

IDENTIFICAZIONE DI *E. COLI* O157 IN UN ALLEVAMENTO DI BOVINE DA LATTE MEDIANTE METODO IN MULTIPLEX REAL-TIME PCR

IDENTIFICATION OF E. COLI O157 IN A BOVINE MILK FARM BY MULTIPLEX REAL-TIME PCR

Petruzzelli A.¹, Amagliani G.², Foglini M.¹, Bartolini C.¹, Agnetti F.¹, Magistrali C.¹, Omiccioli E.³, Brandi G.², Tonucci F.¹

¹IZSUM-Istituto Zooprofilattico Sperimentale Umbria e Marche, Italy.

²Dipartimento di Scienze Biomolecolari, Università di Urbino "Carlo Bo", Urbino, Italy

³Diatheva, Fano, Italy

SUMMARY

Law provisions about direct sell of raw bovine milk require VTEC O157 monitoring in bovine milk farms (milk and faeces). It has been showed that culture-based methods used for this scope, besides being cumbersome and time-consuming, may be also less sensitive, compared to molecular approaches. In this study, a multiplex Real-Time PCR, able to identify VTEC O157, *Salmonella* spp and *Listeria monocytogenes*, has been used to analyse milk, filter, sewage and stool samples from a milk farm, in comparison with standard OIE methods. The performances of the molecular protocol have been preliminary assessed with lyophilized samples from proficiency testing VLA, showing 100% accordance. Results from field samples indicated the absence of the pathogen in milk, and the higher sensitivity of Real-Time PCR with other matrices, suggesting its potential use for fast VTEC O157 identification.

KEYWORDS

Raw milk, multiplex Real-Time PCR, proficiency testing.

Le infezioni da stipiti di *Escherichia coli* verocitotossina (VT)- produttori (VTEC) rappresentano un serio problema di sanità pubblica in quanto responsabili di gravi patologie soprattutto in bambini ed anziani. In Italia il 70-80% di casi di Sindrome Uremica Emolitica (SEU) è riconducibile in particolare ad infezioni da VTEC O157 (39%) (Bonardi et al., 2006). Per quanto l'incidenza di tali infezioni risulti di gran lunga inferiore a quella di altre patologie a trasmissione alimentare, quali salmonellosi e campilobatteriosi, le zoonosi da VTEC rappresentano un serio pericolo per il consumatore a causa della bassa dose infettante del germe e del severo decorso della malattia alla quale spesso sono associate complicanze a lungo termine (Decastelli et al., 2004). La principale via di trasmissione di VTEC si realizza attraverso il consumo di alimenti di origine animale ed in particolare di origine bovina. Negli ultimi anni

si è posta particolare attenzione alla contaminazione da VTEC nel latte crudo bovino in seguito alla diffusione di distributori automatici che ne consentono la vendita diretta al consumatore. La normativa relativa alla commercializzazione diretta di latte crudo (Intesa Stato-Regioni n 5/CSR del 25 gennaio 2007) ribadisce la necessità di monitorare la presenza di tale batterio sia nel latte che nelle feci, in quanto il controllo del solo prodotto finito non garantisce una riduzione significativa del rischio per il consumatore, a causa della bassa prevalenza e del carattere sporadico della contaminazione. Buone pratiche igieniche di allevamento, soprattutto nella fase di mungitura, riducono drasticamente la possibilità di contaminazione del latte (Decastelli et al., 2004). Allo stesso tempo, l'applicazione di metodi diagnostici rapidi per l'identificazione del patogeno permette di attivare misure di controllo tempestive finalizzate

alla prevenzione di eventuali eventi epidemici. Come evidenziato da alcuni autori, i metodi di riferimento (RM), oltre a richiedere lunghi tempi di realizzazione, soprattutto se si includono le prove di conferma, possono essere meno sensibili rispetto alle metodiche molecolari (MM) (Caprioli et al., 2005). Diversi sono i metodi in PCR e Real-Time PCR disponibili per l'identificazione di patogeni. Per il nostro studio è stato utilizzato un kit in multiplex Real-Time PCR (MultipathogenFLUO Kit, Diatheva), in grado di identificare simultaneamente *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes* ed *Escherichia coli* O157, in presenza di un controllo interno di amplificazione (UNI EN ISO 22174:2005), le cui performances erano state precedentemente verificate solo su campioni di latte (Omiccioli et al., 2009). Pertanto, per poter applicare il sistema anche ad altre matrici, sono stati analizzati campioni liofilizzati di feci animali del proficiency testing VLA (Veterinary Laboratories Agency, Sutton Bonington, UK) in parallelo con il metodo di riferimento (Manual OIE) ed il protocollo molecolare (includendo uno step di estrazione del DNA con il GenElute Mammalian Genomic DNA Purification Kit, Sigma-Aldrich). I risultati ottenuti hanno mostrato un'accuratezza del 100% di entrambi i metodi rispetto al valore vero (proficiency testing) e una perfetta concordanza del metodo alternativo (MM) con il metodo di riferimento (RM).

Entrambi i metodi (MM e RM) sono stati applicati in parallelo per l'analisi di campioni di campo provenienti da un allevamento di bovine da latte. In particolare sono stati analizzati 27 campioni di latte crudo (tank di stoccaggio), 25 filtri del sistema di filtrazione latte, 29 liquami e 47 pool di feci (costituiti da campioni di 5 bovine).

Le prove effettuate sui campioni provenienti dall'allevamento, hanno fornito i seguenti risultati: latte, 27 campioni, negativi; filtri, 1/25 (RM) e 12/25 (MM) positivi; liquami, 2/29 (RM) e 27/29 (MM) positivi; feci, 2/47 (RM) e 28/47

(MM) positivi.

I risultati ottenuti hanno evidenziato la maggiore sensibilità del metodo in multiplex Real-Time PCR e, grazie ai dati del proficiency testing, ne suggeriscono l'applicazione per l'identificazione precoce di *E. coli* O157.

BIBLIOGRAFIA

1. Bonardi S., Leccese C, 2006. Il ruolo della specie bovina e di altri ruminanti nell'epidemiologia delle infezioni da *Escherichia coli* verocitotossici. Ann. Fac. Medic. Vet. Di Parma (Vol. XXVI, 2006): 205-218.
2. Decastelli L., Ru G., Brizio G., Gentile D., Gallina S., Caprioli A, 2004. Presenza di *E. coli* O157 in suini alimentati con latte di siero. Il progresso Veterinario. 2: 76-78.
3. Caprioli A., Morabito S., Brugère H., Oswald E. (2005). Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. Vet. Res. 36.:289-311.
4. Anonymous, 2005. Polymerase Chain Reaction (PCR) for the Detection of Food Borne Pathogens e General Requirements and Definitions. EN ISO 22174. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
5. Anonymous, 2008. Preparation of Test Samples, Initial Suspension and Decimal Dilutions for Microbiological Examination – Part. 5: Specific Rules for the Preparation of Milk and Milk Products. DIN EN ISO. Microbiology of Food and Animal Feeding Stuffs: 6887-6895.
6. Omiccioli E., Amagliani G., Brandi G., Maggiani M, 2009. A new platform for Real-Time PCR detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *E. coli* O157 in milk. Food Microbiol. 26: 615-22.
7. Manuale OIE: Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. OIE Terrestrial Manual, 2008: 1294-1304.