

# Interreg

## ITALIA-SLOVENIJA



### TRAIN

Progetto standard co-finanziato dal Fondo europeo di sviluppo regionale  
Standardni projekt sofinancira Evropski sklad za regionalni razvoj



UNIONE EUROPEA  
EVROPSKA UNIJA

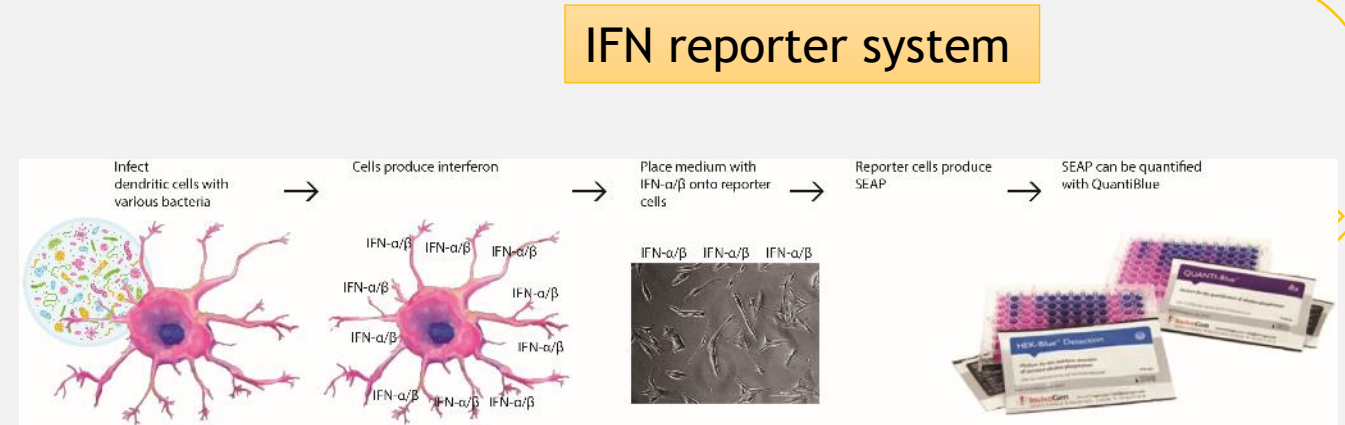
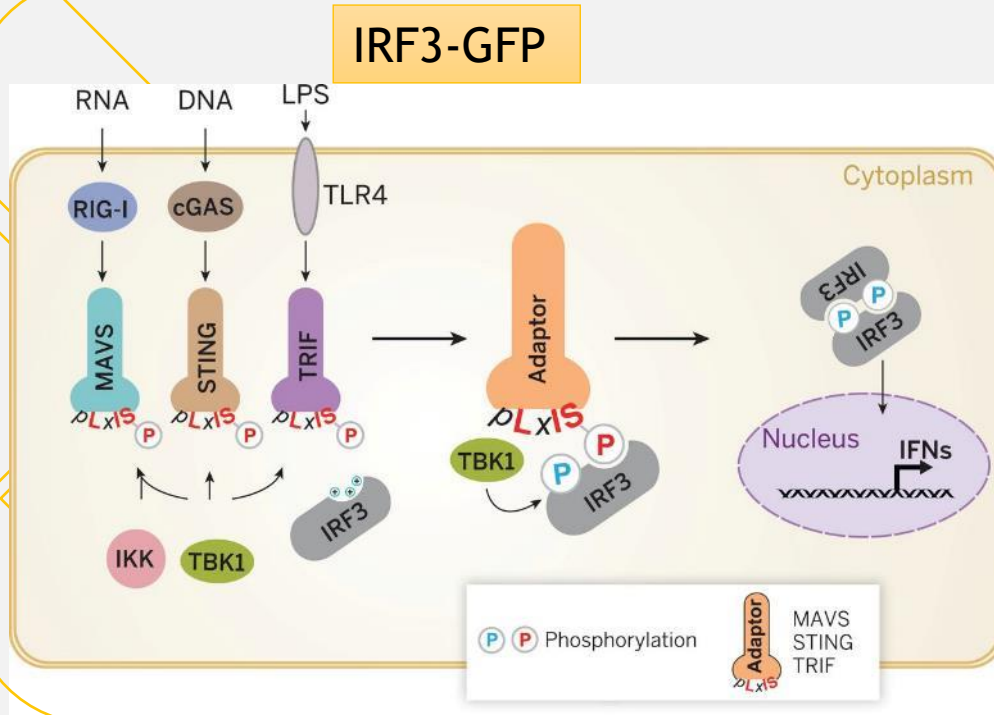
# RISULTATI EXPERTTEAM

*Speaker: Francesca Bruno*



## Idea iniziale:

Testare, con un metodo molecolare, la presenza o l'assenza di uno o più agenti patogeni negli alimenti e verificare che l'agente patogeno sia vivo o morto, mediante High Content Analysis(HCA)



I saggi testati non discriminano tra patogeni e non patogeni e non sono sufficientemente sensibili per il nostro scopo

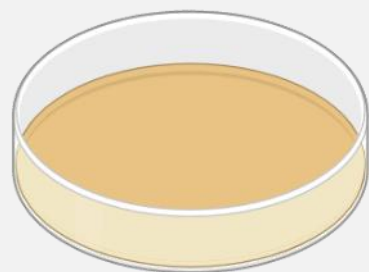
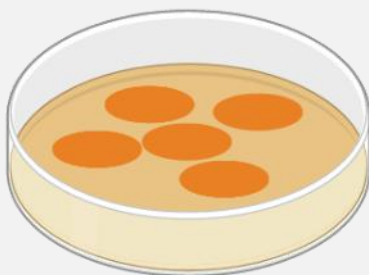
Abbandonare questi approcci

## Rilevazione di agenti patogeni di origine alimentare

Le malattie derivanti dal consumo di alimenti o acqua contaminati da agenti patogeni e / o dalle loro tossine hanno una vasta gamma di impatto economico e sulla salute pubblica in tutto il mondo

### METODI MICROBIOLOGICI CONVENZIONALI

- Richiede tempo
- Poco sensibile



Risultati differenti



Patogeno vivo

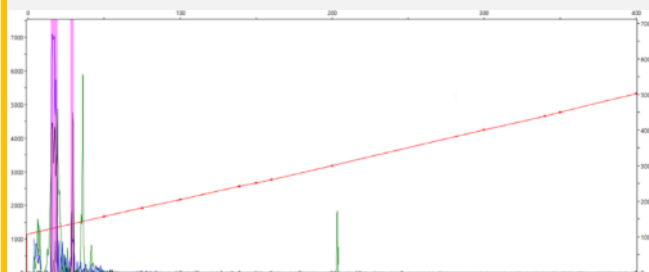
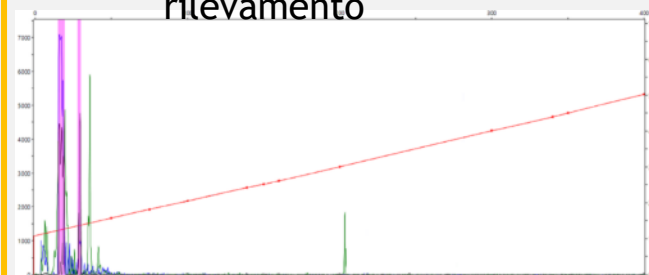


Patogeno morto



### METODI PCR

- Specifico
- Sensibile
- Velocità di rilevamento



Stessi risultati

## Nuovo approccio basato sul rilevamento di m.o. usando mRNA

L'mRNA ha emivita di pochi minuti  
(il DNA batterico è più stabile  
dell'RNA batterico)

Il rilevamento dell'mRNA deve  
essere un buon indicatore della  
vitalità delle cellule



Rilevazione di cellule patogene LIVE negli alimenti  
mediante una PCR in tempo reale transcriptasi inversa  
basata su TaqMan (RT-qPCR)





## Salmonella enterica:

*Salmonella enterica* la contaminazione in vari alimenti è una preoccupazione importante per la salute pubblica, a livello nazionale e internazionale.

invA gene studiato per la presenza di Salmonella



Color	Name	Type	Ct
	Salmonella A strain Live cDNA (1 Dnase treatment) qRT-PCR	Unknown	23,48
	Salmonella A strain Live RNA (1Dnase treatment) qPCR	Unknown	30,45

$$\Delta C_t(qRT-PCR)-(RT-PCR)>4$$



Color	Name	Type	Ct
	Salmonella A strain Dead cDNA (1 Dnase treatment) qRT-PCR	Unknown	23,53
	Salmonella A strain Dead RNA (1Dnase treatment) qPCR	Unknown	23,81

$$\Delta C_t(qRT-PCR)-(RT-PCR)<4$$

→ Nessun RNA nel campione

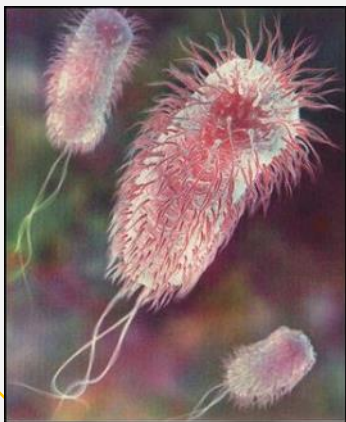
Color	Name	Type	Ct
	Salmonella B strain Live cDNA (1 Dnase treatment) qRT-PCR	Unknown	23,41
	Salmonella B strain Live RNA (1Dnase treatment) qPCR	Unknown	30,05

$$\Delta C_t(qRT-PCR)-(RT-PCR)>4$$

Color	Name	Type	Ct
	Salmonella B strain Dead cDNA (1 Dnase treatment) qRT-PCR	Unknown	25,78
	Salmonella B strain Dead RNA (1Dnase treatment) qPCR	Unknown	26,61

$$\Delta C_t(qRT-PCR)-(RT-PCR)<4$$





→ Nessun RNA nel campione



## ESCHERICHIA COLI O157:H7

- E. coli ha molti importanti geni di virulenza (stx1, stx2, fliC, eaeA, rfbE, uidA, hlyA)
- Non tutti i geni sono bersagli adatti per la rilevazione di E. coli vitale

**rfbE** gene studiato per la presenza di Escherichia, codifica l'antigene O157










Color	Name	Type	Ct
	Escherichia coli Live cDNA (2 DNase treatment)	Unknown	27,84
	Escherichia coli Live RNA (non reverse-transcribed)	Unknown	32,12
	Escherichia coli Dead cDNA (2 DNase treatment)	Unknown	22,15
	Escherichia coli Dead RNA (non reverse-transcribed)	Unknown	23,43












$$\Delta C_t(qRT-PCR)-(RT-PCR)>4$$

$$\Delta C_t(qRT-PCR)-(RT-PCR)<4$$

→ Nessun RNA  
nel campione

## Rilevamento multiplex di entrambi i patogeni cDNA

Color	Name	Type	Ct	Given Conc (copies/reaction)	Calc Conc (copies/reaction)
	Multiplex Detection Mix (Escherichia coli 10 <sup>5</sup> copies/reaction)	Standard	24,52	1,00E+05	9,80E+04
	Multiplex Detection Mix (Escherichia coli 10 <sup>5</sup> copies/reaction)	Standard	24,35	1,00E+05	1,09E+05
	Multiplex Detection Mix (Escherichia coli 10 <sup>4</sup> copies/reaction)	Standard	28,17	1,00E+04	9,99E+03
	Multiplex Detection Mix (Escherichia coli 10 <sup>4</sup> copies/reaction)	Standard	28,14	1,00E+04	1,02E+04
	Multiplex Detection Mix (Escherichia coli 10 <sup>3</sup> copies/reaction)	Standard	31,97	1,00E+03	9,28E+02
	Multiplex Detection Mix (Escherichia coli 10 <sup>3</sup> copies/reaction)	Standard	32,09	1,00E+03	8,61E+02
	Multiplex Detection Mix (Escherichia coli 10 <sup>2</sup> copies/reaction)	Standard	34,85	1,00E+02	1,54E+02
	Multiplex Detection Mix (Escherichia coli 10 <sup>2</sup> copies/reaction)	Standard	35,99	1,00E+02	7,52E+01
	Multiplex Detection Mix (Escherichia coli Live cDNA+ Salmonella Live cDNA)	Unknown	28,83		6,63E+03

Color	Name	Type	Ct	Given Conc (copies/reaction)	Calc Conc (copies/reaction)
	Multiplex Detection Mix (Salmonella enterica 10 <sup>5</sup> copies/reaction)	Standard	24,74	1,00E+05	1,12E+05
	Multiplex Detection Mix (Salmonella enterica 10 <sup>5</sup> copies/reaction)	Standard	24,51	1,00E+05	1,31E+05
	Multiplex Detection Mix (Salmonella enterica 10 <sup>4</sup> copies/reaction)	Standard	28,40	1,00E+04	1,04E+04
	Multiplex Detection Mix (Salmonella enterica 10 <sup>4</sup> copies/reaction)	Standard	28,82	1,00E+04	7,90E+03
	Multiplex Detection Mix (Salmonella enterica 10 <sup>3</sup> copies/reaction)	Standard	32,26	1,00E+03	8,43E+02
	Multiplex Detection Mix (Salmonella enterica 10 <sup>3</sup> copies/reaction)	Standard	32,24	1,00E+03	8,50E+02
	Multiplex Detection Mix (Salmonella enterica 10 <sup>2</sup> copies/reaction)	Standard	36,31	1,00E+02	6,05E+01
	Multiplex Detection Mix (Salmonella enterica 10 <sup>2</sup> copies/reaction)	Standard	35,16	1,00E+02	1,27E+02
	Multiplex Detection Mix (Salmonella enterica 10 copies/reaction)	Standard	39,10	1,00E+01	9,80E+00
	Multiplex Detection Mix (Salmonella enterica 10 copies/reaction)	Standard	38,40	1,00E+01	1,54E+01
	Multiplex Detection Mix (Salmonella Live cDNA+ Escherichia coli Live cDNA)	Unknown	28,58		9,23E+03



## Conclusioni:

- Rileva i patogeni di origine alimentare e discrimina tra patogeni vivi e morti che possono impedire di sprecare cibo
- Con lo stesso ciclo q-PCR possiamo rilevare 2 (al momento) diversi agenti patogeni di origine alimentare (salmonella ed E. coli), sviluppando un metodo che può consentire di distinguere le cellule vive e morte amplificando l'mRNA del m.o