

COMPARAZIONE TRA TECNICHE MICROBIOLOGICHE E MOLECOLARI PER LO SCREENING DI *BRUCELLA* SPP. IN CAMPIONI DI LATTE DI BUFALA

Marianelli C.¹, Martucciello A.², Tarantino M.¹, Alfano D.², Iovane G.², Galiero G.²

¹ Istituto Superiore di Sanità, Dipartimento di Sanità Alimentare ed Animale, Roma; ² Istituto Zooprofilattico del Mezzogiorno, Centro di Referenza Nazionale sull'igiene e le tecnologie dell'allevamento e delle produzioni bufaline, Fuorni-Salerno.

Key words: *Brucella*, PCR, Real Time PCR

SUMMARY

Brucellosis is a highly infectious disease affecting humans and animals. 58 water buffalo milk samples (including 22 bacterial culture negative and 36 bacterial culture positive) were analysed for detection of *Brucella* DNA by PCR and Real-Time PCR. Different methods of extraction of bacterial DNA from buffalo milk and different PCR methods for the direct detection of *Brucella* spp. were evaluated. We found that the sensitivity of the tested PCR-based methods is lower than bacterial culture.

INTRODUZIONE

La brucellosi del bufalo è sostenuta da *B. abortus* e *B. melitensis*. Nei soggetti gravidi *Brucella* spp. colonizza l'utero a carico del quale causa placentite, anossia e setticemia fetale, aborto tardivo e ritenzione placentare. Nel toro, i siti comunemente colonizzati sono i testicoli, le vescicole seminali e l'epididimo, con comparsa di orchite ed epididimite associata a sterilità. La maggioranza degli animali infetti diffonde il microrganismo attraverso invogli fetali, colostro e latte.

Metodi rapidi e sensibili per lo screening diagnostico sono fondamentali per il controllo e l'eradicazione di questa malattia. La diagnosi di brucellosi si basa sui test sierologici e microbiologici. I primi presentano lo svantaggio di evidenziare talvolta soggetti falsamente positivi, a causa di reazioni crociate con altri batteri e di non rilevare l'infezione in fase precoce o latente. Di contro, l'isolamento batterico richiede lunghi tempi di attesa, in quanto *Brucella* spp. è un batterio a crescita lenta, ed espone l'analista a rischio di infezione. Per ovviare alle limitazioni presentate dai test diagnostici tradizionali, negli ultimi anni un grande interesse scientifico è stato rivolto verso lo sviluppo di metodi molecolari per lo screening di campioni biologici come latte e sangue. Numerosi saggi PCR sono stati descritti per la diagnosi di brucellosi nel bovino e pochi nel bufalo (4). Ad oggi non sono disponibili dati sulla sensibilità e specificità di test PCR applicati al latte di bufalo per la diagnosi di brucellosi.

In questo studio abbiamo confrontato cinque differenti metodi di estrazione del DNA e due saggi PCR per l'identificazione diretta della specie *Brucella* su latte artificialmente contaminato al fine di individuare il protocollo dotato di maggiore sensibilità. Successivamente la metodica di estrazione ed amplificazione prescelta, è stata applicata su 58 differenti campioni di latte bufalino proveniente da un allevamento infetto, al fine di confrontarla con i risultati ottenuti utilizzando l'esame batteriologico (ritenuto il test di riferimento) e la Real-Time PCR (metodica ritenuta più sensibile della PCR tradizionale).

MATERIALI E METODI

Al fine di saggiare le 5 differenti tecniche di estrazione sono state predisposte 5 serie di 12 campioni composti ciascuno da 500 µl di latte bufalino batteriologicamente negativo alla

ricerca di *Brucella* spp. e proveniente da un allevamento ufficialmente indenne. Ciascun campione è stato contaminato con diluizioni scalari del vaccino *Brucella abortus* RB51 a concentrazione nota (2×10^{10} UCF/ml), inoculando da 2×10^9 batteri fino a 0.02 batteri.

Estrazione DNA. Metodo A. A ciascun campione così preparato sono stati aggiunti 100 µl di tampone NET (NaCl 50 mM, EDTA 125 mM, Tris-HCl (pH 7.6) 50 mM) e 100 µl di SDS 24%. I campioni sono stati riscaldati ad 80 °C per 10 min e raffreddati poi in ghiaccio. Dopo aver aggiunto 1.5 µl di RNase (4 mg/mL) ed 1.5 µl di PK (20 mg/mL), i campioni sono stati incubati a 50 °C per 2 ore (7). Sono stati successivamente estratti con un ugual volume di fenolo/cloroformio/alcool isoamilico 25:24:1 utilizzando tubi Phase Lock Gel™ Heavy (Eppendorf AG, Hamburg, Germany) e centrifugando per 15 min alla massima velocità. Il DNA è stato precipitato con 1/10 di volume di NaOAc 3.5 M, 1 µl di glicogeno (10 µg/mL) ed 1 volume di isopropanolo ed incubando a -20°C per almeno 3 ore. Il pellet è stato lavato con 600 µl di etanolo 70%, asciugato e ripreso con 100 µl di acqua sterile.

Metodo B. Sono stati aggiunti 400 µl di tampone di lisi (Triton-X-100 2%, SDS 1%, NaCl 100 mM, Tris-HCl (pH 8) 10 mM) e 5 µl di PK (20 mg/mL). I campioni sono stati incubati a 50 °C per 30 min (5). Il DNA è stato estratto come sopra.

Metodo C. Sono stati aggiunti 300 µl di tampone di lisi (guanidina tiocianato 3 M, EDTA 20 mM, Tris-HCl (pH7) 10 mM, Triton-X-100 40 mg/mL, ditiotretolo 10 mg/mL) (3), miscelati e lasciati agire a temperatura ambiente per 10 min. Sono stati poi aggiunti 100 µl di SDS 10% e 3 µl di PK ed incubati a 50 °C per 1 ora. Sono stati aggiunti 3 µl di RNase (4 mg/mL) ed incubato ancora per 1 ora a 37 °C. Il DNA è stato estratto come sopra.

Metodo D. I campioni di latte sono stati centrifugati alla massima velocità per 15 min. Lo strato di grasso superficiale è stato rimosso con un tampone ed il sovranatante è stato scartato. Il pellet è stato disciolto in 500 µl di soluzione fisiologica e sottoposto ad estrazione seguendo il metodo A.

Metodo E. I campioni di latte sono stati processati utilizzando il DNA Mini Kit Qiagen e seguendo il protocollo indicato dal produttore.

PCR. 2 µl di DNA estratto sono stati sottoposti ad amplificazione utilizzando il kit GoTaq Green Master Mix (Promega Corporation, Madison, WI) in 50 µl di volume finale. Due diversi test PCR sono stati eseguiti utilizzando due differenti coppie di primer. a) **coppia di oligonucleotidi B4/B5** (2) con i seguenti cicli di amplificazione: 95 °C per 2 min, seguito da 40 cicli a 95 °C per 30 sec, 60 °C per 30 sec, 72 °C per 30 sec, seguito poi da 10 min a 72 °C; b) **coppia di oligonucleotidi F4/R2** (6) con i seguenti cicli di amplificazione 95 °C per 2 min, seguito da 30 cicli a 95 °C per 30 sec, 54 °C per 90 sec, 72 °C per 30 sec, seguito poi da 10 min a 72 °C. 25 µl di ciascun amplificato sono stati visualizzati mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2%.

Prova di confronto

Allo scopo di confrontare la metodica di PCR prescelta, con l'esame batteriologico e la PCR Real-Time, sono stati raccolti

58 campioni di latte di bufala prelevati da bufale sierologicamente positive.

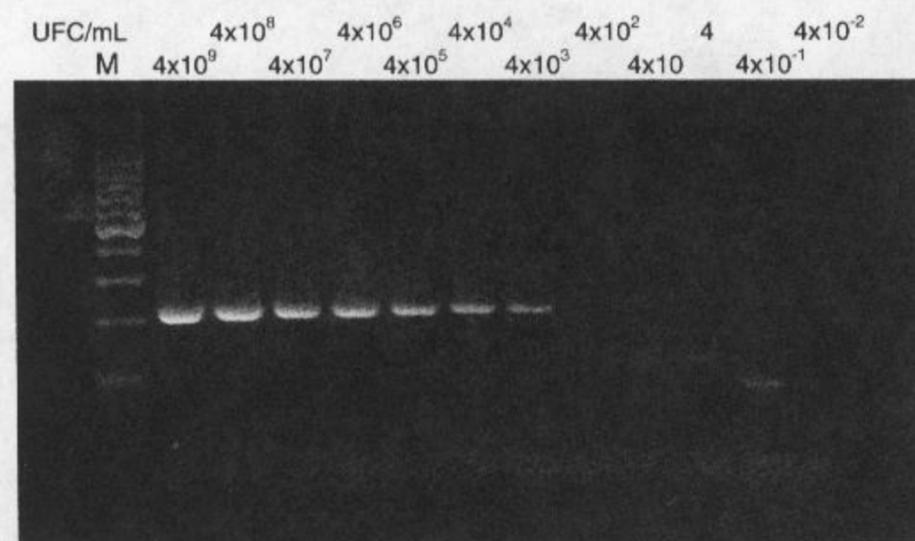
Esame microbiologico. I campioni di latte, sono stati saggiati, previa centrifugazione per 20' a 2000 rpm, per la ricerca di *Brucella* spp. mediante semina della panna e del sedimento, su terreno solido Agar Brucella (Oxoid Ltd., Hampshire, England) addizionato con Brucella Supplement (Oxoid Ltd., Hampshire, England) e siero equino al 5%. Le piastre sono state incubate a 37 °C in presenza di CO₂ per 10 giorni. La crescita di *Brucella* spp. è stata dimostrata mediante esame microscopico, sierologico e biochimico delle colonie (1).

PCR e Real-Time PCR. 2 µl di DNA estratto secondo il metodo A, sono stati sottoposti ad amplificazione utilizzando la coppia di oligonucleotidi B4/B5 ed utilizzando il kit GoTaq Green Master Mix (Promega) per la PCR tradizionale. Per la Real-Time PCR è stata utilizzata la stessa quantità di DNA estratto e la stessa coppia di oligonucleotidi. Sono stati utilizzati il kit Sensy Mix Bioline, in presenza del fluoroforo SYBR Green e lo strumento 7000 Real-Time PCR System della Applied Biosystems. Ciascun campione è stato testato in triplicato e parallelamente sono stati allestiti campioni non contenenti il DNA bersaglio. Per l'analisi dei dati è stato utilizzato il metodo della curva standard.

RISULTATI E DISCUSSIONE

Non sono disponibili ad oggi dati per la diagnosi molecolare di *Brucella* tramite saggio PCR sul latte di bufala, che si caratterizza per il suo alto contenuto in grasso. In questo studio abbiamo valutato cinque diversi metodi di estrazione del DNA e due test PCR su campioni di latte artificialmente contaminati con diluizioni scalari di *B. abortus* RB51. La coppia di oligonucleotidi B4/B5 è risultata 10 volte più sensibile rispetto alla coppia F4/R2, indipendentemente dal metodo di estrazione utilizzato. Il test PCR B4/B5 applicato ai campioni estratti con il metodo A ha permesso di evidenziare la presenza di *Brucella* fino alla concentrazione di batteri pari a 4x10³ UFC/mL; applicato a quelli estratti con il metodo E, ha consentito di visualizzare la presenza del batterio fino alla concentrazione di 4x10⁵ UFC/mL. Il test PCR B4/B5 applicato ai campioni estratti con i metodi B, C e D ha mostrato, invece, sensibilità intermedia, permettendo di evidenziare un segnale positivo fino a 4x10⁴ UFC/mL. Il saggio molecolare più sensibile è risultato, perciò, dalla combinazione del metodo di estrazione A con la coppia B4/B5 (Figura 1).

Figura 1. Sensibilità del saggio PCR con il metodo di estrazione A e la coppia B4/B5.



Dei 58 campioni di latte inizialmente sottoposti all'esame colturale, 36 sono risultati positivi per *Brucella* spp. Tutti i

campioni sono stati parallelamente sottoposti all'analisi molecolare utilizzando il saggio risultato più sensibile ed i risultati riportati in Tabella 1.

Tabella 1. Confronto fra esame batteriologico e molecolare (metodo A + PCR B4/B5) per la ricerca di *Brucella* spp.

| | | PCR | | Real-Time PCR | |
|---------|-----|-----|-----|---------------|-----|
| | | pos | neg | pos | neg |
| Colture | pos | 36 | 25 | 11 | 26 |
| | neg | 22 | 7 | 15 | 8 |

I campioni estratti con il metodo A, sono stati esaminati anche con la Real-Time PCR. Tale tecnica ha evidenziato un maggior numero di campioni positivi come riportato in Tabella 1.

In conclusione, i nostri risultati mostrano che il metodo batteriologico rappresenta il test più sensibile, seguito dalla Real-Time PCR che a sua volta consente un maggior recupero di campioni positivi rispetto alla PCR tradizionale. I saggi molecolari, probabilmente a causa della presenza di molecole inibitrici dell'enzima utilizzato nell'amplificazione ciclica, non sono in grado di rilevare come positivi tutti i campioni dai quali è stato possibile isolare *Brucella* spp. Viceversa taluni campioni risultati negativi al test microbiologico, appaiono come positivi ai saggi molecolari forse in virtù del fatto che questi ultimi sono in grado di evidenziare materiale genetico appartenente a corpi microbici non più vitali. I nostri dati dimostrano che solo attraverso l'utilizzo combinato di saggi tradizionali e molecolari, diviene possibile evidenziare o escludere, la presenza di *Brucella* spp. nel latte di bufala ottenendo un netto miglioramento delle performance diagnostiche.

BIBLIOGRAFIA

1. Alton, G. G., L. M. Jones, R. D. Angus, and J. M. Verger. 1988. Techniques for the Brucellosis Laboratory. Institut National de la Recherche Agronomique Publications. Paris, France.
2. Baily, G. C., J. B. Kraahn, B. S. Drasar, and N. G. Stoeker. 1992. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. J. Trop. Med. Hyg. 95:271-275.
3. Cremonesi, P., B. Castiglioni, G. Malferrari, I. Biunno, C. Vimercati, P. Moroni, S. Moranti, and M. Luzzana. 2006. Technical note: improved method for rapid DNA extraction of mastitis pathogens directly from milk. J. Dairy Sci. 89:163-169.
4. Guarino, A., L. Serpe, G. Fusco, A. Scaramuzza, and P. Gallo. 2000. Detection of *Brucella* species in buffalo whole blood by gene-specific PCR. Veterinary Record. 147:634-636.
5. Leal-Klevezas, D. S., I. O. Martinez-Vazquez, A. Lopez-Merino, and J. P. Martinez-Soriano. 1995. Single-step PCR for detection of *Brucella* spp. from blood and milk of infected animals. J. Clin. Microbiol. 33:3087-3090.
6. Romero, C., C. Gamazo, M. Pardo, and I. Lopez-Goni. 1995. Specific detection of Brucella DNA by PCR. J. Clin. Microbiol. 33:615-617.
7. Romero, C., and I. Lopez-Goni. 1999. Improved method for purification of bacterial DNA from bovine milk for detection of *Brucella* spp. by PCR. Appl. Environ. Microbiol. 65:3735-3737.