

STUDIO PRELIMINARE SULLA PREVALENZA DI COXIELLA BURNETII IN FORMAGGI PRODOTTI IN ITALIA MERIDIONALE

PRELIMINARY STUDY ON THE PREVALENCE OF COXIELLA BURNETII IN CHEESES PRODUCED IN SOUTHERN ITALY

Proroga Y.T.R.¹, Casalnuovo F.², Mancusi A.¹, Gagliardi R.¹, Rippa P.², Albano F.¹, Damiani V.¹, Squillaro D.¹, Guarino A.³, Capuano F.¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno Dipartimento di Ispezione degli Alimenti, Portici.

²Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno-Sezione di Catanzaro

³Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno-Dipartimento Direzione, Portici

SUMMARY

In this study the presence of *Coxiella burnetii* in cow, buffalo and small ruminants (sheep and goat) cheeses produced in southern Italy has been evaluated with the aim to analyze the risk of infection for consumers. The survey was performed using molecular assays (Real-Time PCR) to detect the presence of *C. burnetii* DNA. The samples have been furthermore tested with specific methods for species identification in milk and dairy products. *C. burnetii* has been detected in 75% of cow cheese samples, while in small ruminants and buffaloes dairy products have been assessed at 45,9% and 23,9% respectively.

KEYWORDS

Cheese; *Coxiella burnetii*; Real-Time PCR.

INTRODUZIONE

Coxiella burnetii è l'agente causale della Febbre Q, zoonosi a diffusione pressoché planetaria. La malattia negli animali evolve in forma generalmente inapparente, l'unico sintomo clinicamente apprezzabile è l'aborto o la nati-mortalità. La Febbre Q nell'uomo può presentarsi in due forme diverse, una acuta ed una cronica. La prima, la più comune e clinicamente meno severa, è contraddistinta da sintomatologia simil-influenzale, con febbre, mialgia e disturbi generalizzati. La forma cronica è caratterizzata da maggiore gravità, sino all'esito fatale. L'organo più comunemente coinvolto è l'endocardio, in particolare le valvole cardiache; altro organo bersaglio della forma cronica è il sistema nervoso centrale. L'inalazione di aerosol contaminati è la principale via d'infezione: durante il parto o l'aborto, infatti, gli animali infetti eliminano un gran numero di microrganismi che possono contaminare le polveri ed essere inalati. Anche il morso di artropodi e l'ingestione di cibi contaminati sembrano svolgere un ruolo nell'epidemiologia della Febbre Q.

C. burnetii è eliminata con fluidi e secreti corporei, come l'urina e il latte (1), e il principale serbatoio del microrganismo è costituito dai ruminanti domestici (2). La presenza della Febbre Q nei bovini allevati in Italia Meridionale è stata ampiamente dimostrata, ed è stata osservata una associazione diretta tra tipologia d'allevamento e positività (3). Mediante l'espletamento di test molecolari si è anche osservata una rilevante positività per *C. burnetii* nei feti abortiti e nei nati-morti sia tra ovini che tra i bovini (4) e, più di recente, anche nei bufali allevati in Campania (5). *C. burnetii* è dotata di notevole termo-resistenza, pertanto i protocolli di pastorizzazione del latte prendono a riferimento il rapporto tempo/temperatura che assicura l'inattivazione, tra gli altri batteri, anche di *C. burnetii* (6;7). La presenza di *C. burnetii* nel latte è stata messa in luce da numerosi ricercatori (8; 9), ma poco si è fatto per verificarne la presenza nei formaggi (10). In questa indagine si è valutata la contaminazione da *C. burnetii* in formaggi ovi-caprini, bovini e bufalini prodotti in Italia meridionale al fine di determinare il rischio potenziale d'infezione per i

consumatori alla luce sia della prevalenza registrata che della tipologia di lavorazione prevista per la produzione dei diversi tipi di formaggio analizzati.

MATERIALI E METODI

I campioni di formaggio analizzati in questo studio sono stati prelevati in caseifici e market di Campania e Calabria a partire dal mese di settembre 2010 fino al mese di febbraio 2011 e portati al laboratorio di biologia molecolare degli alimenti del Dipartimento di Ispezione degli alimenti dell'IZSM per l'esecuzione delle analisi. Tra i formaggi consegnati, sono stati presi in considerazione esclusivamente quelli prodotti nel sud Italia con latte di un'unica specie. In totale sono stati esaminati 136 campioni, 71 (52,2%) erano formaggi a pasta filata, 65 (47,8%) erano formaggi a pasta dura o semidura. I campioni venivano conservati a temperatura ambiente o in frigorifero, in funzione del tipo di prodotto, e analizzati entro la rispettiva shelf-life.

Fast Isoelectric Focusing Test: sebbene sui formaggi campionati fosse indicato il latte utilizzato per produrli, si è comunque proceduto alla caratterizzazione delle γ -caseine mediante Fast Isoelectric Focusing Test (IEF). L'analisi è stata eseguita secondo la procedura indicata nel Regolamento CE N° 273/2008 (11). Questo test consente di differenziare le γ -caseine di bufalo da quelle bovine e di piccoli ruminanti. L'IEF non consente di distinguere le caseine ovine da

quelle caprine, pertanto i formaggi di queste due specie sono stati raggruppati in un'unica categoria (ovi-caprini).

Analisi biomolecolare

Estrazione del DNA: 25 g di ogni campione sono stati omogeneizzati, quindi da 25 mg di omogeneizzato si è proceduto ad estrarre il DNA totale mediante QIAamp DNA mini kit (Qiagen, Hilden, Germany) seguendo le indicazioni della ditta produttrice. Dopo aver determinato la concentrazione del DNA estratto mediante analisi spettrofotometrica, questo veniva conservato nel congelatore (-20°C) sino al suo impiego nell'analisi di PCR.

Real-Time PCR: come target di amplificazione si è scelta la regione IS1111 del genoma di *C. burnetii* (12); si tratta di un elemento d'inserzione ripetuto un numero variabile di volte nel cromosoma del batterio. Su tale regione sono stati disegnati i primers e la sonda TaqMan indicati in tabella 1 (13). La mix di reazione (20 μ L) comprendeva 10 μ L di Real Time Master Mix 2 X, 0,2 μ M di sonda, 0,9 μ M di ognuno dei due primer e 2 μ L di template. Primer, sonda e tutti i reagenti erano forniti dalla Applied Biosystems (USA). Come controllo positivo si utilizzavano un estratto commerciale di *Coxiella burnetii Nine Mile* (Dade Bering, Germany). L'amplificazione è stata eseguita utilizzando un Mini Opticon Thermal Cycler (BioRad, USA) alle seguenti condizioni: 50° C per 2 min; 95° C per 10 min; 40 cicli costituiti dai seguenti steps: 95° C per 15 sec. 60° C per 60 sec.

Tabella 1. sequenza nucleotidica di primers e sonda*.

Forward	5'-GGGTAAACGGTGAACAACA-3'
Reverse	5'-ACAACCCCGAATCTCATTG-3'
Sonda	FAM-5'-AACGATCGCGTATCTTTAACAGCGCTTG-3'-TAMRA

* Da: S. G. Kim, E. H. Kim, C. J. Lafferty, and E. Dubovi: *Coxiella burnetii* in bulk tank milk samples, United States. Emerging Infectious Diseases. Vol 11, N° 4, April 2005

Analisi statistica: I campioni sono stati stratificati in funzione della caratterizzazione delle caseine di specie. L'analisi statistica dei risultati è stata eseguita utilizzando il software EpiInfo 3.3. L'approccio epidemiologico è stato quello di studi di tipo retrospettivo.

RISULTATI

Dei 136 campioni analizzati, 28 erano di latte bovino, 71 di latte bufalino e 37 di latte ovi-caprino. La prevalenza di *C. burnetii* complessivamente rilevata è stata del 40,4 %, con una maggiore positività per i formaggi a base di latte bovino (75%) seguiti da quelli ovis/caprini (45,9%) (Tabella 2). L'analisi statistica mostrava che la differenza nella prevalenza in funzione della specie era significativa ($P < 0,0001$).

La maggior prevalenza nei formaggi bovini risultava statisticamente significativa sia verso la somma degli altri analizzati ($X^2=15,72$; $P < 0,00001$; OR= 6,53) sia verso quelli prodotti con solo latte di bufala ($X^2=20,03$; $P < 0,0001$; OR= 9,53). La maggior prevalenza nei formaggi bovini rispetto a quelli ovi-caprini (OR=3,53) non trovava conferma di significatività all'analisi statistica; uguale situazione per i formaggi ovi-caprini verso quelli bufalini.

Tabella 2. Prevalenza osservata.

Specie	Coxiella +	Coxiella -	tot	%
Bovino	21	7	28	75,0
Ovi-caprino	17	20	37	45,9
Bufalino	17	54	71	23,9

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

La Febbre Q è considerata una zoonosi riemergente (14) e il ruolo dei ruminanti nella epidemiologia dell'infezione è ben noto. L'eliminazione per via mammaria del batterio ha posto in evidenza il rischio d'infezione in seguito al consumo di latte bovino crudo, per la cui vendita non è previsto il controllo per Coxiella. I formaggi, in particolare quelli a latte crudo o termizzati, vista l'elevata resistenza di *C. burnetii* ai processi di stagionatura, possono costituire una fonte d'infezione poco considerata ed indagata.

La maggiore prevalenza osservata nei formaggi bovini è in linea con quanto segnalato da altri autori (15) circa l'eliminazione di *C. burnetii* nel latte, che risulta essere poco significativa nelle capre, di breve durata negli ovini, mentre nei bovini si protrae per almeno 16 settimane. Visto che non abbiamo dati sull'eliminazione per via galattogena del batterio nei bufali, i risultati del nostro studio fanno ipotizzare che essa sia poco significativa. Ciò potrebbe conseguire sia ad una effettiva minore sensibilità di questa specie all'infezione oppure all'eliminazione del batterio nella specie bufalina principalmente per altre vie. Anche la tipologia d'allevamento bufalino, generalmente allo stato semi libero, potrebbe contenere la diffusione della Febbre Q all'interno dell'allevamento (3) e, conseguentemente, determinare una minore positività nel latte di massa.

I protocolli d'isolamento di *C. burnetii* sono complessi, lunghi e richiedono personale qualificato e laboratori attrezzati. Ciò ha favorito l'adozione, quale alternativa all'isolamento del batterio, della PCR per la sua ricerca sia in diagnostica umana e animale che nelle matrici alimentari. I test molecolari non consentono però di determinare se i microrganismi ricercati siano vivi o meno, pertanto l'analisi del rischio per i consumatori risulta carente. Dei 136 formaggi analizzati, 30 (22%) erano prodotti artigianalmente con latte non pastorizzato e basse temperature di lavorazione, caratteristiche che consentono la sopravvivenza del microrganismo nel prodotto e, quindi, la sua eventuale trasmissione per via alimentare. La prevalenza registrata in questi formaggi è stata costantemente più bassa rispetto ai dati complessivi, ma, all'analisi statistica, tale differenza non risultava significativa.

La sintomatologia della Febbre Q nell'uomo, che nella sua forma più comune è di tipo simil-influenzale, potrebbe aver portato a sottostimare l'impatto in sanità pubblica di questa infezione che, pur essendo prevalentemente di tipo professionale, può anche conseguire

all'ingestione di alimenti contaminati (16). Benché tale ultimo aspetto sia tuttora controverso, non può escludersi che il consumo di formaggi possa essere causa di sieroconversione, anche nelle popolazioni meno esposte.

BIBLIOGRAFIA:

1. Babudieri B. Q fever: a zoonosis. *Advances in Veterinary Science*. 1959;5:81-182.
2. Kim, S.G., Kim, E.H., Lafferty, C.J., Dubovi, E., 2005. Coxiella burnetii in bulk tank milk samples, United States. *Emerging Infectious Diseases* 11, 619-621.
3. Capuano F., Landolfi M.C., Monetti D.M. - Influence of three types of farm management on the seroprevalence of Q fever as assessed by an indirect immunofluorescence assay. 2001 *The Veterinary Record* 149 (22) 669-671.
4. Parisi A, Fraccalvieri R, Cafiero M, Miccolupo A, Padalino I, Montagna C, Capuano F, Sottili R.- Diagnosis of *Coxiella burnetii*-related abortion in Italian domestic ruminants using single-tube nested PCR. *Veterinary Microbiology*. Nov 26;118(1-2):101-6; pub 2006 Aug.
5. Perugini AG, Capuano F, Esposito A, Marianelli C, Martucciello A, Iovane G, Galiero G - Detection of *C. burnetii* in buffaloes aborted fetuses by IS111 DNA amplification: a preliminary report: *Research in Veterinary Science*. 2009 Oct;87(2):189-91; e pub 2009 Feb 15.
6. J.B. Enright, Ph.D.; W. W. Sadler, D.V.M.; and R.C.T. June: Pasteurization of Milk Containing the Organism of Q Fever 1957 *American Journal of Public Health*. (47) 695-700.
7. O. Cerf and R. Condron *Coxiella burnetii* and milk pasteurization: an early application of the precautionary principle? *Epidemiology and Infection* (2006), 134, 946-951.
8. Ongor, H., Cetinkaya, B., Karahan, M., Acik, M.N., Bulut, H., Muz, A., 2004. Detection of *Coxiella burnetii* by immunomagnetic separation-PCR in the milk of sheep in Turkey. *Veterinary Record* 154, 570-572.
9. S G Kim, E H Kim, C J. Lafferty Ed Dubovi: *Coxiella burnetii* in Bulk Tank Milk Samples, United States *Emerging Infectious Diseases*-Vol. 11, No. 4, April 2005.
10. R. Fretz, W. Schaeren, M. Tanner, A. Baumgartner: Screening of various foodstuffs for occurrence of *Coxiella burnetii* in Switzerland. *International Journal of Food Microbiology* 116 (2007) 414 - 418.
11. Commission Regulation (EC) No 273 of 5 March 2008 methods for the analysis and

- quality evaluation of milk and milk products - *ANNEX IX* : reference method for the detection of cows' milk and caseinate in cheeses from ewes' milk, goats' milk or buffalos' milk or mixtures of ewes', goats' and buffalos' milk.
12. A M Denison, H A Thompson and R F Masung IS111 insertion sequences of *Coxiella burnetii*: characterization and use for repetitive element PCR-based differentiation of *Coxiella burnetii* isolates *BMC Microbiology* 2007, 7:91.
 13. S. G. Kim, E. H. Kim, C. J. Lafferty, and E. Dubovi: *Coxiella burnetii* in bulk tank milk samples, United States. *Emerging Infectious Diseases*. Vol 11, N° 4, April 2005.
 14. Arricau-Bouvery, N., Rodolakis, A., 2005. Is Q fever an emerging or reemerging zoonosis? *Veterinary Research* 36, 327–349.
 15. A Rodolakis, M. Berri, et all Comparison of *C. burnetii* shedding in milk of dairy bovine, caprine and ovine herds. *Journal Dairy Science*. 90:5352-5360
 16. Parere scientifico sulla Febbre Q – *EFSA Journal* 2010; 8 (5):1595-114pp.