

BANDO PER IL SOSTEGNO A PROGETTI DI RICERCA CHE PREVEDONO L'IMPIEGO DI RICERCATORI

ASSE 1 "RICERCA, SVILUPPO TECNOLOGICO E INNOVAZIONE"

Obiettivo specifico "Incremento dell'attività di innovazione delle imprese"

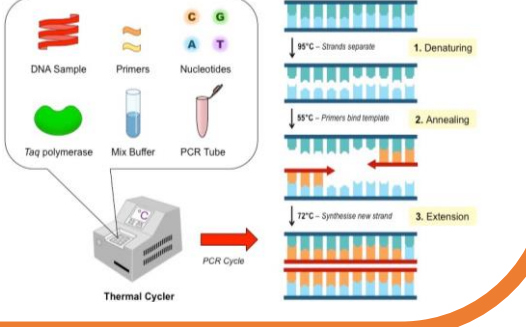
Azione 1.1.1 "Sostegno a progetti di ricerca alle imprese che prevedono l'impiego di ricercatori (dottori di ricerca e laureati magistrali con profili tecnico-scientifici) presso le imprese stesse"

Le malattie derivanti dal consumo di alimenti o acqua contaminata a causa di agenti patogeni e/o dalle loro tossine hanno una vasta gamma di conseguenze per la salute pubblica ed economica in tutto il mondo. E' diventato di fondamentale importanza quindi analizzare il cibo per la presenza di agenti patogeni, in modo da assicurare un approvvigionamento alimentare sicuro e controllato e per minimizzare eventuali trasmissioni di malattie di origine alimentare. Attraverso lo studio della bibliografia e con l'utilizzo di tecniche sensibili basate su amplificazione di acidi nucleici si porterà a termine la produzione e commercializzazione un kit di ampia diffusione e semplice utilizzo che permetta con un'unica analisi una più facile prevenzione delle tossinfezioni alimentari con tempi e protocolli compatibili con le necessità sanitarie e dell'industria alimentare.

I metodi microbiologici convenzionali basati su test biochimici e test di coltura per la rivelazione dei patogeni alimentari normalmente sono laboriosi e poco sensibili.

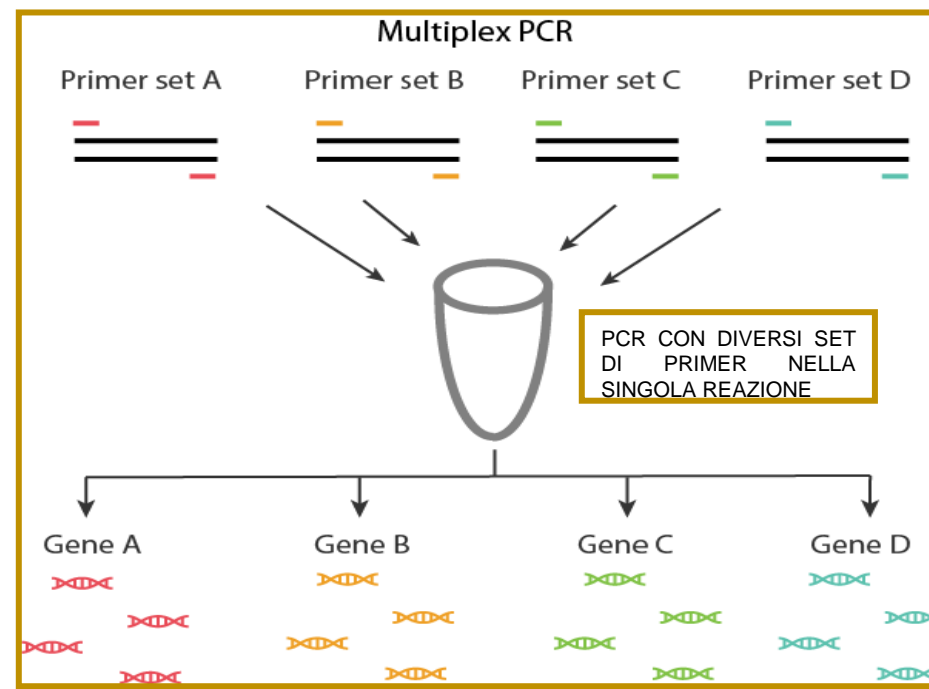
Con lo sviluppo di metodi molecolari la Reazione a catena della DNA Polimerasi (PCR) è diventata un importante strumento per l'individuazione dei microorganismi patogeni nei prodotti alimentari, migliorando:

- SENSIBILITA'
- SPECIFICITA'
- VELOCITA' DI INDIVIDUAZIONE



Validare un kit in multiplex PCR

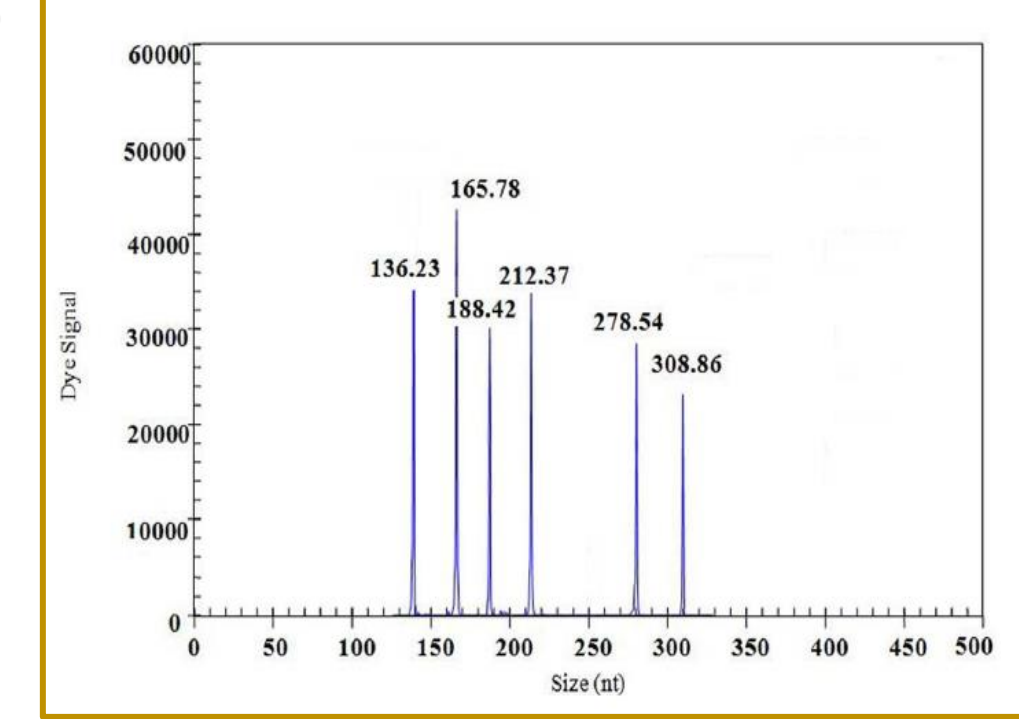
che permetta con un'unica analisi, l'identificazione contemporanea di m.o patogeni negli alimenti. Ottenendo, attraverso diversi set di primers, l'amplificazione delle sequenze di DNA e cDNA target, di più specie microbiche.



SCOPI DEL PROGETTO:

Analisi dei frammenti amplificati

risultanti dalla multiplex PCR tramite elettroforesi capillare identificandoli tramite spettrofotometria a fluorescenza.



PATOGENI DA RICERCARE:

Tra i patogeni di origine alimentare attualmente osservati in una vasta gamma di prodotti, questi 10 sono frequentemente riportati come agenti che causano intossicazioni alimentari:

- STAPHYLOCOCCUS AUREUS:** è un batterio gram positivo di forma rotonda che causa enteriti acute.
- SALMONELLA ENTERICA:** è un batterio gram negativo di forma bastoncellare e flagellato, causa disturbi nel tratto gastro intestinale.
- NOROVIRUS:** è un virus senza capsida, con genoma a singolo filamento di RNA.
- CAMPYLOBACTER JEJUNI:** è un batterio gram negative che causa Campilobacteriosi.
- CLOSTRIDIUM PERFRIGENS:** è un batterio gram positivo sporigeno del genere Clostridium, di forma bastoncellare anaerobico.
- ESCHERICHIA COLI O157:H7:** E' un batterio gram negativo. Appartiene a un ceppo enteroemorragico e delle volte può causare persino morte.
- LISTERIA MONOCYTOGENES:** è un batterio gram positivo che causa un' infezione detta Listeriosi.
- SHIGELLA SPP.:** è un batterio gram negativo che causa Shigellosi che colpisce l'intestino tenue.
- YERSINIA ENTEROCOLITICA:** è un batterio gram negativo con forma bastoncellare che causa Yersiniosi.
- HAV:** E' un picornavirus causa dell' epatite A

ESTRAZIONE ACIDI NUCLEICI:

In base alla frequenza dell' intossicazione da patogeni nei prodotti alimentari, la PCR in multiplex è stata testata a partire da matrici rappresentative usando campioni di cibo e acqua. Le matrici testate sono state: Insalata imbustata, Pollo, Formaggio morbido, Gamberetti, Salse (mayonnaise), Latte, Acqua.



DNA and RNA dei patogeni sono stati estratti usando 3 kit che sono stati confrontati valutando la loro compatibilità con il nostro protocollo. Tutti e 3 hanno dimostrato paragonabile efficienza di estrazione a partire da tutte le matrici testate.

MASTER MIX 1

Mix contenente primers e reagenti per amplificare i patogeni batterici:

Yersinia enterocolitica	Primer marcato HEX
Salmonella enterica	Primer marcato 6-FAM
Campylobacter jejuni	Primer marcato HEX
Shigella spp.	Primer marcato 6-FAM
Escherichia coli O157:H7	Primer marcato HEX
Staphylococcus aureus	Primer marcato 6-FAM
Clostridium perfringens	Primer marcato HEX
Listeria mono cytogenes	Primer marcato 6-FAM

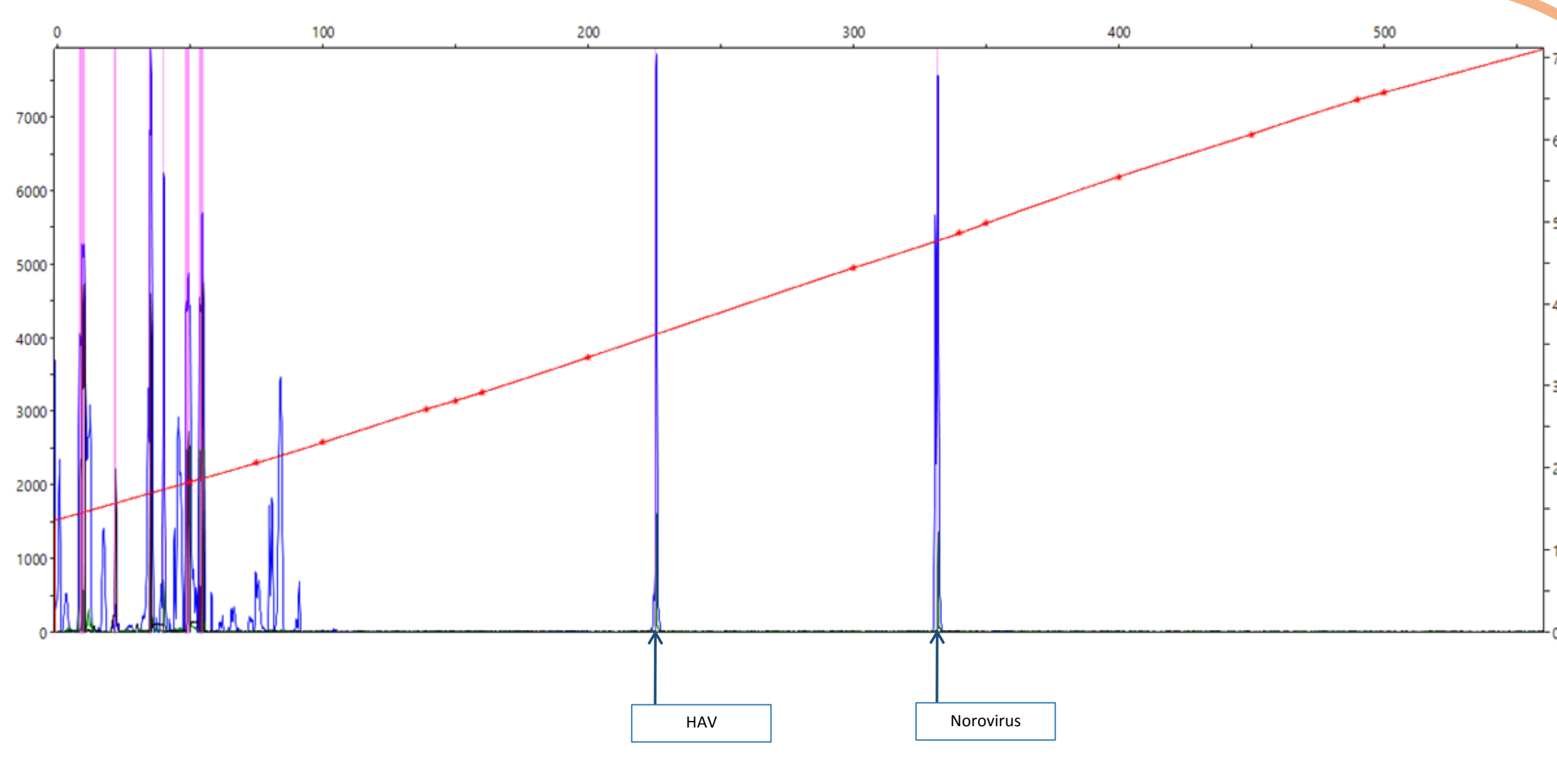
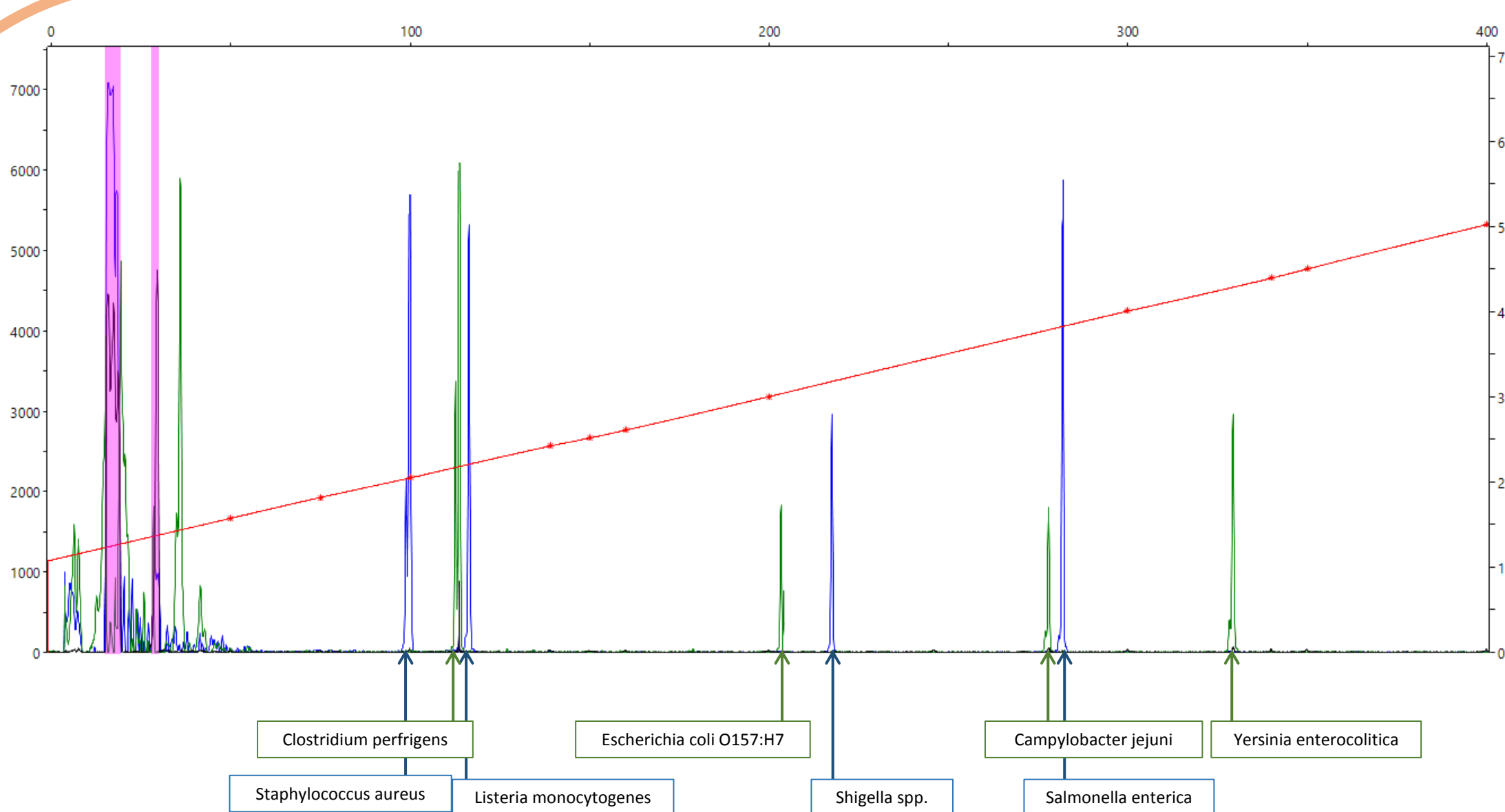
COMPOSIZIONE KIT:

MASTER MIX 2

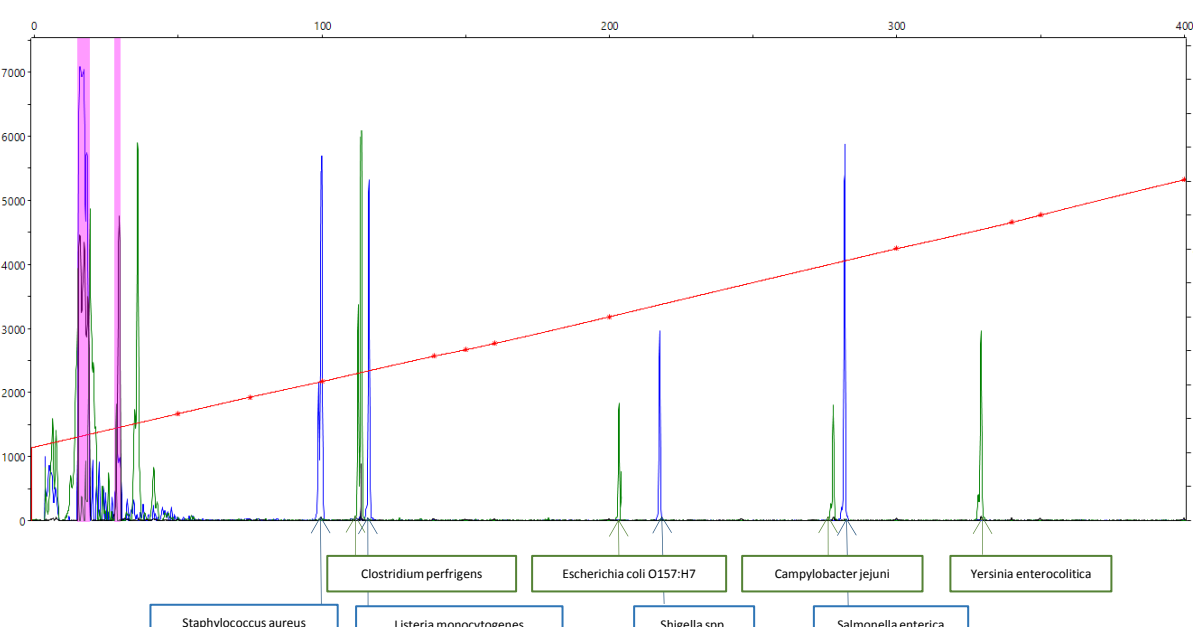
Mix contenente primers e reagenti per amplificare i patogeni virali che prevede uno step precedente di retrotrascrizione da RNA virale in cDNA:

Norovirus	Primer marcato 6-FAM
HAV	Primer marcato 6-FAM

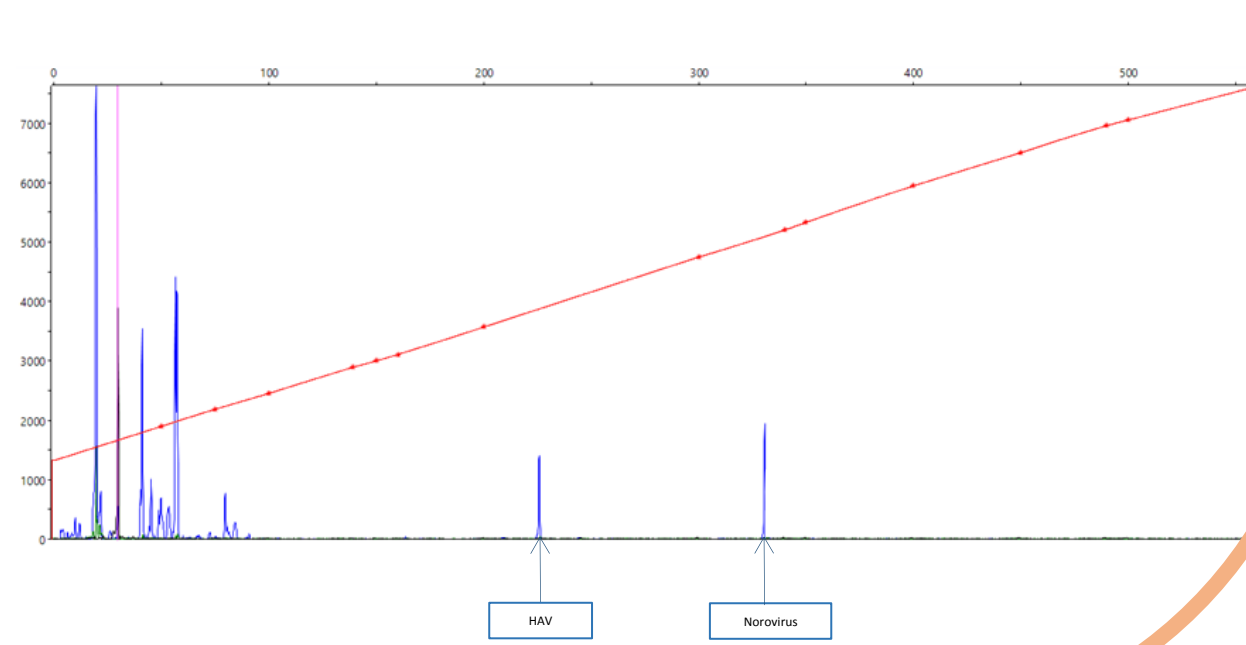
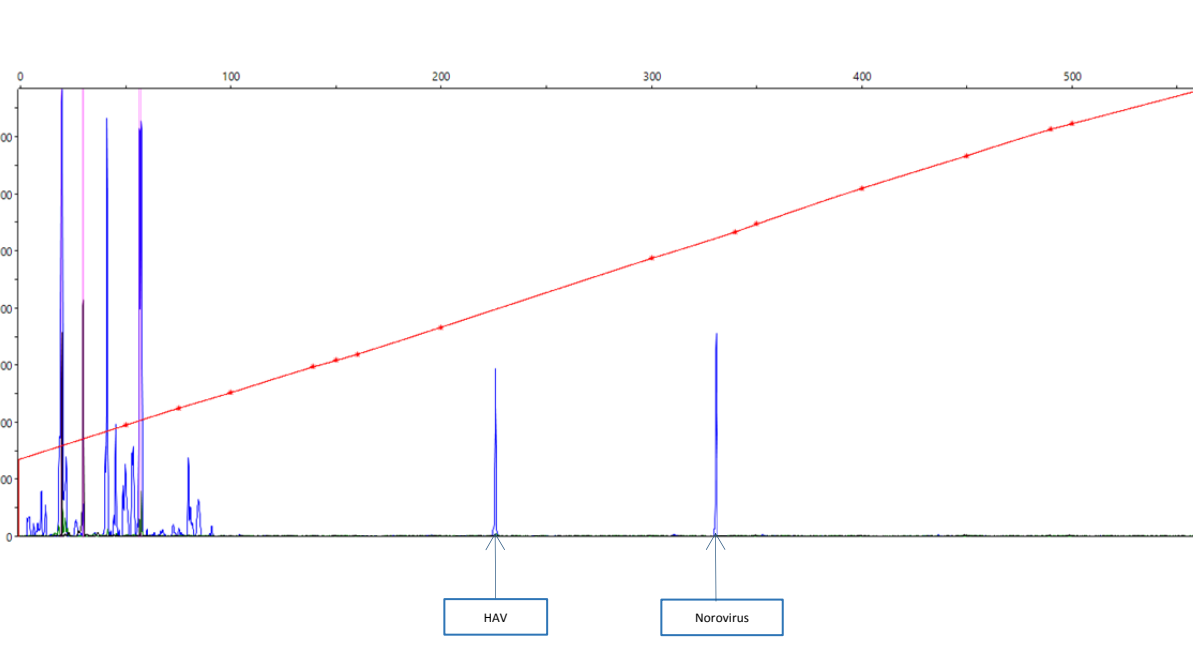
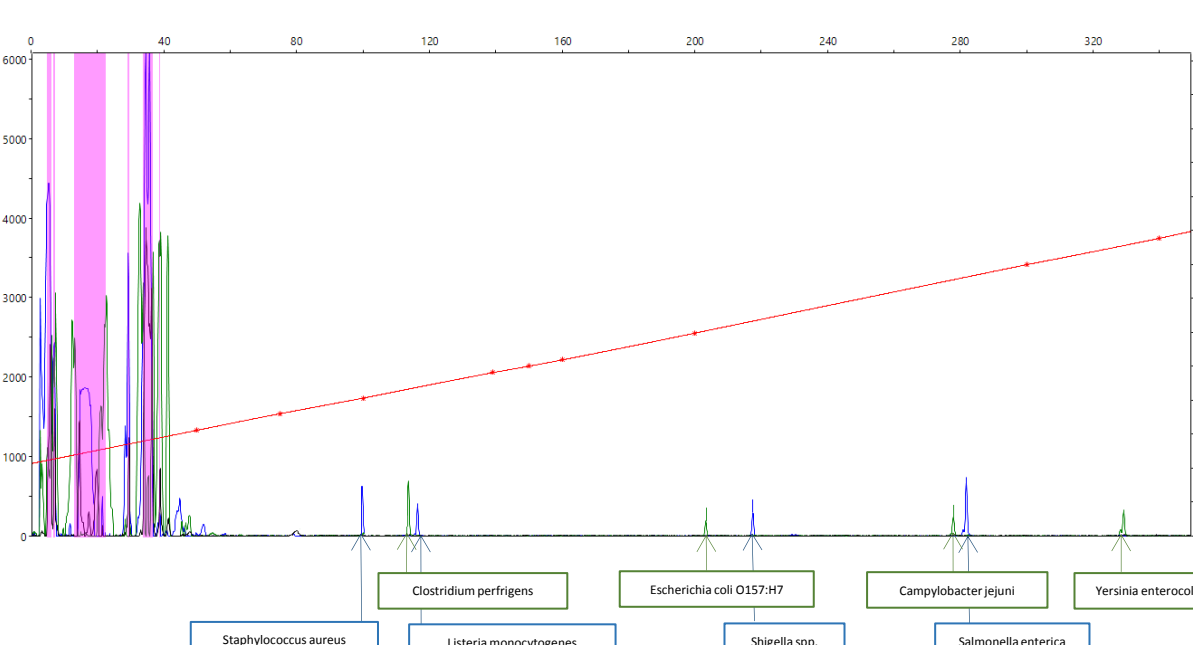
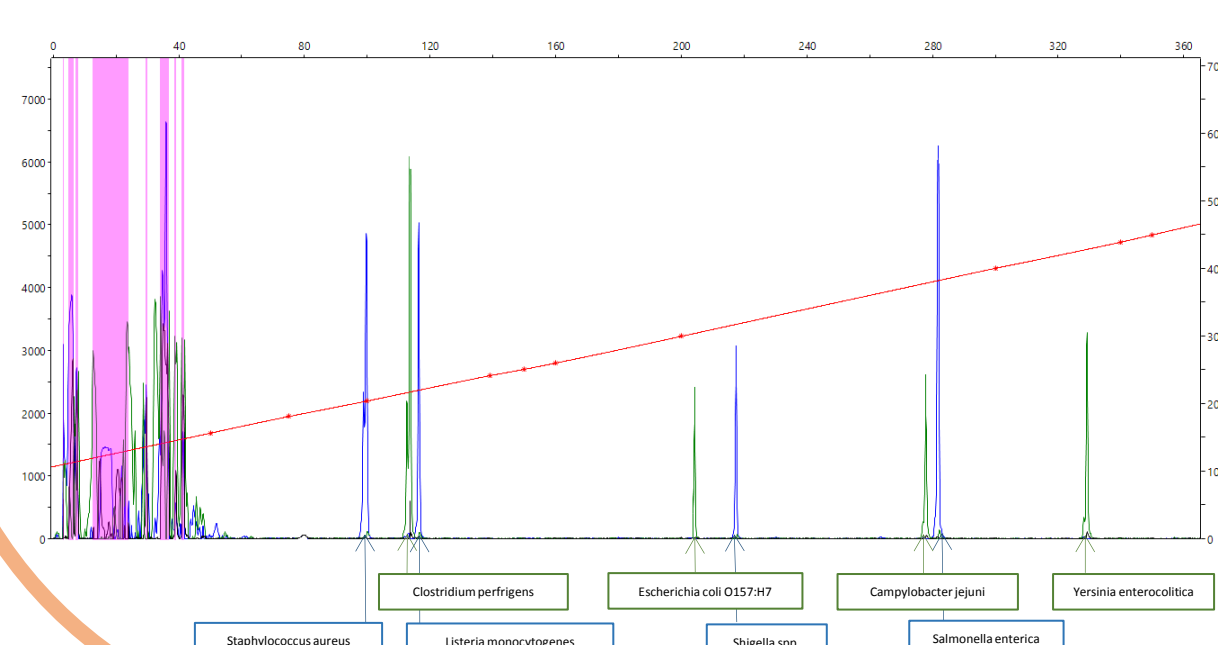
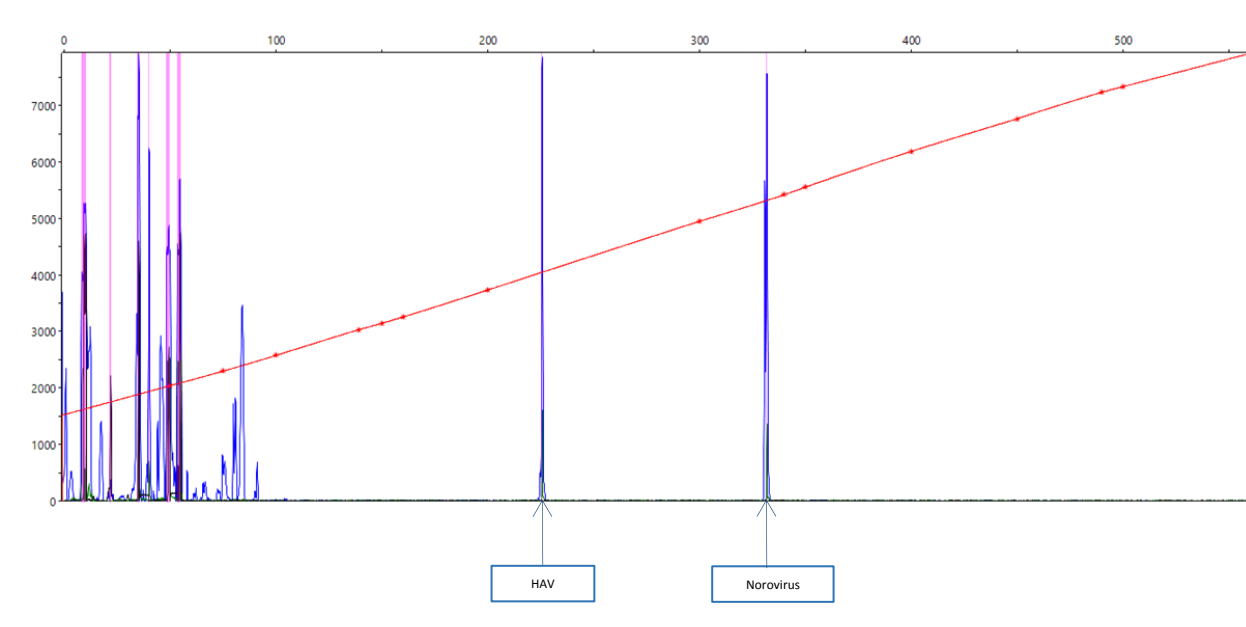
RISULTATI:



La sensibilità del protocollo standardizzato di PCR multiplex è stata controllata utilizzando tre diverse diluizioni di L. monocytogenes, Y. enterocolitica, S. aureus e S. enterica, Cl. Perfringens, Esch. Coli, C. jejuni, Shigella spp. 10^4 , 10^3 , 10^2 . La sensibilità della reazione è espressa in termini di copie di genoma batterico.



La sensibilità del protocollo standardizzato di PCR multiplex è stata verificata utilizzando tre diverse diluizioni di HAV E Norovirus 10^4 , 10^3 , 10^2 . La sensibilità è stata in termini di copie del genoma virale



CONCLUSIONI:

Il kit messo a punto per la ricerca di microrganismi patogeni in alimenti ed acque permette, tramite un protocollo basato su metodologia multiplex PCR, di rilevare contemporaneamente e con il medesimo protocollo 10 m.o. diversi individuabili e quindi da utilizzarsi indipendentemente dal tipo di alimento e lavorazione.

Il nostro kit ha la caratteristica di essere rapido e di semplice utilizzo, soprattutto non necessita di conoscere preventivamente quale contaminante ricercare. Queste caratteristiche lo rendono interessante per diversi tipi di laboratori d'analisi alimentari e ambientali, istituti zooprofilattici, aziende Regionali per l'Ambiente, acquedotti e altri, oltre al fatto che per usarlo si necessita di strumentazione molto diffusa come termociclatore PCR e sequenziatore a elettroforesi capillare.

Grazie ai risultati ottenuti con il kit messo a punto si è in grado di rilevare la quasi totalità dei microrganismi e virus responsabili di tossinfezioni alimentari con tempi e protocolli compatibili con le necessità sanitarie, preventive e dell'industria alimentare, e soprattutto con un'elevata specificità e sensibilità rispetto ai protocolli presenti nel mercato fin ora.