

ISOLAMENTO DI *ESCHERICHIA COLI* DA LINFONODI DI CARCASSE BOVINE E RICERCA DEL GENE *HLYA* TRAMITE PCR

Isolation of Escherichia coli from lymph nodes of bovine carcasses and detection of hlyA gene with PCR

Sechi P.*, Cambiotti V., Parmegiani S., Baldinelli C., Iulietto M.F., Cenci Goga B.

*Corresponding author. Tel: (+39) 075 585 7929; Fax: (+39) 075 585 7929. E-mail: cencigog@unipg.it
Master «Sanità pubblica veterinaria e igiene degli alimenti», Università degli Studi di Perugia

ABSTRACT

A potential source of pathogenic bacteria in ground beef is the lymphatic system, specifically the lymph nodes. The objective of the current study was to determine the prevalence of *Escherichia coli* in bovine lymph nodes. Bovine lymph nodes (n = 200) were collected from 100 carcasses at a commercial slaughterhouse. 192 lymph nodes sampled were obtained from 96 regular slaughter, and the remainder 8 were obtained from 4 emergency slaughter. Subiliaci lymph nodes were collected for this study. *E. coli* prevalence in the lymph node samples was high, with an overall prevalence of 59.00%. Lymph nodes from emergency slaughter carcasses had a higher prevalence (75.00%) of *E. coli* than did those from regular slaughter carcasses (58.33%). *hlyA* gene was never detected.

Keywords: lymph nodes, *Escherichia coli*, carcass, slaughter

INTRODUZIONE

La contaminazione delle carni da parte di batteri è responsabile di diverse migliaia di malattie alimentari ogni anno negli Stati Uniti (T. M. Arthur, et al., 2008). Il principale mezzo per ridurre e prevenire questo tipo di malattia consiste nell'identificare le fonti di contaminazione e minimizzarle o rimuoverle dal processo produttivo. Le pelli bovine sono state costantemente considerate come la principale fonte di patogeni che contaminano le carcasse. Alla luce di queste considerazioni, sono state proposte varie forme di interventi antimicrobici prima e dopo la macellazione (Antic, Blagojevic, & Buncic, 2011; Joseph, Xiangwu, Matthew, Dell, & Mohammad, 2005; Nou, et al., 2003; Terrance M. Arthur, et al., 2007). Queste azioni sono effettuate nelle strutture di lavorazione delle carni e risultano efficaci nel ridurre la contaminazione della carcassa. Tuttavia, anche dopo la realizzazione di questi interventi, batteri patogeni possono ancora essere isolati da alimenti quali la carne macinata: questo molto probabilmente evidenzia esistono altre fonti di contaminazione. Una possibile fonte di batteri patogeni per la carne bovina è il sistema linfatico ed in particolare i

linfonodi (T. M. Arthur, et al., 2008; Barkocyc-Gallagher, et al., 2003; Bonardi, Foni, Chiapponi, Salsi, & Brindani, 2007; Bosilevac, et al., 2004; Sofos, et al., 1999). Il sistema linfatico è coinvolto nelle funzioni immunitarie agendo con un meccanismo di filtrazione in grado di sequestrare batteri, virus e altri agenti estranei all'organismo al fine di permettere l'eventuale distruzione da parte dei linfociti. Esistono diverse segnalazioni relative a batteri isolati dai linfonodi di bovini al macello. In uno tra i primi studi, sono state isolate numerose specie di batteri nei linfonodi di bovino, asportati dalla regione della coscia e del collo (Lepovetsky, Weiser, & Deatherage, 1953). Sofos et al. hanno riferito una conta superiore a 1,000 CFU/g su piastre aerobie da un quarto di linfonodo mandibolare e parotideo ma non è stata identificata *Salmonella* in nessuno dei linfonodi campionati. In due studi, condotti in Australia negli anni '70, *Salmonella* è stata isolata da numerosi linfonodi meseraici, in particolare dai linfonodi cecali e digiunali (Samuel, O'Boyle, Mathers, & Frost, 1979; Samuel, O'Boyle, Mathers, & Frost, 1980). Samuel e al. notarono che nonostante *Salmonella* venisse isolata frequentemente dai linfonodi cecali e digiunali, quest'ultima non veniva mai rinvenuta dai linfonodi duodenali

dei medesimi animali (Samuel, et al., 1979). Queste e altre considerazioni simili spingono i ricercatori a concludere che una significativa diffusione di *Salmonella* attraverso i linfonodi meseraici non si realizzi (T. M. Arthur, et al., 2008; Cenci-Goga, et al., 2007; Anonymous, 2009). Molte delle ricerche effettuate finora si sono occupate dei linfonodi meseraici, i quali non si ritrovano nella carne macinata. I linfonodi meseraici vengono scartati al momento dell'eviscerazione perciò non rappresentano alcun rischio per la sicurezza alimentare. Numerosi altri linfonodi, immersi nel tessuto adiposo della carcassa, possono invece finire nei ritagli usati per la produzione di carne macinata. L'obiettivo del presente studio è quello di determinare la prevalenza di *Escherichia coli* isolati da linfonodi bovini potenzialmente destinati alla produzione di carne macinata.

MATERIALI E METODI

Raccolta dei campioni. I linfonodi bovini sono stati raccolti da carcasse di animali dei due sessi e di età compresa tra i 18 e i 24 mesi in un impianto commerciale, da Aprile a Luglio 2012. I linfonodi sono stati raccolti dal fianco. I linfonodi di questa regione sono stati utilizzati per questo studio perché fanno parte dei tessuti che possono essere utilizzati nella produzione di carne macinata. Il linfonodo subiliaco è stato ottenuto dal fianco. I linfonodi, 96 coppie da 96 carcasse di animali macellati regolarmente e 4 coppie da 4 animali macellati d'emergenza, sono stati asportati dopo il raffreddamento della carcassa. I linfonodi di ciascun animale sono stati raccolti da entrambe le mezzene, trasferiti in buste sterili e inviati al laboratorio in contenitori refrigerati. **Preparazione dei campioni.** All'arrivo in laboratorio, il grasso in eccesso e la fascia sono stati asportati da ogni linfonodo che è quindi stato sterilizzato superficialmente previo passaggio su fiamma per 3 secondi in movimento continuo. Ciascun linfonodo è stato tagliato in frammenti con un bisturi sterile. I pezzi di linfonodi sono quindi stati collocati in buste per stomacher ed omogeneizzato in Stomacher 400 (PBI, Milano) prima dell'allestimento delle diluizioni. Ricerca di *E. coli*. Sono state effettuate diluizioni decimali in acqua peptonata (PW Difco, Detroit, MI, USA) ed è stata usata la norma ISO 16649-1,2 (2001) con terreno TBX (Oxoid, Basingstoke, UK). Analisi dei dati. Per l'analisi dei dati è stato usato il test esatto di Fisher con software Graph Pad InStat 3 (<http://www.graphpad.com>). **PCR.** Per la rilevazione dei determinanti genetici che codificano per i principali fattori di virulenza, il DNA è stato estratto dalle colonie isolate, cresciute su agar sangue attraverso la tecnica della bollitura:

alcune colonie sono state prelevate e stemperate in 1 ml di PBS. La sospensione è stata centrifugata a 13,000 rpm per 7', quindi è stato eliminato il sovrantante ed il pellet, contenente i batteri, è stato risospeso in 100 µl di acqua bidistillata sterile e sottoposto a bollitura per 10'. Il DNA è stato recuperato previa centrifugazione per 2' a 13,000 rpm, quindi conservato a -20°C fino al momento della amplificazione. Le condizioni iniziali della miscela di reazione prevedevano i reagenti nelle seguenti concentrazioni finali: buffer di reazione 1X, 3 mM MgCl₂, 4 U di AmpliTaq Dna, 200 µM dNTP, 2mM di ciascun primer (MWG), per un volume totale di reazione di 50 µl comprendenti 2 µl del DNA dell'isolato. La reazione di PCR è stata effettuata in un Thermocycler Gene Amp, PCR System, 9700 Gold (Applied Biosystem). Per rilevare la reazione di PCR, gli amplificati sono stati analizzati mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio al 2% contenente bromuro di etidio (0,5µg/ml); sono stati caricati 10 µl di ogni campione PCR con 2 µl di loading buffer 6X (Fermentas-VWR- Italia) e 5 µl di marker-PCR come DNA di riferimento (Fermentas-VWR- Italia); la corsa è stata effettuata ad un voltaggio di 100V per circa 1 ora in TBE 1X (Trizma base, Acido Borico, EDTA 0.5M pH 8). Al termine della corsa le bande sono state visualizzate con il transilluminatore a raggi UV (Fotodine 3-3102 Celbio). Condizioni di amplificazione: primer hly-f acg atg tgg ttt att ctg ga; hly-r ctt cac gtg acc ata cat at, amplificato 165 bp, 95°C per 3'; 95°C per 20", 58°C per 40", 72°C per 90" (35 cicli) e 72°C per 5'.

RISULTATI

I risultati sono mostrati nella Tabella 1. Di 200 linfonodi bovini, prelevati da 100 carcasse, 192 linfonodi campionati sono stati ottenuti da 96 macellazioni regolari, e i rimanenti 8 sono stati ottenuti da quattro macellazioni d'urgenza. La prevalenza di *E. coli* in campioni linfonodali è stata elevata, con una prevalenza globale del 67,12%. I linfonodi da carcasse di macellazione d'urgenza avevano una prevalenza del 75,00%, mentre quelli delle carcasse di macellazioni regolari del 58,33%. In nessun campione analizzato è stato evidenziato il gene hlyA codificante per l'entero-emolisina.

DISCUSSIONE

I nostri risultati, sebbene preliminari (la ricerca sarà conclusiva dopo un anno di raccolta campioni e dopo il raggiungimento di 1000 campioni) indicano che la presenza di *E. coli* nei linfonodi che restano nella carcassa dopo la toelettatura possono rappresentare un'importante fonte

di contaminazione delle carni, soprattutto se queste sono usate per la produzione di carne macinata. Sebbene la prevalenza appaia maggiore in carcasse provenienti da macellazioni d'emergenza, il test esatto di Fisher, a causa dell'esiguità dei campioni non ha mostrato differenze significative. In un recente studio Cobbold (Anonymous, 2009) ha generato dati sui livelli tipici della contaminazione batterica nei linfonodi della testa e del torace di bovini. I batteri sono stati isolati da pool di linfonodi raccolti da 534 bovini. La prevalenza di *E. coli* era del 57% nei linfonodi della testa e del collo e del 75% della pancia. Geni shiga like di *E. coli* sono stati rilevati nel 3,8% dei campioni (7,3% dei bovini) e sono stati isolati due *E. coli* O157: H7 (ciascuno da un animale diverso). Questi risultati sono coerenti con uno studio analogo negli Stati Uniti (Sofos, et al., 1999) che ha isolato *E. coli* anche da linfonodi della testa. Il nostro studio sta dimostrando che il livello di contaminazione dei linfonodi va tenuto in considerazione, anche alla luce dell'imminente revisione delle procedure per l'ispezione post mortem delle carni.

BIBLIOGRAFIA

1. Arthur, T. M., Brichta-Harhay, D. M., Bosilevac, J. M., Guerini, M. N., Kalchayanand, N., Wells, J. E., Shackelford, S. D., Wheeler, T. L., & Koohmaraie, M. (2008). Prevalence and characterization of Salmonella in bovine lymph nodes potentially destined for use in ground beef. *J Food Prot*, 71(8), 1685-1688.
2. Antic, D., Blagojevic, B., & Buncic, S. (2011). Treatment of cattle hides with Shellac solution to reduce hide-to-beef microbial transfer. *Meat Sci*, 88(3), 498-502.
3. Joseph, M. B., Xiangwu, N., Matthew, S. O., Dell, M. A., & Mohammad, K. (2005). Development and Evaluation of an On-Line Hide Decontamination Procedure for Use in a Commercial Beef Processing Plant. *Journal of Food Protection*, 68(2), 265-272.
4. Nou, X., Rivera-Betancourt, M., Bosilevac, J. M., Wheeler, T. L., Shackelford, S. D., Gwartney, B. L., Reagan, J. O., & Koohmaraie, M. (2003). Effect of Chemical Dehairing on the Prevalence of Escherichia coli O157:H7 and the Levels of Aerobic Bacteria and Enterobacteriaceae on Carcasses in a Commercial Beef Processing Plant. *Journal of Food Protection*, 66(11), 2005-2009.
5. Arthur, T. M., Bosilevac, J. M., Brichta-Harhay, D. M., Kalchayanand, N., Shackelford, S. D., Wheeler, T. L., & Koohmaraie, M. (2007). Effects of a Minimal Hide Wash Cabinet on the Levels and Prevalence of Escherichia coli O157:H7 and Salmonella on the Hides of Beef Cattle at Slaughter. *Journal of Food Protection*, 70(5), 1076-1079.
6. Barkocy-Gallagher, G. A., Arthur, T. M., Rivera-Betancourt, M., Nou, X., Shackelford, S. D., Wheeler, T. L., & Koohmaraie, M. (2003). Seasonal Prevalence of Shiga Toxin-Producing Escherichia coli, Including O157:H7 and Non-O157 Serotypes, and Salmonella in Commercial Beef Processing Plants. *Journal of Food Protection*, 66(11), 1978-1986.
7. Bonardi, S., Foni, E., Chiapponi, C., Salsi, A., & Brindani, F. (2007). Detection of verocytotoxin-producing Escherichia coli serogroups O157 and O26 in the cecal content and lymphatic tissue of cattle at slaughter in Italy. *J Food Prot*, 70(6), 1493-1497.
8. Bosilevac, J. M., Arthur, T. M., Wheeler, T. L., Shackelford, S. D., Rossman, M., Reagan, J. O., & Koohmaraie, M. (2004). Prevalence of Escherichia coli O157 and Levels of Aerobic Bacteria and Enterobacteriaceae Are Reduced When Hides Are Washed and Treated with Cetylpyridinium Chloride at a Commercial Beef Processing Plant. *Journal of Food Protection*, 67(4), 646-650.
9. Sofos, J. N., Kochevar, S. L., Bellinger, G. R., Buege, D. R., Hancock, D. D., Ingham, S. C., Morgan, J. B., Reagan, J. O., & Smith, G. C. (1999). Sources and Extent of Microbiological Contamination of Beef Carcasses in Seven United States Slaughtering Plants. *Journal of Food Protection*, 62(2), 140-145.
10. Lepovetsky, B. C., Weiser, H. H., & Deatherage, F. E. (1953). A microbiological study of lymph nodes, bone marrow and muscle tissue obtained from slaughtered cattle. *J. Appl. Microbiol.*, 57-59, 57-59.
11. Samuel, J. L., O'Boyle, D. A., Mathers, W. J., & Frost, A. J. (1979). Isolation of Salmonella from mesenteric lymph nodes of healthy cattle at slaughter. *Res. Vet. Sci.*, 28, 238-241.
12. Samuel, J. L., O'Boyle, D. A., Mathers, W. J., & Frost, A. J. (1980). Distribution of Salmonella in the carcasses of normal cattle at slaughter. *Res. Vet. Sci.*, 28, 368-372.
13. Cenci-Goga, B. T., Miraglia, D., Ranucci, D., Branciarri, R., Budelli, L., McCrindle, C. M., Cioffi, A., & Mammoli, R. (2007). An in vitro system for the comparison of excision and wet-dry swabbing for microbiological sampling of beef carcasses. *J Food Prot*, 70(4), 930-936.

14. Anonymous. (2009). Changes to the post mortem procedure for cattle on account of Australia's bovine tuberculosis free status.

access date:
http://www.daff.gov.au/__data/assets/pdf_file/0003/1715484/Attachment-D1.pdf.

Tabella 1. Prevalenza di linfonodi positivi in carcasse di animali provenienti da macellazione ordinarie e d'urgenza.

Fisher's Exact Test

The two-sided P value is 0,6422, considered not significant.
 The row/column association is not statistically significant.

Odds Ratio
 Odds ratio= 0,4667
 95% Confidence Interval: 0,04680 to 4,654
 (using the approximation of Woolf.)

Data analyzed

	regolari	emergenza	Total
+	56 (56%)	3 (3%)	59 (59%)
-	40 (40%)	1 (1%)	41 (41%)
Total	96 (96%)	4 (4%)	100 (100%)