

**Confronto tra PCR Real Time e metodo
microbiologico classico per la ricerca di
Campylobacter spp. in campioni ambientali
prelevati in allevamento avicolo**



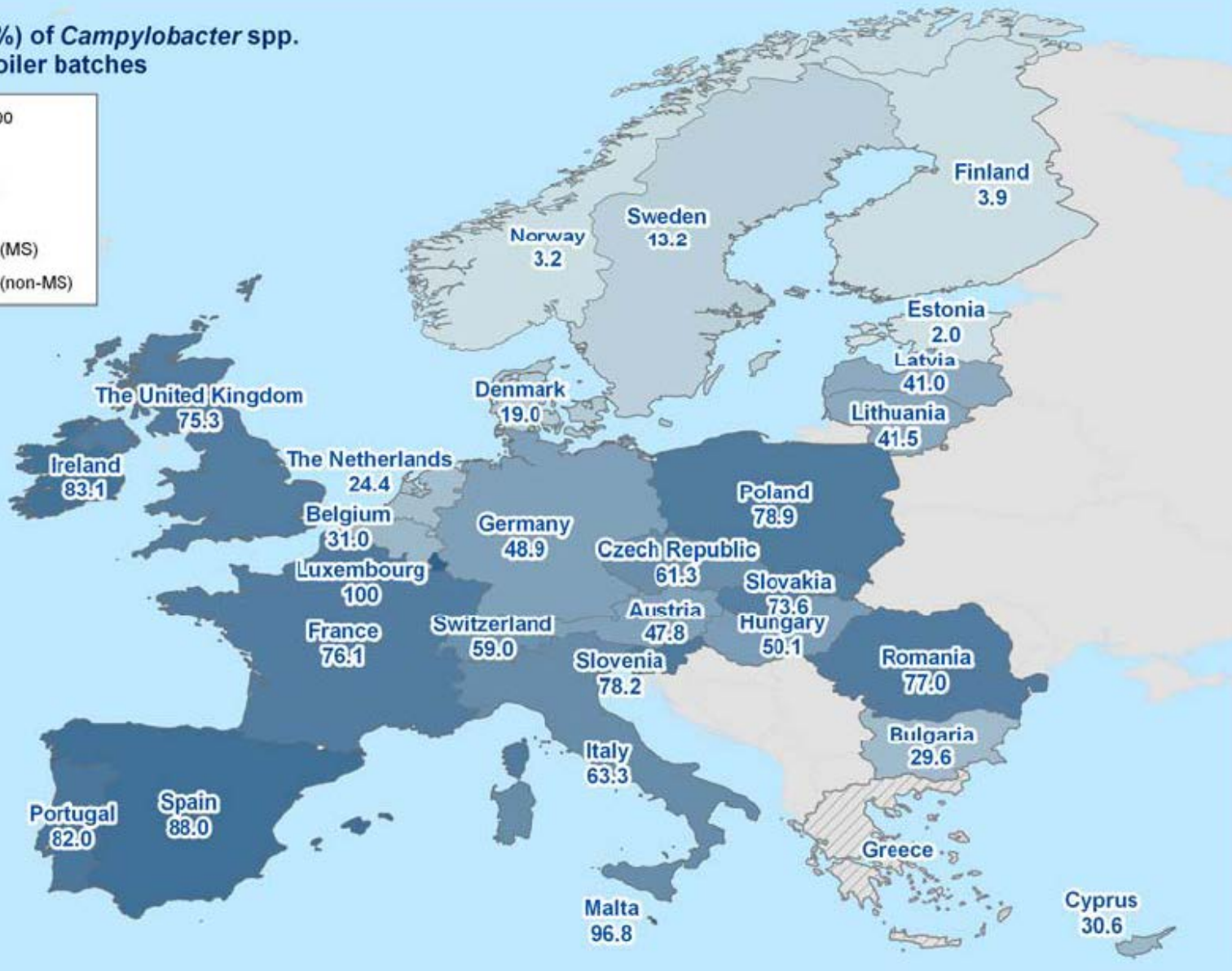
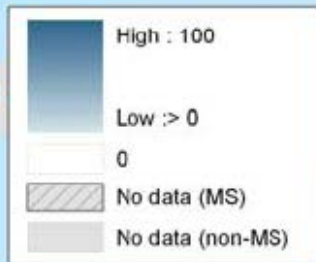
09 Giugno 2015



Di Giannatale E. – Di Serafino G.



Prevalence (%) of *Campylobacter* spp. colonised broiler batches



Prevalenza del *Campylobacter* spp. negli allevamenti (EFSA Journal 2011)

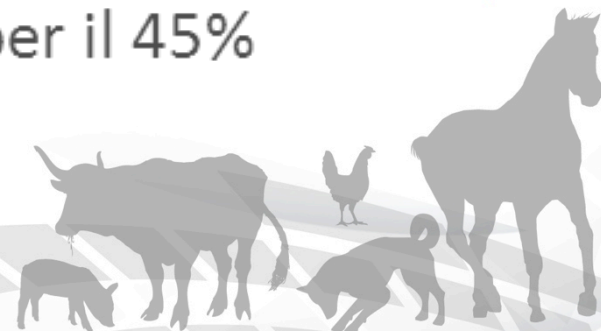
Proposta di criterio microbiologico

Criterio microbiologico 1000 UFC
riduzione rischio 50%

- 15% di produzione fuori dal criterio in EU

Criterio microbiologico 500 UFC
riduzione rischio 90%

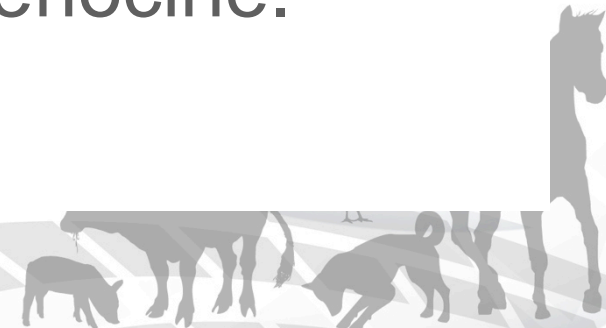
- una produzione fuori dal limite per il 45%



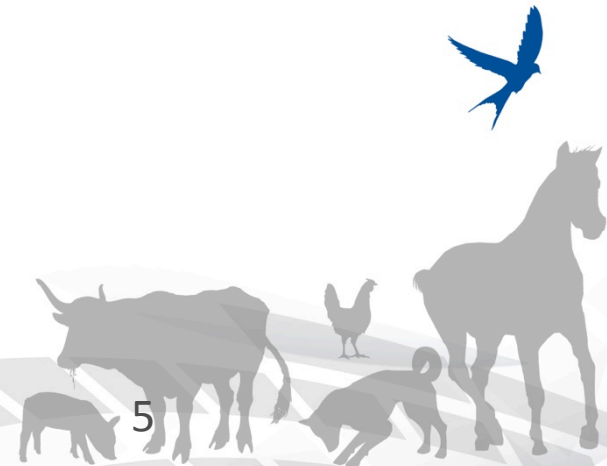
Il controllo del *Campylobacter*

Produzione primaria:

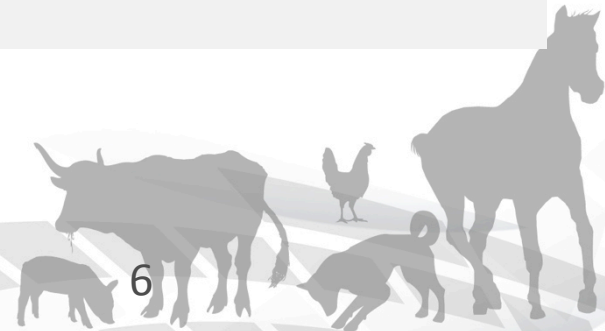
- intensificazione delle buone norme igieniche;
- riduzione dell'età di macellazione degli animali;
- evitare le operazioni di diradamento del gruppo;
- vaccinazioni / batteriofagi / batteriocine.



Ma se gli animali sono positivi per *Campylobacter* spp. in fase di pre-macellazione



**Necessità di mettere a punto un metodo
diagnostico veloce ed affidabile per la
ricerca di *Campylobacter spp.*
*a livello di produzione primaria***



Scopo del lavoro



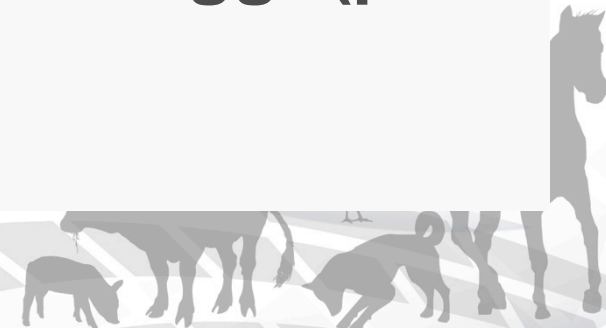
**Analisi dei lotti
di animali in
premacellazione
(31 - 41 gg)**

**Logistic slaughter
(EFSA Journal 2011)**



Materiali e metodi

- ▶ **10 allevamenti**
- ▶ **Prelievo effettuato mediante calzari (boot socks)**
- ▶ **37 box ciascuno da 12000 – 30000 animali**
- ▶ **31gg (pollo da rosticceria) – 41 gg (pollo medio-pesante)**

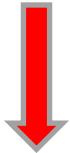


Metodi a confronto

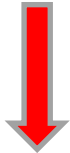


METODO 1

ISO 10272-parte 1



Arricchimento in
brodo Bolton

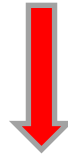


Semina su
agar mCCD e
agar Karmali

IN REVISIONE!!!

METODO 2

Aggiunta di
soluzione
fisiologica



Semina diretta su
agar mCCD e
agar Karmali

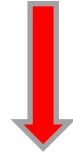
METODO 3

Real Time PCR
direttamente
da matrice

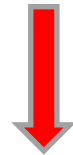


ISO 10272 – parte 1. Ricerca *Campylobacter* spp.

Campione

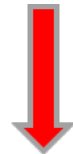


Arricchimento in
brodo Bolton



2 gg.

Semina su
agar mCCD e
agar Karmali



2 gg.

Lettura delle
piastre



**Tempi di analisi:
5 gg!!!!!!**



Real Time PCR



Gene target: 16s

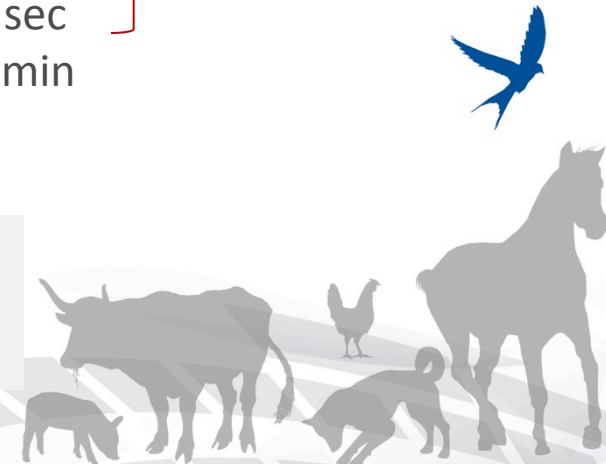
Estrazione del
DNA direttamente
da matrice **30 min.**



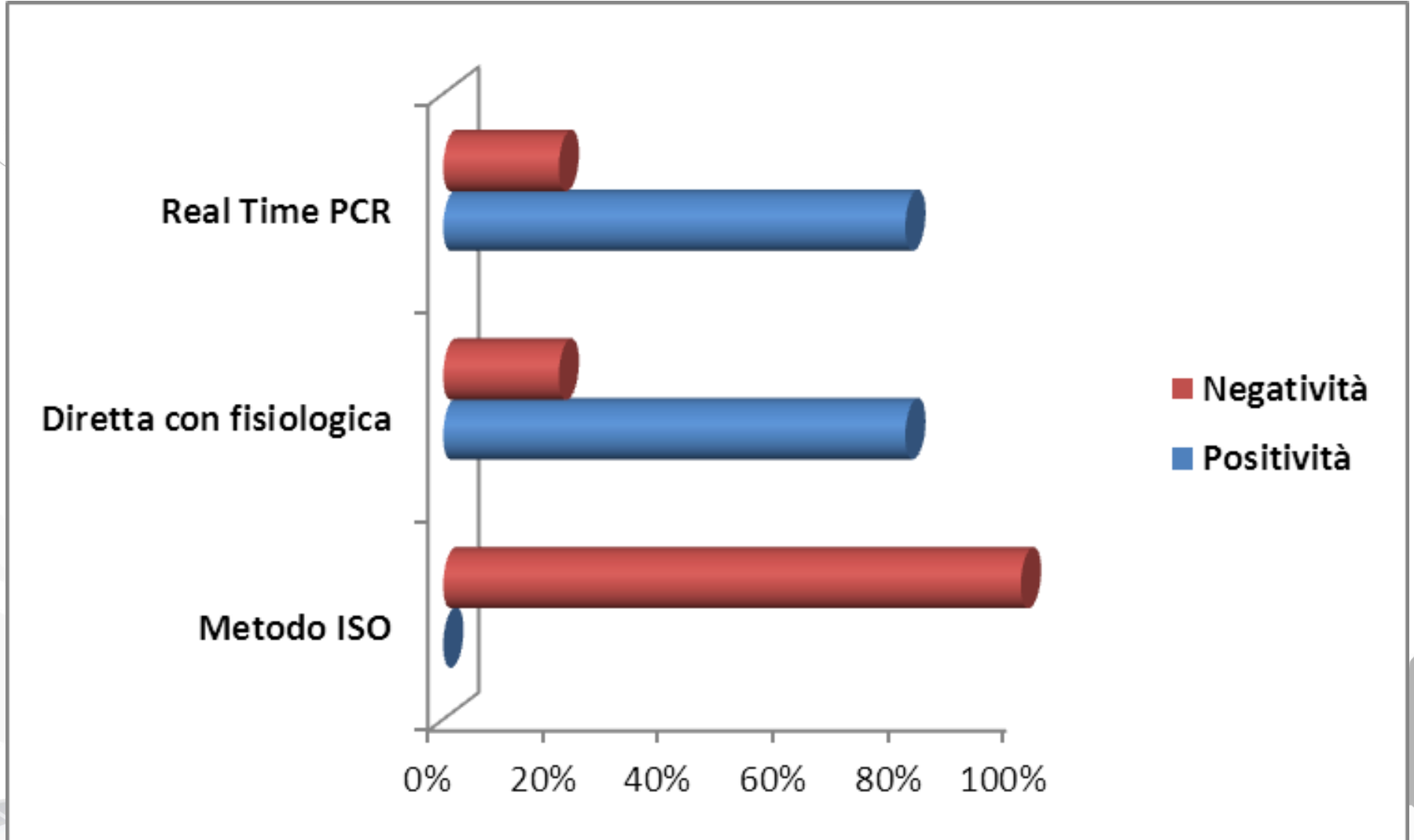
Real Time PCR **1 h 30 min.**

95°C	10 min	}	40 cicli
95°C	15 sec		
58°C	30 sec		
72°C	30 sec		
72°C	5 min		

**Tempi di analisi:
2 h!!!!!!**

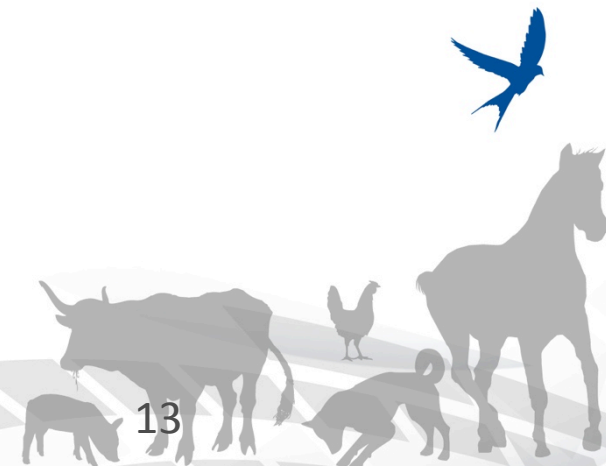


Metodi a confronto: risultati

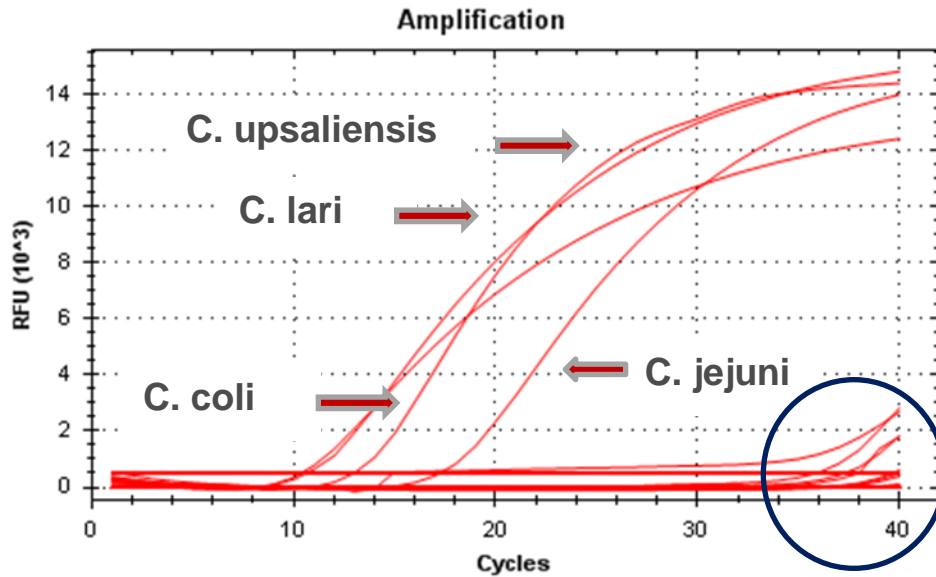


Conferma dei risultati al momento della macellazione:

- ricerca *Campylobacter* da tamponi cloacali;
- numerazione *Campylobacter* da ciechi.



Prove di specificità



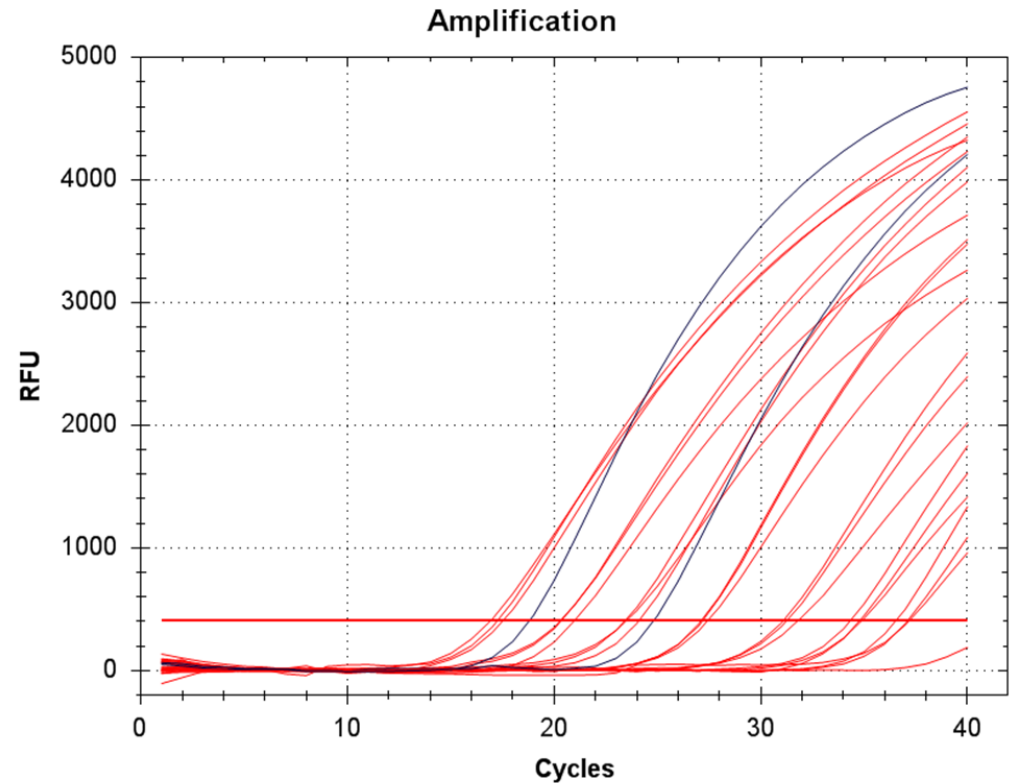
Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq
A01	SYBR		Pos Ctrl	<i>C. jejuni</i>	17,31
A02	SYBR		Pos Ctrl	<i>C. coli</i>	13,06
A03	SYBR		Pos Ctrl	<i>C. lari</i>	10,71
A04	SYBR		Pos Ctrl	<i>C. upsaliensis</i>	10,43
A07	SYBR		Unkn	<i>Helicobacter p</i>	36,03
A08	SYBR		Unkn	<i>Arcobacter bu</i>	38,04
B01	SYBR		Unkn	<i>E. coli</i>	37,38
B02	SYBR		Unkn	<i>Staph. aureus</i>	N/A
B03	SYBR		Unkn	<i>Staph. interme</i>	N/A
B04	SYBR		Unkn	<i>Staph. hyicus</i>	N/A
B05	SYBR		Unkn	<i>Staph. schleifi</i>	14,99
B06	SYBR		Unkn	<i>Salm. typhimu</i>	N/A
B07	SYBR		Unkn	<i>Lactobacillus</i>	N/A
B08	SYBR		Neg Ctrl	Negativo	39,72

Curva standard di calibrazione

Boot sock contaminato con
Campylobacter jejuni (10^9 ufc)

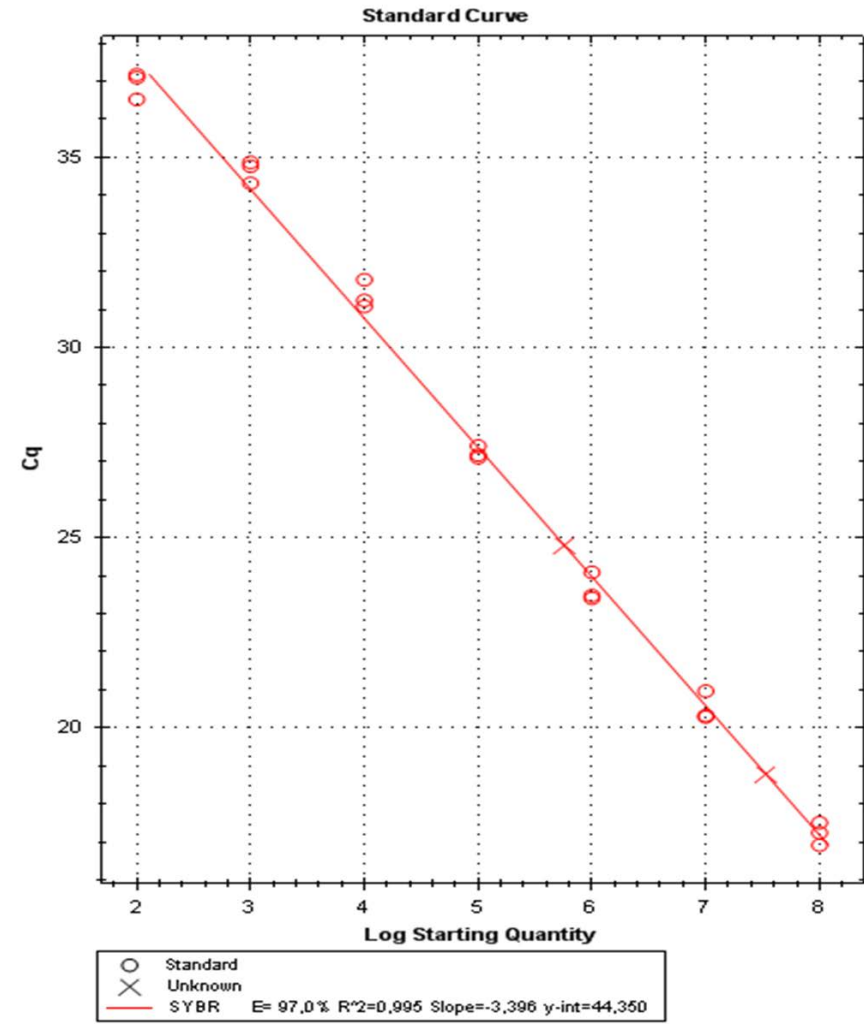
Allestimento delle diluizioni

Real Time PCR per le singole
diluizioni in triplicato



Curva standard di calibrazione

Well	Fluor	Target	Content	Sample	Cq	SQ
A04	SYBR		Std-2		17,51	1,000E+08
A05	SYBR		Std-2		17,24	1,000E+08
A06	SYBR		Std-2		16,91	1,000E+08
A07	SYBR		Std-3		20,29	1,000E+07
A08	SYBR		Std-3		20,97	1,000E+07
A09	SYBR		Std-3		20,32	1,000E+07
A10	SYBR		Std-4		23,41	1,000E+06
A11	SYBR		Std-4		23,48	1,000E+06
A12	SYBR		Std-4		24,09	1,000E+06
B01	SYBR		Std-5		27,41	1,000E+05
B02	SYBR		Std-5		27,18	1,000E+05
B03	SYBR		Std-5		27,10	1,000E+05
B04	SYBR		Std-6		31,78	1,000E+04
B05	SYBR		Std-6		31,08	1,000E+04
B06	SYBR		Std-6		31,24	1,000E+04
B07	SYBR		Std-7		34,87	1,000E+03
B08	SYBR		Std-7		34,77	1,000E+03
B09	SYBR		Std-7		34,32	1,000E+03
B10	SYBR		Std-8		37,10	1,000E+02
B11	SYBR		Std-8		37,17	1,000E+02
B12	SYBR		Std-8		36,52	1,000E+02
C07	SYBR		Pos Ctrl		18,79	3,367E+07
C09	SYBR		NTC		N/A	N/A
C10	SYBR		Unkn		24,80	5,706E+05



$R^2 = 0,995$

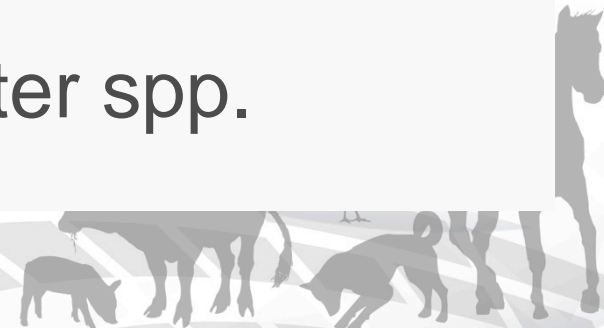


Carica di *Campylobacter* spp.

- ▶ 35 box positivi per *Campylobacter* spp.

N. box	Carica
20	$3 \cdot 10^5$
11	$3 \cdot 10^6$
4	$3 \cdot 10^7$

- ▶ Specie di *Campylobacter* spp.: -23 *C. jejuni*;
-12 *C. coli*.
- ▶ 2 box negativi per *Campylobacter* spp.



Conclusioni

- Real Time PCR affidabile e corrispondenza con i metodi microbiologici
- Velocità di diagnosi
- Esigenza revisione metodo ISO
- Limiti: gene target 16s

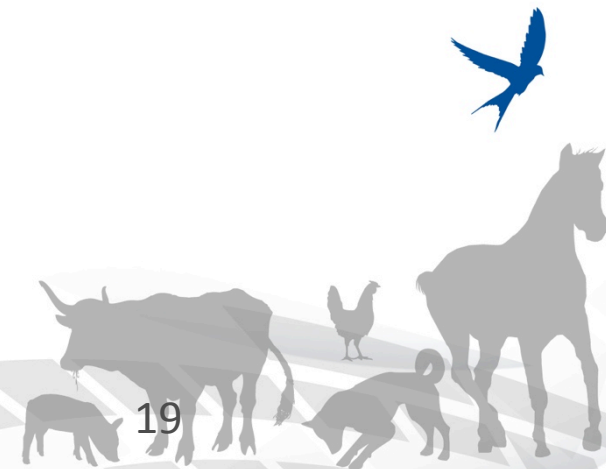


Work in progress.....



Real Time PCR anche per identificazione di specie

Real Time PCR da testare anche su cute prelevata da carcassa di pollo





*Grazie per
l'attenzione!!!*

