

“Applicazione dei metodi rapidi alla microbiologia alimentare: PCR e Immunosensori per la determinazione dei batteri patogeni”

Elisabetta Delibato

Reparto Pericoli microbiologici connessi agli alimenti



METODICHE APPLICABILI ALLA DETERMINAZIONE DEI PATOGENI ALIMENTARI

- *Regolamento comunitario 178/2002: riduzione ed eliminazione del pericolo attraverso l'Analisi del rischio, armonizzazione del Sistema di allerta Europea (maggiore attenzione alle problematiche emergenti).*
- *"Pacchetto di igiene" estensione del Controllo Ufficiale e dell'autocontrollo ai mangimi e alle materie prime; validazione dei piani HACCP (analisi dei punti critici).*

Necessità di ricorrere a metodi rapidi in grado di dare nei tempi più brevi possibili le informazioni sull'origine e la diffusione dei prodotti contaminati



•Metodi tradizionali affidabili ma lunghi: hanno l'obiettivo di isolare o numerare, mediante l'impiego di terreni colturali, i microrganismi presenti nei campioni da sottoporre ad analisi

•Metodi rapidi presentano il vantaggio di potere ottenere i risultati in 24-48 ore e consentono di prendere misure tempestive, ai fini della liberalizzazione dei prodotti. Forniscono una risposta qualitativa e quantitativa

Tra questi i principali sono: metodi molecolari e metodi immunologici

Metodi molecolari: hanno come bersaglio specifiche sequenze geniche del DNA batterico e impiegano la *Polymerase chain reaction*

Metodi immunologici: hanno come bersaglio particolari antigeni e impiegano anticorpi specifici supportati da vari sistemi di rivelazione

*C. Scalfaro, E. Delibato, L. Orefice. Metodi di ricerca di batteri patogeni negli alimenti
.Industrie Alimentari, n°442, 2004.*



Progetti Europei e Nazionali

- Validation and Standardization of Diagnostic Polymerase Chain Reaction for Detection of Foodborne Pathogens (Food PCR 1)
 - General requirements for real-time PCR standardization (Food PCR 2)
 - Ricerca finalizzata 2005: studio e applicazione di modelli di controllo e di microbiologia predittiva su base Real-Time PCR per valutare la presenza e il comportamento di patogeni in prodotti tradizionali italiani
- Validazione di due metodi per la ricerca della *Listeria monocytogenes* e della *Salmonella* in prodotti tipici italiani
- Ricerca finalizzata 2004/2005 (Ministero della Salute): sviluppo di immunosensori per la determinazione dei batteri patogeni negli alimenti e nell'aria



Metodi molecolari

ISO 22174 del 2003: PCR per la determinazione dei patogeni negli alimenti

- arricchimento della matrice contenente i germi patogeni
- estrazione e purificazione degli acidi nucleici
- amplificazione del target utilizzando i primers specifici
- determinazione dei prodotti della PCR

Controlli richiesti per l'analisi dei campioni alimentari

| | Controllo negativo trattamento | Controllo positivo trattamento | Controllo negativo estrazione | Controllo interno amplifica zione | Controllo positivo PCR | Controllo negativo PCR |
|-------------------------|--------------------------------------|--------------------------------------|-------------------------------------|--|------------------------------|------------------------------|
| Trattamento campione | ↓ | ↓ | | | | |
| Eastrazione DNA | ↓ | ↓ | ↓ | | | |
| Amplificazione | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ |
| Detrminazione | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ |

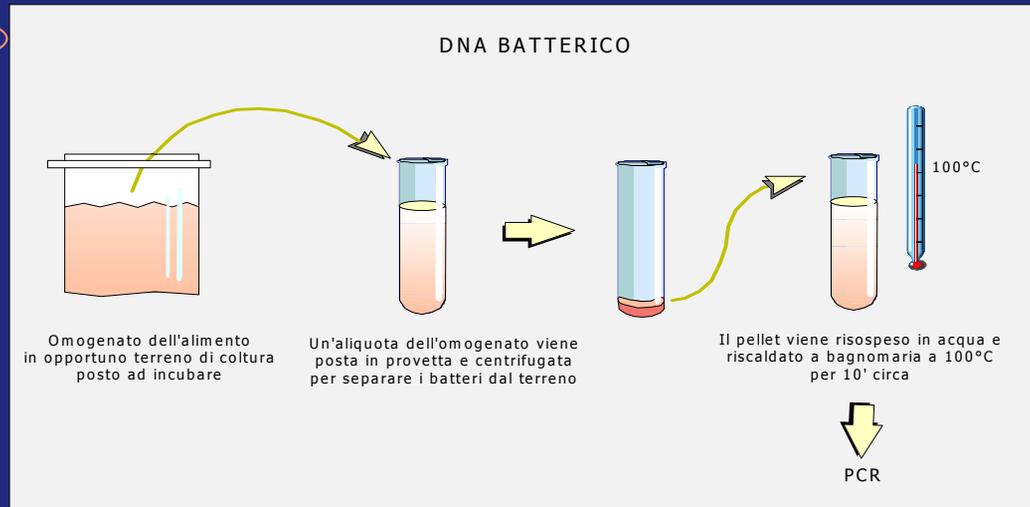
Food-PCR.dk

Malorny B. et al. Int. J. Food Microb. 2003, 83, 39-48

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, Croci, Delibato, Di Pasquale, Toti ., Appl. Environ. Microbiol. 2003, 69: 3456-3461

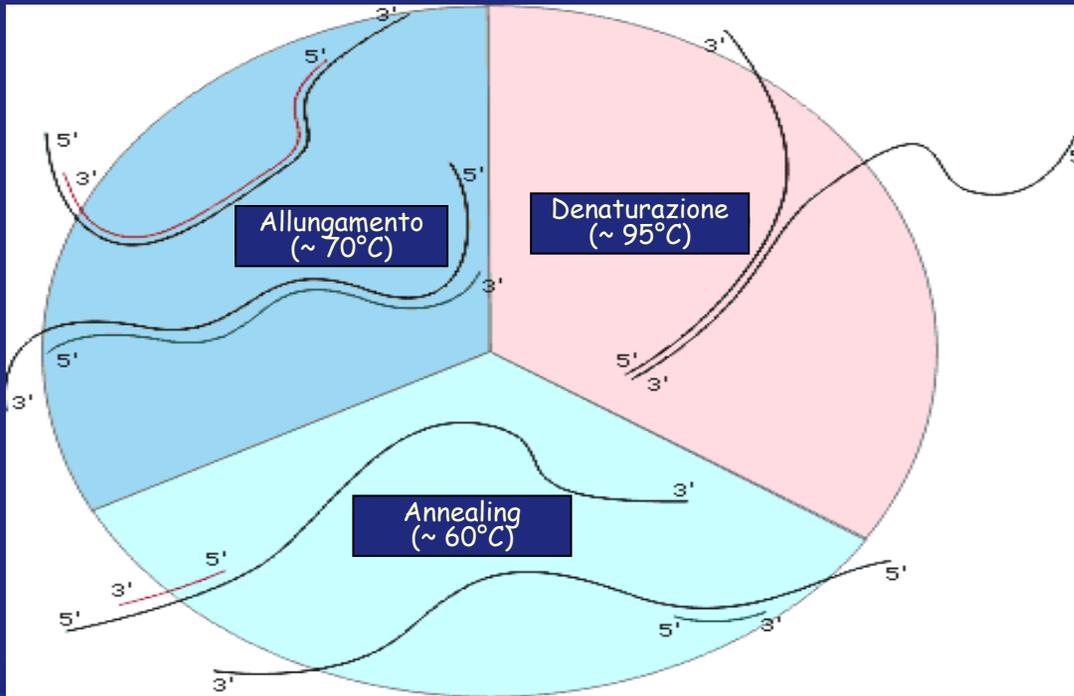
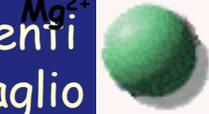
Hoorfar et al., APMIS, 2004, 112, 808-814.

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

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



Le FASI della PCR

Controllo Interno di Amplificazione

Necessità di armonizzare e standardizzare solo metodi che includano un controllo interno di amplificazione (IAC) per potere evidenziare inibizioni della matrice ed evitare quindi i falsi negativi.

Il riscontro della positività dell'IC in assenza della positività del campione, indica che il campione è veramente negativo.

L'IC viene prodotto mediante una 1^a PCR a partire da:

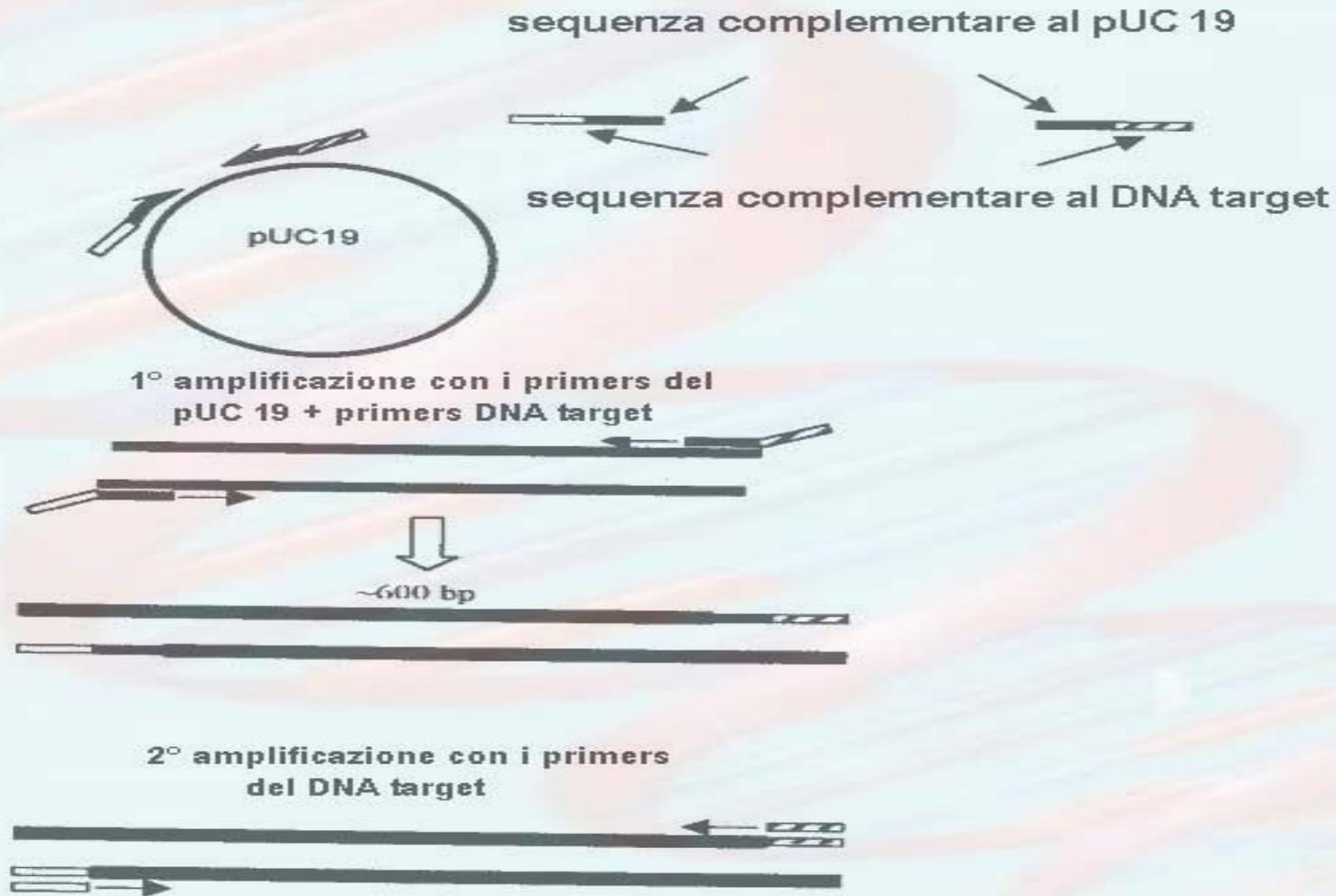
-DNA plasmidico;

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

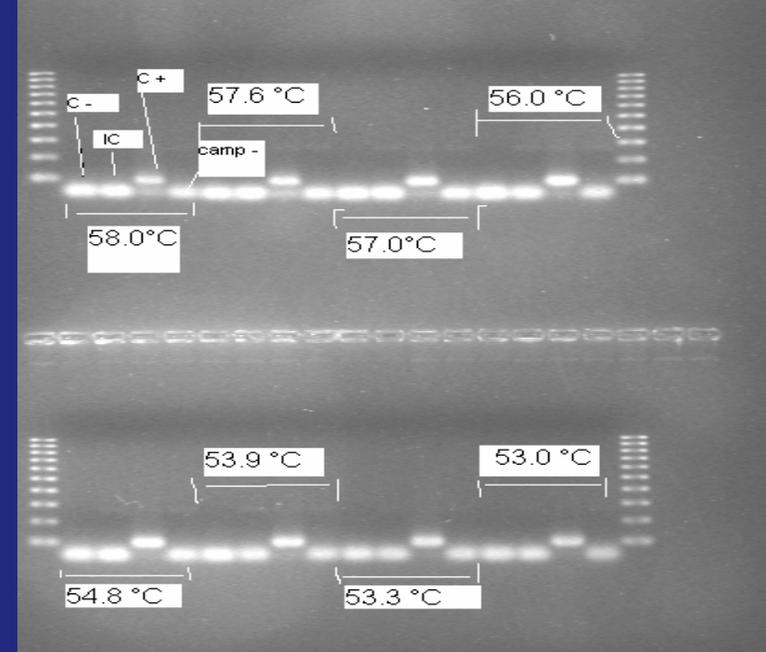
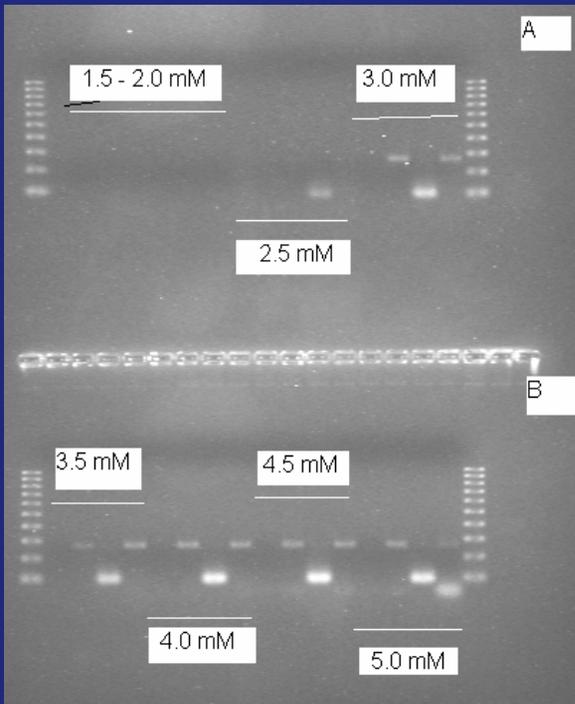
Croci, Delibato, Volpe, De Medici, Palleschit Appl. Envir. Microbiol. 2004, 70, 1393-1396
Hoorfar J., De Meidici 2003, Making Internal Amplification Control for diagnostic PCR. I. Clin Microbiol. Vol.12, 5835



Costruzione dell'IC utilizzando come target il pUC 19

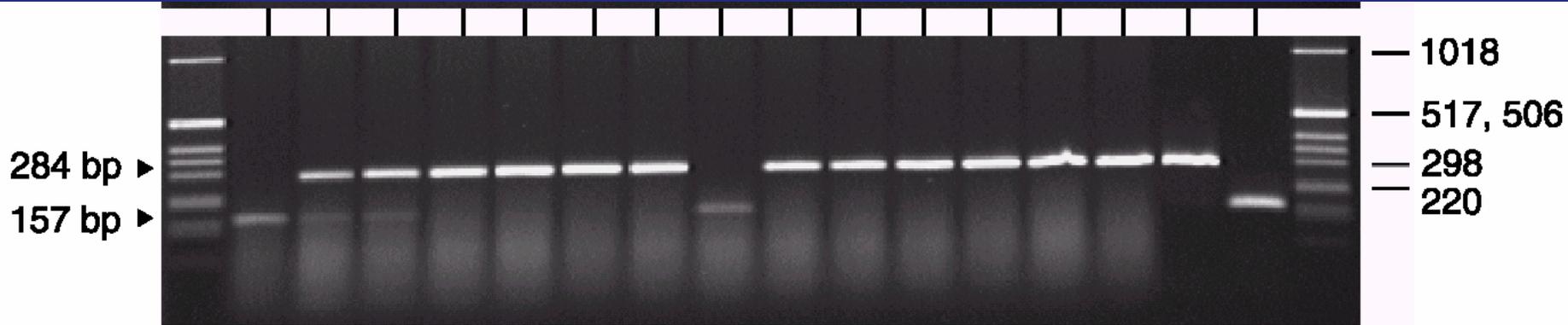


Ottimizzazione della T. annealing nella coamplificazione dell'IC con il DNA target



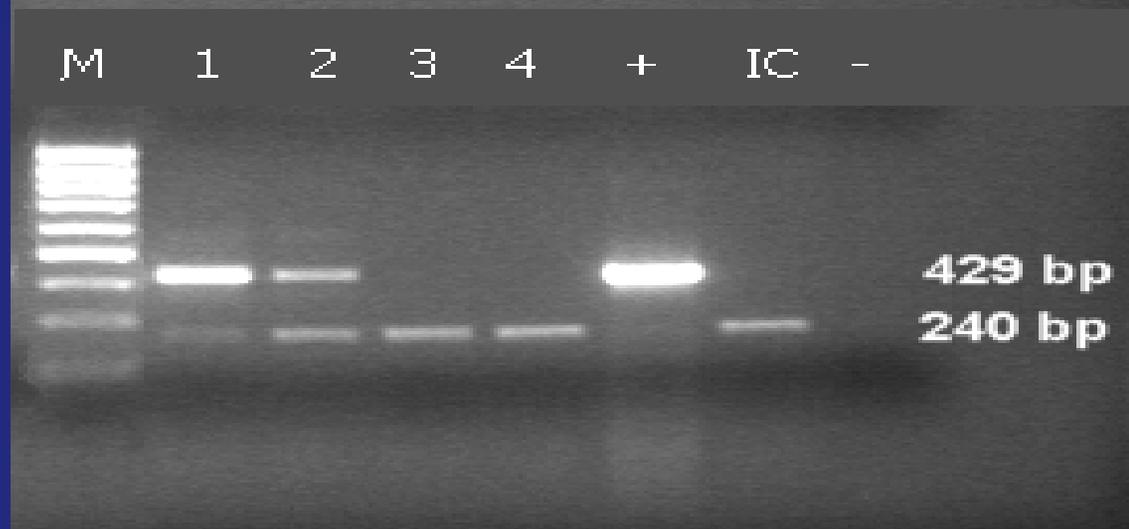
Ottimizzazione della concentrazione di MgCl₂ nella coamplificazione dell'IC con il DNA target

Validazione della PCR con controllo interno per la determinazione della Salmonella nel pollame



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 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 ;
Crocchi et al. Appl. Envir. Microbiol. 2004, 70, 1393-1396*

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

PCR Real Time

Sensibile

Specifica

Rapida

Quantifica i microrganismi presenti nel campione

Misura "step by step" la fluorescenza che si genera durante la reazione a catena per effetto di due diverse reazioni biochimiche, utilizzando due diversi sistemi di rilevamento dell'accumulo dei prodotti di PCR:

-coloranti che si legano ai doppi filamenti di DNA;

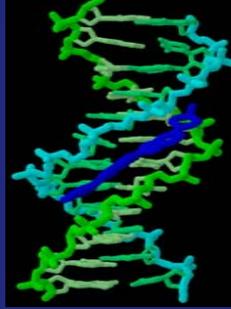
-sonde legate a molecole fluorescenti.

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

De Medici, Di Pasquale, Delibato, Toti (2002) Alimentaria, 02/11, 11-16.



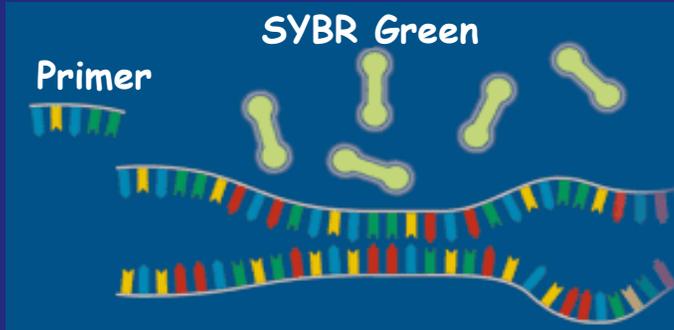
SYBR Green



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

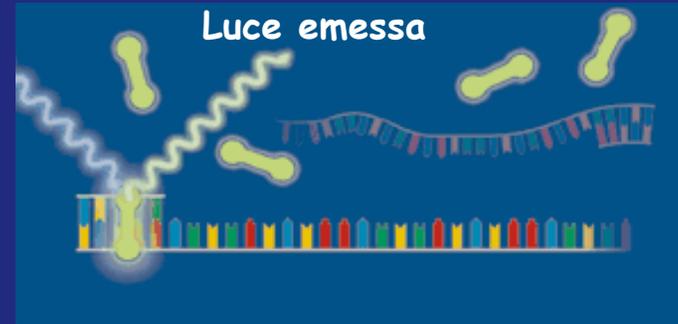
DENATURAZIONE

Non viene rilevata fluorescenza



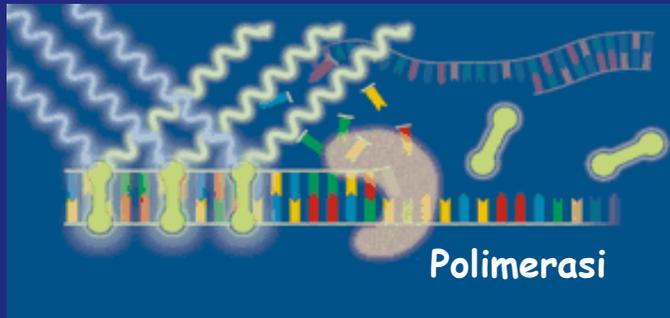
ANNEALING

L'intensità della fluorescenza comincia ad aumentare



ALLUNGAMENTO

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

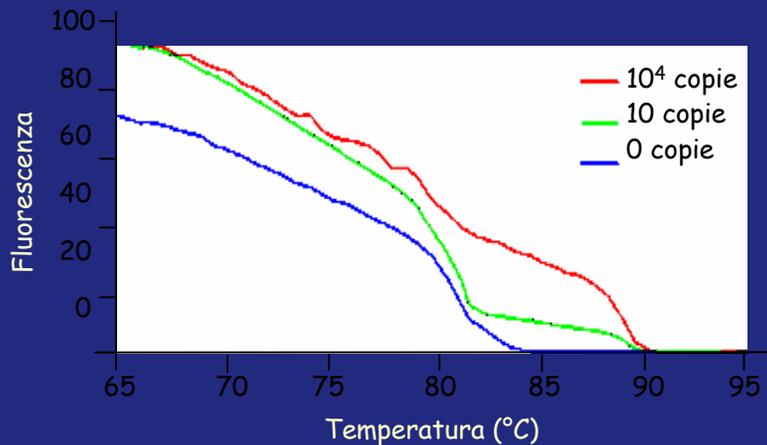


L'AUMENTO DELLA FLUORESCENZA E' REGISTRATO A 530_{nm}

ANALISI della CURVA di MELTING

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

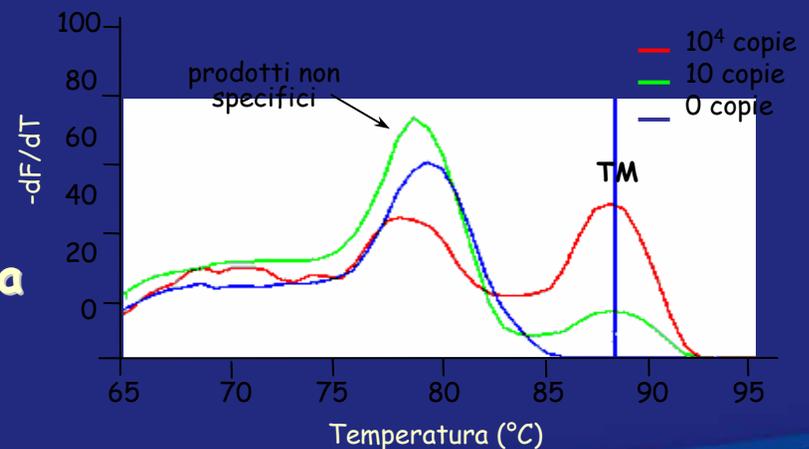
Curva di melting



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

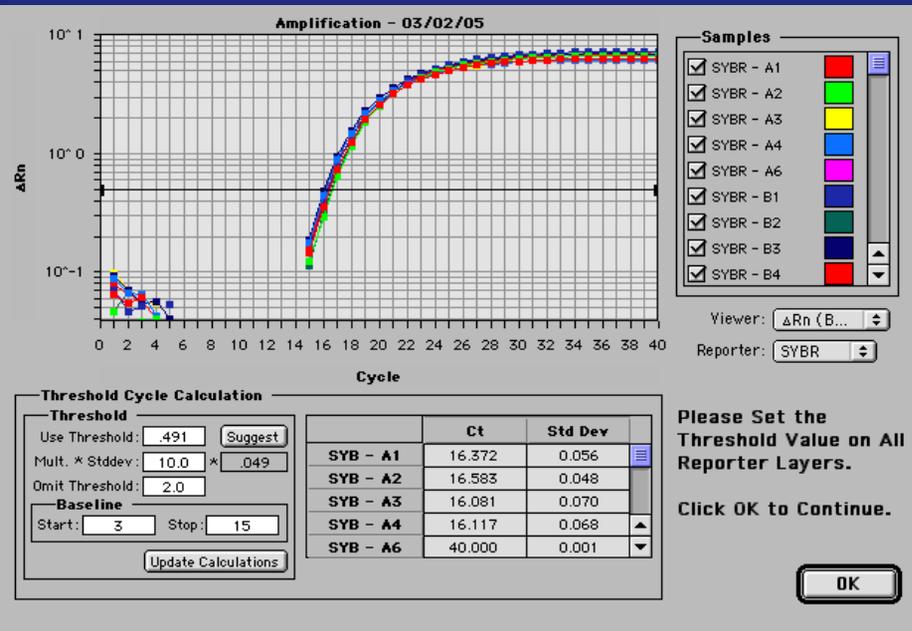
Al termine della PCR la temperatura viene lentamente aumentata inducendo un decremento della fluorescenza. Si applica una rampa di T (60-95 °C)

Derivata negativa della curva di melting

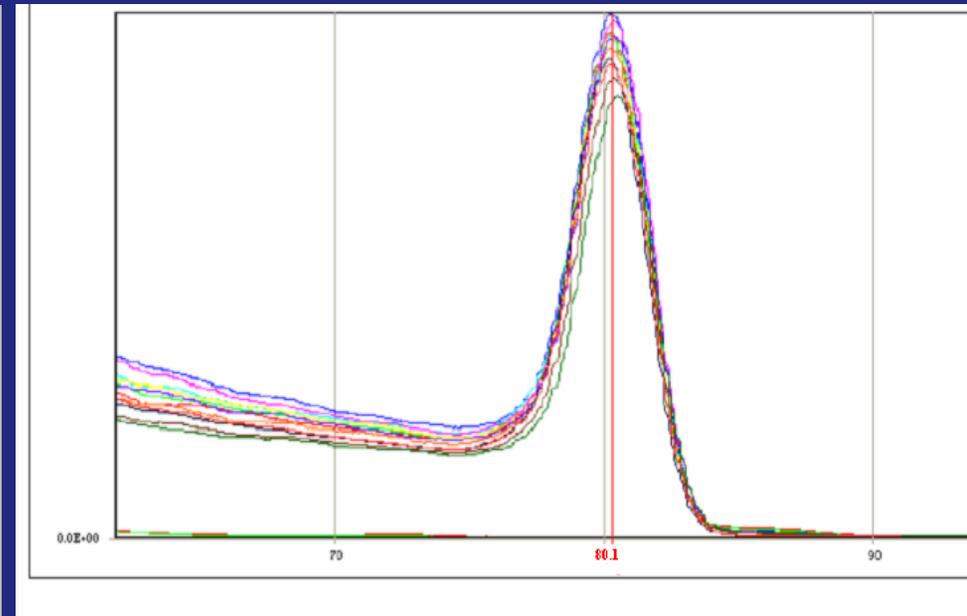


Applicazione della PCR SYBR Green per la determinazione della Salmonella spp. utilizzando i primers ttr

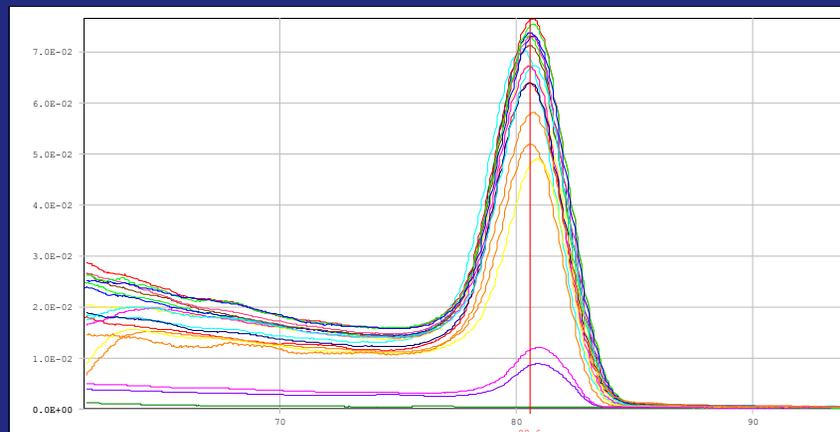
Analisi dei Ct



Curva di melting

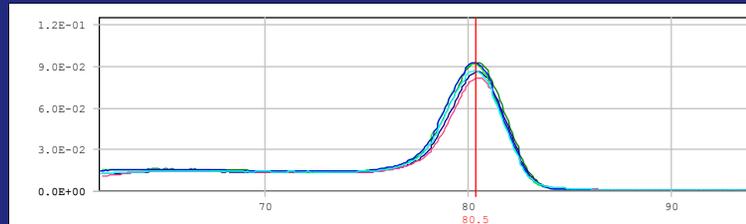


- Diluizioni scalari di *Salmonella typhimurium* (from 10^8 CFU/vial to 10 cfu/vial) e campioni ignoti (10^7 cfu/vial di *S. London* e 10^7 cfu/vial of *S. infantis*)

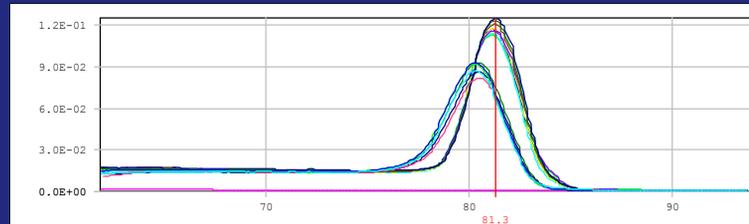


I controlli interni sono stati costruiti utilizzando il pUC19

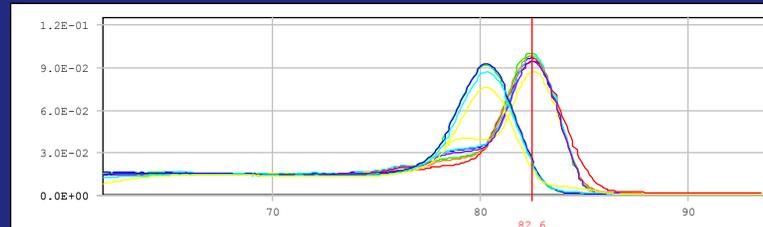
Salmonella



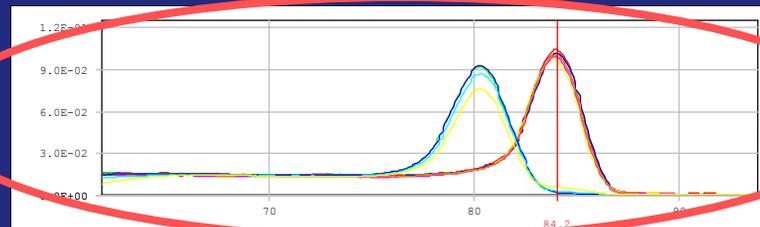
Salmonella e 1° IAC



Salmonella e 2° IAC



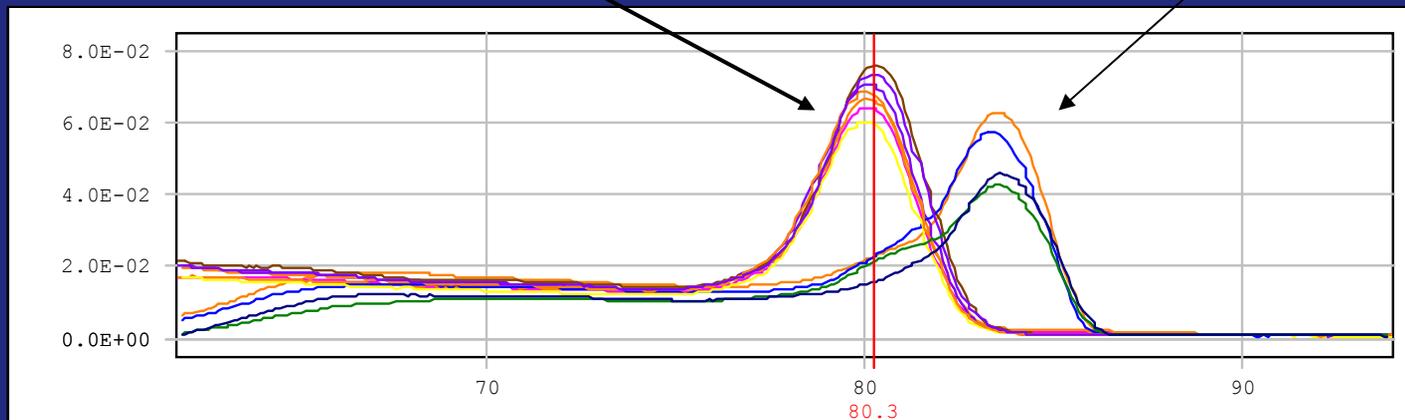
Salmonella e 3° IAC



Determinazione della Salmonella in campioni di carne sperimentalmente contaminati con 1-10 cell/25g utilizzando il SYBR Green real Time PCR dopo 24 h di prearricchimento (IAC=2,65 fg/vial)

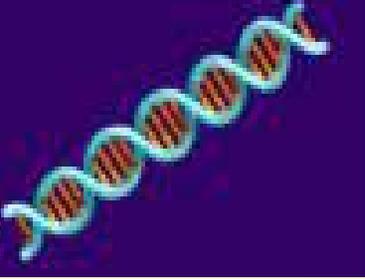
S. Enteritidis
S. Derby
S. London
S. Thypimurium
S. Anatum

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

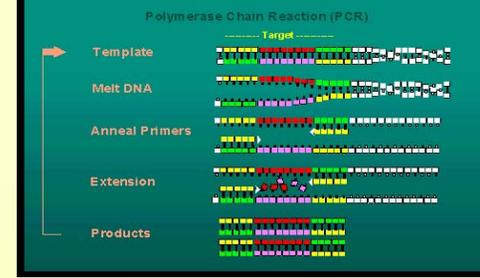


SYBR Green I

- Può essere applicato ai protocolli sperimentali che sono già in uso per l'esecuzione della PCR classica apportando solo piccole modifiche.
- Più di una molecola di SYBR Green I si può legare alla doppia elica di DNA, in modo che, gli ampliconi prodotti dalla PCR generino un segnale molto intenso.
- La specificità della reazione viene confermata con l'analisi della temperatura di melting (T_m) dell'amplicone ottenuto



PCR



Sviluppo e applicazione di metodi molecolari (Real-Time PCR) per valutare la presenza e il comportamento di patogeni in prodotti tradizionali italiani:

Salmonella spp. (PCR Real time sonda)

Listeria monocytogenes (PCR Real time SYBR Green e sonda)

Valutazione della persistenza del Campylobacter spp. (PCR Real time SYBR Green e sonda)

Biosensore

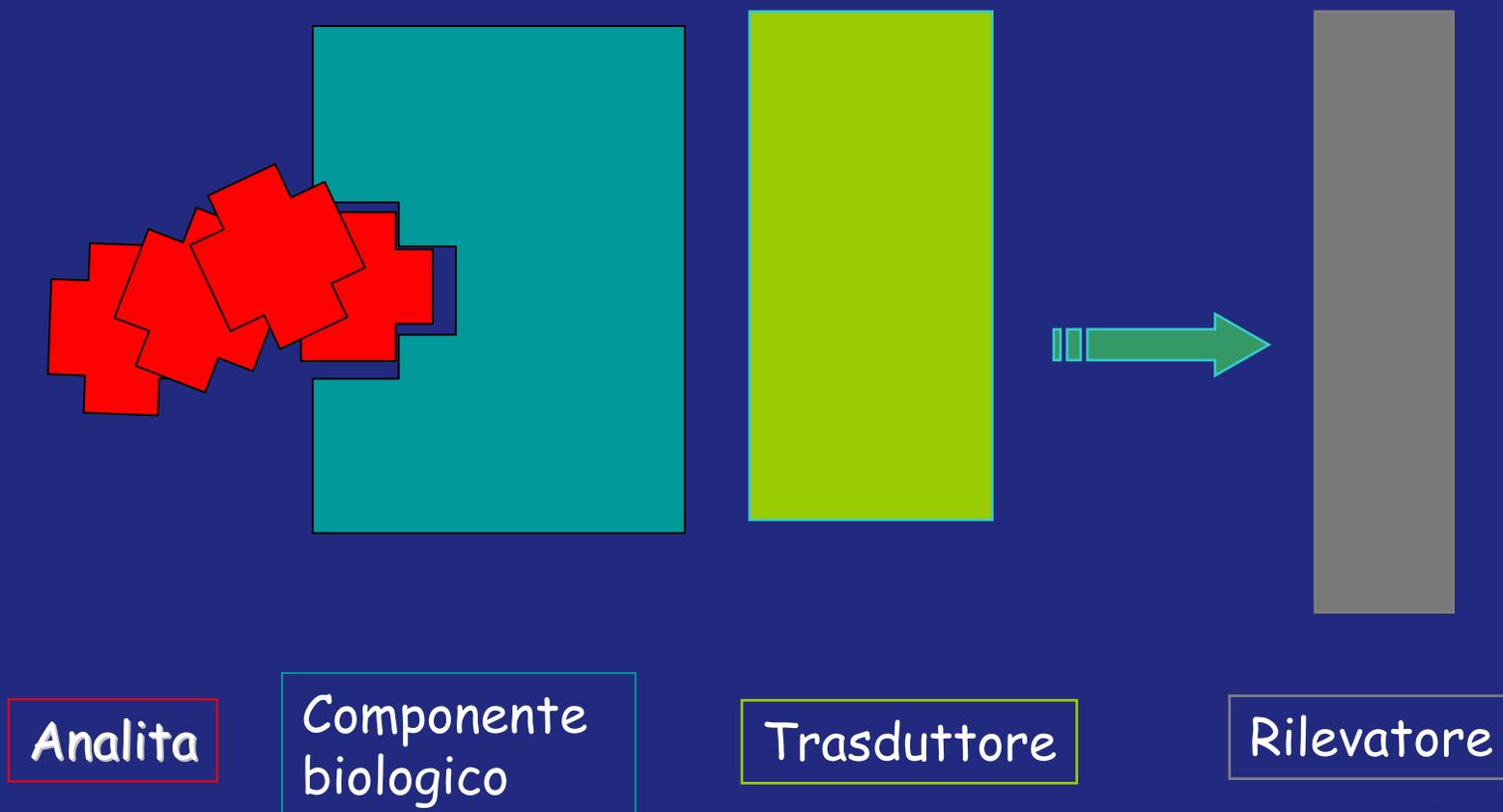
■ Strumento analitico in cui è presente un elemento biologico strettamente connesso o integrato con un trasduttore di segnale.

■ Il materiale biologico è rappresentato da uno o più enzimi, anticorpi, batteri, cellule che interagiscono con il substrato che si vuole determinare e sono responsabili della specificità del sensore.

■ Dall' interazione del materiale biologico con l'analita da determinare si genera un segnale che può essere di tipo:

- elettrochimico
- luminoso (biosensori ottici)
- calorico (biosensori termici)
- variazione di massa (biosensori piezoelettrici)

Schema di un Biosensore



IMMUNOSENSORI



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

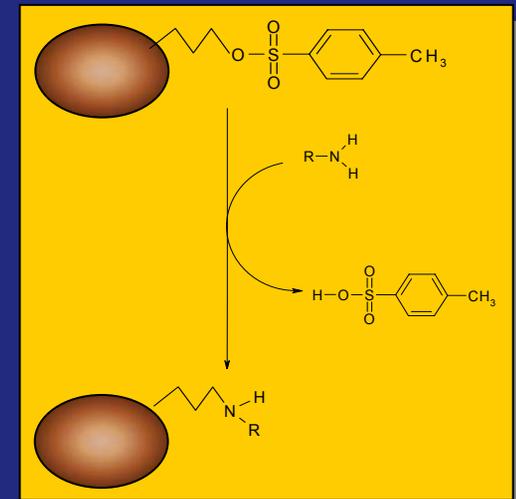
I saggi immunoenzimatici in fase eterogenea sono dosaggi di legame basati sulle interazioni antigene-anticorpo, che utilizzano come traccianti reazioni enzimatiche. L'anticorpo o l'antigene sono infatti coniugati con un enzima in modo che l'antigene da dosare possa essere determinato mediante una misura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

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 .

SAGGIO basato sull'uso di particelle magnetiche per la determinazione dell'*S.aureus*

ELIME *S.aureus* (enzyme linked immunomagnetic electrochemical assay)

Beads tosilate



La proteina A, situata sulla parete dell'*S.aureus*, è stata utilizzata come antigene della reazione.

Tale proteina è stata estratta mediante bollitura.

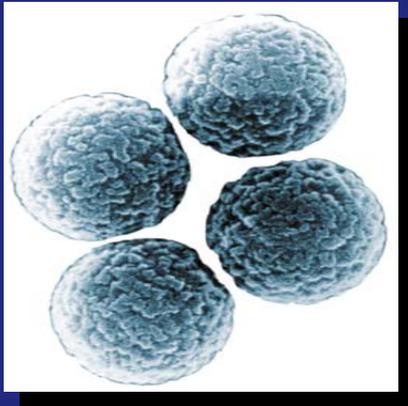
PARTICELLE MAGNETICHE

Le particelle magnetiche, sono particelle costituite da una dispersione di materiale magnetico (Fe_2O_3 and Fe_3O_4) ricoperta da un sottile guscio polimerico che provvede a definirne l'area superficiale per l'immobilizzazione di una grande varietà di molecole.

Buoni risultati in campo immunologico

\varnothing 1-5 μm

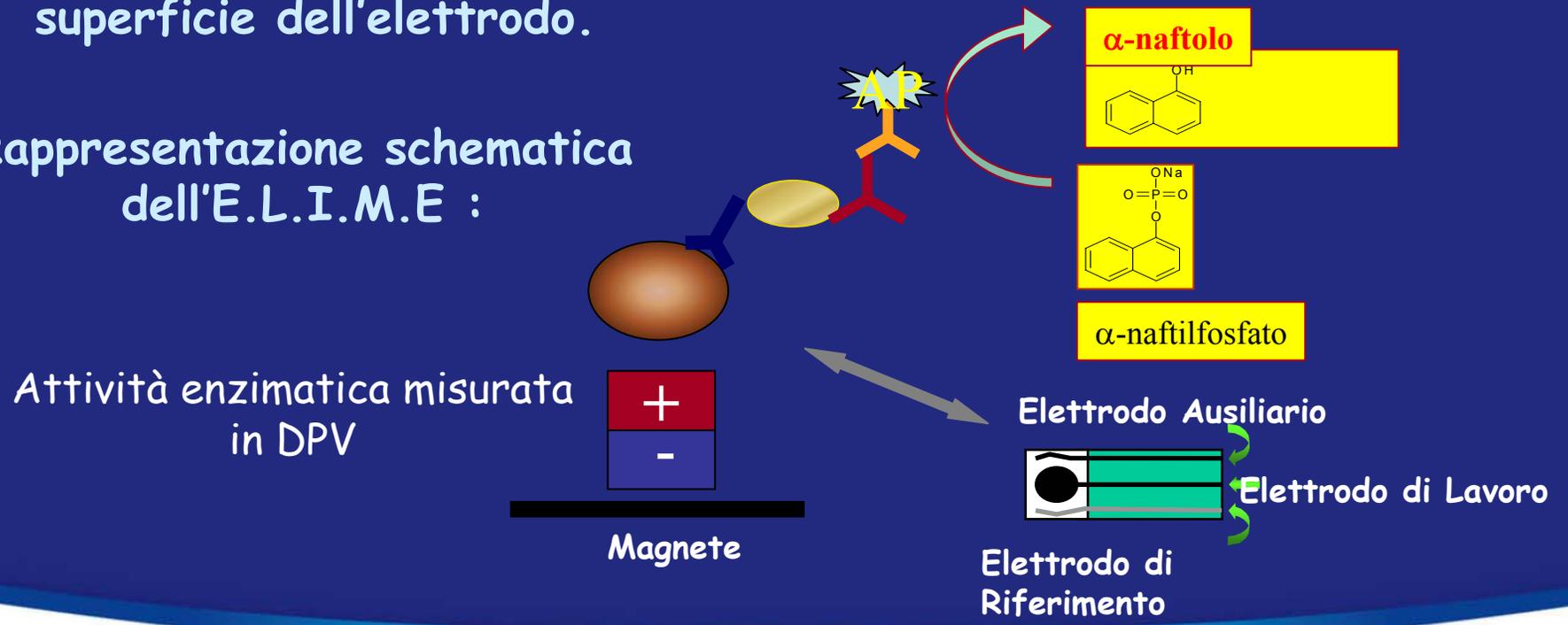
Misure su campioni reali



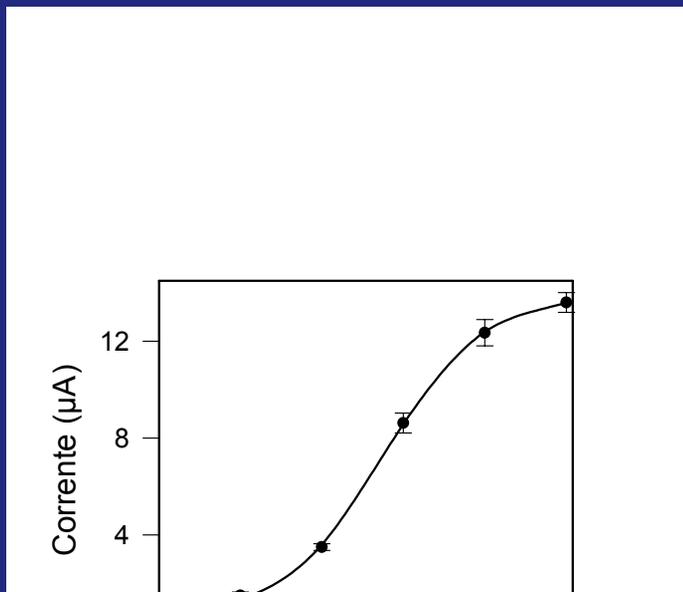
E.L.I.M.E. Assay: Enzyme Linked Immunomagnetic Electrochemical Assay

- Selettività degli anticorpi;
- Sensibilità della rivelazione elettrochimica;
- Possibilità di concentrare le particelle magnetiche sulla superficie dell'elettrodo.

Rappresentazione schematica dell'E.L.I.M.E :



ELIME



LOD

10^{-3} UFC/mL

Sensibilità

2×10^4 UFC/mL

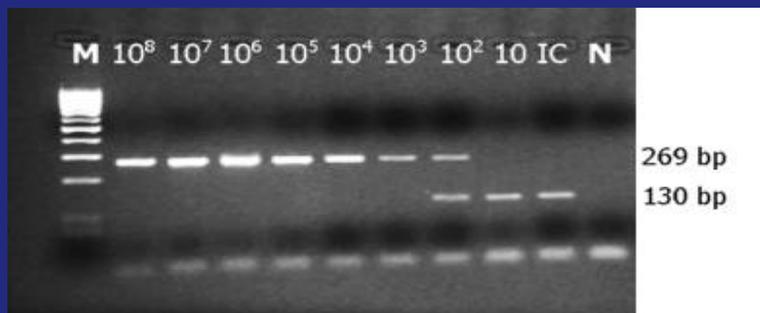
S. aureus

IgG 1.2 mg/mL

MAB 1:1000

Ab₂-AP 1:100

PCR con IC



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11

Sostituendo la bollitura con il trattamento enzimatico con **lisostafina**
LOD = 50 UFC/mL

Tempo totale di analisi ELIME e PCR = 3 ore

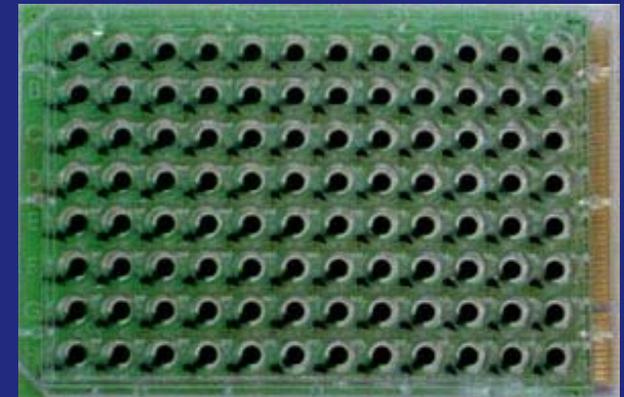
Delibato E. et al. Analytical Letters, 2005

SISTEMA IMMUNOELETTROCHIMICO MULTICANALE

Anticorpi monoclonali e policlonali-HRP, specifici per salmonella, sono stati impiegati in un "format" di tipo sandwich utilizzando una piastra da 96 pozzetti.

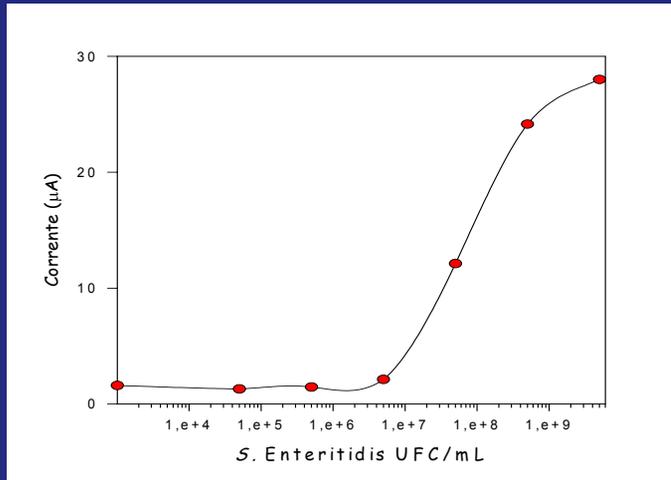


Piastra a 96 pozzetti: sul fondo di ogni pozzetto è localizzato elettrodo "screen printed"



Delibato et al. Analytical letters (in press)

Curva di calibrazione nelle condizioni ottimizzate



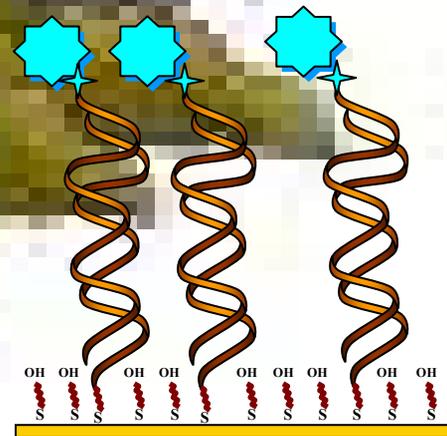
Al termine della catena immunologica la piastra viene collegata ad un potenziostato e l'attività della perossidasi (HRP) viene misurata elettrochimicamente utilizzando come substrato la 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina.

Il prodotto di reazione è rivelato mediante amperometria intermittente ad impulsi (IPA).

● Ottimizzazione :

1. Sostituzione del PAb-HRP con PAb-biotina e amplificazione del segnale grazie al legame di numerose molecole di **avidine-biotine coniugate a numerose molecole di HRP**;
2. Impiego di **particelle immunomagnetiche (IMBs)** immobilizzate sul supporto.
 - **selezione del sistema elettrochimico più sensibile;**
 - **analisi di campioni sperimentalmente contaminati con 1-10 ufc/ml, per stabilire il tempo minimo di pre-arricchimento**

BIOSENSORI a DNA



GRAZIE
PER LA CORTESE
ATTENZIONE

