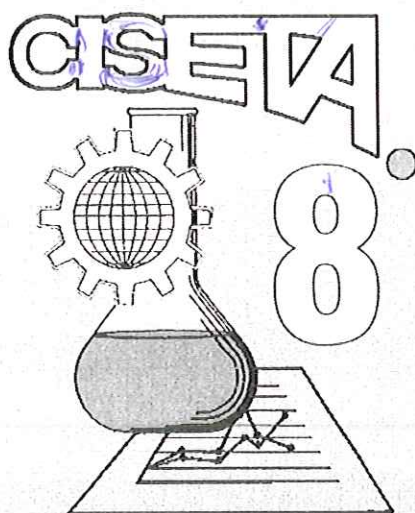


Ricerche e innovazioni nell'industria alimentare

volume VIII



a cura di
Sebastiano Porretta



Consiglio Nazionale delle Ricerche

CHIRIOTTI EDITORI



RICERCHE E INNOVAZIONI NELL'INDUSTRIA ALIMENTARE

Volume VIII

A CURA DI
SEBASTIANO PORRETTA

ATTI DELL'8° CONGRESSO ITALIANO DI SCIENZA
E TECNOLOGIA DEGLI ALIMENTI (8° CISETA)

FIERA MILANO, RHO (MI), 7-8 MAGGIO 2007

CHIRIOTTI EDITORI
Pinerolo - Italia

© Copyright 2008

Chiriotti Editori S.a.s. - Pinerolo - Italy

I diritti di riproduzione, anche parziale, del testo sono strettamente riservati
per tutti i Paesi

ISBN-13: 978-88-96027-00-4

IDENTIFICAZIONE E RILEVAZIONE DI *LISTERIA MONOCYTOGENES* TRAMITE PCR QUANTITATIVA (qPCR) IN PRODOTTI TIPICI PIEMONTESI

Dipartimento di Valorizzazione e Protezione delle Risorse Agroforestali, Sezione di Microbiologia ed Industrie Agrarie, Università di Torino, Via Leonardo da Vinci 44, 10095 Grugliasco (TO)

INTRODUZIONE

Lo sviluppo di metodiche rapide, al fine di rilevare in modo veloce, sensibile, specifico ed accurato i microrganismi negli alimenti, è una necessità sempre più sentita da parte delle industrie del settore alimentare. L'utilizzo di metodi convenzionali basati sull'uso di terreni selettivi non è più compatibile con i tempi di produzione, in quanto i risultati sulla presenza o assenza di un determinato patogeno si devono avere in maniera molto più rapida rispetto al passato. Oggigiorno stanno prendendo sempre più piede i metodi molecolari basati sulla PCR, i quali hanno il grosso vantaggio di essere molto veloci, in quanto i responsi sono disponibili in tempi molto brevi ed al massimo entro 24- 36 ore se si effettua un arricchimento selettivo. Il problema fondamentale della PCR tradizionale era legato alla sua valenza di tecnica qualitativa, infatti se il prodotto PCR viene rilevato su gel d'agarosio, non è possibile una quantificazione del microrganismo target. Questo svantaggio è stato superato con l'avanzamento tecnologico nel campo della PCR quantitativa, una metodica analitica basata ancora una volta sull'amplificazione genica, ma in grado di quantificare il target, grazie alla presenza di molecole, le quali emettono fluorescenza in funzione della quantità di DNA amplificato. In questo lavoro si è voluto ottimizzare una metodica basata sulla PCR quantitativa (qPCR) per l'identificazione e la quantificazione di *Listeria monocytogenes* negli alimenti. Negli ultimi 5 anni già altri autori hanno sviluppato delle metodiche di qPCR per la rilevazione di *L. monocytogenes* negli alimenti (Rossmannith *et al.*, 2006; Rodriguez-Lazaro *et al.*, 2004; Berrada *et al.*, 2006; Rudi *et al.*, 2005; Guilbaud *et al.*, 2005). In quasi tutti i lavori riportati, i geni scelti come target erano rappresentati da geni della virulenza.

MATERIALI E METODI

Primers. Al fine di sviluppare un protocollo PCR specifico per *L. monocytogenes*, sono stati scaricati da Gene Bank una serie di geni comuni a *Listeria* spp. e si sono effettuati degli allineamenti per trovare delle regioni opportune dove disegnare dei primers specifici per *L. monocytogenes*. È stata selezionata la regione intergenica tra i geni 16 e 23S rRNA. La

sequenza dei primers è riportata in Tabella 1.

Tabella 1 - Primers e sonda specifici per *L. monocytogenes*.

Nome del primer sonda	Sequenza (5'-3')	Concentrazione nella mix di PCR
IGS 1	GGCCTATAGCTCAGCTGGTTA	400 nM
IGS 2	GCTGAGCTAAGGCCCGTAAA	400 nM
Sonda IGS	FAM-ATAAGAAATACAAATAATCAT-TAMRA	250 nM

Condizioni di amplificazione. Le condizioni d'amplificazioni erano le seguenti: PCR buffer (contenente 8 mM MgCl₂, Euroclone, Celbio, Milan0, Italia) 12.5 µl, primers 1 µl ognuno, sonda 0.625 µl, DNA 1 µl, acqua a 25 µl, volume di reazione finale. I tubi sono stati sottoposti a 50 cicli di amplificazione a 95°C per 30s, 56°C per 30s e 72°C per 30s. L'attivazione dell'enzima è avvenuta in seguito a trattamento a 95°C per 10 min prima dell'amplificazione.

Curve di calibrazione. Le condizioni sperimentali sono state usate per costruire delle curve di calibrazione a partire da cellule di *L. monocytogenes* diluite in acqua e inoculate in diverse matrici alimentari. Il DNA usato nell'amplificazione è stato ottenuto usando il "total nucleic acid extraction kit" venduto da Epicentre. In particolare, 10 g o ml di alimento sono stati omogeneizzati in 40 ml di brodo BHI (Oxoid) dopo aver inoculato *L. monocytogenes* per raggiungere dei livelli di contaminazione da 10⁸ to 10² cellule per g o ml. Il brodo omogeneizzato è stato ulteriormente diluito 1:10 in acqua sterile ed 1 ml è stato sottoposto all'estrazione del DNA e all'amplificazione.

Campioni alimentari. La metodica qPCR è stata infine utilizzata per la ricerca di *L. monocytogenes* in campioni alimentari raccolti da produttori locali nella regione Piemonte. I campioni erano rappresentati da carni fresche (20 campioni), salsicce fresche (2 campioni), salami fermentati (2 campioni), formaggi freschi (31 campioni) e formaggi stagionati (11 campioni). I campioni di formaggi erano tutti prodotti a livello artigianale a partire da latte crudo non pastorizzato. Tutti i campioni (10 g) sono stati sottoposti ad analisi qPCR prima e dopo arricchimento in BHI brodo a 37°C. Inoltre si è anche effettuata una conta a T0 e striscio a T24 di *L. monocytogenes* su terreno Palcam (Oxoid).

RISULTATI E DISCUSSIONI

Nelle figure 1, 2, 3 e 4 sono riportate le curve di calibrazione costruite a partire da cellule diluite, rispettivamente, in acqua, in matrici carne, in matrici latte e in vegetali freschi.

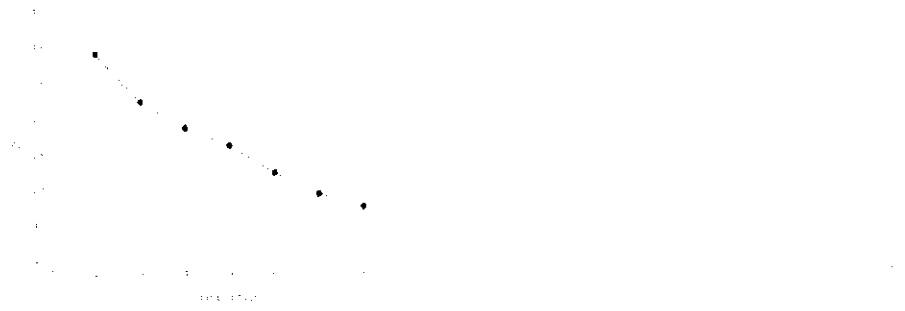


Figura 1 - Curva di calibrazione in acqua.

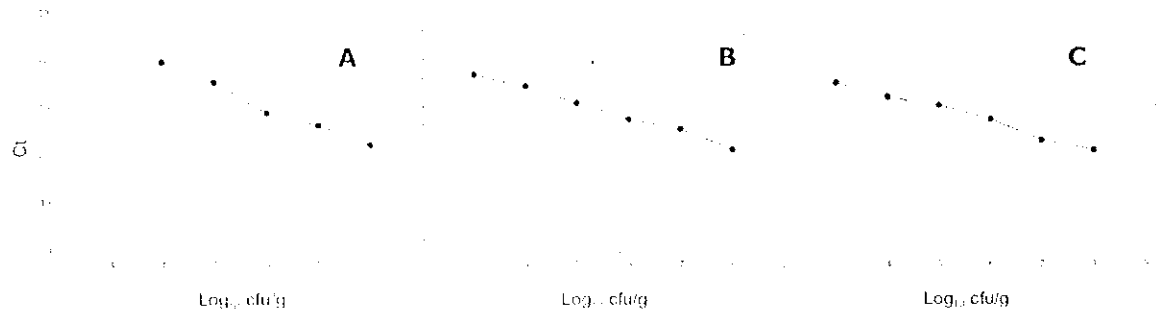


Figura 2 - Curva di calibrazione in carne fresca (A), prosciutto crudo (B) e salame (C).

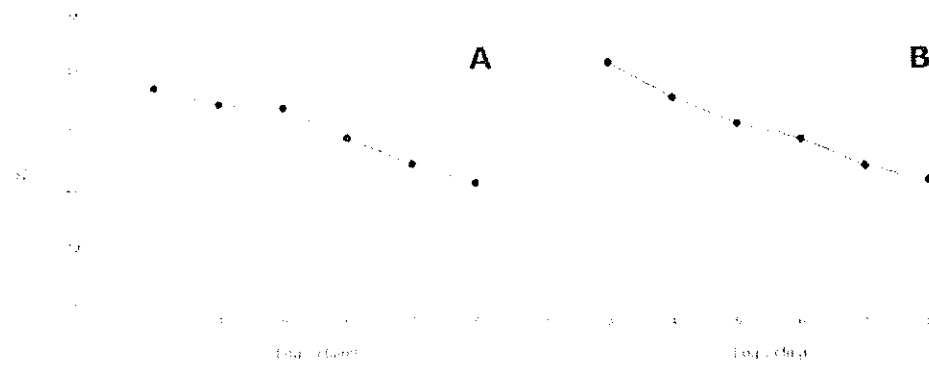


Figura 3 - Curva di calibrazione in latte (A) e stracchino (B).

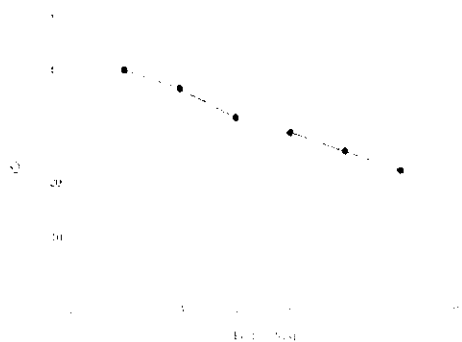


Figura 4 - Curva di calibrazione in vegetali freschi.

Il limite di quantificazione è stato diverso a seconda che il DNA di *L. monocytogenes* era estratto da acqua o da matrici alimentari. Per cellule diluite in acqua, il limite è stato di 10^2 unità formanti colonie (ufc)/ml, mentre per quasi tutti gli alimenti, la sensibilità era di 10^3 ufc/ml or g. Solo per la carne fresca, non si è stati in grado di rilevare più di 10^4 ufc/g. Dopo arricchimento overnight in BHI brood, sono state rilevate anche 10 ufc/ml o g in tutte le matrici testate.

L'efficienza di amplificazione ($E=10^{-1/\text{slope}-1}$) e l' R^2 delle curve di calibrazione sono riportate in Tabella 2.

Tabella 2 - Efficienza di amplificazione e R^2 delle curve di calibrazione in differenti matrici.

Matricce	Efficienza	R^2
Acqua	95	0.970
Latte	101	0.961
Formaggio fresco	77	0.977
Carne fresca	68	0.984
Prosciutto crudo	107	0.993
Salame	119	0.987
Vegetali freschi	88	0.993

Su 66 campioni alimentari testati, solo 4 erano positivi a T0, mentre dopo arricchimento il numero è incrementato a 9. I 4 campioni erano tutti rappresentati da formaggio fresco e quando sottoposti a quantificazione solo uno ha prodotto un segnale nel range di linearità della curva di calibrazione.

Questo campione era rappresentato da un formaggio fresco commercializzato dopo circa 8 ore dalla produzione e la carica di *L. monocytogenes* ritrovata era di 4×10^3 ufc/g. Dei 9 campioni positivi dopo arricchimento solo uno era rappresentato da carne fresca, mentre gli altri erano tutti formaggi.

Inaspettatamente, nessun campione ha dato delle colonie tipiche di *L. monocytogenes* quando analizzato su Palcam. Questo sottolinea la possibilità di avere dei risultati falso-negativi nel caso di metodiche tradizionali, anche se in questo studio non è stata seguita la metodica ISO per l'isolamento di *L. monocytogenes*.

Il presente lavoro è stato finanziato della Commissione Europea con contratto n. PF-FOODCT-2005-007081, "Pathogen Combat: control and prevention of emergin and future pathogens at cellular and molecular level throughout the food chain".

BIBLIOGRAFIA

Berrada H., J.M. Soriano, Y. Picò e J. Manes "Quantification of *Listeria monocytogenes* in salads by real time quantitative PCR" International Journal of Food Microbiologia, 107, 202-206, 2006

Guilbaud M., P. de Coppet, F. Bourbon, C. Rachman, H. Prevost e X. Dousset "Quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in biofilms by real-time PCR" Applied and Environmental Microbiologia, 71, 2190-2194, 2005

Rodriguez-Lazaro D., A. Jofré, T. Aymerich, M. Hugas e M. Pla "Rapid quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in meat products by real-time PCR" Applied and Environmental Microbiologia, 70, 6299-6301, 2004

Rossmann P., M. Krassnig, M. Wagner e I. Hein "Detection of *Listeria monocytogenes* in food using a combined enrichment/real-time PCR method targeting the *prfA* gene" Research in Microbiology, 157, 763-771, 2006

Rudi K., K. Naterstad, S.M. Dromtorp e H. Holo "Detection of viable and dead *Listeria monocytogenes* on gouda-like cheeses by real-time PCR" Lettera in Applied Microbiologia, 40, 301-306, 2005

RIASSUNTO

In questo lavoro si è sviluppato un metodo basato sulla PCR quantitativa per la rilevazione e quantificazione di *Listeria monocytogenes* in alimenti. Dopo aver disegnato dei primers ed una sonda specifici per *L. monocytogenes*, si è ottimizzato le condizioni di amplificazione. L'approccio sperimentale è proseguito con la costruzione di curve di calibrazione utilizzate poi per la quantificazione di *L. monocytogenes* in prodotti tipici piemontesi.

SUMMARY

DETECTION AND QUANTIFICATION OF LISTERIA MONOCYTOGENES IN TRADITIONAL FOOD PRODUCTS FROM THE PIEDMONT REGION BY QUANTITATIVE PCR

In this paper we describe the optimization of a quantitative PCR for the detection and quantification of Listeria monocytogenes in food. We first design a couple of primers and a probe that are specific for L. monocytogenes, and we then optimized the amplification conditions. We then constructed calibration curves that were subsequently used to quantify L. monocytogenes present in typical food products coming from the Piedmont region.