

Università degli Studi di Torino

Scuola di Specializzazione in Microbiologia e Virologia

Ricerca di *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *E.coli* O157:H7 e *Yersinia enterocolitica* presunta patogena negli alimenti: confronto tra metodiche colturali classiche e PCR real time; sviluppo di un metodo in PCR per *Y. enterocolitica*

Direttore

Prof.ssa Rossana Cavallo

Co-Relatore

Dott.ssa Giuliana Banche

Candidata

Dott.ssa Francesca Borney

FOODBORNE DESEASES

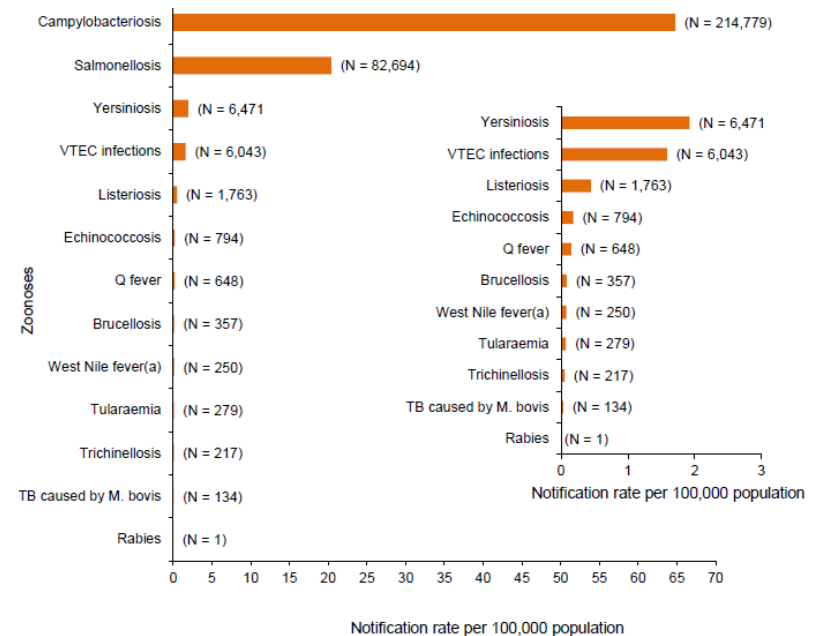
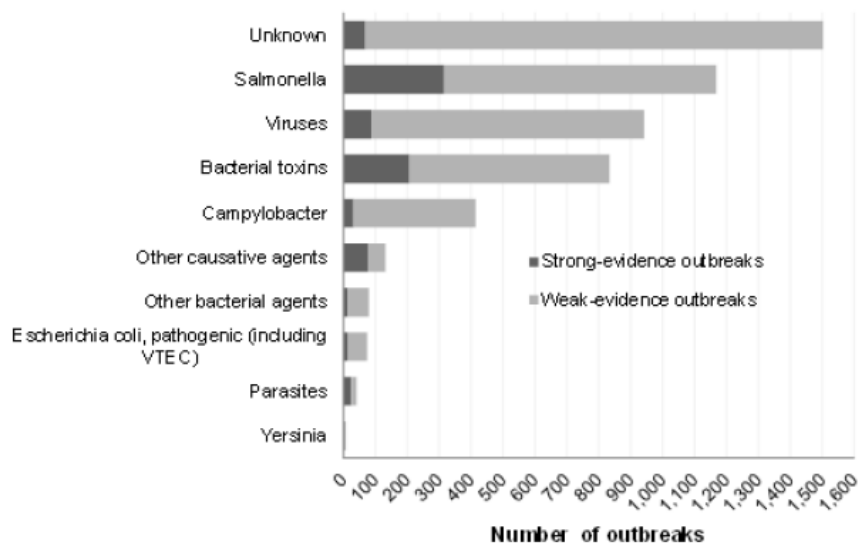
- Le malattie di origine alimentare sono un **problema centrale** per la salute pubblica.
- Nel mondo ogni anno muoiono circa **2 milioni** di persone a causa dell'ingestione di acqua e cibo contaminati (WHO, 2015).
- Con la **globalizzazione** dei mercati si assiste alla continua **emergenza di nuove minacce**.
- **L'incidenza** delle malattie trasmesse da alimenti è in costante **ascesa** anche in tutti i **paesi industrializzati**.



DATI EFSA 2013

(EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY)

In Europa, nel 2013, sono stati segnalati **5.196** focolai di tossinfezioni alimentari, **43.183** casi di malattia nell'uomo, **5.946** ricoveri e **11** decessi (EFSA 2015).

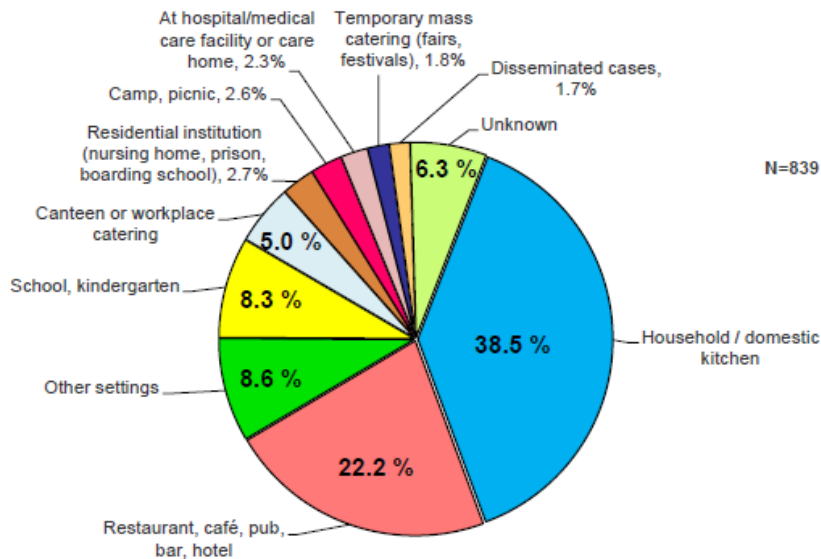


Tassi di incidenza delle **zoonosi** notificate nel 2013 (EFSA ,2015)

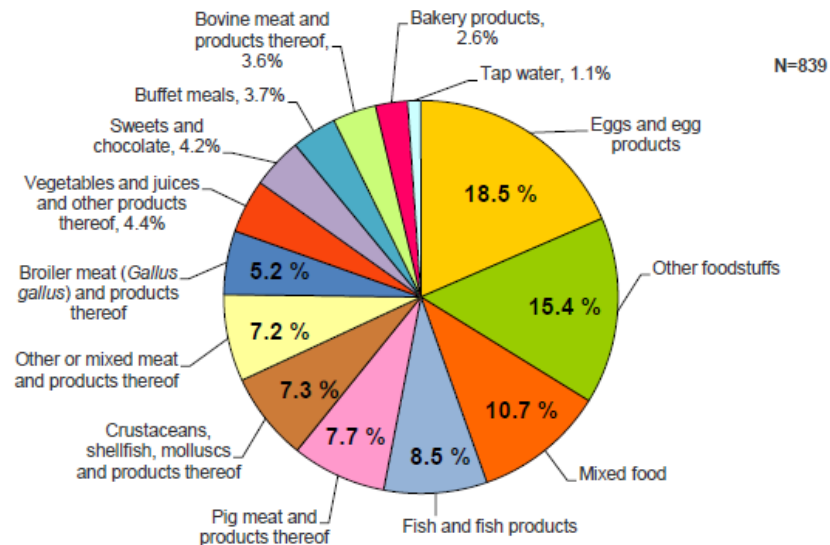
Distribuzione di tutti i focolai di tossinfezione alimentare per **agente eziologico** nel 2013 nella UE (EFSA, 2015)

DATI EFSA 2013

(EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY)

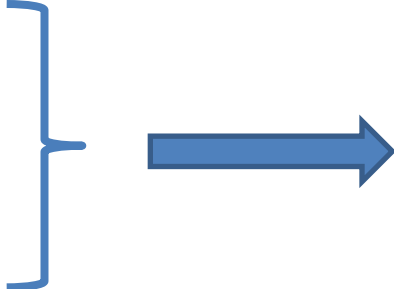


Distribuzione dei focolai di tossinfezione a forte evidenza per **luogo di origine** (EFSA, 2015).



Distribuzione dei focolai di tossinfezione a forte evidenza per **veicolo alimentare** (EFSA, 2015).

NORMATIVA ALIMENTARE

- Regolamento CE 852/2004
 - Regolamento CE 853/2004
 - Regolamento CE 854/2004
 - Regolamento CE 882/2004
- 
- Pacchetto igiene
- **Regolamento CE 2073/2005** e sue successive modifiche sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari.
 - Fissa i **criteri microbiologici** in base alla **valutazione del rischio**:
 1. criteri di **sicurezza alimentare** (microrganismi patogeni e loro tossine)
 2. criteri di **igiene di processo** (microrganismi indice di contaminazione come *E. coli* o Stafilococchi coagulasi positivi).
 - Stabilisce per la prima volta criteri di sicurezza anche per alcuni **alimenti vegetali**.
 - Esplicita i **metodi di riferimento** con cui verificare la conformità dei prodotti.

VALIDAZIONE METODO ALTERNATIVO

- L'**accreditamento** è un requisito essenziale per la validità delle prove ai fini del controllo ufficiale degli alimenti, ai sensi della normativa compresa nel "**pacchetto igiene**".

Garanzia di



Competenza tecnica

Imparzialità

Indipendenza

Correttezza

- Il Reg. 2073/2005 prevede la possibilità di utilizzare **metodi analitici alternativi** rapidi, purchè validati.
- La validazione di un metodo alternativo deve dare dimostrazione che i **risultati analitici** ottenuti siano **confrontabili** con quelli del metodo di riferimento (ISO 16140:2003).

SCOPO DELLA TESI

Le metodiche colturali di riferimento sono complesse e richiedono molti giorni per giungere a un risultato analitico definitivo.

A volte hanno una bassa sensibilità.

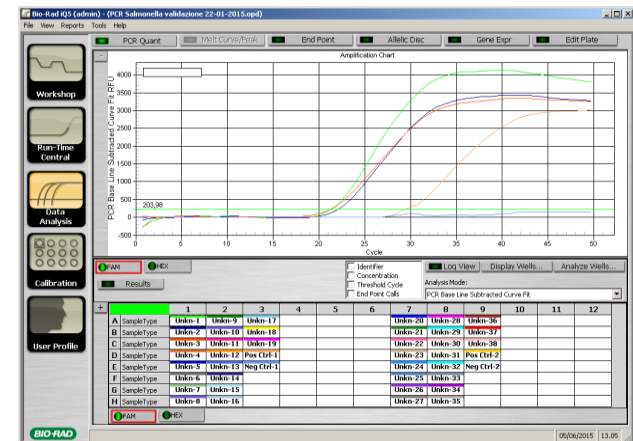
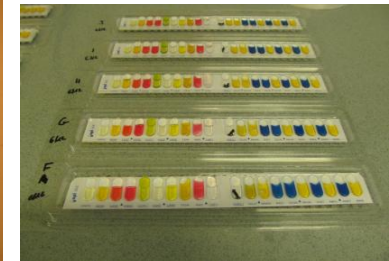


- **Confronto tra le caratteristiche prestazionali** di tecniche colturali classiche e di metodi alternativi rapidi, basati sulla real time PCR, per la determinazione di alcuni batteri patogeni responsabili di infezioni e tossinfezioni alimentari:

1. *Salmonella* spp,
2. *Listeria monocytogenes*,
3. *E. coli* O157:H7.

- Verifica della loro **applicabilità** nel lavoro di routine di un laboratorio deputato al controllo ufficiale degli alimenti.

- Raccolta dei dati necessari **alla validazione e accreditamento** dei metodi alternativi.



SCOPO DELLA TESI

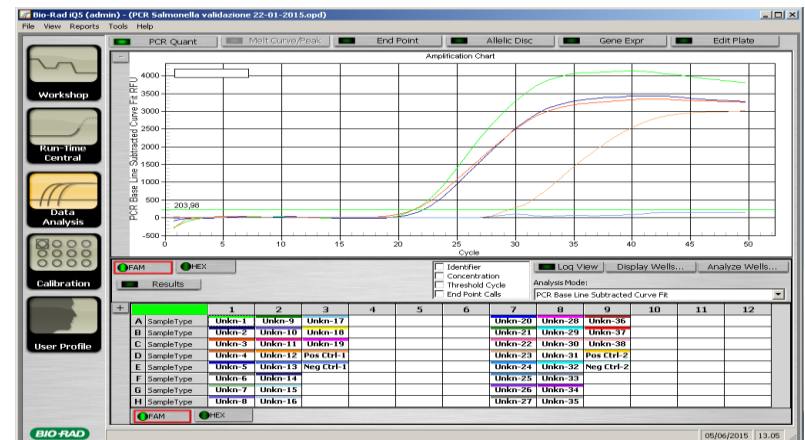
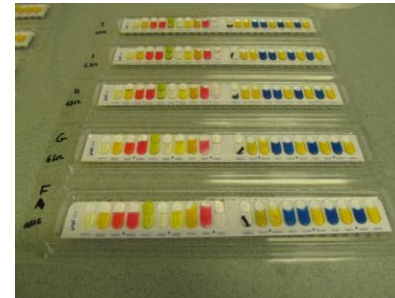
Y. enterocolitica ricercata su campioni di verdure confezionate pronte all'uso (PRIC della Regione Valle d'Aosta).

Molti campioni positivi per *Yersinia* ma nessuno per *Y. enterocolitica* patogena.

I kit PCR disponibili in commercio per *Yersinia* non sono validati.



- Messa a punto di un metodo in **real time PCR**.
- Raccolta dei dati preliminari in vista di una sua **validazione primaria**.



MATERIALI E METODI

Microorganismo	Numero di campioni	Matrici	Metodo culturale	Metodo alternativo	
Salmonella spp.	229	Prodotti alimentari previsti nel Reg. CE 2073/2005	UNI EN ISO 6579:2008	real time PCR (kit iQ-Check Bio-Rad validati AFNOR)	<ul style="list-style-type: none"> •Fase di arricchimento in brodo (24 ore) •Kit analitico comprendente : <ol style="list-style-type: none"> 1. reattivi per l'estrazione del DNA 2. reattivi fase di amplificazione e rilevazione in tempo reale
L. monocytogenes	226		UNI EN ISO 11290-2005		
E.coli O157:H7	142	Verdure pretagliate, lavate e confezionate	ISO 16654:2001		
Y. enterocolitica	29	Verdure pretagliate, lavate e confezionate	ISO 10273:2003	real time PCR (Yersinia enterocolitica genesig Advanced Kit Primerdesign)	<ul style="list-style-type: none"> •Fase di arricchimento in brodo (48 ore) •Kit per l'estrazione del DNA •Kit per la fase di amplificazione e rilevazione in tempo reale

Le prove sono state condotte nell'arco di **due anni** nel laboratorio di microbiologia dell'ARPA Valle d'Aosta.

I campioni analizzati sono stati contaminati con sospensioni batteriche a concentrazione nota, preparate a partire da ceppi batterici certificati.

RISULTATI

Microrganismo	Risultati Validazione	Accuratezza relativa	Specificità relativa	Sensibilità relativa
<i>Salmonella</i> spp BPW + Protocollo Easy I Kit Bio-Rad	AFNOR	97,4%	98,7%	95,9%
	ARPA VdA	97,8%	100%	96,8%
<i>L. monocytogenes</i> H F + Protocollo Standard Kit Bio-Rad	AFNOR	98,3%	98,9%	97,5%
	ARPA VdA	98.7 %	100 %	98.1 %
<i>E. coli</i> O157:H7 BPW + Protocollo Easy Kit Bio-Rad	AFNOR	97.4%	97.1%	100%
	ARPA VdA	98,3 %	97,2%	100%

Microrganismo	Metodo PCR	Metodo di riferimento
	limite di determinazione relativo u.f.c./25 g	limite di determinazione relativo u.f.c./25 g
Salmonella spp	0,1 - 2,8	0,1 - 1,7
<i>L. monocytogenes</i>	0,2 - 1,6	0,2 - 1,6
<i>E. coli</i> O157:H7	0,1 - 1,7	0,2 - 1,9

RISULTATI

<i>Y. enterocolitica</i>	Accuratezza relativa	Specificità relativa	Sensibilità relativa
real time PCR	93.10 %	100 %	90,48%
Colturale incubazione 48h a 30°C	44,83 %	100%	23.81 %
Colturale incubazione 5 gg a 20°C ISO 10273:2005	31,03 %	100%	4.76 %

Livello di inoculo (u.f.c/campione)	Positivi PCR	Positivi colturale 30°C/48 h	Positivi colturale 22°C/5 gg (ISO 10273:2005)
10 ⁶	100%	67 %	33 %
10 ⁵	100%	67 %	0 %
10 ⁴	100%	67 %	0 %
10 ³	100%	0 %	0 %
10 ²	100%	0 %	0 %
10 ¹	61.5%	0 %	0 %

- Caratteristiche prestazionali **buone** per il metodo in PCR.
- Il metodo colturale risulta **inadeguato**.
- Limite di rilevazione relativo di circa 10¹ u.f.c. (limite di sensibilità dichiarato nel kit 100 u.f.c.).


RISULTATI

Tempi di risposta	
Metodo real time PCR	Metodo colturale
<i>Salmonella spp</i>	
Totale circa 1 giorno	Totale da 3 a 5 giorni (+ tempo necessario per la tipizzazione)
<i>Listeria monocytogenes</i>	
Totale circa 1 giorno	Totale da 3 a 5/8 giorni (+ tempo necessario per la tipizzazione)
<i>E. coli O157:H7</i>	
Totale circa 1 giorno	Totale da 2 a 4 giorni (+ tempo necessario per la tipizzazione)
<i>Y. enterocolitica</i>	
Totale circa 2 giorni e mezzo	Totale da 5 a 8 giorni (+ tempo necessario per la tipizzazione)

Risparmio economico: non è richiesta la conferma colturale per i campioni negativi.

CONCLUSIONI

- I risultati ottenuti per i metodi alternativi in PCR per *Salmonella* spp (iQ-Check Salmonella II), *L. monocytogenes* (iQ-Check *Listeria monocytogenes* II) e *E. coli* O157:H7), hanno dimostrato che questi kit sono caratterizzati da un'**elevata accuratezza, sensibilità e specificità**.

- Il sistema inoltre è  **Semplice**
Veloce
Flessibile

- Questi kit sono quindi utilizzabili, previo accreditamento, anche in un laboratorio deputato al controllo ufficiale degli alimenti.

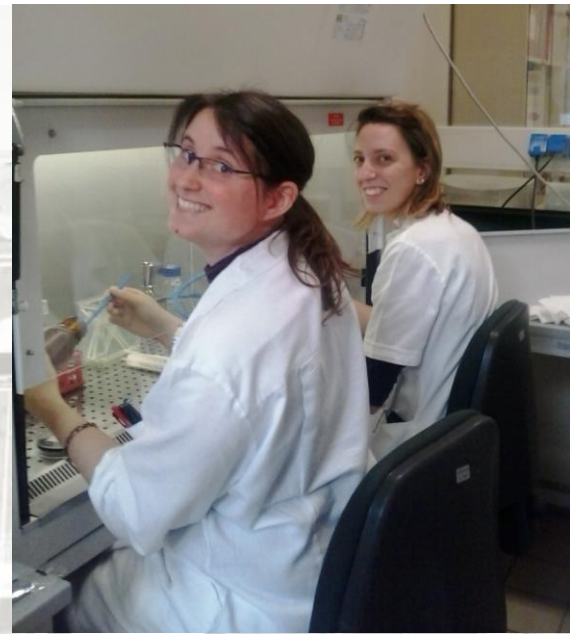
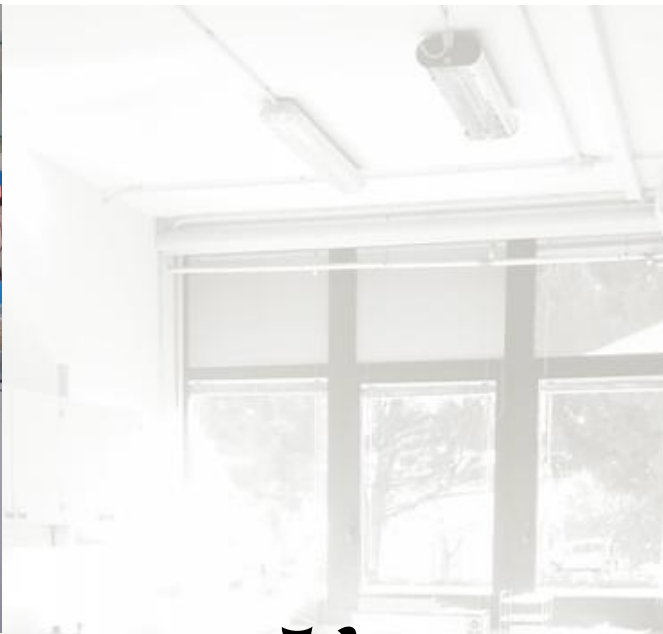
- **Aspetti negativi** evidenziati:



1. il **risultato positivo deve essere confermato** con un metodo colturale di riferimento, con conseguente perdita del risparmio temporale ed economico.
 2. la tecnica molecolare richiede l'utilizzo di **attrezzatura costosa** e **personale specializzato**.
- L'utilizzo esclusivo dei metodi basati su real time PCR è ancora improponibile, ma una **combinazione delle due tecniche analitiche**, quella molecolare e quella colturale, tale da conciliare le caratteristiche positive che entrambe possiedono, rappresenta un compromesso che può dare buoni risultati.

CONCLUSIONI

- Il **metodo colturale** ISO 10273:2003 **sottostima** la presenza di *Y. enterocolitica*, come peraltro riportato in letteratura, probabilmente a causa dell'**abbondante flora interferente**, che cresce nelle stesse condizioni di *Yersinia* e la difficoltà di distinguere i ceppi patogeni da quelli non patogeni (Abadias et al. 2008; Fukushima et al. 2011; Tan et al. 2014).
- Il **metodo molecolare** in PCR ha dimostrato delle **buone prestazioni** in termini di **accuratezza, sensibilità e specificità**. Anche questa osservazione è in linea con quanto indicato da numerosi autori (Lambertz et al. 2008, Arrausi-Subiza et al. 2014; Wang et al. 2014).
- I **tempi di risposta** del metodo molecolare, messo a punto nel laboratorio ARPA VdA, sono **drasticamente ridotti** rispetto al metodo di riferimento.
- Sono necessarie ancora molte prove per migliorare le prestazioni del metodo, ad esempio **ottimizzare il rapporto tempo/temperatura di incubazione** del brodo di arricchimento, in modo da favorire la crescita di *Y. enterocolitica* e sfavorire quella della flora concomitante (Arrausi-Subiza et al. 2014).
- I nostri risultati, come quelli di altri laboratori, suggeriscono che sia necessario uno **stretto monitoraggio microbiologico** che possa definire meglio la prevalenza di questo microrganismo nella popolazione, il suo reservoir animale, e la sua diffusione negli alimenti (Favier et al. 2014).



Grazie per l'attenzione

