



CONFRONTO DI METODI MICROBIOLOGICI E BIOMOLECOLARI PER LA RICERCA DI *ESCHERICHIA COLI* O:157 DA FECI DI BOVINI MACELLATI IN UMBRIA.

Laura Ercoli, Silvia Cibotti, Chiara Francesca Magistrali, Stefania Scuota, Michele Tentellini, Lucilla Cucco, Guerriero Mencaroni, Silvana Farneti

Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Perugia



INTRODUZIONE

I bovini rivestono il ruolo di principale *reservoir* di *Escherichia coli* O:157, la cui presenza negli alimenti rappresenta la modalità principale di trasmissione all'uomo. Gli alimenti più frequentemente implicati sono il latte crudo e le carni bovine, come conseguenza di una contaminazione fecale di queste matrici durante la mungitura o durante la macellazione. La bassa dose infettante che caratterizza *E. coli* O:157 e la capacità del germe di sopravvivere in diverse condizioni ambientali, hanno reso questi patogeni oggetto di una crescente attenzione da parte delle autorità sanitarie.

Il presente lavoro si prefigge di valutare la prevalenza di *E. coli* O:157 in feci di bovini macellati in Umbria, mettendo a confronto il metodo di isolamento tradizionale con metodiche biomolecolari.



MATERIALI E METODI

Campioni: sono stati prelevati con criteri statistici 250 campioni di contenuto cecale di bovini macellati presso quattro diversi impianti situati sul territorio umbro.

Analisi microbiologiche: è stata seguita la procedura descritta dal manuale OIE, che prevede arricchimento in mTSB, incubazione a 37°C ± 1°C per 6 h, immunoseparazione magnetica seguita da semina su terreno CT-SMAC. Le colonie tipiche sono state sottoposte a identificazione biochimica e a sierologia mediante sieri del commercio.

Analisi biomolecolari: dopo incubazione in mTSB per 16-18 h a 37°C ± 1°C, si è proceduto all'estrazione del DNA dal brodo di prearricchimento mediante l'impiego di kit commerciali. Sul template sono state eseguite una Real-time PCR, tramite kit ADIAFOOD Detection System *E. coli* O:157:H7 e una multiplex PCR, volta a evidenziare la presenza di geni codificanti l'antigene somatico dei principali sierogruppi di *E. coli* STEC, fra cui O:157.

Successivamente, sui ceppi isolati e ulteriormente confermati come *E. coli* O:157 in Real-time PCR, si è provveduto al rilevamento dei geni *vtx1*, *vtx2* ed *eae* tramite multiplex PCR (Figura 1), per valutare l'eventuale appartenenza al gruppo di STEC classificati come altamente patogeni per l'uomo, conformemente a quanto indicato nella ISO/TS 13136:2011(E).

RISULTATI

I risultati ottenuti con il metodo tradizionale e con i metodi biomolecolari sono riportati in Tabella 1.

Il metodo microbiologico ha reso possibile l'isolamento di 31 ceppi batterici riferibili a *E. coli*, di cui 20 (8%) appartenenti al sierogruppo O:157.

Con i metodi biomolecolari impiegati nel presente lavoro, sono stati evidenziati i geni codificanti per *E. coli* O:157 in 82 campioni (32.8%).

Il confronto tra le due metodiche biomolecolari è riportato in Tabella 2: sono stati ottenuti risultati concordanti nel 92,8% dei casi, con 168 campioni negativi e 64 positivi. Ne consegue una percentuale di positività per il sierogruppo O:157 variabile dal 27,6% al 30,8%, a seconda del metodo biomolecolare impiegato.

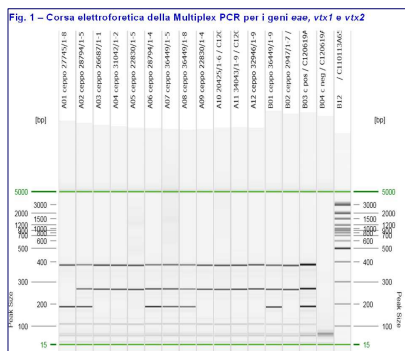
Sui 20 ceppi di *E. coli* O:157 è stata effettuata una multiplex PCR per la ricerca dei geni *vtx1*, *vtx2* ed *eae*; di questi, 14 (5,6%) erano classificabili come STEC altamente patogeni per l'uomo, in quanto provvisti del gene *eae* associato a *vtx1* e/o *vtx2*.

Tab. 1 – Confronto tra metodo microbiologico e metodi biomolecolari

	Metodi Biomolecolari (positivi) N (%)	Metodi Biomolecolari (negativi) N (%)	Totale
Metodo microbiologico (positivi)	20 (8,0)	11 (4,4)	31 (12,4)
Metodo microbiologico (negativi)	62 (24,8)	157 (62,8)	219 (87,6)
Totale	82 (32,8)	168 (67,2)	250 (100,0)

Tab. 2 – Confronto tra i due metodi biomolecolari

	Multiplex PCR (positivi) N (%)	Multiplex PCR (negativi) N (%)	Totale
Real - Time PCR (positivi)	64 (25,6)	5 (2,0)	69 (27,6)
Real - Time PCR (negativi)	13 (5,2)	168 (67,2)	181 (72,4)
Totale	77 (30,8)	173 (69,2)	250 (100,0)



CONCLUSIONI

Tale progetto ha permesso di implementare e confrontare diverse metodiche atte all'individuazione di STEC O:157 e di gettare le basi per indagini epidemiologiche sulla diffusione di tali microrganismi nella realtà locale umbra.

Le percentuali di positività ottenute con i metodi biomolecolari appaiono notevolmente più alte rispetto a quelle ottenute con il metodo microbiologico; questo era comunque prevedibile, dato che i metodi biomolecolari permettono di rilevare nel campione anche il DNA batterico di microrganismi morti, stressati o comunque non vitali, che conseguentemente non è possibile isolare.

La prevalenza di *E. coli* O:157 altamente patogeni, riscontrata nelle feci di bovini macellati in Umbria (5.6%), non si discosta significativamente da quella riportata da EFSA ECDC.

Tuttavia tali batteri possono rappresentare un pericolo, anche nel territorio umbro, per la sicurezza sanitaria di tutti quegli alimenti, consumati crudi o poco cotti, potenzialmente oggetto di contaminazione fecale durante la produzione primaria o durante le fasi successive di lavorazione o di preparazione al consumo.

Bibliografia

Bonardi S, Maggi E, Pizzin G, Morabito S, Caprioli A: 2001. Faecal carriage of Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O:157 and carcass contamination in cattle at slaughter in northern Italy. *Int J Food Microbiol*, 66: 47-53.
 Caprioli A, Edoloni A, Bacchini M, Luzzi I, Rosmini F, Gianviti A, Matteucci M C, Pasquini P:1990. Isolation in Italy of a verotoxin-producing strain of *Escherichia coli* O:157:H7 from a child with hemolytic-uremic syndrome. *Eur J Epidemiol*, 6:102-104.
 Caprioli A, Morabito S, Bugliare H, Oswald E: 2005. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Vet Res*, 36:289-311.
 Manuale OIE: <http://www.oie.int>. Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals. OIE Terrestrial Manual, 2008: 1294-1304.
 Monday S R, Beisaw A, Fang P C H: 2007. Identification of Shiga toxinigenic *Escherichia coli* serotypes A and B by multiplex PCR. *Mol Cell Probes*, 21:308-311.
 Scallan E, Hoekstra R M, Angulo F J, Tauxe R V, Widdowson M A, Roy S L, Jones J L, Griffin P M: 2011. Foodborne illness acquired in the United States—Major pathogens. *Emerg Infect Dis*, 17:7-15.
 Scientific Report of EFSA and ECDC - The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2010 EFSA Journal 2012;10(3):2597.