



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: confronto tra metodiche colturali classiche e PCR real time, e sviluppo di un metodo in PCR per *Y. enterocolitica*

TESI DI SPECIALIZZAZIONE

Direttore

Ch.ma Prof.ssa Rossana Cavallo

Co-Relatore

Dott.ssa Giuliana Banche

Presentata dalla Dott.ssa
M. Francesca Borney

Anno Accademico 2013/2014

INDICE

INTRODUZIONE.....	3
Le tossinfezioni alimentari	3
Termini e definizioni	5
Caratteristiche comuni delle tossinfezioni alimentari.....	7
Agenti patogeni di tossinfezioni alimentari, tossine e sostanze chimiche importanti per la salute pubblica.....	8
Momenti essenziali nella catena del contagio	13
La profilassi delle tossinfezioni alimentari.....	14
Sintesi dei dati EFSA 2013	16
La normativa alimentare.....	20
Il “pacchetto igiene”	21
Piani e controlli ufficiali	24
Regolamento CE 2073/2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari	25
Il sistema di allerta rapido (RASFF)	31
Accreditamento e validazione dei metodi di prova	33
Scelta dei metodi.....	35
Validazione	37
Scopo della tesi.....	47
MATERIALI E METODI.....	49
Attrezzatura utilizzata.....	49
Scelta delle matrici da sottoporre a prova	50
Ceppi batterici utilizzati	50
Preparazione degli inoculi e dei campioni da sottoporre a prova.....	51
Schema per <i>Salmonella</i> spp e <i>Listeria monocytogenes</i>	52
Schema per <i>E. coli</i> O157: H7	54
Schema per <i>Yersinia enterocolitica</i>	55
Metodi colturali	56
<i>Salmonella</i> spp.....	56
<i>Listeria monocytogenes</i>	57
<i>Escherichia coli</i> O157	58
<i>Yersinia enterocolitica</i>	58
Metodi in Real time PCR	59

<i>Salmonella</i> spp.....	59
<i>Listeria monocytogenes</i>	62
<i>E. coli</i> O 157.....	63
<i>Yersinia enterocolitica</i>	64
RISULTATI.....	69
<i>Salmonella</i> spp.	69
Confronto del metodo RTi PCR con il metodo colturale di riferimento	69
Confronto tra i risultati di amplificazione del DNA dopo conservazione a -20°C.....	70
Confronto tra i risultati ottenuti da due operatori abilitati a eseguire l'analisi.....	70
Tabelle dei risultati per <i>Salmonella</i> spp.....	71
<i>Listeria monocytogenes</i>	73
Confronto del metodo RTi PCR con il metodo colturale di riferimento	73
Confronto tra i risultati di amplificazione del DNA dopo conservazioni a -20°C	74
Confronto tra i risultati ottenuti da due operatori abilitati a eseguire l'analisi.....	74
Tabelle dei risultati per <i>L. monocytogenes</i>	75
<i>E. coli</i> O 157.....	77
Confronto del metodo RTi PCR con il metodo colturale di riferimento	77
Confronto tra i risultati ottenuti da due operatori abilitati a eseguire l'analisi.....	78
Tabelle dei risultati per <i>E. coli</i> O157: H7	78
<i>Yersinia enterocolitica</i>	80
Confronto del metodo RTi PCR con il metodo colturale di riferimento	80
Tabelle dei risultati per <i>Y. enterocolitica</i>	84
DISCUSSIONE.....	87
Bibliografia	92

INTRODUZIONE

Le tossinfezioni alimentari

Nel mondo ogni anno muoiono circa due 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. Alimenti contaminati da batteri, virus, parassiti o sostanze chimiche sono causa di più di 200 malattie, che vanno dalla diarrea al cancro.

L'incidenza delle malattie trasmesse da alimenti è in costante ascesa anche in tutti i paesi industrializzati, tuttavia è difficile avere dei dati precisi, in quanto una gran parte di esse non arriva all'osservazione del medico o non è adeguatamente segnalata. Inoltre vi sono delle differenze significative tra Paese e Paese rispetto ai livelli di notifica, pertanto le differenze nel numero e tipo di casi segnalati potrebbero non corrispondere al livello di sicurezza alimentare dei vari Paesi. (EFSA, 2015).

Negli USA si ammalano circa 48 milioni di persone ogni anno, 128.000 sono ospedalizzati e 3.000 muoiono a causa di malattie di origine alimentare (<http://www.cdc.gov/foodborneburden/2011-foodborne-estimates.html>).

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).

In Italia il numero di focolai di tossinfezioni segnalato nel 2009 è stato di 248, con un totale di casi di malattia umana pari a 1.451 (<http://www.epicentro.iss.it/>).

E' evidente quindi perché le malattie di origine alimentare sono un tema centrale per la salute pubblica in tutto il mondo. Si tratta di un tema complesso che richiede molti livelli d'intervento: appropriati programmi di prevenzione, formazione del personale addetto, educazione e informazione dei consumatori, una legislazione adeguata e i conseguenti sistemi di controllo armonizzati a livello internazionale.

Tra le tante pubblicazioni che si trovano sull'argomento (Cody et al. 2014; Viator et al. 2015), appare molto interessante quella pubblicata dall'OMS nel 2008: "*Foodborne disease outbreaks: guidelines for investigation and control*". Queste linee guida sono destinate ai professionisti della salute pubblica, agli ispettori degli alimenti e della salute, ai funzionari medici nazionali e distrettuali, al personale di laboratorio e a tutti coloro che possono partecipare alla sorveglianza e al controllo dei focolai delle malattie legate al cibo, con lo scopo di armonizzare in ambito internazionale le procedure di sorveglianza e di controllo delle epidemie legate agli alimenti.

Il documento si concentra sugli aspetti pratici dell'indagine e del controllo delle epidemie, ma fornisce anche una guida generale, adattabile alle necessità locali o nazionali, dà infatti indicazioni sulle indagini epidemiologiche, ambientali e di laboratorio da effettuare, sull'implementazione delle misure di controllo e sulla valutazione delle situazioni più complesse.

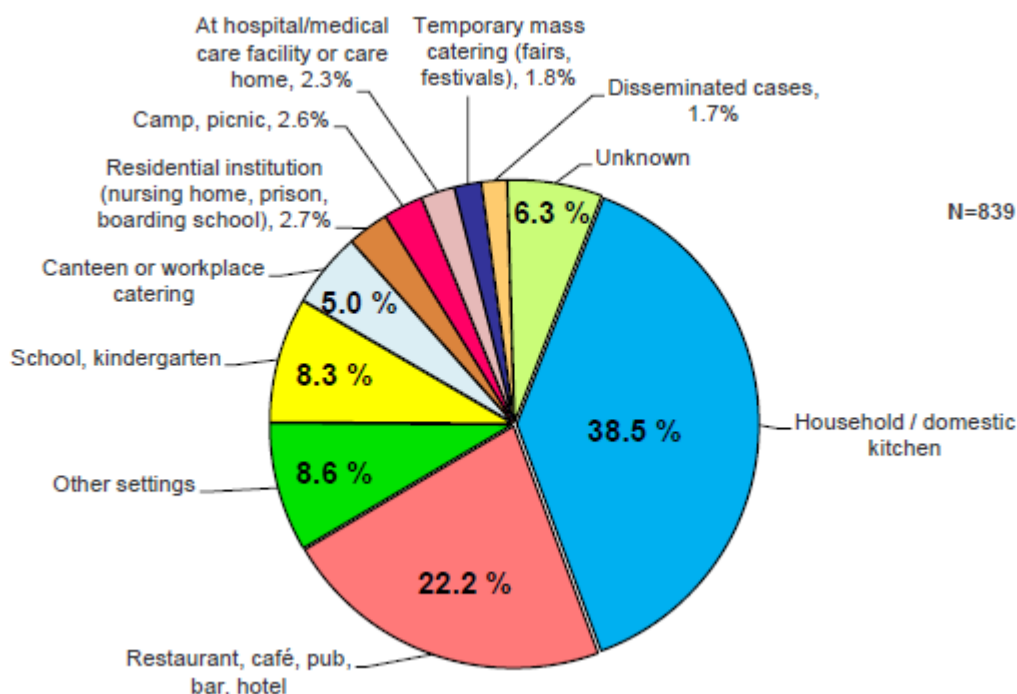
Esistono molti altri documenti sull'argomento, accessibili *online*, come ad esempio il *Bad Bug Book* (<http://www.fda.gov/Food/FoodborneIllnessContaminants/CausesOfIllnessBadBugBook/>), il sito *web* della CDC (<http://www.cdc.gov>), che riporta una lista dei patogeni, corredata da informazioni sulla diagnosi e il trattamento delle malattie alimentari. Anche sul sito dell'EFSA (<http://www.efsa.europa.eu>) si trovano sia semplici e sintetiche pubblicazioni, rivolte ai consumatori, sia pubblicazioni di livello più approfondito, per i professionisti del settore.

Lo scenario epidemiologico delle malattie trasmesse da alimenti è profondamente cambiato nel tempo a causa di numerosi fattori. Primo tra tutti il cambiamento delle abitudini alimentari, con l'aumentare della necessità di consumare i pasti fuori casa, l'abitudine a comprare alimenti a lunga conservazione o alimenti pronti all'uso, che richiedono particolari cautele (consumo immediato o immediata refrigerazione) e il diffondersi nella popolazione di regimi dietetici particolari, che prevedono spesso l'uso di vegetali crudi e potenzialmente infetti. In secondo luogo, la globalizzazione dei mercati porta sulla nostra tavola cibi prodotti in aree geografiche molto estese, il che rende difficile il controllo sia della loro origine sia della loro qualità igienico-sanitaria. Ancora la comparsa dei cosiddetti "patogeni emergenti", la cui responsabilità nell'insorgenza di focolai di tossinfezioni alimentari diventa sempre più importante; si pensi ad esempio ai casi di encefalite spongiforme nei paesi europei, alle infezioni da *E. coli* verocitotossici, all'emergenza di nuovi sierotipi di Salmonelle. Inoltre si è assistito, negli ultimi anni, alla comparsa di nuovi veicoli, prima sconosciuti, di focolai e casi sporadici di tossinfezioni, ad esempio il sidro di mele (*E. coli* O157:H7), i lamponi (*Cyclospora*, norovirus), germogli alfa-alfa (*Salmonella*, *E. coli* O157:H7). In concomitanza con l'aumento della disponibilità sul mercato di prodotti vegetali freschi confezionati è aumentato, negli ultimi anni, anche il numero di focolai di malattie alimentari legate al loro consumo, in quanto i cosiddetti "prodotti di IV gamma" subiscono pochi trattamenti prima di essere confezionati e spesso sono consumati crudi. Questi alimenti rappresentano quindi un serio rischio per la salute, se contaminati da microrganismi patogeni (Olaimat et al. 2012; Määttä et al. 2013). La catena del freddo, indispensabile per la loro corretta conservazione, rappresenta anche un potenziale rischio per la loro sicurezza in quanto favorisce lo sviluppo di batteri psicrotrofi (Fukushima et al. 2011).

Infine, anche il cambiamento climatico in atto sul nostro pianeta sembra giocare un ruolo importante sulle “*foodborne diseases*”, in quanto ha un impatto sulla dispersione e sulla persistenza di molti batteri patogeni nell’ambiente, con un conseguente aumento del rischio di contaminazione di acqua e alimenti (Hellberg et al. 2015).

Secondo i più recenti dati di sorveglianza epidemiologica, negli Stati Uniti il 68% dei casi di tossinfezioni alimentari riportati è stato associato a cibo preparato nei ristoranti, al bar, in albergo o in altri punti di ristorazione collettiva, ma anche in casa. Tra gli altri luoghi in cui è stata contratta un’infezione si annoverano scuole, mense e ospedali o altre strutture sanitarie (Gould et al. 2013).

In Europa nel 2013 il 38,5% delle tossinfezioni si sono verificate in ambiente domestico, il 22% nei ristoranti e l’8,3% nelle mense scolastiche (EFSA 2015).



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

Termini e definizioni

I termini e le definizioni riportate sono ripresi dalle linee guida della: “*Foodborne disease outbreaks: guidelines for investigation and control*” (WHO 2008 http://whqlibdoc.who.int/publications/2008/9789241547222_eng.pdf).

Più che di infezioni alimentari, intossicazioni, tossinfezioni oggi si preferisce parlare di “malattie di origine alimentare” (foodborne diseases), intendendo in questo modo qualsiasi malattia, di natura infettiva o tossica, che si suppone sia stata causata dall’ingestione di cibo o acqua, oppure trasmessa tramite questi veicoli.

In particolare le malattie causate da microrganismi o loro metaboliti si distinguono in:

- **infezioni alimentari:** provocate dall'ingestione di alimenti o liquidi contenenti microrganismi patogeni vivi e la loro successiva moltiplicazione nella mucosa intestinale o in altri tessuti (ad es. *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* spp).
- **intossicazione alimentari:** dovute a sostanze tossiche (sostanze chimiche, tossine naturali presenti in piante, funghi, animali) o tossine prodotte dai microrganismi nell'alimento e ingerite con l'alimento stesso, senza che vi sia necessariamente la presenza anche dell'agente patogeno (ad es. la tossina di *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum*, *Bacillus cereus*).
- **tossinfezioni alimentari:** causate dalla produzione di tossine nel tratto intestinale da parte di microrganismi veicolati da alimenti (es. *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*, *Vibrio cholerae*).

Altre definizioni fondamentali riportate nelle Linee Guida, utili per questa trattazione, sono le seguenti:

Caso: il verificarsi di una malattia che possiede le caratteristiche definite dagli addetti alle indagini.

Definizione di caso: serie di criteri diagnostici che devono essere soddisfatti per poter parlare di un caso di una particolare malattia. Le definizioni di caso possono essere basate su criteri clinici, di laboratorio o su una combinazione tra i due.

Classificazione di caso: grado di probabilità che si sviluppi un caso (possibile, probabile, confermato).

Epidemia: insorgenza di casi di malattia nettamente superiore ai tassi attesi; spesso segnalata come un focolaio.

Focolaio di malattia trasmessa da alimenti: l'insorgenza di due o più casi di una malattia alimentare simile, trasmessa dall'ingestione dello stesso alimento (acqua o cibo).

Contaminazione incrociata: (cross-contaminazione) consiste nel trasferimento di rischi biologici, fisici o chimici ai prodotti alimentari, attraverso un contatto con altri prodotti alimentari crudi, alimenti cotti precedentemente, superfici di contatto sporche o mani sporche degli addetti alla manipolazione degli alimenti.

Incidenza: numero di nuovi casi in una specifica popolazione e in un definito periodo di tempo, diviso per la popolazione a rischio.

Prevalenza: il numero o la proporzione degli individui di una specifica popolazione che, in un dato momento, presentano una determinata malattia.

Tasso: frequenza con la quale un evento si verifica in una specifica popolazione.

Portatore sano: una persona o un animale che ospita uno specifico agente infettivo, senza mostrare i segni clinici della malattia, in grado di trasmettere l'agente patogeno ad altri.

Vettore: un animale che funge da intermediario nella trasmissione di un agente patogeno da un serbatoio a un ospite sensibile.

Veicolo: un oggetto inanimato, per esempio un alimento, che funge da intermediario nella trasmissione di un agente patogeno da un serbatoio a un ospite sensibile.

Zoonosi: malattia infettiva trasmissibile, nelle condizioni naturali, dagli animali agli uomini.

Caratteristiche comuni delle tossinfezioni alimentari

Le malattie legate al consumo di alimenti o acqua sono causate da microrganismi patogeni, come batteri virus e parassiti, sostanze chimiche come le tossine e altri agenti patogeni anche molto rari, come i prioni (Cody et al. 2014). Vi è un interessamento simultaneo di tutti coloro che hanno consumato l'alimento contaminato, di conseguenza le tossinfezioni alimentari si manifestano spesso in piccoli focolai epidemici. Nella maggior parte dei casi, non c'è alterazione dei caratteri organolettici dell'alimento contaminato, tale da poter mettere in allarme il consumatore, ma la carica batterica nell'alimento è spesso elevata.

Le caratteristiche principali delle malattie alimentari di origine batterica sono riassunte nella qui di seguito.

Tabella 1. Aspetti caratteristici delle malattie alimentari causate da batteri.

	Infezioni	Tossinfezioni
Ruolo dell'alimento	Veicolo non indispensabile	Substrato indispensabile per la moltiplicazione batterica
Moltiplicazione batterica nell'alimento prima dell'ingestione	Non necessaria: la carica infettante è molto bassa	Necessaria: la carica batterica nell'alimento deve essere molto elevata
Tipo di alimento	Di qualsiasi tipo	Alimento con caratteristiche specifiche, idonee alla moltiplicazione del batterio
Periodo di incubazione	Di solito lungo (giorni)	Di solito breve (ore)
Meccanismo di azione	Moltiplicazione e diffusione dei batteri nell'organismo	Azione delle tossine prodotte dai batteri inizialmente presenti nell'alimento e poi nell'organismo

La sintomatologia predominante è a carico dell'apparato digerente, con un periodo di incubazione normalmente breve. Tuttavia ci sono alcune eccezioni, ad esempio la tossinfezione da *C. botulinum*, che produce una neurotossina con sintomatologia a carico del sistema nervoso periferico (paralisi flaccida, spesso seguita da morte per paralisi della muscolatura respiratoria).

I sintomi specifici quali malessere generalizzato, nausea, dolori addominali, vomito, diarrea o dissenteria, hanno un decorso solitamente benigno, ma nella popolazione ad alto rischio, malati, persone anziane, bambini, possono avere esito più grave e talvolta letale. In alcuni casi, in seguito alla malattia alimentare, sopravvivono complicazioni come la sindrome di Guillain-Barrè, la sindrome uremico-emolitica o artriti reattive (Cody et al. 2014).

Agenti patogeni di tossinfezioni alimentari, tossine e sostanze chimiche importanti per la salute pubblica

I principali microrganismi, parassiti, tossine e sostanze chimiche di origine biologica, responsabili di malattie alimentari sono elencati qui di seguito.

Tabella 2: principali agenti di infezioni, tossinfezioni e intossicazioni alimentari di origine biologica (WHO 2008)

Batteri patogeni	Virus	Trematodi
<i>Aeromonas hydrophila</i>	Epatite A	<i>Clonorchis sinesi</i>
<i>Bacillus cereus</i>	Epatite E	<i>Fasciola hepatica</i>
<i>Brucella</i> spp	Norovirus	<i>Fasciolopsis buski</i>
<i>Campylobacter</i> spp	Poliovirus	<i>Opisthorchis felineus</i>
<i>Clostridium botulinum</i>	Rotavirus	<i>Opisthorchis viverrini</i>
<i>Clostridium perfringens</i>	Protozoi	<i>Paragonimus westermani</i>
<i>Escherichia coli</i> spp (ETEC, EPEC, EHEC, EIEC)	<i>Cryptosporidium</i> spp	Cestodi
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Diphyllobothrium</i> spp
<i>Mycobacterium bovis</i>	<i>Entamoeba histolytica</i>	<i>Echinococcus</i> spp
<i>Salmonella typhi</i> e <i>S.Paratiphy</i>	<i>Giardia lamblia</i>	<i>Taenia solium</i> e <i>T. Saginatum</i>
<i>Salmonella</i> (non-typhi) spp	<i>Toxoplasma gondii</i>	Tossine naturali
<i>Shigella</i> spp	<i>Cyclospora cayetanensis</i>	Biotossine marine
<i>Staphylococcus aureus</i>	Nematodi	Tossine fungine e Micotossine
<i>Vibrio cholerae</i> O1	<i>Anisakis</i> spp	Composti tossici delle piante
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<i>Ascaris lumbricoides</i>	Alcaloidi
<i>Vibrio vulnificus</i>	<i>Trichinella spiralis</i>	Fitoemoagglutinine
	<i>Tricuris trichiura</i>	Graianotossina (miele)

Le sostanze chimiche, di natura non biologica, più frequentemente responsabili di malattia alimentare sono: antiparassitari (organo fosfati, antimonio), metalli tossici (cadmio, rame, piombo, mercurio, stagno), bifenili policlorurati, radionuclidi, fluoruri, zinco, nitriti (conservanti alimentari), idrossido di sodio, glutammato monosodico (WHO 2008).

Nello stesso documento sono pubblicate delle tabelle che sintetizzano le caratteristiche epidemiologiche, eziologiche e i metodi di controllo e prevenzione per le principali malattie di origine alimentare.

L'incidenza delle malattie trasmesse da alimenti, sulla base dei dati disponibili, è stata suddivisa nei seguenti gruppi:

- + ≤ 1 caso per 100.000
- ++ da 1 a 100 casi per 100.000
- +++ > 100 casi per 100.000

Si riporta, a titolo esemplificativo, una sintesi delle informazioni presenti nelle tabelle relative ai microrganismi patogeni presi in considerazione nella tesi.

Tabella 3: Informazioni riassuntive su *E. coli* enteropatogeni negli alimenti (WHO 2008)

Nome della malattia	Infezione da <i>Escherichia coli</i>
Agente eziologico	Batterio: <i>E. coli</i> enteropatogeno (EPEC) <i>E. coli</i> enterotossigeno (ETEC), produttore di tossina termostabile (ST) e termolabile (LT) <i>E. coli</i> enteroinvasivo (EIEC) <i>E. coli</i> enteroemorragico (EHEC) o produttore di verocitossina (VTEC), tossina Shiga (STEC) il più comune dei quali è conosciuto come <i>E. coli</i> O157.
Caratteristiche	Bacilli Gram -, non sporigeni, anaerobi facoltativi, della famiglia delle <i>Enterobacteriaceae</i> . Tipicamente mesofili, crescono tra i 7-10°C fino ai 50°C (ottimo 37°C). Attività dell'acqua (aw) minima per la crescita 0.95, pH 4.4-8.5. <i>E. coli</i> è parte della normale flora intestinale di uomini e animali a sangue caldo. I ceppi sopra menzionati possono provocare malattia. EHEC sono più acido-resistenti degli altri ceppi.
Periodo di incubazione	EPEC: 1-6 giorni (minimo 12-36 ore). ETEC: 1-3 giorni (minimo 10-12 ore). EIEC: 1-3 giorni (minimo 10-18 ore). EHEC: 3-8 giorni (mediamente 4 giorni).

Sintomi	<p>EPEC aderisce alla mucosa e ne altera la capacità di assorbimento, causando vomito, diarrea, dolore addominale e febbre</p> <p>ETEC produce enterotossine. I sintomi consistono in diarrea (variabile da leggera a grave, sindrome colera-simile), crampi addominali, vomito, talvolta disidratazione e shock.</p> <p>EIEC causa infiammazione della mucosa intestinale, invadendo e moltiplicandosi nelle cellule epiteliali del colon. I sintomi consistono in febbre, forte dolore addominale, vomito e diarrea acquosa (< 10% dei casi muco e sangue nelle feci)</p> <p>EHEC causa crampi addominali e diarrea acquosa, che può divenire sanguinolenta (colite emorragica). Possono comparire anche febbre e vomito</p>
Sequela	EPEC, ETEC, EIEC sono connesse alla malnutrizione nei neonati e nei bambini dei Paesi in via di sviluppo. Le EHEC possono dar luogo a complicanze fatali come la sindrome uremico-emolitica (10% dei colpiti) in particolare nei bambini e negli anziani.
Durata	<p>EPEC: da giorni a settimane</p> <p>ETEC: fino a 5 giorni</p> <p>EIEC: da giorni a settimane</p> <p>EHEC: da giorni a settimane</p>
Serbatoio/sorgente	L'uomo è il principale serbatoio per EPEC, ETEC, EIEC, i bovini per EHEC
Modalità di trasmissione e cibi associati	<p>EPEC, ETEC, EIEC: consumo di acqua e alimenti contaminati (cattiva gestione igienica e della catena del freddo). Fino al 25% delle infezioni in neonati e bambini nei Paesi in via di sviluppo (ETEC ed EPEC). ETEC è la causa principale della diarrea dei viaggiatori nei Paesi in via di sviluppo.</p> <p>EHEC è trasmessa principalmente tramite il consumo di alimenti contaminati (carne macinata, latte crudo, ortaggi). Può verificarsi anche la trasmissione interumana nel periodo di escrezione del patogeno.</p>
Specifiche misure di controllo	<p>A livello industriale: trattamento dell'acqua potabile, sistemi efficaci di smaltimento delle acque reflue e delle acque di irrigazione; trattamento termico; buone pratiche di igiene lungo la filiera di produzione e trasformazione dell'alimento.</p> <p>A livello domestico/ristorazione: buone norme di igiene personale, cottura completa degli alimenti, uso di latte pastorizzato.</p> <p>Esclusione da scuola/lavoro fino a 48 ore dopo la emissione di feci normali. Per gruppi a rischio fino a 3-4 giorni dall'ottenimento della clearance microbiologica (2 campioni fecali negativi prelevati a intervalli di 48 ore).</p>
Diffusione	in tutto il mondo. Incidenza nei Paesi in via di sviluppo +++
Altri commenti	Mortalità per le infezioni da EPEC, ETEC, EIEC nei Paesi industrializzati < 0,01% e di circa il 2% per EHEC, molto più elevata nei paesi in via di sviluppo. Gli anziani e i bambini possono essere affetti dalle forme più gravi. La maggior parte dei casi di EHEC è segnalata d'estate.

Tabella 4: informazioni riassuntive su *Listeria monocytogenes* negli alimenti (WHO 2008)

Nome della malattia	Listeriosi
Agente eziologico	Batterio: <i>Listeria monocytogenes</i>
Caratteristiche	Bacilli Gram +, non sporigeni, anaerobi facoltativi. Psicrotropa: crescono a 3-42°C (optimum 30-35°C), aw > 0.92, pH 5-9 (minimo 4.4). Possono crescere in presenza di sale fino a una concentrazione del 10%.
Periodo di incubazione	Da giorni fino a parecchie settimane
Sintomi	Sintomi similinfluenzali, come febbre e mal di testa e occasionalmente sintomi gastrointestinali
Sequela	Meningoencefaliti e/o setticemia nei neonati e negli adulti; aborto nelle donne in gravidanza.
Durata	Da giorni a settimane
Serbatoio/sorgente	Acqua, suolo, acque di scolo, ortaggi in decomposizione, insilato, feci di numerosi animali domestici e selvatici. Altre sorgenti possono essere l'uomo e gli animali.
Modalità di trasmissione e cibi associati	Una percentuale notevole dei casi di listeriosi è causata dagli alimenti, in particolare latte crudo, formaggi molli, i preparazioni a base di carne come il paté, la lingua di suino in gelatina, i salumi poco stagionati, gli ortaggi crudi e le insalate di verdure cotte, insalate preconfezionate, gelato, prodotti ittici affumicati o crudi.
Specifiche misure di controllo	A livello industriale: trattamento termico del latte (pastorizzazione e sterilizzazione). Per gli alimenti trasformati pronti al consumo ad alto rischio, riduzione di tutti i rischi di contaminazione crociata dopo la preparazione, trattamento termico, buone pratiche igieniche durante la produzione e la trasformazione. A livello domestico/ristorazione uso di latte pastorizzato, refrigerazione degli alimenti deperibili e consumo entro breve tempo. Evitare gli alimenti a rischio, in particolare le donne in gravidanza e i soggetti a rischio.
Diffusione	Incidenza +. La maggior parte dei casi sono stati riportati in Europa, Nord America e le isole del Pacifico.
Altri commenti	La forma più grave di malattia si verifica nei feti e nei neonati, negli anziani e nei soggetti immunodepressi. Circa un terzo dei casi clinici si verifica nei neonati. Negli adulti l'infezione è spesso asintomatica, ma gli individui infetti emettono il batterio con le feci per diversi mesi. La mortalità, nei casi più gravi non trattati adeguatamente può essere del 30%-70%. La malattia sistemica, similinfluenzale, è la manifestazione più comune, ma possono verificarsi, in persone in buone condizioni di salute, forme acute caratterizzate da diarrea, con un periodo di incubazione di due giorni.

Tabella 5: informazioni riassuntive su *Salmonella* spp negli alimenti (WHO 2008)

Nome della malattia	Salmonellosi
Agente eziologico	Batterio: sierotipi di <i>Salmonella</i> non- typhi
Caratteristiche	Bacilli Gram -, non sporigeni, anaerobi facoltativi, della famiglia delle <i>Enterobacteriaceae</i> . mesofili, crescono tra i 5-47°C (optimum 37°C),aw 0.95, pH > 4.0.
Periodo di incubazione	6-48 ore, occasionalmente fino a 4 giorni
Sintomi	febbre, mal di testa nausea, vomito, dolori addominali e diarrea.
Sequele	Artrite reattiva, setticemia, aortite, colicistite, colite, meningite, miocardite,osteomielite, pancreatite, sindrome di Reiter,sindromi reumatoidi.
Durata	da alcuni giorni a 1 settimana, talvolta fino a 3 settimane.
Serbatoio/sorgente	animali domestici e selvatici come pollame, suini, bovini, roditori, animali di compagnia come iguane, tartarughe, pulcini, cani e gatti. Anche l'uomo come convalescente o portatore sano.
Modalità di trasmissione e cibi associati	La principale via di trasmissione sono acqua e alimenti e contaminati da materiale fecale (latte, carne, pollame, uova), provenienti da animali malati, ma anche contaminati da operatori infetti e animali da compagnia. Alla base ci sono sempre carenze nelle norme igieniche. I problemi determinati dalla contaminazione posso accentuarsi a causa di una conservazione prolungata a temperature alle quali il batterio può moltiplicarsi. Può verificarsi la trasmissione diretta da interumana, durante il decorso dell'infezione. Alimenti contaminati possono essere latte, uova, carne, cioccolato, spezie, insalate.
Specifiche misure di controllo	A livello industriale: trattamento termico efficace degli alimenti di origine animale, buone pratiche di igiene, vaccinazione delle galline ovaiole. A livello domestico/ristorazione: pratiche sicure di preparazione degli alimenti, quali cottura adeguata, refrigerazione, prevenzione della contaminazione crociata, pulizia e disinfezione delle superfici di preparazione degli alimenti, esclusione degli animali da compagnia dalle zone di preparazione degli alimenti. I consumatori e in particolare le categorie a rischio dovrebbero evitare il consumo di alimenti crudi o contenenti uova crude.
Diffusione	Cosmopolita. Incidenza ++/ +++
Altri commenti	La sensibilità è accresciuta dall'acloridia, dalla terapia antiacida, dalla terapia immunosoppressiva e da altre condizioni debilitanti, ad esempio la malnutrizione. La gravità della malattia è correlata al sierotipo, al numero di microrganismi ingeriti e ad altri fattori legati all'ospite. La mortalità è < 1 % nei Paesi industrializzati. L'escrezione del microrganismo con le feci può durare diverse settimane o mesi. Si stanno isolando, con frequenza crescente, ceppi batterici resistenti agli antibiotici più utilizzati, è perciò necessario effettuare sempre il saggio di resistenza agli antibiotici.

Tabella 6: Informazioni riassuntive su *Yersinia* negli alimenti (WHO 2008)

Nome della malattia	Yersiniosi
Agente eziologico	Batterio: <i>Yersinia enterocolitica</i>
Caratteristiche	Bacilli Gram -, non sporigeni, anaerobi facoltativi, della famiglia delle <i>Enterobacteriaceae</i> . Psicrotrofi: crescono a 0-44°C (optimum 29°C). pH 4.6-9 (optimum pH7-8). Crescono su mezzi di coltura contenenti 5% di sale (non crescono su substrati contenenti 7% di sale)
Periodo di incubazione	24-36 ore (intervallo da 1 a 11 giorni)
Sintomi	Dolori addominali, diarrea, febbre leggera, talvolta vomito
Sequela	Si verificano nel 2-3% dei casi e comprendono artrite reattiva, sindrome di Reiter, disturbi oculari, colangite, eritema nodoso, setticemia, ascessi epatici e splenici, linfadenite, polmonite, spondilite.
Durata	2-3 giorni può continuare in forma leggera per 1-3 settimane.
Serbatoio/sorgente	Molti animali: ceppi patogeni sono spesso isolati nei suini.
Modalità di trasmissione e cibi associati	La malattia è trasmessa attraverso il consumo di cibi contaminati, soprattutto derivati da suini, il latte prodotti a base di latte, ortaggi freschi.
Specifiche misure di controllo	A livello domestico/ristorazione: cottura completa dei prodotti derivati da suini; prevenzione della contaminazione crociata.
Diffusione	Incidenza in Australia e Nord Europa +/+++, negli USA +.
Altri commenti	I casi non trattati possono espellere microrganismi per 2-3 mesi. La malattia è spesso diagnosticata come appendicite. La mortalità è rara.

Momenti essenziali nella catena del contagio

Un alimento può diventare pericoloso per la salute umana quando si verificano, lungo la filiera di produzione, trasformazione e somministrazione una serie di circostanze concomitanti:

- la sua contaminazione;
- la sopravvivenza del microrganismo patogeno;
- la moltiplicazione del microrganismo patogeno.

La contaminazione dell'alimento può avvenire durante la produzione (contaminazione primaria). Nel corso della macellazione le carcasse degli animali possono venire contaminate se vengono in contatto anche con piccole quantità del contenuto intestinale. Alimenti di origine vegetale, come frutta, verdura, semi germogliati, possono essere contaminati se irrigati o lavati con acqua contenente patogeni di origine enterica.

La contaminazione può verificarsi anche durante la preparazione, la manipolazione industriale, artigianale o domestica e la somministrazione (contaminazione secondaria). Una delle cause

principali è la contaminazione crociata, tra alimenti crudi e cotti, tramite l'utilizzo di attrezzature come affettatrici, tritacarne, superfici di taglio, coltelli, contenitori per la conservazione, non sufficientemente lavata e disinfettata; persone infette, malate o portatori sani, che manipolano l'alimento lungo la filiera di trasformazione o distribuzione, scarsa osservanza delle norme di igiene personale. In secondo luogo vi sono una cottura inadeguata e il mantenimento scorretto della temperatura durante la conservazione: spesso l'alimento contaminato, per diventare pericoloso, deve trovarsi, per un tempo sufficiente, entro un range termico compatibile con la moltiplicazione batterica, fino a raggiungere la carica microbica infettante o la produzione di tossine necessarie per provocare la sintomatologia. L'alimento ingerito, infatti, deve contenere sufficienti microrganismi o tossine per superare la soglia di sensibilità del soggetto.

Nella catena del contagio si distinguono fattori legati all'agente eziologico, all'ospite, all'alimento contaminato, fattori sociali e geografici, che possono influenzare il manifestarsi o meno di una malattia alimentare e l'entità dell'eventuale focolaio epidemico conseguente.

I principali fattori legati all'agente etiologico sono la patogenicità e la virulenza, la produzione di tossine, esotossine, endotossine, termolabili o termostabili, la produzione di spore, la sua capacità di sopravvivenza nell'ambiente, la rapidità di moltiplicazione a temperatura ambiente e/o a temperatura refrigerata, la carica contaminante.

I fattori predisponenti legati all'ospite sono il sesso, l'età, i fattori genetici, la costituzione e lo stato di nutrizione, le abitudini alimentari, l'attività lavorativa, lo stato economico, mentre quelli associati a uno specifico rischio individuale sono per esempio la vecchiaia, l'età neonatale, l'ospedalizzazione, la malnutrizione, il ritardo mentale, la gravidanza, lo stress, l'immunodeficienza iatrogena o acquisita, e una serie di patologie come ad esempio le neoplasie o l'ipocloridria.

I fattori legati all'alimento sono principalmente il suo contenuto di acqua, il pH, la temperatura di conservazione, la presenza di particolari sostanze nutritive, il potenziale di ossidoriduzione e tensione di O₂.

Infine sono importanti anche fattori sociali e climatici, come i costumi alimentari, le condizioni economiche, le norme legislative in materia di igiene degli alimenti, l'educazione alimentare, il clima e la localizzazione geografica.

La profilassi delle tossinfezioni alimentari

Nella profilassi delle tossinfezioni alimentari come in qualsiasi altro intervento preventivo nel campo delle malattie infettive è necessario operare attraverso misure di:

- profilassi diretta

- profilassi indiretta
- profilassi immunitaria

La Profilassi diretta comprende la denuncia, obbligatoria per tutte le tossinfezioni alimentari, l'isolamento, nei casi più gravi e per le categorie a rischio, la disinfezione e la sanificazione degli ambienti e delle attrezzature, l'inchiesta epidemiologica e le indagini di laboratorio. E' fondamentale, nel caso di focolai di tossinfezione alimentare, l'individuazione dell'alimento responsabile, consumato entro le 24-48 ore, e dell'agente eziologico, attraverso analisi di laboratorio sia sui pazienti sia sui residui di alimenti. Inoltre devono essere effettuate ispezioni dei locali dove l'alimento è stato preparato e consumato, reperite informazioni sulle pratiche di lavorazione e conservazione degli alimenti, sulle norme igieniche osservate e sullo stato di salute degli addetti alla preparazione degli alimenti.

La profilassi indiretta riguarda sostanzialmente l'osservazione delle buone pratiche di lavorazione e conservazione degli alimenti, l'igiene del personale, degli ambienti e delle attrezzature.

La profilassi immunitaria consiste nella vaccinazione degli addetti alla produzione e preparazione degli alimenti, oppure nel trattamento con antisieri antitossina nel caso di tossinfezioni da tossine botuliniche.

Possedere informazioni certe e complete sull'incidenza delle malattie alimentari, sia notificabili sia non, è fondamentale per l'individuazione di adeguate strategie di gestione dei rischi.

Un buon sistema di sorveglianza delle malattie trasmesse da alimenti deve prevedere la raccolta dei dati, provenienti da focolai epidemici e da casi singoli, con l'obiettivo di monitorare l'andamento delle malattie trasmesse da alimenti sul territorio, riconoscere le epidemie per intraprendere le necessarie misure di controllo, identificare gli agenti eziologici, le fonti e i fattori di rischio per interrompere la catena di trasmissione e infine identificare misure di prevenzione appropriate, valutare i risultati degli interventi di controllo e prevenzione attuati, identificare i nuovi problemi emergenti.

Tutte le informazioni devono essere raccolte nel corso di accurate e complete investigazioni, da parte di un *team* di professionisti, che lavorano in modo coordinato e integrato, svolgendo analisi epidemiologiche, analisi di laboratorio sugli ambienti e sugli alimenti. Le professionalità che partecipano alla gestione di un episodio di malattia veicolata dagli alimenti sono essenzialmente le seguenti:

- il medico di Igiene e Sanità Pubblica;
- il medico di Igiene degli Alimenti e Nutrizione;
- il medico veterinario;

- il biologo del laboratorio di analisi degli alimenti;
- il tecnico della prevenzione; assistente sanitaria/infermiera professionale;
- il personale amministrativo.

L'importanza e l'obbligo dell'investigazione sono ribadite in Italia nel decreto legislativo n. 191 del 4 aprile 2006, attuazione della Direttiva CE 2003/99 sulle misure di sorveglianza delle zoonosi e degli agenti zoonotici. Lo stesso decreto definisce quali sono i dati relativi ai focolai di malattie trasmesse da alimenti che devono essere rilevati:

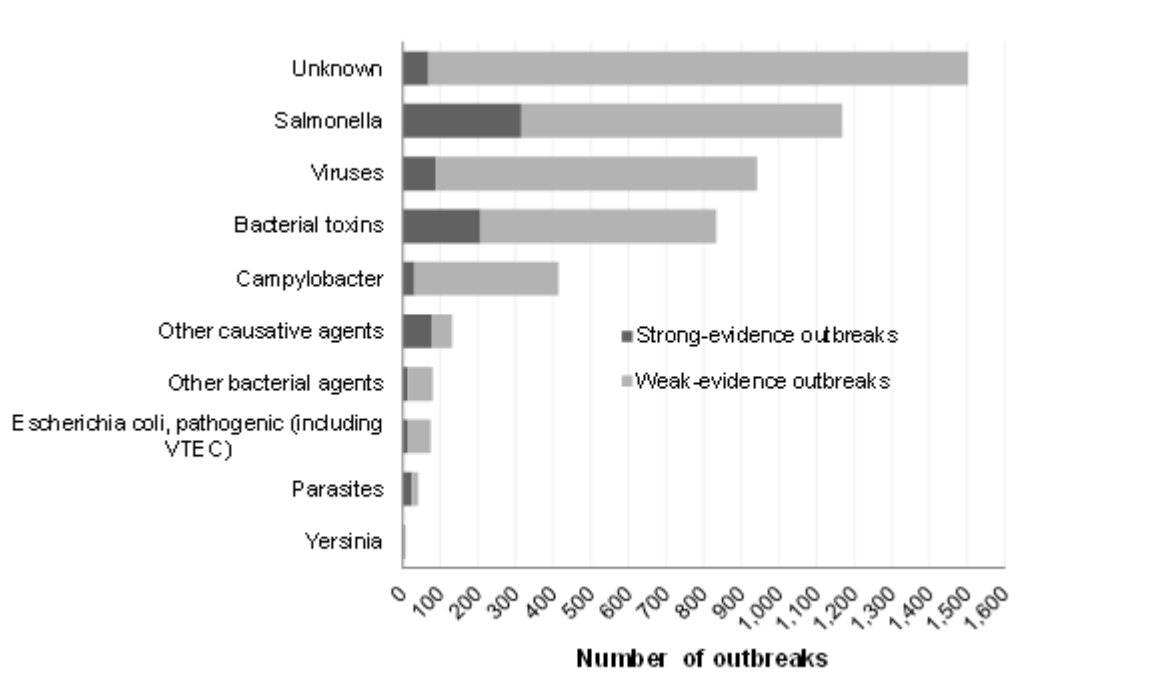
- numero complessivo di focolai in un anno;
- numero di persone morte o colpite da infezione a causa dei focolai;
- agenti responsabili dei focolai, e ove possibile, sierotipo o altra descrizione definitiva di tali agenti;
- prodotti alimentari implicati nel focolaio dell'infezione e altri veicoli di infezione potenziali;
- identificazione della tipologia del luogo di produzione, acquisto, acquisizione e consumo del prodotto alimentare incriminato;
- fattori collaterali, per esempio carenze igieniche nella trasformazione dei prodotti alimentari.

La notizia di un sospetto episodio tossinfettivo può giungere da diverse fonti, come ad esempio da una notifica ufficiale secondo il Decreto Ministeriale 15 dicembre 1990, che prevede “ *l'obbligo per il medico, che nell'esercizio della sua professione venga a conoscenza di un caso di qualunque malattia infettiva e diffusa o sospetta di esserlo, pericolosa per la salute pubblica, di notificarla all'autorità sanitaria competente*”. Successivamente l'Azienda USL, nel caso siano rispettati i criteri stabiliti dal decreto, deve trasmettere la notifica alla Regione, la quale provvede a inoltrarla all'ISTAT e al Ministero della Salute. La notizia di un focolaio epidemico o caso singolo può arrivare anche da un esposto di un privato cittadino, da allerta di forze dell'ordine, del Pronto Soccorso o Guardia medica, ma anche da notizia proveniente da un'altra Azienda USL, nel caso l'episodio tossinfettivo si sia manifestato a causa del consumo di alimenti sospetti, lontano da casa e i sintomi si siano poi manifestati al rientro.

Sintesi dei dati EFSA 2013

L'EFSA, Agenzia Europea per la Sicurezza Alimentare, raccoglie ed elabora i dati relativi alle zoonosi e alle tossinfezioni alimentari, segnalate nel territorio della UE, attraverso i canali istituzionali, e produce un Report annuale, pubblicato online.

I dati qui riportati sono una sintesi dell'ultimo rapporto, relativo al 2013 (EFSA, 2015).



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

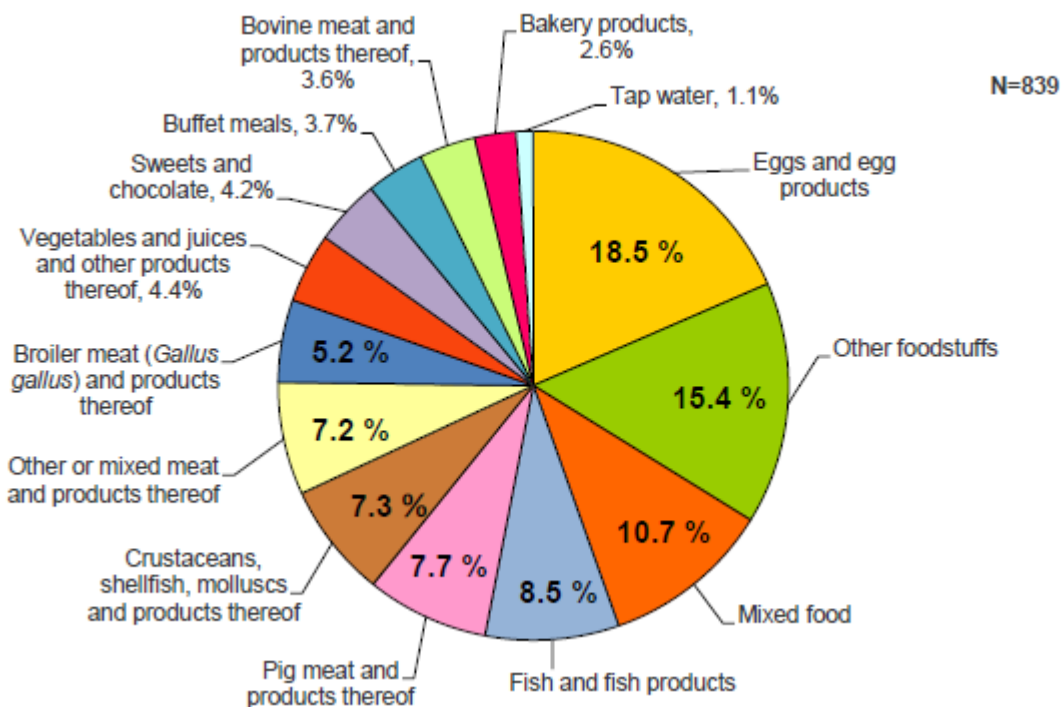
Innanzitutto è necessario chiarire che nel rapporto sono trattati in maniera separata i dati relativi ai focolai di tossinfezioni e i dati relativi alle zoonosi, che possono essere anche non collegate all'insorgere di una epidemia o di un focolaio tossinfettivo.

I focolai di tossinfezione alimentare sono denominati a “forte evidenza” (casi confermati), quando ci sono molte informazioni, la tossinfezione è stata ben caratterizzata, è stato isolato l'agente eziologico e vi è una correlazione elevata tra la malattia e l'alimento consumato. Viceversa sono denominati a “debole evidenza” (casi possibili), i casi per i quali non si dispone di informazioni dettagliate che collegano un alimento ad una data caso/focolaio di malattia.

Nel 2013 sono stati segnalati nel territorio della UE 5.156 focolai di tossinfezione alimentare, comprese nove epidemie a “forte evidenza” di origine idrica. Sono state coinvolte 43.183 persone, con 5.946 ricoveri e 11 decessi. Il collegamento tra casi umani e veicolo alimentare è stato a “forte evidenza” solo in 839 focolai.

Il maggior numero di focolai di tossinfezioni notificate è stato causato da *Salmonella* (22,5%), seguita dai virus (18,1%), le tossine batteriche (16,1%) e il *Campylobacter* (16,1%).

Durante il periodo di sei anni dal 2008 al 2013 è stata osservata una marcata diminuzione delle epidemie da *Salmonella*. Al contrario nello stesso periodo è aumentato del 58,9% il numero di focolai di tossinfezioni causate da tossine batteriche. È diminuito rispetto al 2012 il numero di focolai causati da *Campylobacter*, mentre vi è stato un aumento di quelle causate da virus.

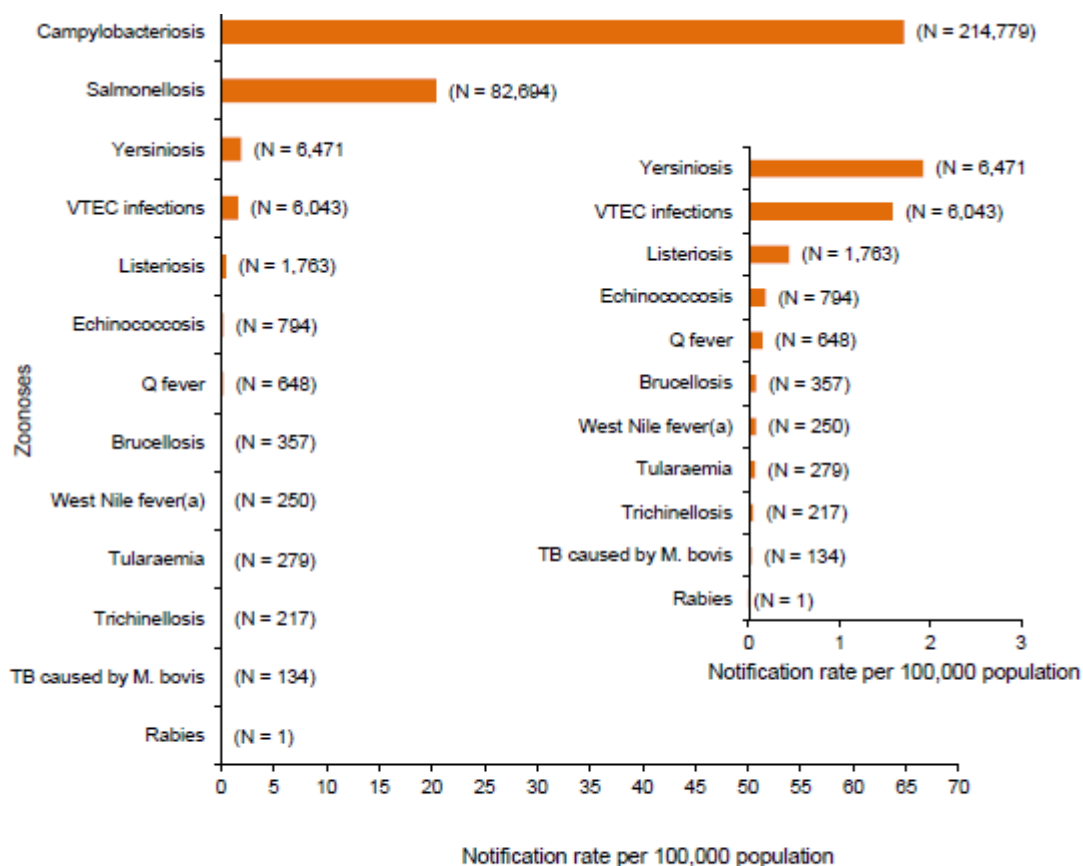


Distribuzione di tutti i focolai a forte evidenza per alimento nel 2013 nella UE (EFSA 2015)

Al pari degli anni precedenti i veicoli più importanti di malattie alimentari sono state le uova, gli ovoprodotti, le preparazioni gastronomiche multi - ingredienti e i prodotti ittici.

Di particolare rilievo è stata l'epidemia di epatite A, che ha coinvolto più Stati, associata al consumo di frutti di bosco e bacche contaminati dal virus.

Tra le tossine batteriche vi sono in particolare quelle prodotte da *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens* e *Staphylococcus aureus*. Altri batteri sono *Listeria*, *Brucella*, *Shigella*, *Vibrio* e altri batteri non specificati. I virus comprendono Calicivirus, Rotavirus, Virus dell'epatite A, Flavivirus ed altri virus non specificati. Altri agenti causali comprendono le tossine di funghi, le biotossine marine, l'istamina, le micotossine. I parassiti sono soprattutto *Trichinella*, ma anche *Cryptosporidium*, *Giardia* e altri parassiti non specificati.



- (a): For West Nile fever, the total number of cases was used.
 (b): The ordering of the diseases is according to the notification rate.
 (c): Total number of confirmed cases is indicated in parenthesis at the end of each bar.

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

Anche nel 2013, come per tutti gli anni a partire dal 2005, il *Campylobacter* è stato il microrganismo patogeno gastrointestinale più notificato nel territorio della UE. L'alimento più spesso contaminato è stata la carne fresca di pollo (31,4% dei campioni). Sono stati segnalati 414 focolai di tossinfezioni alimentari, di cui 32 ad "elevata evidenza". Le fonti di questi focolai erano carni di pollo e loro prodotti, altri tipi di carne, latte e alimenti multi-ingredienti.

Salmonella è stata notificata per un totale di 82.694 casi confermati e sono stati segnalati 59 casi fatali (tasso di mortalità dello 0,14% nella UE). E' ancora l'agente eziologico più frequente nei focolai di tossinfezioni alimentari notificati, malgrado la marcata tendenza alla diminuzione, legata alle azioni di controllo e prevenzione messe in atto in tutto il territorio della UE. Le uova e gli ovoprodotti sono il loro veicolo alimentare più comune.

Per quanto riguarda la *Listeria* vi è stato un aumento del tasso di notifica dell'8,6% rispetto al 2012 (1.763 casi umani notificati, con 191 decessi, di cui 64 in Francia, ed un tasso di mortalità del 15,6%). Gli alimenti più spesso positivi per la presenza di *Listeria* sono prodotti della pesca, pesce

affumicato, formaggi a pasta fresca o semi-stagionati, prodotti a base di carne pronti per il consumo, formaggi a pasta dura.

Sono stati notificati, nel 2013, 6.043 casi di *E. coli* verocitotossico, con 13 morti. Il tasso di notifica è del 5,9% superiore rispetto al 2012, forse anche per la maggior sensibilizzazione degli Stati membri, dopo la grave epidemia avvenuta nel 2011. Sono stati segnalati, inoltre, 73 focolai tossinfettivi, di cui 12 sostenuti da “elevata evidenza”. Gli alimenti implicati sono stati la carne bovina e i suoi derivati, ma anche ortaggi e frutta, pronti al consumo, succhi di frutta e formaggi.

Yersinia, con 6.471 casi confermati, è la terza zoonosi più comunemente riscontrata nel corso del 2013 nel territorio della UE, anche se il tasso di notifica è in calo rispetto agli anni precedenti e la mortalità è bassa, solo due casi fatali. E’ stata segnalata, per quanto riguarda gli alimenti, soprattutto sulla carne di suini, carne bovina, latte non pastorizzato.

La normativa alimentare

La sicurezza alimentare è un punto centrale nella tutela della salute pubblica. La globalizzazione dei mercati e la notevole complessità dei processi produttivi impongono la regolamentazione di tutti gli aspetti della filiera produttiva e distributiva degli alimenti, allo scopo di garantirne la salubrità e le caratteristiche organolettiche e nutrizionali, oltre che di tutelare il consumatore e il libero mercato.

La lotta alle zoonosi e alle tossinfezioni alimentari può avere successo solo in presenza di un solido quadro giuridico, applicato in maniera adeguata da tutti gli stati membri, che devono fornire personale e mezzi finanziari sufficienti ad assicurare le misure di controllo necessarie.

I principi che sono alla base della legislazione alimentare sono quindi volti ad assicurare:

- un elevato livello di protezione della salute umana e un’elevata qualità dei prodotti alimentari;
- il corretto funzionamento del mercato dei prodotti alimentari;
- definizioni chiare per facilitare la comprensione e l’accordo sul significato dei termini, ad esempio circa la definizione di alimento;
- un controllo scientifico di elevata qualità, indipendente e basato sull’analisi del rischio;
- il rispetto dei diritti del consumatore e la garanzia dell’accesso a informazioni accurate;
- la rintracciabilità dei prodotti alimentari;
- la piena responsabilità degli operatori di mercato riguardo alla sicurezza dei prodotti alimentari;
- il rispetto degli accordi internazionali in materia di commercio;
- lo sviluppo trasparente della legislazione alimentare e il libero accesso alle informazioni.

Il “pacchetto igiene”

Il cosiddetto “pacchetto igiene” è un insieme di quattro testi legislativi, che rappresentano la normativa di riferimento riguardo l’igiene della produzione degli alimenti e dei controlli a cui essi devono essere sottoposti.

Si tratta di regolamenti attuativi del Regolamento CE/178/2002, che definisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l’Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) e fissa le procedure nel campo della sicurezza alimentare, gestione e controllo di tutte le fasi della filiera produttiva, valutazione, gestione e comunicazione del rischio.

Il ruolo principale dell’EFSA consiste nel valutare i rischi associati alla filiera alimentare nell’UE. Il suo lavoro scientifico e le sue attività di consulenza assistono la Commissione europea, il Parlamento europeo e gli Stati membri nell’adozione di decisioni di gestione del rischio efficaci e danno un solido fondamento alle politiche e alla legislazione nel campo della sicurezza alimentare.

Le norme che formano il pacchetto igiene sono:

- il Regolamento CE 852/2004
- il Regolamento CE 853/2004
- il Regolamento CE 854/2004
- il Regolamento CE 882/2004

I Regolamenti sono stati pubblicati simultaneamente il 29 aprile 2004, ma sono stati applicati solo a partire dal 1° gennaio 2006.

Le precedenti direttive comunitarie verticali, che regolamentavano la produzione nei singoli settori, sono state abrogate con la Direttiva 41/2004/CE.

In Italia, il decreto di attuazione della Direttiva 2004/41/CE è il DLgs n. 193 del 6 novembre 2007, entrato in vigore il 24 novembre 2007 (G.U. n. 261 del 9 novembre 2007, Suppl. Ordinario n. 228).

Uno degli obiettivi fondamentali del pacchetto igiene è stato quello di uniformare la legislazione di tutti i Paesi Membri, in modo tale da definire i medesimi requisiti di sicurezza degli alimenti, applicare gli stessi criteri riguardo l’igiene della produzione ed effettuare i controlli di natura sanitaria secondo i medesimi standard su tutto il territorio della Comunità Europea.

Le norme intervengono già a livello della cosiddetta produzione primaria (allevamento e coltivazione delle materie prime compresi il raccolto, la mungitura e la produzione zootecnica precedente la macellazione; sono incluse la caccia, la pesca e la raccolta di prodotti selvatici come funghi, bacche, lumache etc.). Sono considerate poi tutte le fasi successive quali la produzione, la

trasformazione, la distribuzione di un alimento, la vendita o la somministrazione. In questo modo è possibile garantire la sicurezza di un alimento a partire dal campo o dall'allevamento, fino ad arrivare alla tavola del consumatore.

Come già ricordato vengono individuati due interlocutori fondamentali:

- l'Operatore del Settore Alimentare (OSA), ovvero chi svolge delle attività connesse alla produzione, trasformazione e distribuzione degli alimenti. I Regolamenti 852 e 853 sono rivolti all'OSA e lo individuano come unico responsabile della salubrità degli alimenti che produce.
- l'Autorità Competente, ovvero chi effettua l'attività di controllo sanitario. I Regolamenti 854 e 882 sono rivolti in maniera specifica proprio a chi deve verificare la sicurezza alimentare lungo tutta la filiera.

Regolamenti rivolti all'OSA

Il Regolamento 852/2004 stabilisce norme generali in materia di igiene di qualunque prodotto alimentare ed è quindi rivolto a tutti gli OSA, a prescindere dall'alimento che producono o dal loro ruolo nella filiera alimentare. La normativa rende obbligatoria l'adozione del sistema HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Points), un metodo di autocontrollo che mira a individuare, identificare e analizzare i rischi possibili durante la produzione di un alimento, a definire i mezzi necessari per gestirli e a assicurare che questi mezzi siano messi in atto in modo efficiente e efficace. Mediante questo strumento, tutti i produttori di alimenti sono obbligati a effettuare un controllo continuo della propria attività, nel rispetto degli standard igienico-sanitari. Soltanto i produttori primari sono dispensati dall'applicazione dell'HACCP, ma devono in ogni modo osservare precauzioni di carattere igienico nell'esecuzione della loro attività produttiva.

Tutti gli operatori devono inoltre implementare un sistema di tracciabilità e rintracciabilità.

Ogni impresa alimentare deve essere registrata in modo che sia possibile conoscere, in ogni momento, chi effettua una qualsiasi delle attività connesse a una delle fasi di produzione, trasformazione e distribuzione degli alimenti. Negli allegati sono poi riportati i requisiti igienici che gli OSA devono rispettare per quanto riguarda i locali di produzione, le attrezzature, il trasporto degli alimenti, il personale, i rifiuti e il confezionamento.

Il Regolamento 853/2004 stabilisce norme specifiche in materia di igiene, che integrano quelle contenute nel Reg. 852/2004 e sono rivolte ai produttori di alimenti di origine animale. Ogni stabilimento, compreso nell'ambito di attuazione del Regolamento, deve essere necessariamente

soggetto a un riconoscimento da parte dell'autorità competente, che verifica la rispondenza dei requisiti. Ogni prodotto immesso sul mercato deve essere contrassegnato da un bollo o da un marchio sanitario che ne certifica la provenienza da un determinato stabilimento europeo.

I Regolamenti destinati alle autorità di controllo

Il Regolamento 854/2004 stabilisce norme specifiche su come devono essere organizzati i controlli ufficiali sui prodotti di origine animale.

Viene disposto che l'autorità competente valuti :

- la corretta applicazione delle buone prassi igieniche di lavorazione;
- la validità del piano di autocontrollo predisposto, al fine di garantire in particolare l'assenza di pericoli microbiologici, chimici o fisici;
- la corretta applicazione di marchi e bolli, in modo da garantire un valido sistema di rintracciabilità;
- la formazione e il rendimento del personale che devono essere soddisfacenti in rapporto all'attività svolta;
- gli esiti dei campioni analizzati in laboratorio, prelevati ogni qualvolta sia necessario;
- il benessere degli animali destinati alla produzione di alimenti.

Il Regolamento 882/2004, invece, stabilisce le regole generali per l'esecuzione dei controlli ufficiali su tutti gli alimenti che vengono prodotti o commercializzati sul territorio dell'UE , non solo quelli di origine animale.

I controlli ufficiali vengono effettuati in qualsiasi punto della filiera produttiva e possono essere effettuati senza alcun preavviso, come le ispezioni, oppure essere concordati con l'OSA, come gli *audit*.

I controlli devono avvenire con una frequenza appropriata, pianificata e stabilita in base alle esigenze dettate dai rischi identificati lungo la filiera alimentare, ai dati in possesso dei produttori, ai risultati dei controlli già eseguiti e a qualsiasi informazione che possa evidenziare un'irregolarità. Anche i prodotti importati ed esportati sono soggetti ai medesimi controlli e, nel caso siano accertate delle mancanze, il Paese membro deve adottare misure appropriate per evitare che la merce possa arrivare al consumatore.

I metodi di campionamento e analisi utilizzati devono essere conformi alle norme comunitarie e, ove queste non esistano, a norme e protocolli riconosciuti a livello internazionale (ISO, UNI EN CEN, FDA).

I laboratori ufficiali sono designati dall'autorità competente e devono essere valutati e accreditati secondo le norme vigenti.

Piani e controlli ufficiali

Il controllo ufficiale degli alimenti e delle bevande ha la finalità di verificare e garantire la conformità dei prodotti ai requisiti indicati nei Regolamenti, al fine di prevenire i rischi per la salute pubblica, proteggere gli interessi dei consumatori e assicurare la lealtà delle transazioni.

Il controllo riguarda sia i prodotti italiani o di altra provenienza, destinati a essere commercializzati nel territorio nazionale, sia quelli destinati a essere spediti in un altro Paese dell'Unione Europea, oppure esportati in uno Stato terzo.

Il controllo ufficiale degli alimenti e delle bevande, come già ricordato, viene effettuato lungo tutta la filiera produttiva. Esso riguarda tutti i prodotti e gli additivi alimentari, nonché i materiali destinati a venire a contatto, commercializzati nel territorio nazionale o destinati all'esportazione.

L'indagine prevede accertamenti completi sul prodotto, attraverso ispezioni, campionamenti e analisi di laboratorio, sopralluoghi nell'ambito dell'ambiente di produzione e indagini sul personale addetto, nonché controlli sull'applicazione dei programmi di HACCP, che le aziende predispongono per l'individuazione e la gestione dei punti critici della catena produttiva.

Le attività del controllo ufficiale sono dirette a verificare:

- lo stato, le condizioni igieniche e i relativi impieghi degli impianti, delle attrezzature, degli utensili, dei locali e delle strutture;
- le materie prime, gli ingredienti, i coadiuvanti e ogni altro prodotto utilizzato nella produzione e preparazione per il consumo;
- i prodotti semilavorati;
- i prodotti finiti;
- i materiali e gli oggetti destinati a venire a contatto con gli alimenti;
- i procedimenti di disinfezione, pulizia e manutenzione delle attrezzature;
- i processi tecnologici di produzione e trasformazione dei prodotti alimentari;
- l'etichettatura e la presentazione dei prodotti alimentari;
- i mezzi e le modalità di conservazione.

Il controllo ufficiale è organizzato su vari livelli, a partire dalla sede centrale, rappresentata dal Ministero della Salute e l'Istituto Superiore di Sanità, fino alle realtà locali.

Il Ministero della Salute (DGSAN) svolge prevalentemente funzioni di programmazione, indirizzo e coordinamento, oltre ad occuparsi della raccolta, del controllo e della rielaborazione dati. E' responsabile inoltre del flusso di informazioni a livello nazionale e comunitario.

Il Ministero opera, a livello centrale, con la Direzione Generale per l'igiene e la sicurezza degli alimenti e la nutrizione e, a livello territoriale, con i propri uffici periferici:

- Uffici di Sanità Marittima, Aerea e di Frontiera (USMAF);
- Posti di Ispezione Frontaliera (PIF);
- Uffici Veterinari per gli Adempimenti Comunitari (UVAC).

Il Comando Carabinieri per la tutela della salute attraverso i Nuclei Antisofisticazione e Sanità (NAS), opera con competenza su tutto il territorio nazionale e con strutture articolate anche a livello periferico, soprattutto nell'ambito della repressione e della prevenzione.

A livello regionale, il coordinamento è affidato agli Assessorati alla sanità, mentre le funzioni di controllo sulle attività di produzione, commercio e somministrazione degli alimenti e delle bevande competono prevalentemente ai Comuni, che le esercitano attraverso le Aziende Sanitarie Locali.

Ai laboratori pubblici del controllo ufficiale, i Presidi Multizonali di Prevenzione (PMP), le Agenzie Regionali per la Protezione dell'Ambiente (ARPA) e gli Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IZS), è affidata l'effettuazione delle analisi sulle matrici alimentari e ambientali.

I risultati delle attività di vigilanza e di controllo analitico vengono trasmessi annualmente al Parlamento.

Per conoscere nel dettaglio come è organizzato il controllo ufficiale degli alimenti in Italia è possibile consultare le "Linee guida per il controllo ufficiale ai sensi dei Regolamenti CE/882/2004 e CE/854/2004" (http://www.salute.gov.it/imgs/C_17_pubblicazioni_906_allegato.pdf).

Regolamento CE 2073/2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari

Uno degli obiettivi fondamentali della legislazione alimentare, come stabilito nel regolamento (CE) n. 178/2002, è un elevato livello di protezione della salute pubblica

I rischi microbiologici dei prodotti alimentari costituiscono una delle principali fonti di malattie umane causate dagli alimenti: per essere definiti sicuri, i prodotti alimentari non devono contenere microrganismi, né loro tossine o metaboliti, in quantità tali da rappresentare un rischio inaccettabile per la salute umana.

Il Regolamento CE 2073/2005 stabilisce i criteri microbiologici per alcuni microrganismi. Al fine di contribuire alla protezione della salute pubblica ed evitare interpretazioni divergenti, è stato ritenuto

opportuno, infatti, fissare criteri di sicurezza, relativi all'accettabilità dei prodotti alimentari, in particolare per quanto riguarda la presenza di determinati microrganismi patogeni.

I criteri microbiologici possono essere applicati anche per la validazione e la verifica di procedure HACCP e delle altre misure di controllo dell'igiene.

A questo proposito il regolamento riporta una serie di definizioni importanti, tra cui:

- la definizione di 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;*
- la definizione di 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;*
- la definizione di criterio di igiene di processo: *un criterio che definisce il funzionamento accettabile del processo di produzione;*
- la definizione di alimenti pronti: *prodotti alimentari destinati dal produttore o dal fabbricante al consumo umano diretto, senza che sia necessaria la cottura o altro trattamento per eliminare o ridurre a un livello accettabile i microrganismi presenti.*

I criteri di sicurezza alimentare, riguardano gli alimenti già in commercio o pronti alla vendita, competono sia al produttore sia agli organi pubblici del controllo alimentare.

I criteri di igiene di processo spettano invece principalmente alle imprese alimentari, in quanto rappresentano uno strumento per la verifica e la validazione delle procedure di autocontrollo. Nell'ambito delle attività di controllo ufficiale tuttavia, sono previste anche verifiche sui sistemi di autocontrollo, che possono evidenziare la necessità di procedere ad accertamenti analitici sui criteri di igiene di processo. In questo caso il superamento dei limiti previsti, non comporta azioni sanzionatorie o penali, ma una revisione delle procedure di autocontrollo.

I risultati delle analisi dipendono dal metodo analitico utilizzato, pertanto occorre associare a ogni criterio microbiologico un metodo di riferimento specifico. Tuttavia, gli operatori del settore alimentare hanno la possibilità di usare metodi d'analisi diversi dai metodi di riferimento, in particolare quelli più rapidi, a condizione che, tramite i diversi metodi, si ottengano risultati equivalenti. È inoltre necessario definire un piano di campionamento per ciascun criterio, al fine di garantire un'attuazione armonizzata dei controlli su tutto il territorio dell'UE. E' autorizzato tuttavia

l'uso di altri sistemi di campionamento e analisi, compreso il ricorso a organismi indicatori alternativi, a condizione che essi forniscano garanzie equivalenti in merito alla sicurezza alimentare. A tal fine il Regolamento CE 2073/2005 stabilisce le caratteristiche dei controlli analitici da effettuare, compresi, ove necessario, l'incertezza di misura, il piano di campionamento, i limiti microbiologici, il numero di unità analitiche che devono risultare conformi a tali limiti. Stabilisce inoltre, le misure di attuazione riguardanti i prodotti alimentari e i punti della catena alimentare ai quali si applica il criterio, nonché le azioni da intraprendere nei casi in cui il criterio non sia soddisfatto. Le misure, che gli operatori del settore alimentare devono adottare per garantire la conformità ai criteri di igiene di processo, possono comprendere, tra l'altro, controlli delle materie prime, dell'igiene ambientale, della temperatura e della conservabilità del prodotto. Se necessario, per verificare il rispetto dei criteri, sono prelevati campioni dalle aree e dalle attrezzature in cui avviene la lavorazione degli alimenti (ISO 18593:2004).

Nell'Allegato I del Regolamento sono riportati, sotto forma di tabelle corredate da note esplicative, i criteri di sicurezza alimentare, i criteri di igiene di processo, le norme per il campionamento e le metodiche analitiche di riferimento (vedi tabelle Allegato I).

Nelle tabelle sono specificati:

- la categoria alimentare (anche se le definizioni date, in qualche caso, sono molto ampie e di non facile interpretazione);
- il microrganismo, sue tossine o metaboliti, stabiliti secondo il principio dell'analisi del rischio;
- il piano di campionamento, dove n indica il numero di unità campionarie di cui deve essere composto il campione e c indica il numero di unità campionarie i cui valori si situano tra m ed M ;
- i limiti, dove m è il valore di riferimento da rispettare ed M rappresenta il valore massimo ammissibile per un certo numero di unità campionarie, m ed M spesso coincidono, in particolare per i criteri di sicurezza alimentare;
- il metodo d'analisi di riferimento; tutti i metodi riportati sono pubblicati in norme internazionali;
- le fasi in cui si applica il criterio, cioè in quale punto della filiera produttiva deve essere eseguito il controllo analitico perché abbia significato ai sensi del controllo ufficiale o dell'autocontrollo eseguito dalle aziende produttrici.

Categoria alimentare	Microorganismo/loro tossine, metaboliti	Piano di campionamento (1)		Limiti (2)		Metodo d'analisi di riferimento (3)	Fase a cui si applica il criterio
		n	c	m	M		
1.1 Alimenti pronti per lattanti e alimenti pronti a fini medici speciali (4)	<i>Listeria monocytogenes</i>	10	0	Assente in 25 g		EN/ISO 11290-1	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
1.2 Alimenti pronti che costituiscono terreno favorevole alla crescita di <i>L. monocytogenes</i> , diversi da quelli destinati ai lattanti e a fini medici speciali	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 ufc/g (5)		EN/ISO 11290-2 (6)	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
		5	0	Assente in 25 g (7)		EN/ISO 11290-1	Prima che gli alimenti non siano più sotto il controllo diretto dell'operatore del settore alimentare che li produce
1.3 Alimenti pronti che non costituiscono terreno favorevole alla crescita di <i>L. monocytogenes</i> , diversi da quelli destinati ai lattanti e a fini medici speciali (4) (8)	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 ufc/g		EN/ISO 11290-2 (6)	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
1.4 Carne macinata e preparazioni a base di carne destinate ad essere consumate crude	<i>Salmonella</i>	5	0	Assente in 25 g		EN/ISO 6579	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
1.5 Carne macinata e preparazioni a base di carne di pollame destinate ad essere consumate cotte	<i>Salmonella</i>	5	0	Dall'1.1.2006 Assente in 10 g Dall'1.1.2010 Assente in 25 g		EN/ISO 6579	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
1.6 Carne macinata e preparazioni a base di carne di animali diversi dal pollame destinate ad essere consumate cotte	<i>Salmonella</i>	5	0	Assente in 10 g		EN/ISO 6579	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
1.7 Carni separate meccanicamente (CSM) (9)	<i>Salmonella</i>	5	0	Assente in 10 g		EN/ISO 6579	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
1.8 Prodotti a base di carne destinati ad essere consumati crudi, esclusi i prodotti per i quali il procedimento di lavorazione o la composizione del prodotto eliminano il rischio di salmonella	<i>Salmonella</i>	5	0	Assente in 25 g		EN/ISO 6579	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità

Criteri di sicurezza alimentare Reg CE 2073/2005 (Allegato I, Capitolo 1)

Categoria alimentare	Microorganismi	Piano di campionamento (1)		Limiti (2)		Metodo d'analisi di riferimento (3)	Fase a cui si applica il criterio	Azione in caso di risultati insoddisfacenti
		n	c	m	M			
2.2.7 Latte in polvere e siero di latte in polvere (4)	Enterobatteriacee	5	0	10 ufc/g		ISO 21528-1	Fine del processo di lavorazione	Controllo dell'efficacia del trattamento termico e prevenzione della ricontaminazione
	Stafilococchi coagulasi-positivi	5	2	10 ufc/g	100 ufc/g	EN/ISO 6888-1 o 2	Fine del processo di lavorazione	Miglioramento delle condizioni igieniche durante la produzione. Se si rilevano valori > 10 ⁵ ufc/g, la partita di formaggio deve essere sottoposta alle prove sulle enterotossine stafilococche
2.2.8 Gelati (5) e dessert a base di latte congelati	Enterobatteriacee	5	2	10 ufc/g	100 ufc/g	ISO 21528-2	Fine del processo di lavorazione	Miglioramento delle condizioni igieniche durante la produzione
2.2.9 Alimenti in polvere per lattanti e alimenti dietetici in polvere a fini medici speciali destinati ai bambini di età inferiore ai 6 mesi	Enterobatteriacee	10	0	Assente in 10 g		ISO 21528-1	Fine del processo di lavorazione	Miglioramento delle condizioni igieniche durante la produzione per minimizzare la contaminazione. Se in una delle unità campionarie sono rilevate enterobatteriacee, la partita deve essere sottoposta alle prove su <i>E. sakazakii</i> e <i>Salmonella</i>

Criteri di igiene di processo Reg CE 2073/2005 (Allegato I, Capitolo 2)

I parametri analitici (microrganismi, tossine e metaboliti) da ricercare indicati nel Regolamento CE 2073/2005 e sue successive modifiche (Reg. CE 1441/2207; Reg. CE 365/2010; Reg. CE 1086/2011; Reg. CE 209/2013; Reg. CE 210/2013) sono di seguito elencati, insieme ad alcune delle categorie alimentari a cui si riferiscono.

Criteri di sicurezza alimentare:

- *Listeria monocytogenes* (alimenti pronti; alimenti pronti per lattanti e destinati a fini medici speciali).
- *Salmonella spp.* (carne e prodotti a base di carne, prodotti a base di uova, prodotti a base di latte, molluschi, alcuni prodotti vegetali come semi germogliati pronti al consumo, frutta e ortaggi pretagliati pronti al consumo, alimenti per lattanti e alimenti di proseguimento in polvere).
- Enterotossine stafilococciche (formaggi, latte in polvere e siero di latte in polvere).
- *Escherichia coli* (molluschi bivalvi vivi ed echinodermi, tunicati e gasteropodi vivi).
- *Cronobacter spp* (*Enterobacter sakazakii*; alimenti in polvere per lattanti e alimenti dietetici in polvere a fini medici speciali destinati ai bambini di età inferiore ai 6 mesi).
- Istamina (prodotti della pesca ottenuti con specie ittiche associate con un tenore alto di istidina e/o che hanno subito un trattamento di maturazione enzimatica in salamoia).
- *E. coli* STEC (germogli).

Criteri di igiene di processo:

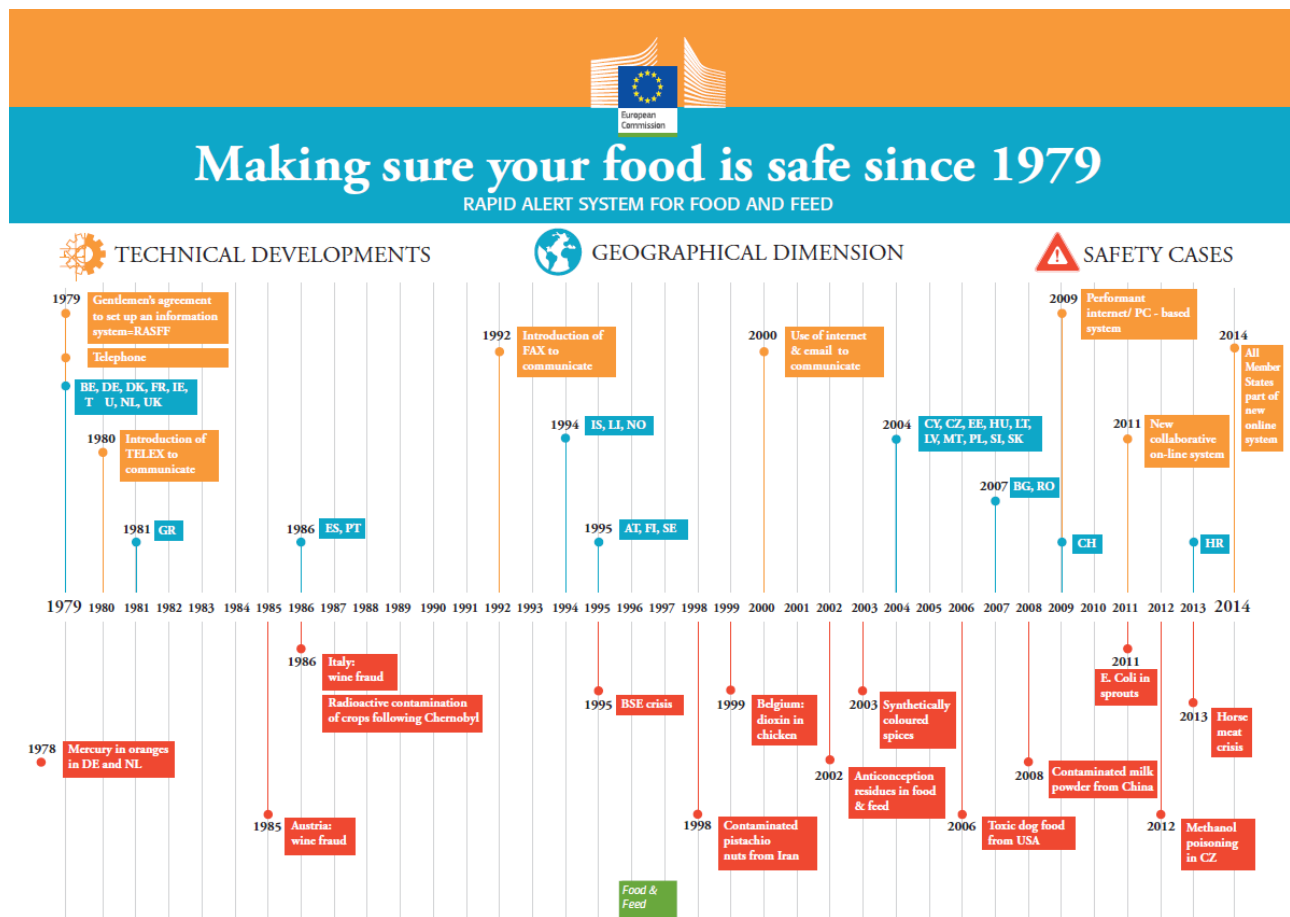
- *Enterobacteriaceae* (ad esempio: carcasse di bovini, suini equini e caprini; alimenti in polvere per lattanti e alimenti dietetici in polvere a fini medici speciali destinati ai bambini di età inferiore ai 6 mesi; alimenti di proseguimento in polvere; gelati e dessert).
- Conteggio delle colonie aerobiche (ad esempio: carcasse di bovini, suini equini e caprini, carne macinata, carni separate meccanicamente).
- *Salmonella spp.* (ad esempio: carcasse di pollame, carcasse di bovini, suini equini e caprini).
- Stafilococchi coagulasi positivi (ad esempio formaggi freschi, latte in polvere e siero di latte in polvere);
- *E.coli* (ad esempio: carne macinata, carni separate meccanicamente, preparati a base di carne).
- *Bacillus cereus* presunto (ad esempio: alimenti in polvere per lattanti e alimenti dietetici in polvere a fini medici speciali destinati ai bambini di età inferiore ai 6 mesi).

Il Regolamento CE 2073/2005 contiene senza dubbio importanti novità, rispetto alla normativa preesistente in materia di sicurezza alimentare. Ad esempio fissa i criteri microbiologici in base alla valutazione del rischio, garantendo una più omogenea valutazione dei prodotti all'interno del mercato unico. Stabilisce inoltre per la prima volta criteri di sicurezza anche per alcuni alimenti vegetali, come frutta ed ortaggi pretagliati, i semi germogliati, i succhi di frutta e ortaggi non pastorizzati pronti al consumo, ed esplicita i metodi di riferimento con cui verificare la conformità dei prodotti.

Tuttavia la sua emanazione ha generato confusione ed incertezza operativa nelle strutture deputate al controllo ufficiale. Per questo motivo sono state prodotte delle linee guida per la sua applicazione (*Linee guida relative all'applicazione del Regolamento CE della Commissione europea n. 2073 del 15 novembre 2005 che stabilisce i criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari*, pubblicate nel Supplemento ordinario alla Gazzetta ufficiale serie generale n. 124 del 30 maggio 2007).

Le norme nazionali, in contrasto con le norme europee, sono automaticamente decadute dal momento della pubblicazione del “pacchetto igiene”, quelle non in contrasto rimangono in vigore, ma sono applicabili solo agli alimenti di produzione nazionale.

Il sistema di allerta rapido (RASFF)



http://ec.europa.eu/food/safety/rasff/docs/0306014_timeline.pdf

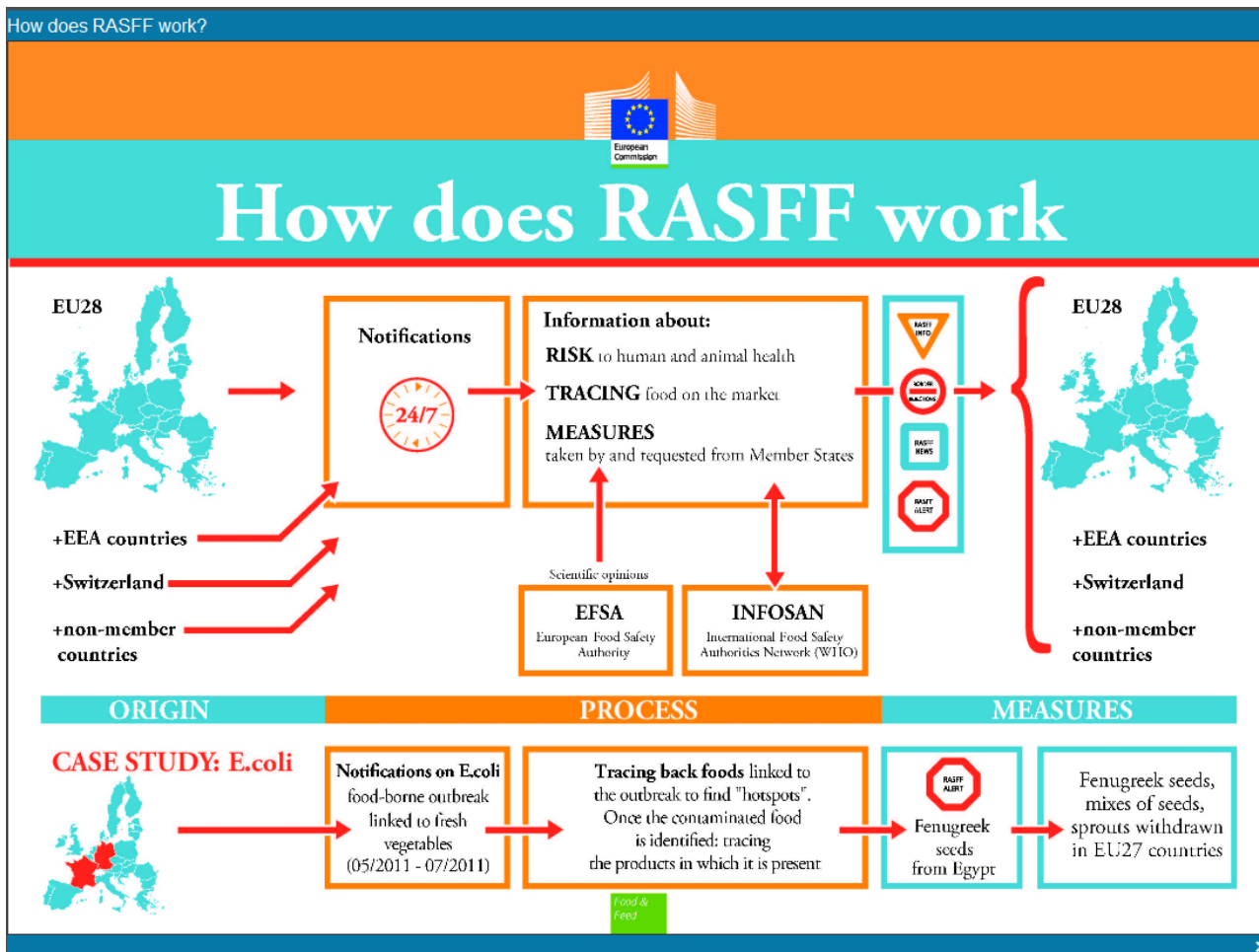
Al fine di prevenire la circolazione di prodotti contaminati da patogeni e di bloccare il più presto possibile il verificarsi di patologie legate al loro consumo, è stato istituito il sistema di allerta rapido, il RAFF (Food and Feed safety Alerts), che funziona come una rete, cui partecipano la Commissione Europea, l'EFSA e gli Stati membri dell'Unione.

Nell'immagine, sopra riportata, sono illustrate le principali tappe dell'evoluzione del sistema di allerta rapido in Europa.

Il sistema di allerta comunitario ha il suo fondamento giuridico nella Direttiva 92/59/CEE del Consiglio europeo, relativa alla sicurezza generale dei prodotti e nel Regolamento CE 178/2002.

L'Ufficio VIII della Direzione Generale della Sicurezza degli alimenti e della nutrizione del Ministero del Lavoro, Salute e Politiche sociali è il punto di contatto italiano per il sistema di allerta comunitario.

Il flusso delle "allerte" deve garantire sia la completezza delle informazioni sia la tempestività della comunicazione.



http://ec.europa.eu/food/safety/rasff/reports_publications/index_en.htm

Nell'immagine è schematizzato il flusso delle informazioni, oltre che un "caso studio" relativo a *E. coli* sui vegetali freschi.

Il sistema di allerta rapido si avvale di articolate procedure operative che prevedono:

- schede di notifica standard (completezza delle informazioni);
- uso della posta elettronica (tempestività della comunicazione).

Le notifiche sono comunicate e condivise tra gli Stati Membri via *web*, in tempo reale.

La Commissione Europea ha istituito sul proprio sito uno spazio apposito (http://ec.europa.eu/food/safety/rasff/index_en.htm) per la consultazione *on line* delle notifiche settimanali, "*weekly overview of alert and information notifications*", trasmesse dai paesi della UE.

Il sito web consente di conoscere le notifiche settimanali già in corso divise in:

- *new alert notification*, per i prodotti a rischio che sono sul mercato europeo
- *new information notification*, per i prodotti non presenti sul mercato europeo e già sottoposti a misure di controllo dal paese interessato.

Accreditamento e validazione dei metodi di prova

Come già riportato, il Reg CE 882/2004 riporta le norme generali in materia di igiene di qualunque prodotto alimentare e specifica che i laboratori deputati al controllo ufficiale della sicurezza alimentare devono utilizzare metodiche accreditate.

In particolare specifica che:

1. L'autorità competente designa i laboratori che possono eseguire l'analisi dei campioni prelevati durante i controlli ufficiali.
2. Le autorità competenti designano soltanto i laboratori che operano, sono valutati e accreditati conformemente alle seguenti norme europee:
 - a. ISO/IEC 17025:2005 «Criteri generali sulla competenza dei laboratori di prova e di taratura»;
 - b. EN 45002* «Criteri generali per la valutazione dei laboratori di prova»;
 - c. EN 45003** «Sistemi di accreditamento dei laboratori di taratura e di prova - requisiti generali per il funzionamento e il riconoscimento».
3. L'accREDITAMENTO e la valutazione dei laboratori di prova possono riguardare singole prove o gruppi di prove.
4. L'autorità competente può annullare la designazione di cui al paragrafo 1 se le condizioni di cui al paragrafo 2 non sono più rispettate.

* Ritirata senza sostituzione

** Ritirata e sostituita dalla UNI CEI EN ISO/IEC 17011:2005

Ne consegue che 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".

Anche i laboratori privati che eseguono analisi per l'autocontrollo nella filiera alimentare (HACCP) devono utilizzare metodiche accreditate (Legge n.88/2009 Accordo dell'8 luglio 2010 – Governo, Regioni- Province autonome).

La definizione di accREDITAMENTO riportata nel Regolamento CE N. 765/2008 è la seguente:

«Attestazione da parte di un organismo nazionale di accREDITAMENTO che certifica che un determinato organismo di valutazione della conformità soddisfa i criteri stabiliti da norme armonizzate e, ove appropriato, ogni altro requisito supplementare, compresi quelli definiti nei rilevanti programmi settoriali, per svolgere una specifica attività di valutazione della conformità»

L'accREDITAMENTO è garanzia di imparzialità, indipendenza, correttezza e soprattutto competenza: l'accREDITAMENTO attesta infatti che il personale addetto all'attività di verifica sia culturalmente, tecnicamente e professionalmente qualificato.

Il riferimento principale, che stabilisce i requisiti, sia gestionali che tecnici, per la competenza dei laboratori di prova e di taratura, è la norma ISO/IEC 17025: 2005 “Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova”.

Sono proprio tali requisiti, oltre a quelli aggiuntivi, stabiliti dall’ente certificatore (in Italia ACCREDIA), che il laboratorio deve dimostrare di possedere e mantenere nel tempo per ottenere l’accreditamento dei metodi analitici utilizzati.

Senza entrare nel dettaglio, è possibile avere un quadro sintetico dei requisiti gestionali (Capitolo 4) e tecnici (Capitolo 5) richiesti, attraverso l’indice della ISO/IEC 17025.

I requisiti gestionali riguardano l’organizzazione, la gestione ed il monitoraggio dei seguenti punti:

- l’organizzazione
- il sistema di gestione
- la tenuta sotto controllo della documentazione
- il riesame delle richieste, delle offerte e dei contratti
- il subappalto delle prove e delle tarature
- l’approvvigionamento di servizi e di forniture
- i servizi al cliente
- i reclami
- il miglioramento
- la tenuta sotto controllo delle attività di prova e/o di taratura non conformi
- le azioni correttive
- le azioni preventive
- la tenuta sotto controllo delle registrazioni
- gli audit interni
- il riesame da parte della direzione

I requisiti tecnici, inerenti in particolare alle attività analitiche, riguardano:

- il personale;
- il luogo di lavoro e le condizioni ambientali;
- i metodi di prova e di taratura e la validazione dei metodi;
- le apparecchiature;
- la riferibilità delle misure;
- il campionamento;
- la manipolazione degli oggetti da sottoporre a prova o taratura;

- l'assicurazione qualità dei risultati di prova e di tarature;
- la presentazione dei risultati.

Gli argomenti trattati nella norma sono molti e tutti altrettanto importanti per un laboratorio che esegue analisi microbiologiche o chimiche. Tuttavia, per lo scopo di questa trattazione, è necessario approfondire i punti relativi alla scelta dei metodi analitici e alla loro validazione.

Scelta dei metodi

Il Laboratorio deve, ove possibile, utilizzare metodi e procedure di prova definiti da Norme, Regole Tecniche o Metodi ufficiali in vigore.

Sono accettati i progetti di Norma (ISO FDIS, prEN, prENV, ecc.), solo nella forma sottoposta al voto finale.

ACCREDIA non riconosce come metodi normati articoli pubblicati su riviste o istruzioni dei fornitori delle apparecchiature: in tal caso il laboratorio deve mettere a punto un metodo interno. Norme superate o progetti di norma sono accettati se a essi fanno riferimento la normativa cogente o le norme per la certificazione di prodotto.

Qualora i metodi non normati siano sviluppati e validati da Laboratori di Riferimento Nazionali o Comunitari accreditati, possono essere utilizzati da altri laboratori senza ulteriore validazione purché:

- tali metodi rientrino nel campo di accreditamento del laboratorio che li ha sviluppati;
- contengano i limiti di ripetibilità e riproducibilità;
- siano messi a disposizione dal laboratorio di riferimento, nella versione in vigore, sul proprio sito *web*, corredati dalla dichiarazione di validazione;
- la dichiarazione di validazione del laboratorio di riferimento sia aggiornata;
- il laboratorio che li applica abbia verificato di rientrare nel limite di ripetibilità dichiarato.

E' ammesso l'uso di Kit certificati (validazione AFNOR, AOAC, NORDVAL), che sostituiscono in parte o del tutto il metodo normato. Ove applicabile, deve essere anche accreditato il corrispondente metodo normato. Essi non sono più utilizzabili dal momento in cui scade la validazione.

Negli ultimi anni si è assistito allo sviluppo di molti metodi rapidi, coltura-indipendenti (*culture-independent diagnostic tests* CIDT), accurati, sensibili e specifici, che consentono di dare un risultato analitico in tempi molto più brevi (da uno o due giorni fino a poche ore) rispetto ai metodi

tradizionali (Iwamoto et al. 2015). Questa caratteristica è di fondamentale importanza sotto molti aspetti: prevenire l'immissione sul mercato di alimenti contaminati, gestire rapidamente gli episodi di tossinfezioni alimentari, e non ultimo soddisfare la sempre più pressante esigenza di abbattere i costi e ottimizzare l'organizzazione del lavoro nei laboratori pubblici, così come già avviene nei laboratori privati che svolgono analisi nell'ambito del sistema di autocontrollo (HACCP) nella filiera alimentare.

I test rapidi, utilizzabili nei laboratori pubblici e privati deputati al controllo degli alimenti, consentono dunque di aumentare di molto l'efficienza analitica: infatti, diminuiscono i tempi di risposta, consentono un risparmio di ore lavorative, di utilizzo di terreni colturali e reattivi e permettono di analizzare contemporaneamente un numero elevato di campioni. Tutto ciò si traduce in un notevole risparmio economico. I metodi alternativi tuttavia devono essere validati da un organismo internazionalmente riconosciuto, per dare la garanzia di essere accurati, sensibili e specifici, al pari dei metodi convenzionali. Inoltre richiedono spesso l'utilizzo di macchinari molto costosi e di personale adeguatamente formato (Palomino-Camargo et al. 2014). Infine i CIDT non permettono l'isolamento del microrganismo patogeno, perché rilevano solo la presenza del DNA o di specifici antigeni, di conseguenza non ne consentono un'adeguata caratterizzazione fenotipica, sierologica e biochimica, né la determinazione dello spettro di resistenza agli antibiotici, tutte informazioni indispensabili per la gestione clinica ed epidemiologica delle tossinfezioni alimentari (Iwamoto et al. 2015). E' possibile sommare i vantaggi offerti dai test rapidi con la completezza di informazioni, indispensabili per un efficiente sistema di sorveglianza epidemiologica delle malattie trasmesse dagli alimenti, da un lato incoraggiando e implementando l'isolamento colturale del patogeno evidenziato tramite il test rapido, e dall'altro migliorando ulteriormente i CIDT in maniera tale che consentano essi stessi di giungere alla caratterizzazione dei ceppi batterici (Iwamoto et al. 2015).

I metodi alternativi, che si trovano oggi in commercio, comprendono spesso una fase di arricchimento o concentrazione simile a quella del metodo di riferimento, e una parte di identificazione del microrganismo, basata su tecniche molecolari (PCR, RTi-PCR), immunologiche (ELISA), o sull'utilizzo di terreni cromogeni, che permettono di rendere molto più veloce il processo analitico di identificazione. (Hoorfar 2011; Baysal 2014; Palomino-Camargo et al. 2014; Law et al. 2015; Iwamoto et al. 2015).

Tra i metodi molecolari rapidi utilizzati nella microbiologia alimentare, il metodo quantitativo PCR Real Time è considerato il metodo migliore per la determinazione e la quantificazione dei microrganismi (Postollec et al. 2011).

Per quel che riguarda il controllo microbiologico degli alimenti compresi nel “Pacchetto igiene”, i metodi di riferimento sono specificati nel Regolamento CE 2073/2005 e sue successive modifiche, ma è possibile usare metodi alternativi, più veloci ed economici dei metodi ufficiali, ove sia dimostrato che questi abbiano gli stessi requisiti tecnici di accuratezza e precisione.

Quando è necessario impiegare metodi di prova non normalizzati, essi devono essere completamente documentati. I metodi di prova interni devono riportare i riferimenti bibliografici dei documenti utilizzati per la loro elaborazione e i risultati di eventuali prove comparative eseguite con metodi analoghi nello stesso laboratorio, o nell’ambito di circuiti interlaboratorio. Inoltre, tutta la documentazione ritenuta utile per dimostrare la validità del metodo, deve essere disponibile e regolarmente archiviata. Il laboratorio deve determinare tutte le caratteristiche tecniche prestazionali (precisione, accuratezza, sensibilità, specificità, ripetibilità, riproducibilità, robustezza, limite di determinazione) dei metodi di prova interni e conservarne adeguata documentazione.

Schematicamente, i metodi microbiologici possono essere classificati in metodi qualitativi e metodi quantitativi.

Un metodo qualitativo identifica una specie o un gruppo di batteri presenti nell’unità di peso o di volume della matrice analizzata. Comprende di solito una o due fasi di arricchimento in brodo liquido (pre-arricchimento e arricchimento selettivo), una fase di reisolamento su terreno agarizzato selettivo, ed una fase di conferma e identificazione biochimica e/o sierologica.

Il risultato è espresso come presenza o assenza per quantità di peso o volume di prodotto analizzato.

Un metodo quantitativo identifica un batterio, o un gruppo di batteri, presenti in una matrice e ne determina il numero di cellule vitali per unità di peso o volume.

Validazione

Secondo la definizione riportata nella norma UNI EN ISO 9000:2005 la validazione è la conferma, sostenuta da evidenze oggettive, che i requisiti relativi a una specifica utilizzazione o applicazione prevista sono stati soddisfatti. Ciò può essere fatto attraverso:

- l’uso di materiali di riferimento certificati;
- il confronto con altri metodi;
- la partecipazione a confronti interlaboratorio;
- la verifica dei contributi all’incertezza di misura.

La validazione primaria di un metodo analitico studia e definisce, in fase di messa a punto e di sperimentazione, le sue caratteristiche prestazionali (ISO/TS 13843:2000). La validazione di un

metodo alternativo, quando effettuata per confronto con un metodo di riferimento normato, deve dare dimostrazione che i risultati analitici ottenuti sono confrontabili con quelli del metodo di riferimento (ISO 16140:2003).

La validazione secondaria, o verifica, è invece la dimostrazione, per via sperimentale, che un determinato metodo analitico funziona, nel laboratorio, in conformità alle sue specifiche. (ISO/TS 13843:2000).

La norma di riferimento per l'accreditamento dei laboratori di prova (ISO/IEC 17025:2005) al capitolo 5.4.2, relativo alla scelta dei metodi analitici, definisce che *“il laboratorio deve confermare che può correttamente eseguire i metodi normalizzati prima di metterli in opera per le prove e/o le tarature. Nel caso di cambiamento del metodo la conferma deve essere ripetuta”*.

Il concetto di validazione primaria e secondaria è perciò centrale nel processo che porta all'accreditamento di un metodo analitico.

Il laboratorio deve validare i metodi non normati, anche sviluppati al suo interno, i metodi normati utilizzati al di fuori del proprio campo di applicazione, come pure loro estensioni e modifiche, per confermare che i essi siano adatti all'impiego previsto.

Nella progettazione del processo di validazione devono essere definiti i parametri di qualità da verificare e i criteri di accettabilità dei risultati ottenuti.

La validazione deve eseguita in modo da soddisfare tutte le esigenze di una data applicazione o di un campo di applicazione. Devono essere registrati tutti i risultati ottenuti, le procedure utilizzate, i calcoli statistici e tutto quanto ritenuto necessario per dare evidenza dell'idoneità del metodo per l'utilizzo previsto.

Validazione primaria di un metodo qualitativo

Ai fini della trattazione di questa tesi si riporta nel dettaglio il processo di validazione di un metodo analitico qualitativo (ISO 13843:2000; ISO 16140:2003).

Le prestazioni del metodo possono essere determinate utilizzando le seguenti modalità:

- confronto con un metodo di riferimento, le cui prestazioni sono note. Si possono utilizzare campioni contaminati artificialmente in laboratorio con ceppi di riferimento certificati di microrganismi target e microrganismi interferenti, caratteristici delle matrici prese in considerazione, oppure campioni naturalmente contaminati analizzati nella routine di laboratorio (ove possibile è meglio scegliere questa seconda opzione);
- partecipazione a circuiti interlaboratorio.

Confronto con un metodo di riferimento

I parametri da determinare sono l'accuratezza, la sensibilità e la specificità relative, il livello di determinazione relativo, l'inclusività e l'esclusività.

Scelta della matrice

Se si intende validare il metodo per tutte le matrici alimentari, è necessario analizzare almeno cinque categorie alimentari tra quelle elencate (vedi Allegato B della norma ISO 16140):

- carni (carne fresca, trattata al calore, congelata, disidratata, seccata, fermentata, altro);
- carne di pollame e altri volatili (fresca, trattata al calore, congelata, altro);
- pesce e crostacei (freschi, trattati al calore, affumicati, congelati, altro);
- prodotti a base di frutta e ortaggi (freschi, trattati al calore, congelati, disidratati, fermentati, seccati, succhi o concentrati, a bassa umidità, altro);
- prodotti a base di latte (fresco, trattato al calore, congelato, fermentato, disidratato, altro);
- cioccolato e prodotti di pasticceria (a bassa umidità, disidratato, altro)
- altri prodotti (birra, salse, spezie, maionese, pasta, uova e derivati, cereali e riso);
- alimenti per animali

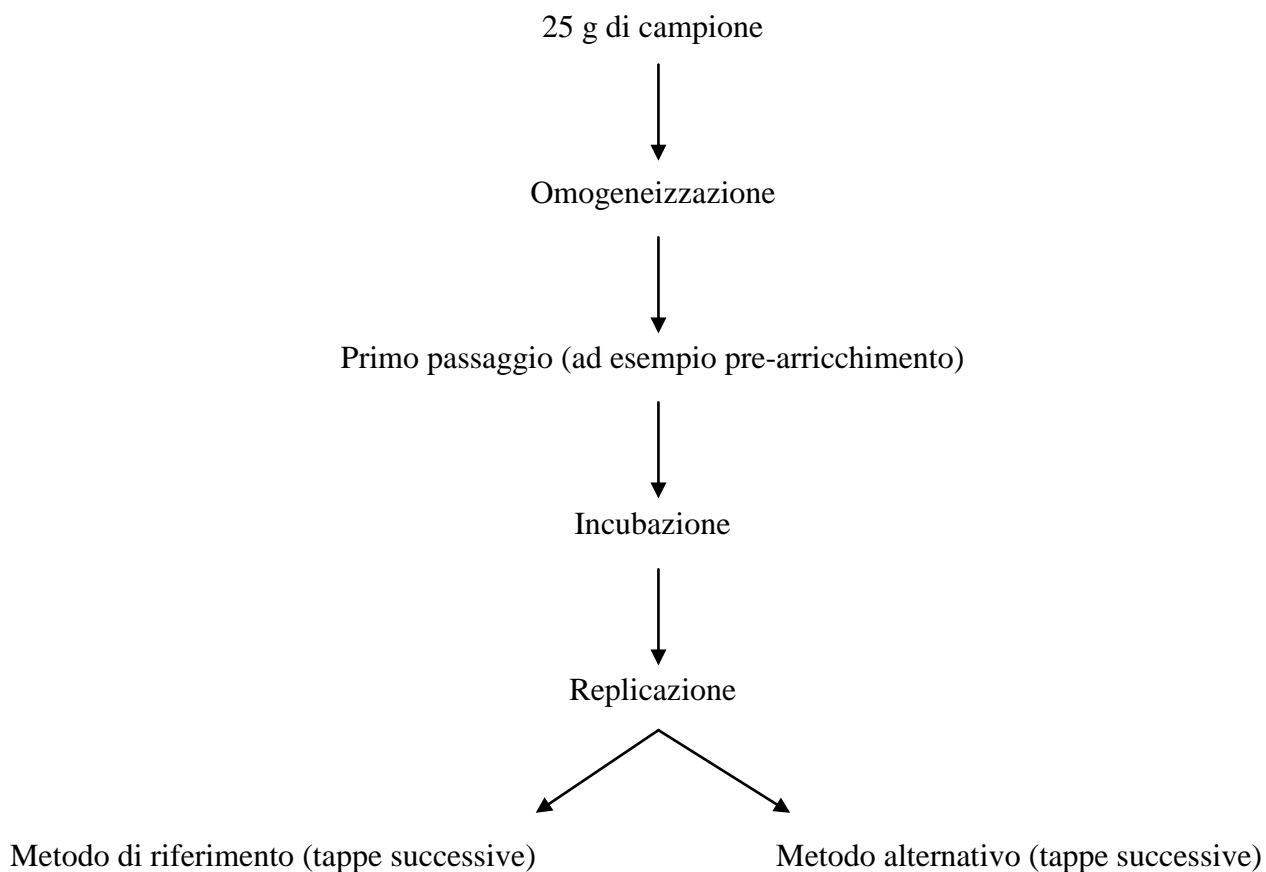
I campioni ambientali possono essere ricondotti in una categoria a parte.

L'origine dei campioni deve essere la più varia possibile, in modo da limitare gli errori sistematici legati alla matrice alimentare, per esempio una specialità locale, e allargare il più possibile il campo di validazione.

Preparazione e analisi dei campioni

Ogni campione è analizzato sia con il metodo di riferimento sia con il metodo alternativo, in fase di validazione.

Per ridurre al minimo l'incertezza legata alla procedura di contaminazione del campione è bene che i due metodi abbiano in comune le fasi iniziali del processo di prova, secondo il seguente schema:



I livelli di contaminazione, sia naturale, che artificiale, devono essere paragonabili a quelli che normalmente si possono ritrovare nelle varie tipologie di campioni.

Il numero di campioni analizzato, per ogni categoria di alimenti e per ogni metodo analitico (alternativo e di riferimento), deve essere pari a 60, equamente suddiviso tra le varie tipologie (alimenti crudi, trattati termicamente seccati fermentati etc.). Le prove da effettuare per una validazione primaria sono perciò tantissime, almeno 300.

E' raccomandato anche che sia analizzato un 50% di campioni positivi e un 50% di campioni negativi (tuttavia non è prescritta una percentuale fissa).

Ove non sia possibile seguire lo schema precedente, in quanto il metodo alternativo differisce dal metodo normato sin dalle prime fasi analitiche, occorre preparare un campione da suddividere in due parti, in modo tale che le caratteristiche del campione si conservino il più simili possibile in entrambe le aliquote.

In particolare, per i prodotti solidi, è necessario prelevare 50 g di campione e risospenderli in 50 ml di acqua o altro diluente appropriato, omogenearlo accuratamente e poi ripartire il campione così preparato in due aliquote che conterranno ciascuna 25g di alimento e 25 ml di diluente. E' necessario procedere al primo passaggio, nel terreno o brodo di coltura, in modo tale da mantenere

un corretto rapporto massa/volume, normalmente di 1:10 (25g di campione + 225 ml di brodo di arricchimento o diluente).

Se il campione è liquido, si può omogenare direttamente 50 ml di campione stesso, per poi suddividerlo in due aliquote da 25 ml, che rappresentano il campione di partenza.

Calcoli e interpretazione dei risultati

I parametri da prendere in considerazione per elaborare i risultati della validazione primaria e dare un giudizio di validità del metodo alternativo rispetto al metodo di riferimento sono:

- Accuratezza relativa, intesa come il livello di corrispondenza tra i risultati ottenuti con il metodo di riferimento e quelli ottenuti con il metodo alternativo su un campione identico;
- Sensibilità relativa, intesa come la capacità del metodo alternativo di rilevare il microrganismo target quando il metodo di riferimento lo rileva e quindi il risultato dell'analisi è positivo;
- Specificità relativa, intesa come la capacità del metodo alternativo di non rilevare l'organismo target quando il metodo di riferimento non lo rileva e quindi il risultato della prova è negativo.

I risultati ottenuti con entrambi i metodi devono essere raccolti in una tabella.

Risposta	Metodo di riferimento (R+)	Metodo di riferimento (R-)
Metodo alternativo (A+)	Accordo positivo PA (R+/A+)	Deviazione positiva PD (R-/A+)
Metodo alternativo (A-)	Deviazione negativa ND (R+/A-)	Accordo negativo NA (R-/A-)

Tabella 1 ISO 16140:2003: coppia dei risultati del metodo di riferimento e del metodo alternativo

Il numero dei risultati negativi ottenuti con il metodo di riferimento, utilizzati per i calcoli, non devono essere superiori al doppio del numero di risultati positivi.

$$\text{Accuratezza relativa: } AC = \frac{(PA + NA)}{N} \times 100\%$$

$$\text{Specificità relativa: } SP = \frac{NA}{N-} \times 100\%$$

$$\text{Sensibilità relativa: } SE = \frac{PA}{N+} \times 100\%$$

N è il numero totale di campioni ($NA + PA + PD + ND$)

$N-$ è il numero totale di risultati negativi ottenuti con il metodo di riferimento ($NA + PD$)

$N+$ è il totale di risultati positivi ottenuti con il metodo di riferimento ($PA + ND$)

Intervallo di confidenza

Calcolare l'intervallo di confidenza (IC) per AC , SE e SP espressi in percentuale (p):

- se $10\% < p < 90\%$ allora è possibile calcolare l'intervallo di confidenza (IC) al 95% con la seguente formula:

$$IC (95\%) \approx p \pm 2 \sqrt{\frac{p(1-p)}{n}}$$

Dove $n = N, N+, N-$ rispettivamente per $p (\%) = AC, SE, SP$;

- se $p > 90\%$ calcolare il più basso limite di confidenza al 95% con $n \cong N, N+, N-$ rispettivamente per $p (\%) = AC, SE, SP$

	n =	10	20	30	40	50	60
p =	0,90	0,75	0,83	0,82	0,84	0,83	0,84
p =	0,92	0,85	0,83	0,85	0,86	0,87	0,88
p =	0,94	0,85	0,88	0,88	0,89	0,89	0,89
p =	0,96	0,85	0,93	0,92	0,91	0,93	0,93
p =	0,98	0,95	0,93	0,95	0,96	0,95	0,96
p =	0,99	0,95	0,98	0,98	0,96	0,97	0,98

Tabella E.1 dell'Allegato E della ISO Norma 16140:2003.

Ad esempio: $n = 20, p = 94\%$ allora il limite di confidenza inferiore = 88%

Risultati discordanti

Per studiare i risultati discordanti è necessario prendere in considerazione la deviazione positiva (PD) e la deviazione negativa (ND) secondo le indicazioni dell'Allegato F della norma ISO 16140:2003 (test di Mc Nemar).

Calcolare il numero totale di risultati discordanti $Y = PD+ND$ (ad es. $PD = 2, ND = 10, Y = 12$)

Verificare se i due metodi siano differenti per il rapporto sensibilità specificità :

Se $Y < 6$ (meno di 6 risultati discordanti) non ci sono calcoli statistici in grado di determinare se i due metodi sono statisticamente diversi per il rapporto sensibilità specificità o meno.

Se $6 \leq Y \leq 22$ (numero di risultati discordanti compreso tra 6 e 22) determinare m come il più piccolo dei due valori PD e ND (nell'esempio $PD = 2$), e utilizzare la legge binomiale conformemente alla tabella F.1 (Allegato F Norma ISO 16140:2003):

Se $m \leq M$ allora i due metodi sono differenti (con $\alpha < 0,05$ bilaterale)

Risultati discordanti Y = PD + ND	6-8	9-11	12-14	15-16	17-19	20-22
M = Max (m) con $\alpha < 0,05$	0	1	2	3	4	5

Tabella F.1 dell'Allegato F della ISO Norma 16140:2003

Per esempio, con Y = 12 risultati discordanti e $m = 2$, $M = 2$, $m \leq M$ di conseguenza i due metodi sono diversi con $p < 0,05$.

Se $Y > 22$, quindi con più di 22 risultati discordanti, utilizzare il test di McNemar con la distribuzione del chi quadro (χ^2) per 1 grado di libertà:

$$\chi^2 = d^2/Y, \text{ con } d = |PD-ND| \text{ e } Y = PD + ND$$

I due metodi sono diversi per $\alpha < 0,05$ (bilaterale) se $\chi^2 > 3,841$

Per ogni Y, d deve essere \geq ai valori indicati nella tabella F.2 (Allegato F ISO 16140:2003), per poter concludere che i due metodi sono differenti.

Risultati discordanti Y = PD + ND	22-26	27-31	35-37	38-44	45-51	52-58
d = PD-ND \geq	10	11	12	13	14	15

Tabella F.2 dell'Allegato F della ISO Norma 16140:2003

I risultati devono essere presentati in una tabella riassuntiva per poter procedere alla loro interpretazione.

Deve essere fornita anche una tabella contenente tutti i dati grezzi utilizzati per i calcoli statistici.

La capacità del metodo alternativo di fornire un numero di risultati positivi superiore o inferiore al metodo di riferimento deve essere valutata tenendo conto del numero delle deviazioni positive e negative.

Il rapporto sullo studio di validazione deve presentare in maniera distinta i risultati ottenuti sui campioni naturali e su quelli contaminati artificialmente nel laboratorio.

Deve essere inoltre descritto nel dettaglio il protocollo utilizzato per la contaminazione artificiale dei campioni.

Livello di determinazione relativo

Il livello di determinazione relativo corrisponde, nella ISO 16140:2003, al numero più basso di microrganismi target coltivabili che è possibile determinare nel campione, con una probabilità del 50%, sia con il metodo di riferimento che con il metodo alternativo (ISO 16140:2003).

Per calcolare il livello di determinazione relativo è necessario procedere nel seguente modo:

- 1) Utilizzare una categoria alimentare per ciascuna matrice (in funzione del campo di validazione).
- 2) Utilizzare almeno un microrganismo target per ciascuna matrice/categoria alimentare (secondo le indicazioni dell'Allegato G della ISO 16140:2003).
- 3) Utilizzare se possibile cinque livelli di contaminazione, e comunque almeno tre, di un microrganismo target per categoria di alimento, più il controllo negativo, secondo lo schema:
 - primo livello = controllo negativo
 - secondo livello = livello teorico di determinazione (ad es. 1 microrganismo in 25 g)
 - terzo livello = appena sopra il livello teorico di determinazione
 - gli altri livelli si devono situare tutti sopra il livello teorico di determinazione (con un fattore di diluizione pari a tre).
- 4) Replicare almeno sei volte ciascuna combinazione microrganismo target/categoria alimentare, sia con il metodo di riferimento che con il metodo da validare.

Per garantire una migliore precisione dell'inoculo a livello di contaminazione più bassa si può aumentare, se necessario, la quantità di campione di alimento analizzato (ad es. inoculare tre cellule in 75 g/ml di alimento).

Maggiore è il numero di livelli di inoculo utilizzati e migliore sarà la precisione del calcolo del livello di determinazione relativo.

Per ogni livello di contaminazione (L_i con i =da 0 a 3) e per ogni combinazione alimento/microrganismo ($j=1$ a 5), paragonare i due metodi e calcolare il livello relativo di determinazione.

		Risultati		
		Negativi	Positivi	totali
Metodo	Riferimento	a	n-a	n = 6
	Alternativo	b	n-b	n = 6
	Totale	a+b	2n - (a+b)	2n = 12

Tabella 3 ISO 16140:2003

Per ciascuna tabella 2 per 2 eseguire il test di Fisher.

Indicare tutte le differenze significative tra i metodi, le categorie di alimenti, i microrganismi e i livelli di inoculo.

Il livello di determinazione relativo è espresso come l'intervallo tra due livelli consecutivi di contaminazione nei quali si hanno rispettivamente più o meno del 50% del livello di determinazione.

$a > 50\% n$

$a < 50\% n$

Selettività (inclusività ed esclusività)

L'inclusività è la capacità del metodo alternativo di rilevare il microrganismo target tra un vasto e appropriato gruppo di microrganismi presenti nel campione (ISO 16140:2003).

L'esclusività è l'assenza di interferenza nel metodo da parte di un vasto e appropriato gruppo di microrganismi non target presenti nel campione (ISO 16140:2003).

I microrganismi scelti per effettuare queste prove devono essere tutti ben caratterizzati biochimicamente, sierologicamente ed eventualmente geneticamente, e devono essere in numero sufficiente per garantire di escludere errori sistematici. Inoltre, dovrebbero essere isolati dagli alimenti o categorie di alimenti su cui viene effettuata la validazione.

Devono essere saggiate almeno 50 colture pure di microrganismi target e almeno 30 colture pure di microrganismi non target, ma che possono essere normalmente presenti nei prodotti alimentari per cui è stato sviluppato il metodo in corso di validazione.

L'inoculo del brodo di arricchimento viene fatto a partire da colture pure dei microrganismi scelti, senza l'aggiunta dell'alimento, a un livello pari a 10-100 volte il livello minimo di determinazione relativa. Tutte le prove vengono eseguite sia con il metodo di riferimento che con il metodo alternativo.

Per procedere a una corretta interpretazione, i risultati devono essere presentati sotto forma di tabella (risultati attesi / risultati ottenuti).

Il metodo alternativo viene giudicato valido se i risultati ottenuti coincidono con i risultati attesi.

Validazione primaria attraverso studi interlaboratorio

In uno studio interlaboratorio vengono analizzati gli stessi campioni in più laboratori diversi, almeno 10, scelti con criteri restrittivi, in base alla loro esperienza e alla qualifica del personale.

Devono avere comprovata competenza nell'eseguire entrambi i metodi, quello di riferimento e quello alternativo.

L'allegato H della Norma ISO 16140:2003 riporta le linee guida per l'organizzazione e la gestione degli studi collaborativi interlaboratorio, specificandone tutti gli aspetti, dalla preparazione del campione, al suo trasporto, fino agli aspetti analitici veri e propri.

Al termine dello studio devono essere ottenuti, per ciascuna categoria alimentare sottoposta a validazione, 480 risultati (240 per ciascun metodo), derivanti da combinazioni tra numero di laboratori (almeno 10), numero di repliche per laboratorio (almeno 8), livelli di inoculo (almeno 3) che vengono elaborati come in precedenza indicato per calcolare i valori di:

- Accuratezza relativa;
- Sensibilità relativa;
- Specificità relativa.

Il laboratorio organizzatore deve poi procedere agli studi relativi al livello di determinazione, inclusività ed esclusività, come precedentemente indicato.

Validazione secondaria

La validazione secondaria (o verifica) serve a stabilire se il laboratorio è in grado di rispettare le specifiche di un metodo, alternativo o di riferimento, stabilite nel corso della validazione primaria del metodo stesso. Si tratta quindi di valutare la competenza del laboratorio e non le caratteristiche del metodo analitico (ISO 13843:2003).

Come primo passo, per una validazione secondaria, si possono utilizzare i risultati derivanti dalla partecipazione ad un circuito di controllo qualità esterno.

La validazione secondaria utilizza forme selezionate e semplificate degli stessi procedimenti utilizzati nella validazione primaria. Non ci sono indicazioni precise sul numero di campioni, ma indicativamente è accettabile un numero statisticamente significativo di ripetizioni, di solito almeno 10, per ogni matrice considerata nel campo di validazione del metodo. La raccolta dei dati di validazione deve essere fatta su un lungo periodo di tempo in modo da raccogliere tutta la variabilità possibile all'interno del laboratorio, in termini di personale, attrezzature, lotti di reattivi, apparecchiature utilizzate.

Per quanto riguarda i metodi alternativi validati da un organismo internazionale, come l'AFNOR, è sufficiente considerare, come parametri di qualità della prestazione, l'accuratezza, la sensibilità e specificità relative e verificare che i valori ottenuti in laboratorio rientrino entro quelli indicati nel certificato di validazione del metodo. Se i risultati sono conformi a quanto indicato nel rapporto di validazione primaria, si ritiene che il laboratorio sia in grado di eseguire il metodo alternativo validato e quindi si fa riferimento, per quel che riguarda tutti gli altri parametri tecnici caratterizzanti il metodo, ai valori indicati nel rapporto di validazione.

Scopo della tesi

Le malattie di origine alimentare sono un problema centrale per la salute pubblica, anche se la loro incidenza a livello globale è probabilmente sottostimata a causa della mancanza di un sistema di controllo e notifica adeguato e armonizzato, in particolare nei paesi del terzo mondo (dati WHO, CDC, EFSA).

I laboratori ufficiali, che svolgono controlli sugli alimenti e sull'acqua destinata al consumo umano, devono, di regola, utilizzare metodiche analitiche accreditate e pubblicate in leggi o norme internazionali (Reg CE 882/2004). Le metodiche tradizionali, basate su tecniche colturali classiche che prevedono la ricerca, l'isolamento e la successiva identificazione e caratterizzazione dei microrganismi patogeni rilevati, sono spesso complesse e richiedono molti giorni per giungere a un risultato analitico definitivo: tipicamente due o tre giorni in caso di negatività o di identificazione preliminare, fino a oltre una settimana se il risultato analitico è positivo. Inoltre, i metodi tradizionali a volte hanno una bassa sensibilità in quanto risultati falsi negativi possono derivare dalla presenza di microrganismi vitali, ma non coltivabili, a causa delle condizioni non ottimali per la loro crescita, in cui spesso si trovano in matrici alimentari o ambientali (Law et al. 2015).

In questa tesi si confrontano le caratteristiche prestazionali delle tecniche colturali classiche, descritte in norme internazionali, e dei kit validati AFNOR, basati sulla Real Time PCR, per la determinazione di alcuni batteri patogeni, responsabili di infezioni e tossinfezioni alimentari, quali *Salmonella* spp, *L. monocytogenes*, *E. coli* O157. Questi microrganismi sono indicati come criteri di sicurezza alimentare nel Regolamento CE 2073/2005, nel quale sono elencati anche i metodi analitici di riferimento. Nello stesso regolamento si fa cenno alla possibilità di utilizzare metodi alternativi, a condizione che abbiano delle caratteristiche di performance almeno pari a quelli dei metodi di riferimento.

Si è estesa la sperimentazione anche alla specie *Y. enterocolitica*. Negli ultimi due anni, infatti, nell'ambito del Piano Regionale Integrato dei Controlli (PRIC) della Regione Valle d'Aosta, sono stati analizzati alcuni campioni di verdure confezionate pronte all'uso, per la determinazione della contaminazione dei microrganismi patogeni sopraindicati, tra cui *Y. enterocolitica*, che rappresenta in Europa la terza causa di malattie enteriche di origine batterica (Rusak et al. 2014; EFSA, 2015). Questo batterio è ampiamente diffuso in natura, nell'acqua e negli animali, tra i quali il maiale è il più importante serbatoio e veicolo di trasmissione per l'infezione umana (Lambertz et al. 2008; Bonardi et al. 2013).

Il genere *Yersinia*, appartenente alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, si distingue in quindici specie tra le quali *Y. enterocolitica* è la causa prevalente di malattia nell'uomo e negli animali.

Questa è anche la specie più eterogenea, se ne distinguono infatti alcuni sierotipi e sei biotipi. La maggior parte dei ceppi patogeni appartengono ai biotipi 1B, 2,3,4 e 5, mentre i ceppi ambientali, non patogeni per l'uomo e gli animali, appartengono al biotipo 1A (Paixão et al. 2012).

La virulenza dei biotipi patogeni è legata alla presenza di geni plasmidici e cromosomici. Il plasmide di virulenza di *Yersinia* (pYV) codifica per l'adesina A (*YadA*), la proteina esterna (*Yops*) e il gene regolatore di trascrizione (*virF*). I geni di virulenza cromosomici includono il gene invasina (*inv*), il locus di attacco e invasione (*ail*), l'enterotossina termostabile A (*ystA*) e il fattore mucoide A (*myfA*). Alcuni di questi fattori di virulenza, come *ail*, *ystA* e *myfA*, sono espressi esclusivamente nei ceppi patogeni, portatori del plasmide pYV, mentre altri, come il gene *inv*, sono presenti anche nei ceppi ambientali non patogeni (Paixão et al. 2012).

Il gene cromosomico *ail* è comunemente usato come target per la rilevazione dei ceppi patogeni di *Y. enterocolitica* negli alimenti, in quanto si trova esclusivamente nei ceppi epidemiologicamente correlati con la malattia umana ed è quindi un importante marcatore di virulenza. (Huang et al. 2010; Kraushaar et al. 2011).

I kit disponibili in commercio per *Yersinia* non sono validati, a differenza di quelli per la determinazione di altri patogeni più frequentemente ricercati negli alimenti. La validazione primaria deve essere fatta tramite il confronto del metodo alternativo con un metodo colturale di riferimento, che sia altamente performante. Tuttavia al momento, come si evince sia dall'esperienza maturata nel nostro laboratorio, sia da fonti bibliografiche, questo non è disponibile per *Y. enterocolitica* (Lambertz et al. 2008; Van Damme et al. 2013). Lo scopo della tesi, relativamente a questo patogeno, è stato quindi quello di effettuare una serie di prove per la messa a punto del metodo in Real Time PCR, in vista di una sua validazione primaria.

MATERIALI E METODI

Le prove sono state condotte nell'arco di due anni nel laboratorio di microbiologia dell'ARPA Valle d'Aosta. I campioni utilizzati sono stati tutti precedentemente analizzati per verificare, tramite il metodo colturale di riferimento, che fossero negativi per il patogeno ricercato. Si è trattato, nella maggior parte dei casi, di campioni analizzati nell'ambito del PRIC (piano regionale integrato dei controlli) Regione Valle d'Aosta, successivamente contaminati da sospensioni batteriche preparate a partire da ceppi batterici certificati.

Attrezzatura utilizzata

L'attrezzatura utilizzata, presente nel laboratorio, è conforme alle specifiche richieste nella ISO 7218:2007/Amd.1:2013 "*Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations*", sottoposta regolarmente a taratura e manutenzione ordinaria. Si riporta di seguito un elenco sintetico dell'attrezzatura utilizzata.

Analisi microbiologica colturale:

- Bilancia tecnica (Kern, Germany)
- Stomacher (PBI International, Italia)
- Incubatori termostatici (PBI International, Italia)
- Bagno termostatico (PBI International, Italia)
- Vortex (PBI International, Italia)
- Agitatore magnetico (PBI International, Italia)
- Cappa a flusso laminare (Bio air, Italia)
- Autoclave (Fedegari, Italia)
- pHmetro (Crison, Spagna)

PCR:

- Micropipette da 20, 200 e 1000 (Eppendorf, Germany)
- Microcentrifuga (Eppendorf, Germany)
- Blocco riscaldante modulare (Barnstead International, USA)
- Cell disruptor "Disruptor Genie" (Scientific Industries, USA)
- Termociclatore iCycler (Bio-Rad, USA)

- Modulo lettore multicanali iQ5 (Bio-Rad, USA)

Scelta delle matrici da sottoporre a prova

La Norma ISO 16140:2003 indica le matrici su cui devono essere effettuate le prove di validazione di un metodo alternativo.

Tuttavia è possibile raggruppare più matrici con caratteristiche simili, come indicato dalla norma ISO ISO/TS 19036:2006 “Microbiology of food and animal feeding stuffs - Guidelines for the estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations”, in modo tale da diminuire il numero di prove che è necessario effettuare per la validazione primaria o la convalida di un metodo analitico.

La classificazione delle matrici utilizzata nel laboratorio ARPA VdA è la seguente:

- Categoria I): liquidi e polveri (ad esempio latte, latte di cocco, latte disidratato)
- Categoria II): solidi ben miscelati (ad esempio carne macinata, carne per salsicce, gelati, panna montata, crema di soia)
- Categoria III): solidi di piccole dimensioni (ad esempio funghi disidratati, carote grattugiate, cereali, insalata)
- Categoria IV): altri solidi (carne non tritata, formaggi, prodotti di pasticceria)

Per la convalida dei metodi *E. coli* O157:H7 e *Yersinia enterocolitica*, sono stati analizzati solo campioni di verdure fresche pretagliate, detti anche prodotti di IV gamma, come richiesto nel PRIC.

Ceppi batterici utilizzati

I ceppi batterici utilizzati sono tutti ceppi certificati da organismi internazionali e acquistati da ditte specializzate, in varie formulazioni (lenticole, matrici certificate, loops). Le colture di riferimento preparate nel nostro laboratorio, vengono conservate a -20°C con il sistema di mantenimento e trasporto dei ceppi microbici “MICROBANK™” (Biolife italiana, Italia), secondo le indicazioni del produttore ed utilizzati sempre secondo le medesime istruzioni.

I ceppi batterici utilizzati per le varie prove sono i seguenti:

- *Enterococcus faecalis* ATCC® 29212 (OXOID, UK)
- *Salmonella enterica subsp. enterica* ATCC 13076 (OXOID, UK)
- *Escherichia coli* O157 NCTC 12900 (OXOID, UK)
- *Yersinia enterocolitica* NCTC 11176 (OXOID, UK)

- *Listeria monocytogenes* (serotype 1) ATCC® 19111 (Biogenetics, Italia)
- *Listeria ivanovii* ATCC® 19119 (Biogenetics, Italia)
- *Listeria innocua* ATCC® 33090 (OXOID, UK)
- *Rhodococcus equi* ATCC® 6939 (OXOID, UK)
- *Escherichia coli* ATCC® 25922 (OXOID, UK)
- *Staphylococcus aureus* ATCC® 25923 (OXOID, UK)
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC® 27853(OXOID, UK)

Preparazione degli inoculi e dei campioni da sottoporre a prova

Gli inoculi dei ceppi batterici sono preparati partendo da una coltura di 24 ore in terreno nutritivo solido non selettivo, come il Nutrient agar (Biolife) o il TSYEA agar (OXOID, UK), del microrganismo target o interferente. Si stempera un'ansata di tale coltura in una provetta di soluzione fisiologica sterile, in modo da ottenere una torbidità pari allo 0,5 del McFarland Standard (OXOID, UK), corrispondente a una sospensione batterica con una concentrazione approssimativa di 10^8 batteri per ml. Si procede poi a diluizioni seriali 1:10 in soluzione fisiologica sterile (o nel diluente utilizzato per le analisi), e si ottengono le sospensioni a una concentrazione idonea allo scopo della prova.

E' necessario eseguire ogni volta un controllo della quantità di batteri inoculati, seminando un ml delle sospensioni 10^2 e 10^1 cellule/ml, in piastre Petri con terreno di coltura non selettivo (ad esempio PCA), incubate per 24-48 ore in termostato, alla temperatura di crescita ottimale per i ceppi inoculati. Il livello di inoculo è calcolato come la media ponderata dei conteggi ottenuti.

I campioni, delle varie matrici alimentari, sono pesati direttamente nelle buste sterili da Stomacher, in rapporto 1:10 peso/volume tra campione e brodo di arricchimento, normalmente 25 g in 225 ml e quindi omogenati in Stomacher (1 minuto e mezzo a 230 rpm). Si procede a questo punto all'inoculo delle sospensioni batteriche, nella misura di 1 ml per ciascun livello da saggiare per busta da Stomacher/aliquota (ISO 16140:2003): si ottiene in questo modo una contaminazione di $10^x/25$ g di campione.

Nel caso in cui il primo passaggio di arricchimento differisca, tra i due metodi a confronto, si è scelto di pesare due aliquote da 25 g ciascuna separatamente, omogenare nell'adeguato volume di brodo di arricchimento, e successivamente inoculare le buste sterili da Stomacher a partire dalla stessa sospensione batterica, vortexando brevemente la provetta tra un inoculo e l'altro.

Schema per *Salmonella* spp e *Listeria monocytogenes*

Sono state eseguite prove confrontando il metodo colturale di riferimento e il metodo alternativo in Real Time PCR su campioni naturali, contaminati in laboratorio con diversi livelli di sospensione batterica, non contaminati (negativi) e campioni artificiali derivati da circuiti interlaboratorio, con lo scopo di:

- confrontare i valori di accuratezza, sensibilità e specificità relativa ottenuti con quelli indicati nei report di validazione AFNOR dei kit Bio-Rad;
- confrontare i risultati di amplificazione del DNA appena estratto (G_0) e conservato per 24 h (G_1) e 48 h (G_2) in congelatore a -20°C , come previsto dal metodo alternativo, con lo scopo di ottimizzare l'uso dei reattivi presenti nel kit e del tempo impiegato per la PCR;
- confrontare i risultati ottenuti da due operatori abilitati ad eseguire le prove, con lo scopo di valutare la riproducibilità del metodo e la performance degli analisti.

Tabella 7: prove eseguite per *Salmonella* spp.

Matrice	Livelli di inoculo target	Microrganismi interferenti	Tipo di prova
Campioni non contaminati		Microflora naturale presente nel campione	Confronto PCR/metodo colturale
Pasticcini al cioccolato (altri solidi)	10^4 (3.600 u.f.c.) 10^3 (360 u.f.c.) 10^2 (36 u.f.c.)	<i>E. coli</i> 10^3 (1200 u.f.c.)	Confronto PCR/metodo colturale Confronto $G_0/G_1/G_2$
Budino di soia (solidi ben miscelati)	10^1 (3,6 u.f.c.) 10^0 (0,36 u.f.c.) 0 (non inoculato)		
Latte in polvere (liquidi e polveri)	10^1 (8 u.f.c.) 10^0 (1 u.f.c.) 0 (non inoculato)	<i>E. coli</i> 10^2 (43 u.f.c.) <i>E. faecalis</i> 10^2 (40 u.f.c.)	Confronto PCR/metodo colturale Confronto $G_0/G_1/G_2$
Germogli di soia (solidi di piccole dimensioni)	10^2 (466 u.f.c.) 10^1 (47 u.f.c.) 10^0 (4,7 u.f.c.) 0 (non inoculato)	<i>E. coli</i> 10^2 (103 u.f.c.)	Confronto PCR/metodo colturale Confronto $G_0/G_1/G_2$
Crema pasticcera (solidi ben miscelati)	10^3 (970 u.f.c.) 10^2 (97 u.f.c.) 10^1 (9,7 u.f.c.) 0 (non inoculato)	<i>E. coli</i> 10^2 (98 u.f.c.) <i>P. aeruginosa</i> 10^2 (230 u.f.c.)	confronto risultati di due operatori
Insalata capricciosa (solidi di piccole dimensioni)	10^3 (2.800 u.f.c.) 10^2 (280 u.f.c.)	<i>E. coli</i> 10^2 (24 u.f.c.) <i>P. aeruginosa</i> 10^2 (115)	confronto risultati di due operatori

	10 ¹ (28 u.f.c.) 0 (non inoculato)	u.f.c.)	
--	--	---------	--

Tutte le prove sono state eseguite in parallelo con il metodo colturale di riferimento, per un totale di 229 campioni.

Tabella 8: prove eseguite per *L. monocytogenes*

Matrice	Livelli di inoculo target	Microrganismi interferenti	Tipo di prova
Campioni non contaminati		Microflora naturale presente nel campione	Confronto PCR/metodo colturale
Pasticcini al cioccolato (altri solidi)	10 ⁴ (1.400 u.f.c.) 10 ³ (140 u.f.c.) 10 ² (14 u.f.c.) 10 ¹ (1,4 u.f.c.) 10 ⁰ (0,14 u.f.c.) 0 (non inoculato)	<i>E. coli</i> 10 ² (15 u.f.c.) <i>E. faecalis</i> 10 ² (40 u.f.c.)	Confronto PCR/metodo colturale Confronto G ₀ /G ₁ /G ₂
Latte in polvere (liquidi e polveri)	10 ² (860 u.f.c.) 10 ¹ (86 u.f.c.) 10 ⁰ (8,6 u.f.c.) 0 (non inoculato)	<i>E. coli</i> 10 ² (44 u.f.c.) <i>E. faecalis</i> 10 ² (41 u.f.c.) <i>L. innocua</i> 10 ² (240 u.f.c.)	Confronto PCR/metodo colturale Confronto G ₀ /G ₁ /G ₂
Germogli di soia (solidi di piccole dimensioni)	10 ² (250 u.f.c.) 10 ¹ (25 u.f.c.) 10 ⁰ (2,5 u.f.c.) 0 (non inoculato)	<i>E. coli</i> 10 ² (190 u.f.c.) <i>E. faecalis</i> 10 ² (44 u.f.c.) <i>L. innocua</i> 10 ² (250 u.f.c.)	Confronto PCR/metodo colturale Confronto G ₀ /G ₁ /G ₂
Crema pasticcera (solidi ben miscelati)	10 ³ (9.700 u.f.c.) 10 ² (970 u.f.c.) 10 ¹ (9,7 u.f.c.) 0 (non inoculato)	<i>E. coli</i> 10 ² (190 u.f.c.) <i>L. innocua</i> 10 ² (1180 u.f.c.)	confronto risultati di due operatori
Insalata capricciosa (solidi di piccole dimensioni)	10 ³ (2.160 u.f.c.) 10 ² (216 u.f.c.) 10 ¹ (21,6 u.f.c.) 0 (non inoculato)	<i>E. coli</i> 10 ² (32 u.f.c.) <i>L. innocua</i> 10 ² (250 u.f.c.)	confronto risultati di due operatori

Tabella 8: Prove eseguite per *L. monocytogenes*

Sono stati analizzati 226 campioni in parallelo, con il metodo di riferimento e con il metodo alternativo.

Schema per *E. coli* O157: H7

Sono state analizzate solo verdure di IV gamma (categoria: solidi di piccole dimensioni), secondo la programmazione del PRIC.

Sono state eseguite prove confrontando il metodo colturale di riferimento e il metodo alternativo in Real Time PCR su campioni naturali, contaminati in laboratorio con diversi livelli di sospensione batterica o non contaminati, per un totale di 142 campioni, con lo scopo di:

- confrontare due diversi brodi di arricchimento, quello previsto dal metodo di riferimento colturale, mTSB + Novobiocina, e il BPW, come indicato nel kit Bio-Rad
- confrontare i valori di accuratezza, sensibilità e specificità relativa con quelli indicati nei report di validazione AFNOR del kit Bio-Rad;
- confrontare i risultati ottenuti da due operatori abilitati ad eseguire le prove, con lo scopo di valutare la riproducibilità del metodo e la performance degli analisti.

Tabella 9 : prove eseguite per *E. coli* O157: H7

Matrice	Livelli di inoculo target	Microrganismi interferenti	Tipo di prova
Campioni non contaminati (prodotti di IV gamma)		Flora interferente presente nel campione non contaminato	Confronto PCR/metodo colturale.
Insalata mista confezionata (prodotti di IV gamma)	10 ² (104 u.f.c.) 0 (non inoculato)	Flora interferente presente nel campione non contaminato	Confronto PCR/metodo colturale. Confronto mTSB/BPW
Insalata valeriana confezionata (prodotti di IV gamma)	10 ¹ (7 u.f.c.) 0 (non inoculato)	Flora interferente presente nel campione non contaminato	Confronto PCR/metodo colturale
Insalata mista con carote confezionata (prodotti di IV gamma)	10 ² (100 u.f.c.) 10 ¹ (10 u.f.c.) 10 ⁰ (1 u.f.c.) 0 (non inoculato)	Flora interferente presente nel campione non contaminato	confronto risultati di due operatori

Non è stato effettuato il confronto tra le PCR eseguite da campione appena estratto e da DNA conservato in congelatore ed analizzato in giorni successivi, in quanto il metodo prevede una conferma immediata del risultato positivo.

Schema per *Yersinia enterocolitica*

Confronto tra il metodo colturale ISO 10273:2003 e il metodo RT-PCR, messo a punto in laboratorio, utilizzando un kit di estrazione e un kit per la reazione di PCR.

Il campione viene arricchito, prima di eseguire l'estrazione del DNA e la successiva amplificazione e rilevazione, ad una temperatura di $30 \pm 1^\circ\text{C}$, superiore a quella indicata dal metodo colturale ISO 10273:2003. Tale temperatura è stata scelta perché corrisponde alla temperatura ottimale di crescita di *Y. enterocolitica*. Ciò ha permesso di accorciare il tempo di incubazione a 48 ore e diminuire quindi sensibilmente i tempi di risposta. A partire dalla busta di ciascun tipo di arricchimento, si è inoltre proceduto all'isolamento su terreno solido selettivo ed alle successive prove di identificazione biochimica e ricerca delle caratteristiche di patogenicità.

Tabella 10: prove eseguite per *Y. enterocolitica*

Matrice	Livelli di inoculo target	Microrganismi interferenti	Tipo di prova
Campioni non contaminati (prodotti di IV gamma)		Flora interferente presente nel campione non contaminato	Confronto PCR/metodo colturale.
Insalata mista confezionata (prodotti di IV gamma)	10 ² (92 u.f.c.) 10 ¹ (9.2 u.f.c.) 10 ⁰ (0.92 u.f.c.) 0 (non inoculato)	Flora interferente presente nel campione non contaminato	Confronto PCR/metodo colturale.
Insalata valeriana confezionata (prodotti di IV gamma)	10 ⁶ (6.900.000 u.f.c.) 10 ⁵ (690.000 u.f.c.) 10 ⁴ (69.000 u.f.c.) 10 ³ (6.900 u.f.c.) 10 ² (690 u.f.c.) 10 ¹ (69 u.f.c.) 0 (non inoculato)	Flora interferente presente nel campione non contaminato	Confronto PCR/metodo colturale.
Insalata mista confezionata con carote (prodotti di IV gamma)	10 ⁶ (4.200.000 u.f.c.) 10 ⁵ (420.000 u.f.c.) 10 ⁴ (42.000 u.f.c.) 10 ³ (4.200 u.f.c.) 10 ² (420 u.f.c.) 10 ¹ (42 u.f.c.) 0 (non inoculato)	Flora interferente presente nel campione non contaminato	Confronto PCR/metodo colturale.

Carote pretagliate (prodotti di IV gamma)	10 ⁶ (1.514.000 u.f.c.)	Flora interferente presente nel campione non contaminato	Confronto PCR/metodo colturale.
	10 ⁵ (151.400 u.f.c.)		
	10 ⁴ (15.140 u.f.c.)		
	10 ³ (1.540u.f.c.)		
	10 ² (150 u.f.c.)		
	10 ¹ (15 u.f.c.)		
	0 (non inoculato)		

Sono stati analizzati, escludendo le prove preliminari necessarie per messa a punto del metodo, 29 campioni

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).

Salmonella spp

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

La determinazione di *Salmonella* necessita di quattro successivi passaggi. *Salmonella* spp, infatti, può contaminare in basso numero il campione analizzato ed è spesso accompagnata da un elevato numero di altre *Enterobacteriaceae*, o da batteri di altre famiglie. E' perciò necessario un pre-arricchimento, che permette di rilevare le Salmonelle in basso numero, o stressate da condizioni di crescita non ottimali (pH, temperatura, aw).

L'analisi è eseguita secondo il seguente schema:

1. Pre-aricchimento in terreno liquido non selettivo (Buffered Peptone Water, Lab M Limited, UK), incubato a 37±1°C per 18 ±2 ore.
2. Arricchimento in due diversi terreno selettivi liquidi: Rappaport-Vassiliadis medium con soia (Lab M Limited, UK), incubato a 41,5 ±1°C, per 24 ± 3 ore e Muller-Kauffmann tetrathionate/novobiocin broth (OXOID, UK), incubato a 37±1 °C per 24 ± 3 ore .

3. Isolamento e identificazione su due terreni di coltura solidi selettivi e differenziali, Xylose Lysine Deoxycolate agar (Lab M Limited, UK) e Hektoen Enteric Agar (OXOID, UK), incubati a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ± 3 ore.
4. Conferma delle colonie con le caratteristiche morfologiche di *Salmonella* spp, dopo la sottocoltura in terreno nutritivo solido Nutrient Agar (Lab M Limited, UK), identificazione biochimica con un sistema miniaturizzato standardizzato (API 20E bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), incubato a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ore, conferma sierologica tramite agglutinazione su vetrino degli antigeni O, H e Vi con specifici antisieri (*Salmonella* polivalente O gruppi A-S, *Salmonella* polivalente H fase 1 e 2, *Salmonella* Vi Remel Europe, UK).

Listeria monocytogenes

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

La determinazione di *Listeria monocytogenes* necessita di quattro successivi passaggi. *L. monocytogenes*, infatti, come avviene per altri batteri patogeni, può contaminare in basso numero il campione analizzato ed è spesso accompagnata da batteri di altro genere in elevato numero; necessita quindi di un passaggio di arricchimento selettivo. Tuttavia è indispensabile rilevare anche le Listerie stressate da condizioni ambientali sfavorevoli alla loro crescita, di conseguenza si effettua una fase di arricchimento selettivo primario, in terreno liquido con una concentrazione più bassa di sostanze inibitrici e selettive.

L'analisi è eseguita secondo il seguente schema:

1. Arricchimento primario in terreno liquido con concentrazione ridotta di sostanze selettive, Half Fraser Broth (OXOID, UK), incubato a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ± 2 ore.
2. Arricchimento secondario in terreno liquido a concentrazione completa di sostanze selettive, Fraser broth (OXOID, UK), incubato a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ per 48 ± 2 ore .
3. Isolamento e identificazione su due terreni di coltura solidi selettivi e differenziali, Agar Listeria Ottaviani Agosti (ALOA, Biolife Italiana, Italia) e Listeria Selective Agar Oxford formulation (OXOID, UK), incubati a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ per $24 \pm 3/48 \pm 3$ ore.
4. Conferma delle colonie con le caratteristiche morfologiche di *Listeria monocytogenes* dopo la sottocoltura in terreno solido (Tryptone Soya Yeast Agar OXOID, UK), tramite i test di conferma dell'emolisi, il CAMP test su Agar sangue di montone (OXOID, UK) e la

caratterizzazione biochimica con un sistema miniaturizzato standardizzato (API Listeria, bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), incubato a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ore.

Escherichia coli O157

ISO 16654:2001 “Microbiologia degli alimenti e mangimi per animali. Metodo orizzontale per la ricerca di *Escherichia coli O157*”.

La determinazione di *Escherichia coli O157* necessita di quattro successivi passaggi:

1. Arricchimento della porzione del campione sottoposta ad analisi in modified Tryptone Soya Broth con novobiocina (mTSB + Novobiocina OXOID, UK) con incubazione a $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ per 18-24 ore.
2. Separazione e concentrazione del microrganismo per mezzo di particelle immunomagnetiche rivestite con anticorpi anti *E.coli O157* (immuno-magneto separazione). Questo passaggio non è stato eseguito nel laboratorio ARPA VdA.
3. Isolamento attraverso sottocoltura delle particelle immunomagnetiche con i batteri adesi su cefixime tellurite sorbitol MacConkey agar (CT-SMAC OXOID, UK) e un secondo terreno selettivo solido a scelta del laboratorio CR Sorbitol MacConkey se (CR-SMAC OXOID, UK) e incubazione a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ per 18-24 ore.
4. Conferma delle colonie caratteristiche, sorbitolo negative, tramite identificazione biochimica con un sistema miniaturizzato standardizzato (API 20E bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), incubato a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ore e identificazione sierologica tramite un test di agglutinazione al lattice (*E. coli O 157 Latex Test OXOID, UK*).

Yersinia enterocolitica

ISO 10273:2003 “Microbiologia degli alimenti e mangimi per animali. Metodo orizzontale per la ricerca di *Yersinia enterocolitica* presunta patogena”.

Il metodo è suddiviso in tre passaggi successivi:

1. Arricchimento in due terreni selettivi liquidi selettivi: Peptone Sorbitol and Bile salt broth (PBS, Biolife Italiana, Italia) e Igarosan Ticarcillin and potassium Chlorate broth (ITC, Biolife Italiana, Italia), incubati per 3/5 giorni a $22 \pm 2^\circ\text{C}$.
2. Isolamento e identificazione su due terreni di coltura solidi selettivi e differenziali, Cefsulodin Irgasan and Novobiocin Agar (CIN Biolife Italiana, Italia) e Salmonella Shigella agar con Deossicolato e Cloruro di calcio (SSDC) prima e dopo trattamento con KOH allo 0,5%, incubati a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ore.

3. Conferma delle colonie con le caratteristiche morfologiche di *Yersinia enterocolitica* per mezzo di test biochimici, ai quali sono sottoposte solo le colonie ossidasi negative (Oxidase Strips OXOID, UK), eseguiti con un sistema miniaturizzato standardizzato (API 20E bioMérieux, Marcy l'Etoile, France), incubato a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ore e i test di patogenicità, la fermentazione dell'esculina, la determinazione della pirazinamidasi (Diagnostic Tablets for Bacteriological Identification DIATABS, Rosco Diagnostica, DK) e il test della dipendenza dal calcio a 37°C .

Metodi in Real time PCR

La scelta dei kit da utilizzare per la sperimentazione è stata fatta valutando la disponibilità degli strumenti già presenti nel nostro laboratorio e del materiale aggiuntivo necessario.

Il termociclatore utilizzato è equipaggiato con un rilevatore di fluorescenza per ciascuno dei 96 pozzetti della micropiastra nella quale avviene la reazione di PCR, che effettua misurazioni ad intervalli regolari e consente quindi una quantificazione in tempo reale del segnale.

Per la determinazione di *Salmonella* spp (iQ-Check Salmonella II), *L. monocytogenes* (iQ-Check *Listeria monocytogenes* II) e *E. coli* O157 (iQ-Check *E. coli* O157:H7) sono stati utilizzati kit validati AFNOR, secondo la norma ISO 16140: 2003, prodotti dalla ditta Bio-Rad (Marnes la Coquette, France), che comprendono anche i reattivi per l'estrazione di DNA dal campione di alimento, a partire da un brodo di arricchimento. La validazione del metodo include tutte le fasi dell'analisi, dall'arricchimento del campione fino alla conferma del risultato analitico positivo, attraverso un metodo colturale.

Per la determinazione *Y. enterocolitica* patogena non si sono reperiti kit commerciali validati da un organismo internazionale. Inoltre, la fase di estrazione e quella di amplificazione del DNA sono state eseguite con due kit commerciali differenti.

***Salmonella* spp**

Il kit iQ-Check *Salmonella* II comprende sia l'estrazione del DNA che la sua amplificazione e rilevazione nel termociclatore. È un test qualitativo che permette di amplificare e rilevare simultaneamente la presenza di una sequenza specifica di DNA di *Salmonella* spp, grazie all'impiego di una sonda fluorescente. Un software, associato all'apparecchio, permette di interpretare i risultati, che sono visualizzati come curve di amplificazione. I reattivi forniti in ogni kit sono sufficienti per eseguire 96 reazioni di amplificazione, a partire dall'estrazione del DNA fino alla reazione di PCR.

Il test è basato sull'amplificazione di una sequenza genica, specifica per *Salmonella* spp., *iagA invasion associated gene* (Liming et al. 2004), e sulla sua rilevazione in tempo reale, tramite la Real Time PCR. La rilevazione del DNA e l'interpretazione dei risultati sono ottimizzati per l'utilizzo di un termociclatore per Real Time PCR della Bio-Rad. Nel corso della reazione di PCR i primers si legano alla sequenza target e la polimerasi catalizza la loro estensione nel senso 5'-3', creando una sequenza complementare al DNA, detta amplicone. Durante questa reazione, delle sonde specifiche, marcate con il fluoroforo FAM, che è una carbossifluoresceina (Lauer et al. 2013), si legano all'amplicone. La fluorescenza è emessa solo quando avviene questa ibridazione, secondo la tecnica del Molecular Beacon (Liming et al. 2004). L'intensità della fluorescenza aumenta proporzionalmente all'aumentare dei prodotti di amplificazione. La fluorescenza è misurata, su una lunghezza d'onda di 490 nm, dal modulo ottico presente nel termociclatore e un software, associato all'apparecchio, calcola automaticamente la relazione tra l'intensità del segnale e il ciclo di amplificazione. Questa relazione indica la presenza o l'assenza del microrganismo target nell'alimento, ma non ne permette la quantificazione, in quanto non è previsto uno standard per la costruzione della retta di taratura, si tratta infatti di un metodo qualitativo.

Nella mix di reazione è incluso un controllo interno, che è amplificato insieme alla sequenza target per *Salmonella*, ma rilevato da una sonda legata con un secondo fluoroforo, il Texas Red (Liming et al. 2004) in seguito sostituito con l'HEX. Ciò permette di individuare eventuali inibizioni della reazione di PCR e perciò validare e interpretare correttamente i risultati negativi.

Preparazione del campione, fase di arricchimento

Sono stati pesati 25 g di ciascun campione in una busta da Stomacher sterile, risospesi in 225 ml di BPW (LAB M) e omogenati nello Stomacher.

Successivamente si sono inoculate le sospensioni batteriche, a seconda del livello richiesto, direttamente nella busta (questa fase è in comune con il metodo colturale).

Estrazione

L'estrazione del DNA è stata eseguita secondo le indicazioni della ditta produttrice, che propone protocolli differenti a seconda del tipo di matrice analizzata.

Nel nostro caso abbiamo seguito il "Protocollo Semplificato I", che consiste nei seguenti passaggi:

- incubare il brodo di pre-arricchimento per 21 ± 1 ore a $37 \pm 1^\circ$ C;
- prelevare 100 μ l di del brodo di arricchimento, 100 μ l del tampone di lisi e mescolare con la micropipetta;

- incubare nel blocco riscaldante a 95°C - 100°C per 15 minuti;
- vortexare ad alta velocità e centrifugare a 10.000-12.000 g per due minuti;
- eseguire la PCR

Il surnatante può essere conservato a -20 °C per un anno. Prima di essere utilizzato per l'amplificazione è necessario eseguire di nuovo l'ultimo passaggio.

Il tempo richiesto per procedere all'estrazione di un campione è di circa 30 minuti.

Preparazione della mix di reazione

I reattivi forniti sono pronti all'uso, quindi basta prelevarne la quantità necessaria per il numero reazioni PCR che si desidera effettuare, contando un controllo positivo e un controllo negativo per ogni seduta analitica (seguire le tabelle fornite insieme al kit). La mix di reazione deve essere utilizzata subito, può essere conservata, ad una temperatura compresa tra 2°C e 8°C, per un'ora.

Reazioni di amplificazione

Il volume totale di reazione è di 50 µl (45 µl di mix di reazione + 5 µl di DNA estratto) per ciascun pozzetto di una piastra da 96 wells.

Il protocollo termico, indicato dal produttore, identico per tutti e tre i kit presi in considerazione, è il seguente:

cicli	step	tempo	temperature
1	1	10 minuti	95 °C
50	1	15 secondi	95°C
	2	30 secondi	58°C
	3	30 secondi	72°C

La durata totale del processo, preparazione dei reattivi, inoculo delle piastre e PCR, è di circa due ore.

Analisi e interpretazione dei risultati

I risultati sono visualizzati come curve esponenziali. Il Ct (cycle threshold o ciclo soglia) è il numero di cicli richiesto perché il segnale di fluorescenza superi la threshold, cioè il livello del background. Il Ct è inversamente proporzionale alla quantità di DNA presente nel campione.

Lo schema per l'interpretazione dei risultati, rielaborati dal software dello strumento, è il seguente:

	Salmonella detection (FAM)	Controllo interno
Controllo negativo	Ct = N/A	$28 \leq Ct \leq 40$
Controllo positivo	$26 \leq Ct \leq 36$	Non significativo
Risultato positivo	$Ct \geq 10$	Non significativo
Risultato negativo	Ct = N/A	$Ct \geq 28$
Risultato inibito	Ct = N/A	Ct = N/A

Nel caso di risultato inibito è necessario ripetere il test con il campione diluito 1:10.

N/A significa non applicabile. Il software restituisce questo valore quando la curva di fluorescenza non interseca la threshold, di conseguenza non è avvenuta l'amplificazione della sequenza target.

I campioni risultati positivi devono essere confermati con un metodo colturale, nel nostro caso il metodo di riferimento UNI EN ISO 6579:2008, ma è validato anche un metodo di conferma colturale rapido, basato sull'utilizzo di un terreno cromogeno.

Listeria monocytogenes

iQ-Check *Listeria monocytogenes* II.

Il principio del kit è analogo a quello spiegato per *Salmonella*, cambiano solo la sequenza target e le sonde specifiche per *L. monocytogenes*. La sequenza target è *hlyA*, un gene necessario per la produzione di listeriolisina, importante fattore di virulenza di *L. monocytogenes*. (Lauer et al. 2013).

Preparazione del campione e fase di arricchimento

Sono stati pesati 25 g di ciascun campione in una busta da Stomacher sterile, risospesi in 225 ml di Half Fraser e omogenati nello stomacher.

Successivamente sono state inoculate le sospensioni batteriche, a seconda del livello richiesto, direttamente nella busta (questa fase è in comune con il metodo colturale).

Estrazione

L'estrazione del DNA è stata eseguita secondo le indicazioni della ditta produttrice, che propone protocolli differenti a seconda del tipo di matrice analizzata.

Nel nostro caso abbiamo seguito il "Protocollo Standard", che consiste nei seguenti passaggi:

- incubare il brodo di arricchimento per 25 ± 1 h a $30 \pm 1^\circ\text{C}$;
- prelevare 1500 μl di del brodo e centrifugare a 10.000-12.000 g per cinque minuti;
- aggiungere 250 μl del reattivo di lisi, contenente le bilie e mescolare con la micropipetta;

- agitare per 3 ± 1 minuti nell'agitatore vibrante "Disruptor Genie";
- incubare nel blocco riscaldante a 95°C - 100°C per 15 minuti;
- vortexare ad alta velocità e centrifugare a 10.000-12.000 g per cinque minuti;
- eseguire la PCR

Il surnatante può essere conservato a -20°C per un anno. Prima di essere utilizzato per l'analisi deve essere ripetuto l'ultimo passaggio.

Il tempo necessario per estrarre il DNA è di circa 45 minuti

Preparazione della mix di reazione

Eseguita come precedentemente indicato per *Salmonella*.

Reazioni di amplificazione

Eseguita come precedentemente indicato per *Salmonella*.

Analisi e interpretazione dei risultati

Eseguita come precedentemente indicato per *Salmonella*

I campioni risultati positivi devono essere confermati con un metodo colturale, nel nostro caso il metodo di riferimento UNI EN ISO 11290-1:2005, ma è validato anche un metodo di conferma colturale rapido, basato sull'utilizzo di un terreno cromogeno.

***E. coli* O 157**

iQ-Check *E. coli* O157:H7 kit.

Il principio del kit è analogo a quello spiegato per gli altri due patogeni, cambiano solo la sequenza target e le sonde specifiche per *E. coli* O 157. Il gene amplificato è *katP*, che codifica per una catalasi-perossidasi (Lauer et al. 2009).

Preparazione del campione e fase di arricchimento

Sono stati pesati 25 g di campione, risospesi in 225 ml di BPW e omogenati in Stomacher. Sono state effettuate delle prove di estrazione del DNA per la PCR anche a partire dal brodo di arricchimento previsto dalla ISO 16654:2001 (mTSB + Novobiocina), con lo scopo di unificare il primo passaggio del metodo colturale di riferimento con quello in PCR.

Successivamente, sono inoculate le sospensioni batteriche, a seconda del livello richiesto, direttamente nella busta contenente l'uno o l'altro brodo di arricchimento.

Estrazione

I protocollo di estrazione, "Protocollo Semplificato I", è analogo a quello descritto per *Salmonella*, salvo per il fatto che il brodo di arricchimento è incubato per 8-24 ore a $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$.

Preparazione della mix di reazione

Eseguita come precedentemente indicato per *Salmonella*.

Reazioni di amplificazione

Eseguita come precedentemente indicato per *Salmonella*.

Analisi e interpretazione dei risultati

Eseguita come precedentemente indicato per *Salmonella*.

I campioni risultati positivi devono essere confermati con il metodo colturale di riferimento oppure a partire BPW, isolando, con o senza immunoseparazione, su CT-SMAC. E' necessario poi confermare da una a tre colonie caratteristiche con un test di agglutinazione al lattice (Latex test) specifico. E' validato anche l'uso di un terreno cromogeno.

Yersinia enterocolitica

Per *Yersinia enterocolitica* il kit di estrazione e di amplificazione sono separati, forniti da due ditte diverse.

- Kit di estrazione: Realpure Spin Food Stool bacterials Kit (REAL Durviz s.l., Spagna) ottimizzato per l'estrazione di DNA di vari microorganismi patogeni, a partire da un brodo di pre-arricchimento o arricchimento, come stabilito dalle diverse norme di riferimento, utilizzando delle colonnine (MicroSpin) con membrana di fibra di vetro, che legano selettivamente il DNA.
- Kit di amplificazione: *Yersinia enterocolitica* genesig Advanced Kit (PrimerdesignTM,UK). I reattivi forniti in ogni kit sono sufficienti per eseguire 150 reazioni di amplificazione.

I componenti del kit PCR sono:

- una miscela di primers/probes specifici per *Y. enterocolitica*, marcati con il fluoroforo FAM;
- un template per il controllo positivo di *Y. enterocolitica*;

- una miscela di primers/probes, marcati con il fluoroforo VIC, per il controllo interno di estrazione e di PCR;
- il DNA per il controllo interno di estrazione e di PCR;
- acqua RNase/DNase *free*, per la risospensione delle miscele di primer/probe e il controllo interno di estrazione, che è usata anche come controllo negativo di PCR;
- un tampone, per la preparazione del controllo positivo e delle curve di calibrazione.

Il kit non fornisce la mastermix con l'enzima polimerasi.

Per queste prove è stata utilizzata la Precision PLUS 2xqPCR Mastermix (PrimerdesignTM,UK), adatta per il termociclatore iQ5, già presente in laboratorio.

Il kit è stato disegnato per la rilevazione e la quantificazione del genoma di *Y. enterocolitica*, andando ad amplificare in maniera specifica una sequenza del gene *ail* (attacco e invasione). E' in grado quindi di rilevare il più ampio profilo possibile, rimanendo specifico per il ceppo patogeno. In condizioni ottimali di PCR si possono rilevare fino a 100 copie del template target. Il kit è applicabile a molte matrici diverse, ma l'estrazione del DNA deve essere fatta in modo da garantire un'adeguata quantità, l'integrità e la purezza dell'acido nucleico. Il kit è corredato da un controllo interno in grado di rilevare un'eventuale inibizione della reazione di PCR.

Il kit fornisce una mix specifica di primers e probes che sono marcati con il fluoroforo FAM, secondo il principio della TaqMan. In sintesi, durante la reazione di amplificazione i primers, forward e reverse, legano in DNA target. Nella stessa mix è inclusa una sonda marcata con un fluoroforo (5'-reporter dye e 3'-quencher). Durante la PCR, la Taq agisce da esonucleasi, la sonda è tagliata e il reporter dye e il quencher sono separati: ne risulta una emissione di fluorescenza, che può essere rilevata da un'ampia gamma di piattaforme di Real Time PCR.

Il kit è fornito di un template di controllo positivo, che può essere utilizzato in diluizione singola, se l'analisi condotta è qualitativa, oppure può essere utilizzato per costruire la curva standard, necessaria per la quantificazione del DNA nel campione. Ogni seduta analitica deve comprendere almeno un controllo positivo, per garantire che la reazione di PCR sia avvenuta correttamente. In caso di negatività, il risultato analitico è invalidato e tutto il processo deve essere ripetuto. Allo stesso modo deve essere inserito un controllo negativo, rappresentato dall'acqua RNase/DNase *free* fornita nel kit.

Il controllo interno di estrazione è un *template* di DNA, che viene aggiunto al campione nella fase di estrazione, al momento del passaggio con il tampone di lisi. Esso è purificato con l'acido nucleico presente nel campione stesso e funge da controllo positivo del processo di estrazione. La

sua rilevazione, durante la reazione di amplificazione, indica anche che non sono presenti, in concentrazione elevata, sostanze inibitrici l'enzima Taq.

Nella mix di primerse probes, fornita con il kit per rilevare il DNA esogeno di controllo, i primers sono presenti ad una concentrazione tale da permettere la rilevazione simultanea anche del DNA target (PCR multiplex). L'amplificazione del DNA di controllo infatti non interferisce con la rilevazione del DNA target, nemmeno se presente in basso numero di copie. Il controllo interno è rilevato tramite il fluoro foro VIC, a un Ct di 26 ± 3 .

Preparazione del campione e fase di arricchimento

Sono stati pesati 25 g di campione e risospesi in 225 ml di PBS e omogenati in Stomacher.

Sono state preparate due aliquote per ciascun campione analizzato, inoculate come descritto precedentemente e incubate per 48 h ore a $30 \pm 1^\circ\text{C}$, quella destinata alla PCR, e per 5 giorni a $22 \pm 3^\circ\text{C}$, quella analizzata con il metodo colturale.

La PCR è stata condotta, in qualche caso, anche sui campioni incubati a 20 per 5 gg.

Estrazione

Secondo le istruzioni della ditta produttrice:

- trasferire 1,5 ml di brodo di arricchimento in un microtubo da 1,5 ml e centrifugare a 14.000 rpm per 5 minuti;
- eliminare il surnatante e aggiungere 300 μl di lysozyme reaction buffer + 20 μl di lisozima + 4 μl di DNA per il controllo interno di estrazione, mescolare bene ed incubare a 37°C per 30 minuti;
- aggiungere 300 μl di Lysis/Binding Buffer + 20 μl di Proteinasi K, mescolare bene e incubare a 70°C per 10 minuti;
- aggiungere 150 μl di Isoporopanololo, mescolare bene e centrifugare a 14.000 rpm per 60 secondi;
- aggiungere il surnatante nella microcolonnina *Spin Microcolum* e procedere con una serie di passaggi che consentono la purificazione del DNA estratto;
- aggiungere, nell'ultimo, 100 μl di tampone di eluizione alla colonnina e centrifugare alla massima velocità per raccogliere nel microtubo il DNA.

Il tempo necessario per estrarre 1 campione è di circa un ora e mezza.

Preparazione della mix di reazione

I reattivi sono pronti all'uso, quindi basta prelevarne la quantità necessaria per il numero di reazioni PCR che si desidera effettuare.

In particolare per ogni campione di DNA è necessaria preparare una mix di reazione con i seguenti volumi:

- PrecisionPLUS 2x qPCR Master mix 10 μ l
- Y. enterocolitica primer/probe 1 μ l
- Controllo interno primer/probe 1 μ l
- RNase/DNase free water 3 μ l

Il volume totale di mix di reazione per ogni pozzetto è 15 μ l

Reazioni di amplificazione

Il volume totale in ogni pozzetto della piastra da 96 wells è di 20 μ l, 15 μ l di mix di reazione + 5 μ l di DNA estratto.

Protocollo termico:

	Step	tempo	temperature
50 cicli	attivazione enzima	2 minuti	95°C
	Denaturazione	10 secondi	95°C
	raccolta segnale	60 secondi	60°C

Il tempo richiesto per la PCR, comprensivo della preparazione della mix e della micropiastra, è di circa 2 ore.

Analisi e interpretazione dei risultati

Come nel caso dei kit Bio-Rad, si ottengono delle curve di amplificazione che escono dalla threshold ad un determinato Ct (ciclo soglia), in proporzione alla quantità di DNA di partenza, con una relazione di proporzionalità inversa. Trattandosi di un kit quantitativo, questa relazione dovrebbe essere lineare, e permettere, se si costruisce una retta di calibrazione, anche la quantificazione del DNA presente nel campione.

L'interpretazione dei risultati deve essere fatta utilizzando il seguente schema:

Campione FAM	Controllo interno VIC (23 ≤ Ct ≤ 29)	Controllo negativo (CN) FAM	Controllo positivo (CP) FAM	Interpretazione risultato
Positivo	Positivo	Negativo	Positivo	Positivo
Positivo	Negativo	Negativo	Positivo	Positivo
Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	*
Positivo	Negativo	Positivo	Positivo	*
Negativo	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Negativo	Negativo	Negativo	Negativo	Esperimento fallito
Positivo	Positivo	Positivo	Positivo	Esperimento fallito

In un campione contenente un alto numero di copie genomiche di *Y. enterocolitica*, il controllo interno di estrazione può non produrre una curva di amplificazione: ciò non invalida il risultato della reazione di PCR ed il risultato deve essere considerato come positivo.

*Quando sia il campione che il controllo negativo risultato positivi, l'interpretazione del risultato dipende dalla differenza relativa tra i segnali dei due risultati. Si deve perciò sottrarre il valore del Ct del target a quello del controllo negativo ($\Delta Ct = Ct\ CN - Ct\ campione$). Se il campione è positivo e il controllo negativo è uscito molto più tardi ($\Delta Ct \geq 5$), allora la positività del test è da considerarsi significativa. Quando la differenza tra i due valori è piccola ($\Delta Ct < 5$), l'interpretazione del risultato positivo del campione non è corretta, è quindi necessario ripetere la prova.

Quando il DNA target è presente in quantità elevata, il controllo interno di estrazione può non produrre una curva di amplificazione, ma ciò non è rilevante ai fini dell'interpretazione del risultato.

RISULTATI

Salmonella spp.

Confronto del metodo RTi PCR con il metodo colturale di riferimento

Sono stati analizzati 229 campioni, comprensivi di tutte le matrici su cui è esteso il campo di applicazione del metodo colturale di riferimento e del metodo alternativo.

I risultati ottenuti nel corso della sperimentazione, suddivisi per matrice, sono sintetizzati nella **Tabella 11**.

Si è riscontrata un' inibizione del controllo interno di PCR in due campioni di latte in polvere.

In una tipologia di matrice, l'insalata capricciosa, si sono rivelati cinque falsi negativi, sia per la reazione di PCR sia per la sua conferma dal brodo di pre-arricchimento (BPW) conservato, come previsto dal metodo validato AFNOR, per 48 ore ad una temperatura di $3 \pm 2^\circ\text{C}$. Il prodotto era confezionato, del tipo "pronto al consumo", a lunga scadenza. In questo caso non è stata inibita la reazione di PCR, ma la crescita del microrganismo target nel brodo di pre-arricchimento, probabilmente a causa della presenza nella matrice di sostanze conservanti. Bisogna sottolineare anche che, il risultato negativo, è stato ottenuto solo ai livelli più bassi di inoculo (10^1 pari a 28 u.f.c./25 g), tuttavia ben sopra il limite di determinazione relativo dichiarato nel report di validazione (**Tabella. 16**).

Anche il metodo colturale ha dato risultati positivi solo a partire da uno dei due brodi di arricchimento selettivo richiesti, il MK, e solo su uno dei due terreni selettivi di isolamento, l'HEA, confermando l'ipotesi della presenza nella matrice di condizioni non favorevoli alla crescita di *Salmonella*, probabilmente un pH troppo basso, un'elevata concentrazione di sale o la presenza di sostanze conservanti.

In **Tabella 12** è riportata una sintesi dei i risultati totali ottenuti.

I dati sono stati elaborati, come indicato nella ISO 16140:2003, in termini di accuratezza, specificità e selettività relativa. Si fa riferimento, per il confronto tra i metodi, al certificato di validazione No: BRD 07/06-07/04, valido fino al 01/07/2016. (**Tabella 13** e **Tabella 14**).

I risultati ottenuti sono confrontabili con quelli dichiarati nel report di validazione del kit iQ-Check *Salmonella* II, di conseguenza si può concludere che il metodo è correttamente eseguito nel laboratorio ARPA VdA. In questo caso si può far riferimento, per quanto riguarda le altre

caratteristiche tecniche, a quanto specificato nel documento di validazione AFNOR, conformemente alle norme ISO 17025:2005 e ISO/TS 13843:2000 (**Tabella 15** e **Tabella 16**).

I risultati ottenuti con i due metodi sono quindi equivalenti, come richiesto dalla normativa vigente. Per quanto riguarda la selettività, intesa come inclusività ed esclusività, su 156 ceppi di microrganismo target testati, il 100% è stato rilevato. Lo studio di 30 ceppi di batteri diversi da *Salmonella* non ha rilevato la presenza di reazioni crociate.

Confronto tra i risultati di amplificazione del DNA dopo conservazione a -20°C

La prova è stata eseguita su tutte le tipologie di matrice comprese nell'ambito di applicazione del metodo colturale e del metodo alternativo. I campioni, sia quelli positivi sia quelli negativi alla PCR, sono stati sottoposti a conferma tramite il metodo colturale di riferimento, a partire dalla fase di pre-arricchimento conservata in frigorifero a $3 \pm 2^\circ\text{C}$, come indicato dal metodo iQ Check *Salmonella* II, che prevede però la conferma solo dei campioni positivi.

Nella **Tabella 17** si riportano i risultati ottenuti complessivamente per tutte le matrici e per tutti i livelli di inoculo saggiati. Ogni campione/livello di inoculo è stato estratto in triplicato per avere una maggiore precisione del risultato, in particolare a livelli bassi di inoculo.

I risultati sono perfettamente sovrapponibili: appare evidente che la conservazione del DNA a -20°C e del brodo BPW a $3 \pm 2^\circ\text{C}$ non influenzano il risultato analitico.

Confronto tra i risultati ottenuti da due operatori abilitati a eseguire l'analisi

Le prove sono state eseguite solo su due matrici: insalata capricciosa (solidi di piccole dimensioni) e crema pasticcera (solidi ben miscelati) tra quelle comprese nel campo di applicazione dei metodi. In vista di un accreditamento del metodo kit iQ-Check *Salmonella* II, sarà necessario proseguire le prove relativamente alle matrici al momento escluse.

Nella **Tabella 18** sono riportati i risultati complessivi di tutte le prove eseguite.

Come precedentemente spiegato, per confrontare le performance di due operatori sono stati saggiati 4 livelli di inoculo compreso lo 0, sono state eseguite tre estrazioni, per ciascun operatore e per ciascun livello di inoculo e due reazioni di PCR, per ciascuna estrazione e per ciascun operatore. Sono state perciò confrontate tra i due operatori, 12 estrazioni e 24 reazioni di PCR per ciascuna matrice.

Il test del χ^2 indica che non ci sono differenze significative tra i risultati ottenuti dai due operatori ($p=0.83$). Il metodo risulta perfettamente riproducibile nel laboratorio ARPA VdA.

Tabelle dei risultati per *Salmonella* spp

Tabella 11: sintesi dei risultati ottenuti per *Salmonella* spp

Matrice	Numero di campioni analizzati	RTi PCR	Conferma PCR	Colturale (ISO)
Latte in polvere (liquidi)	37	Positivi = 18	Positivi = 18	Positivi = 18
		Negativi = 19	Negativi = 19	Negativi = 19
			Inibiti = 2	
			Falsi negativi = 0	
		Falsi positivi = 0		
Budino di soia (solidi ben miscelati)	54	Positivi = 39	Positivi = 39	Positivi = 39
		Negativi = 15	Negativi = 15	Negativi = 15
			Inibiti = 0	
			Falsi negativi = 0	
		Falsi positivi = 0		
Pasticcini al cioccolato (altri solidi)	54	Positivi = 39	Positivi = 39	Positivi = 39
		Negativi = 15	Negativi = 15	Negativi = 15
			Inibiti = 0	
			Falsi negativi = 0	
		Falsi positivi = 0		
Germogli (solidi di piccole dimensioni)	36	Positivi = 27	Positivi = 27	Positivi = 27
		Negativi = 9	Negativi = 9	Negativi = 9
			Inibiti = 0	
			Falsi negativi = 0	
		Falsi positivi = 0		
Crema pasticcera (solidi ben miscelati)	24	Positivi = 18	Positivi = 18	Positivi = 18
		Negativi = 16	Negativi = 16	Negativi = 16
			Inibiti = 0	
			Falsi negativi = 0	
		Falsi positivi = 0		
Insalata capricciosa (solidi di piccole dimensioni)	24	Positivi = 18	Positivi = 13	Positivi = 13
		Negativi = 16	Negativi = 11	Negativi = 11
			Inibiti = 0	Falsi negativi = 5
			Falsi negativi = 5	
		Falsi positivi = 0		

Tabella 12: risultati complessivi del confronto tra metodo di riferimento e metodo alternativo

	Totale campioni	Totale positivi	Totale negativi
UNI EN ISO 6579:2008	229	156	73
iQ-Check <i>Salmonella</i> II (Protocollo Easy I)	229	151	78

Tabella 13: Accordo Positivo e Negativo e Deviazione Positiva e Negativa

Kit Bio-Rad Protocollo Easy I	Positivi ISO 6579 (R+)	Negativi ISO 6579 (R-)
Positivi PCR (A+)	Accordo positivo A+/R+ PA = 151	Deviazione positiva R-/A+ PD = 0
Negativi PCR (A-)	Deviazione negativa A-/R+ ND = 5	Accordo negativo = A-/R- NA = 73

A= metodo alternativo in fase di validazione; R = metodo colturale di riferimento

Tabella 14: confronto tra i valori di Accuratezza, Specificità e Sensibilità relative

Kit Bio-Rad Protocollo Easy I	Accuratezza relativa	Specificità relativa	Sensibilità relativa
Risultati Validazione AFNOR	97,4%	98,7%	95,9%
Risultati laboratorio ARPA VdA	97,8%	100%	96,8%

Tabella 15: analisi dei discordanti

Risultati Validazione AFNOR Protocollo Easy I	PD = 3, ND = 8 Y = PD + ND = 11 $6 \leq Y \leq 22$; m=3, M=0 m>M	Equivalenza con il metodo di riferimento
---	---	--

Tabella 16: limite di determinazione relativo

Protocollo Easy I	RTi PCR	Metodo di riferimento
Risultati Validazione AFNOR	Tra 0,1 e 2,8 u.f.c./25 g	Tra 0,1 e 1,7 u.f.c./25 g

Tabella 17: confronto tra i risultati in PCR a G₀, G₁ e G₂.

	Positivi PCR	Negativi PCR	Totale risultati
PCR G ₀	40	17	57
PCR G ₁	40	17	57
PCR G ₂	40	17	57

Tabella 18: confronto risultati di due operatori

	Positivi PCR	Negativi PCR	Totale
Operatore A	30	18	48
Operatore B	31	17	48

Listeria monocytogenes

Confronto del metodo RTi PCR con il metodo colturale di riferimento

Sono stati analizzati 226 campioni, comprensivi di tutte le matrici su cui è esteso il campo di applicazione del metodo colturale di riferimento e del metodo alternativo. I risultati ottenuti nel corso della sperimentazione sono sintetizzati nella **Tabella 19**.

Nove campioni di latte in polvere sono risultati inibiti, ma dopo diluizione 1:10, come indicato nel kit, tutte le reazioni di PCR hanno dato esito positivo.

Per tutte le altre matrici non sono state riscontrate reazioni inibite.

Sono stati rilevati risultati falsi negativi nella matrice budino di soia (solidi ben miscelati), al livello di inoculo più basso (0,14 u.f.c./25g); tale livello si trova al di sotto del limite di determinazione dichiarato nel report di validazione AFNOR (**Tabella 24**). Tuttavia bisogna sottolineare che, allo stesso livello di inoculo, sulla matrice pasticcini al cioccolato, non si è riscontrato nessun risultato di PCR negativo. Probabilmente influisce, sui risultati negativi del primo campione, alcuni fattori legati al tipo di matrice, ad esempio la presenza di sostanze che interferiscono con la reazione di PCR senza tuttavia inibire l'amplificazione del controllo interno. Inoltre, dato il basso numero di cellule, l'incertezza legata all'inoculo effettuato è molto elevata (ISO 7218:2007/Amd.1:2013) quindi, pur partendo da una stessa sospensione iniziale, è possibile che non sia stata seminata un'identica quantità di batteri nei due diversi campioni.

Nella **Tabella 20** sono riportati i risultati complessivi, non suddivisi per matrice, del confronto tra il metodo colturale di riferimento e il metodo alternativo.

I risultati totali sono stati elaborati, come per *Salmonella*, in termini di accuratezza relativa, specificità relativa e selettività relativa (**Tabella 21** e **Tabella 22**). Si fa riferimento, per il confronto, al certificato di validazione AFNOR No: BRD 07/10-04/05, valido fino al 07/04/2017, riferito al protocollo di estrazione utilizzato.

Anche in questo caso i risultati ottenuti sono confrontabili con quelli dichiarati nel rapporto di validazione del kit iQ-Check. I risultati falsi negativi sono stati rilevati su una sola matrice, il budino di soia, di conseguenza si può concludere che il metodo è correttamente eseguito nel

laboratorio ARPA VdA. Tuttavia è necessario approfondire, con ulteriori prove, il problema dei falsi negativi sulle varie matrici analizzate di routine nel laboratorio ARPA VdA.

Si fa riferimento, per le altre caratteristiche tecniche, a quanto specificato nel report di validazione AFNOR (**Tabella 23** e **Tabella 24**).

I risultati ottenuti con i due metodi sono equivalenti, come richiesto dalla normativa vigente, anche il limite di determinazione relativo è confrontabile con quello del metodo colturale.

La selettività del metodo Bio-Rad è molto buona: su 50 ceppi di *L. monocytogenes* testati 50 sono stati rilevati. Lo studio con 33 ceppi di batteri interferenti ha dimostrato che non ci sono cross-reazioni. Un ceppo di *E. faecium*, cresciuto nel brodo di arricchimento (Half Fraser), quando trasferito nel secondo terreno di arricchimento (Fraser completo) non ha confermato la positività.

Confronto tra i risultati di amplificazione del DNA dopo conservazioni a -20°C

Come per *Salmonella* spp, la prova è stata eseguita su tutte le tipologie di matrice comprese nell'ambito di applicazione del metodo colturale e il metodo alternativo. Tutti i campioni, sia quelli positivi che quelli negativi alla PCR, sono stati sottoposti a conferma tramite il metodo colturale di riferimento, a partire dalla fase arricchimento, conservata in frigorifero a $3 \pm 2^\circ\text{C}$.

Nella **Tabella 25** si riportano i risultati ottenuti. Ogni campione/livello di inoculo è stato estratto in triplicato per avere una maggiore precisione del risultato, in particolare a livelli bassi di inoculo.

Il test del χ^2 indica che non ci sono differenze significative tra i risultati ottenuti ($p = 0,89$).

Viene confermato perciò che la conservazione del DNA a -20°C e del HF a $3 \pm 2^\circ\text{C}$ non ha nessuna influenza negativa sull'esito risultato analitico.

Confronto tra i risultati ottenuti da due operatori abilitati a eseguire l'analisi

Le prove sono state eseguite solo su due matrici: insalata capricciosa (solidi di piccole dimensioni) e crema pasticcera (solidi ben miscelati) tra quelle comprese nel campo di applicazione dei metodi considerati. In vista di un accreditamento del kit iQ-Check *Listeria monocytogenes* II, sarà necessario eseguire le prove anche per le matrici al momento escluse.

Nella **Tabella 26** sono riportati i risultati complessivi di tutte le prove eseguite.

Come precedentemente spiegato per confrontare le performance di due operatori sono stati saggiati 4 livelli di inoculo compreso lo 0, sono state eseguite tre estrazioni, per ciascun operatore e per ciascun livello di inoculo e due reazioni di PCR, per ciascuna estrazione e per ciascun operatore. Sono state perciò confrontate tra i due operatori, relativamente a due delle matrici saggiate, 12 estrazioni e 24 reazioni di PCR per ciascuna matrice.

I risultati sono perfettamente sovrapponibili, quindi si può concludere che non c'è differenza tra i due operatori. Il metodo risulta perfettamente riproducibile nel laboratorio ARPA VdA.

Tablelle dei risultati per *L. monocytogenes*

Tabella 20: risultati complessivi del confronto tra metodo di riferimento e metodo alternativo

	Totale campioni	Totale positivi	Totale negativi
ISO 11290-1	226	160	66
iQ-Check <i>Listeria monocytogenes II</i>	226	157	69

Tabella 21: Accordo Positivo e Negativo e Deviazione Positiva e Negativa

Risultati laboratorio ARPA VdA H F + Standard protocol	Positivi ISO 11290-1 (R+)	Negativi ISO 11290-1 (R-)
Positivi PCR (A+)	Accordo positivo A+/R+ PA = 157	Deviazione positiva R-/A+ PD = 0
Negativi PCR (A-)	Deviazione negativa A-/R+ ND = 3	Accordo negativo = A-/R- NA = 66

Tabella 22: confronto tra i valori di Accuratezza, Specificità e Sensibilità relative

H F + Standard protocol	Accuratezza relativa	Specificità relativa	Sensibilità relativa
Risultati Validazione AFNOR	98,3%	98,9%	97,5%
Risultati laboratorio ARPA VdA	98.7 %	100 %	98.1 %

Tabella 23: analisi dei discordanti (secondo l'Allegato F della norma ISO 16140)

Risultati Validazione AFNOR	PD = 2, ND = 4 Y= PD + ND = 6 $6 \leq Y \leq 22$; m=2, M=0 m>M	Equivalenza con il metodo di riferimento
-----------------------------	---	--

Tabella 24: limite di determinazione relativo

HF + Standard protocol	RTI PCR	Metodo di riferimento
Risultati Validazione AFNOR	Tra 0,2 e 1,6 u.f.c./25 g	Tra 0,2 e 1,6 u.f.c./25 g

Tabella 19: sintesi dei risultati ottenuti per *L.monocytogenes*

Matrice	Numero di campioni analizzati	RTi PCR	Conferma PCR	Colturale (ISO)	
Latte in polvere	25	Positivi = 14	Positivi = 14	Positivi = 14	Positivi = 14
		Negativi = 11	Negativi = 11	Negativi = 11	Negativi = 11
			Inibiti = 9*		
			Falsi negativi =0		
Falsi positivi = 0					
Budino	54	Positivi = 39	Positivi = 36	Positivi = 39	Positivi = 39
		Negativi = 15	Negativi = 18	Negativi = 15	Negativi = 15
			Inibiti = 0		
			Falsi negativi =3		
Falsi positivi = 0					
Fungone	54	Positivi = 39	Positivi = 39	Positivi = 39	Positivi = 39
		Negativi = 15	Negativi = 15	Negativi = 15	Negativi = 15
		Positivi = 27 Negativi = 9	Inibiti = 0		
			Falsi negativi =0		
Falsi positivi = 0					
Germogli	36	Positivi = 27	Positivi = 27	Positivi = 27	Positivi = 27
		Negativi = 9	Negativi = 9	Negativi = 9	Negativi = 9
			Inibiti = 0		
			Falsi negativi =0		
			Falsi positivi = 0		
Crema pasticceria	24	Positivi = 18	Positivi = 18	Positivi = 18	Positivi = 18
		Negativi = 6	Negativi = 6	Negativi = 6	Negativi = 6
			Inibiti = 0		
			Falsi negativi =0		
Falsi positivi = 0					
Insalata capricciosa	24	Positivi = 18	Positivi = 18	Positivi = 18	Positivi = 18
		Negativi = 6	Negativi = 6	Negativi = 6	Negativi = 6
			Inibiti = 0		
			Falsi negativi =0		
Falsi positivi = 0					
Campioni derivanti da Circuiti interlaboratorio	9	Positivi = 5	Positivi = 5	Positivi = 5	Positivi = 5
		Negativi = 4	Negativi = 4	Negativi = 4	Negativi = 4
			Inibiti = 0		
			Falsi negativi =0		
Falsi positivi = 0					

Tabella 25: Confronto tra i risultati in PCR a G₀, G₁ e G₂.

	Positivi PCR	Negativi PCR	Totale risultati
PCR G ₀	43	17	60
PCR G ₁	45	15	60
PCR G ₂	45	15	60

Tabella 26: confronto risultati di due operatori

	Positivi PCR	Negativi PCR	Totale
Operatore A	31	17	48
Operatore B	31	17	48

***E. coli* O 157**

Confronto del metodo RTi PCR con il metodo colturale di riferimento

Le prove sono state eseguite solo su verdure fresche confezionate (prodotti di IV gamma). In totale sono stati analizzati 141 campioni, sia con il kit iQ-Check *E. coli* O157:H7 sia con il metodo colturale di riferimento. Sono stati confrontati anche due diversi brodi di arricchimento primari (BPW e mTSB).

I risultati ottenuti nel corso della sperimentazione sono sintetizzati nella **Tabella 27**.

Casi di inibizione della reazione di PCR sono stati rilevati da DNA estratto a partire dal brodo di arricchimento selettivo mTSB. Le sostanze selettive presenti nel brodo, probabilmente, interferiscono con la reazione di amplificazione dell'acido nucleico. La sperimentazione in questo senso è stata abbandonata, in quanto fuori del campo di applicazione della validazione AFNOR per il kit iQ-Check *E. coli* O157:H7.

Una sintesi dei risultati totali, escludendo i risultati di cui sopra, è presentata in **Tabella 28**.

Sui campioni naturali non contaminati, analizzati nell'ambito del PRIC, sono stati ottenuti due risultati positivi tramite la PCR, che però non sono stati confermati dall'esame colturale. Ciò può essere dovuto alla presenza di DNA ancora integro nel campione, ma non di cellule batteriche in grado di crescere nel brodo di arricchimento o sulla piastra di terreno di isolamento selettivo. Nei prodotti di IV gamma è presente un'elevata carica batterica (Abadias et al. 2008) che può aver interferito con la crescita di *E. coli* nel brodo di pre-arricchimento non selettivo. L'incubazione dello stesso, condotta a 41,5±1°C, può aver favorito la moltiplicazione di *E. coli* non patogeni, o di altre *Enterobacteriaceae* in grado di sopravvivere a quella elevata temperatura. Un'altra possibilità è che la presenza concomitante della flora interferente mascheri la colonia target (sorbitolo negativa)

sulla piastra di CT SMAC (non si è proceduto alla fase di concentrazione immunomagnetica). Inoltre, durante il processo di produzione delle insalate confezionate, potrebbe essere stata introdotta qualche sostanza conservante che inibisce la crescita del batterio sul terreno colturale, ma non la reazione di PCR. Per giungere ad un'ipotesi validata da evidenze sperimentali è necessario effettuare ulteriori prove.

Nella **Tabella 29** sono riportati i valori di accordo positivo (PA), negativo (NA), di deviazione negativa (ND) e positiva (PD). Nella **Tabella 30** quelli accuratezza, sensibilità e specificità relative. Si fa riferimento, per il confronto, al certificato di validazione AFNOR No: BRD 07/15-06/08, valido fino al 30/06/2016.

I valori ottenuti nel laboratorio ARPA VdA sono migliori rispetto a quelli dichiarati nel report di validazione AFNOR. Bisogna tener conto, tuttavia, che i nostri dati sono stati calcolati per la matrice verdure di IV gamma; la validazione del kit invece è stata eseguita prevalentemente su campioni di carne macinata. Si può comunque concludere che il metodo alternativo in RTi PCR è correttamente eseguito nel laboratorio ARPA VdA.

Per quanto riguarda le altre caratteristiche tecniche, si fa riferimento a quanto specificato nel report di validazione AFNOR (**Tabella 31** e **Tabella 32**). Per l'analisi dei dati discordanti, in questo caso, non ci sono test statistici per verificare l'equivalenza dei metodi.

Il limite di determinazione relativo dichiarato è simile, ma un po' più basso, rispetto a quello del metodo di riferimento; i dati forniti sono relativi alla matrice carne macinata.

Il metodo è molto selettivo: su 50 ceppi target testati 50 sono risultati positivi, e si sono rilevate cross-reazioni con i 36 ceppi di *E. coli* non O157: H7 testati.

Confronto tra i risultati ottenuti da due operatori abilitati a eseguire l'analisi

Le prove sono state eseguite solo su verdure fresche pretagliate.

I risultati ottenuti, presentati in **Tabella 33**, indicano che non ci sono differenze tra le performance dei due operatori. Il metodo Bio-Rad risulta perfettamente riproducibile nel laboratorio VdA.

Tabelle dei risultati per *E. coli* O157: H7

Tabella 33: confronto tra i risultati di due operatori

	Positivi PCR	Negativi PCR	Totale
Operatore A	31	17	48
Operatore B	31	17	48

Tabella 27: Sintesi dei risultati ottenuti per *E. coli* O157:H7

Matrice	Numero di campioni analizzati		PCR	Conferma PCR	Colturale (ISO)
Campioni non contaminate (verdure IV gamma)	37		Positivi = 2	Positivi = 0	Positivi = 0
			Negativi = 35	Negativi = 37	Negativi = 37
			Inibiti = 0		
			Falsi negativi = 0		
			Falsi positivi = 2		
Insalata mista (mTSB)	20	Positivi = 10 Negativi = 10	Positivi = 6	Positivi = 10	Positivi = 10
			Negativi = 10	Negativi = 10	Negativi = 10
			Inibiti = 4		
			Falsi negativi = 0		
			Falsi positivi = 0		
Insalata mista (BPW)	20	Positivi = 10 Negativi = 10	Positivi = 10	Positivi = 10	Positivi = 10
			Negativi = 10	Negativi = 10	Negativi = 10
			Inibiti = 0		
			Falsi negativi = 0		
			Falsi positivi = 0		
Insalata valeriana confezionata (BPW)	40	Positivi = 20 Negativi = 20	Positivi = 20	Positivi = 20	Positivi = 20
			Negativi = 20	Negativi = 20	Negativi = 20
			Inibiti = 0		
			Falsi negativi = 0		
			Falsi positivi = 0		
Insalata mista con carote confezionata (BPW)	24	Positivi = 18 Negativi = 6	Positivi = 18	Positivi = 18	Positivi = 18
			Negativi = 6	Negativi = 6	Negativi = 6
			Inibiti = 0		
			Falsi negativi = 0		
			Falsi positivi = 0		

Tabella 30: confronto tra i valori di Accuratezza, Specificità e Sensibilità relative.

BPW 24 h a 41,5°C + Easy protocol	Accuratezza relativa	Specificità relativa	Sensibilità relative
Risultati Validazione AFNOR	97.4%	97.1%	100%
Risultati laboratorio ARPA VdA	98,3 %	97,2%	100%

Tabella 32: limite di determinazione relativo.

BPW 24 h + Easy protocol	RTi PCR	Metodo di riferimento
Risultati Validazione AFNOR	Tra 0,1 e 1,7 u.f.c./25 g	Tra 0,2 e 1,9 u.f.c./25 g

Tabella 31: analisi dei discordanti (secondo l'Allegato F della norma ISO 16140).

Risultati Validazione AFNOR	PD = 4, ND = 1 Y = PD + ND = 5 Y < 6	Non ci sono test Statistici disponibili per verificare l'equivalenza dei metodi
------------------------------------	--	---

Yersinia enterocolitica

Anche in questo caso sono stati analizzati campioni appartenenti ad un'unica matrice, le verdure lavate e pretagliate, pronte per essere consumate.

Un'indagine colturale, condotta su circa 42 campioni, nell'ambito del PRIC VdA negli anni 2013 e 2014, ha rilevato la presenza di *Yersinia* su un gran parte di questi (il 69.05 % positivi per il genere *Yersinia*, di cui il 35,71 % erano *Y. enterocolitica*). Tuttavia nessuno dei batteri isolati è risultato essere *Y. enterocolitica* presunta patogena. Inoltre si è riscontrata la presenza di numerose altre *Enterobacteriaceae* (26.19 % dei campioni), come viene indicato anche in letteratura (Abadias et al. 2008, Tan et al. 2014) .

Confronto del metodo RTi PCR con il metodo colturale di riferimento

Dopo la fase di messa a punto del metodo i RTi PCR, sono stati analizzati 29 campioni, rappresentativi di 4 tipi di verdura fresca, prelavata, tagliata e confezionata. Sono state eseguite prove sia su campioni incubati a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ per 48 ore che su campioni incubati a $22 \pm 2^\circ\text{C}$ per 5 giorni. I risultati sono presentati in **Tabella 34**.

E' stato dimostrato che il metodo ISO 10273:2003 non ha le caratteristiche tecniche adeguate, tali da poter essere preso come un valido riferimento (Lambertz et al. 2008). Per valutare l'accuratezza, la specificità e la selettività relativa dei tre metodi presi in considerazione, sono stati perciò confrontati i risultati analitici ottenuti (O) con i risultati attesi (A), in base alla contaminazione effettuata in laboratorio (**Tabella 35**).

Nessuna reazione di PCR è risultata inibita, in quanto tutti i controlli interni sono stati amplificati correttamente. I campioni negativi con il metodo molecolare sono quindi da considerarsi "falsi negativi".

I risultati in termini di accuratezza, sensibilità e specificità, calcolati a partire dai dati attesi in base agli inoculi eseguiti, sono presentati in **Tabella 36**.

Appare evidente che il metodo molecolare risulta estremamente più accurato, sensibile e specifico rispetto a entrambi i metodi colturali. Sono stati rilevati con la RTi PCR il 90,48% dei campioni positivi. Con il metodo colturale ISO 10273:2003 è stato rilevato un solo campione positivo (4,76%), al livello di inoculo più elevato (10^6 u.f.c./25g). Il metodo colturale, variato per la

combinazione temperatura/tempo di incubazione (30° C per 48 ore), ha rilevato il 23,81% dei campioni positivi.

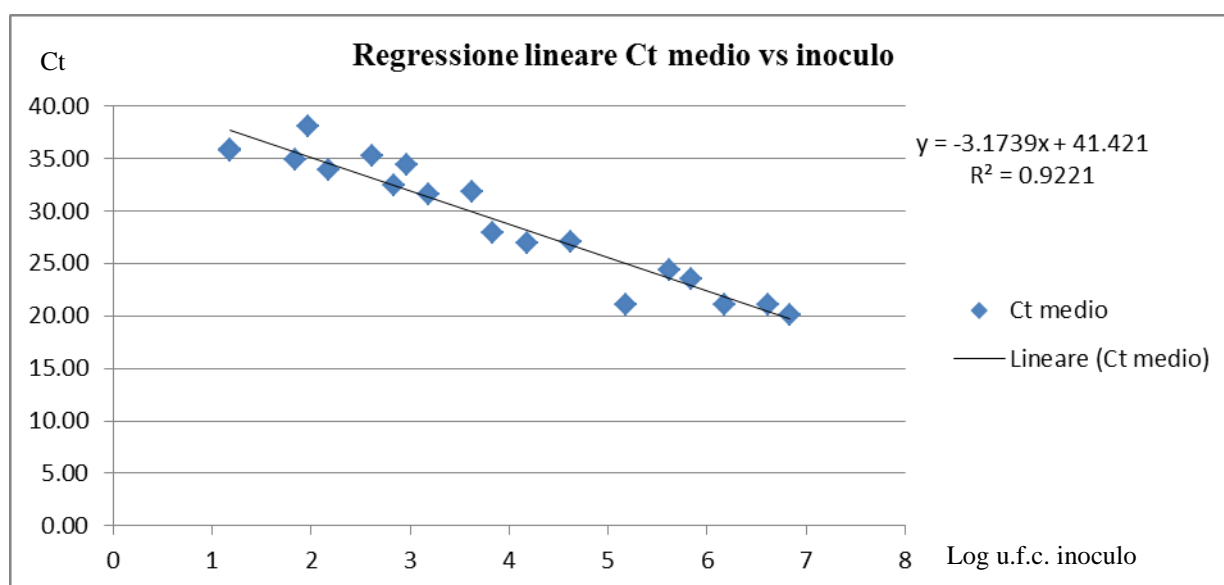
I risultati falsi negativi in RTi PCR si riferiscono tutti a livelli di inoculo molto bassi. Il kit indica una sensibilità, in condizioni ottimali, di 100 u.f.c.: fino al livello di contaminazione teorico di 10^2 u.f.c./25 g di campione, anche nel nostro laboratorio i risultati osservati coincidono con quelli attesi. Al livello teorico di inoculo di 10^1 u.f.c./25g i risultati positivi e quelli negativi sono il 61.5% e il 38.5%, rispettivamente (**Tabella 37**). Possiamo stimare che questo sia il livello di determinazione relativo del metodo messo a punto (il LOD_{50} è il livello di contaminazione al quale il metodo alternativo ha la capacità di rilevare il 50% dei risultati positivi. ISO 16140:2003). In letteratura si trovano dati simili (Lambertz et al. 2008).

Non è stato possibile purtroppo quantificare il limite di determinazione relativo con precisione, in quanto il numero necessario delle prove da effettuare, secondo la ISO 16140:2003, è molto elevato. I costi, sia in termini di reattivi, sia in termini di tempo impiegato, non sono giustificabili se non in vista della validazione e dell'accreditamento del metodo analitico presentato in questa tesi. Tuttavia la ricerca di *Y. enterocolitica* su verdure di quarta gamma non è più nel programma del PRIC 2015, di conseguenza la sperimentazione deve essere sospesa.

Dato che, fin dalle prime prove eseguite, il metodo colturale ISO 10273:2003 non ha rilevato la presenza del ceppo di *Y. enterocolitica* patogeno a nessun livello di inoculo, si è deciso di effettuare la reazione di PCR anche a partire dal brodo di arricchimento incubato a $22\pm 2^\circ\text{C}$ per 5 giorni, al fine di valutare se fosse rivelabile il DNA target, al termine del periodo di incubazione previsto dal metodo, o se il risultato colturale negativo derivasse da una completa inibizione del ceppo batterico inoculato. E' stata eseguita una prova preliminare a basso livello di inoculo (10^2 u.f.c./25 g e 10^1 u.f.c./25 g più il campione non inoculato), estraendo i campioni una sola volta ed effettuando una sola reazione di PCR per ciascuna estrazione. Successivamente è stata ripetuta la prova su 7 livelli di inoculo (10^6 u.f.c./25g - 10^1 u.f.c./25g e campione non inoculato). L'estrazione del DNA è stata eseguita in triplicato e l'amplificazione in doppio su ciascun estratto. Sono state perciò condotte 45 reazioni di RT PCR ciascuna combinazione temperatura/tempo di incubazione del brodo di arricchimento. I risultati ottenuti sono mostrati nella **Tabella 38**.

Il test del χ^2 indica che ci sono differenze significative tra le due serie di dati ($p = 0.003$). In particolare, la RTi PCR sul DNA estratto dal brodo incubato a 30°C per 48 h ha dimostrato una accuratezza (AC) del 91.11%, una specificità (SP) del 100% e una sensibilità (SE) del 89.47%, la RTi PCR sul DNA estratto dal brodo incubato a 22°C per 5 giorni ha dimostrato una AC del 68.89%, una SP del 100% e una SE del 63,16%.

Probabilmente, dopo un periodo di arricchimento prolungato a bassa temperatura, la flora naturalmente presente nelle insalate prende il sopravvento sul ceppo di inoculato. Le reazioni di PCR eseguite a partire dal campione incubato per 5 giorni, infatti, sono risultate tutte positive solo fino a un livello di inoculo di 10^4 (42.000 u.f.c./25g), mentre quelle eseguite a partire dal brodo incubato per 48 ore a 30°C risultano tutte positive fino al livello di inoculo di 10^2 (420 u.f.c./25g). Senza dubbio questo è anche uno dei motivi per cui l'esame colturale sottostima ampiamente il risultato analitico atteso. E' stato riportato in letteratura anche che in molti campioni, a causa di un'abbondante flora interferente sulla piastra di isolamento (CIN agar), *Y. enterocolitica* appare non con il suo aspetto caratteristico ad "occhio di bue", ma sotto forma di piccole colonie bianche, che quindi non vengono selezionate per la successiva identificazione biochimica (Van Damme et al. 2013). La sottostima del metodo colturale può essere quindi dovuta anche a variazioni del profilo fenotipico caratteristico del batterio, che quindi non viene reisolato e successivamente identificato. Per concludere l'analisi dei dati ottenuti con il metodo PCR sono stati confrontati i valori degli inoculi effettuati ($\text{Log u.f.c} = \log_{10} \text{u.f.c.}$) con i valori di Ct (ciclo soglia) delle reazioni di PCR. Per verificare la correlazione lineare tra i valori di Ct e i livelli di inoculo sono stati utilizzati tutti i dati raccolti: il coefficiente di correlazione di Pearson è stato calcolato, quindi, tenendo conto anche delle reazioni di PCR eseguite in singolo, i cui valori di Ct non sono riportati in Tabella 39. Si evidenzia una regressione lineare negativa, in quanto il valore di Ct è inversamente proporzionale al livello di inoculo eseguito.



Pearson : -0,96 ($\alpha < 0,05$)

Nella **Tabella 39** si riportano i valori di il Ct medio, la deviazione standard (Dev St) e il coefficiente di variazione (CV %), riferiti ai campioni analizzati (A,B,C) a vari livelli di inoculo. Il campione C è stato contaminato solo a bassi livelli. Per la quarta matrice (D) la reazione di PCR è stata effettuata in singolo, a causa di problemi tecnici, di conseguenza non è stato possibile calcolare il Ct medio con la deviazione standard ed il CV %.

I coefficienti di variazione (CV %), relativi ai Ct medi e alla deviazione standard associata, non sono correlati al livello di inoculo, ma variano da un valore 0,32% ad un valore di 4,13%. Probabilmente c'è un effetto combinato tra la tipologia di campione analizzato (più o meno manipolato prima di essere confezionato, presenza di sostanze inibenti la crescita batterica durante lo stadio di arricchimento) e il livello di contaminazione da parte di batteri, per esempio *Y. enterocolitica* non patogena e altre *Enterobacteriaceae*, che possono interferire con la sopravvivenza e la moltiplicazione del ceppo inoculato. Inoltre la reazione di PCR avviene in un volume molto piccolo, di conseguenza sicuramente gioca un ruolo importante, nella ripetibilità del risultato, anche la componente legata alla precisione dell'inoculo del DNA estratto nei pozzetti della micropiastra. In ogni caso i coefficienti di variazione rilevati sono molto bassi, con CV % < 2 ad eccezione di due casi, e indicano che il kit utilizzato fornisce dati molto ripetibili. Per approfondire anche quest'aspetto, tuttavia, è necessario raccogliere un maggior numero di dati.

Tabelle dei risultati per *Y. enterocolitica*

Tabella 34: confronto tra metodo PCR e metodi colturali

	Totale campioni analizzati 29	Totale positivi a vari livelli di inoculo 21	Totale negativi non inoculati 8
PCR Real time 48h 30°C	29	19	10
Colturale incubazione 48h a 30°C	29	5	24
Colturale incubazione 5 gg a 20°C	29	0	29

Tabella 35 : Accordo Positivo e Negativo e Deviazione Positiva e Negativa

	Accordo positivo A+/O+ (PA)	Accordo negativo A-/O- (NA)	Deviazione positiva A-/O+ (PD)	Deviazione negativa A+/O- (ND)
PCR Real time	19	8	0	2*
Colturale incubazione 48h a 30°C	5	8	0	14
Colturale incubazione 5 gg a 20°C	1	8	0	20

Tabella 36: confronto tra i valori di Accuratezza, Specificità e Sensibilità relative

	Accuratezza relativa	Specificità relative	Sensibilità relativa
PCR Real time	93.10 %	100 %	90,48%
Colturale incubazione 48h a 30°C	44,83 %	100%	23.81 %
Colturale incubazione 5 gg a 20°C	31,03 %	100%	4.76 %

Tabella 38: confronto tra PCR a 48 ore e 5 giorni

PCR Positive attese: 38 PCR Negative attese: 7	PCR Real time (30°C per 48 h)	PCR Real time (22°C per 5 giorni)
positive PCR	34	24
negative PCR	11	21
Totali	45	45

Tabella 37: risultati per ogni livello di inoculo

livello di inoculo	Numero di reazioni PCR eseguite	Positivi PCR	Negativi PCR	Positivi metodo colturale 30°C/48 h	Positivi metodo colturale 22°C/5 gg
10 ⁶	9	9 (100%)	0	2 su 3 matrici	1 su 3 matrici
10 ⁵	9	9 (100%)	0	2 su 3 matrici	0
10 ⁴	9	9 (100%)	0	1 su 3 matrici	0
10 ³	9	9 (100%)	0	0	0
10 ²	13	13 (100%)	0	0	0
10 ¹	13	8 (61.5%)	5 (38.5%)	0	0

Tabella 39: confronto tra i livelli di inoculo e i Ct rilevati.

Matrice	livello di inoculo u.f.c./25g	livello di inoculo Log u.f.c./25g	Ct medio ± Dev St	CV%
A	4,2 X 10 ⁶	6.62	21.12± 0,24	1,14
B	1,5 X 10 ⁶	6.18	21.05 ± 0.14	0,65
A	4,2 X 10 ⁵	5.62	24.36 ± 0.21	0,87
B	1,5 X 10 ⁵	5.18	24.09 ± 0.08	0.35
A	4,2 X 10 ⁴	4.62	27.01 ± 0.35	1.28
B	1,5 X 10 ⁴	4.18	26.94± 0.09	0.32
A	4,2 X 10 ³	3.62	31.85 ± 0.34	1.08
B	1,5 X 10 ³	3.18	31.62 ± 0.24	0.77
C	9,2 X10 ²	2.96	34.44 ± 0.42	1.21
A	4,2 X 10 ²	2.62	34.24 ± 0.97	2.84
B	1,5 X 10 ²	2.18	33.90 ± 0.45	1.33
C	9,2 X10 ¹	1.96	38.00 ± 1.57	4.13
B	1,5 X 10 ¹	1.18	35.81 ± 0.09	0.26

Tabella 40: Confronto tempi di risposta tra metodo RT PCR e metodo colturale.

Metodo PCR Real Time	Metodo colturale
<i>Salmonella spp</i>	
Pre-arricchimento 21 ± 1 h	Pre-arricchimento 18 - ± 2 h
Estrazione del DNA circa 30 minuti	Arricchimento 24 ± 3 h
Preparazione master mix e amplificazione circa 2 ore	Isolamento 24 ± 3 h
Lettura risultato circa 15 minuti	Reisolamento colonie sospette 18 ± 2 h
	Identificazione biochimica e sierologica 24 ± 3 h
Totale circa 1 giorno	Totale da 3 a 5 giorni (+ tempo necessario per la tipizzazione)
<i>Listeria monocytogenes</i>	
Arricchimento 25 ± 1h	Primo arricchimento 24 ± 3 h
Estrazione del DNA circa 45 minuti	Secondo arricchimento 48 ± 3 h
Preparazione master mix e amplificazione circa 2 ore	Isolamento 24 – 48 ± 3 h
Lettura risultato circa 15 minuti	Reisolamento colonie sospette 24 ± 3 h
	Identificazione biochimica 24 ± 2 h
Totale circa 1 giorno	Totale da 3 a 5 giorni o 8 giorni (+ tempo necessario per la tipizzazione).
<i>E. coli O 157 H:7</i>	
Arricchimento 8 - 24 h	Arricchimento 18 -24 h
Estrazione del DNA circa 30 minuti	Isolamento 24 ± 3 h
Preparazione master mix e amplificazione circa 2 ore	Reisolamento colonie sospette 18 ± 2h
Lettura risultato circa 15 minuti	Identificazione biochimica e sierologica 24 ± 3 h
Totale circa 1 giorno	Totale da 2 a 4 giorni (+ tempo necessario per la tipizzazione).
<i>Y. enterocolitica</i>	
Arricchimento 48 h	Arricchimento 2 - 5 giorni
Estrazione del DNA circa 2 h	Isolamento 24 ± 3 h
Preparazione master mix e amplificazione circa 2 ore	Reisolamento colonie sospette 24 ± 3 h
Lettura risultato circa 15 minuti	Identificazione biochimica e sierologica 24 ± 3 h
	Prove di patogenicità 24 h
Totale circa 2 giorni e mezzo	Totale da 5 a 8 giorni (+ tempo necessario per la tipizzazione).

DISCUSSIONE

I risultati ottenuti per i metodi alternativi in PCR Real Time, validati AFNOR, secondo la norma ISO 16140: 2003, *Salmonella* spp (iQ-Check Salmonella II), *L. monocytogenes* (iQ-Check *Listeria monocytogenes* II) e *E. coli* O157 (iQ-Check *E. coli* O157:H7), hanno dimostrato che questi kit sono caratterizzati da un' elevata accuratezza, sensibilità e specificità (**Tablelle 14, 22, 30**). I dati analitici sono, inoltre, ripetibili e riproducibili: non ci sono differenze significative tra quelli ottenuti, a partire dalla fase di estrazione, da un operatore su più ripetizioni di uno stesso campione e neppure tra quelli ottenuti da due operatori diversi (**Tablelle 18, 26, 33**). Questi kit sono quindi utilizzabili, previo accreditamento, anche in un laboratorio deputato al controllo ufficiale degli alimenti.

Il sistema, comprensivo della fase di estrazione, di amplificazione del DNA e di rilevazione del risultato in tempo reale, è veloce, in quanto permette di ottenere un risultato , negativo o presunto positivo, in circa 24 ore (**Tabella 40**).

Il protocollo analitico è semplice da applicare, in quanto tutti reagenti sono pronti all'uso, inoltre è diminuita al minimo la manipolazione del campione anche nella fase di estrazione e quindi l'errore umano a essa associato, infine l'interpretazione dei risultati è automatica e facilitata dall'uso del software.

Il sistema è anche flessibile, in quanto consente di effettuare, su una micropiastra da 96 pozzetti, lo screening di 94 campioni contemporaneamente (più un controllo positivo e un negativo di PCR). Questo è un vantaggio nell'ambito del controllo ufficiale degli alimenti. La normativa di riferimento richiede, infatti, l'analisi di un numero elevato di unità campionarie per ogni alimento analizzato, fino a trenta nel caso degli alimenti in polvere per lattanti. Inoltre, grazie al fatto che i protocolli termici sono gli stessi, per i tre kit presi in considerazione, è possibile effettuare contemporaneamente la determinazione di diversi microrganismi in una sola seduta analitica. Spesso, infatti, su uno stesso campione di alimento è necessario ricercare più criteri di sicurezza alimentare, quindi più microrganismi. Accorciare i tempi di risposta è importante in particolare per quegli alimenti che hanno una *shelf life* molto bassa, come ad esempio le verdure di IV gamma, incompatibile con i lunghi tempi analitici dei metodi colturali di riferimento: si rischia di giungere ad un risultato, magari positivo, quando l'alimento analizzato è ormai scaduto.

E' possibile, infine, procedere all'estrazione del DNA dopo il tempo di incubazione del brodo di arricchimento, indicato nel metodo alternativo validato, normalmente circa 24 ore, e conservare il

DNA a -20°C fino a due giorni, in modo da poter ottimizzare l'utilizzo del kit. Si possono quindi analizzare contemporaneamente campioni giunti in laboratorio in tre giorni successivi, come tipicamente avviene durante le campagne di controllo ufficiale (**Tabelle. 17, 25**).

I brodi di arricchimento possono essere conservati a $3\pm 2^\circ\text{C}$ per 48 ore prima della loro conferma in caso di positività del campione.

Ottimizzare l'uso dei kit significa migliorare i tempi di risposta, l'impiego del personale e diminuire il costo complessivo dell'analisi anche in termini di reattivi che, per un kit ottimizzato come descritto, è di circa 10 euro per campione. Il risparmio economico è rilevante in particolare sui campioni negativi, che non necessitano di conferma con il metodo colturale. Inoltre, l'impiego dei sistemi miniaturizzati, come le micropiastre e le micropipette, e il diminuito numero di reattivi necessari per eseguire l'analisi, riduce in maniera sensibile la produzione dei rifiuti speciali di laboratorio e l'utilizzo di sostanze tossiche, cancerogene e teratogene: ha perciò un risvolto positivo sia di tipo ambientale sia di sicurezza per gli operatori.

La presenza nel kit di un controllo positivo, un controllo negativo e un controllo interno, permette un'interpretazione del risultato affidabile e corretta, in quanto esclude i campioni falsi negativi a causa di una inibizione della reazione PCR. I risultati falsi negativi, ottenuti nell'ambito di questa tesi, sono tutti relativi a livelli di inoculo molto bassi, vicini al limite di determinazione relativo dichiarato nei certificati di validazione (**Tabella 16, 24, 32**). Per contro sono stati rilevati due campioni falsi positivi per *E. coli* O157:H7 (**Tabella 27**).

Un risultato falso negativo è un problema in termini di sanità pubblica, in quanto può voler dire non riconoscere l'agente eziologico causa di una tossinfezione alimentare, o permettere che un alimento non salubre circoli liberamente sul mercato. Un risultato falso positivo è invece un problema commerciale, viene infatti temporaneamente bloccata la vendita di una merce o addirittura ritirata dal mercato.

Gli aspetti negativi di questi metodi alternativi sono riconducibili, essenzialmente, al fatto che il risultato positivo deve essere confermato con un metodo colturale di riferimento. In questo caso si perdono i vantaggi sopra descritti, sia in termini di risparmio economico che in termini di tempi di risposta più brevi: infatti, per la conferma, è necessario partire dal brodo di arricchimento e ripetere tutti i passaggi previsti dal metodo colturale. Sono tuttavia validati anche metodi di conferma rapidi, basati su terreni cromogeni, ma hanno un prezzo elevato e, per questo motivo, non sono stati presi in considerazione in questa tesi.

Un'altro punto critico è che la tecnica molecolare richiede l'utilizzo di attrezzatura costosa, che va tenuta sotto controllo e tarata regolarmente, come peraltro tutta l'attrezzatura utilizzata in un

laboratorio. La manutenzione ha un costo rilevante e richiede un'assistenza tecnica specializzata e costante. Il personale che esegue le analisi, inoltre, deve possedere una preparazione di base di buon livello sia in microbiologia che in biologia molecolare, deve inoltre essere adeguatamente formato e costantemente aggiornato sull'uso dei kit.

Per quanto riguarda *Yersinia* le analisi effettuate sono poche, rispetto a quelle eseguite per i tre kit Bio-Rad e i dati a disposizione non sono sufficienti per un'analisi dei risultati che ne consenta una validazione statisticamente significativa. Non esiste in commercio né in bibliografia un metodo normato e riconosciuto a livello internazionale, il protocollo analitico proposto è stato perciò messo a punto nel laboratorio ARPA VdA. Tuttavia sono necessarie ancora molte prove, ad esempio per 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).

La fase di estrazione, con il kit utilizzato, è lunga e laboriosa (sono necessarie circa 2 ore di lavoro, contro i trenta minuti circa dei kit iQ-Check), richiede numerosi passaggi e quindi è aumentato di molto il rischio di contaminazioni crociate. Inoltre, per lo stesso motivo non è possibile processare tanti campioni contemporaneamente, come nel caso dei kit Bio-Rad. Una caratteristica importante per un kit analitico è la sua convenienza, anche in termini di ore lavoro richieste, e la sua praticabilità, durante il lavoro di routine, nel laboratorio (Margot et al. 2013).

Come già detto, il numero di campioni analizzato non permette di giungere a conclusioni statisticamente significative. Tuttavia, nel corso della sperimentazione sono emerse alcune chiare indicazioni.

Il metodo colturale ISO 10273:2003 sottostima la presenza di *Y. enterocolitica*, come peraltro riportato in letteratura, probabilmente per l'abbondante flora interferente, che cresce nelle stesse condizioni di *Yersinia* e la difficoltà a distinguere i ceppi patogeni da quelli non patogeni (Abadias et al. 2008; Fukushima et al. 2011; Tan et al. 2014).

Il terreno selettivo utilizzato per l'isolamento delle colonie, CIN (Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin), pur essendo più selettivo di altri terreni di isolamento convenzionalmente utilizzati per le *Enterobacteriaceae*, non permette di distinguere la *Yersinia* spp da altri microorganismi fermentanti il mannitolo, come ad esempio *Serratia liquefaciens*, *Enterobacter agglomerans*, *Aeromonas* spp., *Citrobacter* spp, *Providencia* spp, che crescono sulla piastra producendo colonie rosse con un aspetto caratteristico, detto a "occhio di bue" (Tan et al. 2014). Inoltre, nel corso del primo anno di controlli, molti campioni analizzati sono risultati contaminati da ceppi di *Y. enterocolitica* con

caratteristiche biochimiche molto diverse tra loro, ma tutte risultate non patogene in base al metodo ISO 10273:2003. I ceppi non patogeni, frequentemente isolati negli alimenti, devono essere distinti da quelli patogeni sulla base di caratteristiche fenotipiche come la calcio dipendenza a 37°C, il test della produzione dell'esculina, il test della pirazinamidasi e i test sierologici di agglutinazione. Tuttavia la classificazione biochimica e sierologica, pur essendo dispendiosa in termini di ore lavorative, ha una bassa specificità per la *Y. enterocolitica* patogena (Ye et al. 2014).

Si è osservato un certo miglioramento nel recupero del ceppo patogeno inoculato nei campioni analizzati, diminuendo a 2 giorni il tempo di incubazione del brodo di arricchimento e aumentando la temperatura a 30°C (**Tabella 35**), cosa già evidenziata in altre sperimentazioni (Van Damme et al. 2013);

Il metodo molecolare utilizzato ha dimostrato delle buone prestazioni in termini di accuratezza sensibilità e specificità (**Tabella 36**). 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). Inoltre, anche in questo caso, i tempi di risposta sono molto ridotti (**Tabella 40**).

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)

La *Y. enterocolitica*, come ricordato, è il terzo agente di zoonosi nella U.E. ma, malgrado questo, le tecniche analitiche per le indagini alimentari a disposizione dei laboratori non sono utilizzabili o perché poco performanti, come il metodo normato ISO, o perché manca la validazione da parte di studi interlaboratorio e/o organismi internazionali. Anche l'EFSA indica che sarebbe auspicabile uno screening mediante la tecnica RTi-PCR, per diminuire il rischio di risultati falsi negativi su campioni ambientali e alimentari (EFSA, 2007). Tuttavia, come già detto, non esistono al momento kit commerciali validati, utilizzabili in routine dai laboratori: probabilmente, dal momento che la patologia causata è spesso di lieve entità, manca il “*medical need*”, primo presupposto per investire nella messa a punto di metodi analitici altamente performanti.

Un metodo in Real Time PCR per *Y. enterocolitica*, validato e riconosciuto a livello internazionale, potrebbe diventare, viste le carenze del metodo colturale, il metodo di riferimento, come già accade per *E. coli* O 157 sui germogli (Reg. UE N. 209/2013 metodo CEN/ISO TS 13136 per *E. coli* STEC sui germogli). Tra l'altro se questo fosse il metodo di riferimento anche per le verdure di IV gamma, allora i due campioni positivi, rilevati con il kit Bio-Rad non sarebbero da considerarsi dei

“falsi positivi” (**Tabella 27**), in questo caso al contrario sarebbero stati dei “falsi negativi” quelli ottenuti con il metodo colturale.

L'utilizzo esclusivo dei metodi basati su RTi-PCR, al momento, è ancora improponibile, ma sicuramente una combinazione delle due tecniche analitiche, quella molecolare e quella colturale, tale da conciliare le caratteristiche positive che entrambe le tecniche possiedono, rappresenta un compromesso che può dare buoni risultati. Ad esempio l'utilizzo dei kit in fase di screening diminuirebbe moltissimo la mole di lavoro, in particolar modo per i molti campioni analizzati che danno un risultato negativo, con un rilevante risparmio in termini di tempo e denaro (Wang et al. 2014).

E' necessario, vista l'evoluzione a cui si sta assistendo nell'ambito della filiera alimentare, della legislazione dedicata e delle tecniche analitiche a disposizione, effettuare un “salto culturale” che i laboratori pubblici in Italia, a causa delle sempre minori risorse economiche a disposizione, fanno fatica a compiere. In realtà, come è stato dimostrato anche nel corso di questa trattazione, si risparmierebbero tempo e denaro e si migliorerebbero le performance analitiche; per ottenere questo, tuttavia, bisogna investire nelle attrezzature e nella formazione del personale.

Bibliografia

- Abadias M., Usall J., Anguera M., Solsona C., Viñas I. “Microbiological quality of fresh, minimally-processed fruit and vegetables, and sprouts from retail establishments”. *Int J Food Microbiol.* (2008 Mar 31);123(1-2):121-9. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.12.013.
- Arrausi-Subiza M., Ibabe J.C., Atxaerandio R., Juste R.A., Barral M. “Evaluation of different enrichment methods for pathogenic *Yersinia* species detection by real time PCR”. *BMC Vet Res.* (2014 Aug 29):10(1):192. doi: 10.1186/s12917-014-0192
- Baysal A.H. ”Comparison of conventional culture method and fluorescent in situ hybridization technique for detection of *Listeria* spp. in ground beef, turkey, and chicken breast fillets in İzmir, Turkey”. *J Food Prot.*(2014 Dec): 77(12):2021-30. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-14-034.
- Bonardi S., Bassi L., Brindani F., D'Incau M., Barco L., Carra E., Pongolini S. “Prevalence, characterization and antimicrobial susceptibility of *Salmonella enterica* and *Yersinia enterocolitica* in pigs at slaughter in Italy”. *Int J Food Microbiol.* (2013 May 15): 163(2-3):248-57. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.02.012
- Cody M.M., Stretch T.; Academy of Nutrition and Dietetics. “Position of the Academy of Nutrition and Dietetics: food and water safety”. *J Acad Nutr Diet.* (2014 Nov): 114(11):1819-29. doi: 10.1016/j.jand.2014.08.023.
- European Food Safety Authority. “The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013”. *EFSA Journal* (2015): 13(1):3991
- European Food Safety Authority.”Monitoring and identification of human enteropathogenic *Yersinia* spp.1. Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards” *EFSA Journal* (2007) 595, 1-30.
- European Food Safety Authority. “Technical specifications for the monitoring and reporting of verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC) on animals and food (VTEC surveys on animals and food)” *EFSA Journal* (2009): 7(11):1366 [43 pp.]. doi:10.2903/j.efsa.2009.1366
- Favier G.I., Lucero Estrada C., Cortiñas T.I., Escudero M.E. “Detection and Characterization of Shiga Toxin Producing *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., and *Yersinia* Strains from Human, Animal, and Food Samples in San Luis, Argentina”. *Int J Microbiol.* (2014): 2014:284649. doi: 10.1155/2014/284649.

- Frickmann H., Schwarz N.G., Rakotozandrindrainy R., May J., Hagen R.M. "PCR for enteric pathogens in high-prevalence settings. What does a positive signal tell us?". *Infect Dis (Lond)*. (2015 Mar): 12:1-8.
- Fukushima H., Shimizu S., Inatsu Y. "Yersinia enterocolitica and Yersinia pseudotuberculosis Detection in Foods" *J Pathog*. (2011): 2011:735308. doi: 10.4061/2011/735308
- Gould L.H., Walsh K.A., Vieira A.R., Herman K., Williams I.T., Hall A.J., Cole D.; "Centers for Disease Control and Prevention Surveillance for foodborne disease outbreaks - United States, 1998-2008". *MMWR Surveill Summ*. (2013 Jun 28): 62(2):1-34.
- Hellberg R.S., Chu E. "Effects of climate change on the persistence and dispersal of foodborne bacterial pathogens in the outdoor environment: A review". *Crit Rev Microbiol*. (2015 Jan 23): 1-25.
- Hoorfar J. "Rapid detection, characterization, and enumeration of foodborne pathogens" *APMIS Suppl*. (2011 Nov): (133):1-24. doi: 10.1111/j.1600-0463.2011.02767.x.
- Huang Y., Wang X., Cui Z., Yang Y., Xiao Y., Tang L., Kan B., Xu J., Jing H. "Possible use of ail and foxA polymorphisms for detecting pathogenic Yersinia enterocolitica". *BMC Microbiol*. (2010 Aug 7): 10:211. doi: 10.1186/1471-2180-10-211.
- Iwamoto M., Huang J.Y., Cronquist A.B., Medus C., Hurd S., Zansky S., Dunn J., Woron A.M., Oosmanally N., Griffin P.M., Besser J., Henao O.L. "Bacterial Enteric Infections Detected by Culture-Independent Diagnostic Tests" - FoodNet, United States, 2012-2014". *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. (2015 Mar 13): 64(9):252-7.
- Kraushaar B., Dieckmann R., Wittwer M., Knabner D., Konietzny A., Mäde D., Strauch E. "Characterization of a Yersinia enterocolitica biotype 1A strain harbouring an ail gene". *J Appl Microbiol*. (2011 Oct): 111(4):997-1005. doi: 10.1111/j.1365-2672.2011.05112.x.
- Lambertz S.T., Nilsson C., Hallanvuo S., Lindblad M. "Real-time PCR method for detection of pathogenic Yersinia enterocolitica in food". *Appl Environ Microbiol*. (2008 Oct): 74(19):6060-7. doi: 10.1128/AEM.00405-08.
- Lauer W.F., Tourniaire J.F. "iQ-Check Listeria monocytogenes II GovVal Validation Comparison to the Health Canada MFHPB-30 Reference Method for Detection of Listeria in Ready-to-Eat Meats and on Stainless" *Journal of AOA C Internat*. (2013): Vol. 96, No. 3.
- Lauer W.F., Tymciu S., Sidi C.D., Sonigo P. "Validation of iQ-Check E. coli O157:H7 real-time PCR test kit for detection of Escherichia coli O157:H7 in selected foods." *JAOAC Int*. (2009 Jul-Aug): 92(4):1095-104.

- Law J.W., Ab Mutalib N.S., Chan K.G., Lee L.H. “Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations”. *Front Microbiol.* (2015 Jan 12): 5:770. doi: 10.3389/fmicb.2014.00770.
- Liming S.H., Bhagwat A.A. “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
- Määttä J., Lehto M., Kuisma R., Kymäläinen H.R., Mäki M. “Microbiological quality of fresh-cut carrots and process waters”. *J Food Prot.* (2013 Ju): 76(7):1240-4. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-12-550
- Margot H., Stephan R., Guarino S., Jagadeesan B., Chilton D., O'Mahony E., Iversen C. “Inclusivity, exclusivity and limit of detection of commercially available real-time PCR assays for the detection of *Salmonella*”. *Int J Food Microbiol.* (2013 Aug 1): 165(3):221-6. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.012..
- Olaimat AN., Holley R.A. “Factors influencing the microbial safety of fresh produce: a review”. *Food Microbiol.* (2012 Oct): 32(1):1-19. doi: 10.1016/j.fm.2012.04.016.
- Paixão R., Moreno L.Z., Sena de Gobbi D.D., Raimundo D.C., Hofer E., Matté M.H., Ferreira T.S., de Moura Gomes V.T., Costa B.L., Moreno A.M. “Characterization of *Yersinia enterocolitica* biotype 1A strains isolated from swine slaughterhouses and markets” *.Scientific World Journal.* (2013): 2013:769097. doi: 10.1155/2013/769097..
- Palomino-Camargo C., González-Muñoz Y..”Molecular techniques for detection and identification of pathogens in food: advantages and limitations” *Rev Peru Med Exp Salud Publica.* (2014 Jul-Sep): 31(3):535-46.
- Postollec F., Falentin H. Pavan S., Combrisson J., Sohier D. “Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology”. *Food Microbiol.* (2011 Aug): 28(5):848-61. doi: 10.1016/j.fm.2011.02.008.
- Rusak L.A., Dos Reis C.M., Barbosa A.V., Santos A.F., Paixão R., Hofer E., Vallim D.C., Asensi M.D. “Phenotypic and genotypic analysis of bio-serotypes of *Yersinia enterocolitica* from various sources in Brazil”. *J Infect Dev Ctries.* (2014 Dec 15): 8(12):1533-40. doi: 10.3855/jidc.4553.
- Tan L.K., Ooi P.T., Carniel E., Thong K.L. “Evaluation of a modified Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin agar for isolation of *Yersinia spp*”. *PLoS One.* (2014 Aug 29): 9(8):e106329. doi: 10.1371/journal.pone.0106329. eCollection 2014.

- Van Damme I., Berkvens D., Botteldoorn N., Dierick K., Wits J., Pochet B., De Zutter L. "Evaluation of the ISO 10273:2003 method for the isolation of human pathogenic *Yersinia enterocolitica* from pig carcasses and minced meat". *Food Microbiol.* (2013 Dec): 36(2):170-5. doi: 10.1016/j.fm.2013.05.007.
- Viator C., Blitstein J., Brophy J.E., Fraser A. "Preventing and controlling foodborne disease in commercial and institutional food service settings: a systematic review of published intervention studies". *J Food Prot.* (2015 Feb): 78(2):446-56. doi: 10.4315/0362-028X.JFP-14-266.
- Wang J.Z., Duan R., Liang J.R., Huang Y., Xiao Y.C., Qiu HY, Wang X., Jing H.Q. "Real-time TaqMan PCR for *Yersinia enterocolitica* detection based on the ail and foxA genes". *J Clin Microbiol.* (2014 Dec): 52(12):4443-4. doi: 10.1128/JCM.02528-14.
- Ye Y.W., Ling N., Han Y.J., Wu Q.P. "Detection and prevalence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in refrigerated and frozen dairy products by duplex PCR and dot hybridization targeting the virF and ail genes". *J Dairy Sci.* (2014 Nov): 97(11):6785-91. doi: 10.3168/jds.2014-8382.
- UNI EN ISO 11290-1:2005 "Microbiologia degli alimenti e mangimi per animali. Metodo orizzontale per la ricerca di *Listeria monocytogenes*" www.iso.org/iso/home/standards.htm.
- UNI EN ISO 6579:2008 "Microbiologia degli alimenti e mangimi per animali. Metodo orizzontale per la ricerca di *Salmonella* spp" www.iso.org/iso/home/standards.htm.
- ISO 18593:2004 "Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontale methods for sampling techniques from surfaces using contact plates and swabs". www.iso.org/iso/home/standards.htm.
- ISO 7218:2007/Amd.1:2013 "Microbiology of food and animal feeding stuffs – General requirements and guidance for microbiological examinations" www.iso.org/iso/home/standards.htm.
- ISO/IEC 17025: 2005 "Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova". www.iso.org/iso/home/standards.htm.
- ISO/TS 13843:2000 "Water quality - Guidance on validation microbiological methods" www.iso.org/iso/home/standards.htm.
- ISO 10273:2005 "Microbiologia degli alimenti e mangimi per animali. Metodo orizzontale per la ricerca di *Yersinia enterocolitica* presunta patogena" www.iso.org/iso/home/standards.htm.
- ISO 16654:2001 "Microbiologia degli alimenti e mangimi per animali. Metodo orizzontale per la ricerca di *Escherichia coli* O:157" www.iso.org/iso/home/standards.htm.

ISO 16140:2003 “Microbiology of food and animal feeding stuffs – Protocol for the validation of alternative methods” www.iso.org/iso/home/standards.htm.

ISO/IEC 17025:2005 “General requirements for the competence of testing and calibration laboratories” www.iso.org/iso/home/standards.htm.