

Jacopo Fratus De Balestrini – Valentina Ratti – Davide Sbarbada – Vittorio Villa

SISTEMI DI DIAGNOSTICA MOLECOLARE PER L'IDENTIFICAZIONE DEI MICROORGANISMI PATOGENI NEGLI ALIMENTI

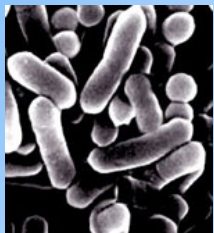
Tutor del progetto Prof. Pier Sandro Cocconcelli
Stage – Istituto di Microbiologia

Il problema

Nonostante la popolazione Europea sia oggi maggiormente preoccupata per la presenza nei cibi di organismi geneticamente modificati (OGM) è necessario considerare altri contaminanti come principale fonte di patologie legate all'alimentazione.



In questo progetto si è focalizzata l'attenzione sui contaminanti biologici, in particolare quelli patogeni la cui presenza nei cibi è regolata da precise norme a livello Europeo (racchiuse nel Libro Bianco della sicurezza alimentare).



Una delle principali analisi da eseguire sui cibi è la verifica della presenza della *Listeria Monocytogenes* (foto a lato): batterio in grado di sopravvivere alle normali temperature di conservazione (0~2°C).

Un'analisi del cibo è quindi necessaria in quanto il 99% delle listeriosi dell'uomo deriva da esso.

La normativa Europea impone l'assenza della *Listeria* in 25g di prodotto. E' stato necessario sviluppare quindi un metodo certo e rapido per la ricerca di questo e altri patogeni alimentari comuni.

La risposta

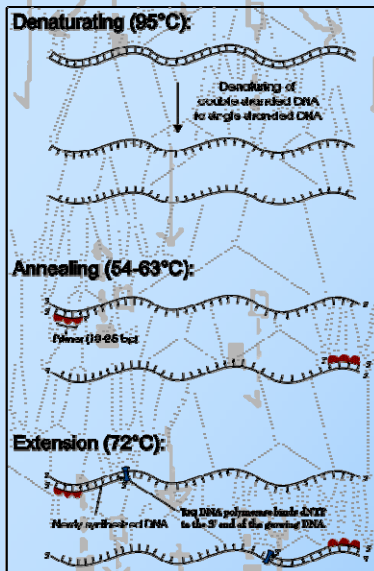
La ricerca della listeria(*) si effettua portando 25g di prodotto solido in 225ml di terreno selettivo e incubando per un giorno a 37°C (arricchimento).



100µl di brodo ottenuto vengono trattati in modo da separare i microrganismi formati. L'estrazione del genoma batterico avviene in microonde, rompendo la membrana batterica per opera del calore.

La PCR è una tecnica che permette di amplificare specifiche sequenze di DNA da riconoscere all'interno dei microrganismi ed ottenerne un elevato numero di copie.

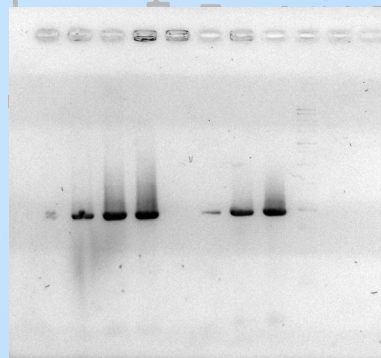
L'analisi prevede l'aggiunta, al DNA estratto dalla cellula, di una miscela di dNTP (i "mattoni" del DNA), primer, tamponi ed enzimi. I primer sono sequenze di DNA specifiche, scelte per accoppiarsi con i filamenti DNA idrolizzati. L'allungamento della catena di DNA avviene per opera dell'enzima TAQpolimerasi che, allineandosi ai primer, permette di ottenere l'estensione.



L'amplificazione prevede tre fasi (schema in basso): la prima (denaturazione, ~90°C) denatura l'elica accoppiata di DNA ottenendo i singoli filamenti; la seconda prevede l'accoppiamento dei primer (~60°C); la terza è l'allungamento (~70°C), in cui la TAQpolimerasi allunga le catene e completa l'amplificazione. Questo ciclo, ripetuto più volte permette di ottenere quantità sufficienti di DNA per effettuare la separazione elettroforetica.

Mediante elettroforesi su gel di agarosio avviene la separazione elettrostatica dei frammenti di DNA ottenuti. Per metterle in evidenza le sequenze vengono colorate con bromuro di etidio e lette in luce UV. Il riconoscimento delle sequenze avviene in base al loro peso confrontandole con marker a peso noto aggiunti nel gel di elettroforesi.

Le conferme



Nell'immagine si riporta un esempio di elettroforesi eseguita su DNA ottenuto da PCR. Questa tecnica permette di riconoscere batteri, caratterizzandoli per specie. Si noti la terza colonna da destra che contiene i marcatori di peso molecolare. Confrontando le bande ottenute col marcatore è possibile riconoscere la specie batterica analizzata.

Oltre alla normale PCR eseguita secondo queste modalità esistono due varianti: la RAPD e l'ARDRA.

La RAPD (random amplified polymorphic DNA) è una tecnica che sfrutta la PCR per amplificare sequenze molto più lunghe di DNA permettendo di riconoscere, a parità di ceppo batterico, la caratterizzazione di individuo (utile per capire se ad esempio una contaminazione alimentare ha un'origine comune).

L'ARDRA è una tecnica parallela che realizza la sequenziazione mediante la digestione con enzimi di restrizione, in grado di tagliare il DNA in punti specifici. In realtà non si lavora sull'intero genoma ma solo sul gene 16rRNA, considerato l'orologio genetico di un batterio. Questo gene presenta zone invariate nel tempo ma anche regioni che hanno subito modificazioni nel tempo, generando la cosiddetta speciazione. E' in questo modo possibile riconoscere ceppi diversi della stessa specie batterica.

In entrambi i casi si esegue la separazione mediante elettroforesi per separare i filamenti amplificati.

Conclusioni

La sicurezza alimentare è un diritto del consumatore che deve sentirsi libero di acquistare prodotti sani e sicuri; per questo si deve fidare del mercato e delle leggi che lo regolano.

La tecnologia odierna ci permette di ottenere questo standard di sicurezza ed è quindi giusto un impegno comune perché questo scopo sia raggiunto nel più breve tempo possibile.

* Il procedimento descritto è quello relativo alla normativa Europea ma in realtà la prova è stata eseguita con *Streptococcus Thermophilus* in quanto *Listeria Monocytogenes* è un microorganismo altamente patogeno, per la cui manipolazione occorre adottare particolari misure di sicurezza