

Comparazione fra *polymerase chain reaction* e isolamento batteriologico in campioni di latte crudo e mozzarella di bufala prodotta in provincia di Caserta, regione Campania (Italia)

Elisabetta Di Giannatale, Alessandra Alessiani, Vincenza Prencipe, Osvaldo Matteucci, Tiziana Persiani, Katuscia Zilli & Giacomo Migliorati

Riassunto

Per contribuire all'individuazione di un possibile nesso epidemiologico tra consumo di mozzarella di bufala preparata con latte crudo (non trattato al calore) e casi di brucellosi umana, sono stati analizzati, per ricerca di *Brucella* spp., 80 campioni di latte bufalino crudo e 315 campioni di mozzarella. Gli alimenti esaminati sono stati prelevati in caseifici della provincia di Caserta dove è presente la più alta concentrazione di allevamenti bufalini sierologicamente positivi alla brucellosi in Campania, regione che, nel periodo 2000-2005, ha registrato il 96,02% dei casi di brucellosi umana notificati in Italia. Al fine di valutare possibili variazioni stagionali, i campioni sono stati acquistati in 72 rivendite associate a caseifici nel periodo febbraio 2006-marzo 2007. La ricerca di *Brucella* spp. è stata effettuata utilizzando *polymerase chain reaction* (PCR) ed eseguendo contemporaneamente l'isolamento microbiologico. I campioni esaminati sono risultati negativi alla ricerca di *Brucella* con entrambi i metodi utilizzati. Sono stati, inoltre, definiti i parametri di sensibilità, specificità, ripetibilità, riproducibilità e il limite di rilevazione del metodo molecolare, esaminando campioni artificialmente contaminati, sia con metodo PCR sia con isolamento microbiologico classico. Il limite di rilevazione

è risultato inferiore a 1 UFC/g, ripetibilità e riproducibilità sono stati pari a 100% ($p=0,95$), sensibilità a 96,7% ($p=0,95$) e specificità a 100% ($p=0,95$).

Parole chiave

Brucella spp., Brucellosi, Bufalo, Campania, Caserta, Italia, Latte, Microbiologia, Mozzarella, *Polymerase chain reaction*.

Introduzione

I 500.000 nuovi casi di brucellosi umana che si registrano ogni anno a livello mondiale, evidenziano come questa malattia sia ancora un'importante zoonosi nei paesi Europei dell'area del mediterraneo, Africa orientale e parte dell'Asia e dell'America del Sud (3). Nonostante la legislazione vigente in Europa (4) tuteli la salute pubblica nei confronti della brucellosi, regolando il flusso e l'utilizzo del latte per la produzione dei suoi derivati, nel 2005, nei paesi europei del bacino del mediterraneo, sono stati notificati 1.218 casi di brucellosi umana con un'incidenza di 0,2 casi per 100.000 abitanti (6). Nel quinquennio 2000-2005 i livelli di incidenza più elevati sono stati registrati in Portogallo (1,4), Italia (1,1) e Spagna (0,5), sebbene, in questi Paesi, i programmi di eradicazione della malattia, nelle popolazioni animali, abbiano determinato

una diminuzione dell'incidenza di brucellosi umana rispetto agli anni precedenti (6). In Italia, nel 2004, il 92,18% delle notifiche sono state registrate nelle regioni Campania, Puglia, Calabria e Sicilia. La situazione è stata confermata nel 2005 con dati sovrapponibili (92,7%) (1). I dati ufficiali, pubblicati dal Ministero della Salute, riportano il numero totale dei casi di brucellosi umana in Italia, ma non i biovar coinvolti. Tuttavia, i ceppi umani pervenuti al Centro di Referenza Nazionale per le Brucellosi (IZSA&M), relativi alle brucellosi registrate negli ultimi 10 anni, sono risultati sempre costituiti da *Brucella melitensis* biovar 3.

In Europa l'infezione nell'uomo è causata prevalentemente da *B. melitensis* (90,1%) (3), riferibile all'ingestione di alimenti contaminati come latte fresco, burro, gelati e formaggio fresco prodotti con latte non pastorizzato (1, 2, 9). I formaggi "DOP" (denominazione di origine protetta), in Italia, rivestono un ruolo fondamentale nell'economia lattiero casearia. Il marchio DOP nasce dall'intento di tutelare i prodotti di una specifica area geografica la cui realizzazione prevede l'uso di materie prime locali e di tecniche tradizionali. Tra questi prodotti la produzione di mozzarella di bufala, che prevede nel disciplinare la preparazione a partire da latte crudo, ha fatto registrare, nel corso degli ultimi anni, un trend estremamente positivo (nel biennio 2005-2006 l'incremento di vendita è stato del 7-10% annuo). La presenza di brucellosi nelle popolazioni bufaline interessa in modo rilevante la regione Campania, in particolare, la provincia di Caserta area ad alta densità di allevamenti bufalini infetti. Con questo studio è stato possibile valutare la presenza di *Brucella* in campioni di latte di massa, destinato ai caseifici, e in campioni di mozzarella di bufala prelevati in provincia di Caserta. Nei campioni è stata effettuata la ricerca di *Brucella* spp, con *polymerase chain reaction* (PCR) e isolamento microbiologico, e la numerazione in MPN per determinarne l'eventuale livello di contaminazione. Sono stati, inoltre, definiti i parametri di sensibilità, specificità, ripetibilità e riproducibilità e il limite di rilevazione del metodo di

ricerca in PCR su campioni artificialmente contaminati.

Materiali e metodi

Prelievo di campioni di latte crudo e mozzarella di bufala

Sono stati esaminati 315 campioni di mozzarella di bufala prelevati direttamente presso i caseifici di produzione (o loro punti vendita) presenti nella provincia di Caserta. I prodotti, confezionati in buste sterili, sono stati inviati tramite corriere a temperatura di refrigerazione ed esaminati entro 24 ore dal conferimento in laboratorio. Ad ogni campione è stata associata una scheda di prelievo in cui sono stati raccolti indicazioni relative alla provenienza del prodotto e dati riguardanti parametri tecnologici delle principali fasi di lavorazione (pH, concentrazione di sale, temperatura).

Sono stati analizzati, inoltre, 80 campioni di latte di massa destinato alla produzione di mozzarella, provenienti da caseifici della stessa provincia.

Metodi diagnostici

Mozzarella

Da ogni campione di mozzarella, sono stati prelevati 25 g di prodotto omogenati allo stomacher in brodo *Brucella* (in rapporto 1:10 p/v). L'isolamento microbiologico di *Brucella* nei campioni di mozzarelle è stato effettuato utilizzando brodo *Brucella* e agar *Brucella* (Oxoid, Basingstoke-UK) con l'aggiunta di una miscela di antibiotici (Oxoid) e siero equino (12). In ogni campione è stata effettuata contemporaneamente all'isolamento la numerazione di *Brucella* in MPN secondo il metodo ufficiale dell' *United States Department of Agriculture/Food Safety and Inspection Service* (USDA/FSIS) *Microbiology Laboratory Guidebook* (MLG) 2.03. (11).

Latte

Da ogni campione di latte sono stati prelevati 50 ml, trasferiti in una provetta e centrifugati a 2.000 g per 30 min. Dalla panna e dal sedimento ottenuti sono stati effettuati semina

diretta su agar *Brucella* e arricchimento in brodo *Brucella* (1 ml di sedimento in 9 ml di brodo) (12). Tutti i campioni (arricchimento e semina diretta), sono stati incubati in termostato a 37°C, in CO₂ al 10%. Ogni settimana i brodi di arricchimento sono stati seminati su agar *Brucella* per un periodo complessivo di 42 giorni. Per la ricerca di *Brucella* spp. in PCR sono stati prelevati 5 ml di omogenato. Dopo l'aggiunta di 500 µl di Tween 80 (Becton Dickinson, St Louis, Missouri-USA) il campione è stato sottoposto a centrifugazione (13.400 rpm per 5 min.). L'estrazione di DNA è stata effettuata con Kit Ultraclean Microbial DNA (Mobio Laboratories Inc., Carlsbad, California-USA). La concentrazione e purezza del DNA sono stati determinati con biofotometro (Eppendorf, New York-USA). I primer utilizzati, indicati come BB1 e BB2, sono stati disegnati sulla base della struttura dell'IS711. La specificità è stata verificata comparando le sequenze nel database di BLAST (8). Come controllo interno è stato utilizzato M13 (MWG Biotech, Ebersberg-Germania) (7) per rilevare eventuali inibizioni della reazione di PCR. Le sequenze dei primer e del controllo sono riportate in Tabella I. Per l'amplificazione è stato utilizzato Thermocycler GeneAmp PCR System 9700 (Applied Biosystems, Foster City, California-USA) alle seguenti condizioni: 94°C per 30 sec, 60°C per 30 sec, 72°C per 30 sec. L'amplificato è stato separato mediante elettroforesi in gel di agarosio (Eppendorf, Segrate-Italia) all'1% in TBE 1X (BioRad Laboratories, Milano-Italia), il gel colorato con Sybr Safe DNA Gel Stain (Invitrogen, Foster City, California-USA) e visualizzato al transilluminatore (Alpha Innotech Corporation, San Leandro, California-USA). La ricerca di *Brucella* in PCR è stata eseguita al momento della preparazione dell'omogenato e successivamente dopo tre e

sette giorni di incubazione. In caso di negatività a 7 giorni la prova è stata ripetuta al termine delle 6 settimane di incubazione.

Validazione del metodo di ricerca in *polymerase chain reaction*

Per determinare il limite di rilevazione, sensibilità, specificità, ripetibilità e riproducibilità del metodo di ricerca di *Brucella* spp in PCR, sono stati preparati campioni artificialmente contaminati.

Per il limite di rilevazione è stata allestita, in PBS, una sospensione di *Brucella melitensis* biotipo 3 (*Central Veterinary Laboratory*, Weybridge-UK) di densità ottica (DO600) di 0,400±0,005 rilevata con biofotometro (Eppendorf) pari a circa 10⁸ UFC/ml. Dall'inoculo iniziale sono state allestite diluizioni decimali fino a 10⁴ UFC/ml. Quest'ultima è stata utilizzata per la contaminazione del campione e, contemporaneamente, è stata verificata la carica batterica dell'inoculo mediante titolazione su *brain infusion heart agar* (Biolife, Milano-Italia).

Il campione è stato preparato prelevando 25 g da mozzarelle di bufala risultate precedentemente negative alla ricerca di *Brucella* spp. con metodo microbiologico, e ponendolo in una busta da stomacher con 225 ml di brodo *Brucella* (Oxoid). La sospensione allestita è stata inoculata con *Brucella* in modo da ottenere una contaminazione finale di circa 10³ UFC/g. Con l'omogenato sono state effettuate 5 diluizioni decimali (da 10³ a 10⁻¹ UFC/g) ognuna sottoposta a ricerca di *Brucella* spp. in PCR.

Per determinare la sensibilità del metodo sono stati preparati ed esaminati 30 campioni contaminati con le stesse modalità descritte ma in modo da avere una concentrazione finale di 10 UFC/g, per la specificità sono stati esaminati

Tabella I
Sequenza dei primer e del controllo interno

| Target | Sequenza |
|--------|-----------------------------------|
| BB1 | CATATCTCCGGGGCGAGTTGGTA |
| BB2 | GGATGACTCATCTGAGCCGTTGCCTTGAGATTG |
| M13rev | GAGCGGATAACAATTCACACAGG |
| M13uni | AGGGTTTCCCAGTCACGACGTT |

30 campioni di mozzarella sicuramente negativi per *Brucella*. I campioni negativi sono stati preparati con la stessa modalità.

I dati sono stati analizzati statisticamente utilizzando la distribuzione Beta ($s+1, n-s+1$), dove s è il numero dei successi e n è il numero dei campioni analizzati.

La ripetibilità del metodo è stata determinata esaminando 30 volte consecutive un campione sicuramente positivo, contaminato in modo da avere una contaminazione finale di 10 UFC/ml.

Per la riproducibilità sono stati analizzati 30 campioni positivi di mozzarella, artificialmente contaminati, e 30 campioni negativi. I dati ottenuti sono stati valutati calcolando il k di Cohen.

Risultati

La ricerca di *Brucella* spp. nei campioni di mozzarella di bufala e di latte di massa, effettuata con isolamento microbiologico e PCR, è risultata negativa per tutti i campioni esaminati. Anche la numerazione in MPN è risultata $<0,3$ MPN/g. Le prove effettuate su

campioni artificialmente contaminati esaminati con PCR prima dell'incubazione, dopo 3 giorni e 7 giorni di incubazione, hanno evidenziato un miglioramento del limite di rilevazione del metodo (Figura 1). La diluizione 1:10 del campione contaminato, risultata inizialmente negativa, è risultata positiva quando ripetuta sul campione contaminato dopo 3 giorni di incubazione.

I dati delle ripetibilità sono risultati tutti concordanti (100%), con un intervallo di confidenza compreso tra il 90,8% e il 100% ($p=0,95$). Per la riproducibilità non è stata riscontrata alcuna discordanza tra i risultati forniti dai due diversi operatori (k di Cohen =1).

Per quanto riguarda la determinazione della sensibilità del metodo, sono stati ottenuti 29 risultati positivi pari a 96,7% (limite di confidenza inferiore: 88,3%; limite di confidenza superiore: 99,2% con $p=0,95$), la specificità è stata del 100% (limite di confidenza inferiore: 90,8%; limite di confidenza superiore: 100% con $p=0,95$).

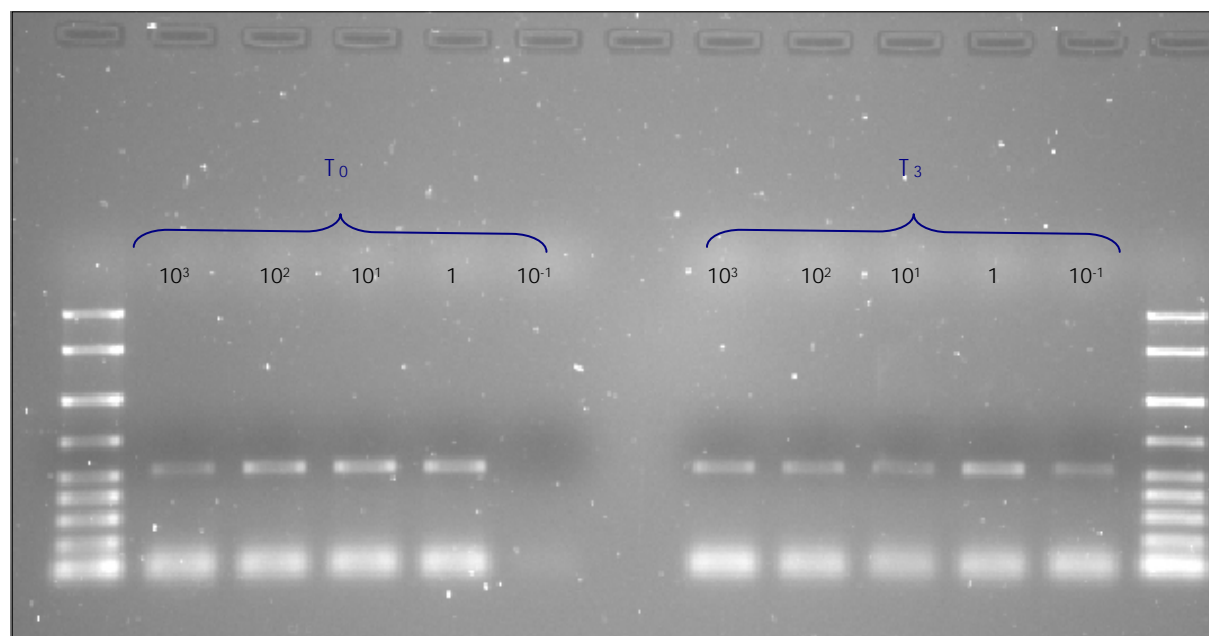


Figura 1 Risultati della ricerca di *Brucella* spp. in PCR di campioni artificialmente contaminati con *Brucella melitensis* biotipo 3 a 5 diversi livelli di inoculo, effettuata prima dell'incubazione (T_0) e dopo 3 giorni di incubazione (T_3)

Discussione

Malgrado l'adozione di vari provvedimenti nazionali e di piani regionali straordinari (1, 2), la brucellosi nelle popolazioni bovine e ovicaprine resta un serio problema soprattutto in alcune regioni del sud d'Italia. Gli allevamenti bufalini sono ugualmente interessati, in Campania, dove sono presenti 1.478 allevamenti di cui 994 (65,58%) nella sola provincia di Caserta, i controlli effettuati nel 2006 hanno rilevato il 28,8% degli allevamenti con animali sierologicamente positivi. Nel 2007 la percentuale è aumentata fino al 37% (1, 2). Pertanto le indagini eseguite in questa ricerca sono state concentrate in questa area geografica. L'utilizzo di latte crudo per la produzione di mozzarella di bufala, come previsto dalla tecnica tradizionale di produzione, lascia ipotizzare il possibile ruolo di questo alimento nell'infezione umana. Il rischio deriverebbe principalmente dall'utilizzo di latte crudo contaminato e destinato alla produzione casearia e con minor frequenza a eventuali contaminazioni secondarie che si verificherebbero durante la produzione e commercializzazione (9, 10). Da questa indagine non sono stati rilevati campioni di latte di massa o mozzarella di bufala positivi per *Brucella* spp., risultato confermato anche dai dati riportati in altri studi (9, 10). Tale risultato richiederebbe, comunque, ulteriori indagini che prendano in considerazione lo studio dei processi produttivi e la pratica del trattamento termico del latte proveniente da allevamenti infetti.

Per quanto riguarda il primo punto, di particolare interesse sono gli impianti di tipo tradizionale o semi-industriale nei quali il non attento sviluppo dei piani hazard analysis critical control point (HACCP) o il non rigoroso rispetto dei limiti stabiliti nei punti critici di controllo, potrebbero rappresentare una situazione di maggiore esposizione del consumatore al rischio di mozzarelle contaminate da *Brucella*. Il secondo aspetto riguarda il non rigoroso rispetto dei parametri di trattamento termico del latte proveniente da animali negativi di allevamenti infetti che, secondo la procedura prevista dalla normativa

vigente (5), può essere trattato rappresentando, di conseguenza, una possibile fonte di contaminazione per il prodotto finito. Ciò è particolarmente rilevante per i latticini e i formaggi a breve stagionatura (inferiore a 60 giorni) dal momento che tale fase di trasformazione è considerata risanante. Le attività di controllo sia ufficiale sia in autocontrollo prevedono verifiche microbiologiche sul latte crudo destinato alla caseificazione e sul prodotto finito. Punto critico della ricerca microbiologica classica (10) sono i tempi lunghi di incubazione e le basse percentuali di isolamento che mal si conciliano con il controllo ufficiale che prevede il fermo dei prodotti in attesa del risultato. Per tale motivo sono sempre più necessari test diagnostici che associno, alla rapidità d'esecuzione, l'alta specificità e la sensibilità del metodo al fine di identificare gli animali infetti e i cibi contaminati. Il presente studio ha valutato le performance di un protocollo di indagine in PCR per il rilevamento di *Brucella* spp. in matrici complesse come i formaggi. Il protocollo si è rivelato di facile esecuzione, rapido, economico e con elevati livelli di sensibilità e specificità, adeguato, quindi, come test di screening rapido.

Conclusioni

La problematica della brucellosi bufalina ha assunto per alcune regioni italiane un'enorme rilevanza sul piano sociale ed economico, tanto che da anni è oggetto di specifiche regolamentazioni, nazionali e regionali, introdotte per ridurre la malattia nella popolazione animale, aumentando il livello di sicurezza per il consumatore. È stato evidenziato come alcuni prodotti lattiero-caseari, in particolare formaggio fresco e ricotta prodotti con latte di pecora, possano rappresentare una fonte di infezione alimentare per l'uomo. Lo stesso rischio invece non risulterebbe associato al consumo della mozzarella di bufala. La breve vita commerciale delle mozzarelle non si concilia con l'applicazione dei metodi classici di ricerca di *Brucella* che notoriamente richiedono tempi lunghi, ma impone l'applicazione di test rapidi di screening come la PCR. L'introduzione

routinaria dei metodi molecolari permette di poter effettuare un controllo igienico sanitario degli alimenti di origine animale in maniera rapida, sensibile e specifica, permettendo la realizzazione in tempi adeguati, rispetto alla

vita commerciale del prodotto, di piani di monitoraggio da applicare, soprattutto, nelle aree ad alta incidenza di brucellosi.

Bibliografia

1. Anon. 2006. Ordinanza ministeriale 14/16/2006: Misure straordinarie di polizia veterinaria in materia di tubercolosi, brucellosi bovina, bufalina e ovicaprina, leucosi in Calabria, Campania, Puglia e Sicilia. *Gazz Uff*, **285**, 7 dicembre.
2. Anon. 2007. Piano triennale per il controllo della brucellosi in provincia di Caserta 2007-2010. Regione Campania, Assessorato alla Sanità, Settore Veterinario, Napoli, 17 pp (ec.europa.eu/food/committees/regulatory/scfcah/animal_health/bb_05062007.pdf data ultima consultazione il 13 aprile 2009).
3. Boschirolì M.L., Foulongue V. & O'Callaghan D. 2001. Brucellosis: a worldwide zoonosis. *Curr Opin Microbiol*, **4**, 58-64.
4. Commissione Europea (CE) 1990. Decisione del Consiglio, del 21 maggio 1990, che istituisce un'azione finanziaria della Comunità per l'eradicazione della brucellosi degli ovini e dei caprini (90/242/CEE). *Gazz Uff*, **L 140**, 01/06/1990, 123-127 (eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=celex:31990d0242:it.html data ultima consultazione il 13 aprile 2009).
5. Commissione Europea (CE) 2004. 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. *Gazz Uff*, **L 139**, 30.04.2004, 55 (eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2004:139:0055:0205:IT:PDF data ultima consultazione il 13 aprile 2009).
6. European Food Safety Authority (EFSA) 2006. *Brucella*. Information on specific zoonoses. *EFSA J*, **94**, 145-288.
7. Josefsen M.H., Cook N., D'Agostino M., Hansen F., Wagner M., Demnerova K., Heuvelink A.E., Tassios P.T., Lindmark H., Kmet V., Barbanera M., Fach P., Loncarevic S. & Hoorfar J. 2004. Validation of PCR-based method for detection of food-borne thermotolerant campylobacters in a multicenter collaborative trial. *Appl Environ Microbiol*, **70** (7), 4379-4383.
8. National Library of Medicine (NLM) 2009. Basic local alignment search tool (BLAST). Blast data base. NLM, Washington, DC (blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi data ultima consultazione il 13 aprile 2009).
9. Serpe L., Battisti A., Alfano F., Scaramuzza A. & Gallo P. 2000. PCR determination of *Brucella* spp. in milk products made and commercialized in the Campania Region. *Industr Aliment*, **39** (388), 5-7.
10. Tantillo G.M., Di Pinto A. & Buonavoglia C. 2003. Detection of *Brucella* spp. in soft cheese by semi-nested polymerase chain reaction. *J Dairy Res*, **70**, 245-247.
11. United States Department of Agriculture/Food Safety and Inspection Service (USDA/FSIS) 2008. Most probable number procedure and tables, Appendix 2.03. *In* Microbiology laboratory guidebook 01/28/08USDA/FSIS, Washington, DC, 9 pp (www.fsis.usda.gov/PDF/MLG_Appendix_2_03.pdf data ultima consultazione il 13 aprile 2009).
12. World Organisation for Animal Health (Office International des Epizooties: OIE) 2008. Bovine brucellosis, Chapter 2.4.3. *In* Manual of diagnostic tests and vaccines for terrestrial animals OIE, Paris, 624-659 (www.oie.int/eng/normes/mmanual/2008/pdf/2.04.03_bovine_brucell.pdf data ultima consultazione il 15 marzo 2009).