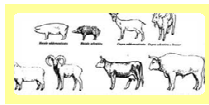


Diagnostica microbiologica nell'ambito della sicurezza alimentare

Bioteecnologie nella diagnostica veterinaria e nel controllo degli alimenti



BIOLOGIA MOLECOLARE : cos'è?

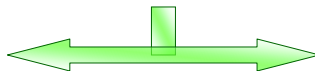


<<Disciplina che studia la struttura e le funzioni degli acidi nucleici (DNA e RNA) e di molecole di grande interesse fisiologico come le proteine>>

TECNICHE UTILIZZATE

GENERALI

PCR, clonazione,
ibridazione degli acidi
nucleici...



SPECIFICHE

RT-PCR, PFGE,
ARDRA, DGGE...



APPLICAZIONI

I

CAMPO VETERINARIO

- ✓ Diagnosi di malattie infettive (batteriche e virali) e parassitarie
- ✓ Vaccini ricombinanti per gli animali
- ✓ Genetica e selezione delle razze
- ✓ Animali transgenici come supporto ai Paesi in via di sviluppo (o per la produzione di farmaci e vaccini)

CAMPO ALIMENTARE

- ✓ Salubrità degli alimenti: individuazione di virus, batteri ...

- Attività di screening
- Conferma dei risultati microbiologici
- Approfondimento dei risultati microbiologici

...



...metodi molecolari come...

SCREENING

- ✓ Tempi brevi
- ✓ Metodi accurati
- ✓ Metodi sensibili

APPROFONDIMENTO

Individuazione dei fattori di patogenicità (VTEC)

CONFERMA

Conferma di appartenenza a specie batteriche patogene
- Ceppi "anomali"
- Matrici difficili
"campioni contaminati"



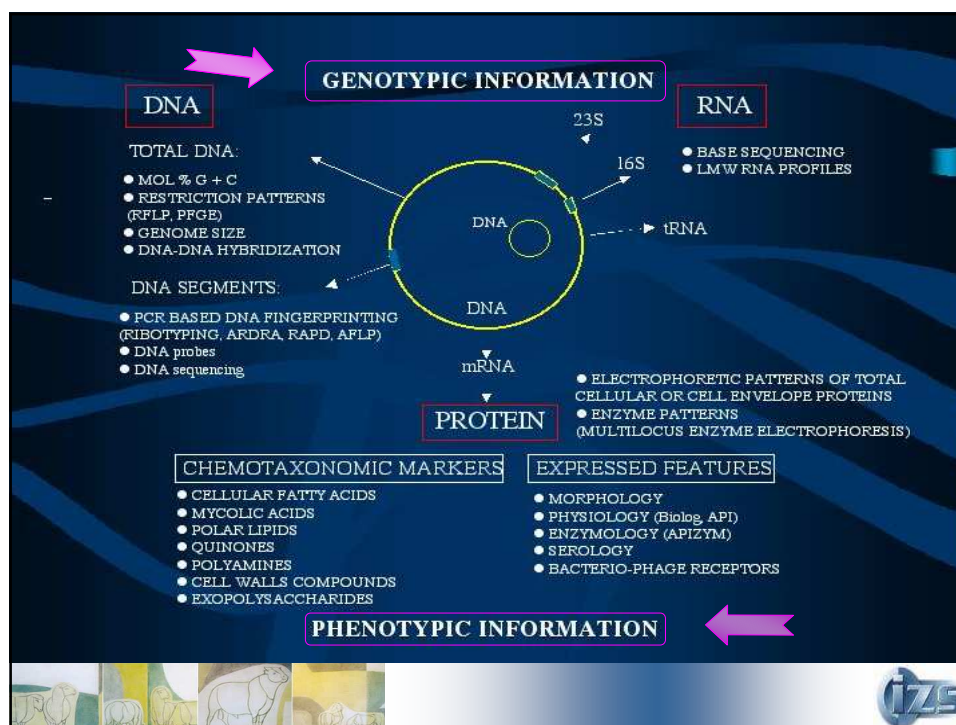
...ma per far tutto ciò....

La strategia più semplice per l'identificazione di un batterio con metodi di biologia molecolare è quella di cercare di evidenziare un gene che sia presente solo in quella specie

(geni *vtx1*, *vtx2*, *eae* per gli *E. coli* VTEC o proteine di membrana come le fasi flagellari delle Salmonelle)

ciò presuppone che:

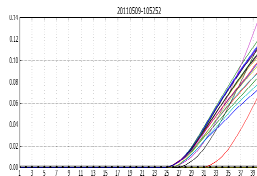
- ci sia un sospetto diagnostico che indirizzi verso il test da effettuare
- genoma della specie in esame a prescindere dalla sua vitalità



CARATTERIZZAZIONE DEI PATOGENI ALIMENTARI E DEI RELATIVI FATTORI DI VIRULENZA

PCR REAL-TIME

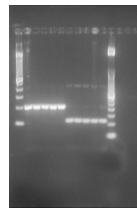
Yersinia spp.
Salmonella spp.
Campylobacter spp.
E.coli VTEC
Listeria monoc.



(Amplification Plots *E.Coli* O157:H7)

PCR END-POINT MULTIPLEX

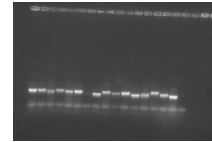
Salmonella spp.
Campylobacter spp.
Tossine botuliniche



(PCR multiplex per tossine botuliniche)

PCR END-POINT SIMPLEX

Yersinia spp.
Salmonella spp.
E.coli VTEC
Listeria monoc.



(PCR simplex *E.coli* VTEC)



ALTRE ANALISI

ALLERGENI

PCR REAL-TIME

HA

PCR REAL-TIME

VIBRIO

PCR REAL-TIME

NOROVIRUS

PCR REAL-TIME

TOSSINE STAFILOCOCCICHE

PCR MULTIPLEX



PCR (Polymerase Chain Reaction)

[Mullis *et al.*, 1986; Mullis e Faloona, 1987]

Amplificazione esponenziale *in vitro* di regioni specifiche degli acidi nucleici. Per poter applicare questa tecnica è necessario conoscere la sequenza delle regioni terminali della sequenza bersaglio; la loro conoscenza permette la sintesi dei due inneschi oligonucleotidici ("primer") necessari per la reazione

END-POINT

Rilevazione prodotto
PCR su gel di agarosio
dopo l'amplificazione

REAL-TIME

Analisi in tempo
reale del prodotto
PCR



PCR (Polymerase Chain Reaction)

DNA TARGET
sequenza da
amplificare

MgCl₂
cofattore
enzima

H₂O
volume di
reazione

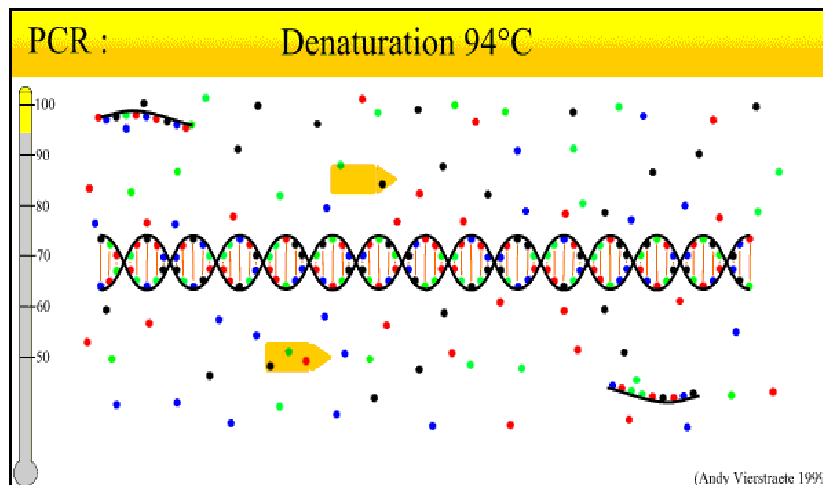
Taq POLIMERASI
enzima DNA polimerasi
che catalizza la reazione
di polimerizzazione del
filamento di DNA

**DEOSSINUCLEOTIDI
TRIFOSEFATI (dNTP)**
unità monomeriche per la
sintesi degli ampliconi

PRIMERS
sequenze oligonucleotidiche
complementari alle estremità
dello stampo (lunghezza 20-30
nucleotidi)



Reazione a catena della polimerasi PCR



PCR REAL-TIME

- ✓ La PCR “classica” è stata migliorata con l’introduzione di coloranti fluorescenti che fungono da “indicatori diretti del numero di ampliconi sintetizzati durante la PCR”
- ✓ Il termine PCR real-time si riferisce ad una “reazione PCR in cui la concentrazione dell’ amplicone è misurata in tempo reale nel tubo di reazione mentre l’amplificazione è ancora in corso”

PCR REAL-TIME

- ✓ Identificazione rapida
- ✓ Quantificazione
- ✓ Rilevamento di variazioni alleliche
 - Farmacoresistenze
 - Genotipi virulenti
 - Dinamica di popolazione

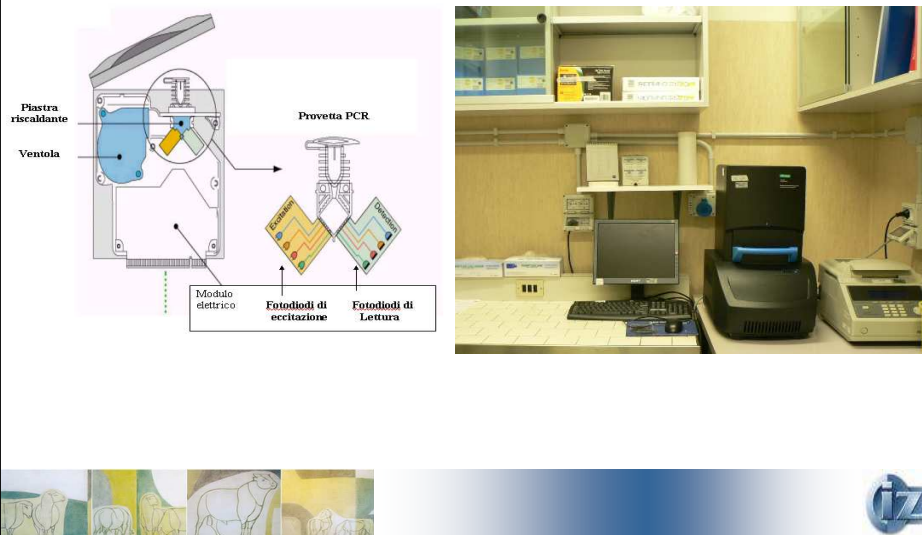


VANTAGGI

- ✓ Specificità
- ✓ Sensibilità
- ✓ Selettività
- ✓ Rapidità di esecuzione
- ✓ Costo contenuto
- ✓ Contenimento delle contaminazioni



TERMOCICLATORI PCR REAL-TIME



PRINCIPIO

«rilevazione e quantificazione di un reporter fluorescente che produce un segnale che aumenta in modo direttamente proporzionale alla quantità di prodotto PCR della reazione»

Test basati sul legame colorante fluorescente-DNA

SYBR Green

Test basati sul legame sonda fluorescente-sequenza specifica

LINEARI

CIRCOLARI

Sonde d'idrolisi: TaqMan
Sonde d'ibridazione
Molecular Beacons

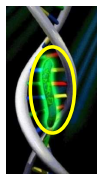


SONDA



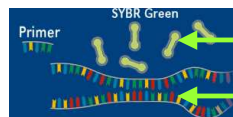
FRAMMENTO DI DNA DI SEQUENZA
NOTA A CUI E' LEGATA UNA MOLECOLA
DI "MARCATORE" FACILMENTE
RILEVABILE

QUANDO LA SONDA TROVA UNA
SEQUENZA DI BASI COMPLEMENTARE
SUL DNA FISSATO, SI LEGERA' AD
ESSO CON LEGAMI AD IDROGENO



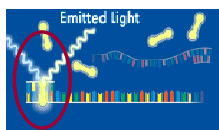
SYBER GREEN

Utilizza una molecola fluorescente
non specifica che si lega al solco
minore del dsDNA

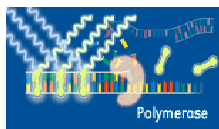


SYBR Green

DNA bersaglio



Dopo l'annealing dei primers, poche molecole
fluorescenti si legano alla doppia elica



Durante l' allungamento si verifica un aumento di
fluorescenza che corrisponde all' aumento del
numero di copie dell' amplicone



LEGAME SONDA-SEQUENZA SPECIFICA

Il segnale fluorescente è prodotto solo se nella reazione è presente il bersaglio specifico. Tali metodi utilizzano sonde sequenza-specifiche marcate con un set di fluorofori

TRASFERIMENTO DI ENERGIA DISTANZA-DIPENDENTE TRA DUE FLUOROFORI ADIACENTI



SONDE

Estremità 5'
“**REPORTER**”
(R)



fluorocromo ad alta energia che emette fluorescenza

Estremità 3'
“**QUENCHER**”
(Q)



fluorocromo a bassa energia che spegne la fluorescenza del reporter



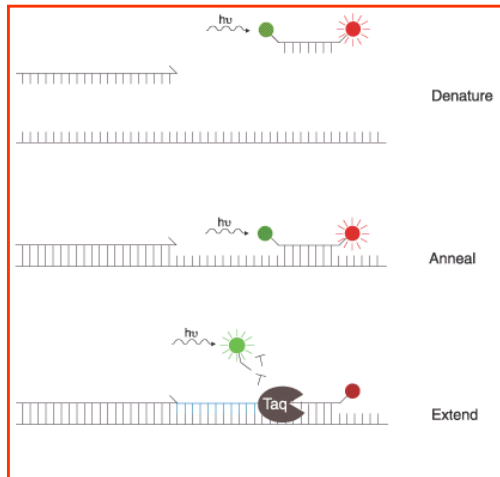
Se R e Q si trovano vicini, Q spegne l'effetto di R perchè i fotoni di R vengono assorbiti da Q



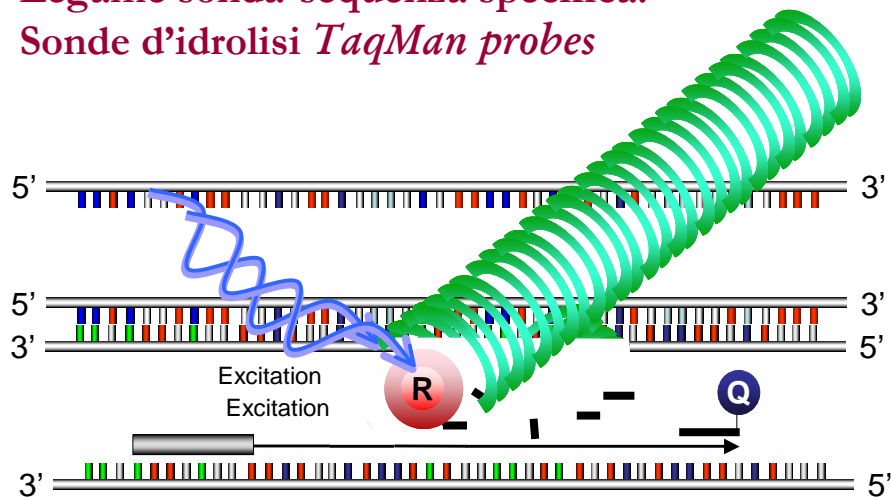
Sonda *TaqMan*

Oligonucleotide che, come i primers della PCR, viene disegnato per essere complementare alla sequenza bersaglio da amplificare.

La sonda è disegnata in modo da ibridarsi all'interno del frammento amplificato nella reazione di PCR



Legame sonda-sequenza specifica: Sonde d'idrolisi *TaqMan probes*

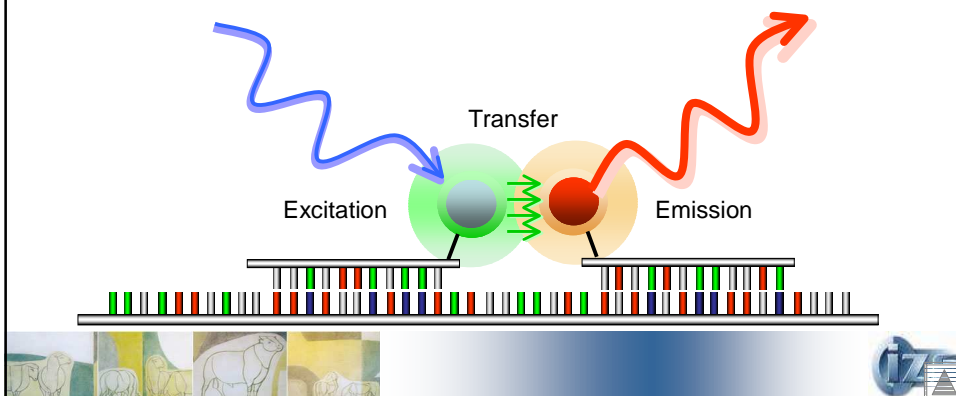


Sonde FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer): sonde d'ibridazione

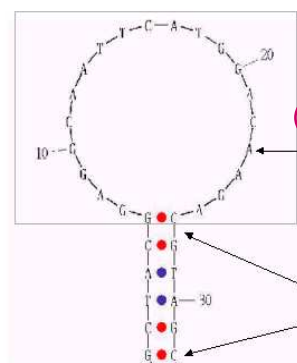
- ✓ Simili alle sonde TaqMan perché si legano al DNA bersaglio e vengono idrolizzate
- ✓ Costituite da due sonde ognuna marcata con un solo fluorocromo (accettore e donatore)
- ✓ Quando le sonde non sono legate alle sequenze target il segnale fluorescente proveniente dall'accettore non è rilevato
- ✓ Durante l'annealing entrambe le sonde FRET ibridizzano alle sequenze target: ciò avvicina il fluoroforo donatore all'accettore permettendo il trasferimento di energia tra i due fluorofori e la produzione di un segnale fluorescente da parte dell'accettore che viene rilevato



Legame sonda-sequenza specifica: Sonde d'ibridazione FRET



Molecular Beacons



OLIGONUCLEOTIDE
DISEGNATO IN MODO DA
ESSERE COMPLEMENTARE
PER FORMARE UNA
STRUTTURA "STEM-LOOP"

IL LOOP È
COMPLEMENTARE AD UNA
SEQUENZA ALL'INTERNO
DEL PRODOTTO
AMPLIFICATO

Quencher

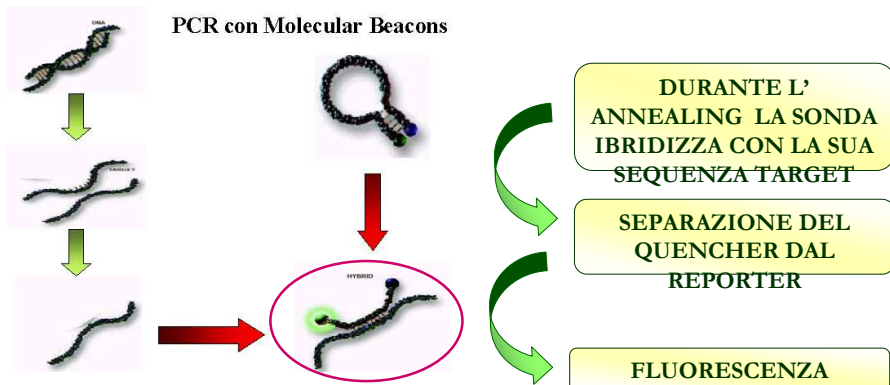
Reporter

LA VICINANZA DEL "QUENCHER" AL
"REPORTER" IMPEDISCE L'EMISSIONE DI
FLUORESCENZA



Molecular Beacons

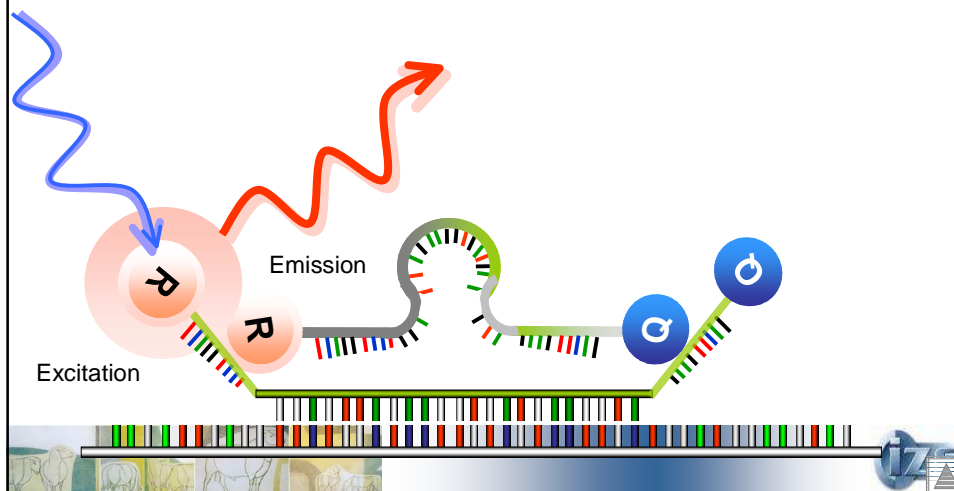
PCR con Molecular Beacons



Tyagi S., F.R. Kramer, 1996. Molecular Beacons: Probes that Fluoresce upon Hybridization. Nat. Biotech **14**: 306-308



Legame sonda-sequenza specifica: Molecular Beacons

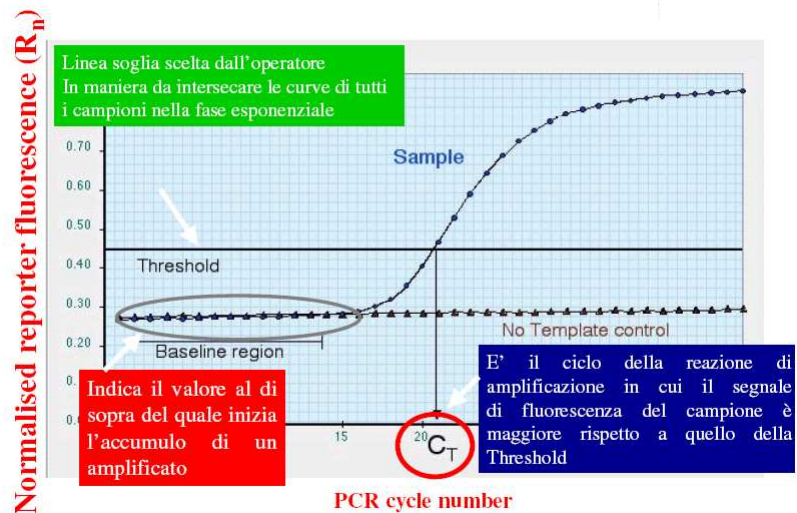


Molecular Beacons vs TaqMan

**LE MOLECULAR BEACONS NON
VENGONO DISTRUTTE
DURANTE LA REAZIONE DI
AMPLIFICAZIONE PER CUI
POSSONO REIBRIDIZZARSI
DURANTE IL SUCCESSIVO
CICLO**



RISULTATI



ALLERGENI

CAMPIONI

- Prodotti da forno (biscotti e fette biscottate)
- Alimenti estrusi (gallette di riso)
- Gelati
- Bevande
- Salse

MATERIALI

- Estrazione ESyALL DNA Releaser (Celbio)
- PCR real-time con sonde *TaqMan*
 - Duplica ESyALL Pistachio (Celbio)
 - Duplica ESyALL Almond (Celbio)
 - Duplica ESyALL Oats (Celbio)
 - Duplica ESyALL Sesame (Celbio)
 - Duplica ESyALL Hazelnut (Celbio)

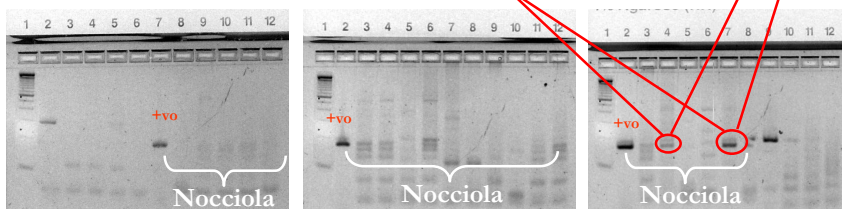
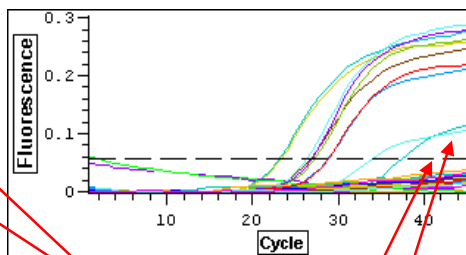
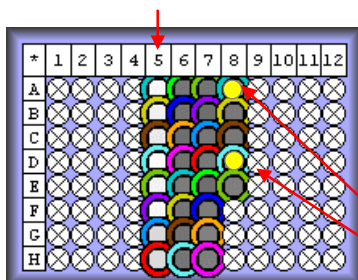
Estrazione del DNA dai campioni con kit ESyALL DNA Releaser

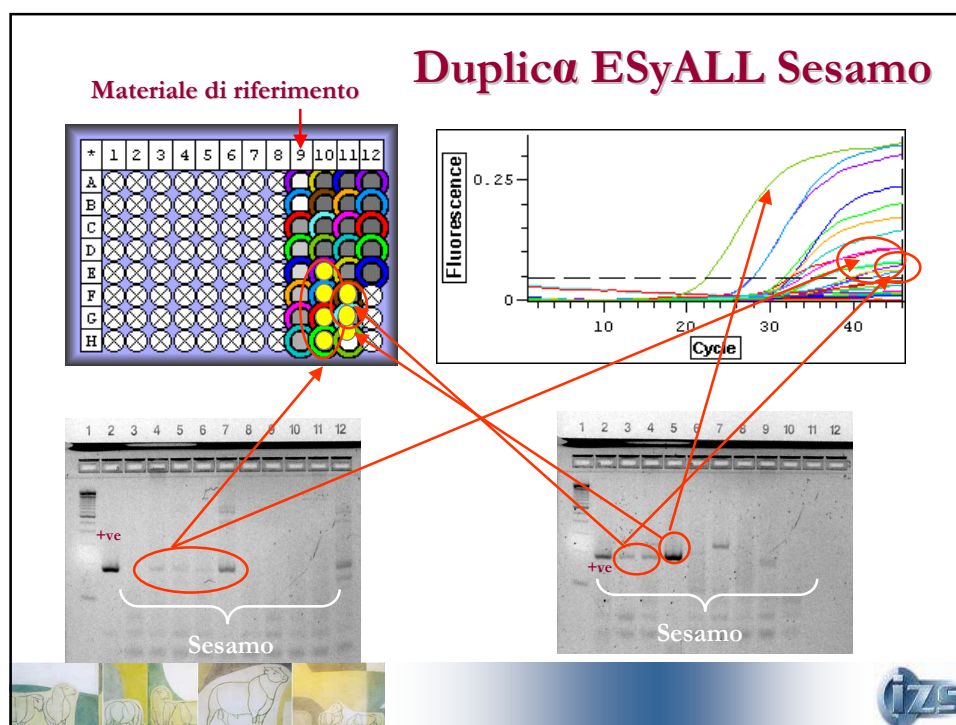
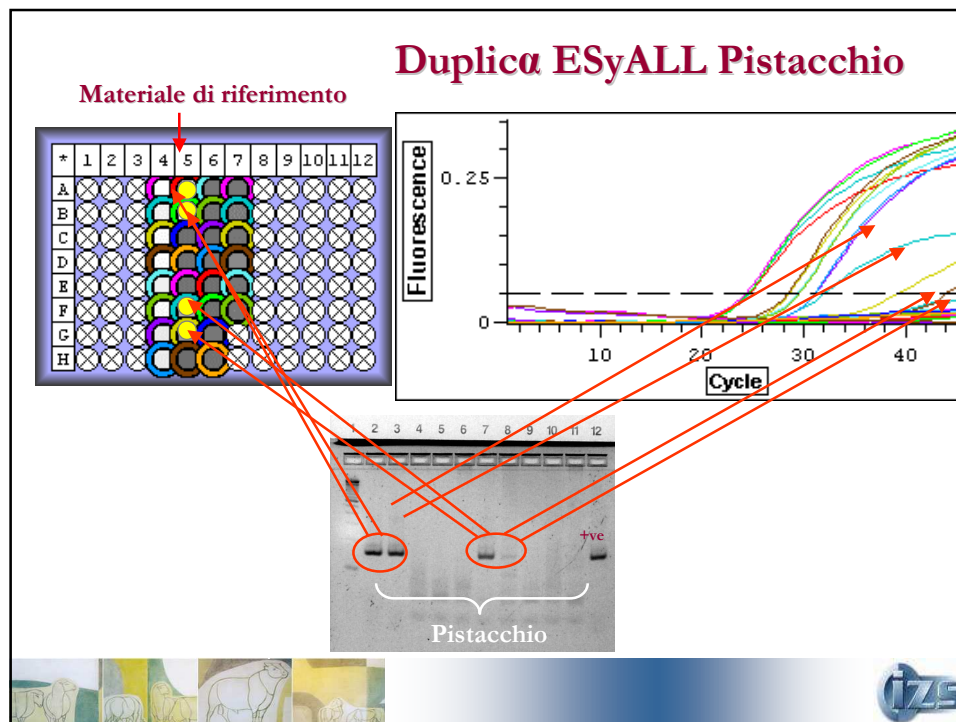
- Digestione del campione in un tampone di lisi a 85°C
- Purificazione della soluzione di lisato con cloroformio
 - Eventuale filtraggio della soluzione con filtri Millipore di acetato di cellulosa con porosità di 45 µm
- Purificazione del DNA mediante colonne cromatografiche
- Concentrazione del DNA estratto mediante precipitazione in etanolo
- Standardizzazione della quantità di DNA per reazione (100 ng)

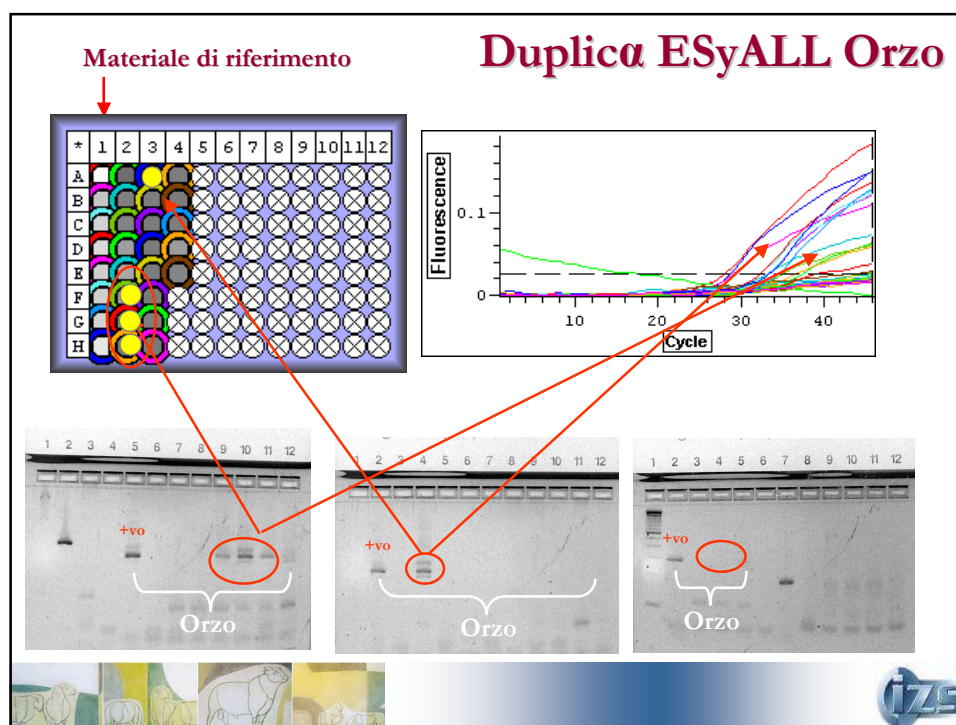
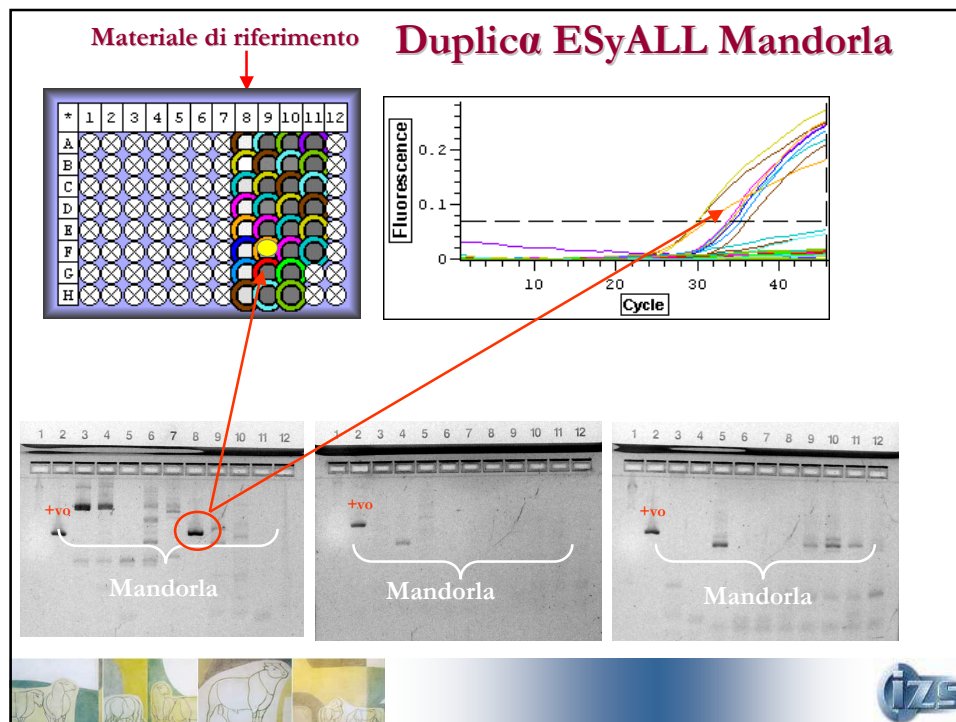


Duplica ESyALL Nocciola

Materiale di riferimento







RISULTATI

	NOCCIOLA	PISTACCHIO	SESAMO	MANDORLA	ORZO
Prodotti da forno (tot. 16)	negativi	negativi	n. 2 campione positivi	negativi	n. 3 campione positivi •n. 2 non dichiarato •n. 1 dichiarato
Alimenti estrusi (tot. 4)	negativi	negativi	negativi	negativi	n. 1 campione positivi
Gelati (tot. 6)	n. 2 campione positivi •n. 1 attesi •n. 1 non atteso	n. 3 campione positivi •n. 2 attesi •n. 1 non atteso	n. 3 campione positivi	negativi	negativi
Bevande (tot. 1)	negativi	negativi	negativi	positivi	negativi
Salse (tot. 1)	positivi	positivi	positivi	negativi	negativi



NOROVIRUS

serbatoio principale
UOMO

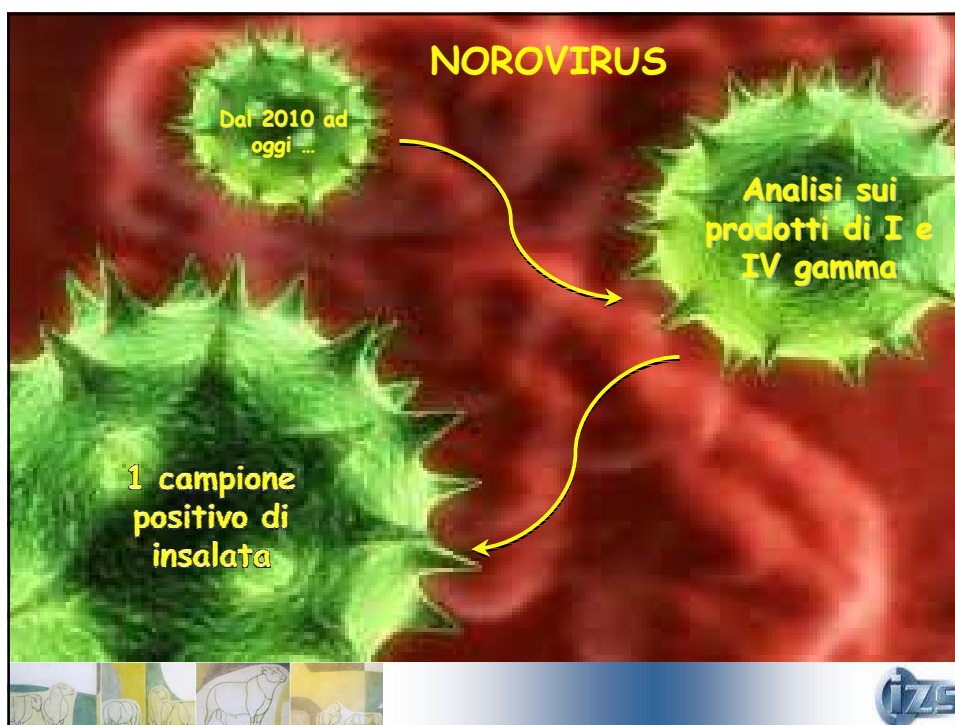
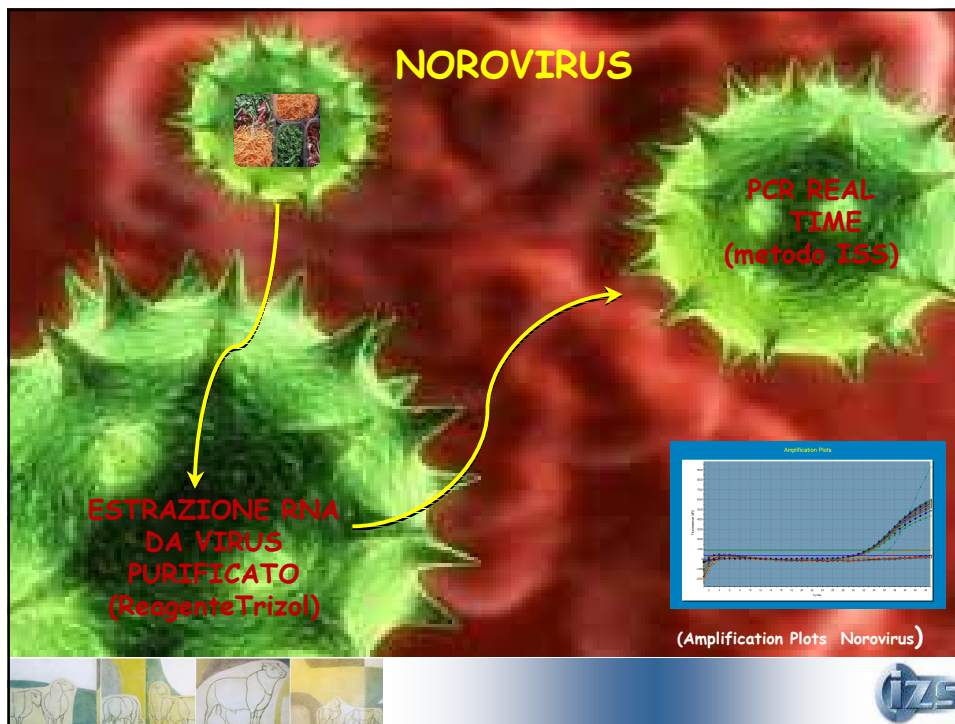
Acqua e bevande, frutti di piante a basso fusto (es. fragole e altri "berries"), verdura, frutti di mare soprattutto mitili e ostriche che più facilmente vengono consumati crudi o poco cotti.

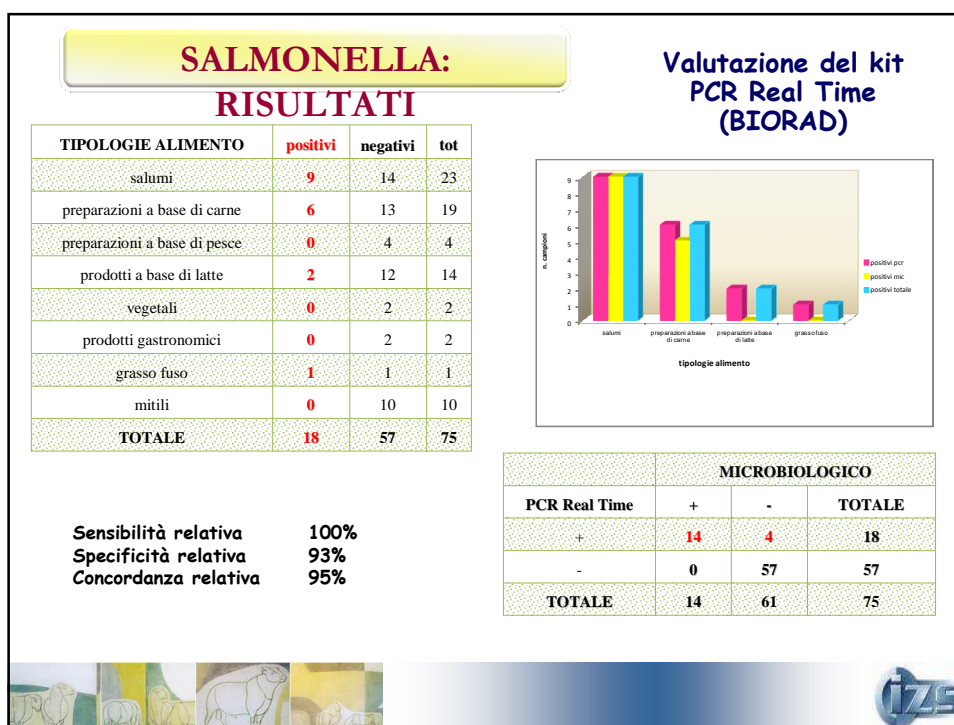
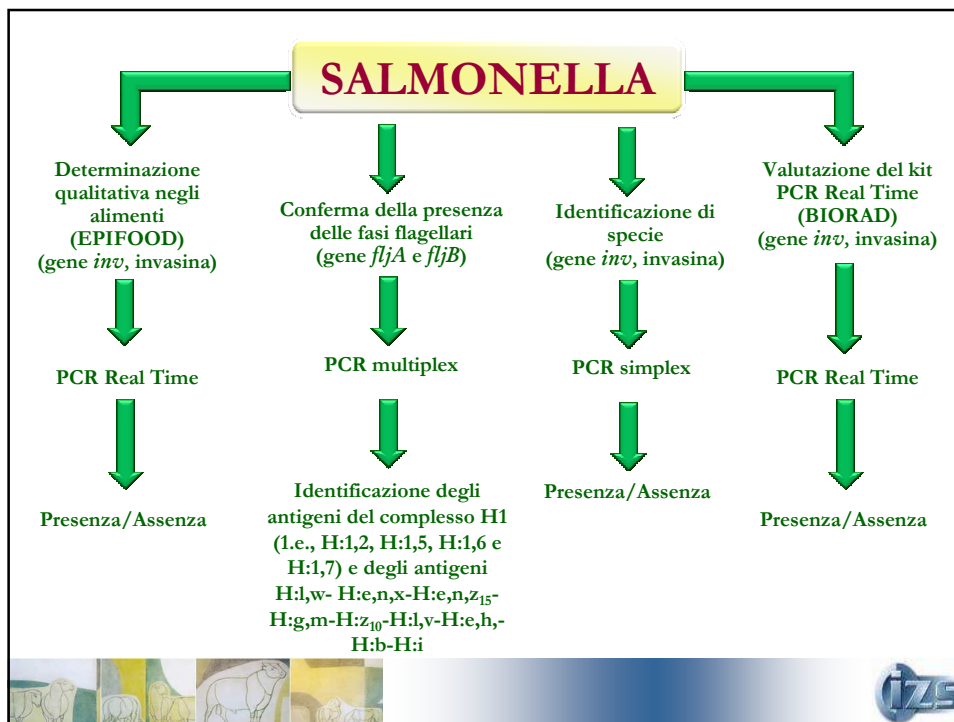
- Famiglia dei *Caliciviridae*
- Forma a calice
- Virus a RNA
- Insieme al virus dell'Epatite A, Epatite E, Poliovirus, Cocksackievirus, Astrovirus, Rotavirus, appartiene gruppo dei "Virus Enterici"

Gastroenterite con vomito, diarrea, crampi addominali, cefalea, mialgia e occasionalmente febbre.

Il periodo d'incubazione varia da 12 a 72 ore e in genere la malattia si risolve in 48 ore.







SALMONELLA:

RISULTATI

Determinazione qualitativa negli alimenti
(EPIFOOD)

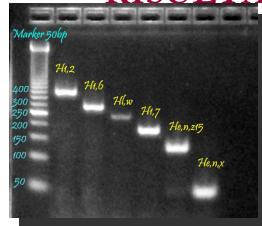
PAGINA
IN
ALLESTIMENTO



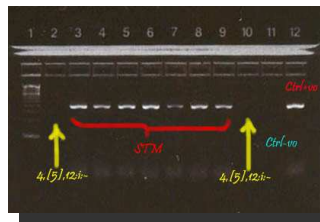
SALMONELLA:

RISULTATI

Seconda fase flagellare *Salmonella*
spp
(POS MIC 008 INT)



(Echeita et al. 2002)



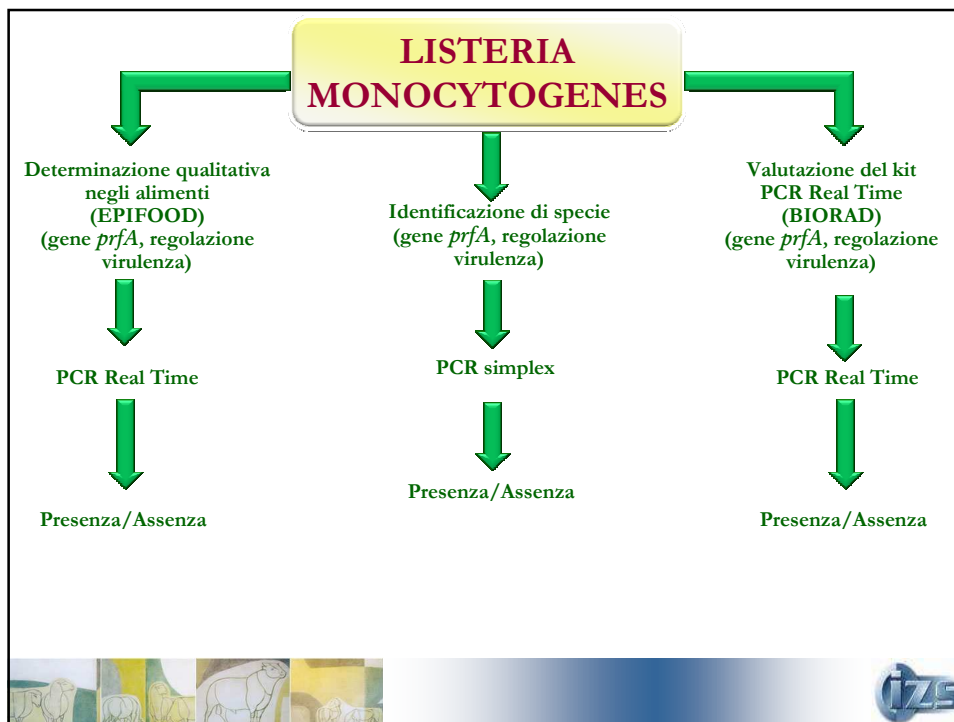
Conferma molecolare di
"Salmonella 4,12,12,12, nuovo
sierotipo"

Identificazione degli
antigeni del
complesso H1 (i.e.,
H:1,2, H:1,5, H:1,6 e
H:1,7) e degli
antigeni H:l,w-
H:e,n,x-H:e,n,z₁₅

Anno	Salmonella 4,12,12,12 (uomo)	%	Totale	Salmonella 4,12,12,12 (animali e alimenti)	%	Totale
1995	-	-	-	0	0	174
1996	-	-	-	1	0,4	425
1997	4	1,0	381	0	0	390
1998	0	0	557	0	0	325
1999	3	0,3	884	0	0	275
2000	0	0	772	0	0	278
2001	8	1,6	478	0	0	221
2002	4	0,7	591	2	1,0	198
2003	6	1,3	446	0	0	303
2004	15	2,5	605	14	3,8	360
2005	31	6,7	463	3	1,2	250
2006	41	9,2	445	18	6,4	282

Distribuzione di *Salmonella*
4,12,12,12: per anno
d'isolamento e origine





LISTERIA: RISULTATI

Determinazione qualitativa negli alimenti (EPIFOOD)

PAGINA
IN
ALLESTIMENTO

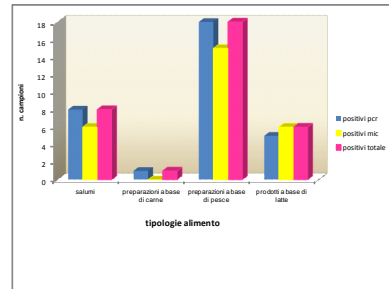


LISTERIA: RISULTATI

TIPOLOGIE ALIMENTO	positivi	negativi	tot
salumi	8	27	35
preparazioni a base di carne	1	13	14
preparazioni a base di pesce	18	28	46
prodotti a base di latte	6	42	48
vegetali	0	2	2
prodotti gastronomici	0	5	5
salumi	8	27	35
preparazioni a base di carne	1	13	14
totale	18	57	75

Sensibilità relativa 95%
Specificità relativa 91%
Concordanza relativa 92%

Valutazione del kit PCR Real Time (BIORAD)



PCR Real Time	MICROBIOLOGICO		
	+	-	TOTALE
+	21	11	32
-	1	117	118
TOTALE	22	128	150



CAMPYLOBACTER

**Determinazione qualitativa
negli alimenti
(EPIFOOD)**
 (kit commerciale, target non
dichiarato)

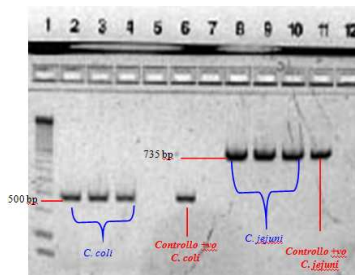
PCR Real Time

Presenza/Assenza
 (gruppo: *C. coli*, *C. jejuni*, *C. lari*)

Identificazione di specie
 (*C. coli*, *C. jejuni*)

PCR multiplex

Presenza/Assenza



CAMPYLOBACTER:

RISULTATI

Determinazione qualitativa negli alimenti
(EPIFOOD)

PAGINA
IN
ALLESTIMENTO

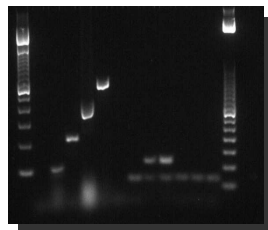


CLOSTRIDIUM BOTULINUM

Identificazione tossina
botulinica A, B, E e F
(alimenti)
POS MIC 012 INT

PCR multiplex

Presenza/Assenza



Identificazione tossina
botulinica C e D
(animali)
POS MIC 012 INT

PCR multiplex

Presenza/Assenza

