



UNIVERSITÀ DEL PIEMONTE ORIENTALE

Università del Piemonte Orientale

Scuola di Medicina

Dipartimento di Scienze della Salute

Corso di Laurea in Biotecnologie

Presidente: Prof.ssa Maria PRAT

Tesi di Laurea

L'uso della PCR Real Time per la rilevazione di Escherichia coli STEC, Salmonella spp e Listeria monocytogenes negli alimenti secondo il Reg. (CE) 2073/2005 e sue successive modifiche

Relatore: Prof. Diego Cotella

Candidato: Alberto Camedda

Matricola: 20020113

Anno accademico 2018/2019

INDICE

Abstract.....	2
1. Introduzione.....	4
1.1 Scopo della tesi.....	4
1.2 Regolamento (CE) 2073/2005.....	5
2. <i>Escherichia coli</i> STEC.....	6
2.1 Caratteristiche microbiologiche degli STEC.....	6
2.2 Sindromi cliniche.....	6
2.3 Shiga tossine.....	6
3. <i>Listeria</i>	8
3.1 Caratteristiche microbiologiche.....	8
3.2 Listeriosi.....	8
3.3 Azione Tossica.....	8
4. <i>Salmonella</i> spp.....	9
4.1 Caratteristiche e denominazioni.....	9
4.2 Sindromi cliniche.....	9
4.3 Febbre tifoide.....	9
4.4 Gastroenterite acuta.....	10
5. Materiali e metodi.....	10
5.1 Metodi colturali.....	10
5.2 Protocollo <i>Escherichia coli</i> STEC PCR Real Time.....	12
5.3 Protocollo <i>Salmonella</i> spp PCR Real Time.....	15
5.4 Protocollo <i>Listeria monocytogenes</i> PCR Real Time.....	18
6. PCR Real Time.....	19
7. Risultati.....	25
8. Conclusioni.....	35
Bibliografia.....	39

Laboratorio di analisi ambientali ARPA Valle d' Aosta

Relatore: Prof. Diego COTELLA

Studente: Alberto CAMEDDA

Abstract

L'incidenza delle malattie trasmesse dagli alimenti è ormai in costante crescita in tutti i paesi del mondo nonostante sia difficile avere dei dati precisi ed attendibili. In Italia, secondo i dati dell'Istituto Superiore della Sanità, circa il 33% dei focolai epidemici non presenta indicazione eziologica o non specifica il microrganismo responsabile. In ambito preventivo, l'Unione Europea ha stilato varie norme per la ricerca dei più frequenti patogeni alimentari, come il Regolamento (CE) 2073/2005. Quest'ultimo ha lo scopo di definire l'accettabilità e la sicurezza dei prodotti alimentari in base alla presenza di microrganismi, tossine e/o metaboliti. In più, ad ogni criterio analitico effettuato è associata una guida per l'interpretazione dei risultati oltre alla possibilità di poter usare metodi alternativi benché siano conformi ai criteri di riferimento. Nonostante i dati mondiali sulle tossinfezioni siano sottostimati a causa dell'assenza di un adeguato sistema di controllo e notifica, specie nei paesi del terzo mondo, nel nostro continente, tale normativa europea ha portato ad un leggero calo riguardante le sepsi alimentari dei principali batteri patogeni. Basandosi sulle tecniche di rilevamento e identificazione descritte nel Reg. (CE) 2073/2005, si è deciso di incentrare il lavoro di questa tesi sulle analisi di *E. coli* STEC, *Salmonella spp* e *Listeria monocytogenes* negli alimenti comparando le tecniche molecolari in PCR Real Time con i metodi colturali classici, in particolare per quel che riguarda la tempistica dei risultati ed il consumo dei materiali. Le analisi si sono svolte nel laboratorio di microbiologia dell'ARPA Valle d'Aosta nell'ambito di controlli ufficiali sugli alimenti. I kit ed i metodi utilizzati sono stati validati a livello internazionale dall' ISO (International Organization for Standardization). Un'ulteriore validazione secondaria del metodo è stata effettuata dall'ARPA. Le analisi sono state effettuate su un numero di unità campionarie superiore a 130, prendendo in esame campioni di diversa origine alimentare. A seguito di una fase di arricchimento, nella quale è stato aggiunto un terreno liquido al campione, sono state effettuate le operazioni di estrazione del DNA, di amplificazione della sequenza target mediante PCR Real Time ed in seguito la conseguente lettura dei dati. Nel caso vi fossero campioni risultanti positivi allo screening, è stata effettuata un'ulteriore analisi mediante il metodo colturale in modo da avere una conferma. I risultati hanno evidenziato un solo

campione positivo (*Salmonella spp*) sia in PCR Real Time sia all'analisi colturale. *Listeria monocytogenes* ha presentato la più alta percentuale di positività allo screening in PCR pari a 15,94 %, nonostante tutte le conferme colturali siano risultate negative. Il dato in questione può essere spiegato dal fatto che *Listeria monocytogenes*, diversamente da *Salmonella* ed *E. coli* STEC, può essere rilevato in bassissima carica a causa della sua resistenza agli ambienti estremi. Inoltre, la Real Time PCR è in grado di rilevare il materiale genetico di cellule non vitali, di conseguenza è possibile fossero presenti frammenti di acidi nucleici di *Listeria* nel campione. Le analisi su *Escherichia coli* STEC hanno riguardato meno campioni, tutti appartenenti alla stessa matrice alimentare (germogli), ma nessuno di questi ha richiesto una conferma colturale e quindi una conseguente rilevazione del sierogruppo STEC. Mettendo a confronto i protocolli termici della Real Time dei tre batteri con i protocolli per l'analisi colturale, si nota un grande risparmio dei tempi a favore della metodica di PCR. Quest'ultima impiega, tenendo conto delle fasi di arricchimento, estrazione ed amplificazione, all'incirca un giorno per poter fornire un risultato. Al contrario, il metodo colturale può impiegare dalle 72 alle 192 ore, a seconda del parametro microbiologico in analisi. Un ulteriore risparmio temporale è dato dalla possibilità di poter analizzare contemporaneamente le tre specie batteriche, effettuando una sola PCR per la ricerca dei parametri, poiché esse posseggono lo stesso protocollo termico. Nel caso vi siano campioni positivi, si dovrà comunque procedere con la metodica di riferimento colturale re isolando i campioni per avere un risultato di conferma definitivo.

1. Introduzione

L'incidenza delle malattie trasmesse dagli alimenti è ormai in costante crescita in tutti i paesi del mondo, nonostante sia difficile avere dei dati precisi ed attendibili a causa di una mancata diagnosi eziologica, spesso dovuta ad uno scarso ricorso agli accertamenti di laboratorio. Sebbene vi sia una mancanza di dati ufficiali e compiutamente affidabili, la minaccia delle infezioni alimentari spaventa circa il 40% della popolazione degli Stati membri dell'Unione Europea (EFSA, 2018). Secondo quanto riferito dall'ultimo report dell'ECDC-EFSA, risalente all'anno 2017, sulle zoonosi e malattie trasmesse da alimenti, il principale agente patogeno a causare infezioni nell'uomo è *Campylobacter* (incidenza di 64,8 su 100.000 abitanti), con una letalità dello 0,04%. Risultano invece in costante decrescita le infezioni di Salmonellosi (91.662 casi nel 2017), mentre sono stati segnalati 2480 casi di listeriosi invasiva con tasso del 0,48 casi per 100.000 con una letalità del 13,8% (ECDC-EFSA, 2018).

In Italia, secondo i dati dell'Istituto Superiore della Sanità riferenti all'anno 2018, i microrganismi maggiormente implicati nell'eziologia di tali episodi sono rappresentati da *Salmonella spp.* (45%). Il *Campylobacter* risulta essere implicato solo nel 1,2% dei casi. Purtroppo, circa il 33% dei focolai epidemici non presenta indicazione sull'eziologia degli episodi o non specifica il microrganismo responsabile. Rispetto agli anni precedenti si evidenzia una certa stabilità nel numero di infezioni da *Campylobacter* (1057 contro i 1060 del 2016), mentre le infezioni da *Salmonella* e *Listeria monocytogenes* mostrano una leggera diminuzione (3347 contro 4134 per *Salmonella*; 164 contro 179 per *Listeria*).

Nonostante i dati mondiali sulle tossinfezioni siano sottostimati a causa dell'assenza di un adeguato sistema di controllo e notifica, specie nei paesi del terzo mondo (WHO, CDC, EFSA 2018), il leggero calo riguardante le sepsi alimentari dei principali batteri patogeni, nel nostro continente, è senza dubbio dovuto alle norme erogate dall'Unione Europea sulla salvaguardia e l'identificazione dei microrganismi tossici.

1.1 Scopo della tesi

Nella presente tesi vengono descritte le tecniche di rilevamento e identificazione, secondo il Regolamento (CE) 2073/2005 e sue successive modifiche, delle principali specie batteriche in grado di causare malattie di provenienza alimentare. Si è deciso di incentrare il lavoro sui batteri patogeni *Escherichia coli* STEC, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella spp.*, mettendo a confronto i metodi molecolari in PCR Real Time con le tecniche colturali classiche, in particolare per quel che riguarda

la tempistica dei risultati ed il consumo di materiali. Questi microrganismi sono indicati come criteri di sicurezza alimentare nel Regolamento (CE) 2073/2005, che prescrive anche i piani di campionamento, i limiti di contaminazione tollerati, i metodi analitici di riferimento e la fase del processo di produzione in cui si applicano. I metodi di analisi utilizzati sono conformi ai protocolli e alle norme riconosciute a livello internazionale dall'ISO (International Organization for Standardization).

1.2 Regolamento (CE) 2073/2005

Tale normativa europea indica dei criteri microbiologici, con lo scopo di definire l'accettabilità e la sicurezza dei prodotti alimentari (oppure di un processo di produzione), in base all'assenza o alla presenza di microrganismi, tossine e/o metaboliti. Uno degli obiettivi della legislazione alimentare è di garantire un elevato livello di protezione della salute pubblica. Al fine di raggiungere questo scopo l'Unità Europea, basandosi sulle procedure HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points), ha ritenuto opportuno fissare criteri di sicurezza in grado di marcare la presenza di determinati organismi patogeni. Sul tema della sicurezza il regolamento riporta una serie di definizioni importanti, tra cui:

- criterio microbiologico: un criterio che definisce l'accettabilità di un prodotto, di una partita di prodotti alimentari o di un processo, in base all'assenza, alla presenza o al numero di microrganismi e/o in base alla quantità delle relative tossine/metaboliti, per unità di massa, volume, area o partita;
- criterio di sicurezza alimentare: un criterio che definisce l'accettabilità di un prodotto o di una partita di prodotti alimentari, applicabile ai prodotti immessi sul mercato. Riguardano alimenti già in commercio o prossimi alla vendita, competono sia al produttore sia agli organi pubblici del controllo alimentare;

Il mancato rispetto dei criteri di sicurezza alimentare porta al ritiro o al richiamo del prodotto secondo l'articolo 19 Reg. (CE) 178/2002. Il Regolamento 2073 descrive inoltre le norme specifiche per l'analisi ed il campionamento delle varie matrici alimentari, le quali devono essere inserite nell'ambito delle procedure di validazione e verifica del piano HACCP. In più, ad ogni criterio analitico effettuato è associata, ove necessario, una guida per l'interpretazione dei risultati delle prove. Nello stesso

regolamento si fa cenno alla possibilità di utilizzare metodi analitici alternativi benché siano conformi ai criteri di riferimento.

2. *Escherichia coli* STEC

2.1 Caratteristiche microbiologiche degli STEC

La specie batterica degli *Escherichia coli*, appartenente alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, è un Gram negativo. L'habitat naturale è rappresentato dall'intestino dell'uomo e di molti organismi a sangue caldo. Vengono definiti *Escherichia coli* STEC (o VTEC) i ceppi in grado di produrre le shiga-tossine (o verocitotossine), le quali sono agenti patogeni pericolosi per la salute umana. Esistono circa un centinaio di specie differenti di STEC patogene per l'uomo (FAO/WHO STEC EXPERT GROUP, 2019) ma la gran parte delle infezioni riportate risultano essere causate da cinque sierotipi: O26, O111, O103, O145 e O157. Lo STEC può essere inattivato da una cottura accurata ed omogenea degli alimenti, sino al raggiungimento di una temperatura di 70°C o superiore (WHO,2018).

2.2 Sindromi cliniche

Le fonti principali di focolai STEC sono dovute a prodotti con base di carne macinata bovina o suina (cruda/poco cotta), latte non pastorizzato e la contaminazione fecale nelle verdure. Le manifestazioni cliniche associate a questi batteri variano dalla diarrea acquosa, alla colite emorragica sino alla sindrome emolitico uremica (SEU) il cui il ceppo O157:H7 svolge un ruolo fondamentale, come riportato dagli studi di Tarr *et al.* del 2005 e di Tozzi *et al.* del 2003. Le manifestazioni di tale sindrome possono includere l'anemia emolitica, trombocitopenia, un'acuta deficienza renale oltre a conseguenze neurologiche come ictus ed attacchi cardiaci.

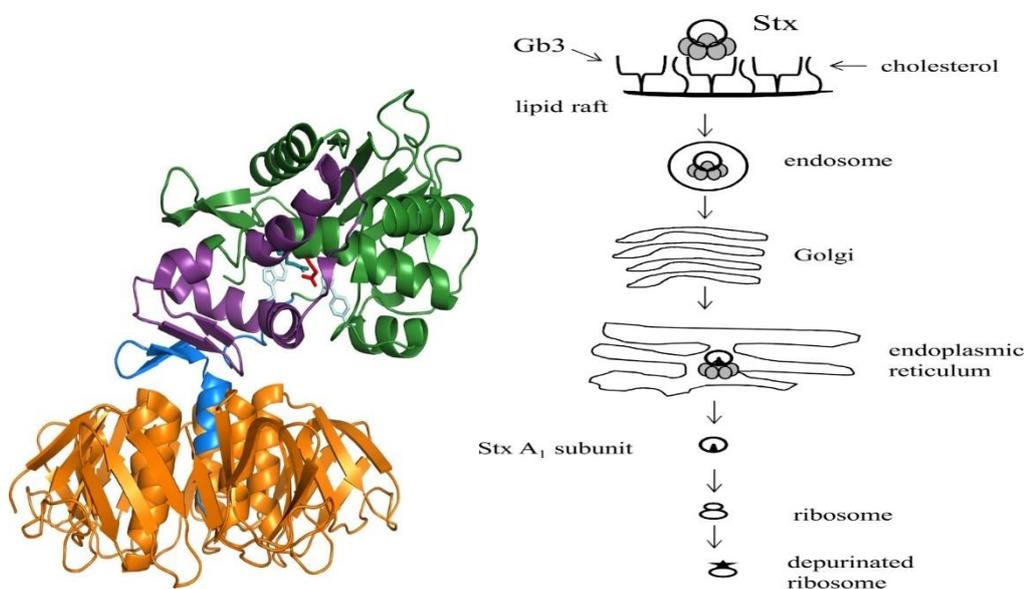
2.3 Shiga tossine

Gli *E. coli* STEC sono quindi patogeni a causa della produzione di particolari esotossine definite shiga tossine. I geni che permettono l'identificazione di tali batteri, nonché il loro rilevamento attraverso la PCR Real Time, sono i seguenti fattori di virulenza:

- i geni *stx1* e *stx2* (Shiga tossine)
- il gene *eae* (intimina)

Le tossine Shiga (*stx*) sono tra le tossine batteriche più potenti conosciute. La loro azione tossica si traduce nell'inibizione della sintesi proteica cellulare. Gli *stx* sono costituiti da due subunità principali: una subunità A che si unisce ad un pentamero di cinque subunità B identiche. Come illustrato in

numerosi articoli e trattati (Melton-Celsa, 2014 e La Placa, 2014), la subunità A della tossina danneggia il ribosoma eucariotico e blocca la sintesi proteica nelle cellule bersaglio. La funzione del pentamero B è di legarsi al recettore cellulare Gb3 che si trova principalmente sulle cellule endoteliali. Il traffico di *stx* avviene in maniera retrograda all'interno della cellula, in modo tale che la subunità A della tossina raggiunga il citosol solo dopo lo spostamento dall'endosoma al Golgi ed infine al reticolo endoplasmatico. Tale subunità possiede attività catalitica N-glicosidasi in grado di staccare un'adenina al 3' terminale nel sito 28s dell'rRNA, facendo sì che non avvenga il legame tra ribosoma e tRNA con una conseguente inibizione della sintesi proteica. La Figura 1 e Figura 2 sottostanti sono state prese dall'articolo di Melton-Celsa del 2014, e mostrano la struttura di una *Stx* e la sua endocitosi da parte delle cellule endoteliali.



Il gene *eae*, utilizzato per il rilevamento del DNA batterico durante la PCR, codifica per l'intimina (un'adesina). È una proteina attaching-effacing (A/E) che assieme ad altri fattori di virulenza è responsabile della diarrea enteropatogena ed enteroemorragica. Viene espressa sulla superficie cellulare batterica dove può legarsi al suo recettore Tir. Una volta all'interno del citoplasma della cellula ospite, Tir viene inserito nella membrana plasmatica, consentendo l'esposizione superficiale ed il legame con l'intimina.

3. *Listeria monocytogenes*

3.1 Caratteristiche microbiologiche

Listeria monocytogenes è un batterio appartenente alla famiglia delle *Listeriaceae*. Deve il suo nome al fatto che le infezioni da essa provocate sono caratterizzate da un elevato numero di grossi monociti nel circolo sanguigno. *Listeria* è un batterio Gram positivo ed è frequente trovarlo nelle acque, nel suolo e nella vegetazione. È inoltre un parassita a prevalente localizzazione intracellulare. Il consumo di cibo o mangime contaminato è la principale via di trasmissione per l'uomo e gli animali. L'eliminazione dei batteri avviene con cotture dei cibi a temperature superiori a 65°C. La *Listeria* tuttavia è in grado di tollerare ambienti salati e temperature basse (tra +2°C e 4°C) (EFSA, 2018).

3.2 Listeriosi

La listeriosi è una grave malattia invasiva che colpisce prevalentemente le donne in gravidanza, i neonati e i soggetti immunodeficienti (Swaminathan e Gerner-Smidt, 2007). Sono state descritte varie sindromi cliniche dovute a *Listeria monocytogenes*, come la sepsi, le infezioni al sistema nervoso centrale, endocarditi, gastroenteriti ed infezioni localizzate. I sintomi sono variabili e possono essere lievi come nausea, vomito e diarrea, o più gravi come la meningite. Come evidenziato da molteplici studi, risulta molto grave il contagio durante la gravidanza. L'infezione materna è spesso asintomatica, mentre l'infezione fetale, o neonatale, può portare ad una malattia invasiva o alla perdita del neonato con un tasso di mortalità del 25-35% (Charlier-Woerther e Lecuit, 2014). In più è stato riportato dai dati dei CDC (Centers for Disease Control and Prevention) americani come le donne in gravidanza siano 20 volte più suscettibili alla malattia. È stato inoltre evidenziato, come negli USA, le prevenzioni ed i continui sforzi normativi sugli alimenti a rischio abbiano portato ad un calo di listeriosi prenatale (Lamont *et al*, 2011). La *Listeria* può inoltre infettare animali domestici, come ovini e caprini, o renderli solamente portatori del batterio. L'Organizzazione mondiale della sanità consiglia, per prevenire la listeriosi, di seguire importanti norme di igiene e buone pratiche di fabbricazione (WHO). Considerata la resistenza di questo batterio, oltre agli elevati tassi di mortalità nell'uomo, la manipolazione sicura degli alimenti riveste un'importanza capitale per tutelare la salute pubblica.

3.3 Azione Tossica

Listeria monocytogenes è un parassita a prevalente localizzazione intracellulare. Agisce sul citoscheletro della cellula infettata inducendo una polimerizzazione dell'actina. La continua polimerizzazione dell'actina porta alla formazione di una "coda" di materiale fibroso. L'uso della

spinta di questa coda permette ai batteri di penetrare la membrana cellulare della cellula infettata (La Placa, 2014). L'azione sull'actina e la motilità intracellulare dipendono dalla proteina *ActA* che si attiva solo all'interno della cellula ospite. Nell'azione patogena intervengono inoltre dei lipidi di membrana in grado di provocare alterazioni al metabolismo dei carboidrati e delle proteine, come descritto nell'articolo di Joseph e Goebel del 2007. Un ulteriore gene, necessario per la produzione di listeriosina, quindi considerabile come fattore di virulenza, è *hlyA* (Jiang *et al.*, 1998). Quest'ultimo sarà la sequenza target che verrà ricercata durante il test di PCR Real Time.

4. Salmonella spp.

4.1 Caratteristiche e denominazioni

Il genere *Salmonella* appartiene alle *Enterobacteriaceae*. Nonostante la grande vastità di sierotipi si è deciso di arrivare alla definizione di sole due specie: *Salmonella enterica* con 2.443 sottospecie e *Salmonella bongori* (20). Entrambe si possono trovare sia negli animali domestici che selvatici come pollame, suini, bovini, roditori o animali di compagnia. L'uomo può essere portatore sano. La contaminazione può quindi avvenire per via oro-fecale, tra uomo e uomo, per ingestione di acqua o alimenti contaminati per il contatto tra uomo animale infetto. (WHO, La Placa, 2014).

4.2 Sindromi cliniche

Le Salmonelle causano principalmente due tipi fondamentali di malattie: la febbre tifoide e la gastroenterite acuta.

4.3 Febbre tifoide

La febbre tifoide, conosciuta anche come febbre enterica o tifo addominale, è causata da *Salmonella typhi*, un sierotipo di *Salmonella enterica*. L'uomo è l'unico vettore della malattia che, se non trattata, ha un tasso di mortalità superiore al 10%. Durante l'infezione i soggetti affetti da febbre tifoide trasportano i batteri nel sangue e nell'intestino. La maggior parte dei pazienti è contagiosa fino alla fine della prima settimana di convalescenza, ma il 10% degli individui non trattati disperde i batteri fino a tre mesi dopo la guarigione. Il 2-5% delle persone non trattate può anche diventare portatore cronico della malattia continuando a disperdere batteri. Dall'intestino e dal sangue i batteri passano poi nelle feci delle persone infette, permettendo la trasmissione dell'infezione ad altri individui. (Istituto Superiore della Sanità).

4.4 Gastroenterite acuta

Le gastroenteriti sono infezioni che riguardano la mucosa dello stomaco e dell'intestino. Sono molto comuni nei neonati e nei bambini al di sotto dei 5 anni (Istituto Superiore della Sanità). Una delle conseguenze più temute delle gastroenteriti è la disidratazione, la quale, se non viene contrastata da una reintegrazione adeguata dei liquidi persi, può avere conseguenze gravi per anziani, neonati e soggetti immunodeficienti. I disturbi più frequenti nelle gastroenteriti possono essere nausea, vomito e diarrea, tutti fattori che provocano la perdita di liquidi.

La trasmissione dell'infezione può avvenire per contatto diretto portando alla bocca le mani contaminate con i germi o, indirettamente, a seguito dell'ingestione di alimenti e/o acqua contaminati o attraverso l'uso di utensili o stoviglie non puliti.

5. Materiali e metodi

Le analisi sono state condotte nel laboratorio di microbiologia dell'ARPA Valle d'Aosta. Le varie matrici alimentari analizzate erano, per la maggior parte, campioni routinari, prelevati nell'ambito del PRIC (Piano Regionale Integrato dei Controlli), che ha come oggetto prevalentemente la sicurezza alimentare (previsto dall'articolo 41 del Reg. (CE) 882/2004). Alcuni campioni sono stati analizzati in quanto possibile causa di tossinfezioni alimentari.

L'attrezzatura utilizzata deve avere le caratteristiche di precisione indicate nella norma ISO7218:2007/Amd.1:2013 "*Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations*".

- Strumentazione utilizzata per l'analisi microbiologica colturale: bilancia tecnica, omogenizzatore peristaltico, sacchetti sterili con filtro, incubatore termostatico, bagno termostatico, vortex, agitatore magnetico, agitatore vibrante, cappa a flusso laminare, autoclave, pHmetro
- Strumentazione per la PCR: micropipette dotate di puntali con filtro (20µl, 100 µl e 1000 µl), microtubi DNA *free*, centrifuga, vortex, termociclatore dotato di lettore ottico con rilevatore di fluorescenza, blocco riscaldante, ceppi batterici certificati ATCC per i controlli positivi

5.1 Metodi colturali

I metodi colturali, utilizzati come metodi di riferimento, sono quelli indicati nell'Allegato I del Regolamento 2073/2005, sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari. Il laboratorio

ARPA VdA è accreditato per i metodi colturali utilizzati, in quanto svolge la sua attività nell'ambito del controllo ufficiale degli alimenti (PRIC Regione Valle d'Aosta). I metodi colturali delle specie batteriche in esame sono indicati nella tabella sottostante.

Procedura analitica	E. coli STEC	Salmonella ISO6579-1:2017	Listeria ISO 11290-1:2017
Primo arricchimento	Non applicabile in quanto il metodo di riferimento è quello molecolare ISO/TS 13136:2013	Pre-arricchimento in BPW (non selettivo), incubato a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ per 18 ± 2 ore	Arricchimento primario in Half Fraser broth incubato a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ per 25 ± 1 ore
Secondo arricchimento selettivo		Arricchimento in Rappaport Vassiliadis medium con soya (RVS broth) a $41.5 \pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ± 3 ore Muller-Kauffmann tetrathionate- novobiocin (MKTTn) broth incubato a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ± 3 ore	Arricchimento secondario in Fraser broth incubato a 37°C per 24 ± 2 ore
Isolamento e identificazione presuntiva delle colonie caratteristiche su terreno solido		Isolamento su due terreni selettivi e differenziali <ul style="list-style-type: none"> • XLD • HEA entrambi incubati a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ± 3 ore	Isolamento su due terreni selettivi e differenziali <ul style="list-style-type: none"> • Ottaviani Agosti (ALOA) • Agar Oxford Entambi incubati a 37°C per 48 ± 2 ore
Conferma e identificazione delle colonie caratteristiche isolate		Dopo la sottocoltura in NA, si procede con l'identificazione biochimica e sierologica.	Dopo la sottocoltura in TSYA, si procede con test di emolisi e caratterizzazione biochimica

Per la determinazione qualitativa mediante PCR Real Time, i kit utilizzati per le analisi sono:

- iQ-Check STEC VirX (*E.coli* STEC)
- iQ-Check STEC SerO (*E.coli* STEC)
- iQ-Check *Listeria monocytogenes* II (*Listeria monocytogenes*)
- iQ-Check *Salmonella* II (*Salmonella spp*)

Tutti i kit sono prodotti dalla Bio-Rad e validati dall'AFNOR. Questi kit comprendono anche i reattivi per l'estrazione di DNA dal campione.

5.2 Protocollo *Escherichia coli* STEC PCR Real Time

Per la rilevazione degli *E. coli* STEC si utilizza il metodo ISO/TS13136:2013. I reattivi sono compresi nel kit iQ-Check STEC VirX e nel kit iQ-Check SerO. Il principio del metodo consiste nell'effettuare uno screening della presenza dei geni *stx* ed *eae* nel campione, dopo un periodo di arricchimento di circa 20 ore, mediante l'uso del kit iQ-Check STEC VirX. Se i campioni risultano positivi per entrambi i geni sopraindicati, si effettua un secondo screening per la ricerca dei geni di sierogruppo utilizzando il kit iQ-Check STEC SerO (O157, O111, O26, O103 e O145). Per i campioni positivi allo screening dei geni *stx* ed *eae* si procede inoltre al reisolamento delle cellule caratteristiche e alla loro conferma colturale, tramite la ricerca nelle singole colonie dei geni di virulenza, rilevati nel precedente screening e all'identificazione biochimica e sierologica degli *E. coli* STEC.

Per la rilevazione degli STEC sono utilizzate delle PCR multiplex, composte da diverse sonde fluorescenti, specifiche per i differenti target: tali sonde sono rilevate nello strumento su diversi canali ottici in quanto marcate da fluorofori che emettono il segnale a diversa lunghezza d'onda. Nello screening dei geni di virulenza:

- FAM: rileva i geni *stx1/2*
- HEX: controllo interno di PCR
- Cy5: rileva il gene *eae*

Reagenti e reattivi

Il brodo di arricchimento utilizzato è il Buffered Peptone Water (BPW).

Nel kit sono presenti i reattivi:

- Reattivo A: reagente di lisi
- Reattivo B: contenente sonde fluorescenti
- Reattivo C: contenente la mix di amplificazione già preparata
- Reattivo D: controllo negativo di PCR
- Reattivo E: controllo positivo di PCR

Fase di arricchimento

Vengono pesati 25 g di ciascun campione in un sacchetto con filtro sterile, al quale è aggiunta una sospensione di 225 mL di BPW (Buffered Peptone Water). In seguito, tutto viene omogeneizzato meccanicamente, tramite omogeneizzatore peristaltico.

In ogni sessione analitica devono essere presenti due controlli di processo:

- Controllo positivo (225 mL di BPW + ceppo batterico inoculato)
- Controllo negativo (225 mL di BPW)

Estrazione

1. Incubare il brodo di arricchimento (21 ± 1 ore a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$)
2. Prelevare 100 μl del brodo di arricchimento e metterlo in un microtubo contenente 100 μl del tampone di lisi; mescolare con la micropipetta
3. Incubare nel blocco riscaldante a $95^{\circ}\text{C} - 100^{\circ}\text{C}$ per 15 minuti (lisi enzimatica ad alta temperatura).
4. Vortexare per qualche secondo, in seguito centrifugare a 12.000 g per 5 minuti.
5. Eseguire la PCR a partire da 5 μl del surnatante così ottenuto.

Reazioni di amplificazione

Per l'analisi è utilizzata una piastra multiwells da 96 pozzetti. Il volume totale di reazione corrisponde a 25 μl (20 μl di mix di reazione + 5 μl di DNA estratto) per ogni pozzetto della multiwells.

Il protocollo termico utilizzato è il seguente:

CICLI	STEP	TEMPO	TEMPERATURE
1	1	10 minuti	95°C → attivazione Taq
50	1	15 secondi	95°C → denaturazione
	2	30 secondi	58°C → annealing e rilevazione segnale ottico
	3	30 secondi	72°C → elongazione DNA

Analisi e interpretazione dati

I risultati sono visualizzati su un monitor secondo un modello di curve esponenziali. Il Ct (cycle threshold o ciclo soglia) è il numero di cicli necessario affinché il segnale di fluorescenza superi la threshold, ovvero il livello del background (rumore di fondo). Il Ct è inversamente proporzionale alla quantità di DNA presente nel campione.

Prima di poter effettuare l'interpretazione dei risultati analitici è necessario verificare i profili dei controlli positivi e negativi. Un processo analitico valido deve avere i seguenti risultati:

	FAM (stx1 e stx2)	Cy5 (eae)	HEX (controllo interno)
Controllo negativo di processo	Ct = N/A	Ct = N/A	$26 \leq Ct \leq 36$
Controllo positivo di processo	$Ct \geq 10$	$Ct \geq 10$	Non significativo
Controllo negativo PCR	Ct = N/A	Ct = N/A	$26 \leq Ct \leq 36$
Controllo positivo PCR	$26 \leq Ct \leq 36$	$26 \leq Ct \leq 36$	Non significativo

N/A = Non Applicabile (la fluorescenza del controllo non si distingue dal rumore di fondo e quindi non interseca la *threshold*). Nel caso i valori differiscano da quanto sopra indicato sarà necessario ripetere la reazione di PCR.

Lo schema per l'interpretazione dei risultati dello screening dei geni di virulenza è:

FAM	Cy5	HEX	Interpretazione
Ct ≥10	Ct ≥10	Non significativo	stx + eae +
Ct ≥10	Ct = N/A	Non significativo	stx + eae -
Ct = N/A	Ct ≥10	Non significativo	stx - eae+
Ct = N/A	Ct = N/A	Ct ≥26	stx - eae -
Ct = N/A	Ct = N/A	Ct = N/A	inibizione della reazione di PCR*

*Nel caso vi sia un'inibizione il campione dovrà essere testato ad una diluizione 1/10 in acqua deionizzata.

L'espressione dei risultati dello screening dei geni stx e eae è la seguente:

NEGATIVO a stx 1 e 2	Assenza di <i>E.coli</i> STEC in 25 g
POSITIVO a stx 1 e 2	Presenza presuntiva di <i>E.coli</i> STEC in 25 g
POSITIVO a stx 1 e 2 ed eae	Presenza presuntiva di STEC in grado di causare la lesione intestinale A/E in 25 g

Per ottenere un risultato definitivo (presenza e non solo presenza presuntiva di *E. coli* STEC) è necessario isolare i ceppi batterici vitali e procedere come sopraindicato.

5.3 Protocollo *Salmonella* spp PCR Real Time

Il kit utilizzato è l'iQ-Check *Salmonella* II. Il test si basa sull'amplificazione della sequenza *iagA* invasion associated gene (Liming, 2004) specifica per *Salmonella* spp.

Reagenti e reattivi

Il brodo di arricchimento utilizzato è il Buffered Peptone Water (BPW). I reattivi, pronti all'uso e inclusi nel kit sono:

- Reattivo A: reagente di lisi
- Reattivo B: contenente sonde fluorescenti
- Reattivo C: contenente la mix di amplificazione già preparata
- Reattivo D: controllo negativo di PCR

- Reattivo E: controllo positivo di PCR

Il kit iQ-Check *Salmonella* II è un test qualitativo che permette l'amplificazione ed il rilevamento di una sequenza di DNA di *Salmonella* grazie ad una sonda fluorescente. Il metodo prevede i seguenti passaggi consecutivi:

Fase di arricchimento

Questa fase è identica a quella descritta per *E. coli* STEC

Estrazione

Anche questa fase è identica a quella descritta per *E. coli* STEC.

Per questo motivo le fasi di arricchimento e di estrazione del DNA possono essere eseguite su un'unica porzione del campione (25g) per la determinazione di entrambi i patogeni, permettendo un risparmio di tempo e di materiale.

I reattivi in dotazione sono pronti all'uso. La quantità necessaria da prelevare per il numero di PCR è indicata nelle tabelle fornite insieme al kit, contando anche il controllo positivo e negativo.

Reazioni di amplificazione

Per l'analisi viene utilizzata una piastra multiwells da 96 pozzetti. Il volume totale di reazione corrisponde a 50 µl (45 µl di mix di reazione + 5 µl di DNA estratto) per ogni pozzetto della multiwells.

Il protocollo termico impostato è

CICLI	STEP	TEMPO	TEMPERATURE
1 50	1	10 minuti	95°C → attivazione Taq
	1	15 secondi	95°C → denaturazione
	2	30 secondi	58°C → annealing e rilevazione segnale ottico
	3	30 secondi	72°C → elongazione DNA

Come si può notare, il protocollo utilizzato è identico per *E. coli* STEC, *Salmonella* e anche per *Listeria monocytogenes*. Ciò permette di analizzare, nella stessa sessione analitica tutti e tre i patogeni contemporaneamente, cosa che consente un notevole risparmio temporale.

Analisi e interpretazione dei risultati

I risultati sono visualizzati su un monitor secondo un modello di curve esponenziali. Il Ct (cycle threshold o ciclo soglia) è il numero di cicli necessario affinché il segnale di fluorescenza superi la threshold, ovvero il livello del background. Il Ct è inversamente proporzionale alla quantità di DNA presente nel campione. Prima di poter effettuare l'interpretazione dei risultati è necessario verificare i risultati dei controlli positivi e negativi. L'analisi per risultare valida deve avere i seguenti risultati:

	FAM (<i>Salmonella spp</i>)	HEX (controllo interno)
Controllo negativo di processo	Ct = N/A	$28 \leq Ct \leq 40$
Controllo positivo di processo	$Ct \geq 10$	Non significativo
Controllo negativo di PCR	Ct = N/A	$28 \leq Ct \leq 40$
Controllo positivo di PCR	$26 \leq Ct \leq 36$	Non significativo

N/A = Non Applicabile (la fluorescenza del controllo non si distingue dal rumore di fondo e quindi non interseca la *threshold*). Nel caso i valori differiscano da quanto sopra indicato sarà necessario ripetere la reazione di PCR.

Lo schema per l'interpretazione dei risultati fornito dal kit è:

FAM (<i>Salmonella spp</i>)	HEX (controllo interno)	Interpretazione
$Ct \geq 10$	Non significativo	POSITIVO
Ct = N/A	$Ct \geq 28$	NEGATIVO
Ct = N/A	Ct = N/A	INIBIZIONE

Nel caso vi sia un'inibizione il campione dovrà essere testato ad una diluizione 1/10.

Se lo screening in PCR ha dato risultato negativo, l'analisi è conclusa e si può esprimere il risultato come “*Salmonella spp* assente in 25g”.

Se l'analisi colturale porta all'isolamento e identificazione di *Salmonella* si esprimerà il risultato come “*Salmonella spp* presente in 25 g”.

Se al contrario non si giunge all'isolamento e all'identificazione di *Salmonella* bisognerà esprimere il risultato come “*Salmonella spp* assente in 25g”.

5.4 Protocollo *Listeria monocytogenes* PCR Real Time

Si utilizza il kit iQ-Check *Listeria monocytogenes* II. La sequenza target ricercata è *hlyA*, un gene necessario per la produzione di listeriolisina.

Reagenti e reattivi

Il brodo di arricchimento utilizzato è l'Half Fraser. I reattivi pronti all'uso presenti nel kit sono:

- Reagente A: reagente di lisi
- Reagente B: contiene le sonde fluorescenti
- Reagente C: contiene la mix di amplificazione pronta all'uso
- Reagente D: controllo negativo di PCR
- Reagente E: controllo positivo di PCR
- Reagente F: biglie di lisi

A differenza dei kit per *E. coli* e *Salmonella*, è necessario avere un ulteriore ausilio, dato dalle microbiglie, per provocare la corretta lisi delle membrane cellulari dei fagociti di *Listeria monocytogenes* in quanto batterio intracellulare facoltativo.

Campionamento e fase di arricchimento

Vengono pesati 25 g di ciascun campione in un sacchetto con filtro sterile, al quale è aggiunta una sospensione di 225 mL di HF (Half Fraser broth). In seguito, viene tutto omogeneizzato meccanicamente, tramite omogeneizzatore peristaltico.

Sono inseriti, per ogni sessione analitica, due campioni controlli di processo:

- positivo (225 mL di Half Fraser + ceppo batterico inoculato)

- negativo (225 mL di Half Fraser)

Estrazione

1. Incubare il brodo di pre-arricchimento (25 ± 1 ore a $30^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$)
2. Prelevare 1500 μl del brodo di arricchimento e mettere in un tubo da microcentrifuga; centrifugare a 12.000 g per cinque minuti
3. Eliminare il surnatante, aggiungere 250 μl del reattivo di lisi, contenente le microbiglie e mescolare con la micropipetta
4. Agitare per 3 ± 1 minuti nell'agitatore vibrante (Cell Disruptor)
5. Incubare nel blocco riscaldante a $95^{\circ}\text{C} - 100^{\circ}\text{C}$ per 15 minuti
6. Vortexare ad alta velocità e centrifugare a 10.000-12.000 g per cinque minuti
7. Eseguire la PCR

Reazione di amplificazione

Eseguita come precedentemente indicato per Salmonella.

Analisi e interpretazione dei risultati

Eseguita come precedentemente indicato per Salmonella.

I reattivi in dotazione sono pronti all'uso, la quantità necessaria da prelevare per il numero di PCR si basa sulle tabelle fornite insieme al kit, contando anche il controllo positivo e negativo.

Se lo screening in PCR ha dato risultato negativo, l'analisi è conclusa e si può esprimere il risultato come "*Listeria monocytogenes* assente in 25g".

Se l'analisi colturale porta all'isolamento e identificazione di *Listeria monocytogenes* si esprimerà il risultato come "*Listeria monocytogenes* presente in 25 g".

Se al contrario non si giunge all'isolamento e all'identificazione di *Listeria monocytogenes* bisognerà esprimere il risultato come "*Listeria monocytogenes* assente in 25 g".

6. PCR Real Time

La PCR Real Time è una metodica che permette di amplificare e simultaneamente rilevare, ed eventualmente quantificare, il DNA. Questa tecnica consente di avere una lettura dei risultati in circa 2

ore escludendo la fase di arricchimento. Comparato alle PCR tradizionali, il test oltre a mantenere elevate caratteristiche di sensibilità, tipiche di una PCR classica, garantisce miglioramenti anche nella specificità. La tecnologia “Real Time” del DNA amplificato, permette quindi sia di ridurre il numero delle repliche necessarie alla determinazione di ogni campione, sia di abbandonare tutte le manipolazioni successive all'amplificazione, che rappresentano potenziali fonti di alterazione dei risultati. (Kesmen *et al*, 2009).

Con il procedere dei cicli di amplificazione la concentrazione degli amplificati aumenta, con conseguente incremento dell'emissione di fluorescenza. Il termociclatore della PCR Real Time, oltre ad avere funzione di mantenere il protocollo termico necessario per l'amplificazione del DNA, è associato ad un modulo rilevatore della fluorescenza che eccita, durante il processo, mediante lampade a tungsteno i fluorocromi presenti nei campioni facendo sì che venga emessa fluorescenza. Un software dedicato decodifica il segnale ottenuto, restituendolo, nel caso sia presente la sequenza target, sotto la forma della caratteristica curva di amplificazione esponenziale.

Il calcolo della quantità di DNA dei campioni incogniti viene effettuata determinando il ciclo della PCR (ciclo soglia, Ct) in cui viene raggiunto il valore soglia di fluorescenza del reporter che separa i segnali di amplificazione specifici da quelli del rumore di fondo del sistema.

Materiale necessario

La tecnica della PCR Real Time necessita, per il suo funzionamento, dei seguenti strumenti e reattivi:

- Un termociclatore
- Un lettore ottico con rilevatore di fluorescenza
- Software dedicato
- Monitor per la lettura dei dati
- Piastra multiwells e/o microtubi appositi per PCR
- Sequenza di DNA target
- DNA polimerasi termostabile
- Due primers oligonucleotidi (Forward e Reverse)
- dNTPs

- Sonde fluorescenti specifiche o fluorocromi
- Mix di reazione ottimizzata

Funzionamento

Basandosi sulla tecnica della PCR, la Real Time si avvale anch'essa di tre fasi:

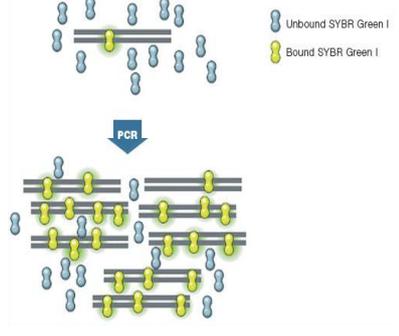
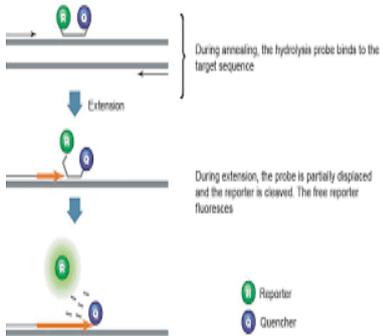
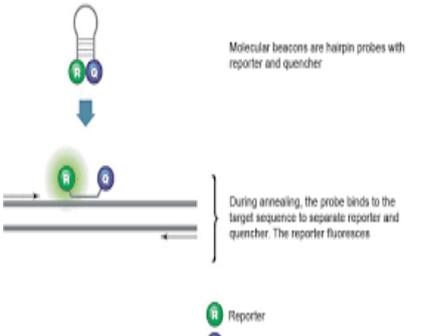
STEP	FASE	TEMPERATURA	AVVENIMENTO
1	DENATURAZIONE	94-96°C	La doppia elica di DNA si separa
2	ANNEALING	50-65°	I primers si legano alle sequenze target
3	AMPLIFICAZIONE	72°C	DNA pol. amplifica

Spesso la temperatura di denaturazione è mantenuta per più minuti affinché la polimerasi termostabile si possa attivare efficacemente. La rilevazione e quantificazione degli acidi nucleici avviene grazie alla fluorescenza emessa da diverse reazioni chimiche dovute alle sonde che interagiscono con il DNA.

Sonde principali

Le sonde possono effettuare reazioni chimiche intercalandosi al dsDNA o ibridandosi a quest'ultimo (la fluorescenza è quindi legata alle sonde). La tabella sottostante indica le principali sonde utilizzate nei saggi di PCR Real Time. Le immagini sono fornite nei kit della Bio Rad.

SYBR GREEN	TAQMAN	MOLECULAR BEACONS
<ul style="list-style-type: none"> • Metodica che si avvale sull'uso di una molecola fluorescente aspecifica che si lega al solco minore di tutte le molecole di dsDNA. • A seguito all'annealing dei primers, si legano poche molecole fluorescenti al solco minore della doppia elica. • Durante l'elongazione si verifica un aumento di 	<ul style="list-style-type: none"> • Oligonucleotide che, come i primers della PCR, viene disegnato affinché sia complementare alle sequenze bersaglio da amplificare. • Il fluoroforo (R) è silente, ovvero non emette a causa di una molecola silenziatrice Quencher (Q) posta vicino ad essa. • Durante la fase di elongazione, la polimerasi con la sua attività esonucleasica incontra la sonda, la degrada provocando il distacco della Quencher. 	<ul style="list-style-type: none"> • I saggi impiegano delle sequenze oligonucleotidiche specifiche marcate in maniera fluorescente (25-40 nt) con una orma a forcina. • All'estremità 5' è posto il fluorocromo mentre la molecola silenziatrice Quencher è posta al 3'. • Quando la molecola si trova nella sua struttura a forcina, non viene rilevata fluorescenza

<p>fluorescenza che corrisponde all'aumento del numero di copie dell'amplicone.</p> <ul style="list-style-type: none"> La PCR deve essere seguita da una analisi della curva di Melting per rilevare la specificità della reazione di amplificazione Facendo uso di questa chimica di reazione, il protocollo termico è suddiviso in due step in quanto l'annealing ed elongazione avvengono alla stessa temperatura. 	<ul style="list-style-type: none"> Si avrà quindi emissione di fluorescenza. 	<p>a causa della sua vicinanza fisica al Quencher.</p> <ul style="list-style-type: none"> Durante la fase di annealing, il fluorocromo si lega alla sua sequenza bersaglio separandosi dal Quencher, Emissione segnale fluorescente
		

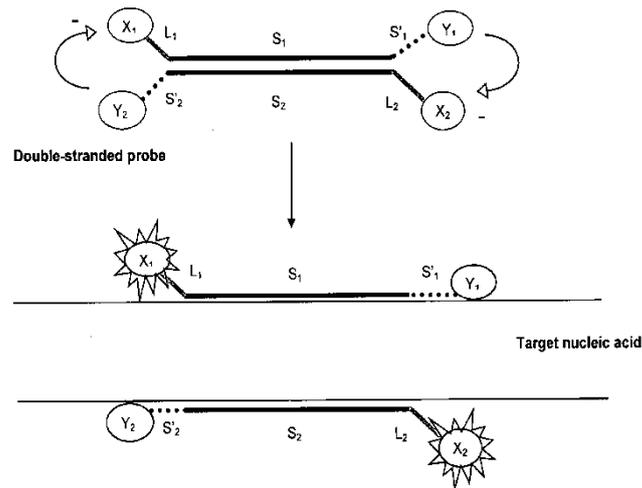
Double Strands

Tutti i kit utilizzati per le analisi in questa tesi presentano invece sonde Double Strands. Precedentemente si avevano sonde Molecular Beacons, questo cambiamento ha consentito un migliore rapporto del segnale/rumore (Dagland, Rieunier, 2008).

Questo tipo di chimica si avvale di una sonda nucleotidica a doppio filamento destinata al rilevamento, e quindi all'emissione di fluorescenza, di un singolo o di un doppio filamento di sequenza target. Come mostrato in figura (Dagland, Rieunier, 2008), la sonda è costituita da due filamenti complementari:

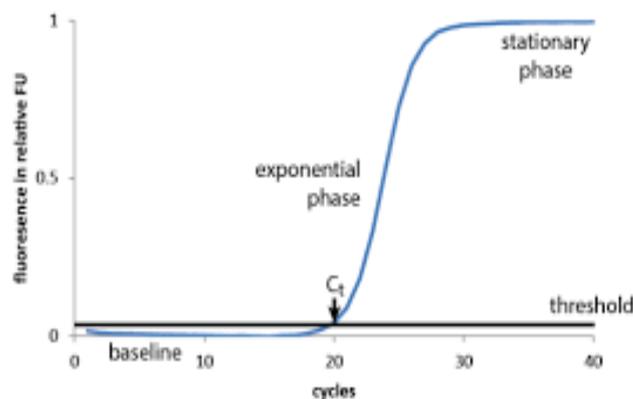
- $X1 - (L1) a-S1-S'1 - (L'1) b-Y1$ destinato a rilevare, a seguito della fase di denaturazione degli acidi nucleici e della sonda stessa, la prima elica di DNA target;
- $X2 - (L2) c-S2-S'2 - (L'2) d-Y2$ destinato a legarsi con la seconda elica denaturata del DNA target.

Le sequenze X1 e X2 saranno i fluorocromi donatori, che emetteranno fluorescenza a seguito dell'appaiamento della sonda.



Curve e grafici

Nell'immagine sottostante è mostrato il grafico di una PCR Real Time. Il numero dei cicli effettuati è mostrato sull'asse delle ascisse. La fluorescenza durante la reazione di amplificazione, proporzionale alla quantità di prodotto amplificato, è mostrata sull'asse delle ordinate. Il diagramma di amplificazione mostra due fasi, una fase esponenziale seguita da una fase di plateau. Durante la fase esponenziale, la quantità di prodotto raddoppia approssimativamente in ciascun ciclo. Mentre la reazione procede, tuttavia, i componenti di reazione vengono consumati e alla fine uno o più dei componenti diventano limitanti. A questo punto, la reazione rallenta ed entra nella fase stazionaria di plateau. Il numero di ciclo in cui si verifica la rilevazione della fluorescenza è chiamato ciclo soglia o Ct. Il Ct di una reazione è determinato principalmente dalla quantità di DNA presente all'inizio della reazione di amplificazione. Se è presente una grande quantità saranno necessari pochi cicli di amplificazione affinché venga rilevato. Di conseguenza il Ct verrà individuato relativamente presto. Al contrario, se ci sarà una piccola quantità di DNA all'inizio della reazione, saranno necessari più cicli di amplificazione.



Flusso analitico

Le diverse fasi analitiche devono avvenire in spazi separati, in modo che l'operatore segua un flusso unidirezionale di lavoro, con diverse procedure atte ad evitare contaminazioni crociate, quali l'utilizzo di guanti monouso, l'uso di pipette apposite, puntali con filtro e l'uso di indumenti dedicati.

Il laboratorio deve avere:

- Una stanza sterile in cui arrivano i campioni
- Una stanza per l'estrazione del DNA (bancone per isolamenti e cappa a flusso laminare)
- Una stanza per la PCR (amplificazione acido nucleico)
- Una stanza per la rilevazione del frammento target amplificato

Per PCR RT è un unico

In alternativa possono essere individuate aree di lavoro separate spazialmente e/o temporalmente.

I campioni con il DNA estratto dovranno essere posti in appositi microtubi o piastre multiwells, seguendo le istruzioni del kit in dotazione.

Per ogni sessione analitica è necessario inserire:

- Un controllo positivo di processo
- Un controllo negativo di processo

Questi controlli serviranno a dare indicazione all'operatore su eventuali errori o contaminazioni durante l'estrazione. Dovranno inoltre essere presenti:

- Un controllo positivo di PCR
- Un controllo negativo di PCR

Questi indicheranno se il processo di amplificazione è avvenuto correttamente.

Infine, devono essere compresi dei controlli interni per monitorare eventuali inibizioni della reazione di PCR. I controlli interni sono costituiti da DNA sintetico, incluso nella mix di reazione, che è amplificato insieme al DNA target, ma tramite una sonda collegata ad un altro fluoroforo, che emette fluorescenza ad una diversa lunghezza d'onda rispetto al target.

7. Risultati

Di seguito vengono riportati, suddivisi per parametro microbiologico ricercato, i risultati analitici ottenuti dai campioni analizzati.

Salmonella spp

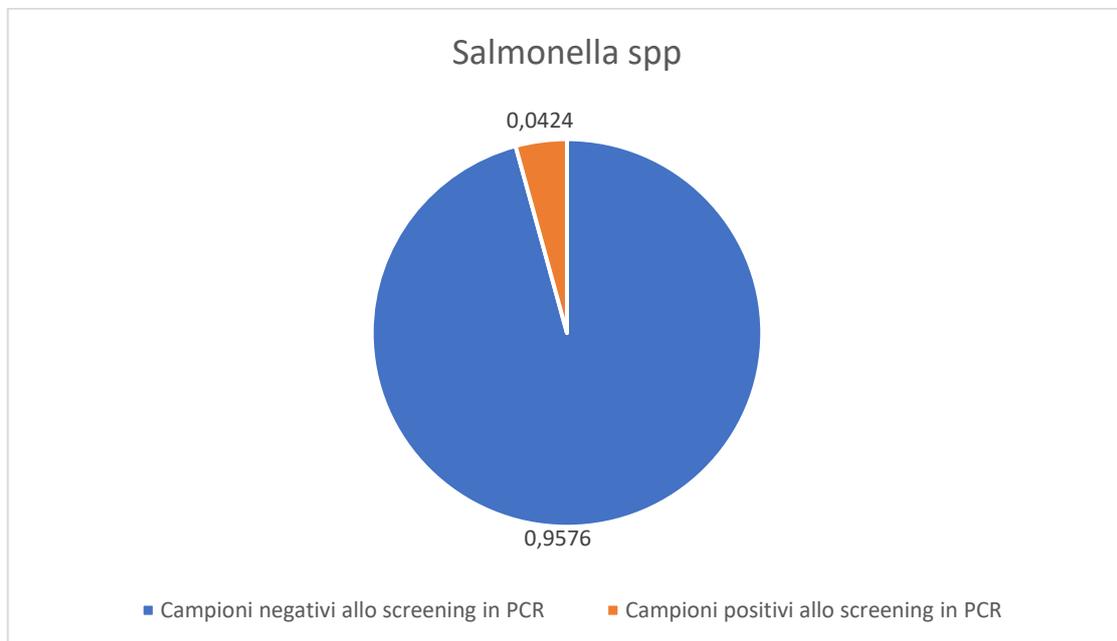
	Tipo di alimento	N° campioni	N° unità campionarie	Totale determinazioni	Risultato PCR	Conferma culturale	Risultato finale
Prodotti a base di uova	Creme caramel	1	5	5	Negativo		Assente in 25g
	Crostata	2	5	10	Negativo		Assente in 25g
	Bignè alla crema	2	5	10	Negativo		Assente in 25g
Alimenti a base di uova crude	Tiramisù	4	5	20	Negativo		Assente in 25g
	Salsa tonnata	1	5	5	Negativo		Assente in 25g
	Semifreddo al pane nero	1	5	5	Positivo	Positivo	Presente in 25g
Gelato	Gelato sfuso gusto crema	2	5	10	Negativo		Assente in 25g
	Gelato sfuso gusto viola	1	5	5	Negativo		Assente in 25g
	Gelato sfuso gusto fiordilatte	1	5	5	Negativo		Assente in 25g

	Gelato sfuso gusto vaniglia	1	5	5	Negativo		Assente in 25g
Frutta e ortaggi pretagliati	Ananas in pezzi	1	5	5	Negativo		Assente in 25g
	Insalata fantasia	1	5	5	Negativo		Assente in 25g
	Misto crauti	1	5	5	Negativo		Assente in 25g
	Insalata mista	1	5	5	Negativo		Assente in 25g
	Lamponi	1	5	5	Negativo		Assente in 25g
	Latte scremato in polvere	1	5	5	Negativo		Assente in 25g
	Arrosto di maiale	1	1	1	Negativo		Assente in 25g
	Timballo di cavolfiori	1	1	1	Negativo		Assente in 25g
	Involentino di coniglio	1	1	1	Negativo		Assente in 25g
	Ragù di cinghiale	1	1	1	Negativo		Assente in 25g
	Tiramisù	1	1	1	Negativo		Assente in 25g
	Ragù di carne	1	1	1	Negativo		Assente in 25g

	Coscia d'anatra	1	1	1	Negativo		Assente in 25g
	Ragù di capriolo	1	1	1	Negativo		Assente in 25g

- Totale determinazioni → 118
- Totale campioni negativi allo screening in PCR → 113
- Totale campioni positivi allo screening in PCR → 5

Campioni negativi allo screening in PCR	Campioni positivi allo screening in PCR
95,76 %	4,24 %



Listeria monocytogenes

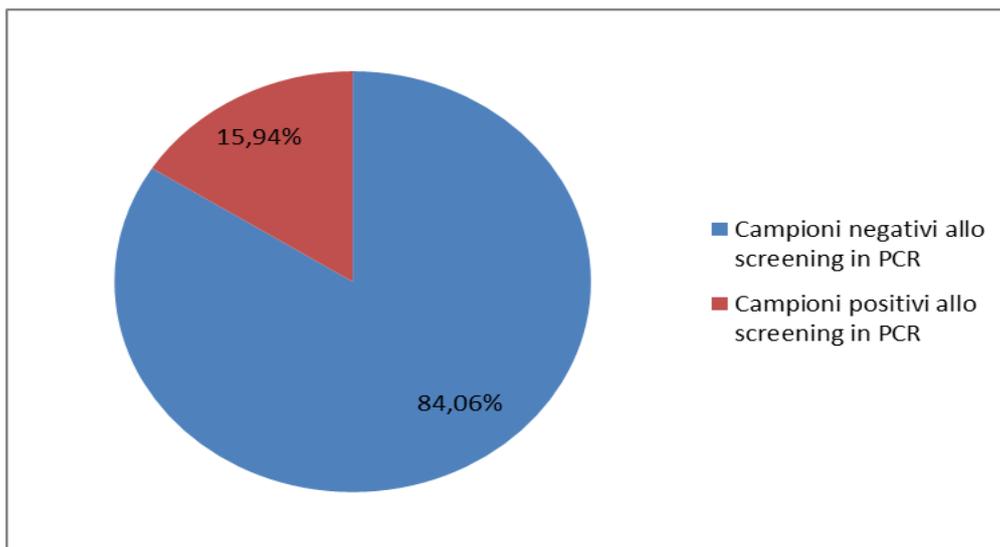
	Tipo di alimento	N° campioni	N° unità campionarie	Totale determinazioni	Risultato PCR	Conferma colturale	Risultato finale
Prodotti che non consentono crescita di Listeria	Creme caramél	1	5	5	Negativo		Assente in 25g
	Crostata	2	5	10	1 Positivo 9 Negativi	Negativo	Assente in 25g
	Bignè alla crema	2	5	10	6 Positivi 4 Negativi	Negativo	Assente in 25g
Alimenti che non consentono crescita di Listeria	Tiramisù	1	5	5	Negativo		Assente in 25g
	Gelato sfuso gusto crema	1	5	5	Negativo		Assente in 25g
	Gelato sfuso gusto viola	1	5	5	Negativo		Assente in 25g
	Gelato sfuso gusto fiordilatte	1	5	5	Negativo		Assente in 25g
	Gelato al latte	1	5	5	Negativo		Assente in 25g
	Gelato al caffè	1	5	5	Negativo		Assente in 25g
	Gelato sfuso gusto vaniglia	1	5	5	Negativo		Assente in 25g
	Ragù di soia	1	5	5	Negativo		Assente in 25g
	Ragù alla bolognese	1	5	5	Negativo		Assente in 25g
	Ragù	1	5	5	Negativo		Assente in 25g
	Salsiccia al sugo	1	5	5	Negativo		Assente in 25g

	Carbonada	1	5	5	Negativo		Assente in 25g
	Riso cotto	1	5	5	Negativo		Assente in 25g
	Insalata russa	1	5	5	Negativo		Assente in 25g
	Ragù	1	5	5	Negativo		Assente in 25g
	Ragù di agnello	1	5	5	Negativo		Assente in 25g
	Arrosto di maiale	1	1	1	Negativo		Assente in 25g
	Timballo di cavolfiori	1	1	1	Negativo		Assente in 25g
	Involtini di coniglio	1	1	1	Negativo		Assente in 25g
	Ragù di cinghiale	1	1	1	Negativo		Assente in 25g
	Tiramisù	1	1	1	Negativo		Assente in 25g
	Ragù di carne	1	1	1	Negativo		Assente in 25g
	Coscia d'anatra	1	1	1	Negativo		Assente in 25g
	Ragù di capriolo	1	1	1	Negativo		Assente in 25g
Alimenti pronti al consumo	Ananas in pezzi	1	5	5	Negativo		Assente in 25g
	Insalata fantasia	1	5	5	Negativo		Assente in 25g
	Misto crauti	1	5	5	5 Positivi	Negativo	Assente in 25g
	Insalata mista	1	5	5	5 Positivi	Negativo	Assente in 25g

	Lamponi	1	5	5	5 Positivi	Negativo	Assente in 25g
--	---------	---	---	---	------------	----------	-------------------

- Totale determinazioni → 138
- Totale campioni negativi allo screening in PCR → 116
- Totale campioni positivi allo screening in PCR → 22

Campioni negativi allo screening in PCR	Campioni positivi allo screening in PCR
84,06 %	15,94 %



E. coli STEC

Categoria alimentare	N° campioni	N° unità campionarie	Totale determinazioni	Risultato PCR	Conferma colturale	Risultato finale
Semi germogliati	1	5	5	Negativo		Assente in 25g
Germogli	1	5	5	Negativo		Assente in 25g
Germogli bonduelle	1	5	5	Negativo		Assente in 25g

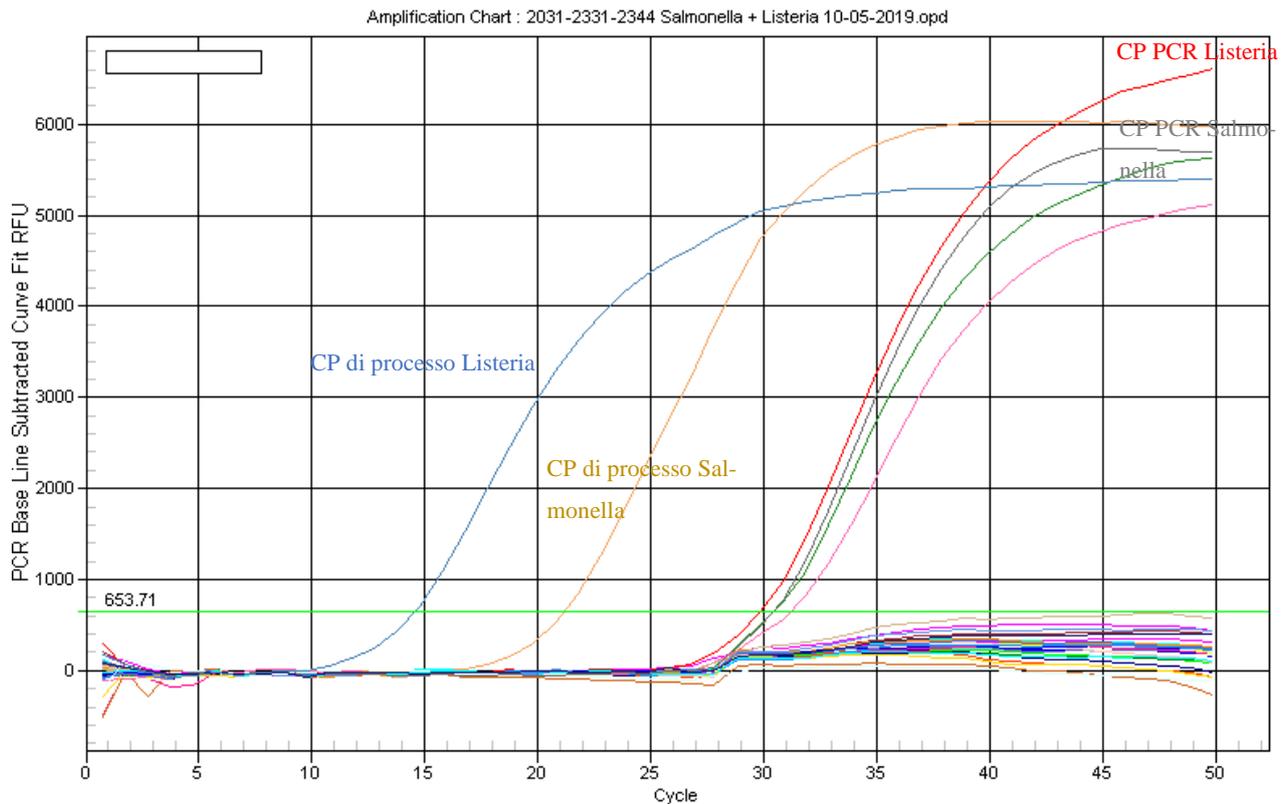
Totale campioni negativi allo screening in PCR → 15

Totale campioni positivi allo screening in PCR → 0

Curve ottenute in PCR Real Time

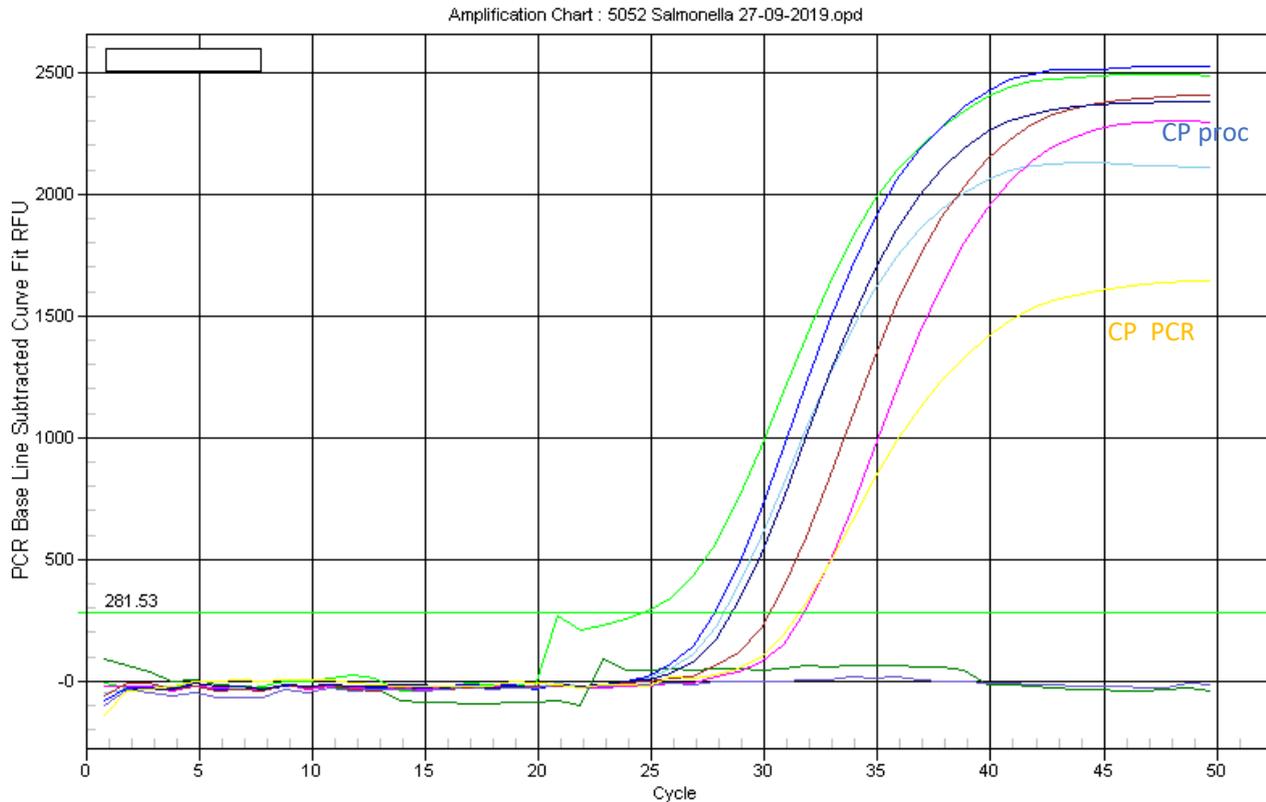
Nello spazio sottostante sono riportate alcune curve dei campioni risultati positivi allo screening di PCR.

Bigné alla crema (*Listeria* e *Salmonella*)



Il controllo in questione è stato effettuato su *Salmonella* e *Listeria*. In blu ed arancione sono rappresentati i controlli positivi di processo rispettivamente di *Listeria* ($Ct = 14,56$), e *Salmonella* ($Ct = 21,16$) in rosso e grigio i due controlli positivi di PCR. Le due curve verde e rosa rappresentano i 2 campioni risultati positivi per *Listeria* ($Ct = 30,38$ e $31,22$). Tutte le altre curve al di sotto della *threshold* sono i campioni, oltre ai controlli di PCR e di processo, di *Salmonella* e *Listeria* risultati negativi, che quindi non hanno emesso fluorescenza distinguibile dal rumore di fondo.

Semifreddo al pane nero (*Salmonella*)



La curva di amplificazione in figura rappresenta la presenza di *Salmonella* in tutte le unità campionarie (5). I campioni hanno una Ct pari a: [28,18]; [24,57]; [27,78]; [31,76]; e [30,23]. I campioni positivi di PCR (Ct = 31,54) e di processo (Ct = 28,56) si trovano regolarmente al di sopra della *threshold*, così come i controlli negativi si trovano al di sotto. L'esito positivo dello screening di PCR Real Time è stato confermato dall'analisi colturale.

Confronto tempi di risposta tra metodo PCR Real Time e metodo colturale

Nelle seguenti tabelle sono riportati i tempi analitici del metodo in PCR e dei metodi colturali, con lo scopo di raffrontare le due metodiche in termini di velocità di risposta.

Metodo PCR Real Time	Metodo colturale
Salmonella spp	
Incubazione del brodo di pre-arricchimento (21 ± 1 ore)	Pre arricchimento (18 ± 2 ore)
Estrazione del DNA (circa 30 minuti)	Arricchimento (24 ± 3 ore)
Preparazione master mix e amplificazione (circa 2 ore)	Isolamento 24 ± 3 ore)
Lettura risultato (circa 15 minuti)	Re isolamento colonie sospette (24 ± 3 ore)
	Identificazione biochimica e sierologica (24 ± 3 ore)
TOTALE → Circa 1 giorno	TOTALE → da 4 a 6 giorni
Listeria monocytogenes	
Arricchimento (25 ± 1 ore)	Primo arricchimento 24 ± 3 ore
Estrazione del DNA (circa 45 minuti)	Secondo arricchimento (48 ± 3 ore)
Preparazione master mix e amplificazione (circa 2 ore)	Isolamento (24-48 ± 3 ore)
Lettura risultato (circa 15 minuti)	Re isolamento colonie sospette 24 ± 3 ore
	Identificazione biochimica 24 ± 2 ore
TOTALE → Circa 1 giorno	TOTALE → da 3 a 5 giorni o 8 giorni
E. coli STEC	
Arricchimento (8-24 ore)	Non applicabile in quanto il metodo di riferimento è quello molecolare ISO/TS 13136:2013
Estrazione del DNA (circa 30 minuti)	
Preparazione maaster mix e amplificazione circa 2 ore).	
Lettura risultato (circa 15 minuti)	
TOTALE → circa 1 giorno	NON APPLICABILE

8. Conclusioni

Per commentare i risultati ottenuti secondo lo scopo di partenza è necessario definire i concetti di accuratezza, sensibilità e specificità delle colture batteriche basandosi sull'ISO 16140-2 e l'ISO 13843.

- Accuratezza → l'accuratezza della misura è la concordanza tra un valore misurato ed un valore di quantità assegnato.
- Sensibilità → è il frazionamento del numero totale di colture/colonie positive assegnate correttamente nel controllo presuntivo
- Specificità → è il frazionamento del numero totale di colture/colonie negative assegnate correttamente nel controllo presuntivo

Salmonella spp

Il metodo di ricerca di *Salmonella* spp mediante iQ-Check *Salmonella* II utilizzato in questa tesi, è stato validato dall'AFNOR. I dati di validazione primaria sono riportati nel "Rapport de synthèse" (AFNOR BRD 07/06 – 07/04). Questa validazione utilizza come riferimento i metodi colturali ISO 6579 e U47-100. Le analisi effettuate nella tesi si basano sul *protocole simplifié* I. Un'ulteriore validazione secondaria del metodo è stata effettuata dall'ARPA VdA.

Secondo la validazione AFNOR il kit ha i seguenti risultati:

- Accuratezza relativa: **98,9 %**
- Sensibilità relativa: **97,5 %**
- Specificità relativa: **100,0 %**

A seguito della validazione dell'ARPA VdA si avranno i seguenti dati:

- Accuratezza relativa: **98,8 %**
- Sensibilità relativa: **98,4 %**
- Specificità relativa: **100,0 %**

È importante che la specificità sia ai livelli massimi in quanto è usata come screening essenziale. Per la rilevazione di *Salmonella* spp solamente un campione (semifreddo al pane nero), tra le analisi effettuate, è risultato positivo allo screening di PCR. Tale campione, appartenente alla categoria

alimentare “alimenti pronti contenenti uova crude”, è stato prelevato nell’ambito di un’indagine effettuata in seguito ad una tossinfezione alimentare. Il risultato dello screening è stato confermato dall’esito dell’esame colturale, che si è ottenuto ben quattro giorni dopo.

Listeria monocytogenes

Il metodo di ricerca di *Listeria monocytogenes* mediante iQ-Check *Listeria monocytogenes* utilizzato in questa tesi, è stato validato dall’AFNOR. I dati di validazione primaria sono riportati nel “Rapport de synthèse” (AFNOR BRD 07/10-04/05). Questa validazione usa come metodo colturale di riferimento ISO 11290-1/A1. Le analisi effettuate in questa tesi si basano sul protocollo standard con l’uso di Half Fraser. Un’ulteriore validazione secondaria del protocollo viene effettuata dell’ARPA VdA.

Secondo la validazione AFNOR il kit ha i seguenti risultati:

- Accuratezza relativa: **98,3 %**
- Sensibilità relativa: **97,5 %**
- Specificità relativa: **98,9 %**

A seguito della validazione dell’ARPA VdA si avranno i seguenti dati:

- Accuratezza relativa: **97,7 %**
- Sensibilità relativa: **96,7 %**
- Specificità relativa: **100,0 %**

Nelle analisi effettuate in questa tesi i campioni risultati positivi allo screening in PCR sono 22 su 138. A seguito della conferma colturale sono stati accertati come falsi positivi. In confronto agli altri due batteri, *Listeria* risulta avere un alto numero di campioni positivi in PCR. Questo dato può essere spiegato da diversi fattori, quale il fatto che *Listeria monocytogenes*, diversamente da *Salmonella* ed *E. coli* STEC è un batterio che, sopravvivendo ad habitat estremi, può essere rilevato in bassissima carica, sotto, il limite di determinazione del metodo colturale, più frequentemente rispetto ai primi due. Inoltre, la Real Time PCR è anche in grado di rilevare il materiale genetico di cellule non vitali, di conseguenza è possibile fossero presenti frammenti di acidi nucleici, provenienti da microrganismo morti, nel campione; tuttavia a seguito dell’analisi colturale si ha avuto la conferma negativa.

Un'ulteriore interpretazione può essere data dal kit, che è più carente in termini di specificità rispetto a quelli per gli altri microrganismi. Infine, la curva di PCR presentava per alcuni campioni, un andamento insolito, non permettendo una conseguente interpretazione chiara del risultato. Si è quindi deciso, trattandosi di campioni ufficiali, di cautelarsi svolgendo l'analisi colturale per avere conferma dei risultati.

E. coli STEC

La validazione dei kit iQ-Check STEC VirX e SerO è stata approvata dall' AOAC.

La seconda validazione da parte dell'ARPA VdA ha portato ad avere i seguenti dati:

- Sensibilità relativa screening geni di virulenza (stx1/stx2 e eae):100%
- Sensibilità relativa screening geni di sierogruppo 100%
- Sensibilità relativa risultato finale (isolamento e identificazione): 100%
- Specificità relativa screening geni di virulenza (stx1/stx2 e eae): 100%
- Specificità relativa screening geni di sierogruppo 100%
- Specificità relativa risultato finale (isolamento e identificazione): 100%
- Accuratezza relativa screening geni di virulenza (stx1/stx2 e eae): 100%
- Accuratezza relativa screening geni di sierogruppo: 100%
- Accuratezza relativa risultato finale (isolamento e identificazione): 100%

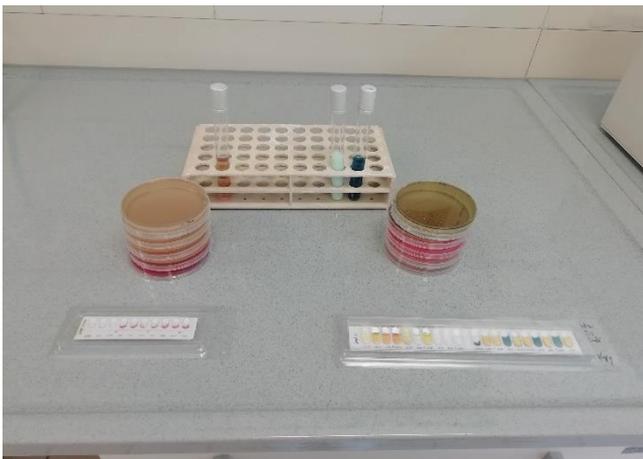
Le analisi su *E. coli* STEC hanno riguardato meno campioni ma nessuno di questi ha richiesto una conferma colturale e una conseguente rilevazione del sierogruppo mediante iQ-Check STEC SerO. Le matrici analizzate sono stati unicamente germogli.

Confronto tra le tempistiche di risposta e quantità di materiale utilizzati

Per il confronto tra i metodi molecolari in PCR Real Time con le tecniche colturali classiche:

	Salmonella	Listeria
PCR Real Time	Circa 24 h	Circa 24 h
Metodo colturale	Da 96 a 144 h	Da 72 a 192 h

Si nota quindi come l'utilizzo della metodica della PCR Real Time permetta un grande abbattimento dei tempi di analisi. Inoltre, è possibile notare come le tre specie batteriche posseggano lo stesso protocollo termico, di conseguenza sarà possibile effettuare una sola PCR per la ricerca contemporanea di tutti i parametri stabiliti. Nonostante ciò, la metodica di riferimento è la colturale, dunque, nel caso vi siano campioni che risultino positivi nello screening di PCR, sarà necessario re isolare i ceppi dei campioni positivi per poter avere un risultato definitivo. Come inoltre si evince dalle foto sotto riportate, anche dal punto di vista del consumo dei materiali la metodica in PCR comporta un notevole risparmio.



Materiale usato per il metodo colturale



Materiale usato per analisi di PCR Real Time

Bibliografia

AFNOR (Association Française de Normalisation) BRD 07/06-07/04

AFNOR (Association Française de Normalisation) BRD 07/10-04/05

CDC (Centers for Diseases Control and Prevention), "Listeria (Listeriosis)" (2019).

Charlier-Woerther C, Lecuit M. [Listeriosis and pregnancy]. *Presse Med.* 2014 Jun;43(6 Pt 1):676-82. doi: 10.1016/j.lpm.2014.03.006

Dagland T., Rieunier F. "Double-Stranded probes for the fluorescent detection of nucleic acids" *WIPO* (2008).

EFSA (European Food Safety Authority), "Listeria" (2018).

EFSA (European Food Safety Authority), "Tossinfezioni alimentari" (2019).

European Food Safety Authority. "The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017" *EFSA Journal* (2018).

ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control), "Tossinfezioni alimentari" (2019).

FAO/WHO STEC EXPERT GROUP. Hazard Identification and Characterization: Criteria for Categorizing Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* on a Risk Basis(†). *J Food Prot.* 2019 Jan;82(1):7-21. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-18-291

Istituto Superiore della Sanità, "Tossinfezioni alimentari" (2019).

Jiang Y, Lei Z, Li J. [Identification of *Listeria monocytogenes* by PCR method]. *Zhonghua Yu Fang Yi Xue Za Zhi.* 1998 Jan;32(1):19-21

Joseph B, Goebel W. Life of *Listeria monocytogenes* in the host cells' cytosol. *Microbes Infect.* 2007 Aug;9(10):1188-95

Kesmen Z, Gulluce A, Sahin F, Yetim H. Identification of meat species by TaqMan-based real-time PCR assay. *Meat Sci.* 2009 Aug;82(4):444-9. doi: 10.1016/j.meatsci.2009.02.019

La Placa, "Principi di microbiologia medica" (2014).

Lamont RF, Sobel J, Mazaki-Tovi S, Kusanovic JP, Vaisbuch E, Kim SK, Ulbjerg N, Romero R. Listeriosis in human pregnancy: a systematic review. *J Perinat Med.* 2011 May;39(3):227-36. doi: 10.1515/JPM.2011.035

Liming SH, Bhagwat AA. Application of a molecular beacon-real-time PCR technology to detect *Salmonella* species contaminating fruits and vegetables. *Int J Food Microbiol.* 2004 Sep 1;95(2):177-87

Melton-Celsa AR. Shiga Toxin (Stx) Classification, Structure, and Function. *Microbiol Spectr.* 2014 Aug;2(4): EHEC-0024-2013. doi: 10.1128/microbiolspec.EHEC-0024-2013

Swaminathan B, Gerner-Smidt P. The epidemiology of human listeriosis. *Microbes Infect.* 2007 Aug;9(10):1236-43

Tarr PI, Gordon CA, Chandler WL. Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* and haemolytic uraemic syndrome. *Lancet.* 2005 Mar 19-25;365(9464):1073-86

Tozzi AE, Caprioli A, Minelli F, Gianviti A, De Petris L, Edefonti A, Montini G, Ferretti A, De Palo T, Gaido M, Rizzoni G; Hemolytic Uremic Syndrome Study Group. Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infections associated with

hemolytic uremic syndrome, Italy, 1988-2000. *Emerg Infect Dis.* 2003

Jan;9(1):106-8

Regolamento (CE) N. 178/2002 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 28 gennaio 2002 che stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare.

Regolamento (CE) N. 882/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 relativo ai controlli ufficiali intesi a verificare la conformità alla normativa in materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali.

Regolamento (CE) N. 2073/2005 della Commissione europea del 15 novembre 2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari.

UNI EN ISO 11290-1:2005 “Microbiologia degli alimenti e mangimi per animali. Metodo orizzontale per la ricerca di *Listeria monocytogenes*”.

UNI EN ISO 6579:2008 “Microbiologia degli alimenti e mangimi per animali. Metodo orizzontale per la ricerca di *Salmonella* spp”

UNI EN ISO 7218:2007/Amd.1:2013 “Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations”

UNI EN ISO/TS 13843:2000 “Water quality - Guidance on validation microbiological methods”

UNI EN ISO 16140:2003 “Microbiology of food and animal feeding stuffs – Protocol for the validation of alternative methods”

UNI EN ISO/TS 13136:2013 “Microbiology of food and animal feed -- Real-time polymerase chain reaction (PCR)-based method for the detection of food-borne pathogens -- Horizontal method for the detection of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and the determination of O157, O111, O26, O103 and O145 serogroups”

WHO (World Health Organization), “*Salmonella*” (2018).

WHO (World Health Organization), “*Salmonella* (non-typhoidal)” (2018).

WHO (World Health Organization), “*Listeriosis*” (2018).

WHO (World Health Organization), “Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) and food: attribution, characterization, and monitoring: report” (2018).

Ringraziamenti

Vorrei innanzitutto ringraziare i miei genitori, mia madre Marie Rose e mio padre Bernardino, per avermi sempre sostenuto, psicologicamente ed economicamente, nel mio percorso di studi che ha portato a questo piccolo traguardo.

Grazie a mio fratello Francesco, per avermi permesso di tornare “bambino” assieme a lui, nonostante ci siano più scaramucce che abbracci.

Un grazie ai miei “fratelli” Federico (l’hai vinto tu il fanta), Luca, Nicholas ed Emanuele, per chi da tutta la vita, chi da più tempo e chi da meno sopporta ogni mio cambiamento emotivo e mi permette di vivere sempre con il sorriso condividendo ogni momento speciale in vostra compagnia. Senza di voi non sarei mai arrivato al conseguimento di questo risultato.

Grazie a Valentina per essere più una sorella/amica che una cugina, ed un grazie a mia zia Isabella per essersi presa cura di me per gran parte della vita, insegnandomi che le difficoltà ci saranno sempre, l’importante è alzare la testa e saperle affrontare.

Ringrazio il mio coinquilino Marco, per le serate tra sushi e panini pur di non accendere i fornelli e sporcare le padelle.

Grazie ad Arianna per capirmi e sostenermi nei momenti difficili, ed accendermi il cervello nei momenti di svago. Grazie a lei ho avuto il coraggio di sperimentare nuove idee, di mettermi in gioco e di guardare da un'altra prospettiva le cose.

Ringrazio sentitamente la famiglia Albani e Berti per aver reso disponibili i loro testi (o mattoni) per il mio percorso di studi.

Un grazie a tutti i membri del laboratorio di Microbiologia e Biologia dell’ARPA per avermi accettato come tesista, ed aver avuto la pazienza e la disponibilità nello spiegarmi i metodi di lavoro utili per questo elaborato.

Ringrazio tutti i miei parenti più cari: mia nonna Tita, in particolare per i pasti energetici pre-studio, ed i miei zii Mario, Michel e Marino per i valori insegnatomi.

Infine, una menzione particolare va a Francesca M. Borney, la mia tutor aziendale all’ARPA Valle d’Aosta, per avere avuto la dedizione, il tempo e la volontà nell’aiutarmi alla stesura di questo elaborato. Probabilmente senza i suoi preziosi consigli starei ancora “vagando” su Pub Med interrogandomi sul come iniziare lo svolgimento della tesi.