienti di lavorazione degli alimenti (Giaccone, 2010).

Il microrganismo può essere veicolato, oltre che dall'acqua, da tutti gli alimenti con elevati valori di attività dell'acqua (Aw), come il latte, i vegetali e la carne. Molte specie di *Pseudomonas* sono in grado di produrre dei pigmenti idrosolubili che possono provocare alterazioni cromatiche nei prodotti.

Fra questi i più noti sono la fluoresceina (giallo dorato), la piorubina (rossastro), la piomelanina (nero), la pioverdina (verde) e la piocianina (blu-viola) (Giaccone, 2010). A questi si associa una rara biovariante di *Pseudomonas fluorescens* capace di produrre un pigmento intensamente blu.

Questa ultima sembra essere presente maggiormente in mozzarelle ad acidificazione mista o lattica piuttosto che in quelle ad acidificazione chimica (Comi et al., 2003).

Nel mese di maggio 2010 è stato segnalato il primo caso italiano di "mozzarella blu", prodotta in Germania e acquistata presso la grande distribuzione; a questo primo caso sono seguite numerose altre segnalazioni da parte di consumatori per la presenza di colorazioni anomale sulla superficie dei prodotti acquistati. All'inizio le mozzarelle con colorazione anomala provenivano da un unico stabilimento di produzione tedesco, pur essendo vendute con diversi marchi commerciali. Successivamente le segnalazioni hanno riguardato anche prodotti lattiero caseari di produzione nazionale e locale, evento che ha indotto le stesse Autorità Sanitarie ad effettuare campionamenti presso i caseifici.

Le prime analisi effettuate presso gli Istituti Zooprofilattico Sperimentali hanno consentito di individuare *Pseudomonas fluorescens* come responsabile della colorazione anomala.

In questo lavoro si riportano i risultati dell'attività di laboratorio sui campioni esaminati presso la sede di Perugia dell'IZS Umbria e Marche e l'analisi molecolare eseguita sui ceppi isolati al fine di valutare la loro correlazione genetica.

Materiali e metodi

Sono stati esaminati 174 campioni costituiti da reperti di alimenti conferiti da privati cittadini alle Autorità, da campioni ufficiali e da campioni analizzati in regime di autocontrollo presso alcuni stabilimenti della Regione.

Le matrici analizzate erano rappresentate da formaggi a pasta filata (66%), da altri formaggi freschi (6%) e da diverse tipologie di campioni prelevati durante i sopralluoghi presso i caseifici: acqua in entrata e acqua delle vasche di raffreddamento (16%), latte e cagliate (8%) e tamponi ambientali (4%). Su tutte le matrici alimentari è stato eseguito l'esame ispettivo, al fine di valutare la presenza di eventuali colorazioni anomale. I campioni di alimenti apparentemente normali, dopo il prelievo dell'aliquota di prova per gli esami microbiologici, sono stati conservati fino alla data di scadenza nelle condizioni indicate dal produttore (temperatura di refrigerazione).

E' stata inoltre eseguita la numerazione di *Pseudomonas* spp. secondo la Norma ISO/TS 11059:2009 IDF/RM 225:2009. Le colonie sospette sono state identificate biochimicamente mediante il sistema API 20NE (Biomérieux). L'elettroforesi in campo Pulsato (PFGE) è stata eseguita su ceppi di *Pseudomonas fluorescens* isolati dai vari campioni nel trimestre giugno-agosto, secondo il protocollo PulseNet per gli enterobatteri (Ribot et al.,), con l'apporto di piccole modifiche (es. aggiunta di sodio dodecyl solfato nella preparazione dei blocchetti di agar) e digestione con l'enzima SpeI (20U, Promega). La corsa elettroforetica è stata eseguita utilizzando il sistema CHEF-DR III (Bio-Rad, Hercules, CA) con impulsi da 10" iniziali a 30" finali, per 22 h a 6V/cm, a 14°C in TBE 0.5X (Gershman et al., 2008).

Dopo colorazione con etidio bromuro, il gel è stato fotografato e l'immagine acquisita con il sistema UVIsave (UVItec Limited, Cambridge, UK). Il ceppo di *Salmonella* Braenderup H9812, digerito con l'enzima XbaI, è stato utilizzato come marker di peso molecolare.

I profili di restrizione ottenuti mediante PFGE sono stati analizzati utilizzando il software Bionumerics (v.6.5, Applied Maths, Saint-Martins-Latem, Belgio) ed è stata eseguita una "cluster analysis" per raggruppare i ceppi analizzati in base all' omologia genetica. I ceppi con percentuale di omologia >90% sono stati considerati strettamente correlati.

Risultati

L'esame ispettivo ha consentito di evidenziare un'alta percentuale di campioni con colorazione blu sui reperti (44.23%), mentre sui campioni ufficiali e su quelli prelevati nei vari caseifici il riscontro di prodotti con colorazioni anomale si è verificato solo in due campioni di mozzarella (1.62%). In nessuno dei campioni risultati conformi all'esame ispettivo e conservati a temperatura di refrigerazione fino alla scadenza si è potuta osservare la comparsa di colorazione blu.

Dalla numerazione di *Pseudomonas* spp. è emerso che la carica di *Pseudomonas fluorescens* non è in alcun modo correlata con la presenza di colorazione blu del prodotto, in quanto tale colorazione è stata osservata indifferentemente in campioni con un contenuto di *Pseudomonas fluorescens* variabile da 4 log a oltre 9 log. Analogamente si sono riscontrate alte concentrazioni di *Pseudomonas fluorescens* in campioni con caratteri organolettici perfettamente normali.

Sono risultati positivi per *Pseudomonas fluorescens*, n. 83 campioni secondo la ripartizione indicata nella seguente tabella:

Tabella 1. Campioni positivi per <i>Pseudomonas fluorescens</i>			
Matrice	Esaminati	Positivi	%
Formaggi a pasta filata	115	71	61.74
Formaggi freschi	10	5	50.00
Acqua	27	3	11.11
Latte/cagliate	15	3	20.00
Tamponi	7	1	14.29
Totale	174	83	-

L'analisi molecolare mediante PFGE (Figura 1) ha messo in evidenza la circolazione di pulsotipi diversi all'interno di uno stesso stabilimento e anche della stessa matrice alimentare. I ceppi con la più elevata correlazione genetica sono stati isolati da campioni provenienti dalla grande distribuzione (in massima parte reperti), venduti con diversi marchi commerciali, ma tutti riconducibili allo stesso stabilimento tedesco di origine (Stabilimento A).

Confrontando i profili elettroforetici ottenuti dai ceppi isolati negli altri stabilimenti, tutti ubicati nel territorio regionale, con quelli riferiti allo stabilimento A, si può notare una correlazione molto stretta solo con un ceppo isolato da un campione di mozzarella proveniente dallo stabilimento B (IT7). Nello stabilimento B, inoltre, il ceppo (IT2) isolato da un reperto appare strettamente correlato con un ceppo isolato da un campione ufficiale di mozzarella (IT11). Questi ultimi due pulsotipi sono correlati solo all'80% con il pulsotipo IT7, di cui si è già detto.

Nello stabilimento C è stata riscontrata la presenza di pulsotipi strettamente correlati in mozzarelle prelevate nello stesso stabilimento a distanza di 2 settimane (IT13 e IT15), oltre ad altri 6 pulsotipi con una omologia genetica inferiore all'80%.

Analoga situazione si riscontra nello stabilimento E, dove sono stati evidenziati 3 pulsotipi identici (IT27 IT28 e IT20), i primi due isolati da uno stesso reperto e il terzo isolato da un campione eseguito in autocontrollo a distanza di circa 20 giorni; nel campione ufficiale, prelevato lo stesso giorno del reperto, sono stati evidenziati due altri pulsotipi non correlati tra loro (IT30 e IT29) e con una omologia genetica inferiore al 75% rispetto ai primi tre.

Nello stabilimento F si osserva correlazione all'80% tra due pulsotipi isolati da stracchino (IT25 e IT22). Due ulteriori pulsotipi, isolati sempre da stracchino in tempi diversi e tra loro correlati all'80% (IT36 e IT34), risultano notevolmente diversi dai pulsotipi sopra descritti. Da un campione di mozzarella prelevato lo stesso giorno, si evidenziano due diversi pulsotipi non correlati tra loro (IT23 e IT24), né con quelli isolati da stracchino. Infine un pulsotipo isolato dall'acqua in entrata (IT21) non appare correlato con nessuno degli altri pulsotipi sopra descritti, isolati da matrici alimentari.

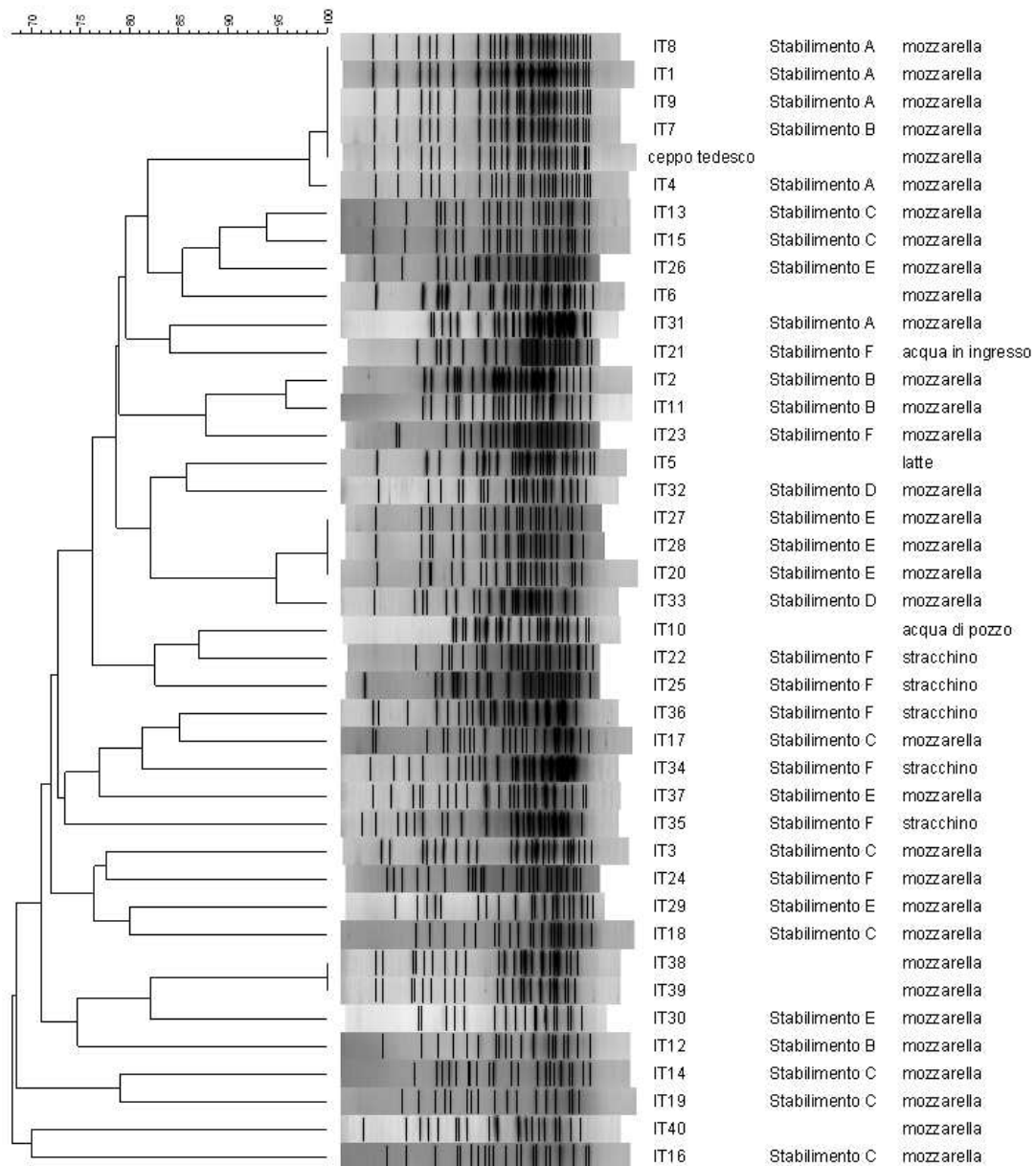


Figura 1 - PFGE- SpeI *P. fluorescens*

Conclusioni

Le numerose analisi effettuate su prodotti lattiero caseari in seguito all'allerta, hanno permesso di evidenziare in circa la metà dei campioni esaminati la presenza di ceppi riferibili a *Pseudomonas fluorescens*, sia negli alimenti che manifestavano alterazioni di colore, sia in alimenti con caratteristiche organolettiche normali. La concentrazione di *Pseudomonas fluorescens* non è sembrata essere legata alla produzione del pigmento blu, almeno nel range compreso tra 4 log e 9 log.

Dall'analisi dei pulsotipi descritti nel presente lavoro emerge solo in un caso una stretta correlazione con il pulsotipo isolato da prodotti tedeschi. Nel complesso, a parte altri 2 casi, l'omologia genetica si attesta intorno all' 80%, dato giustificato dall'alta variabilità genetica caratteristica di questo genere. Questo dato è confermato dalla presenza simultanea di pulsotipi differenti sia nello stesso campione sia all'interno di ogni stabilimento.

Alla luce dei risultati ottenuti si può concludere che la colorazione anomala osservata nei prodotti lattiero caseari è causata dalla presenza di specifici cloni di *Pseudomonas fluorescens* nei prodotti, indipendentemente dalla carica di *Pseudomonas* spp. presente.

L'alta positività di colorazioni anomale riscontrata nei campioni aperti, conferiti da privati cittadini alle Autorità (reperti), rispetto a quella osservata nei campioni prelevati presso stabilimenti o punti vendita, induce tuttavia a pensare che le condizioni di conservazione del prodotto dopo la vendita possano avere un ruolo importante nella alterazione delle caratteristiche organolettiche del prodotto, soprattutto nella stagione calda.

Bibliografia

Hindson J.C., Winter A. C. (2002). Manual of sheep diseases. Blackwell Publishing.

Gershman M. D., Kennedy D.J., Noble-Wang J., Kim C., Gullion J., Kacica M., Jensen B., Pascoe N., Saiman L., McHale J., Wilkins M., Schoonmaker-Bopp D., Clayton J., Arduino M., Srinivasan A. (2008). Multistate outbreak of *Pseudomonas fluorescens* bloodstream infection after exposure to contaminated heparinized saline flush prepared by a compounding pharmacy. *Clinical Infectious Diseases*, 47(11), pag. 1372-1379.

Po-Ren Hsueh, Lee-Jene Teng, Hui-Ju Pan, Yu-Chi Chen, Chun-Chuan Sun, Shen-Wu Ho, and Kwen-Tay Luh. (1998). Outbreak of *Pseudomonas fluorescens* Bacteremia among Oncology Patients. *Journal of Clinical Microbiology*. 36(10), pag. 2914-2917.

Giaccone V. (2010). *Pseudomonas* e prodotti lattiero caseari. *Medicina Veterinaria Preventiva*, suppl. al n. 32, settembre.

Comi G., Iacumin L., Bersani C., Dragoni I., Cantoni C. (2003). Microbiologia - *Pseudomonas* fluorescenti negli alimenti. *Industrie alimentari*, 42, pag. 609-612.

Ribot E. M., Fair M. A., Gautom R., Cameron D. N., Hunter S. B., Swaminathan B., Barrett T. J. (2006). Standardization of pulsed-field gel electrophoresis protocols for the subtyping of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Shigella* for PulseNet. *Foodborne pathogens and disease*, 3(1), pag 59-67.



Caratterizzazione molecolare di ceppi di *Pseudomonas fluorescens* isolati in Umbria da prodotti lattiero caseari. byCibotti S. et al., 2011 is licensed under a Creative Commons Attribuzione 2.5 Italia License. Permissions beyond the scope of this license may be available at <http://indice.spvet.it/adv.html>.

	Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Via G. Salvemini 1. 06126, Perugia - Italy
Centralino Istituto	Tel. +39 075 3431 - Fax. +39 075 35047
Biblioteca	Tel. / Fax +39 075 343217 e-mail: bie@izsum.it
Rivista SPVet.it ISSN 1592-1581	Tel. +39 075 343207 e-mail: editoria@izsum.it ; redazione-spvet@izsum.it http://spvet.it ; http://indice.spvet.it
U. R. P.	Tel. +39 075 343223; Fax: +39 075 343289 e-mail: URP@izsum.it