

Salmonella: patogenesi, epidemiologia e diagnostica

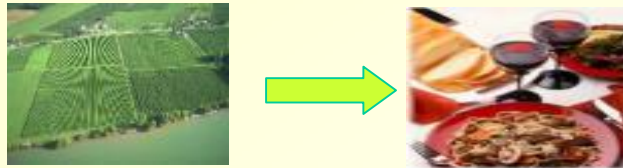
Elisabetta Delibato

Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Sicurezza Alimentare

Istituto Superiore di Sanità

From farm to fork

L'unione Europea per rispondere alle paure del consumatore ha attuato una serie di misure e di metodologie per garantire la sicurezza degli alimenti "dai campi alla tavola".



Regolamento C.E. 178/2002 che fissa le procedure nel campo della sicurezza alimentare

Regolamenti igiene

- 852/2004 – Igiene dei prodotti alimentari
- 853/2004 - Norme specifiche in materia di igiene degli alimenti di origine animale
- 854/2004 – Norme specifiche per l'organizzazione dei controlli ufficiali
- 882/2004 – Controlli ufficiali per la verifica della conformità alla normativa in materia di mangimi e alimenti

Le tossinfezioni alimentari rappresentano un serio problema di sanità pubblica per la loro relativa frequenza e per l'alto numero di soggetti che possono essere colpiti in un singolo evento epidemico.

Comprendono manifestazioni patologiche in genere a carattere gastroenterico acuto, alla cui origine vi è il consumo di cibi contaminati da microrganismi patogeni e/o loro metaboliti tossici.

La salmonella è il patogeno più frequentemente responsabile di epidemie di origine alimentari, costituendo un grave problema di sanità pubblica anche nei paesi industrializzati

Gli alimenti che possono agire da veicolo dell'infezione sono: carni, pollame, uova ed i loro derivati, che se contaminati all'origine e non sottoposti ad adeguato trattamento termico, costituiscono un terreno di crescita ideale per i batteri

Il genere *Salmonella* è distinto in due sole specie:

S. enterica e *S. bongori*

La specie *enterica* è a sua volta suddivisa in sei sottospecie.

Oggi si conoscono più di 2400 sierotipi della specie *enterica*

La *Salmonella* è

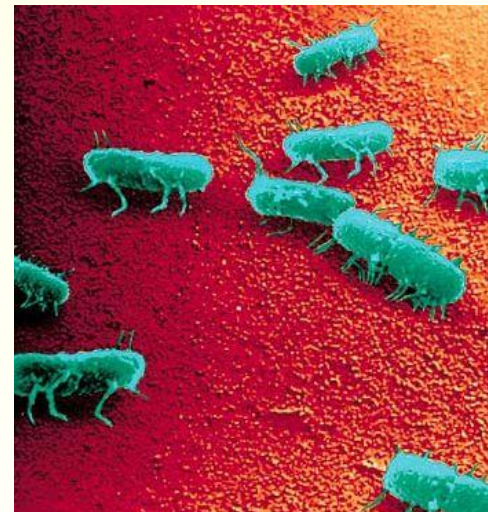
un bastoncello gram-negativo

asporigeno

mobile per la presenza di flagelli

Catalasi positivo

Ossidasi negativo



Caratteristiche fisiche

ü **Salmonella** è un microrganismo che si sviluppa bene a temperatura ambiente e ancora meglio a **35-43° C**

ü Possiede un intervallo di temperatura utile alla moltiplicazione compreso **tra +5,2 e +46 °C**, il freddo ne rallenta lo sviluppo

ü Non viene inattivata dal congelamento

ü L'intervallo di pH per sviluppare è limitato **fra 3,8 e 9,5**



üViene uccisa dal calore e basta portare il cibo a 70°C per un quarto d'ora per causare la morte delle salmonelle eventualmente presenti.

üViene uccisa dalla pasteurizzazione e non produce tossine termoresistenti

üE' sensibile ai più comuni disinfettanti (alcool, mercurrocromo, ipoclorito di sodio, acido fenico, formaldeide, acqua ossigenata..)



Caratteristiche biochimiche

Tipico profilo biochimico della Salmonella

Reazione	Risultato	Reazione	Risultato
<i>Produzione di indolo</i>	-	<i>Idrolisi dell'urea</i>	-
<i>Rosso metile</i>	+	<i>Voges-Proskauer</i>	-
<i>Riduzione dei nitrati</i>	+	<i>Fermentazione del glucosio+gas</i>	+
<i>Produzione di H₂S</i>	+	<i>Fermentazione del lattosio</i>	-
<i>Fermentazione del saccarosio</i>	-	<i>Fermentazione di salicina</i>	-
<i>Fermentazione di adonite</i>	-	<i>Fermentazione di mannite</i>	+
<i>Fermentazione del maltosio</i>	+	<i>Fermentazione di inosite</i>	-
<i>Fermentazione del sorbite</i>	+	<i>Liquefazione della gelatina</i>	-
<i>Sviluppo con NH₄ citrato</i>	+	<i>Sviluppo con KCN</i>	-



Caratteristiche antigeniche

La Salmonella possiede numerosi antigeni e tra questi quelli più conosciuti sono:

- ▼ antigeni somatici (O), termostabili e resistenti all'azione di acidi e alcool,
- ▼ antigeni ciliari (H) termolabili,
- ▼ antigene Vi che dà virulenza

Le caratteristiche antigeniche permettono di differenziare i diversi sierotipi



Epidemiologia

In Italia, le infezioni umane da *Salmonella* sono soggette a notifica obbligatoria al SSN

ü I dati riportati nel bollettino epidemiologico del Ministero della Salute mostrano:

10-15.000 casi di salmonellosi per anno

50% dei focolai epidemici di tossinfezione alimentare sia sostenuto da *Salmonella*

ü La mortalità causata da infezioni da *Salmonella* è di circa 20 decessi annui e principalmente in soggetti anziani

ü I sierotipi isolati più frequentemente isolati nell'uomo, negli ultimi anni, sono *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*

Il sierotipo maggiormente isolato in Europa e negli Stati Uniti risulta ancora la S. Enteritidis

Negli Stati Uniti, si stimano da 2 a 4 milioni di casi su base annua:

• si è osservato un picco di isolati di SE dal 1995 (3.8 per 100,000);

• successivamente, si è assistito un calo che si è attestato su una cifra costante a partire dal 1999 (circa 1.9 casi per 100,000).

• in totale, nel periodo 1990-2001, 677 focolai di SE sono stati riportati da varie autorità locali, con 1,988 ricoveri e 33 morti.

Episodi epidemici

- Tra maggio e giugno 2001, in Queensland (Australia) **41 casi** di salmonellosi dovuti a *Salmonella bovis* moribundans. La fonte è stata individuata in una specifica catena di ristoranti ed in un alimento a base di **insalata**. Presso il produttore di insalata, si è trovato che una **macchina usata nella produzione** (per il taglio) era contaminata.

- Nel dicembre 2001, **28 persone** si sono ammalate dopo aver mangiato in un ristorante coreano in Australia meridionale. Il cibo incriminato era un **budino al mango**. Si è concluso che il dipendente, che si era ammalato due giorni prima, sia stato il responsabile.

• Agosto 2002, 141 persone si sono ammalate di salmonellosi, con 18 casi confermati analiticamente, dopo aver mangiato **pomodori confezionati tagliati a dadini**, in sei diversi ristoranti in Florida. Poiché vi era in concomitanza un evento sportivo per trapiantati di organo, molti di loro, una categoria a grande rischio, si sono ammalati.



• Tra settembre e dicembre 2002, in Inghilterra sono state riportate alle autorità 23 focolai, rispetto a 36 nell'intero 2001; in quel breve periodo del 2002, vi furono più di 1000 casi con 17 morti tra gli infetti; tre focolai furono nazionali, con 450 casi. Si è scoperto, con una grossa investigazione di 8501 uova, che **la causa erano uova spagnole** usate nelle mense.



- A Posillipo (Napoli), ai primi di luglio 2002, 128 di 300 partecipanti ad un banchetto nuziale sono stati colpiti da salmonellosi.

L'indagine epidemiologica ha fatto sospettare che il veicolo del patogeno fosse la **salsa olandese** (servita insieme ad una spigola), preparata con uova fresche lasciate per 5 ore a temperatura ambiente (oltre i 30°C). Almeno 3 persone sono state ricoverate e altre 9 si sono rivolte al pronto soccorso.



MANIFESTAZIONI CLINICHE

Il periodo di incubazione è molto breve: solitamente dopo **12-18 ore** dall'ingestione dell'alimento contaminato compaiono i principali sintomi:

- ü Dolori addominali
- ü Nausea e vomito
- ü Febbre
- ü Diarrea



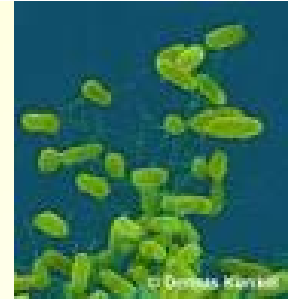
Nei soggetti debilitati, nei lattanti e nei bambini la sintomatologia può essere dominata dai segni della **disidratazione** ed assumere un decorso più grave

ü Il periodo di contagiosità è estremamente variabile, **da diversi giorni a parecchie settimane** e pare significativamente influenzato dalla assunzione di antibiotici, che aumenterebbero i tempi di eliminazione del patogeno

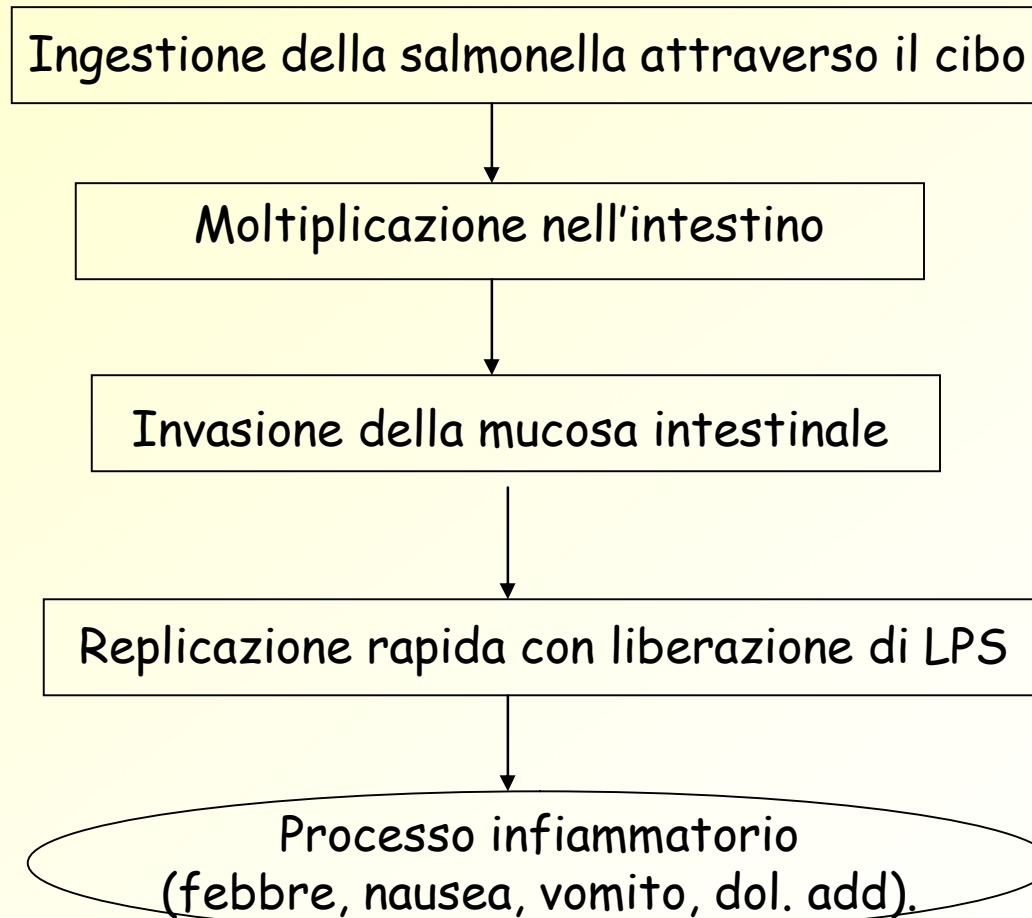
ü A volte uno stato temporaneo di portatore persiste **per mesi** e durante questo periodo le salmonelle vengono eliminate con le feci anche in assenza di sintomi

ü Per tale motivo per definire completamente guarita la persona occorre che la stessa effettui tre esami delle feci a giorni alterni con esito negativo

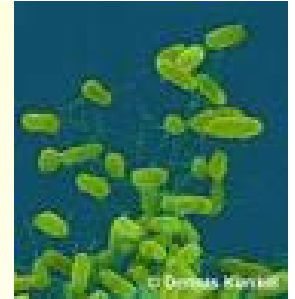
Patogenesi delle infezioni da Salmonella



E' un fenomeno complesso e multifattoriale:



Dopo 15 h insorge la diarrea con feci molli e acquose con tracce di muco e sangue



ü Avvenuta l'ingestione del germe, lo sviluppo di un'infezione sintomatica dipende dal numero di batteri ingeriti (dose minima infettante 10^2 - 10^3 cellule), ma può variare nei diversi sierotipi e in dipendenza delle condizioni dell'ospite.

ü Nei neonati e negli adulti immunocompromessi si assiste talvolta al **passaggio da una forma enterica ad una sistemica** con complicanze a livello di vari organi.

Le salmonelle **possiedono** diversi **fattori di virulenza**, necessari ad attuare tutte le varie fasi dell'infezione:

- **Sistemi di difesa** che permettono la sopravvivenza in ambienti a pH acido, utili per superare la barriera gastrica

- **Fattori** che intervengono al momento della colonizzazione dell'intestino, permettendo al batterio di aderire efficacemente alle cellule del lume intestinale

- **Fattori** che consentono di attraversare l'epitelio intestinale e di sopravvivere nei macrofagi

Ognuno di questi fattori è codificato da geni strutturali, di modificazione e di regolazione.

Le salmonelle sono in grado di elaborare :

Ø **una tossina termolabile** di natura proteica prodotta dalla membrana batterica, **capace di alterare la morfologia della mucosa intestinale**

Ø **un lipopolisaccaride** dotato di proprietà endotossica e di **resistenza alla lisi**

Terapia



ü **La terapia antibiotica**, anche se breve, (con chinoloni, amoxicillina, cotrimoxazolo) non riduce la durata dei sintomi e non elimina lo stato di portatore fecale;

ü Sono invece state osservate un numero significativamente maggiore di **coproculture positive** nei soggetti trattati con terapia antimicrobica

ü **Il trattamento antibiotico** dell'episodio acuto, va protratto per non più di 3 giorni.

Fattori di rischio

L'infezione da salmonella si trasmette per via oro-fecale.

ü Gli alimenti contaminati rappresentano quindi uno dei veicoli più importanti di diffusione per l'uomo.



ü In particolare, sono a rischio:

le uova crude o poco cotte, derivati a base di uova, latte crudo e derivati dal latte crudo (compreso il latte in polvere), acqua contaminata, carne e derivati (anche lavorati, ma anche bistecche, filetti bovini e carne di maiale) polli e derivati (specie se poco cotto), salse e condimenti per insalate, dolci alla crema, gelato, latte artificiale, cacao, vegetali crudi....



ü Fattori di rischio sono anche le superfici e gli utensili contaminati, l'abuso della temperatura, la **contaminazione crociata**.

ü Negli **animali da fattoria**, la **trasmissione** è mediata da mangimi e fertilizzanti, preparati da avanzi di carni, ossa o pesce contaminati.

ü Negli animali l'infezione si diffonde durante l'allevamento o l'abbattimento.

La PREVENZIONE delle salmonellosi prevede:

Applicazione di misure igieniche atte a prevenire o almeno limitare la contaminazione oro-fecale

ü **Controllo** sulle fonti di approvvigionamento idrico e sulle acque di balneazione



ü **Riconoscimento** dei portatori nell'ambito del personale ospedaliero e degli addetti alle industrie alimentari

ü **Proteggere gli alimenti dal contatto con le mosche** (veicoli importanti di contaminazione)

ü **Cuocere** con cura tutti i cibi di origine animale in modo particolare pollame, maiale, uova, prodotti derivati dalle uova, piatti a base di carne e i frutti di mare di qualunque tipo

ü Evitare il contatto tra gli alimenti di diverso genere, tra i cibi cotti e crudi, ponendo attenzione agli utensili usati, stoviglie e i piani di lavoro



ü **Lavare** i vegetali accuratamente con acqua potabile prima del consumo

Regolamento (CE) 2073/2005 (1441/2007)

Criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari

- Tale regolamento entra in vigore il 01.01.06 a complemento della 852/2004
- Il regolamento sostituisce le precedenti normative della UE che riportano criteri microbiologici
- . Per gli alimenti ove non siano stabiliti i criteri gli stati membri possono avere criteri nazionali.

Per evitare interpretazioni divergenti è opportuno fissare criteri armonizzati di sicurezza relativi all'accettabilità dei prodotti alimentari ed indicare il metodo di riferimento per l'analisi dei microrganismi patogeni



Autocontrollo (D.Lvo 155/97) 852/04



Controllo ufficiale 854/04

L'azienda è responsabile
della garanzia igienico
sanitaria della:



Il controllo ufficiale deve
valutare le azioni che
l'azienda promuove per
garantire la "continuità" dei
suoi standard igienici

- Produzione primaria
- Trasformazione
- Distribuzione
- Vendita al dettaglio
- Ristoratori

Gli alimenti non devono contenere un pericolo microbiologico in
quantità tali da presentare un rischio inaccettabile per la salute umana

Destinatari dei criteri microbiologici

Tab. Criteri di sicurezza alimentare

Categoria alimentare	Microrganismi/ loro tossine, metaboliti	Piano di campionamento		Limiti		Metodo di analisi di riferimento	Fase a cui si applica il criterio
		n	c	m	M		

Metodo utilizzato (art. 5)

Utilizzo di un metodo alternativo (rapido) di cui è dimostrata l'equivalenza mediante validazione secondo la norma EN/ISO 16140:2005

PROTOCOLLO TECNICO DI VALIDAZIONE DI UN METODO ALTERNATIVO (ISO EN 16140)

Criteri da testare sulle metodiche alternative in funzione del metodo (qualitativo o quantitativo):

precisione relativa in rapporto al metodo di riferimento;
accuratezza;
sensibilità;
specificità;
limite minimo di rilevabilità;
limite minimo di quantificazione;
praticabilità ed applicabilità;
possibili condizioni modificative (robustezza).

I principi del protocollo tecnico si basano su:

- Studio comparativo dei metodi alternativi, in rapporto al metodo di riferimento, realizzato all'interno del laboratorio organizzatore
- Studio interlaboratorio (studio collaborativo) di ciascuno dei due metodi, che deve essere realizzato in almeno 10 laboratori diversi

METODICHE APPLICABILI ALLA DETERMINAZIONE DI SALMONELLE NEGLI ALIMENTI

- **Metodiche tradizionali** affidabili ma lunghe: hanno l'obiettivo di isolare o numerare, mediante l'impiego di terreni colturali, i microrganismi presenti nei campioni da sottoporre ad analisi
- **Metodiche rapide** presentano il vantaggio di potere ottenere i risultati in 24 ore e consentono di prendere misure tempestive, ai fini del:
 - controllo delle materie prime
 - rilascio dei prodotti
 - sistema di allerta
 - verifica dei piani HACCP (criteri di processo e di sicurezza)
 - controllo ufficiale
 - rintracciabilità di un microrganismo in un prodotto

Metodi analitici

Metodi tradizionali

- Prearricchimento
- Arricchimento
- Isolamento
- Identificazione e conferma



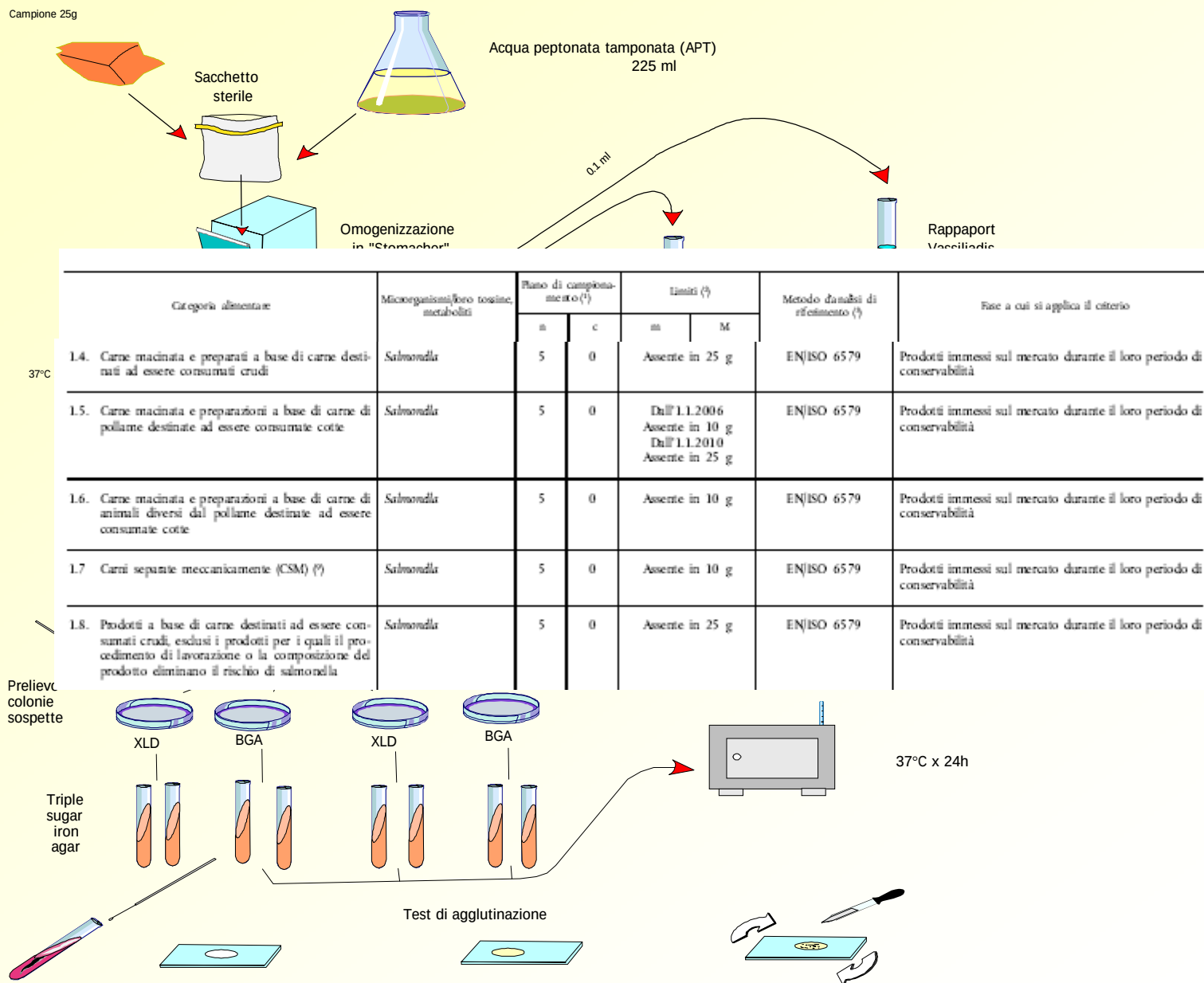
Metodi rapidi ed innovativi

- Metodi immunologici che si basano su reazioni Ag-Ab supportati da vari sistemi di rivelazione
- Metodi biomolecolari
(PCR e PCR Real time)

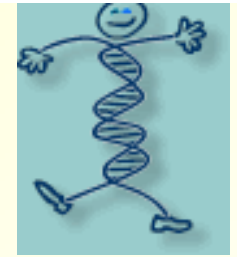


Langton S.D. et al. Int. J. Food Microb. 2002, 79, 175-181
Orefice L. et al. Industrie Alimentari 2004, 442, 1257-1275

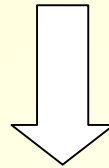
Ricerca della Salmonella negli alimenti: Metodo ISO 6579:2002/Corr.1:2004



Metodi biomolecolari



Basati sullo studio di specifiche sequenze geniche (DNA/RNA) dell'agente patogeno da ricercare



Polymerase Chain Reaction (PCR)

K. Mullis 1983-1993 Premio Nobel per la Chimica

Reazione enzimatica di amplificazione in vitro di un segmento specifico di DNA, ottenuta per mezzo di una Taq polimerasi a partire da una coppia di primers specifici

Progetti Europei



5th Framework

- FoodPCR 1
validazione metodi di PCR
per la determinazione
dei batteri patogeni

6th Framework

- FoodPCR 2
validazione metodi di PCR real time
per la determinazione
dei batteri patogeni

Batteri considerati

Salmonella spp.

L. monocytogenes

Campylobacter spp.

E. coli O:157

Yersinia enterocolitica

Norme ISO

Polymerase chain reaction for the detection of food-borne pathogens

- **UNI EN ISO 22174:2005** General requirements and definitions.
- **ISO/TS 20836:2005** Performance testing for thermal cyclers
- **ISO 20837:2006** Requirements for samples preparation for qualitative detection
- **ISO 20838:2006** Requirements for amplification and detection for qualitative methods
- **ISO DIS 22118:2008** Performance characteristics of molecular detection methods

Ricerca di patogeni negli alimenti mediante PCR

UNI EN ISO 22174:2005

- **Percorso analitico**
 1. arricchimento della matrice contenente i germi patogeni
 2. estrazione e purificazione degli acidi nucleici
 3. amplificazione del target utilizzando i primers specifici
 4. determinazione dei prodotti della PCR
- **Organizzazione delle aree di lavoro**
- **Controlli da effettuare**

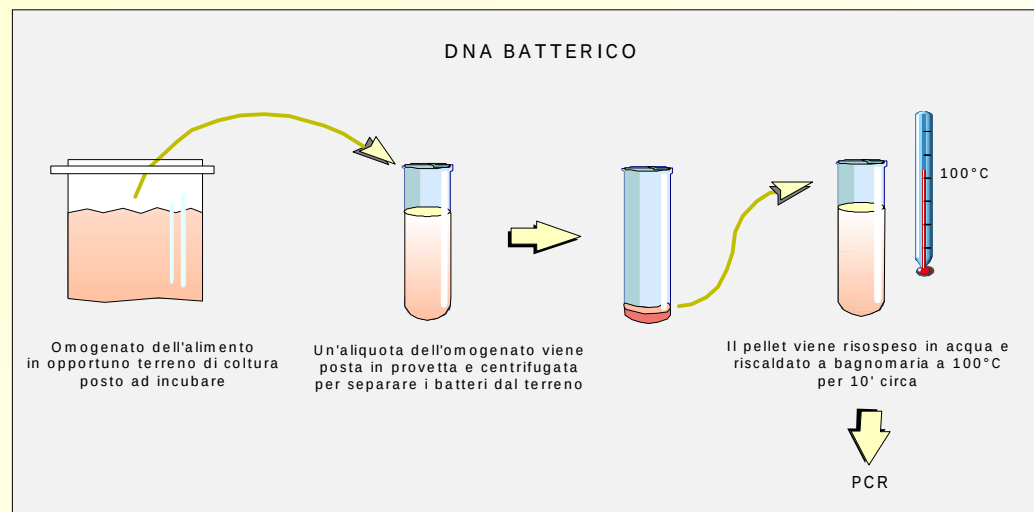
	Controllo negativo trattamento	Controllo positivo trattamento	Controllo negativo estrazione	Controllo interno amplifica zione	Controllo positivo PCR	Controllo negativo PCR
Trattamento campione	↓	↓				
Estrazione DNA	↓	↓	↓			
Amplificazione	↓	↓	↓	↓	↓	↓
Determinazione	↓	↓	↓	↓	↓	↓



Estrazione di DNA batterico

- trattamento termico a elevate temperature
- detergenti ed enzimi (proteinasasi K); trattamento con fenolo-cloroformio
- lisi alcalina
- colonnine nucleospin

Chelex 100



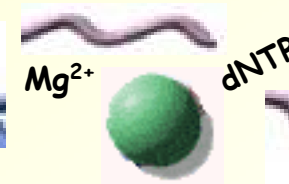
De Medici et al., Appl. Environ. Microbiol. 2003, 69: 3456-3461
Hoorfar et al., APMIS, 2004, 112, 808-814.



COMPONENTI di una REAZIONE di PCR



Stampo $\Rightarrow$ DNA a doppio filamento



Primers $\Rightarrow$ Oligonucleotidi complementari a regioni dei filamenti opposti che fiancheggiano la sequenza DNA bersaglio

Deossiribonucleotidi trifosfati $\Rightarrow$ Miscela equimolare di dATP, dTTP, dGTP, dCTP

Tampone contenente cloruro di magnesio $\Rightarrow$ Lo ione Mg^{2+} è essenziale per il funzionamento dell'enzima

Enzima $\Rightarrow$ Tradizionalmente viene usata la *Taq* polimerasi, enzima termostabile estratto dal batterio termofilo *Thermus aquaticus*



Le FASI della PCR

DENATURAZIONE:

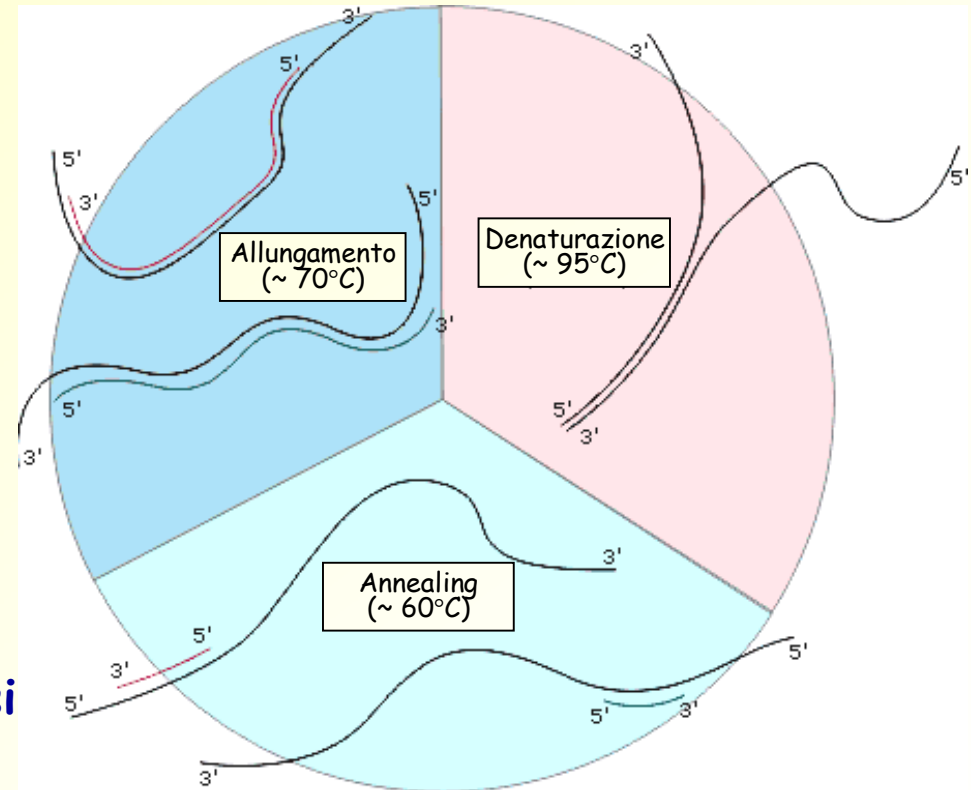
Il DNA viene denaturato mediante riscaldamento in provetta a $\sim 92-95^{\circ}\text{C}$

ANNEALING:

La miscela viene raffreddata fino a raggiungere la temperatura che garantisce la specifica ibridazione dei primers alle regioni dello stampo ad essi complementari

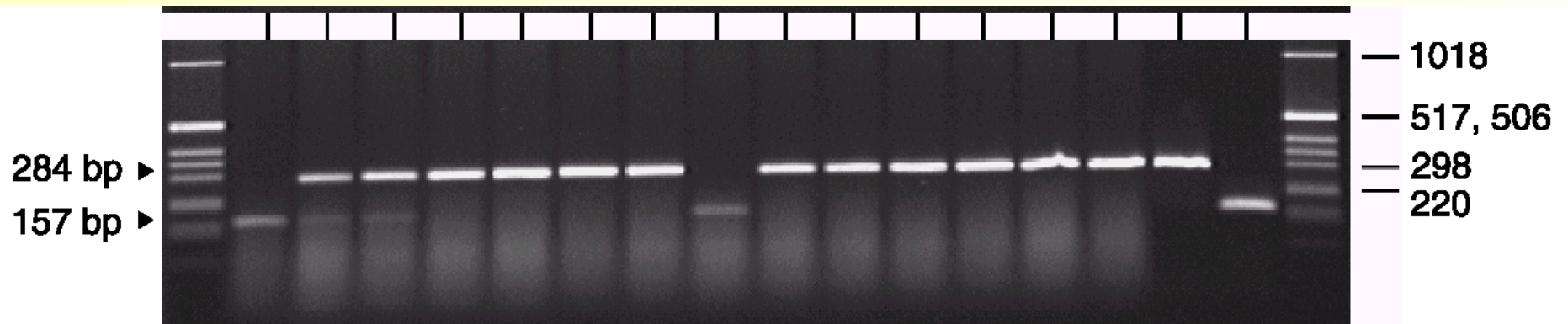
ALLUNGAMENTO:

La temperatura della miscela viene portata a $68-72^{\circ}\text{C}$ consentendo alla *Taq* polimerasi termostabile di sintetizzare il filamento complementare allo stampo a partire dall'innesco oligonucleotidico





Validazione della PCR per la determinazione della Salmonella nel pollame (regione primers *inv A*)



Malorny, 2004. Multicenter validation of PCR-based method for detection of Salmonella in chicken and pig samples. J AOAC Int 87:861-6.



Campioni di pollame contaminati da Salmonella- Ricerca mediante PCR



Marker bp 100, 1-2 campioni positivi, 3-4 campioni negativi, +=controllo positivo, -=controllo negativo

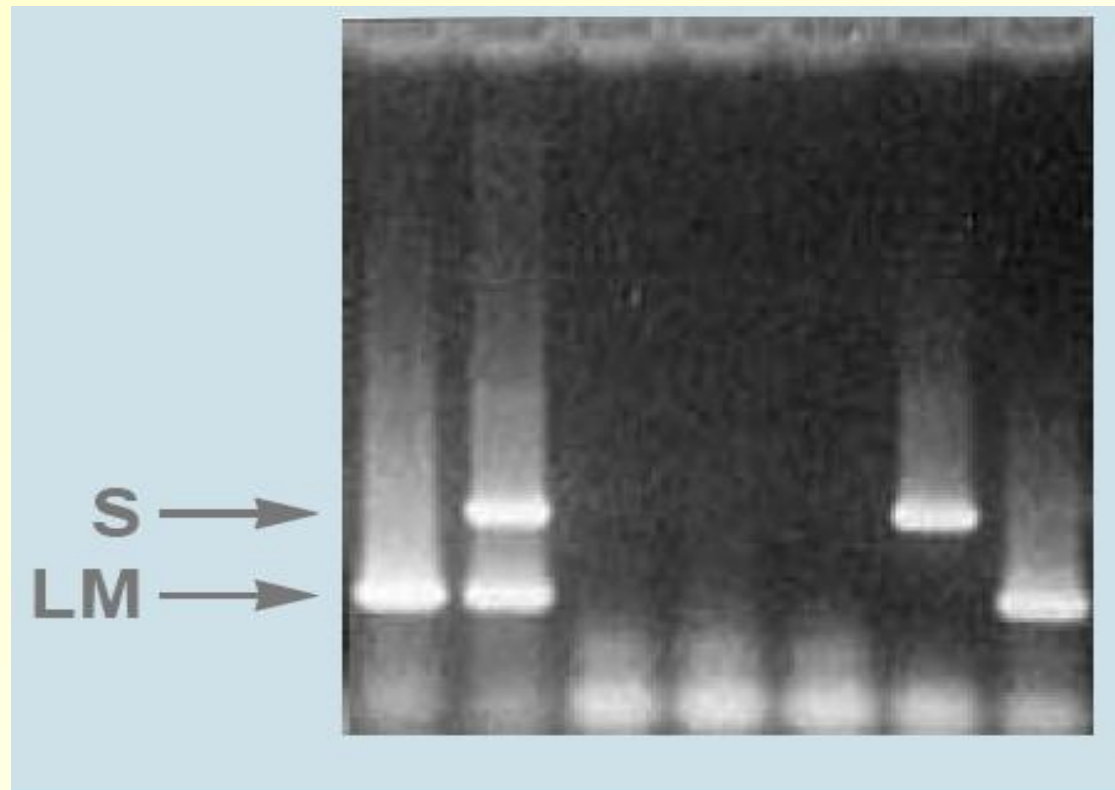
Multiplex PCR

Vi sono due o più sequenze-bersaglio
nel DNA contenuto nel campione da analizzare
Trova applicazione in varie situazioni diagnostiche:

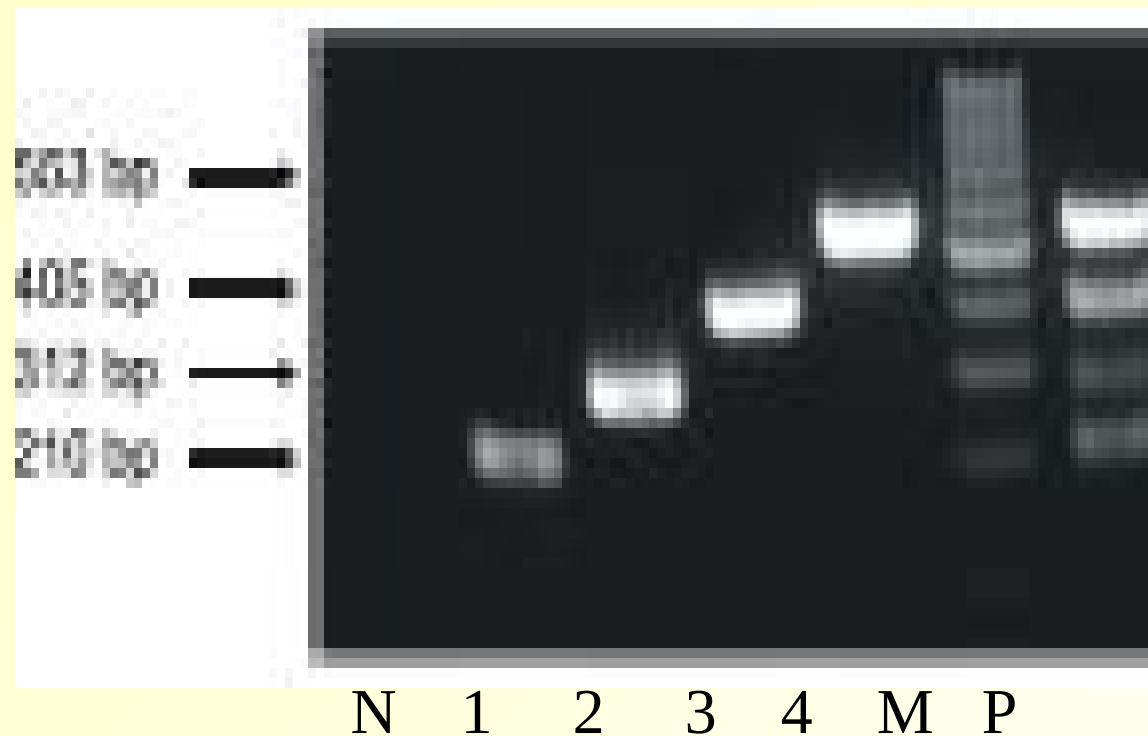
- Identificare contemporaneamente una specie microbica e la presenza di uno o più sierotipi (es. *Salmonella enterica*, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium*; *Listeria spp.* e *Listeria monocytogenes*)
- Accertamento simultaneo di due o più specie microbiche nel campione (*Salmonella spp.*, *Listeria spp.*)

Vengono prodotti contemporaneamente e nella stessa provetta diversi amplificati, grazie all'impiego di diverse coppie di primers, ciascuna specifica per un determinato bersaglio

Multiplex PCR per la determinazione contemporanea di *L. monocytogenes* e *Salmonella*



La figura mostra l'esempio dell'analisi condotta su tre campioni di carne trita di manzo. In questo caso un campione era stato contaminato con *Listeria monocytogenes* (corsia 1), uno con entrambe i batteri (corsia 2) e uno non era stato inoculato (corsia 3).



Multiplex PCR per la determinazione di:

L. Monocytogenes (lane 1)
S. Aureus (lane 2)
E. Coli O157 (lane 3)
Salmonella (lane 4)

Park et al. J. Microb. 2006, 44, 92-97

Making Internal Amplification Control Mandatory for Diagnostic PCR

Necessità di validare attraverso ring trial internazionali solo metodi che includono la presenza di Internal Amplification Control (IAC).

Una reazione di PCR negativa può essere dovuta a vari fattori: assenza del target, malfunzionamento dell'apparecchio, presenza di sostanze inibenti, scarsa attività della polimerasi ecc.

Un risultato falsamente negativo è un problema di sanità pubblica
Un risultato falsamente positivo è un problema commerciale

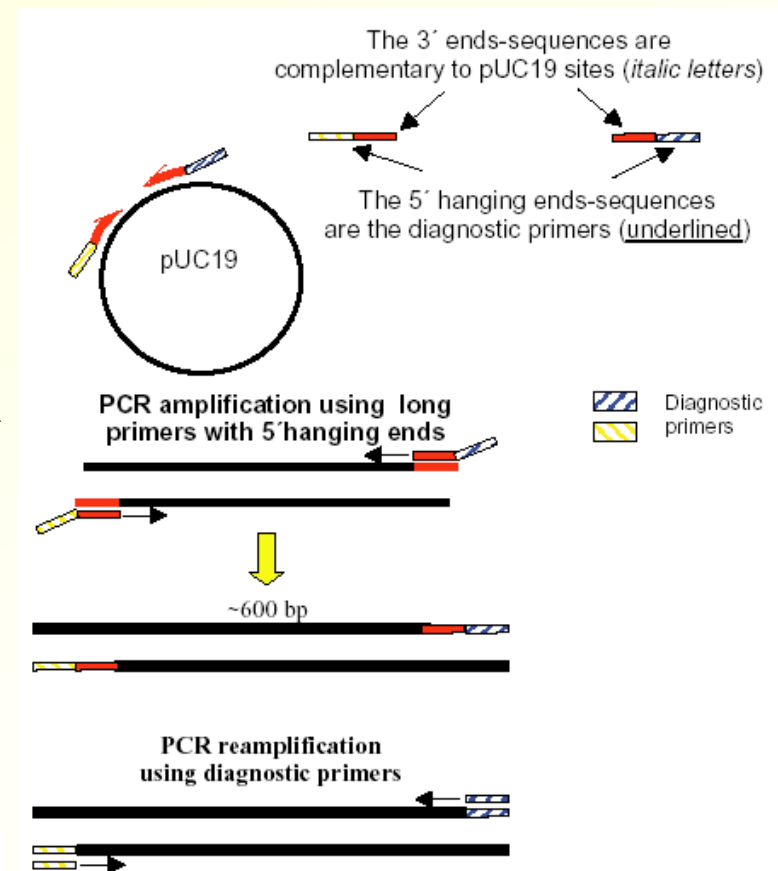
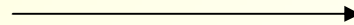
**Introduzione di un controllo interno per
potere evidenziare inibizioni della matrice ed
evitare i falsi negativi.**

**Il riscontro della positività dello IAC in
assenza della positività del campione, indica
che il campione è veramente negativo.**

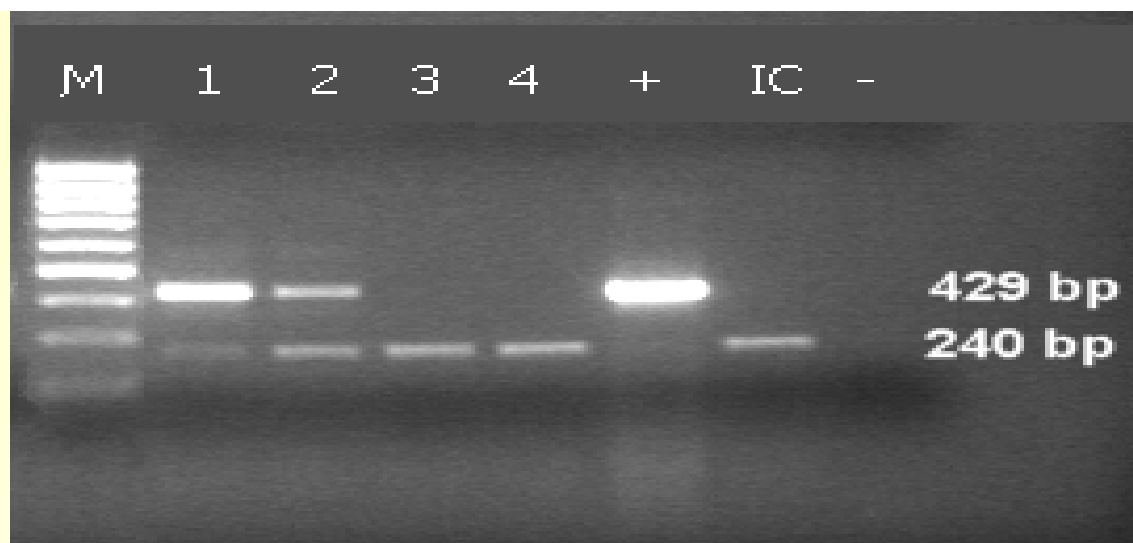
**IAC viene prodotto a
partire da:**

DNA plasmidico

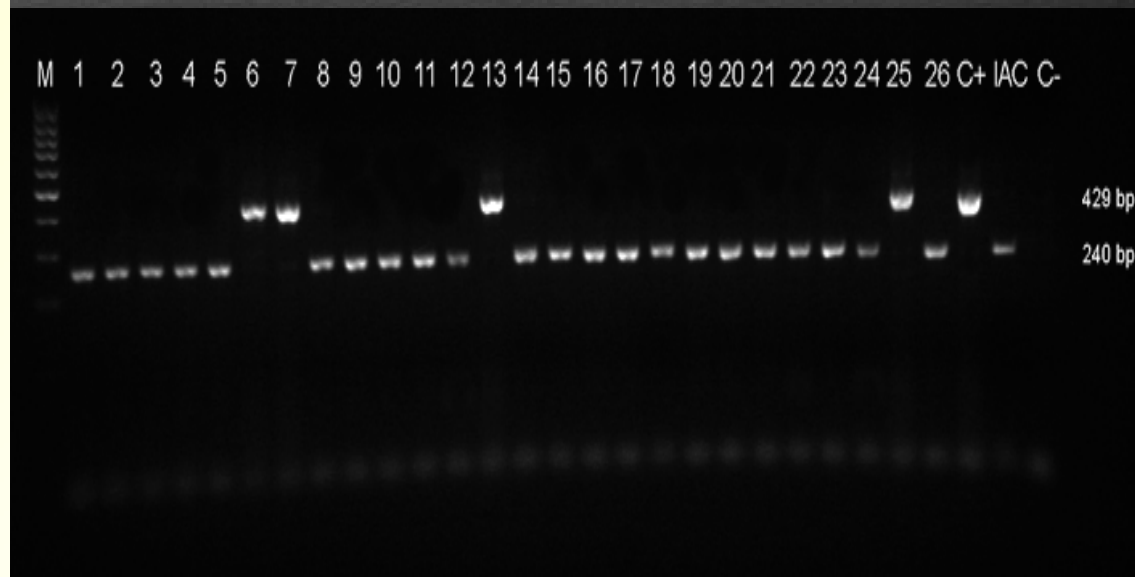
**Tratto di DNA dello
stesso bersaglio,
esterno o interno al
DNA target**



**Campioni di pollame
contaminati da
Salmonella-Ricerca
mediante PCR con
controllo interno**

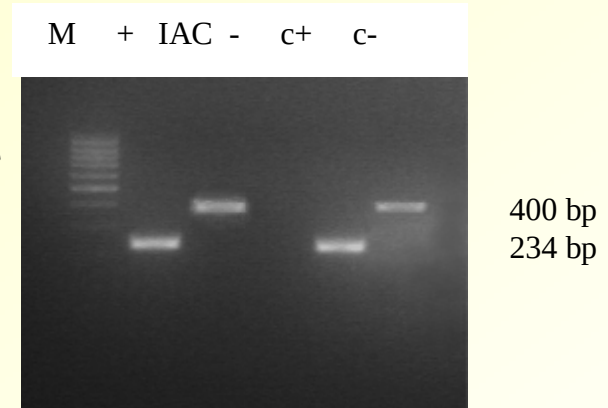


**Campioni di caseina
contaminati da Salmonella.
Ricerca mediante PCR con
Controllo Interno**



***De Medici et al. Industrie Alimentari, 2005, 447, 515-519 ;
Crocì et al. Appl. Envir. Microbiol. 2004, 70, 1393-1396***

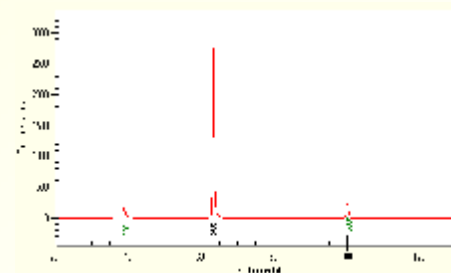
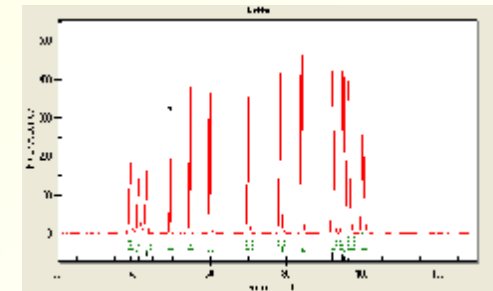
Determinazione di salmonella mediante PCR-Gel agarosio e PCR-Experion system



Elettroferogrammi

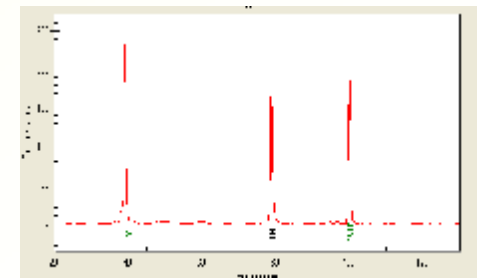
- Sistema automatizzabile
 - Alta riproducibilità
 - Determinazione della concentrazione del DNA
- Uso di una minima quantità di campione (1 μ l)
 - Rapidità di analisi (120 s/campione)
- Ampio range di analisi (50-1500 bp)

Marker



Campione negativo per salmonella

Campione positivo per salmonella



Limitazioni del gel d'agarosio

- Bassa sensibilità
- Il sistema non è automatizzato
- I prodotti dell'amplificazione vengono rivelati solo nella fase di "plateau"
- Il bromuro di etidio non dà una risposta quantitativa ed è potenzialmente mutagenico

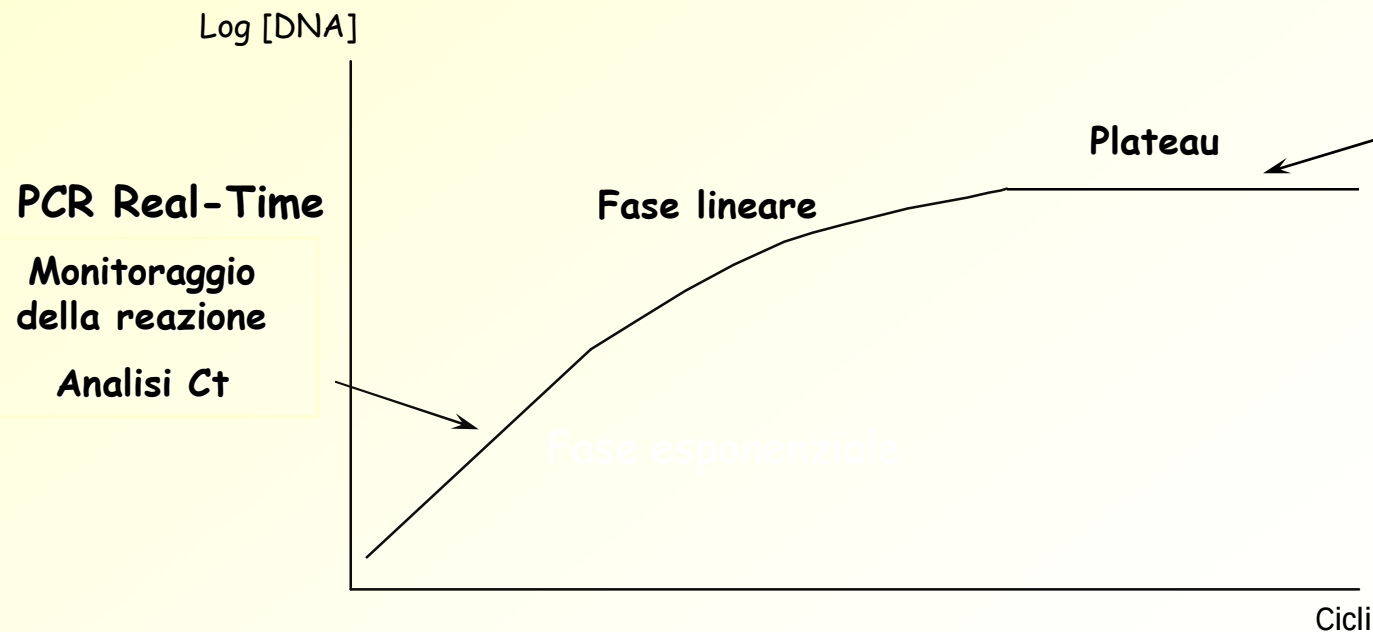
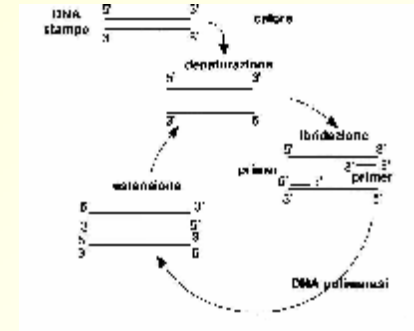


Real Time PCR

Principi della Tecnologia

Metodologia che permette di:

- monitorare la reazione di PCR mentre questa si verifica
- registrare l'emissione della fluorescenza durante la reazione



Determinazione
dei prodotti di
PCR mediante
Gel-EtBr



PCR real time

Sensibile

Specifica

Rapida

Quantifica i microrganismi presenti nel campione

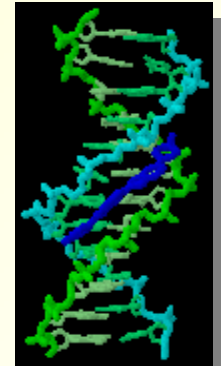
Misura "step by step" la fluorescenza che si genera durante la reazione utilizzando due diversi sistemi di rilevamento dell'accumulo dei prodotti di PCR:

- coloranti che si legano ai doppi filamenti di DNA
- sonde legate a molecole fluorescenti

Hoorfar J. et al J. AOAC Int., 2005, 88, 45

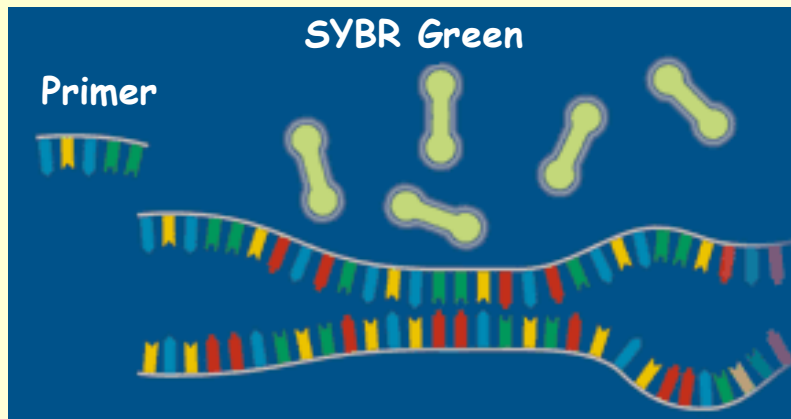
SYBR Green

E' un colorante fluorescente che si lega solo al DNA a doppio filamento ed emette la fluorescenza solamente in queste condizioni.



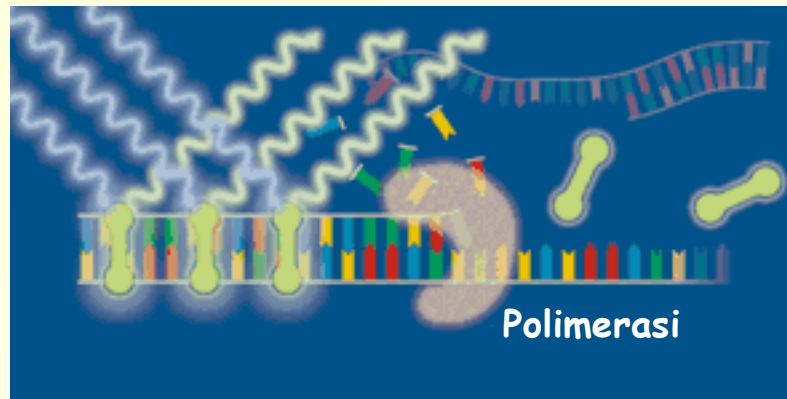
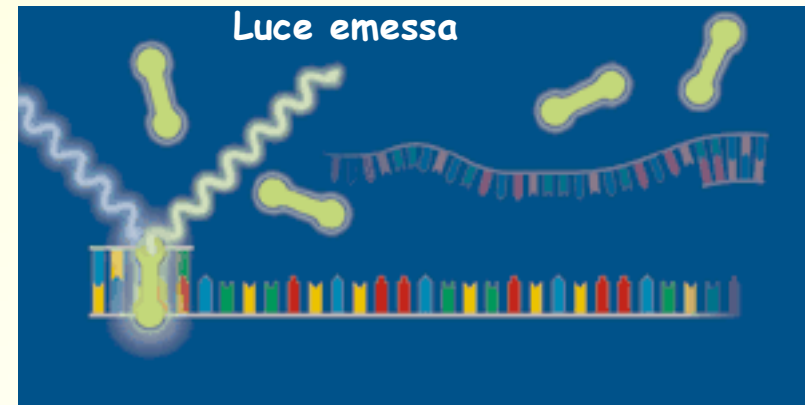
DENATURAZIONE

Non viene rilevata fluorescenza



ANNEALING

L'intensità della fluorescenza comincia ad aumentare



ALLUNGAMENTO

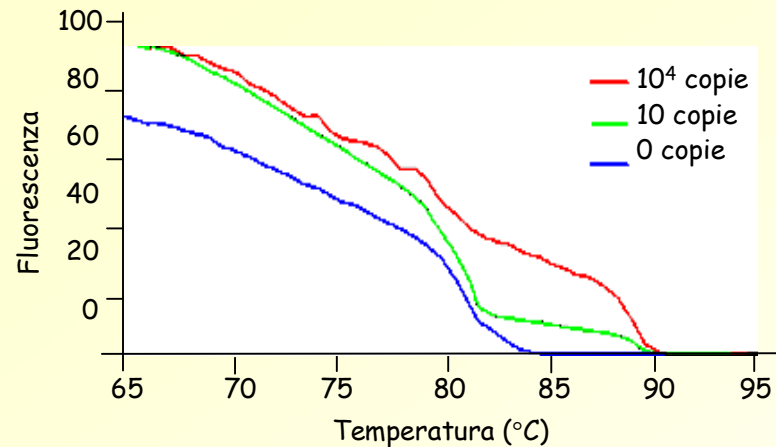
L'intensità della fluorescenza continua ad aumentare e diventa massima al termine della fase di allungamento

L'AUMENTO DELLA FLUORESCENZA E' REGISTRATO A 530_{nm}

ANALISI della CURVA di MELTING

Consente di identificare il prodotto di amplificazione specifico rispetto a prodotti aspecifici.

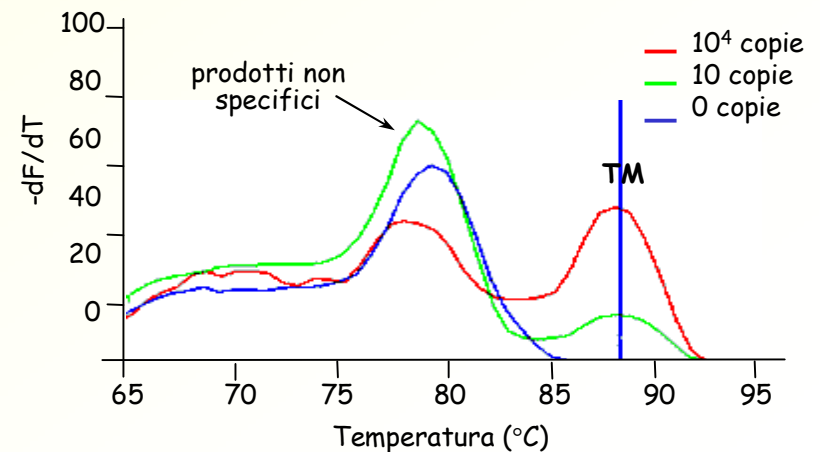
Curva di melting



Al termine della PCR la temperatura viene lentamente aumentata inducendo un decremento della fluorescenza.

La temperatura in corrispondenza della quale si ha un repentino decremento della fluorescenza corrisponde alla T_m del prodotto.

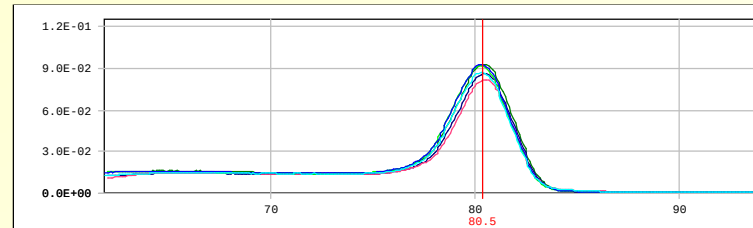
Derivata negativa della curva di melting



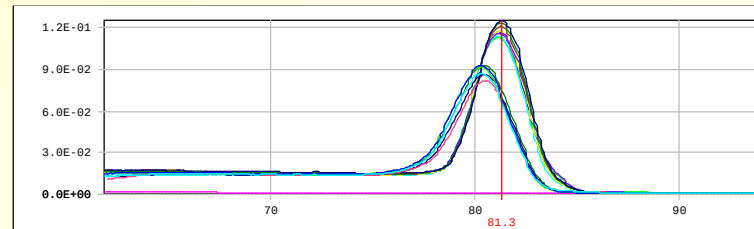


SYBR Green Salmonella con IC utilizzando i primers TTR (tratto di gene che codifica per l'enzima tetracionato reduttasi)

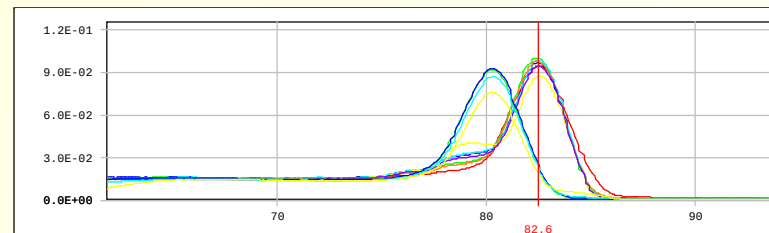
Salmonella



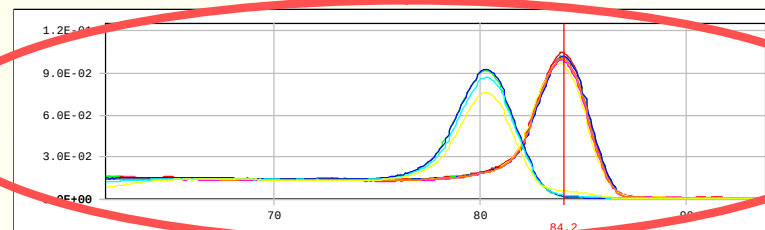
Salmonella e 1° IAC



Salmonella e 2° IAC



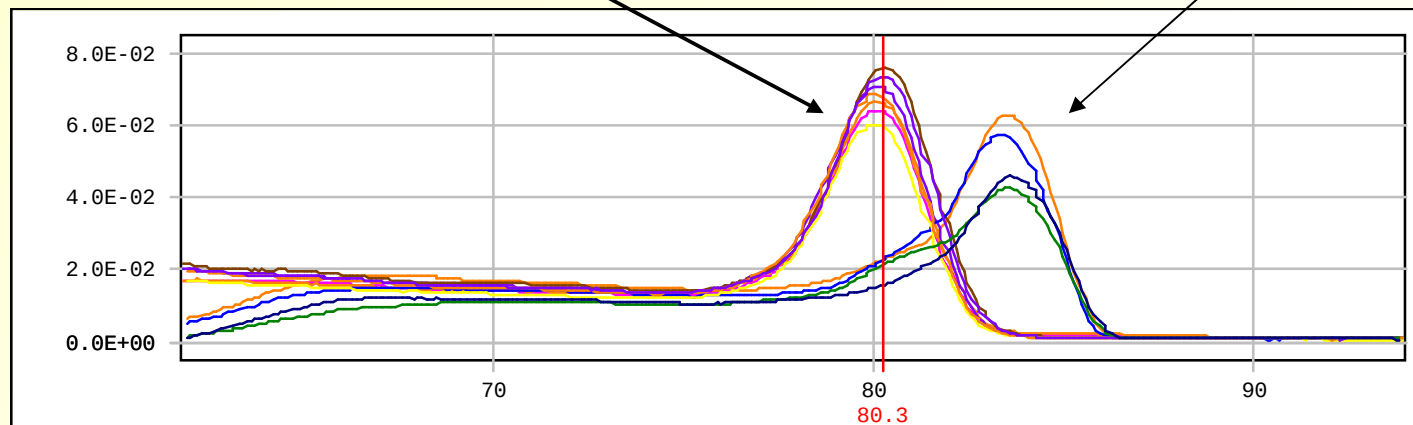
Salmonella e 3° IAC



Determinazione della Salmonella in campioni di carne contaminati utilizzando il SYBR Green real Time PCR dopo 24 h di prearricchimento

S. Enteritidis
S. Derby
S. London
S. Thypimurium
S. Anatum

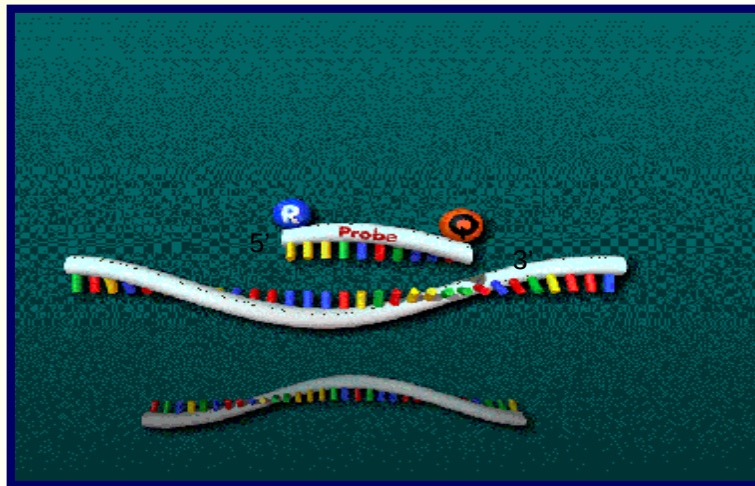
L. ivanovi
L. monocytogenes
L. innocua
S. aureus
Campylobacter Jejuni
Campylobacter coli



Sonda TaqMan

Il secondo sistema di rivelazione utilizza sonde fluorescenti, che si legano al DNA (in una zona interna al DNA target) poco prima della coppia di primers e durante l'amplificazione costituiscono un sistema di rilevamento altamente specifico.

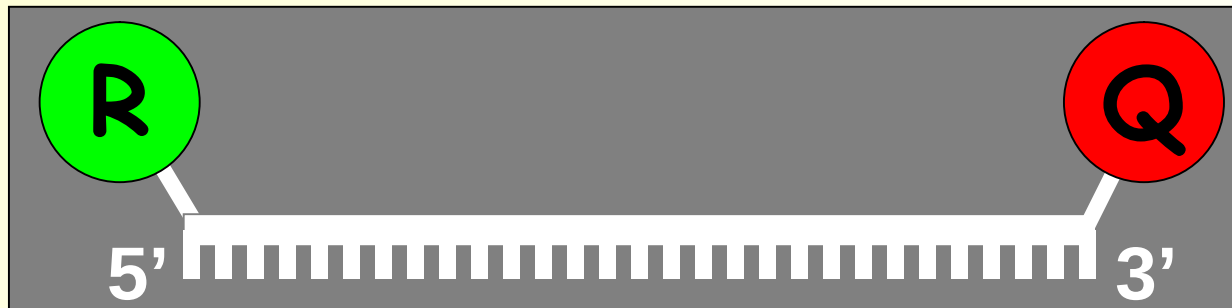
Presenta all'estremità 5' un fluoroforo "Reporter" ed all'estremità 3' una molecola "Quencher"



Reporter-Quencher

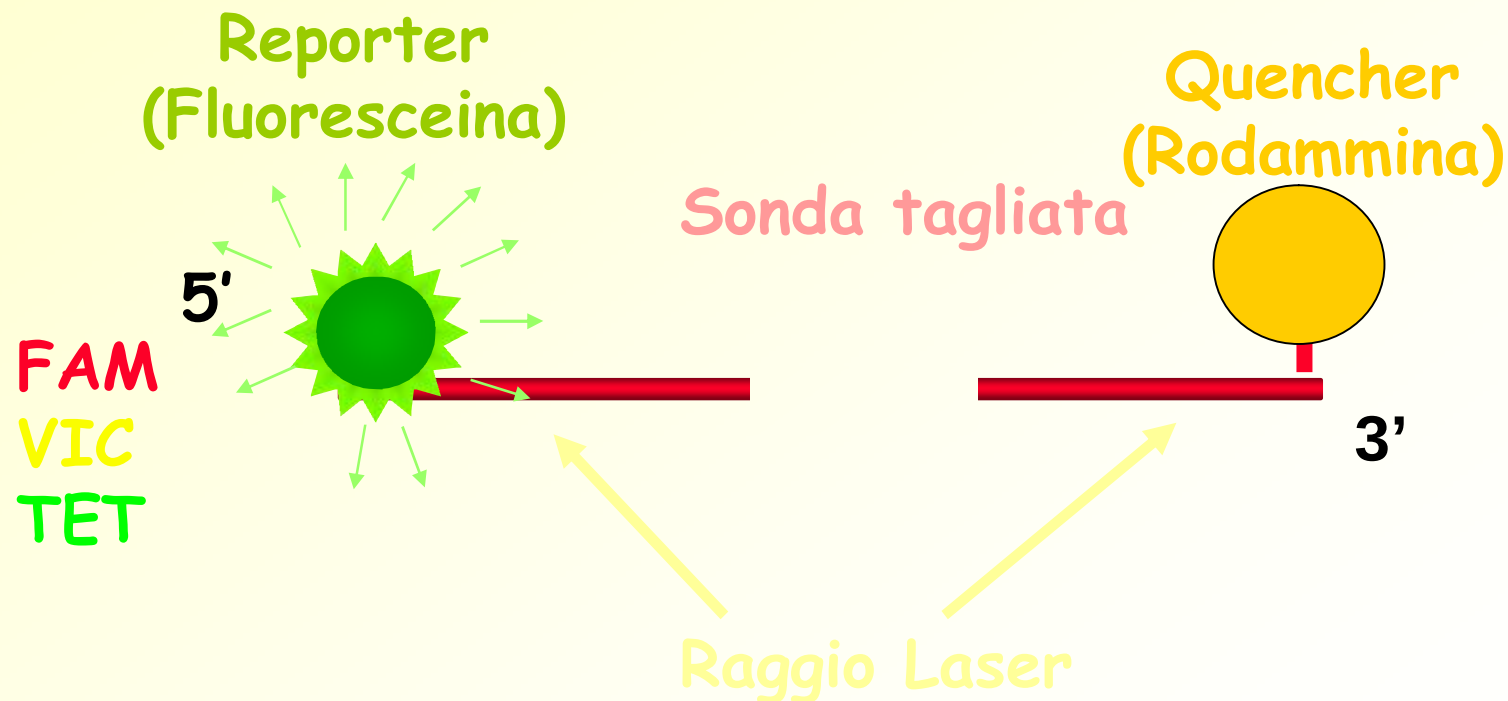
5' REPORTER (R): fluorocromo ad alta energia che emette fluorescenza

3' QUENCHER (Q): fluorocromo a bassa energia che spegne la fluorescenza del reporter



Se R e Q si trovano vicini, Q spegne l'effetto di R perchè i fotoni di R vengono assorbiti da Q

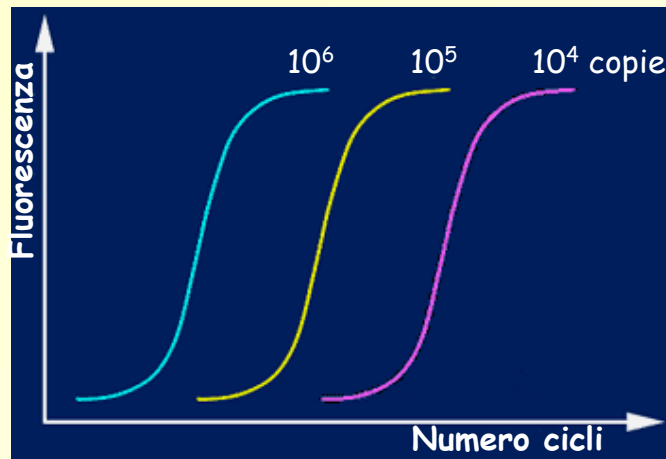
Quando la sonda è intatta, la fluorescenza del "reporter" è soppressa dalla vicinanza del "quencher" limitando l'emissione da parte del "reporter", cosicché il segnale risulta essere molto basso. Quando la sonda, viene degradata dall'attività 5'-esonucleasica della *Taq* polimerasi, il "reporter" viene separato dal "quencher" e quindi può emettere piena fluorescenza alla sua specifica lunghezza



QUANTIFICAZIONE del PRODOTTO di PCR

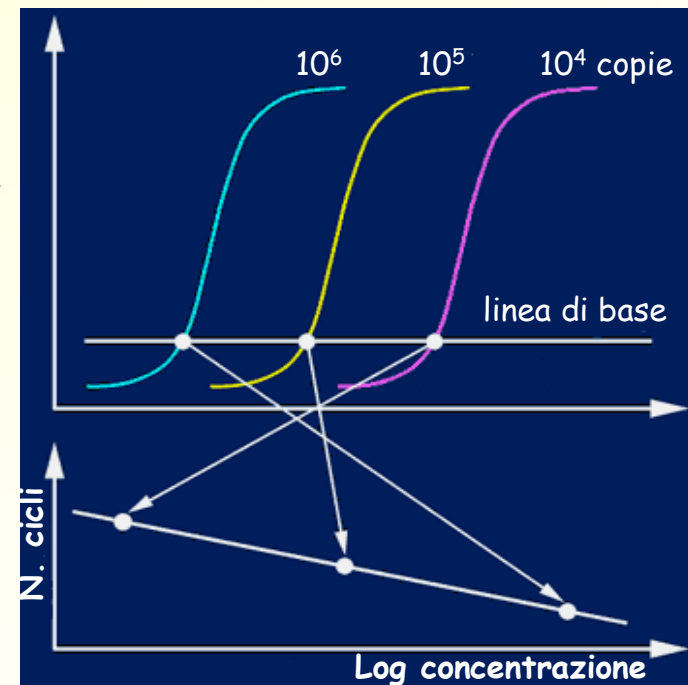
Il ciclo della PCR in cui si ha un incremento significativo della F viene definito Ct. Tale Ct è inversamente proporzionale alla concentrazione del DNA

Curva di fluorescenza di campioni a concentrazione nota

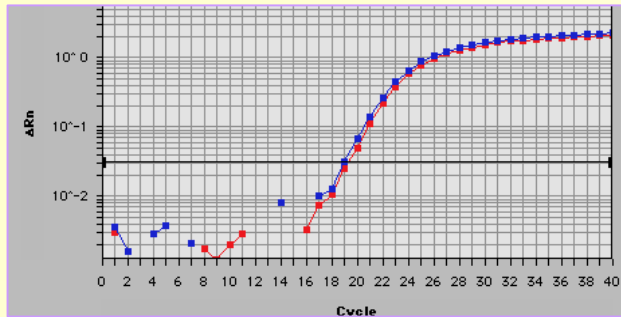


Riportando in grafico il valore dei Ct in funzione del Log della concentrazione iniziale di ciascun campione si ottiene la curva standard da cui si può estrapolare il valore della concentrazione di campioni a titolo ignoto.

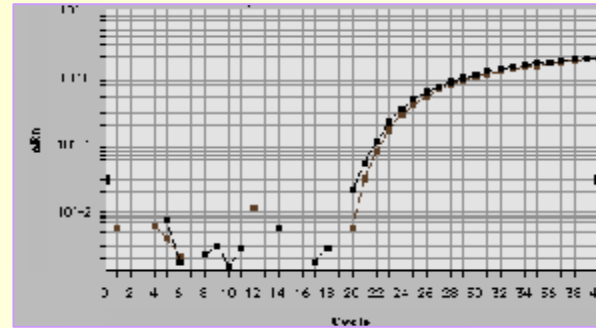
Estrapolazione della curva standard



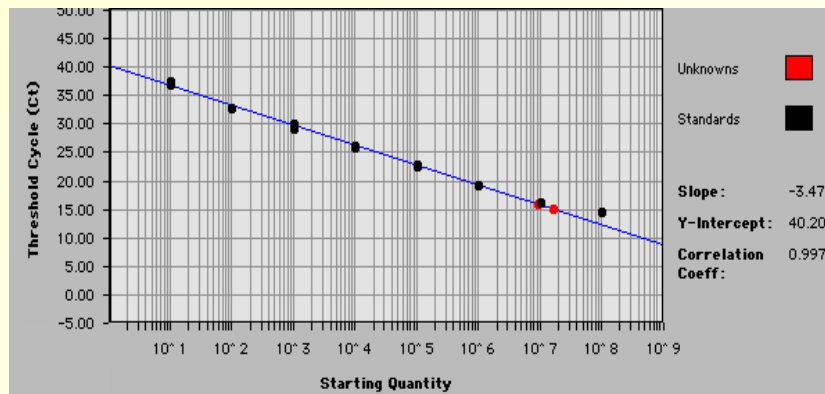
PCR Real time per Salmonella (primers ttr)* con IAC



Ct di un campione positivo
per salmonella marcato in
FAM



Ct dello IAC (campione
negativo per salmonella)
marcato in VIC



Retta standard + alcuni
campioni incogniti

Guilbaud M. Appl Environ Microbiol. 2005 Apr;71(4):2190-4.

Malorny B. J Microbiol Methods. 2007 Aug;70(2):245-51.

Malorny B. Int J Food Microbiol. 2007 Jun 30;117(2):211-8.

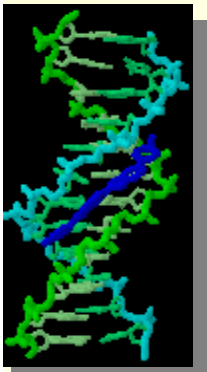
Malorny B. Appl Environ Microbiol. 2004 Dec;70(12):7046-52*.

Rudi K. Lett Appl Microbiol. 2005;40(4):301-6.

SYBR Green

- Può essere applicato ai protocolli sperimentali che sono già in uso per l'esecuzione della PCR classica

- legandosi indiscriminatamente ad ogni doppio filamento di DNA, la specificità della reazione deve essere determinata dalla temperatura di melting (T_m) dell'amplicone ottenuto

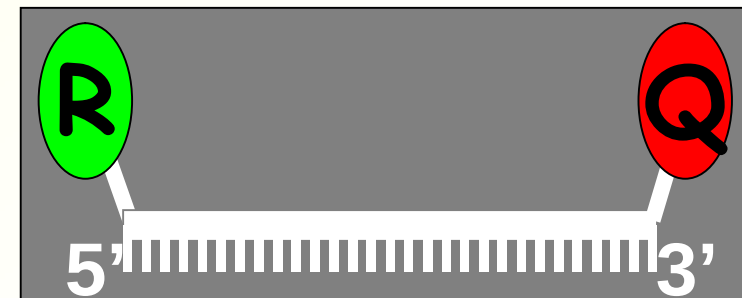


Sonda

- Ha un'elevata specificità

- In una singola reazione di PCR Real time si possono utilizzare più sonde

- Riesce a discriminare differenti ampliconi, in quanto ciascuna sonda può legare molecole fluorescenti diverse



ISO TC 34/SC 9 N753

Microbiology of food and animal feeding stuffs

Real-time polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens-General requirements and definitions

Principi generali

Amplificazione di una specifica sequenza mediante PCR in presenza di sonde fluorescenti;

Legame delle sonde durante la reazione;

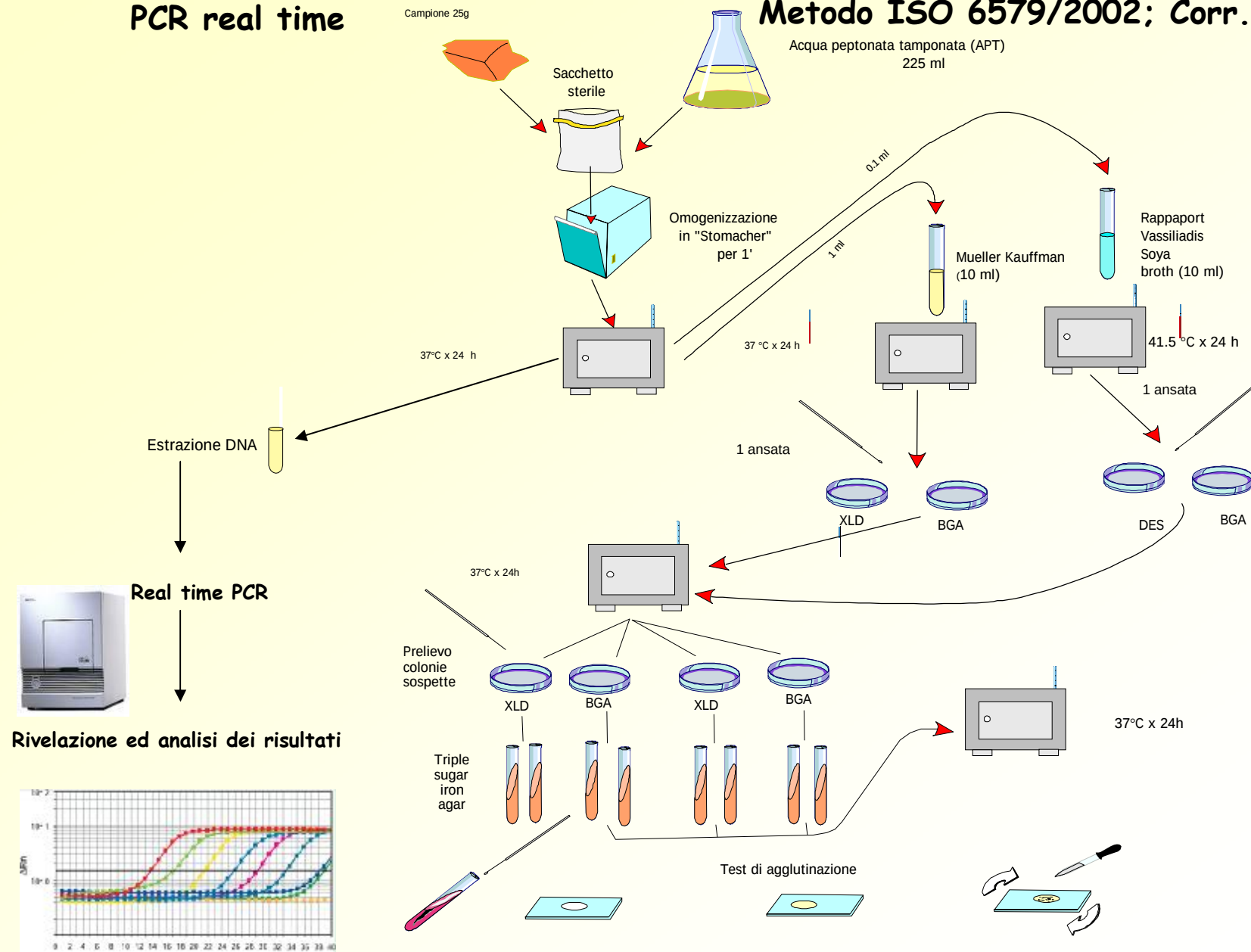
generazione di un segnale di fluorescenza durante ciascun ciclo;

Monitoraggio della fluorescenza;

Analisi dei dati.

Ricerca della Salmonella negli alimenti PCR real time

Ricerca della Salmonella negli alimenti Metodo ISO 6579/2002; Corr. 1/2004

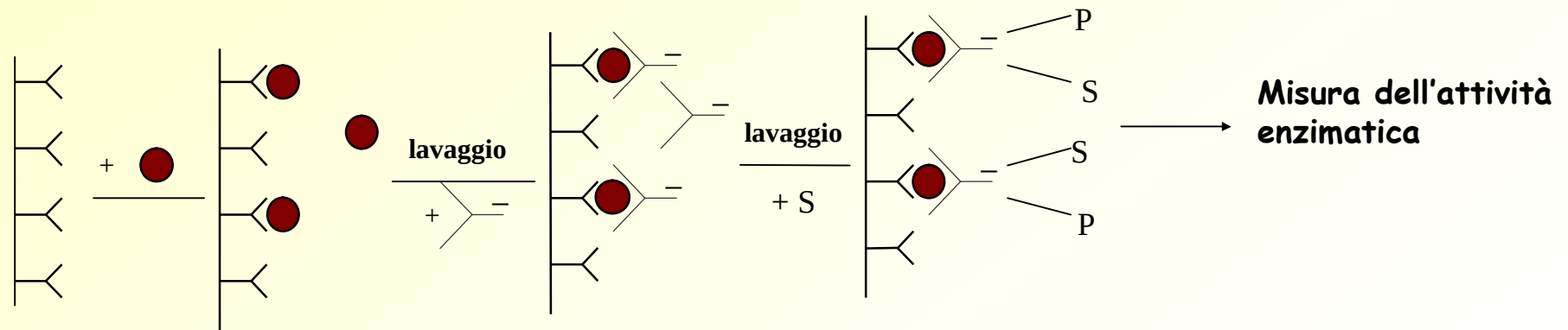


Tempo totale di analisi: 1 giorno

Tempo totale di analisi: 5-7 giorni

Saggi ELISA

Sono **dosaggi di legame** basati sulle **interazioni antigene-anticorpo**, che utilizzano come **traccianti reazioni enzimatiche**. L'anticorpo o l'antigene sono infatti coniugati con un enzima in modo che l'antigene da dosare possa essere determinato mediante una misura di attività enzimatica.



● Antigene (standard o campione)

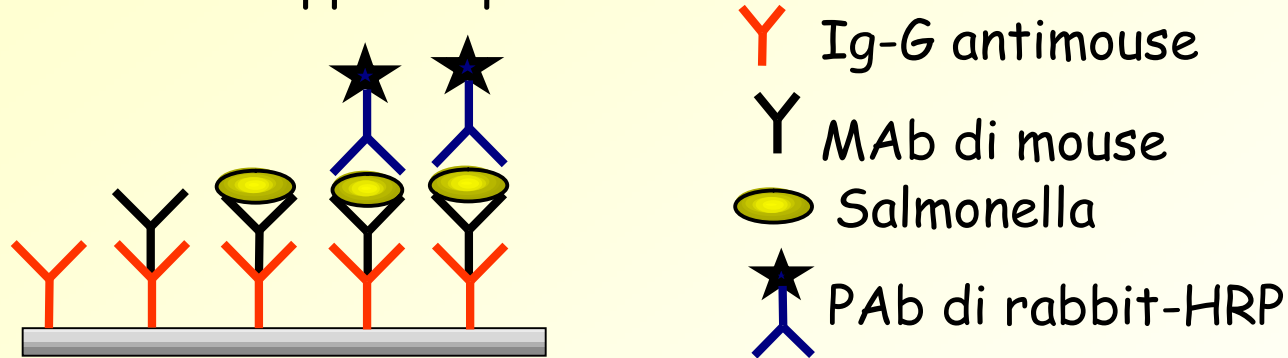
Y Anticorpo specifico per l'antigene (generalmente MAb)

Y- Anticorpo specifico e coniugato con enzima (generalmente PAb)

S = substrato, P = prodotto

Saggio ELISA spettrofotometrico per salmonella

Anticorpi monoclonali e policlonali-HRP, specifici per *Salmonella* vengono impiegati in un "format" di tipo sandwich utilizzando una convenzionale piastra ELISA come supporto per l'immobilizzazione.



Al termine della catena immunologica $\text{TMB} + \text{H}_2\text{O}_2$ viene addizionata nei pozzetti della piastra e, dopo incubazione, la reazione enzimatica viene bloccata con H_2SO_4 . L'attività enzimatica viene misurata spettrofotometricamente a 405 nm. (LOD 10^3 ufc/ml)

Rivelazione fluorescente (sistema VIDAS):
PAb-HRP + substrato 4-metil-umbelliferil fosfato.

Le tecniche di rilevamento più comunemente usate per la determinazione dell'attività enzimatica sono:

Ø la spettrofotometria

Ø la fluorimetria

Ø la chemiluminescenza

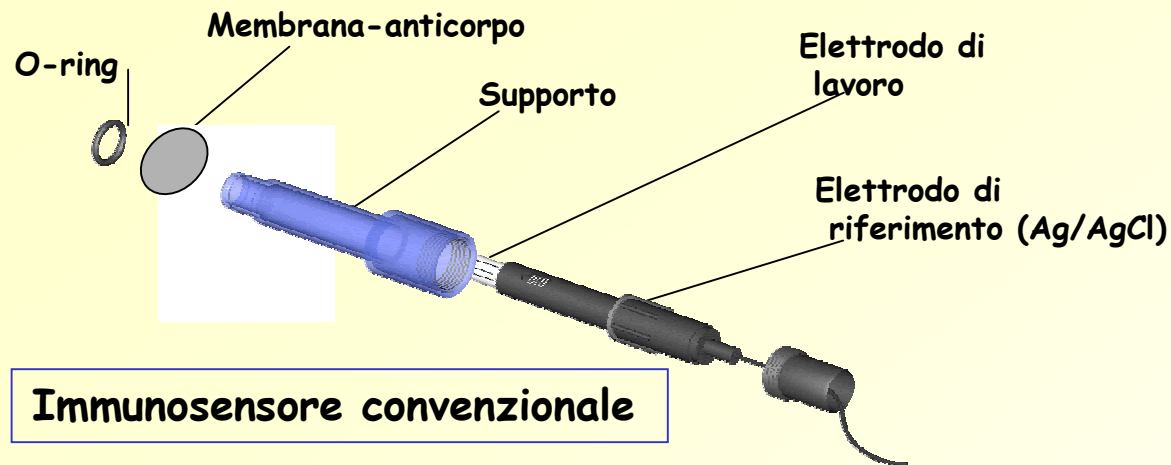
Ø più recentemente l'elettrochimica

IMMUNOSENSORI

Saggi ELISA in cui il materiale biologico viene accoppiato ad un trasduttore di segnale.

Gli immunosensori elettrochimici permettono di combinare l'ELEVATA SELETTIVITA' della reazione antigene-anticorpo con un'ECCELLENTE SENSIBILITA' ed un AMPIO INTERVALLO LINEARE DI MISURA che sono caratteristici dei metodi elettrochimici .

Immunosensori amperometrici



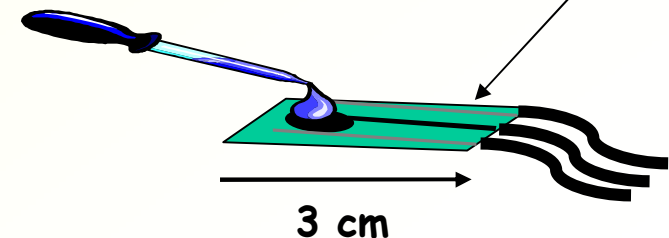
Svantaggi:

- Sostituzione della membrana per ogni concentrazione da analizzare
- o rigenerazione dei siti di legame dell'anticorpo

Immunosensore SPE

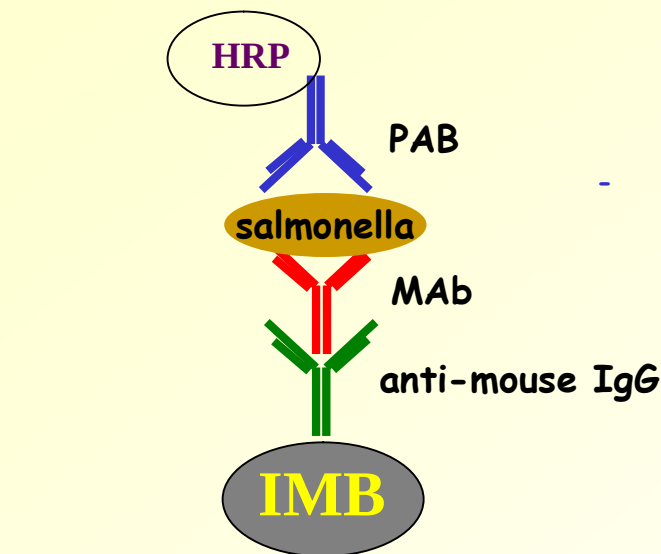
Vantaggi:

- produzione di massa e basso costo
- usa e getta
- strumentazione portatile
- analisi in goccia
 - Ridotta distanza di diffusione → **Analisi rapida**
 - < diluizione del prodotto enzimatico → **Elevata sensibilità**

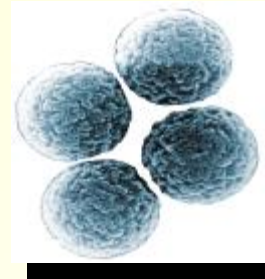


ELIME-array = ENZYME-LINKED-IMMUNO-MAGNETIC-ELECTROCHEMICAL array per Salmonella

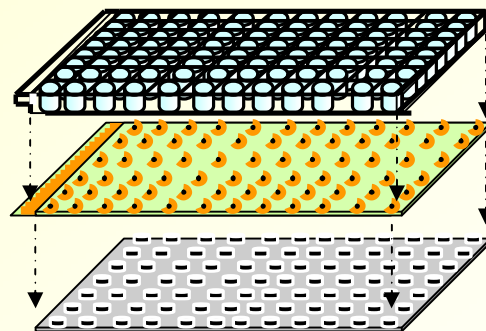
Le MB sono particelle μ -metriche costituite da una dispersione di materiale magnetico (Fe_2O_3 and Fe_3O_4) ricoperta da un sottile guscio polimerico che ne definisce l'area superficiale e permette l'immobilizzazione di una grande varietà di molecole.



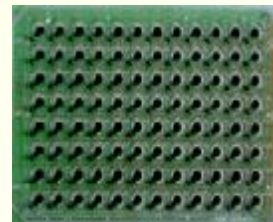
$\varnothing 1-5 \mu\text{m}$



DYNAL
BIOTECH



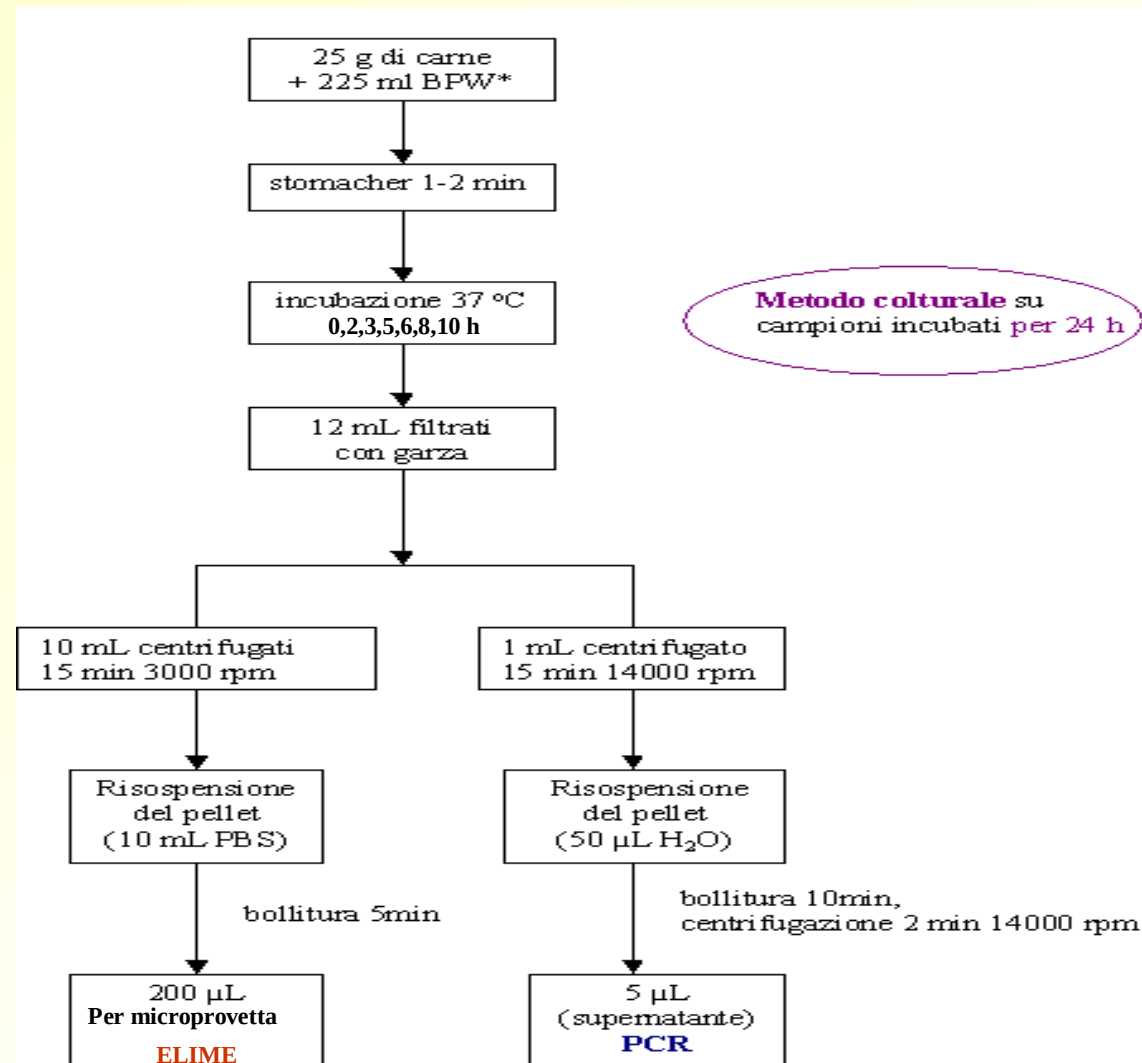
Supporto con 96 magneti



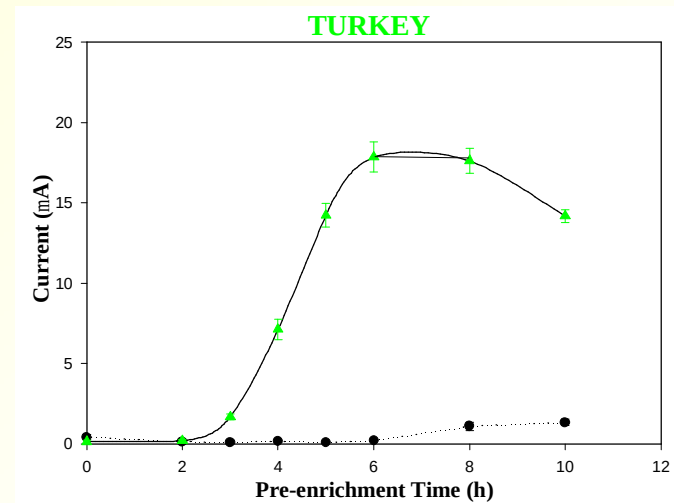
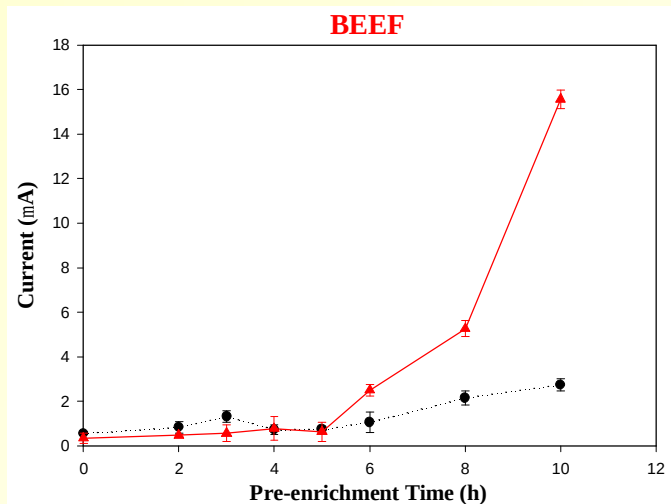
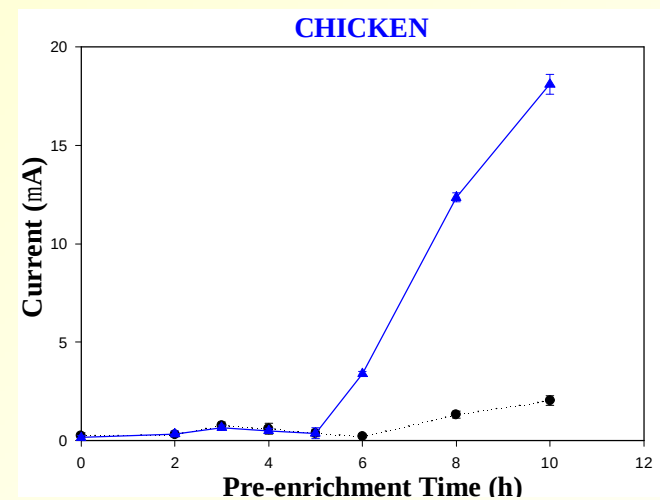
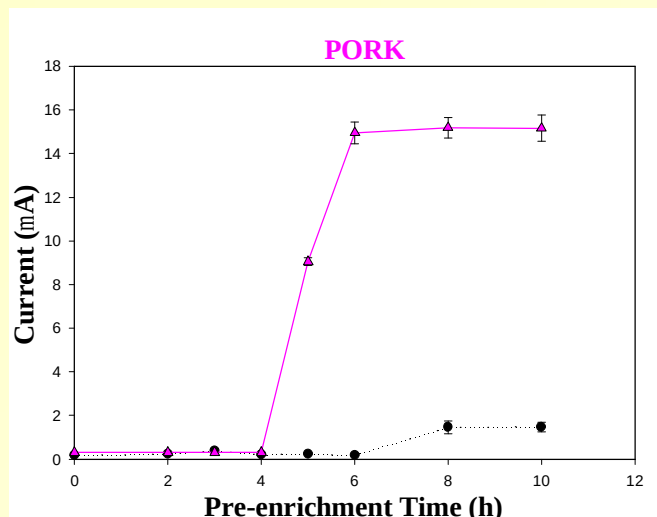
Intervallo di lavoro:
 $3 \times 10^3 - 10^7$ UFC/mL
Tempo di esecuzione = 2h

Analisi di campioni di carne di maiale, pollo, manzo e tacchino

In accordo con la legislazione europea che stabilisce assenza di salmonella in 25 g di prodotto, sono stati analizzati **campioni sperimentalmente contaminati** (aggiungendo a 25 g di carne 1-10 cellule di salmonella) e durante la fase di **prearricchimento** sono stati effettuati dei prelievi a tempo. Parallelamente sono state effettuate analisi con la **PCR real time** e il **metodo culturale classico**.



Campioni sperimentalmente contaminati



▲ campioni sperimentalmente contaminati (1-10 cell/25g);

● campioni non contaminati (risultati negativi al test microbiologico)

Tempo di prearricchimento variabile (ciò era probabilmente dovuto alla differente concentrazione dei microrganismi competitori naturalmente presenti nei campioni analizzati) **in ogni caso 6 ore di prearricchimento erano sufficienti a mettere in evidenza la presenza 1-10 cell/25g.**

Analisi di campioni di carne con il metodo ELIME, PCR e il metodo colturale classico

Samples	ELIME	PCR	Cultural Method	Agglutination method
pork	-	-	-	
pork	-	-	-	
pork	+	+	+	S. infantis
chicken	-	-	-	
chicken	-	-	-	
chicken	+	+	+	S. Enteritidis
chicken	-	-	-	
beef	-	-	-	
beef	-	-	-	
beef	+	+	+	S. Anatum

Soltanto 3 dei dieci analizzati sono risultati positivi per salmonella con l' **ELIME-array** (dopo 6 h di prearricchimento) con la **PCR** (dopo 5 h di prearricchimento) ed il **metodo colturale classico**.

- I metodi rapidi solo dopo accurata validazione potranno essere utilizzati come metodi di screening per il controllo delle derrate alimentari nell'ambito dei piani HACCP e dei controlli ufficiali

- Sono soprattutto utili nel monitoraggio di alcuni CCP per consentire l'adozione di rapide azioni correttive in caso di positività



•Migliorare la (rin)tracciabilità dei microrganismi (178/2002) che possono accidentalmente o deliberatamente contaminare la catena alimentare (incluso le acque imbottigliate) o i mangimi.

