

OTTIMIZZAZIONE DI UN METODO PCR PER LA RICERCA DI *SALMONELLA* SPP. DA MANGIMI

Taddei R., Tosi G., Massi P.

*Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna
Sezione di Forlì*

Key words: *Salmonella* spp., PCR, mangime

Abstract

Salmonella spp. rappresenta una delle maggiori cause di tossinfezioni trasmesse da alimenti. Poichè le tecniche colturali convenzionali richiedono lunghi tempi di risposta, negli ultimi anni sono stati sviluppati alcuni metodi PCR notevolmente più rapidi. Lo scopo di questo lavoro è stato quello di ottimizzare un metodo PCR tradizionale per la ricerca di *Salmonella* spp. da mangimi ad uso zootecnico. Tre diversi metodi di estrazione sono stati accoppiati ad un protocollo di amplificazione e testati su mangimi artificialmente contaminati. Utilizzando questo metodo è stato possibile rilevare la presenza di 4 u.f.c. *Salmonella* spp. per 50 grammi di mangime. Gli stessi metodi saranno anche testati su mangimi naturalmente contaminati e su campioni di contenuto cecale di polli SPF sperimentalmente infettati con un ceppo di campo di *S. enterica* serotype Hadar.

Introduzione

Salmonella spp. è riconosciuta come uno dei maggiori agenti zoonotici per gli uomini e gli animali. In un recente parere dell'EFSA sulla valutazione del rischio microbiologico dei mangimi per animali destinati alla produzione alimentare, sia per la salute umana che per la salute animale (3), il gruppo di esperti scientifici ha individuato in *Salmonella* spp. il principale pericolo di contaminazione microbica dei mangimi. I mangimi contaminati da *Salmonella* spp. costituiscono una fonte di potenziale infezione per gli animali destinati alla produzione alimentare e di contaminazione degli alimenti derivati. Allo scopo di minimizzare il rischio di infezione, diventa fondamentale l'adozione di misure di controllo lungo tutta la catena produttiva alimentare. In questo contesto, la PCR rappresenta un metodo con indubbi vantaggi rispetto al metodo colturale, legati in particolare ai tempi di risposta considerevolmente minori (2 giorni rispetto ai 4-6 giorni della coltura).

Scopo del lavoro

Scopo del lavoro è la ottimizzazione di un metodo PCR attraverso il confronto tra tre diversi protocolli per la ricerca di *Salmonella* spp. da campioni di mangime. Campioni di mangime sono stati artificialmente contaminati con una sospensione a titolo noto di *S. enterica* serotype Typhimurium ATCC 6994 ed analizzati con i tre protocolli PCR, con il metodo colturale di riferimento ISO 6579(2002)/Cor1 (2004) "Microbiology of food and animal feeding stuff – Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp." e con il metodo ISO 6579:2002/Amd 1:Annex D: "Detection of *Salmonella* spp. In animal faeces and environmental samples from the primary production stage (2007)". La metodica PCR ottimizzata verrà quindi applicata a campioni di mangime naturalmente

infetti e a campioni di contenuto cecale provenienti da polli SPF infettati sperimentalmente con un ceppo di campo di *S. enterica* serotype Hadar.

Materiali e Metodi

Estrazione

Crescita del ceppo batterico utilizzato per l'inoculo. Il ceppo di *S. enterica* serotype Typhimurium ATCC 6994 utilizzato per la contaminazione dei campioni di mangime è stato coltivato in Acqua Peptonata Tamponata.

Quantificazione batterica attraverso conta vitale. La concentrazione della sospensione batterica è stata determinata piastrando diluizioni seriali in base 10 su terreno Hektoen.

Preparazione di campioni di mangime artificialmente contaminato. Il mangime utilizzato per l'analisi, preventivamente testato con esito negativo per la presenza di *Salmonella* spp. con metodo colturale di riferimento ISO 6579(2002)/Cor1 (2004), è un mangime completo per galline in produzione reperito sul commercio. Diluizioni seriali in base 10, da 10^5 a 10^{-2} *S. enterica* serotype Typhimurium ATCC 6994 per ml, sono state allestite in soluzione di Ringer. 50 grammi di ogni campione di mangime sono stati omogenati in 450 ml di Acqua Peptonata Tamponata in un sacchetto da stomacher ed addizionati di un'aliquota di sospensione batterica in modo da ottenere campioni con concentrazione finale da 4×10^5 a 0,04 c.f.u di *Salmonella* in 50 g di mangime. I sacchetti sono stati incubati a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ per 18 ± 2 ore e sottoposti ad analisi mediante i 2 metodi microbiologici, ISO 6579(2002)/Cor1 (2004), ISO 6579:2002/Amd 1:Annex D (2007).

Estrazione di DNA dai campioni di mangime dopo prearricchimento. I campioni di mangime sono stati sottoposti a 3 diversi metodi di estrazione. Ogni metodo è stato testato su due repliche (A e B) di campioni contaminati:

- Metodo 1: kit DNeasy® Blood & Tissue, Qiagen

1 ml del brodo di prearricchimento ad ogni livello di contaminazione è stato sottoposto ad estrazione utilizzando il kit del commercio per l'estrazione del DNA seguendo il protocollo per batteri Gram negativi, da noi ottimizzato sulla matrice mangime. Brevemente, il surnatante ottenuto da ogni campione dopo centrifugazione ($1000 \times g$ per 3 min.), è stato sottoposto a lisi chimica e successiva purificazione del DNA mediante colonne di affinità.

- Metodo 2: estrazione con proteinasi K

1 ml del brodo di prearricchimento ad ogni livello di contaminazione è stato sottoposto ad estrazione con proteinasi K. Brevemente, il surnatante ottenuto da ogni campione dopo centrifugazione ($1000 \times g$ per 3 min.), è stato sottoposto a lisi chimica mediante proteinasi K per 1 ora a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ e successiva inattivazione dell'enzima a $99 \pm 1^\circ\text{C}$ per 10 min.

- Metodo 3: Bollitura

Il surnatante ottenuto da ogni campione dopo centrifugazione ($1000 \times g$ per 3 min.), è stato sottoposto a lavaggio e bollitura a $99 \pm 1^\circ\text{C}$ per 10 min. L'estratto ottenuto è stato diluito 1:10 in TE 0,1X ed utilizzato per la PCR.

Sensibilità dei metodi di estrazione. Allo scopo di valutare la sensibilità dei metodi di estrazione testati, gli estratti ottenuti con i tre protocolli sono stati sottoposti al medesimo protocollo di amplificazione.

Amplificazione

E' stata allestita una PCR che amplifica un frammento di 284bp del genoma batterico codificante per una Kinesina-like protein (gene *invA*) situata sulla parete batterica e responsabile dell'invasività del batterio (2)

Per l'amplificazione è stato utilizzata una *Taq* polimerasi Hot-Start (kit AccuPrime™ *Taq* DNA polymerase System, Invitrogen). In particolare, in 25 µl totali vengono miscelate le seguenti componenti: 200 nM di ogni primer (*invA*1: GTGAAATTATCGCCACG-TTCGGGCAA, *invA*2: TCATCGCACCGTCAAAGGAACC) 2,5 µl di 10x AccuPrime™ PCR Buffer II, 1 µl di AccuPrime™ *Taq* DNA polymerase e 5 µl di estratto di DNA. Profilo di amplificazione: 1 X (94°C, 2 min), 40 X (94°C, 30 sec; 64°C, 1 min, 68°C, 1 min), 1 X (68°C, 7 min).

I prodotti di PCR sono stati analizzati con elettroforesi su gel di agarosio al 2% in 1X TAE buffer. I gel sono stati colorati con SyBr Safe (Invitrogen), e visualizzati su transilluminatore UV.

Risultati

Limite di rilevabilità dei metodi colturali. I due metodi colturali hanno dato il medesimo limite di rilevabilità di 4 u.f.c. *Salmonella* spp. in 50 g di mangime. In nessun caso ci sono state differenze tra le due repliche di campioni analizzate (A e B) (Tab.1).

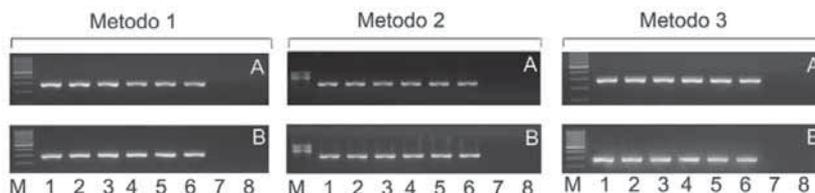
Limite di rilevabilità dei metodi PCR. I tre metodi PCR sono risultati avere tutti il medesimo limite di rilevabilità di 4 u.f.c. *Salmonella* spp. in 50 g di mangime. In nessun caso ci sono state differenze tra le due repliche di campioni analizzate (A e B) (Fig.1).

Tab. 1. Limite di rilevabilità dei 2 metodi colturali e dei 3 metodi PCR

	Metodo	Limite di Rilevabilità
Colturale	ISO 6579(2002)/Cor1 (2004)	4 u.f.c./50 g
	ISO 6579:2002/Amd 1:Annex D (2007)	4 u.f.c./50 g
PCR	Metodo di estrazione 1	4 u.f.c./50 g
	Metodo di estrazione 2	4 u.f.c./50 g
	Metodo di estrazione 3	4 u.f.c./50 g

Fig. 1. Limite di rilevabilità dei 3 metodi di estrazione.

M = Marker di peso molecolare; lane 1 = 4 x 10⁵ u.f.c./50 g; lane 2 = 4 x 10⁴ u.f.c./50 g; lane 3 = 4 x 10³ u.f.c./50 g; lane 4 = 4 x 10² u.f.c./50 g; lane 5 = 40 u.f.c./50 g; lane 6 = 4 u.f.c./50 g; lane 7 = 0,4 u.f.c./50 g; lane 8 = 0,004 u.f.c./50 g.



DISCUSSIONE

Il metodo PCR ottimizzato in questo studio ha permesso di rilevare anche basse concentrazioni di *Salmonella* spp. in campioni di mangime artificialmente contaminati. I tre metodi di estrazione hanno, infatti, mostrato il medesimo limite di rilevabilità di 4 u.f.c. *Salmonella* spp. per 50 g di mangime.

Lo stesso limite di rilevabilità è stato rilevato anche nei 2 metodi colturali testati in parallelo sui medesimi campioni: ISO 6579(2002)/Cor1 (2004) “Microbiology of food and animal feeding stuff – Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.” e ISO 6579:2002/ Amd 1:Annex D: “Detection of *Salmonella* spp. In animal faeces and environmental samples from the primary production stage (2007)”. Conseguentemente riteniamo che il metodo di estrazione del DNA per bollitura, essendo il più semplice e rapido tra i 3 testati (20 minuti circa), sia quello da preferire nelle applicazioni diagnostiche, in accordo con quanto riportato da analoghi studi della letteratura (1).

Concludendo, riteniamo che il metodo sviluppato, qualora confermi le stesse performance anche su campioni naturalmente contaminati, mostrando limite di rilevabilità analogo al metodo colturale di riferimento ISO 6579(2002)/Cor1 (2004), possa essere applicato alla ricerca routinaria di *Salmonella* spp da campioni di mangime.

Bibliografia

De Medici D., Croci L., Delibato E., Di Pasquale S., Filetici E., Toti L. 2003 Evaluation of DNA extraction methods for use in combination with SYBR green I real Time PCR to detect *Salmonella enterica* Serotype Enteritidis in poultry”. Applied. Environ. Micobiol. 69:3456-3461.

1. Rahn K., De Grandis S.A., Clarke R.C., McEwen S.A., Galan C., Ginocchio R., Curtis III R., Gyles C. L. 1992 Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella typhimurium* by polymerase chain reaction as a specific method of detection of *Salmonella*. Mol. Cell. Probes 6:271-279.

2. Microbiological risk assessment in feedingstuffs for food-producing animals. Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards - Question No EFSA-Q-2007-045 - 5 Giugno 2008

http://www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale1178620753820_1211902004131.h

Figura 1. Andamento delle medie della sintomatologia clinica giornaliera.

