

VALUTAZIONE DELLA REAL-TIME PCR COME COMPLEMENTO AL METODO ISO 6579:2004 PER LA RILEVAZIONE DELLA SALMONELLA NELLA CARNE SUINA

Evaluation of Real-Time PCR to complement ISO 6579:2004 method for the detection of Salmonella in pork cuts

Frédérique Pasquali, Federica Bovo, Alex Lucchi, Alessandra De Cesare, Gerardo Manfreda*

*Corresponding author. Tel: +390512097854; Fax: +390512097852. E-mail: Gerardo.manfreda@unibo.it
Dipartimento di Scienze e Tecnologie Agroalimentari, Alma Mater Studiorum - Università di Bologna,
Ozzano dell'Emilia, Italia

ABSTRACT

According to Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuff, the analytical reference method for the detection of Salmonella in food is ISO 6579:2004. However this long and labor-intensive method is not in line with the short production times of the food industry. In the last years, Real-Time PCR is used more and more by scientists for the reliable, fast and specific detection of bacterial pathogens in food. The aim of the present study was to evaluate the Salmonella detection capability of a validated Real-Time PCR assay on naturally contaminated pork cuts in comparison with the reference method ISO 6579:2004. Three samplings were performed and included 16 pork cut packaging. From each packaging, three aliquots of 10 g each were tested separately by ISO 6579:2004 method and by Real-Time PCR. In particular this molecular method was applied on DNA samples extracted from pre-enrichment broth after 1 and 18 hours of incubation. Within the three sampling periods, Real-Time PCR detected Salmonella in 81%, 100% e 62,5% of pork cut samples respectively, whereas the corresponding percentages of detection of the reference method were 56%, 81% e 62,5% respectively. In conclusion the Real-Time PCR assay used in the present study might be a reliable tool for a fast detection of Salmonella on pork cuts, especially when large number of samples needs to be tested. The reference method might be applied only on positive samples for isolation purposes mandatory in epidemiological investigations.

Keywords: ISO 6579:2004, Real-Time PCR, Salmonella, Pork Cuts.

INTRODUZIONE

Secondo il Regolamento (CE) n. 2073/2005 della Commissione del 15 novembre 2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari, il metodo analitico di riferimento per la rilevazione della Salmonella, è incluso nella norma ISO 6579:2004. Tale metodo risulta laborioso e richiede 4-5 giorni per l'ottenimento dei risultati. La comunità scientifica, in risposta alla crescente domanda da parte sia della Comunità Europea, sia dal settore produttivo alimentare, si è adoperata negli ultimi anni nell'identificazione di nuove metodiche molecolari caratterizzate da un'elevata specificità, sensibilità e ridotti tempi di analisi per la rilevazione di patogeni negli alimenti.

Attualmente sono disponibili diversi saggi di Real-Time PCR per la rilevazione della Salmonella nella carne, nelle carcasse, su insalata, cioccolata, formaggio, latte, frutta e uova (Josefson et al., 2007; Kramer et al., 2010; McCabe et al., 2010; Lofstrom et al., 2009; Hein et al., 2006; Liming et al., 2004; Wang et al., 2010; Seo et al., 2004; Malorny et al., 2007).

Tra tutti questi, solo due saggi di Real-Time per l'identificazione della Salmonella negli alimenti sono stati validati (McCabe et al., 2010; Lofstrom et al., 2009). Entrambi questi saggi includono un controllo interno di amplificazione (IAC) necessario per la valutazione della presenza di possibili inibitori della PCR responsabili di risultati falsi - negativi (Malorny et al., 2004). Il saggio di McCabe e colleghi include

due passaggi di arricchimento e quindi richiede almeno due giorni per l'ottenimento dei risultati. Inoltre tale saggio prevede l'amplificazione del gene *hlyA* che, essendo localizzato nell'isola di patogenicità 1 di *Salmonella*, può subire modificazione genetica responsabili di risultati falsi negativi (Malorny et al., 2004). Il saggio di Lofstrom e colleghi, invece, ha come bersaglio il locus genico *ttrRSBCA* essenziale per la respirazione anaerobica del tetrationato importante per la sopravvivenza e crescita di *Salmonella* in ambienti anaerobi competitivi (Winter et al., 2010). Questo secondo saggio è risultato efficace nella rilevazione di *Salmonella* nella carne macinata già dopo 18 ore di pre-arricchimento in BPW. (Lofstrom et al., 2009).

Lo scopo della presente ricerca è stato di valutare l'efficacia del saggio validato di Real-Time PCR, che include uno IAC e amplifica una sequenza interna al locus *ttrRSBCA*, per la rilevazione di *Salmonella* nella carne di maiale che insieme alle carni avicole risulta tra i principali veicoli dell'infezione salmonellare nell'uomo. In particolare si è valutata l'efficacia del saggio su campioni naturalmente contaminati come complemento al metodo analitico di riferimento ISO 6579:2004 dal momento che in letteratura sono stati riportati dati di validazione solo su campioni artificialmente contaminati. Inoltre, al fine di ridurre i tempi di analisi, si è verificata l'efficacia del presente saggio di Real-Time PCR dopo una e 18 ore di pre-arricchimento. Questa valutazione potrebbe consentire agli operatori dell'industria alimentare di valutare in termini di analisi del rischio la possibilità di immettere in commercio alimenti in accordo con il Reg. CE 2073/05.

MATERIALI E METODI

Sono stati eseguiti tre campionamenti nei mesi di Febbraio, Aprile e Maggio 2011. Per ciascun campionamento sono state prelevate al punto vendita 16 confezioni di carne di maiale (campioni).

Da ciascun campione, tre aliquote (repliche) di 10 g ciascuna, sono state testate singolarmente in parallelo mediante Real-Time PCR e metodo analitico di riferimento per la rilevazione di *Salmonella* nella carne.

Il metodo di riferimento è stato eseguito secondo il protocollo riportato nella norma ISO 6579:2004 (Anonymous, 2004). In breve si è proceduto seguendo le fasi: pre-arricchimento in Buffer Peptone Water (BPW, Oxoid, Milano, Italia) a 37°C per 18 ore; arricchimento in Rappaport-Vasiliadis (RVS, Oxoid) a 42°C per 24 ore e in Muller Kauffman Tetrathionate broth (MKTTn, Oxoid) a 37°C per 24 ore in parallelo; piastramento selettivo in Xylose Lysine Deoxy-

cholate agar (XLD, Oxoid) e Brillant Green Agar (BGA, Oxoid) con incubazione delle piastre a 37°C per 24 ore in parallelo e test di conferma, sulle colonie isolate in terreno selettivo, mediante saggio PCR per l'amplificazione specifica di una sequenza interna del gene *rpoD* di *Salmonella* (coinvolto nella sintesi proteica) secondo il protocollo di Rijpens e colleghi (2002).

Per l'estrazione del DNA, due aliquote di 5 ml ciascuna del brodo di pre-arricchimento BPW dopo un'ora e 18 ore di incubazione sono state centrifugate per 5 min a 3.000 x g. Il surnatante è stato eliminato ed il pellet lavato due volte. Il DNA è stato quindi estratto dal pellet con l'ausilio di un kit di estrazione seguendo le indicazioni del produttore (DNAeasy Blood and Tissue Kit, Qiagen, Milano, Italia). IL DNA è stato eluito in 200 µl di TE buffer e stoccato a -20°C.

Il saggio di Real-Time PCR è stato eseguito come precedentemente descritto (Malorny et al., 2004; Kramer et al., 2011). Ogni reazione includeva 10 µl di 2X Fast TaqMan Universal Master mix (Applied Biosystems, Milan, Italy), 5 µl di DNA totale e i diversi oligonucleotidi come riportato in tabella1 in un volume complessivo di 20 µl. Il programma di amplificazione prevedeva: 95°C per 20 s, seguito da 45 cicli di 95°C per 3 s, 65 °C per 30 s. Ogni campione di DNA è stato testato in doppio in un amplificatore specifico per Real-Time PCR (Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System, Applied Biosystems).

Il limite di sensibilità del saggio PCR è stato determinato in due esperimenti indipendenti, analizzando diluizioni seriali 1:10, in un intervallo compreso tra 5 e 5 x 10⁶ copie geniche/PCR, della sequenza bersaglio di 86 bp clonata all'interno del plasmide vettore pCR 2.1 (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany).

Al fine di valutare la corrispondenza dei risultati ottenuti con i due metodi, l'accuratezza, sensibilità e specificità relative sono state calcolate secondo quanto descritto nella norma ISO 16140:2003 ed il grado di accordo quantificato secondo il coefficiente kappa di Cohen (k).

RISULTATI

Per quanto riguarda il limite di sensibilità del saggio PCR, si è osservata una rilevazione del gene bersaglio nell'intervallo da 5 a 5 x 10⁶ copie geniche/PCR con un valore medio di Ct che variava rispettivamente da 33,9 ± 0,85 a 16,1 ± 0,34. La rilevazione è stata lineare con un coefficiente di correlazione pari a 0,99 (Figura 1). Questi risultati sono congruenti con quelli già riportati in letteratura (Malorny et al., 2004).

Aprile è risultato il campionamento con la più alta prevalenza di *Salmonella* con rispettivamente 13 (81%) vs 16 (100%) campioni e 34

(70,8%) vs 43 (89,5%) repliche risultate positive per Salmonella mediante ISO e Real-Time PCR testata sui brodi di pre-arricchimento dopo 18h di incubazione. La prevalenza è risultata consistente anche nel campionamento eseguito nel mese di Maggio durante il quale 10 (62,5%) campioni sono risultati positivi con entrambe le metodiche. Una minore prevalenza è stata riscontrata nel mese di Febbraio solo con il metodo ISO che ha rilevato la presenza di Salmonella in 9 (56%) campioni, rispetto a 13 (81,2%) campioni positivi con il metodo di Real-Time PCR. Inoltre tale metodo ha rilevato la presenza di Salmonella in un 19% di campioni in più nel campionamento di Aprile fino ad arrivare ad un 25% in più di campioni positivi rispetto alla metodica ISO nel campionamento di Febbraio. Anche se si confrontano i risultati relativi alle repliche, la positività della metodica Real-Time PCR è risultata del 24% in più rispetto alla metodica di riferimento (82/144 [56,9%]) vs (69/144 [47,9%]).

Volendo fare un confronto dei risultati della Real-Time PCR applicata ai brodi di pre-arricchimento dopo un'ora d'incubazione rispetto ai risultati ottenuti dagli analoghi brodi alle 18 h, è stato osservato un sostanziale aumento del numero di campioni e di repliche positive per Salmonella. In particolare dai 29 (60,4%) campioni positivi della Real-Time PCR 1h si passa ai 39 (81,2%) campioni positivi dopo le 18h con un incremento del numero di positivi di circa il 20%. Analogamente per le repliche, si passa da 61 (42,3%) repliche positive a 1h a 82 (56,9%) repliche positive a 18h (Tabella 2) con un incremento di positivi di circa il 15%.

Analizzando il grado di accordo dei risultati di Real-Time PCR dopo 18 ore di pre-arricchimento con i risultati della metodica colturale tradizionale, su 144 repliche 61 sono risultate positive ad entrambe le metodiche (accordo positivo), 54 erano negative per entrambe le metodiche (accordo negativo), 39 erano negative in ISO e positive in Real-Time PCR (deviazione positiva) e 5 erano positive con metodica ISO e negative con metodica di Real-Time PCR (deviazione negativa). Pertanto l'accuratezza, sensibilità e specificità relative calcolate sui risultati relativi alle repliche sono state pari a 80,4%, 88,4% e 82,4% rispettivamente. Secondo il coefficiente kappa di Cohen la corrispondenza complessiva tra le due metodiche è stata pari a 0,61 equivalente ad un accordo buono.

DISCUSSIONE E CONCLUSIONI

I risultati sopra riportati indicano una sensibilità della Real-Time PCR sui brodi di pre-arricchimento 1h complessivamente inferiore alla metodica ISO 6579 e quindi non proponibile

come valida sostituta della metodica di microbiologia tradizionale. La metodica di Real-Time PCR applicata invece ai brodi di pre-arricchimento delle 18 h si è dimostrata una metodica con una sensibilità maggiore rispetto alla metodica analitica di riferimento.

Il grado di accordo dei risultati di Real-Time PCR dopo 18 ore di pre-arricchimento con i risultati della metodica colturale tradizionale, nella presente ricerca ha evidenziato un'accuratezza relativa pari al 80,4% giudicata buona. Questi risultati sono superiori a quelli riportati da Eygor et al (2010) nella quale è stata registrata un'accuratezza relativa di una Real Time PCR in comparazione con il metodo di riferimento ISO 6579 in campioni naturalmente contaminati, pari a 67,4% nella carne di pollo, 60% nella carne di tacchino, e 53,3% nelle carni rosse. Il dato riferibile alla deviazione positiva (repliche positive in PCR e negative in ISO) registrato nella nostra ricerca ipotizziamo possa essere dovuto alla presenza nel campione di cellule stressate/non colturabili (Schrank et al. 2001; Eygor et al. 2002; Lofstrom et al. 2004). Infatti, a conferma di questa ipotesi, la deviazione positiva registrata in una prova su campioni artificialmente contaminati da Lofstrom et al. (2004) è risultata minore (2/240) rispetto a quella dei campioni da noi analizzati (20/144) in questo studio. Inoltre il risultato di deviazione negativa a noi osservato non può essere ascrivibile alla presenza di sostanze inibitorie, in quanto il saggio di Real Time PCR selezionato in questa ricerca, prevedeva l'individuazione di effetti inibitori mediante l'inclusione di un controllo interno di amplificazione (IAC) che è risultato sempre positivo. Pertanto questa deviazione negativa può essere ricondotta alla presenza di una bassa quantità iniziale di DNA target nelle colture di pre-arricchimento. Tale inconveniente può essere eliminato se la Real-Time PCR viene eseguita sul DNA estratto da un'aliquota del brodo di arricchimento (RVS) piuttosto che sul DNA estratto dal brodo di pre-arricchimento (BPW) come già consigliato da altri autori (McGuinness et al. 2009; O'Regan et al. 2008; McCabe et al. 2010).

In conclusione l'accuratezza relativa della metodica di Real-Time PCR è risultata buona rispetto al metodo analitico ISO pertanto può proposto come metodo alternativo di screening soprattutto in situazioni che prevedono un elevato numero di campioni da sottoporre a controllo oppure nel caso in cui, come avviene nella pratica dell'industria alimentare, è necessario operare in tempi rapidi prima della commercializzazione del prodotto. Tuttavia il metodo di riferimento ISO 6579:2004 dovrebbe essere uti-

lizzato su campioni positivi in PCR per l'isolamento e tipizzazione del ceppo infettivo a fini epidemiologici.

BIBLIOGRAFIA

1. Anonymous. 2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs — horizontal method for the detection of Salmonella (EN ISO 6579:20024). International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
2. Anonymous. 2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Protocol for the validation of alternative methods (EN ISO 16140:2003). International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
3. Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuff. (OJ L 338,22.12.2005, pp. 1-26).
4. Eyigor A., Temelli S. e Carli K.T. 2010. Evaluation of ISO 6579 and FDA-BAM methods to complement real-time polymerase chain reaction for the detection of Salmonella in naturally contaminated poultry meat and red meat. *Foodborne . Dis.* 7(8):921-927.
5. European Food Safety Authority and European centre for disease prevention and control. 2012. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2010. *The EFSA Journal* 10(3):2597.
6. Hein I., Flekna G., Krassnig M. e Wagner M. 2006. Real-time PCR for the detection of Salmonella spp. in food: An alternative approach to a conventional PCR system suggested by the FOOD-PCR project. *J. Microbiol. Methods* 66:538-547.
7. Josefsen M.H., Krause M., Hansen F. e Hoorfar J. 2007. Optimization of a 12-hour TaqMan PCR-based method for detection of Salmonella bacteria in meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 73:3040-3048.
8. Krämer N., Löfström C., Vigre H., Hoorfar J., Bunge C. e Malorny B. 2011. A novel strategy to obtain quantitative data for modelling: combined enrichment and real-time PCR for enumeration of salmonellae from pig carcasses. *Int. J. Food Microbiol.* 145:S86-95.
9. Liming S.H. e Bhagwat A.A. 2004. Application of a molecular beacon-real-time PCR technology to detect Salmonella species contaminating fruits and vegetables. *Int. J. Food Microbiol.* 95:177-187.
10. Löfström C., Krause M., Josefsen M.H., Hansen F. e Hoorfar J. 2009. Validation of a same-day real-time PCR method for screening of meat and carcass swabs for Salmonella. *BMC Microbiol.* 9: 85.
11. Malorny B., Bunge C. e Helmuth R. 2007. A real-time PCR for the detection of Salmonella Enteritidis in poultry meat and consumption eggs. *J. Microbiol. Methods* 70:245-251.
12. Malorny B., Paccassoni E., Fach P., Bunge C., Martin A. e Helmuth R. 2004. Diagnostic real-time PCR for detection of Salmonella in food. *Appl. Environ. Microbiol.* 70:7046-7052.
13. McCabe E.M., Burgess C.M., Walsh D., O'Regan E., McGuinness S., Barry T., Fanning S. e Duffy, G. 2011. Validation of DNA and RNA real-time assays for food analysis using the *hilA* gene of Salmonella enterica serovars. *J. Microbiol. Methods* 84:19-26.
14. McGuinness S., McCabe E., O'Regan E., Dolan A., Duffy G., Burgess C., Fanning S., Barry T. e O'Grady, J. 2009. Development and validation of a rapid real-time PCR based method for the specific detection of Salmonella on fresh meat. *Meat Sci.* 83:555-562.
15. O'Regan E., McCabe E., Burgess C., McGuinness S., Barry T., Duffy G., Whyte P.,
16. Fanning S. 2008. Development of a real-time multiplex PCR assay for the detection of multiple Salmonella serotypes in chicken samples. *BMC Microbiol.* 8:156.
17. Rijpens N., Jannes G. e Herman L. 2002. Messenger RNA-based RT-PCR detection of viable Salmonella. *Int. Dairy J.* 12:233-238.
18. Seo K.H., Valentin-Bo I.E., Brackett R.E. e Holt P.S. 2004. Rapid, specific detection of Salmonella Enteritidis in pooled eggs by real-time PCR. *J. Food Prot.* 67:864-869.
19. Schrank I.S., Mores M.A., Costa J.L., Frazzon A.P., Soncini R., Schrank A., Vainstein M.H. e Silva S.C. 2001. Influence of enrichment media and application of a PCR based method to detect Salmonella in poultry industry products and clinical samples. *Vet. Microbiol.* 82(1):45-53.
20. Wang L. e Mustapha A. 2010. EMA-real-time PCR as a reliable method for detection of viable Salmonella in chicken and eggs. *J. Food Sci.* 75:M134-139.
21. Winter S.E., Thiennimitr P., Winter M.G., Butler B.P., Huseby D.L., Crawford R.W., Russell J.M., Bevins C.L., Adams L.G., Tsolis R.M, Roth J.R. e Bäumlér A.J. 2010. Gut inflammation provides a respiratory electron acceptor for Salmonella. *Nature* 467:426-429.

Tabella 1. Sequenze e rispettive concentrazioni degli oligonucleotidi inclusi nel saggio di Real-Time PCR

Oligonucleotide	Sequenza	Concentrazione
Sequenza IAC	GACTCACCAGGAGATTACAACATGGCTCTTGCTGTGCATC ATCGCAGAACATCAAAGCGTTCGCGTCGCCGTGTGGGATG GTCACTTTTGGTCTGAGCTAC	1000 copie
Primer ttr-6	CTCACCAGGAGATTACAACATGG	0,4 µM
Primer ttr-4	AGCTCAGACCAAAAAGTGACCATC	0,4 µM
Sonda LNA	6-FAM-CG+ACGGCG+AG+ACCG-BHQ1	0,24 µM
Sonda IAC	JOE-CACACGGCGACGCGAACGCTTT-BHQ1	0,24 µM

Tabella 2. Rilevazione della Salmonella nella carne di maiale mediante metodo ISO 6579 e Real-Time PCR dai brodi di pre-arricchimento dopo una e 18 ore di incubazione

Campionamento	ISO		Real-Time PCR 1 ora		Real-Time PCR 18 ore	
	N°positivi (N°TOT campioni)	N°positivi (N°TOT repliche)	N°positivi (N°TOT campioni)	N°positivi (N°TOT repliche)	N°positivi (N°TOT campioni)	N°positivi (N°TOT repliche)
Febbraio	9 (16)	15 (48)	13 (16)	24 (48)	13 (16)	24 (48)
Aprile	13 (16)	34 (48)	14 (16)	33 (48)	16 (16)	43 (48)
Maggio	10 (16)	20 (48)	2 (16)	4 (48)	10 (16)	15 (48)
TOTALE	32 (48)	69 (144)	29 (48)	61 (144)	39 (48)	82 (144)

Figura 1. Valutazione della sensibilità del saggio di Real-Time PCR su diluizioni 1:10 della sequenza bersaglio clonata in plasmide vettore