



UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Biomedicina Comparata ed Alimentazione

Corso di laurea magistrale in
Biotecnologie per l'alimentazione

Analisi di *Salmonella* spp in PCR nel processo di potabilizzazione
dall'acqua grezza da destinare al consumo umano e in acque
potabili: confronto tra metodo colturale e biomolecolare.

Relatore

Prof.ssa Barbara Cardazzo

Correlatori

Dott. Stefano Della Sala

Dott.ssa Paola Miana

Laureanda

Alice Pivato

Matricola n.

1128629

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

SOMMARIO

INDICE DELLE FIGURE.....	3
INDICE DELLE TABELLE.....	4
RIASSUNTO.....	5
ABSTRACT.....	7
1.INTRODUZIONE.....	9
1.1 DESCRIZIONE ACQUA E PROCESSO DI POTABILIZZAZIONE.....	9
1.2 RESPONSABILITA' E ASPETTO NORMATIVO.....	16
1.3 AGENTE EZIOLOGICO DELLA SALMONELLOSI: RILEVANZA PER LA SALUTE UMANA.....	19
2. SCOPO DEL LAVORO.....	26
3. MATERIALI E METODI.....	27
3.1 ATTREZZATURE E MATERIALI NECESSARI.....	27
3.2 METODO COLTURALE.....	28
3.3 METODO BIOMOLECOLARE.....	30
3.3.1 REAL TIME POLYMERASE CHAIN REACTION (REAL-TIME PCR).....	30
3.4 TERRENI DI COLTURA E REAGENTI.....	34
3.5 PROCEDURA.....	34
3.6 CONFRONTO TRA I DUE METODI.....	41
4. RISULTATI.....	51
5. DISCUSSIONE DEI RISULTATI.....	57
6. ALTRI STUDI IN LETTERATURA.....	57
7. CONCLUSIONI.....	61
RINGRAZIAMENTI.....	63
BIBLIOGRAFIA TESTO.....	64
BIBLIOGRAFIA IMMAGINI E TABELLE.....	65

INDICE DELLE FIGURE

Figura 1 – Formula chimica acqua.....	9
Figura 2- Schema del ciclo idrologico.....	10
Figura 3- Schema di ciclo idrico antropico.....	12
Figura 4- Foto al microscopio elettronico di <i>Salmonella</i> spp.....	19
Figura 5- Schema riassuntivo.....	19
Figura 6- Tabella delle epidemie di gastroenteriti in Europa dal 1986 al 1996.....	22
Figura 7- Andamento dei casi di Salmonellosi non tipizzate dal 2002 al 2006.....	24
Figura 8- Percentuale delle malattie idrodiffuse.....	25
Figura 9 - Colonie di <i>Salmonella</i> spp su Rambach agar.....	29
Figura 10 - Kit del test di agglutinazione per <i>Salmonella</i>	30
Figura 11- Schema riassuntivo tecnica PCR.....	33
Figura 12- Metodo della filtrazione.....	35
Figura 13- Termocicizzatore Real Time PCR StepOnePlus.....	37
Figura 14- Schermata di impostazioni nel file di corsa PCR.....	37
Figura 15 - Sportello frontale del termocicizzatore con relativi pozzetti.....	38
Figura 16 - Schermata finale di amplificazione.....	39
Figura 17 - Sequenza consenso di una colonia di acqua superficiale analizzata il 22/12/2016.....	54
Figura 18 - Risultati dell'analisi di similarità in riferimento alla sequenza consenso del 22/12/2016.....	54
Figura 19 - Sequenza consenso di una colonia di acqua superficiale analizzata il 01/03/2017.....	55
Figura 20- Risultati dell'analisi di similarità in riferimento alla sequenza consenso del 01/03/2017.....	55
Figura 21- Sequenza consenso di una colonia di acqua superficiale analizzata il 01/03/2017.....	56
Figura 22- Risultati dell'analisi di similarità in riferimento alla sequenza consenso del 01/03/2017.....	56

INDICE DELLE TABELLE

Tabella 1- Classi di notifica della malattie infettive secondo il sistema Sorveglianza Italia.....	23
Tabella 2- Test del limite di rilevabilità.....	42
Tabella 3- Confronto dei risultati ottenuti col metodo colturale e real time-PCR nella ricerca di <i>Salmonella</i> spp.....	43
Tabella 4- Sintesi dei risultati del metodo colturale e real time-PCR.....	51
Tabella 5- Sintesi dei risultati del metodo colturale e real time-PCR nei campioni di acqua potabile.....	52

RIASSUNTO

Il seguente progetto di tesi è stato elaborato nel luogo di lavoro, come studente lavoratore. Lavoro presso il laboratorio biologico di VERITAS SpA (Veneziana Energia Risorse Idriche Territorio Ambiente Servizi), un'azienda multiutility dei comuni della provincia di Venezia, principalmente, le cui attività sono i servizi ambientali, idrici ed energetici.

Il servizio idrico è dotato di un laboratorio accreditato dove si svolgono analisi dell'acqua potabile e reflua sia di parametri chimici (ad esempio pH, alcalinità, metalli, ecc) che biologici (come, per esempio, la determinazione di *Escherichia coli*, conteggio della carica batterica totale a 22°/36° C, analisi microscopica, ecc).

La norma di riferimento per le analisi dell'acqua potabile è il Decreto Legislativo 31/2001 con il titolo "Attuazione della direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano".

Come viene descritto nell'articolo 7 del suddetto Decreto Lgs, si svolgono analisi di autocontrollo nei vari potabilizzatori della provincia di Venezia e anche analisi per altri Servizi Idrici Integrati (SII). Nel laboratorio biologico si svolgono sia analisi di microbiologia classica, con il metodo di filtrazione su membrana/MPN (most probably number), che analisi di biologia molecolare con l'utilizzo della tecnica della real time-Polymerase Chain Reaction (real time-PCR), oltre che analisi di microscopia ottica e di tossicità acuta. La tecnica real time-PCR viene utilizzata come analisi di screening per la ricerca di DNA di microorganismi patogeni nei campioni prelevati nelle diverse fasi del processo di potabilizzazione dalle acque grezze e nei vari punti della rete di distribuzione dell'acqua potabile.

La seguente tesi tratta la verifica effettuata per la possibilità di utilizzo di tecniche biomolecolari per la ricerca di DNA di *Salmonella* spp. Viene riportato il lavoro svolto nel Laboratorio VERITAS nel periodo 2015-2016 in acque superficiali prima e dopo il

trattamento di potabilizzazione, confrontando il metodo colturale (descritto nei Rapporti ISTISAN 07/5) con il metodo molecolare utilizzato dal laboratorio.

Nel seguente lavoro saranno descritti ulteriori confronti svolti per la ricerca di microrganismi patogeni, che con i metodi classici sono difficili da trovare, nell'acqua destinata al consumo umano.

ABSTRACT

The following thesis project was developed in the workplace, as a working student. I work at the biological laboratory of VERITAS SpA (Veneziana Energia Risorse Idriche Territorio Ambiente Servizi), a multi-utility company in the municipalities of the province of Venice, mainly, whose activities are environmental, water and energy services.

The water service is equipped with an accredited laboratory where drinking and wastewater analyzes are carried out, both chemical parameters (for example pH, alkalinity, metals, etc.) and biological (such as, for example, the determination of *Escherichia coli*, counting of the total bacterial load at 22° / 36° C, microscopic analysis, etc.).

The reference standard for the analysis of drinking water is the Legislative Decree 31/2001 with the title "Implementation of Directive 98/83 / EC on the quality of water intended for human consumption".

As described in Article 7 of the aforementioned Legislative Decree, self-control analyzes are carried out in the various water purifiers in the province of Venice and also analyzes for other Integrated Water Services (SII). In the biological laboratory the classical microbiology analyzes are carried out, with the membrane / MPN (most probable number) filtration method, and molecular biological analyses with the use of the real time-Polymerase Chain Reaction (real time-PCR) technique, as well as analysis of optical microscopy and acute toxicity. The real time-PCR technique is used as a screening analysis for the search for DNA of pathogenic microorganisms in the samples taken in the different phases of the purification process from raw water and in the various points of the drinking water distribution network.

The following thesis deals with the verification carried out for the possibility of using biomolecular techniques to search for the DNA of *Salmonella* spp. The work carried

out in the VERITAS Laboratory in the period 2015-2016 in surface waters before and after the purification treatment is reported, comparing the cultivation method (described in the ISTISAN 07/5 Reports) with the molecular method used by the laboratory.

The following work will describe further comparisons carried out for the search for pathogenic microorganisms, which with classical methods are difficult to find, in water intended for human consumption.

1.INTRODUZIONE

1.1 DESCRIZIONE ACQUA E PROCESSO DI POTABILIZZAZIONE

Dal punto di vista chimico l'acqua è un composto di formula molecolare H₂O, in cui due atomi di idrogeno sono legati all'atomo di ossigeno con legame covalente polare.

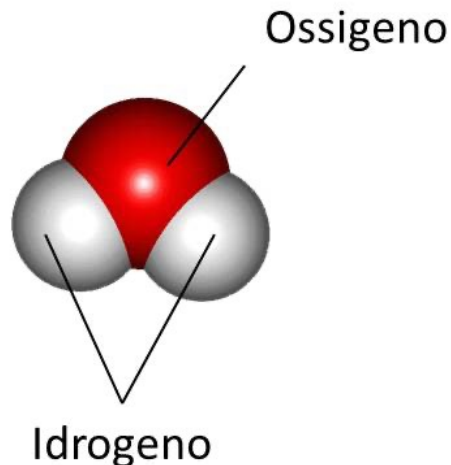


Figura 1 - Formula chimica Acqua

Secondo l'OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità) l'acqua è un bene prezioso ed essenziale per la vita di tutti gli esseri umani.

L'acqua destinata al consumo umano deve essere considerata come alimento; infatti come enuncia l'articolo 2 del Regolamento CE 178/2002 si definisce alimento "qualsiasi sostanza o prodotto trasformato o non trasformato, destinato ad essere ingerito, o di cui si prevede ragionevolmente che possa essere ingerito da esseri umani...esso include l'acqua nei punti in cui i valori devono essere rispettati come stabilito dall'art.6 della direttiva 98/83/CE"(1), quest'ultimo recepito dal Decreto Legislativo 31/2001.

L'acqua per accumularsi nelle varie zone del pianeta segue un ciclo idrologico.



Figura 2 - Schema del ciclo idrologico

Le fasi del ciclo idrologico sono:

- Evaporazione
- Condensazione
- Precipitazione
- Infiltrazione

Queste fasi descrivono i processi attraverso i quali parte dell'acqua passa dal mare all'atmosfera, raggiunge i continenti sotto forma di precipitazioni e ritorna nuovamente al mare.

Nella fase di evaporazione il sole riscalda l'acqua dei mari, oceani, fiumi e laghi; parte di essa evapora nell'aria cambiando di stato e passando da liquido a vapore.

Nella fase di condensazione le correnti d'aria ascensionali sollevano il vapore in alto, dove incontra gli strati più freddi dell'atmosfera e ne provoca la condensazione. Il vapore si trasforma così in goccioline microscopiche che rimangono sospese nell'aria sotto forma di nuvole. Nella fase di precipitazione i venti trasportano le nubi per il mondo e le particelle delle nubi si uniscono diventando sempre più pesanti, fino a precipitare sotto forma di pioggia, neve o grandine che può accumularsi come calotte

glaciali o ghiacciai. Infine, nella fase di infiltrazione la neve, nei climi più caldi, si scioglie con l'arrivo della primavera e l'acqua fluisce come ruscellamento da fusione delle nevi. Mentre una gran parte delle precipitazioni cade nei mari, un'altra cade sulle terre emerse dove, a causa della gravità, fluisce come ruscellamento superficiale. Parte del ruscellamento superficiale raggiunge i fiumi e si muove come flusso incanalato verso il mare, mentre il restante si accumula come acqua dolce nei laghi e nei fiumi. Ma la percentuale maggiore delle precipitazioni penetra nel suolo, nei punti in cui questo è permeabile, e scorre molto lentamente in profondità andando ad alimentare le falde acquifere sotterranee; e da qui si ricomincia con l'evaporazione. Questo appena descritto è il ciclo cosiddetto "naturale" dell'acqua; esiste un ciclo idrico definito antropico che descrive i processi che rendono l'acqua disponibile in natura fruibile per il consumo umano.

Le fasi di questo ciclo sono:

- Captazione
- Potabilizzazione
- Trasporto
- Distribuzione
- Utilizzo
- Convogliamento
- Depurazione
- Restituzione all'ambiente.

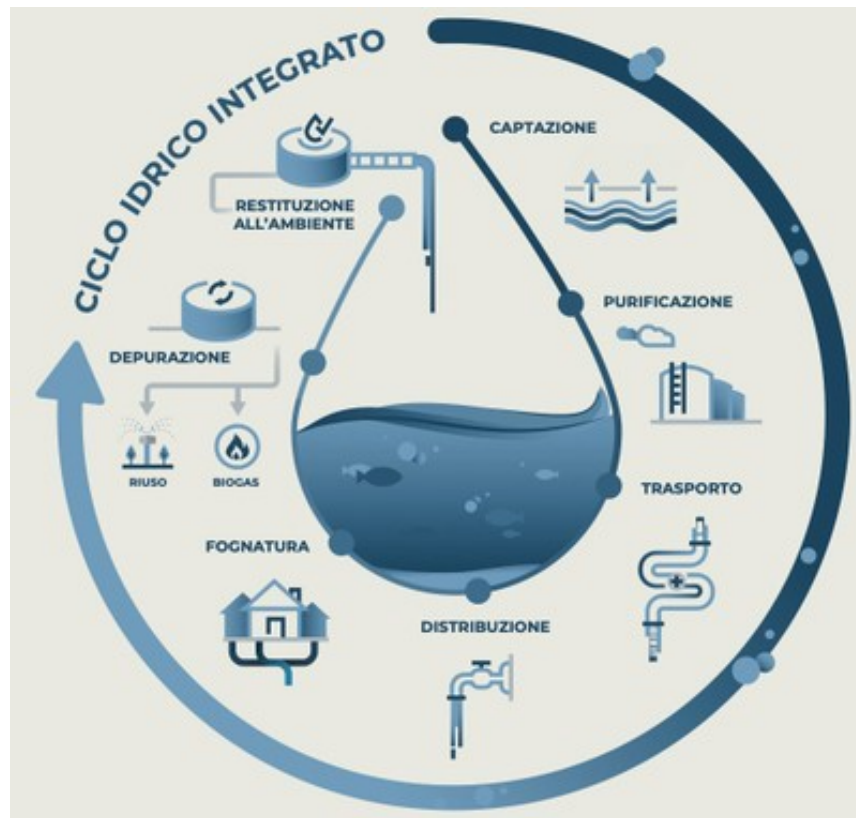


Figura 3 - Schema di ciclo idrico antropico

Nella fase di captazione viene prelevata l'acqua dai fiumi, dai laghi (acque superficiali) o dal sottosuolo attraverso pozzi (acqua di falda) e la si trasporta con l'acquedotto (tubazioni, impianti di sollevamento, pompaggio) verso gli impianti di potabilizzazione. Infatti, l'acqua non può essere bevuta direttamente dalla fonte di approvvigionamento, non essendo di ottima qualità poiché ovvero contiene impurità, microrganismi o sostanze inquinanti. Deve, perciò, essere depurata passando attraverso gli impianti che, con una serie di trattamenti, eliminano le sostanze dannose per la salute umana, gli odori e i sapori sgradevoli e la rendono limpida. Attraverso l'acquedotto, l'acqua potabile viene portata attraverso le tubature, verso i centri abitati e da qui viene distribuita alle singole abitazioni e le varie attività. L'acqua "usata", che si scarica attraverso i lavandini, docce, gabinetti, lavatrici e lavastoviglie contiene sostanze inquinanti e maleodoranti. Attraverso la fognatura l'acqua di scarico viene raccolta e inviata agli impianti di depurazione dove, passando attraverso griglie e vasche, lasciando le impurità intrappolate in fiocchi di fango,

diventa più pulita. Alla fine, l'acqua può essere scaricata nei fiumi, nei laghi e nel mare per cominciare un nuovo ciclo naturale o può essere riutilizzata.

La fase di interesse per la seguente tesi sperimentale è quella di potabilizzazione dove l'acqua prelevata da falda o da acque superficiali viene depurata passando attraverso impianti che eliminano sostanze dannose e i microrganismi patogeni per la salute umana.

I processi di potabilizzazione sono di tipo:

- Fisico (filtrazione)
- Chimico-fisico (flocculazione)
- Chimico (disinfezione, ozonizzazione e clorazione).

I processi di potabilizzazione possono interessare sia acqua superficiali che quelle sotterranee, con l'obiettivo comune di eliminare le sostanze dannose ed inquinanti e di rendere idonea l'acqua per il consumo umano.

Le fasi convenzionali del processo di potabilizzazione sono:

- Accumulo
- Grigliatura
- Sedimentazione
- Pre-ossidazione
- Chiariflocculazione
- Filtrazione
- Carbone attivo
- Disinfezione

Nella fase di sedimentazione/decantazione vengono rimosse le sostanze solide sedimentabili presenti nell'acqua dalla quale si separano per gravità.

Nella fase di pre-ossidazione si ha:

- il controllo di sapori e odori
- il controllo della crescita algale

- ossidazione di inquinanti organici (solventi clorurati, pesticidi fenoli) e inorganici (ferro, manganese, ammoniaca)
- disinfezione primaria (eliminazione della carica batterica)
- riduzione precursori di formazione di sottoprodotti di disinfezione.

La pre-ossidazione può essere effettuata:

- con cloro: parziale rimozione dei contaminanti, pre-disinfezione, controllo della crescita algale, dosaggio 0,5-1 mg Cl₂/mg TOC (Total Organic Carbon);
- ozono: dosaggio 0,25-2,5 mg O₃/mg TOC, rimozione dei precursori dei sottoprodotti della disinfezione;
- biossido di cloro: basso dosaggio (< 1mg/L) al fine di minimizzare la formazione di clorito e clorato;
- acido peracetico (PAA): dosaggio 2-6 mg/L; incremento di TOC (acido acetico). La chiariflocculazione è l'insieme di tre processi: coagulazione, flocculazione e sedimentazione; si hanno le seguenti attività: - rimozione dei solidi sospesi colloidali (torbidità)
- rimozione dei microrganismi
- rimozione dei precursori dei sottoprodotti di disinfezione - riduzione di composti organici ed inorganici.

Nella coagulazione si ha la destabilizzazione delle cariche colloidali, il dosaggio di agenti coagulanti (calce, sali di ferro, alluminio); miscelazione rapida per 30-40 sec.

Nella flocculazione si ha l'aggregazione dei colloidali con conseguente addensamento dei fiocchi; eventuale dosaggio di agenti flocculanti (polielettroliti) con miscelazione lenta per 15-40 minuti.

Nella sedimentazione si ha la decantazione dei fiocchi per gravità, tempo di permanenza 2-3 ore.

Nella fase di ossidazione/disinfezione intermedia ci sono la rimozione dei microinquinanti organici, la distruzione e inattivazione dei microrganismi (per prevenire la ricrescita microbiologica prima dei filtri a sabbia e dei GAC, filtri a carbone

attivo). In questa fase si ha un aumento della biodegradabilità della sostanza organica (BDOC) prima dello stadio dei GAC.

Gli agenti ossidanti più utilizzati sono: cloro e ipoclorito, biossido di cloro (disinfezione) ed ozono (che però porta ad un aumento della BDOC).

Nella fase di filtrazione si hanno:

- rimozione dei solidi sospesi non rimossi con la sedimentazione
- rimozione di piccoli fiocchi di colloidali non rimossi nella chiariflocculazione
- rimozione di composti insolubili (idrossidi di metalli) derivanti dalla precedente ossidazione
- rimozione di organismi patogeni
- protezione dello stadio di filtrazione su GAC.

La filtrazione può essere completata dal passaggio attraverso elementi filtranti a carbone attivo (GAC) col risultato conseguente di:

- rimozione di composti disciolti nell'acqua sia di origine naturale (acidi umidi e fulvici) che artificiale (erbicidi, pesticidi, fenoli, composti organoclorurati (microinquinanti)) e anche derivanti dal trattamento di potabilizzazione (clorito, clorato, bromato), cloro libero residuo, perossido d'idrogeno;
- degradazione di sostanza organica biodegradabile (attività biologica).

La disinfezione finale è lo stadio di trattamento finale, eseguito prima che l'acqua sia immessa nella rete di distribuzione. Questo dà la garanzia della qualità microbiologica dell'acqua nella rete di distribuzione fino all'utenza. Viene immesso un disinfettante persistente e stabile nell'acqua in grado di garantire un residuo fino all'utenza più critica.

I principali metodi di disinfezione sono:

- chimici: ipoclorito di sodio, calcio, biossido di cloro, ozono, permanganato di potassio, sali d'argento;
- fisici: radiazione UV, calore.

Le principali funzioni dell'impianto di potabilizzazione nell'ambito dell'intero sistema acquedottistico sono quelle di assicurare un'ulteriore fonte di approvvigionamento idrico e di costruire una riserva idrica strategica garantendo anche la copertura nelle punte di consumo, come nel periodo estivo, dove la richiesta d'acqua aumenta.

1.2 RESPONSABILITA' E ASPETTO NORMATIVO

Il responsabile del Servizio Idrico Integrato assicura che l'acqua che esce dai rubinetti sia conforme ai requisiti di legge. Riesce a far ciò grazie al lavoro del Laboratorio di Veritas in cui si svolgono analisi sia chimiche che biologiche nelle acque destinate al consumo umano. Infatti, per il controllo di qualità dell'acqua da trattare e di quella potabilizzata, e più in generale, per l'analisi delle acque potabili approvvigionate dall'azienda, è in funzione presso Fusina (VE) un laboratorio attrezzato, in cui vengono effettuate le analisi chimico-fisiche e microbiologiche sui parametri previsti dalla normativa vigente.

L'attività analitica, che viene effettuata secondo un piano di controllo aziendale approvato dalle ULSS competenti, prevede il campionamento e l'analisi dell'acqua prelevata in punti significativi dell'intero sistema acquedottistico. La qualità è, inoltre, certificata dall'ARPAV e dalle Aziende Sanitarie competenti cui spetta, attraverso il Servizio Igiene Alimenti e nutrizione, il giudizio di potabilità.

Nel laboratorio biologico si verifica l'eventuale presenza di organismi indicatori di inquinamento fecale e di contaminazione ambientale, sia la probabile presenza di microrganismi patogeni. Si ricercano infatti *Escherichia coli*, Enterococchi intestinali, *Clostridium perfringens*, *Salmonella spp*, *Shigella spp*, *Pseudomonas aeruginosa*, Stafilococchi patogeni e *Legionella spp* e *Legionella pneumophila*, con analisi di microbiologia classica (metodo di filtrazione su membrana) e analisi al microscopio per il controllo della presenza di alghe e nematodi, sia con metodi di biologia

molecolare (Real time Polymerase Chain Reaction - real time-PCR) per la ricerca del DNA di organismi patogeni.

Il laboratorio Veritas utilizza come testo di riferimento la normativa vigente, cioè Il Decreto Legislativo 31/2001 “Attuazione della Direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano”. Secondo il seguente decreto “l’acqua destinata al consumo umano deve considerarsi alimento; quindi, la qualità e il valore nutrizionale vanno preservati” (art.2) (2), quindi non devono contenere microrganismi e parassiti, né altre sostanze in quantità o in concentrazioni tali da rappresentare un potenziale pericolo per la salute.

Nel suddetto decreto è stabilito che “oggetto del giudizio di idoneità dell’acqua destinata al consumo umano è l’acqua distribuita a mezzo di pubblici acquedotti” (art.2). Nell’articolo 2 si enuncia che i “controlli interni ed esterni, intesi a garantire che le acque destinate al consumo umano soddisfino i requisiti del presente decreto, devono essere effettuati:

- ai punti di prelievo delle acque superficiali e sotterranee da destinare al consumo umano;
- agli impianti di adduzione e di accumulo e potabilizzazione;
- alle reti di distribuzione.” (2)

Nell’articolo 7 del D.Lgs 31/2001 si definiscono controlli interni quei “controlli che il gestore è tenuto ad effettuare per la verifica della qualità dell’acqua destinata al consumo umano. Per l’effettuazione dei controlli il gestore si avvale di laboratori di analisi interni, ovvero stipula apposita convenzione con altri gestori di servizi idrici”.

Nell’allegato I vengono descritti i parametri di conformità:

- indici di contaminazione fecale

1) *E.coli* 0 UFC/100mL

2) Enterococchi 0 UFC/100mL.

Nell’avvertenza del 2017 sono stati inseriti ulteriori parametri microbiologici per la conformità dell’acqua potabile che potevano essere ricercati dalle Aziende sanitarie

locali (ASL), come cita l'articolo 8 comma 3 del D.Lgs 31/2001, "qualora ci fosse stato un motivo di sospettarne la presenza".

I parametri che si leggono nell'avvertenza sono:

- presenza di alghe microscopiche in un litro
- Batteriofagi anti-E.coli in 100 mL
- Nematodi a vita libera in un litro
- Enterobatteri patogeni in un litro
- Enterovirus in un litro
- Funghi in 100 mL
- Protozoi in un litro
- *Pseudomonas aeruginosa* in 250 mL - Stafilococchi patogeni in 250 mL.

In questa avvertenza si dice, inoltre, che tra questi parametri "devono comunque essere costantemente assenti nelle acque destinate al consumo umano gli Enterovirus, Batteriofagi anti-E.coli, gli Enterobatteri patogeni e gli Stafilococchi patogeni".

Tra gli Enterobatteri patogeni fa parte anche il batterio del genere *Salmonella* spp, oggetto di questa tesi.

Di seguito una breve descrizione di questo agente eziologico.

1.3 AGENTE EZIOLOGICO DELLA SALMONELLOSI: RILEVANZA PER LA SALUTE UMANA

Il batterio *Salmonella* spp fa parte della famiglia delle Enterobacteriaceae, in cui sono compresi vari batteri che si localizzano nel tratto gastrointestinale dell'uomo e degli animali a sangue caldo (3).



Figura 4 - Foto al microscopio elettronico di *Salmonella* spp.

Di seguito viene riportato uno schema esemplificativo dei principali generi racchiusi in questa famiglia.

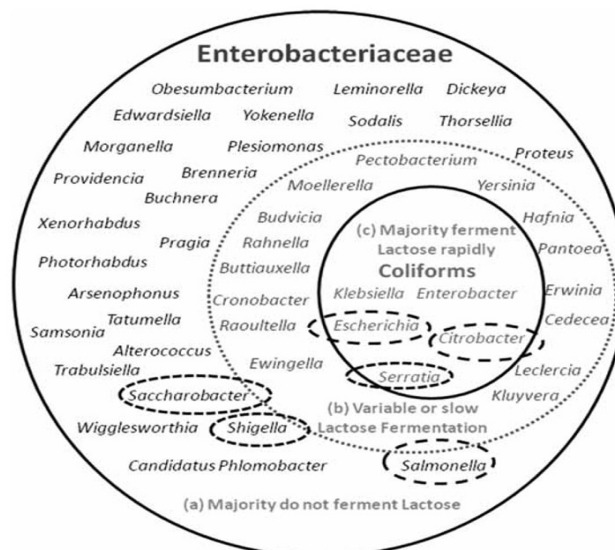


Figura 5 - Schema riassuntivo

Il genere *Salmonella* spp è caratterizzato da bacilli Gram negativi, asporigeni, aerobi e anaerobi facoltativi, C8-esterasi positivi, non fermentanti lattosio, saccarosio e glicina. Mobili per la presenza di flagelli peritrichi.

I bacilli del genere *Salmonella* spp sono presenti nell'ambiente nel suolo e nelle acque e possono essere riscontrati come parassiti nell'intestino degli animali e dell'uomo (es. *Salmonella typhimurium*) o esclusivamente dell'uomo (es. *Salmonella typhi* e *Salmonella paratyphi*).

Nell'uomo questi vari sierotipi sono causa di differenti gruppi di malattie infettive:

- Febbri enteriche: la febbre tifoide e paratifoide, manifestazioni a carattere sistemico, rispettivamente causate dai sierotipi *Salmonella typhi* e *paratyphi*;
- Salmonellosi: sono le forme più comuni di malattia da salmonelle e si manifestano come infezioni localizzate a carico dell'intestino (tossinfezioni alimentari) e sono causate dalle salmonelle minori ovvero dai sierotipi *Salmonella typhimurium* e *Salmonella enteritidis*;
- Setticemia: infezione associata al sierotipo *Salmonella choleraesuis* e il cui rischio di insorgenza è più alto nei pazienti in età geriatrica, pediatrica e negli immunocompromessi; si arriva a questa condizione quando l'infezione è grave e raggiunge il sangue ed è più pericolosa in soggetti immunocompromessi.

La presenza di *Salmonella* nell'ambiente idrico è indice di contaminazione fecale o per immissione diretta di scarichi fognari o per dilavamento da suoli contaminati. Quindi, è da porre la massima attenzione soprattutto per le acque grezze superficiali da destinare al consumo umano. In acque trattate e disinfettate la presenza di *Salmonella* spp è estremamente rara da essere quasi nulla. Ma ci possono essere delle eccezioni, come il caso di aprile 2022 di presenza di *Salmonella* spp nelle acque trattate della zona del bellunese, e queste sono generalmente da associare a carenze dei processi di trattamento delle acque. Nel caso specifico come scritto sul quotidiano Il Dolomiti del 20 aprile 2022 "l'indagine sulle possibili cause dell'inquinamento

suggerisce un'ipotesi di natura ambientale (fauna selvatica) favorita da una certa vulnerabilità dei punti di presa, relativamente superficiali" (4).

La clorazione è tuttora considerata un'efficace misura di prevenzione. Il rilevamento nelle acque richiede l'esame di volumi di acqua relativamente elevati (minimo un litro); quale patogeno umano il batterio *Salmonella* spp deve essere obbligatoriamente assente nelle acque destinate al consumo umano.

Nel Manuale "Linee guida per l'Igiene dell'acqua" si dice che nel corso della storia ci sono state molte epidemie di gastroenteriti idrodiffuse causate da vari agenti eziologici, tra cui quelli appartenenti al genere *Salmonella* spp (5).

Le patologie sono dovute ai microrganismi presenti nell'acqua; la trasmissione può essere causata dall'ingestione di acqua contaminata. I microrganismi possono essere introdotti nell'acqua tramite contaminazione fecale.

Secondo l'Istituto Superiore della Sanità (ISS) per sostenere l'attività di prevenzione e per tutelare la salute umana, è necessario valutare i rischi legati alla qualità delle acque in funzione dell'incidenza di malattie derivate dall'uso e consumo di acqua (si definiscono Waterborne diseases WBDs) (6).

In Europa non c'è un sistema uniforme di sorveglianza delle malattie perché non tutti i soggetti si recano dal medico quando manifestano sintomi diarroici, l'agente eziologico responsabile dell'epidemia rimane spesso sconosciuto e non è sempre possibile identificare con certezza se una patologia sia realmente a trasmissione idrica. Tuttavia, la mancanza di segnalazioni di epidemie comunque non garantisce che non si verifichino, né conferma che l'acqua sia da considerarsi salubre ed esente da patogeni.

Molte gastroenteriti, di cui non si conosce l'agente eziologico, sono di origine idrica. Nel periodo 1986-1996 in 17 paesi europei, come riportato nella tabella sottostante, sono stati registrati più di 2 milioni di casi di gastroenteriti di cui soltanto il 2% circa sono di origine idrica. (7)

Durante quell'indagine sono state riportate complessivamente 710 epidemie, soltanto per 208 delle quali è stato possibile individuare a quale tipologia di acqua fossero imputabili e quale fosse l'agente eziologico.

Paese	n. di epidemie	n. di casi	Agente eziologico o malattia (n. di epidemie)
Albania	14	59	Dissenteria amebica (5), febbre tifoide (5), colera (4)
Croazia	29	1931	Dissenteria batterica (14), gastroenterite ^(a) (6), epatite A (4), tifo (4), criptosporidiosi (1)
Estonia	12	1010	Dissenteria batterica (7), epatite A (5)
Germania	0	0	Non sono state riportate epidemie
Grecia	2	16	Dissenteria batterica (1), tifo (1)
Islanda	1	10	Dissenteria batterica (1)
Lettonia	1	863	Epatite A (1)
Lituania	0 ^(b)	0	Non sono state riportate epidemie
Malta	162	19	Gastroenterite ^(a) (152), dissenteria batterica (4), epatite A (4), giardiasi (1), tifo (1)
Norvegia	0	0	Non sono state riportate epidemie
Regno Unito	20	2810	Criptosporidiosi (13), gastroenterite ^(a) (6), giardiasi (1)
Rep. Ceca	18 ^(c)	76	Gastroenterite ^(a) (15), dissenteria batterica (2), epatite A (1)
Rep. Slovacca	61	5173	Dissenteria batterica (30), gastroenterite ^(a) (21), epatite A (8), tifo (2)
Romania	57	745	Dissenteria batterica (36), gastroenterite ^(a) (8), epatite A (8), colera (3), tifo (1)
Slovenia	45	n.d.	Gastroenterite ^(a) (33), dissenteria batterica (8), epatite A (2), dissenteria amebica (1), giardiasi (1)
Spagna	208	n.d.	Gastroenterite ^(a) (97), dissenteria batterica (47), epatite A (28), tifo (27), giardiasi (7), criptosporidiosi (1), non specificato (1)
Svezia	53 ^(d)	27074	Gastroenterite ^(a) (36), campilobacteriosi (8), Norwalk like virus (4), giardiasi (4), criptosporidiosi (1), dissenteria amebica (1), <i>Aeromonas</i> sp. (1)
Ungheria	27 ^(e)	4884	Dissenteria batterica (17), gastroenterite ^(a) (6), salmonellosi (4)

(a) Da agente eziologico sconosciuto; (b) dati relativi solo a dieci anni; (c) dati relativi solo ad un anno; (d) in una epidemia *Campylobacter* sp., *Cryptosporidium* sp. and *Giardia duodenalis* sono stati identificati come agenti eziologici (tutti e tre sono stati elencati nella colonna); (e) epidemie associate con acqua potabile (n. = 12) e ad attività di balneazione (n. = 15); n.d. = non determinato.

Figura 6 - Tabella delle epidemie di gastroenteriti in Europa dal 1986-1996 (7)

Nel 2005 è stato istituito l'European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC), un'organizzazione che attraverso un'azione di coordinamento e di vigilanza, ha lo scopo di organizzare un unico sistema di sorveglianza delle malattie in Europa. Uno degli agenti eziologici di epidemie gastroenteriche idrodiffuse è *Salmonella* spp. Anche in Italia c'è un sistema di Notifica per le malattie infettive, il SIMI Sistema Informativo delle Malattie Infettive. Il SIMI stabilisce l'obbligo di notifica per 47

malattie infettive, classificate in 4 classi in base alla loro rilevanza in sanità pubblica ed al loro interesse sul piano nazionale ed internazionale che devono essere notificate con tempi e modalità differenziate in funzione della classe di appartenenza della malattia; di seguito è riportata la tabella esemplificativa.

Tabella 1 - Classi di notifica delle malattie infettive secondo il sistema di sorveglianza in Italia (7)

Classi	Tempi di segnalazione del medico alla ASL	Malattie
I - Malattie per le quali si richiede segnalazione immediata o perché soggette al Regolamento sanitario internazionale o perché rivestono particolare interesse	12 ore	Colera, botulismo, febbre gialla, febbre ricorrente epidemica, influenza con isolamento virale, febbri emorragiche virali (febbre di Lassa, Marburg, Ebola), rabbia, peste, tetano, poliomielite, trichinosi, tifo esantematico, difterite
II - Malattie rilevanti perché ad elevata frequenza e/o passibili di interventi di controllo	48 ore	Blenorragia, brucellosi, diarree infettive non da salmonella, epatite virale A, B, NANB, epatite virale non specificata, febbre tifoide, legionellosi, leishmaniosi cutanea, leishmaniosi viscerale, leptospirosi, listeriosi, meningite ed encefalite acuta virale, meningite meningococcica, morbillo, parotite, pertosse, rickettsiosi diversa da tifo esantematico, rosolia, salmonellosi non tifoidee, scarlattina, sifilide, tularemia, varicella
III - Malattie per le quali sono richieste particolari documentazioni	48 ore	AIDS, lebbra, malaria, micobatteriosi non tubercolare, tubercolosi
IV- Malattie per le quali alla segnalazione del singolo caso da parte del medico deve seguire la segnalazione dell'unità sanitaria locale solo quando si verificano focolai epidemici	24 ore	Dermatofitosi (tigna), infezioni, tossinfezioni e infestazioni di origine alimentare, pediculosi, scabbia
V - Malattie infettive e diffuse notificate all'unità sanitaria locale e non comprese nelle classi precedenti, zoonosi indicate dal regolamento di polizia veterinaria		Le notifiche di classe V sono comunicate annualmente al Ministero della Salute. Solo quando assumano le caratteristiche di focolaio epidemico, devono essere segnalate con le modalità previste per la Classe IV.

Dal 2001 al 2006 sono stati raccolti dati di patologie trasmesse per via idrica o che comunque prevedevano nel loro percorso etiologico anche il contatto con l'acqua; tra le patologie rilevate dalla seguente indagine c'è anche la salmonellosi, come descritto nel Rapporto Istisan 09/3.

Nei 6 anni considerati sono stati notificati 2928 casi di malattie riconducibili all'acqua, con una media di 172 casi/anno, sulla base di quanto ricavato dalle informazioni inserite nelle schede di notifica. Patologie quali Salmonellosi non tipizzate, con un numero di casi totali pari a 538, AGI (496) e le malattie riportate sotto il termine di Tossinfezioni (162) hanno mostrato un andamento decrescente negli ultimi anni rispetto ai primi anni del periodo considerato.

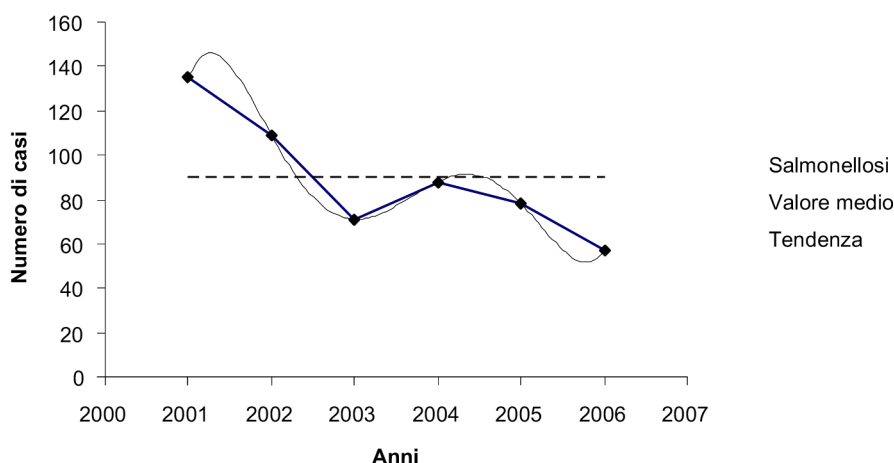


Fig.7 Andamento dei casi di Salmonellosi non tipizzate periodo 2001-2006 (7)

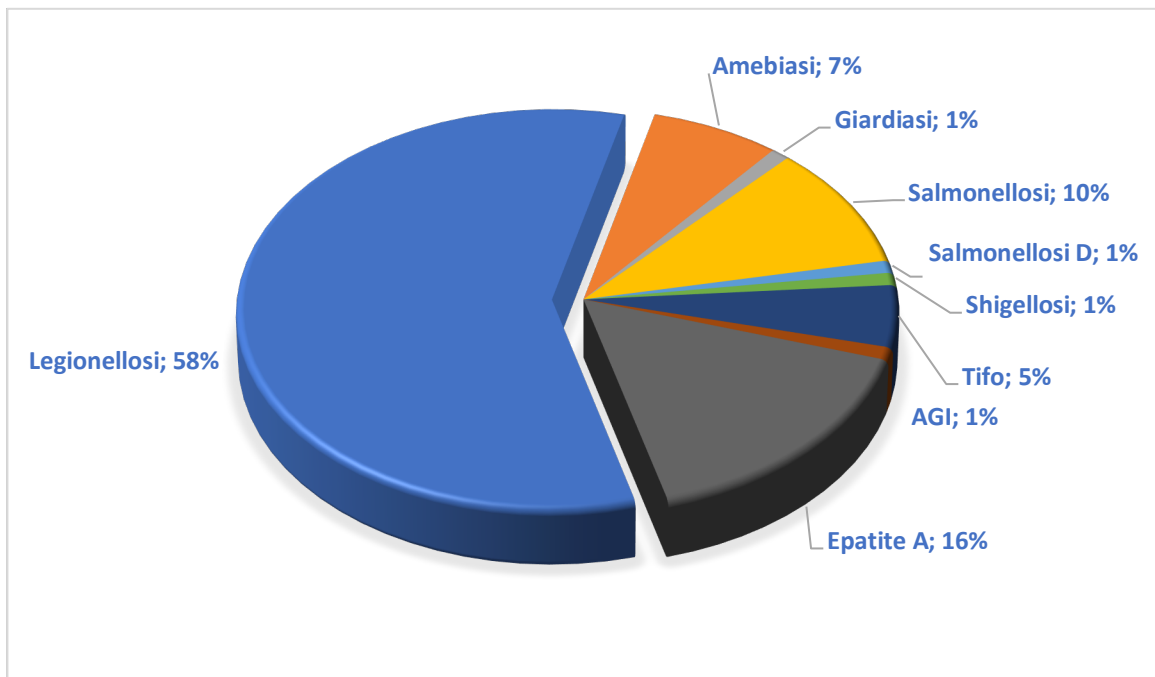


Figura 8 - Percentuale di distribuzione delle malattie idrodiffuse (7)

In questo studio riportato si vede che i casi di gastroenterite da *Salmonella* sono in progressiva diminuzione, anche per il fatto che la disinfezione delle acque destinate al consumo umano ha ridotto il rischio di contrarre malattie idrodiffuse.

Infatti, l'analisi delle acque destinate e da destinare al consumo umano, sia dal punto di vista microbiologico che chimico, ha come obiettivo primario quello di assicurare la tutela della salute del consumatore, garantendo l'assenza di patogeni e di sostanze nocive.

2. SCOPO DEL LAVORO

Il lavoro descritto nella seguente tesi è stato svolto presso il laboratorio Veritas, diretto dal Dott. Della Sala Stefano, nel reparto di biologia, diretto dalla Dott.ssa Miana Paola.

In questo elaborato si vuole descrivere i metodi colturale e biomolecolare per la ricerca di *Salmonella* spp, il lavoro svolto dal 2015 al 2016 per arrivare alla scelta della tecnica biomolecolare per lo screening di analisi di batteri patogeni. Inoltre, si vuole descrivere anche il sequenziamento genico effettuato da un laboratorio esterno per la conferma che le colonie o il DNA estratto appartenga veramente al genere *Salmonella* spp.

Inoltre, in questo elaborato saranno descritti ulteriori metodi di rilevamento confrontati in altri studi.

3. MATERIALI E METODI

Di seguito vengono presentati i materiali e i metodi utilizzati nel laboratorio per la ricerca del parametro *Salmonella* spp.

La fase preanalitica rappresenta una delle fasi più delicate dell'intero processo analitico.

I risultati analitici, ed in particolare quelli microbiologici, devono permettere di stabilire le caratteristiche della matrice analizzata nelle condizioni in cui essa si trova nel momento in cui viene effettuato il prelievo. Tra il momento del prelievo e quello dell'analisi il tempo massimo che può intercorrere per le varie determinazioni è così indicato:

- *E.coli* e coliformi, Enterococchi, *Salmonella* ed altre Enterobacteriaceae 12-18 ore.

(8)

3.1 ATTREZZATURE E MATERIALI NECESSARI

Per l'analisi sia con metodo colturale che biomolecolare, l'apparecchiatura utilizzata è la normale attrezzatura di laboratorio, in particolare:

- Cappa a flusso laminare
- Autoclave
- Incubatori capaci di mantenere una temperatura pari a $36 \pm 2^\circ\text{C}$
- Frigorifero e congelatore rispettivamente a $5 \pm 3^\circ\text{C}$ e a $-20 \pm 5^\circ\text{C}$
- Bagno termostatico
- Termometri (che permettono di registrare la temperatura e di segnalare eventuali variazioni)
- Apparecchiatura per la filtrazione (rampe), con pompa a vuoto
- Membrane filtranti bianche in nitrocellulosa di diametro pari a 47 mm e 0,45 μm di porosità
- Pinzette

- Terreni di coltura
- Bicchieri per la filtrazione sterili monouso
- Riscaldatore a secco fino a 150°C con blocco in alluminio per microtubi da 1,5mL
- Minicentrifuga 15000 giri/min per microtubi da 1,5mL
- Micropipette a volume variabile da 10 µl, 20 µl, 200 µl e da 1000 µl e relativi puntali con filtro sterili
- Cabina passiva a raggi UV-C
- Termocicizzatore Real Time PCR
- Tubi da 1,5 mL (DNA/RNA free). (9)

Alcuni dei materiali citati sono utilizzati solo per l'analisi biomolecolare (ad esempio i tubi da 1,5mL DNA/RNA free) e altri per entrambi i metodi di analisi (ad esempio il sistema di filtrazione).

3.2 METODO COLTURALE

Il seguente metodo è descritto nei Rapporti ISTISAN 07/5 nella sezione

“Determinazione degli enterobatteri patogeni: *Salmonella*”; si divide in diverse fasi: pre-aricchimento, arricchimento, isolamento e identificazione delle colonie e fase di conferma. (3)

Si filtra un litro di campione attraverso una membrana, o più se necessario, di esteri di cellulosa di 47 mm di diametro, con caratteristiche di filtrazione equivalenti a un diametro dei pori nominale di 0,45 µm posta sul supporto dell'apparecchiatura di filtrazione rispettando le comuni norme di asepsi. In seguito, si deve trasferire la/e membrana/e in 100 mL di acqua peptonata tamponata e poi si mette in incubazione a 36°C per 20/24 ore.

Trascorso l'overnight si passa alla fase di arricchimento dove si inocula un'aliquota della brodocoltura in un ulteriore brodo selettivo, qui viene utilizzato il Selenite Broth; fatto ciò, si mette in incubazione a 36°C per ulteriori 48h. Trascorse le prime 24 ore si esegue uno striscio per diluizione su un terreno solido selettivo cromogeno, nel caso specifico si utilizza il Rambach agar, e si mette in incubazione a 36°C per 24 ore. Le colonie presuntive di *Salmonella* spp si presentano di colore rosso ciliegia. Trascorse le seconde 24 ore si esegue un ulteriore striscio su un'altra piastra di Rambach agar.



Figura 9 - Colonie di *Salmonella* spp su Rambach Agar

Per confermare o meno la presenza di questo enterobatterio si isola una o più colonie su un terreno nutritivo non selettivo, come il Tryptic Soya Agar, e si mette la piastra ad incubare per 24 ore a 36°C. Trascorse queste ulteriori 24 ore si esegue un test al lattice per la conferma.

Il test al lattice utilizzato in laboratorio è Microgen detection Salmonella. All'interno della confezione si trovano dei cartoncini dove eseguire il test, il controllo positivo per *Salmonella* spp, lattice coagulante e soluzione salina che serve per omogenizzare la colonia presuntiva isolata.



Figura 10 - Kit del test di agglutinazione per *Salmonella*

Si dosa una goccia di soluzione salina isotonica allo 0,85% sull'apposito cartoncino contenuto nella confezione, si preleva con un'ansa sterile la colonia presuntiva e la si omogenizza con la soluzione salina; infine, si aggiungono 1-2 gocce di lattice e si omogenizza con un'ansa sterile. In seguito, si muove il cartoncino con movimenti circolari per due minuti: se si formano dei piccoli coaguli di lattice si è in presenza di *Salmonella* spp.

3.3 METODO BIOMOLECOLARE

3.3.1 REAL TIME POLYMERASE CHAIN REACTION (real time-PCR)

La reazione in real time a catena della polimerasi (Real Time Polymerase Chain Reaction, nota con la sigla real time-PCR), è una tecnica di biologia molecolare in grado di ottenere simultaneamente nella stessa provetta sia il processo di amplificazione sia quello di rivelazione dell'amplificato.

Ci si avvale di un particolare strumento che unisce un termociclatore ad un fluorimetro. Assieme, infatti, permettono di monitorare in tempo reale la quantità di prodotto che si sta formando nella fase esponenziale di amplificazione e di ottenere così stime della concentrazione del DNA bersaglio di partenza. La rivelazione del DNA amplificato avviene tramite l'utilizzo di particolari sonde specifiche per i frammenti da amplificare che generano segnali fluorescenti.

La real time-PCR è sensibile, accurata, veloce perché non si utilizza il gel d'agarosio, sicura perché non si utilizzano sostanze pericolose, come il bromuro di etidio, per marcare il DNA presente. Essendo la real time-PCR molto sensibile c'è la possibilità

di rilevare DNA di organismi vitali, non vitali e non coltivabili, aumentando la probabilità di avere falsi positivi. Con questa tecnica è possibile fare l'analisi simultanea di molti campioni (si possono riempire i 96 pozzetti) e si presta all'analisi di DNA degradato o incluso, o fissato.

I componenti della reazione sono:

- DNA target
- DNA polimerasi
- Due oligonucleotidi (primer uno forward e uno reverse)
- dNTPs (desossiribonucleosidi)
- probe (sonda) fluorescente.

Questa tecnica consente di rilevare l'amplicone nello stesso momento in cui si forma e con la presenza nella mix di reazione di leganti fluorescenti o oligonucleotidi marcati con fluorofori, in grado di emettere un segnale la cui intensità è in rapporto molare con l'amplicone formato in quell'istante.

Le fasi della real time PCR sono le stesse della PCR:

- denaturazione: il doppio filamento di DNA da testare si separa, formando due filamenti singoli; ciò avviene solitamente ad una temperatura compresa tra i 94 e 99° C;
- annealing (accoppiamento): la temperatura si abbassa attorno ai 50° C per permettere il legame dei primer alle regioni loro complementari dei filamenti di DNA denaturati;
- prolungamento (elongation): si alza ulteriormente la temperatura fino ai 70° C per far sì che si massimizzi l'azione della DNA polimerasi che determina un allungamento dei primer legati.

Il ciclo descritto viene ripetuto per circa 20-40 volte e non si superano questo numero di cicli perché la quota di DNA ottenuto dall'amplificazione raggiunge un plateau. La lettura sarà tanto più lineare quanto più precocemente sarà possibile evidenziare il prodotto amplificato.

Nel laboratorio Veritas si segue una procedura tecnica per la ricerca di DNA di *Salmonella* spp con metodo biomolecolare tramite Real Time PCR.

In questa procedura si definisce, in termini genotipici, la *Salmonella* quel genere di batteri che possono essere definiti da una sequenza genica di DNA che codifica il loro specifico rRNA 16S.

Nella seguente procedura tecnica ci sono le seguenti definizioni (10):

- **Acido deossiribonucleico, DNA:** materiale genetico di organismi viventi, costituito da parti generiche e parti molto specifiche;
- **Reazione a catena della polimerasi, PCR:** procedura enzimatica per cui uno specifico frammento di DNA viene replicato da un processo di cicli ripetuti di denaturazione, ricongiungimento e sintesi di primers specifici;
- **Amplificazione, replicazione del DNA:** aumento dei frammenti di DNA o ampliconi come risultato della reazione di PCR;
- **Prodotto di PCR, Amplicone di PCR:** DNA che è stato amplificato dalla reazione di PCR;
- **PCR quantitativa, qPCR:** formazione di specifici frammenti di DNA che vengono evidenziati da sonde fluorescenti collegate e monitorate in tempo reale.
L'intensità della fluorescenza rappresenta la misura della quantità di ampliconi.
- **Valore di Ct, ciclo soglia:** numero di cicli di PCR (denaturazione e amplificazione) richiesti per replicare le coppie di DNA originali presenti nel campione, così da avere una concentrazione di DNA che supera il limite di determinazione. Il valore Ct è l'intercetta della linea che rappresenta la concentrazione di DNA del campione con la linea di fluorescenza base;
- **Primer reverse, primer forward:** frammento a singolo filamento di DNA (oligonucleotidi) che servono come stampo per la replicazione del DNA specifico. La scelta della sequenza di DNA per i primer forward e reverse, determina quale frammento di DNA viene replicato. La lunghezza varia da 15 a 30 nucleotidi;

- **Probe, sonda:** frammento a singolo filamento di DNA, complementare a una sequenza specifica, legato ad un fluoroforo che può essere rilevato nel macchinario real time PCR;

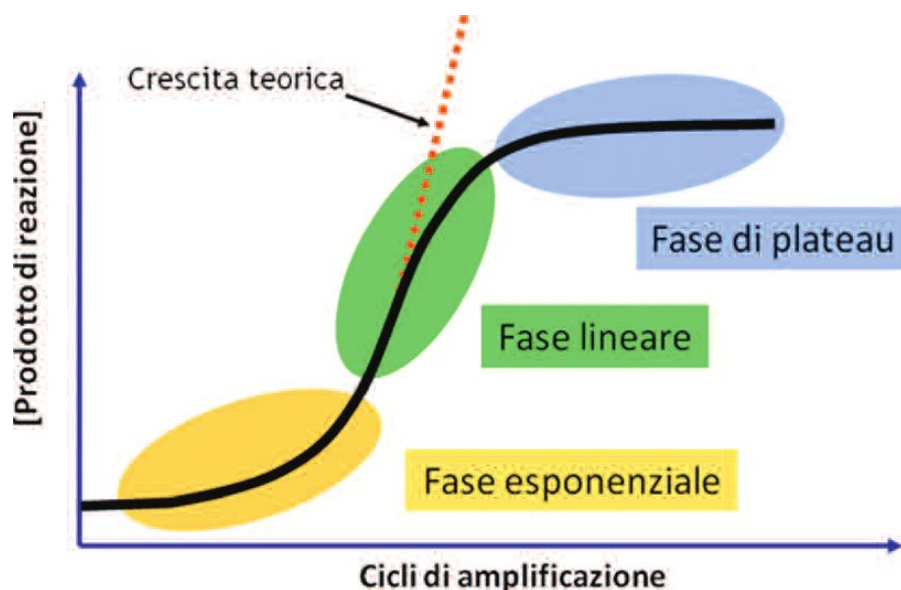


Fig.11 Schema riassuntivo tecnica PCR

- **Taq DNA polimerasi:** polimerasi ottenuta dal batterio *Thermus aquaticus* che vive nelle sorgenti calde e nei geysers. Questa polimerasi termo-stabile è usata per la sintesi del DNA nella PCR. L'uso di polimerasi con partenza ad alte temperature serve per evitare risultati falsi positivi;
- **GU Unità genomiche di *Salmonella* spp:** unità che rappresenta la singola copia di DNA genomico batterico di *Salmonella* spp;
- **Limite di rilevabilità della qPCR, LDqPCR:** il più basso numero di unità genomiche che possono dare un risultato positivo nella qPCR con un intervallo di confidenza del 90%;
- **IPC, controllo positivo interno:** DNA stabilizzato che viene co-amplificato con il campione di DNA estratto usando i primers necessari per la determinazione di *Salmonella* spp. Il controllo interno di inibizione deve rilevare la presenza di qualsiasi inibitore nel campione di DNA estratto. Il controllo può essere un

plasmide, un nucleotide, o DNA genomico di *Salmonella* spp. Deve essere utilizzata una sonda specifica per rilevare il controllo interno positivo. (10)

3.4 TERRENI DI COLTURA E REAGENTI

Nel laboratorio Veritas si utilizzano terreni e supplementi disidratati disponibili in commercio e preparati dal tecnico che lo utilizza secondo le indicazioni della ditta produttrice e/o terreni e kit pronti all'uso disponibili in commercio.

I terreni/kit utilizzati sono:

- Buffered peptone water
- Kit per l'estrazione del DNA disponibili in commercio
- Kit per la reazione di amplificazione genomica e suo rilevamento (contenente diluente, dNTP, primers, sonde, polimerasi) per *Salmonella* spp
- Diluenti e materiali sterili DNA/RNA free
- TE buffered, pH 8.0

3.5 PROCEDURA

Le attività di preparazione dei campioni sono condotte a temperatura ambiente.

Vengono identificate e separate tre aree:

- Un'area per la concentrazione del campione (filtrazione e arricchimento) e l'estrazione del DNA
- Un'area per la preparazione dei reagenti per la PCR
- Un'area per l'amplificazione del DNA (termocicizzatore real time PCR)

CONCENTRAZIONE DEL CAMPIONE E ARRICCHIMENTO

Per campioni liquidi, viene filtrato un litro di campione o diluizioni scalari in base 10 (secondo quanto previsto dalla normativa o linee guida) mediante la tecnica delle membrane filtranti, su membrana del diametro di 47 mm e 0,45 µm di porosità. La membrana viene posta in maniera asettica in un contenitore contenente un brodo di

arricchimento (Buffered peptone water). Il seguente brodo di arricchimento viene posto ad incubare a 36 ± 1 ° C per 18-24 h.



Figura 12 - Metodo della filtrazione

ESTRAZIONE DEL DNA

Trascorse le 24 h si procede con l'estrazione del campione per la concentrazione del DNA.

L'estrazione si effettua prelevando 1 mL di brodo di arricchimento con una micropipetta idonea usando puntali con filtro adeguati e dosandolo o direttamente in un tubo da 1,5 mL oppure in una colonnina di purificazione (a scambio ionico) previamente inserita in un tubo da 1,5 mL a seconda del kit utilizzato.

In entrambi i casi si procede come segue:

- s'inserisce il tubo nella centrifuga in maniera adeguatamente bilanciata, e centrifugare a 12000-16000 giri (13000) per circa 5 minuti;
- si rimuove il tubo dalla centrifuga, eliminare l'eventuale colonnina ed eliminare il surnatante;
- si aggiungono da 50 a 100 μ L di Buffer di Lisi al pellet rimasto nel tubo e risospenderlo;
- tappare il tubo e incubare a 97 ± 2 ° C nel termoblocco per 12 ± 2 minuti;

- trascorsi questi minuti, si lascia raffreddare il campione per 2 minuti a temperatura ambiente;
- centrifugare a 12000-16000 giri per circa 1 minuto per far scendere la condensa (che può contenere DNA) dal tappo;
- si aggiungono da 100 a 1000 µL di TE buffer risospesendo il pellet;
- centrifugare a 12000-16000 giri per circa 3 minuti per sedimentare il materiale di scarto (pellet) sul fondo del tubo;
- con un nuovo puntale prelevare il surnatante e riporlo in un tubo da 1,5 mL nuovo identificato col codice campione.

Il campione può essere analizzato subito, altrimenti va posto in congelatore a -20 °C +/- 5 °C fino ad un massimo di un anno.

PREPARAZIONE DEI REAGENTI PER PCR E CAMPIONI

Vengono seguite le indicazioni del kit utilizzato.

I primer fanno riferimento alla sequenza:

139: 5'-GTGAAATTATCGCCACGTTCGGGCAA-3'

141: 5'-GTGAAATTATCGCCACGTTCGGGCAA-3'

AMPLIFICAZIONE E RILEVAMENTO TRAMITE REAL TIME PCR

In questo lavoro sarà descritto il procedimento dei kit e dello strumento StepOnePlus Applied Biosystems.



Fig.13 Termocicizzatore Real Time PCR

StepOnePlus

Innanzitutto, dopo aver acceso sia il macchinario che il computer collegato ad esso si comincia a preparare il file per la corsa di PCR.

Dalla schermata in cui si vede la rappresentazione dei pozzetti del termocicizzatore, si posizionano, in verticale o in orizzontale, i campioni da analizzare nei pozzetti corrispondenti alla macchina. Vengono poi predisposti i vari segnali (fluorofori) da ricercare: il segnale per *Salmonella* (FAM) e IPC (Internal Positive Control) (VIC) definiti come Unknown (U).

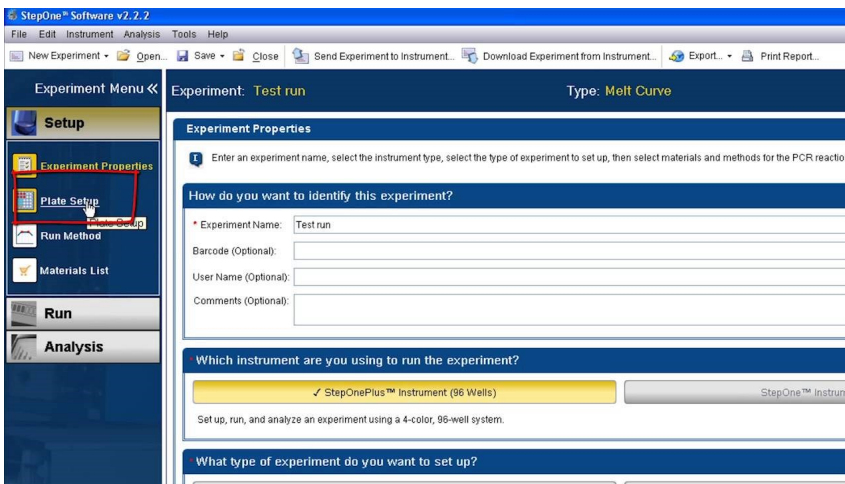


Fig.14 Schermata di impostazioni nel file di

corsa PCR



Fig.15 Sportello frontale del termocicizzatore con relativi pozzetti

Il kit di amplificazione utilizzato per questa macchina è il MicroSEQ *Salmonella* spp detection kit della Life Technologies.

Come descritto nelle specifiche tecniche del seguente kit, con questo si può identificare *Salmonella* spp in maniera rapida e semplice in campioni di alimento (acqua compresa) usando i reagenti in formato liofilizzato. Il saggio usa la reazione a catena della polimerasi per amplificare la sequenza target di DNA specifica per un unico microrganismo e una TaqMan per identificare la sequenza amplificata. Il limite di rilevamento di questo kit di amplificazione è di 10^3 CFU/mL, testando 30 μ L di campione. Inoltre, con questo kit si identificano tutte le specie di *Salmonella enterica* testate e non può identificare altre specie di *Salmonella* non testate.

Una volta che il file di corsa è pronto, lo si salva nella apposita cartella nominandolo con la data di analisi. Successivamente si apre lo sportello frontale dello strumento termocicizzatore, e si dispongono i tubini nell'ordine corrispondente alla griglia assegnata nel file; ci si assicura che rimangano ben posizionati e poi si chiude delicatamente lo sportello e si clicca sull'icona verde "Start RUN"

La macchina esegue i seguenti cicli di denaturazione-amplificazione-elongazione per un totale di 40 cicli per la ricerca del DNA di *Salmonella* spp con un volume di reazione di 30 μ L:

- primo step a 50°C per 2 minuti;

- secondo step a 95°C per 2 minuti dove il doppio filamento di DNA viene denaturato cioè separato;
- terzo step 95°C per un secondo e 60°C per 20 secondi, e questi si riferiscono alle fasi di annealing e di elongation.

Terminati i cicli di analisi il software analizza autonomamente i dati ed esprime il risultato; si vedrà il grafico di Amplification plot con i segnali relativi all'aumento di fluorescenza in FAM o VIC con un andamento di crescita esponenziale qualora l'organismo sia presente e ci sia quindi un'amplificazione genica, per l'organismo ricercato, e non ci sia interferenza nella reazione.

Nella schermata View plate layout, per ciascun pozzetto, saranno indicati i valori di CT (ciclo threshold) se il segnale di amplificazione per *Salmonella* e/o per IPC interseca la Threshold. Si considerano come positivi quei campioni in cui i valori di CT (ciclo in cui il segnale interseca la soglia threshold) sono inferiori a 35.

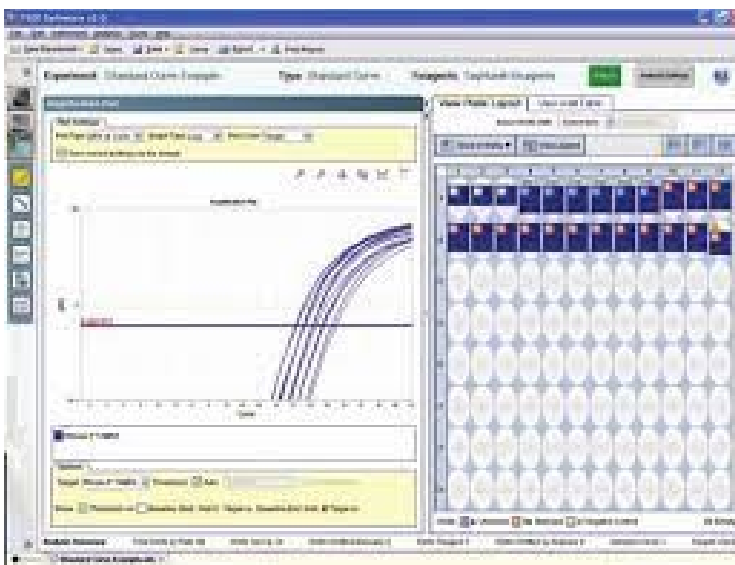


Fig.16 Schermata finale di amplificazione

La threshold può essere modificata e aggiustata manualmente appena al di sopra dei segnali di rumore di fondo seguendo la seguente procedura:

- si clicca sulla tendina “Target” *Salmonella* (così si vedranno solo i segnali di amplificazione per *Salmonella*);
- si spunta la voce “Show-Threshold” e si toglie la spunta da “Threshold Auto”;
- ci si posiziona col puntatore sopra la linea di threshold che compare sulla schermata di Amplification Plot e spostarla sopra il rumore di fondo, in corrispondenza dell’inizio della fase esponenziale della curva di amplificazione; fatto ciò si ottimizzeranno, di conseguenza, i valori di CT ottenuti per i campioni che danno segnale.

Si deve fare attenzione qualora si vedano dei segnali che non hanno un andamento tipicamente esponenziale; in questo caso si deve verificare che non siano dei segnali aspecifici seguendo la seguente procedura: si clicca la voce “Multicomponent plot” e si verifica che il segnale FAM (blu) sia realmente esponenziale e non abbia un andamento iniziale in aumento seguito da un decadimento; in questo caso si tratta di un falso positivo.

ESPRESSIONE DEL RISULTATO

Terminata la corsa analitica e dopo aver analizzato il grafico che esce si può considerare che:

- *Salmonella* è considerata **positiva**, quando il segnale per *Salmonella* è presente e il segnale per IPC è presente;
- *Salmonella* è considerata **negativa**, quando il segnale per *Salmonella* è assente e quello per IPC è presente (reazione non inibita);
- *Salmonella* è considerata **indeterminata**, e l’analisi va ripetuta, quando i segnali sia per *Salmonella* che per l’IPC sono assenti (ciò avviene o perché la reazione è inibita o per mancanza di reagenti).

Il risultato dell'analisi verrà espresso nel rapporto di prova nel seguente modo:

Salmonella (DNA): Presente/Assente in 1 litro.

3.6 CONFRONTO TRA I DUE METODI

Di seguito viene descritto un lavoro svolto nel Laboratorio Veritas nel periodo compreso tra luglio 2015 e aprile 2016 per poter confrontare i due metodi, colturale e biomolecolare, per la ricerca di *Salmonella* spp. (11)

In questo studio sono stati analizzati 236 campioni di acqua da destinare e destinata al consumo umano campionata nelle varie fasi del processo di potabilizzazione.

I risultati ottenuti col metodo colturale sono stati comparati con quelli ottenuti col metodo biomolecolare per stabilire una correlazione tra le due tecniche e in particolare i valori predittivi della Real Time PCR. Infatti, per verificare l'applicazione del metodo della real time-PCR è stata valutata la correlazione tra i due metodi considerando il metodo colturale come il metodo di riferimento per la determinazione dei batteri.

Sono stati valutati i seguenti parametri:

- Correlazione generale: (veri positivi + veri negativi) / n° di campioni analizzati
- Valore Predittivo Positivo (PPV): veri positivi / (veri positivi + falsi positivi)
- Valore Predittivo Negativo (NPV): veri negativi / (veri negativi + falsi negativi).

I risultati di questa comparazione statistica vengono espressi in percentuale.

Per poter confrontare questi due metodi per il parametro *Salmonella* spp, è stato verificato il limite di rilevabilità dei due metodi, utilizzando un ceppo certificato di *Salmonella abony* con una concentrazione nota di batteri. Il test è stato effettuato utilizzando quattro diverse concentrazioni di *Salmonella abony* in assenza e in presenza di altri microrganismi (*Pseudomonas aeruginosa* ed *Escherichia coli*). Per il metodo colturale sono stati utilizzati due diversi terreni di arricchimento (Selenite Broth e Rappaport medium) e per la real time-PCR due diversi volumi di terreno di

pre-arricchimento (è stata utilizzata la Buffered peptone water BPW col volume pari a 0,75mL e 10mL).

Il limite di rilevabilità ottenuto corrispondeva a 2 UFC/L di *Salmonella abony* in BPW sia per il metodo colturale che biomolecolare, come si vede dalla tabella sottostante.

(11)

Tabella 2 - Test del limite di rilevabilità della Real Time PCR utilizzando lenticole di *Salmonella abony*; S= *Salmonella abony*, P= *Pseudomonas aeruginosa*, E= *Escherichia coli*.

Theoretical quantity of bacteria filtered	Cultural method results		RT-PCR method results	
	selenite medium	Rappaport medium	0,75 ml of BPW	10 ml of BPW
700 CFU S	Positive	Positive	Positive	Positive
70 CFU S	Positive	Positive	Positive	Positive
7 CFU S	Positive	Positive	Positive	Positive
2 CFU S	Positive	Positive	Positive	Positive
700 CFU S + 433 CFU P + 333 CFU E	Positive	Positive	Positive	Positive
70 CFU S + 433 CFU P + 333 CFU E	Positive	Positive	Positive	Positive
7 CFU S + 433 CFU P + 333 CFU E	Positive	Positive	Positive	Positive
2 CFU S + 433 CFU P + 333 CFU E	Positive	Positive	Positive	Positive

Di seguito viene riportata la tabella con i risultati ottenuti dai 236 campioni analizzati con entrambi i metodi di ricerca.

N° CAMPIONE	DATA	METODO MEMBRANA FILTRANTE	METODO REAL TIME PCR
1	06/07/2015	POSITIVO	POSITIVO
2	06/07/2015	POSITIVO	POSITIVO
3	06/07/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
4	06/07/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
5	06/07/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
6	06/07/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
7	06/07/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
8	13/07/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
9	13/07/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
10	13/07/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
11	13/07/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
12	13/07/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
13	13/07/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
14	13/07/2015	POSITIVO	POSITIVO
15	20/07/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
16	20/07/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
17	20/07/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
18	20/07/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
19	20/07/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
20	20/07/2015	POSITIVO	POSITIVO
21	27/07/2015	POSITIVO	POSITIVO
22	27/07/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
23	27/07/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
24	27/07/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
25	27/07/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
26	27/07/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
27	17/08/2015	POSITIVO	POSITIVO
28	17/08/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
29	17/08/2015	NEGATIVO	NEGATIVO

30	17/08/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
31	17/08/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
32	17/08/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
33	24/08/2015	POSITIVO	NEGATIVO
34	24/08/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
35	24/08/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
36	24/08/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
37	24/08/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
38	24/08/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
39	31/08/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
40	31/08/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
41	31/08/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
42	31/08/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
43	31/08/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
44	31/08/2015	POSITIVO	NEGATIVO
45	07/09/2015	POSITIVO	POSITIVO
46	07/09/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
47	07/09/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
48	07/09/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
49	07/09/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
50	07/09/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
51	07/09/2015	POSITIVO	POSITIVO
52	14/09/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
53	14/09/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
54	14/09/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
55	14/09/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
56	14/09/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
57	14/09/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
58	14/09/2015	POSITIVO	POSITIVO
59	21/09/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
60	21/09/2015	NEGATIVO	NEGATIVO

61	21/09/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
62	21/09/2015	NEGATIVO	NEGATIVO

63	21/09/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
64	21/09/2015	POSITIVO	NEGATIVO
65	22/09/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
66	22/09/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
67	28/09/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
68	28/09/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
69	28/09/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
70	28/09/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
71	28/09/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
72	28/09/2015	POSITIVO	NEGATIVO
73	05/10/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
74	05/10/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
75	05/10/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
76	05/10/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
77	05/10/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
78	05/10/2015	POSITIVO	POSITIVO
79	05/10/2015	POSITIVO	POSITIVO
80	06/10/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
81	06/10/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
82	06/10/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
83	06/10/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
84	12/10/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
85	12/10/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
86	12/10/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
87	12/10/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
88	12/10/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
89	12/10/2015	POSITIVO	POSITIVO
90	19/10/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
91	19/10/2015	NEGATIVO	NEGATIVO

92	19/10/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
93	19/10/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
94	19/10/2015	POSITIVO	NEGATIVO
95	13/10/2015	NEGATIVO	NEGATIVO

96	13/10/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
97	26/10/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
98	26/10/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
99	26/10/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
100	26/10/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
101	26/10/2015	POSITIVO	POSITIVO
102	02/11/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
103	02/11/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
104	02/11/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
105	02/11/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
106	02/11/2015	POSITIVO	POSITIVO
107	02/11/2015	POSITIVO	POSITIVO
108	16/11/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
109	16/11/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
110	16/11/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
111	16/11/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
112	16/11/2015	POSITIVO	POSITIVO
113	23/11/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
114	23/11/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
115	23/11/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
116	23/11/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
117	23/11/2015	POSITIVO	POSITIVO
118	30/11/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
119	30/11/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
120	30/11/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
121	30/11/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
122	30/11/2015	POSITIVO	POSITIVO

123	01/12/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
124	01/12/2015	POSITIVO	NEGATIVO
125	01/12/2015	POSITIVO	NEGATIVO
126	09/12/2015	POSITIVO	NEGATIVO
127	09/12/2015	NEGATIVO	NEGATIVO

128	09/12/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
129	09/12/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
130	09/12/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
131	09/12/2015	POSITIVO	POSITIVO
132	14/12/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
133	14/12/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
134	14/12/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
135	14/12/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
136	14/12/2015	POSITIVO	POSITIVO
137	29/12/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
138	29/12/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
139	29/12/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
140	29/12/2015	NEGATIVO	NEGATIVO
141	29/12/2015	POSITIVO	POSITIVO
142	11/01/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
143	11/01/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
144	11/01/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
145	11/01/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
146	11/01/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
147	11/01/2016	POSITIVO	NEGATIVO
148	11/01/2016	POSITIVO	POSITIVO
149	18/01/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
150	18/01/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
151	18/01/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
152	18/01/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
153	18/01/2016	POSITIVO	NEGATIVO

154	21/01/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
155	25/01/2016	POSITIVO	NEGATIVO
156	01/02/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
157	01/02/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
158	01/02/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
159	01/02/2016	NEGATIVO	NEGATIVO

160	01/02/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
161	01/02/2016	POSITIVO	NEGATIVO
162	01/02/2016	POSITIVO	POSITIVO
163	15/02/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
164	15/02/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
165	15/02/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
166	15/02/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
167	15/02/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
168	15/02/2016	POSITIVO	NEGATIVO
169	22/02/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
170	22/02/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
171	22/02/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
172	22/02/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
173	22/02/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
174	22/02/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
175	24/02/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
176	29/02/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
177	29/02/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
178	29/02/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
179	29/02/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
180	29/02/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
181	29/02/2016	POSITIVO	POSITIVO
182	07/03/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
183	07/03/2016	NEGATIVO	NEGATIVO

184	07/03/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
185	07/03/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
186	07/03/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
187	07/03/2016	POSITIVO	NEGATIVO
188	14/03/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
189	14/03/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
190	14/03/2016	NEGATIVO	NEGATIVO

191	14/03/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
192	14/03/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
193	14/03/2016	POSITIVO	NEGATIVO
194	14/03/2016	POSITIVO	NEGATIVO
195	21/03/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
196	21/03/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
197	21/03/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
198	21/03/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
199	21/03/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
200	21/03/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
201	23/03/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
202	23/03/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
203	29/03/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
204	29/03/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
205	29/03/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
206	29/03/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
207	29/03/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
208	29/03/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
209	04/04/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
210	04/04/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
211	04/04/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
212	04/04/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
213	04/04/2016	NEGATIVO	NEGATIVO

214	04/04/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
215	04/04/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
216	05/04/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
217	05/04/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
218	07/04/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
219	07/04/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
220	07/04/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
221	07/04/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
222	07/04/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
223	07/04/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
224	11/04/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
225	11/04/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
226	11/04/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
227	11/04/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
228	11/04/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
229	11/04/2016	POSITIVO	POSITIVO
230	11/04/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
231	18/04/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
232	18/04/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
233	18/04/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
234	18/04/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
235	18/04/2016	NEGATIVO	NEGATIVO
236	18/04/2016	NEGATIVO	NEGATIVO

Tabella 3 - Confronto dei risultati ottenuti col metodo colturale e RT-PCR nella ricerca di Salmonella spp. (11)

4.RISULTATI

Dai dati riportati nella tabella n°3, nella maggior parte dei campioni (90%), si è osservata una corrispondenza tra il metodo colturale e biomolecolare. I campioni per i quali non si è osservata tale corrispondenza, (10%), sono campioni di acqua grezza superficiale prima del processo di potabilizzazione.

È stata fatta un'elaborazione statistica dei dati relativi a tutti i campioni analizzati (acque prima e dopo potabilizzazione) e di quelli riguardanti solo le acque potabili secondo le modalità indicate precedentemente.

Nella tabella successiva è riportata una sintesi dei risultati di tutti i campioni

Tabella 4 - Sintesi dei risultati del metodo colturale e real time-PCR (11)

METODO COLTURALE	METODO REAL TIME PCR		TOTALE CAMPIONI
	CAMPIONI POSITIVI	CAMPIONI NEGATIVI	
CAMPIONI POSITIVI	25	17	42
CAMPIONI NEGATIVI	0	194	194
TOTALE CAMPIONI	25	211	236

L'elaborazione statistica dei vari dati indica i seguenti risultati:

- Correlazione generale (relazioni tra due variabili) pari al 92,8%
- Valore predittivo positivo (probabilità che il test risulti positivo) 100%
- Valore predittivo negativo (probabilità che il test sia veramente negativo) 91,9%.

Nella tabella successiva c'è una sintesi dei risultati dei campioni di acque destinate al consumo umano.

METODO COLTURALE	METODO REAL TIME PCR		TOTALE CAMPIONI
	CAMPIONI POSITIVI	CAMPIONI NEGATIVI	
CAMPIONI POSITIVI	0	0	0
CAMPIONI NEGATIVI	0	189	189
TOTALE CAMPIONI	0	189	189

Tabella 5 - Sintesi dei risultati del metodo colturale e real time-PCR nei campioni di acqua potabile (11)

La correlazione statistica dei dati sopracitati dà i seguenti risultati:

- Correlazione generale pari al 100%
- Valore predittivo negativo pari al 100%.

Il valore predittivo positivo (PPV) non è calcolabile per le acque potabili in quanto non sono state riscontrate positività nei 189 campioni di acqua destinata al consumo umano, analizzati con entrambe le tecniche. Questo dato conferma l'ottima qualità dell'acqua erogata da VERITAS.

Il laboratorio ha verificato il valore predittivo negativo pari al 92%, riscontrato nelle acque prima della potabilizzazione. Tale risultato, infatti, non era congruente con i dati di letteratura che indicano per la tecnica in real time-PCR la possibilità di rilevare organismi vitali, non vitali e non coltivabili. Il metodo colturale, invece, è in grado di identificare organismi vitali e coltivabili. Il risultato atteso era un'incidenza di campioni positivi maggiore in real time-PCR rispetto al metodo colturale.

Ha, quindi, verificato in campioni negativi in real time-PCR e positivi col metodo colturale alcune colonie positive attraverso il sequenziamento genomico.

Il sequenziamento genomico è una tecnica molecolare che è molto utile per lo studio dei polimorfismi nelle sequenze geniche che presentano sequenze variabili e conservate. Il vantaggio più significativo della genotipizzazione mediante sequenziamento è l'elevata specificità e riproducibilità.

Il laboratorio Veritas ha incaricato un laboratorio esterno specializzato per effettuare tali indagini. La tecnica di sequenziamento utilizzata per queste indagini è stato il metodo Sanger.

Il database di ricerca utilizzato è stato il NCBI (National Center for Biotechnology Information) e i risultati della ricerca di similarità sono stati ottenuti utilizzando il programma BLAST. Questo programma confronta la sequenza di DNA in esame, chiamata sequenza consenso, con le sequenze batteriche contenute nel database. Viene effettuata un'amplificazione in PCR del DNA di una colonia presuntiva o di DNA genomico precedentemente estratto, una purificazione dei prodotti della PCR e il sequenziamento di frammenti di DNA delle dimensioni di 500 bp (paia di basi) posizionate nel gene 16S del rRNA (RNA ribosomiale). Si esegue, infine un'analisi di similarità utilizzando il programma BLAST.

Sono state sequenziate tre colonie positive al test al lattice per *Salmonella* spp provenienti da campioni risultati negativi in real time-PCR. I campioni sono stati prelevati dalla stessa acqua superficiale, monitorata durante lo studio in confronto, ma in periodi diversi.

Di seguito vengono riportate le sequenze consenso analizzate e i relativi risultati. (13)

CONSENSUS

Prima sequenza analizzata il 22/12/2016

```
NGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAGCGGTAACAGAAGAA
AGCTTGCTTTCTTGCTGACGAGCGGGACGGGTGAGTAATGTATGGGGATCTGCCCGAT
AGAGGGGGATAACTACTGAAACGGTAGCTAATACCGCATAATGCTCTACGGACCAAAGCA
GGGGCTCTTCGGACCTTGGCTATCGGATGAACCCATATGGGATTAGCTAGTAGGTGGGG
TAAAGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACACTGGG
ACTGACACACGGCCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCG
CAAGCCTGATGCACCCATGCCGCGTGTATGAAAAAGGCCTTAGGGTTGTAAAGTACTTTC
AGCGGGGAGGAAGGTGATAAGGTTAATACCCTTATCAATTGACGTTACCCGCANAAGAAG
CACCGGCTAACTCCGTGCCANCAGC
```

Fig. 17 Sequenza consenso di una colonia di acqua superficiale analizzata il 22/12/2016

Sequences producing significant alignments:		Score	E
		(Bits)	Value
JQ624316.1	Uncultured <i>Proteus</i> sp. clone OTU-8-ABB 16S ribosom...	875	0.0
KX781271.1	<i>Proteus mirabilis</i> strain VJ01 16S ribosomal RNA ge...	870	0.0
KU748676.1	<i>Bacillus</i> sp. strain AAJ18 16S ribosomal RNA gene, ...	870	0.0
CP015347.1	<i>Proteus mirabilis</i> strain AOUC-001, complete genome	870	0.0
LT221193.1	<i>Proteus mirabilis</i> partial 16S rRNA gene, isolate A...	870	0.0
KR072211.1	<i>Proteus mirabilis</i> strain BUR15 16S ribosomal RNA g...	870	0.0
CP012675.1	<i>Proteus vulgaris</i> strain CYPV1, complete genome	870	0.0
CP012674.1	<i>Proteus mirabilis</i> strain CYPM1, complete genome	870	0.0
KT261796.1	<i>Proteus</i> sp. BAB-5300 16S ribosomal RNA gene, parti...	870	0.0
KY072883.1	<i>Proteus mirabilis</i> strain CUMBPM 01-A1 16S ribosoma...	868	0.0

Fig. 18 Risultati dell'analisi di similarità in riferimento alla sequenza consenso del 22/12/2016

CONSENSUS

Seconda sequenza analizzata il 01/03/2017

```

TCGCACCTGAGCGTCAGTCTTTGTCCAGGGGGCCGCTTCGCCACCGGTATTCTCCACA
TCTCTACGCATTTACCCGCTACACATGGAATTCTACCCCTCTACAAGACTCTAGCCGA
CCAGTATCAGATGCAATTCGCGGTTAAGCTCGGGGATTCACATCTGACTCAATCAACC
GCCTGCGTGCCTTTACGCCAGTAATTCGATTAACGCTTGACCCTCCGTATTACCGC
GGCTGCTGGCACGGAGTTAGCCGCTTCTTCTGCGGTAACGTCAATTGCCAAGGGTA
TTAACCTTAACACCTTCTCCCTCCACTGAAAGTACTTTACAACCCCTAAGGCCCTTCTCATA
CACGGCGCATGGCTGCATCAGGCTTGGCCCATTTGTGCAATATTTCCCTGCTGCCTCC
CGTAGGAGTCTGGCCGCTGCTCAGTCCCAGTGTGGCTGATCATCTCTCAGACCAGTA
GGGATCGTCGCTAGGTAAGCCGTTACCTCACCTACTAGCTAATCCCATATGGGTTTCATC
CGATAGCGCAAGGCCCGAAGAGCCCGCTTTGGTCCGAAGACATTATGCGGTATTAGCC
ACCGTTTCCAGTAGTTATCCCTCCATCAGGCAGATCCCATACATTACTACCCNNCC
GCCGC
    
```

Fig. 19 Sequenza consenso di una colonia di acqua superficiale analizzata il 01/03/2017

Sequences producing significant alignments:		Score (Bits)	E Value
GU905815.1	Uncultured Enterobacteriaceae bacterium clone Pig_...	1124	0.0
FJ657734.1	Uncultured bacterium clone Winter_MachineB_HEPAoff...	1124	0.0
FJ858185.1	Morganella morganii strain HX081027 16S ribosomal ...	1124	0.0
KY114161.1	Uncultured Morganella sp. clone KMM16 16S ribosoma...	1121	0.0
KU674965.1	Morganella morganii subsp. sibonii strain ML 16S r...	1121	0.0
KT825803.1	Morganella morganii strain 34Kp1 16S ribosomal RNA...	1121	0.0
KT029129.1	Morganella morganii strain wf-1 16S ribosomal RNA ...	1121	0.0
KP054388.1	Morganella morganii strain JZ-05 16S ribosomal RNA...	1121	0.0
KP054387.1	Morganella morganii strain JZ-04 16S ribosomal RNA...	1121	0.0
KP054386.1	Morganella morganii strain JZ-03 16S ribosomal RNA...	1121	0.0

Fig.20 Risultati dell'analisi di similarità in riferimento alla sequenza consenso analizzata il 01/03/2017

CONSENSUS

Terza sequenza analizzata il 01/03/2017

```
NNNGCTCAGATTGAACGCTGGCGGCAGGCCTAACACATGCAAGTCGAACGGTAGCACAGA
GGAGCTTGCTCCTTGGGTGACGAGTGGCGGACGGGTGAGTAATGTCTGGGAACTGCCCG
ATGGAGGGGGATAACTACTGGAAACGGTAGCTAATACCGCATAACGTCGCAAGACCAAAG
AGGGGGACCTTCGGGCCTCTTGCCATCGGATGTGCCCAGATGGGATTAGCTAGTAGGTGG
GGTAACGGCTCACCTAGGCGACGATCCCTAGCTGGTCTGAGAGGATGACCAGCCACACTG
GAACTGAGACACGGTCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGG
CGCAAGCCTGATGCAGCCATGCCCGTGTATGAAGAAGGCCTTCGGGTTGTAAGTACTT
TCAGCGAGGAGGAAGNNNTTGTGGTTAATAACCGCANNNATTGACGTTACTCGCAGAAGA
AGCACCGGCTAACTCCGTGCCAGCANN
```

Fig. 21 Sequenza consenso di una colonia di acqua superficiale analizzata il 01/03/2017

Sequences producing significant alignments:	Score (Bits)	E Value
KY435705.1 <i>Citrobacter freundii</i> strain IG1 16S ribosomal RNA ...	888	0.0
CP016952.1 <i>Citrobacter freundii</i> strain SL151, complete genome	888	0.0
CP016762.1 <i>Citrobacter freundii</i> strain B38, complete genome	888	0.0
CP014030.1 <i>Citrobacter</i> sp. FDAARGOS_156, complete genome	888	0.0
LN998087.1 <i>Citrobacter freundii</i> partial 16S rRNA gene, strain...	888	0.0
KT440881.1 <i>Citrobacter youngae</i> strain OZK3 16S ribosomal RNA ...	888	0.0
CP012554.1 <i>Citrobacter freundii</i> strain P10159, complete genome	888	0.0
KP893653.1 Uncultured bacterium clone F52 16S ribosomal RNA g...	888	0.0
KR189313.1 <i>Citrobacter</i> sp. UIWRF1262 16S ribosomal RNA gene, ...	888	0.0
KR612052.1 Uncultured bacterium clone KSR-CFL4 16S ribosomal ...	888	0.0

Fig. 22 Risultati dell'analisi di similarità in riferimento alla sequenza analizzata il 01/03/2017

5.DISCUSSIONE DEI RISULTATI

In base ai risultati ottenuti dal sequenziamento si è osservato che gli organismi isolati con il metodo colturale, appartenevano ad altri generi: *Proteus* spp., *Morganella morganii* e *Citrobacter freundii*.

Tali dati hanno dimostrato che il risultato ottenuto con la real-time PCR relativo ai campioni negativi di acqua superficiale, erano corretti.

Il kit al lattice si è dimostrato, in alcuni casi, per la matrice acqua grezza poco specifico nel riconoscimento di *Salmonella* spp.

Il Laboratorio, in base ai risultati ottenuti, ha potuto inserire tale tecnica come analisi di screening per campioni d'acqua da destinare e destinata al consumo umano: in caso di risultato positivo è stata prevista l'analisi dello stesso campione con il metodo colturale.

E' stato in tal modo possibile consentire ai Gestori degli impianti, in caso di presenza di *Salmonella* spp nelle acque, un rapido intervento per ottimizzare il trattamento di potabilizzazione e garantire in tal modo la qualità dell'acqua erogata come previsto dalla Normativa Vigente.

6.ALTRI STUDI IN LETTERATURA

Ci sono stati altri studi in letteratura nel trovare un metodo di ricerca più rapido nell'acqua destinata al consumo umano perché quest'ultima è la nostra principale fonte di sostentamento e sopravvivenza.

Il seguente lavoro è stato incentrato sulla ricerca della *Salmonella* spp. in acqua destinata al consumo umano. L'acqua destinata ha molteplici usi, tra cui anche l'irrigazione e questo fa sì che, se c'è presenza di *Salmonella* spp nell'acqua d'irrigazione, vengano contaminati anche gli alimenti vegetali (Presence and Persistence of *Salmonella* in Water: the impact on Microbial Quality and Food Safety; di Huanli Liu et al., Frontiers in Public Health, 30 maggio 2018) (14). In questo studio

si è visto che il microorganismo può sopravvivere a temperatura ambiente acquatico per circa 30 giorni, ma con la presenza di biofilm questa può sopravvivere più a lungo. In questo studio si è fatto una comparazione tra il metodo di rilevamento classico, colturale, e biomolecolare e si è visto che i tempi di risposta sono molto rapidi col metodo biomolecolare e il vantaggio nell'utilizzo della tecnica biomolecolare è che si possono identificare molteplici target simultaneamente con un'alta specificità e sensibilità.

Ci sono altre metodiche di ricerca rapida di *Salmonella* spp nell'acqua destinata al consumo umano. Nell'articolo pubblicato nella rivista Sensors nell'aprile 2011 (15) viene descritto uno studio dove si utilizza un biosensore ottico per la ricerca del lipopolisaccaride (LPS) di *Salmonella typhimurium* e batteri del genere *Salmonella* in acqua potabile, basata sulla spettroscopia a luce chiara (WLRS). In questo studio vengono confrontati sia il metodo colturale, il più utilizzato, per la ricerca di *Salmonella* spp, con i metodi biomolecolari, come la PCR, real-time PCR e multiplex PCR. Un significativo inconveniente di queste tecniche è l'inabilità di discriminare tra cellule batteriche vive e morte, che porta frequentemente a risultati falsi positivi.

I metodi immunologici, come per esempio enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), sono metodi specifici e veloci per la ricerca di batteri, ma richiedono uno step di arricchimento che allungherebbe il tempo dell'analisi, e ciò sarebbe controproducente per i tempi di produzione e la shelf-life breve nei prodotti che non sono pastorizzati. Per queste ragioni, i biosensori basati su trasduttori elettrochimici, piezoelettrici o ottici stanno guadagnando terreno nel rilevamento dei batteri di origine alimentare.

Questo test si divide in queste fasi: incubazione del lipopolisaccaride immobilizzato sul chip con una miscela di calibratore batterico e anticorpo policlonale anti-salmonella di coniglio, poi reazione con streptavidina e rigenerazione della superficie del chip, ad esempio, rimozione delle molecole immunosorbite per utilizzare il chip per un nuovo ciclo di analisi. Il biosensore WLRS fornisce una sensibilità simile con il metodo ELISA,

che è stato completato in più di due ore; in più i biochip di WLRS possono essere rigenerati e riutilizzati per 15 volte, riducendo così significativamente i costi di analisi. Questo studio ha mostrato un ulteriore metodo rapido di analisi per la determinazione di batteri patogeni in alimenti e acqua potabile che potrebbe facilitare la valutazione della qualità attraverso le linee di produzione.

Nell'articolo "Simultaneous Detection of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* O157:H7 in Drinking Water and milk with Mach-Zehnder Interferometers Monolithically Integrated on Silicon Chips" di Michalia Angelopoulou, et al. (pubblicato nella rivista Biosensors nel luglio 2022 (16)) viene descritto un'ulteriore metodo rapido per la ricerca di batteri patogeni in acqua potabile e latte. In questo studio viene descritto un immunosensore miniaturizzato basato sull'interferometria Mach-Zehnder a banda larga per la determinazione simultanea di *Salmonella typhimurium* e *Escherichia coli* O157:H7 riducendo il tempo di analisi in 10 minuti, in acqua imbottigliata.

In questo lavoro è stato impiegato un immunosensore ottico basato sugli interferometri Mach-Zehnder integrati monoliticamente su chip in silicio, per la rivelazione simultanea di due batteri. La rivelazione dei batteri è stata eseguita impiegando un principio di immunoassay competitivo attraverso la biofunzionalizzazione del rilevamento dei diversi MZI sullo stesso chip con LPS dei due batteri. Il test includeva la reazione delle molecole LPS immobilizzate con una miscela del campione con anticorpi specifici per i due batteri, seguita da una reazione con anticorpi biotinilati anti-specie specifici e streptavidina. Tutte le reazioni che si verificano sulle finestre del braccio di rilevamento modificate con LPS cambiano l'indice di rifrazione effettivo, causando uno spostamento verso il blu dello spettro di interferenza.

Questi microorganismi indicatori di inquinamento e patogeni si possono ritrovare nel microbioma che si forma in ambiente acquatico.

Il microbioma dell'acqua potabile è quello meno studiato perché si riteneva che questo fosse molto semplice data la natura del suo ambiente, considerata molto semplice. (17) Nell'articolo "It's a Long way to the Tap: Microbiome and DNA-Based Omics at the core of Drinking Water Quality" (Antonia Bruno et al.) (17) viene descritto uno studio su come le tecnologie -omics (New Generation Sequencing-NGS) potranno dare molte più informazioni per quanto riguarda il microbiota dell'acqua, che ha subito delle variazioni nel corso della storia, e potranno dare una progressione naturale nella strategia di biomonitoraggio che comprenderà un quadro per un'analisi completa del microbioma dell'acqua potabile per ricavarne informazioni significative che sostengono la salute sia dell'ecosistema che umana.

L'evoluzione delle tecniche -omics ha fatto sì che si potessero identificare i diversi microrganismi presenti nel microbioma acquatico. Infatti, nell'articolo "A comparative analysis of drinking water employing metagenomics" di Kyle D. Brumfield, et al., pubblicato nella rivista PLOS ONE nell'aprile 2020 (18) descrive uno studio preliminare che riporta il microbioma completo di tipi selezionati di acqua potabile che impiegano il sequenziamento dell'intero genoma e la bioinformatica.

In questo studio è stato analizzato a livello metagenomico il microbioma proveniente da differenti tipologie di acqua potabile, sia di fontane pubbliche che acqua imbottigliata. Con lo stato attuale delle tecnologie metagenomiche, i ricercatori non possono determinare la vitalità o il potenziale infettivo dei microorganismi rilevati. Tuttavia, questi approcci possono utilizzare il DNA totale per rilevare con precisione e identificare tutti i microorganismi in un campione, inclusi batteri, funghi, virus e protisti e caratterizzarli.

Questo studio ha dimostrato che il sequenziamento metagenomico dell'intero DNA e la bioinformatica possono essere utilizzati efficacemente per studiare la comunità microbica autoctona dell'acqua potabile e fornire un metodo per estrarre nuove informazioni sulla qualità dell'acqua potabile. Quest'analisi preliminare, applicando la metagenomica dell'intero genoma per determinare la composizione microbica

dell'acqua potabile, ha prodotto nuove informazioni sulla composizione delle specie microbiche di diverse acque potabili. Ulteriori indagini per affrontare i dati quantitativi includeranno ulteriori campioni e tipi di acqua potabile sono ancora in corso.

7. CONCLUSIONI

L'utilizzo di tecniche molecolari ha ottimizzato le procedure necessarie per il rilevamento e identificazione dei microrganismi patogeni nell'ambiente acquatico: la tecnica in real time-PCR si è dimostrata affidabile e adeguata alla misura qualitativa (presenza/assenza) di *Salmonella* spp. Infatti, come viene descritto nell'articolo di Mioni R. (2001, Com. pers. PCR per rilevazione delle salmonelle in campioni di acqua peptonata. Modifica della metodica descritta in Rahn K. e Coll., Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella* 63 typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of salmonella, *Molecular and Cellular Probes*, 1992, 6, 271. (19)) la scelta di questo tipo di metodica è stata fatta in quanto essa permette un'analisi efficiente degli acidi nucleici, la cui identificazione si basa sulla misurazione della fluorescenza emessa da sonde incorporate nei filamenti di DNA sviluppati durante il corso del processo di amplificazione.

L'utilizzo di tale tecnica ha consentito, inoltre, di ridurre notevolmente i tempi di risposta: l'analisi microbiologica convenzionale per la ricerca di *Salmonella* spp richiede, infatti, 5/6 giorni per ottenere il risultato finale (3), mentre le tecniche molecolari richiedono tempi di risposta più contenuti pari a 18-24 ore. Per questo motivo il Laboratorio ha potuto inserire tale tecnica come analisi di screening, consentendo così ai Gestori degli impianti, in caso di presenza di *Salmonella* spp. nelle acque, un rapido intervento di ottimizzazione del trattamento di potabilizzazione. Il futuro sviluppo della ricerca di altri microrganismi nelle acque secondo tecnica

molecolare potrà assicurare un monitoraggio delle acque destinate e da destinare al consumo umano in modo specifico e in tempi brevi.

Con il continuo sviluppo delle tecniche di ricerca di microorganismi rapide, sia biomolecolari che enzimatiche sarà possibile avvisare tempestivamente il produttore/gestore in modo da poter riprendere in brevemente la produzione alimentare. Infine, grazie all'evoluzione delle tecniche omiche sarà possibile identificare al meglio i vari microorganismi presenti nel microbioma acquatico in maniera tale da garantire il miglior trattamento di potabilizzazione.

RINGRAZIAMENTI

Innanzitutto, vorrei ringraziare i miei responsabili, la Dott.ssa Miana Paola e il Dott. Della Sala Stefano per avermi lasciato la possibilità di poter scrivere la tesi nell'ambito del lavoro che svolgo, la Direzione del personale per avermi concesso i permessi studio per poter seguire il corso di studio. Ringrazio inoltre, tutti i miei colleghi del laboratorio biologico per la loro disponibilità e comprensione durante il mio periodo di studio.

Dedico questo lavoro alla mia famiglia e al mio compagno che mi hanno supportato moralmente durante il percorso di studio e in particolare a mia mamma che ha sempre creduto in me anche quando altre persone non credevano che ce l'avrei fatta, in tutto il mio percorso scolastico.

BIBLIOGRAFIA TESTO

- Regolamento CE 178/2002, definizione “alimento” (1);
- Decreto Legislativo 31/2001 “Attuazione della Direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano” e la relativa avvertenza del Decreto Legislativo 31/2001 (2);
- Quotidiano “Il Dolomiti” del 20/04/2022 articolo di cronaca di G.Fin (4);
- Linee guida per l’igiene dell’Acqua (5);
- Rapporti ISTISAN 12/38 del 2012 “Sorveglianza e diagnostica delle gastroenteriti acute” (6);
- Rapporti ISTISAN 09/03 del 2009 “L’acqua come veicolo di malattie, elaborazione e valutazione di dati registrati e notificati nell’area di Roma” (7);
- Rapporti ISTISAN 07/05, parte generale “Determinazione degli enterobatteri patogeni: *Salmonella*” (3);
- Procedura tecnica Veritas per determinazione del DNA di *Salmonella* spp; (10)
- UNI EN ISO 7218 “requisiti generali e guide per analisi microbiologiche” (8);
- APAT CNR IRSA “Metodi Analitici per le Acque Vol.1 Parte generale”(9);
- Report on the implementation of the Pilot Action: Comparison between Membrane Filtration and Real Time PCR methods for microbiological detection in drinking water (settembre 2016); (11)
- Risultati delle analisi del sequenziamento da BMR Genomics Srl (12);
- Mioni R. (2001, Com. pers.), PCR per rilevazione delle salmonelle in campioni di acqua peptonata. Modifica della metodica descritta in Rahn K. e Coll., Amplification of an *invA* gene sequence of *Salmonella* 63 typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of salmonella, *Molecular and Cellular Probes*, 1992, 6, 271. (19) .
- “It’s a Long way to the Tap: Microbiome and DNA-Based Omics at the core of Drinking Water Quality”. Di Antonia Bruno et al. pubblicato nel *International Journal of Environmental Research and Health* nel giugno 2022. (17);

- Presence and Persistence of *Salmonella* in Water: the impact on Microbial Quality and Food Safety; di Huanli Liu et al., *Frontiers in Public Health*, 30 maggio 2018 (14);
- Rapid Detection of *Salmonella typhimurium* in drinking water by a white Light Reflectance Spectroscopy Immunosensor; di Michaila Angelopoulou et al., *Sensors*, 10 aprile 2021 (15);
- Simultaneous Detection of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli O157:H7* in Drinking Water and milk with Mach-Zehnder Interferometers Monolithically Integrated on Silicon Chips” di Michalia Angelopoulou, et al. (pubblicato nella rivista *Biosensors* nel luglio 2022 (16);
- “A comparative analysis of drinking water employing metagenomics” di Kyle D.Brumfield, et al., pubblicato nella rivista *PLOS ONE* nell’aprile 2020 (18);

BIBLIOGRAFIA IMMAGINI E TABELLE

- Figura 1 dal sito web ada.ic.cnr.it;
- Figura 2 dal sito webusgs.gov;
- Figura 3 dal sito web arpat.toscana.it;
- Figura 4 dal sito web microbiologiaitalia.it;
- Figura 5 dal sito web bioscience.com;
- Figura 6 dai Rapporti ISS 09/03;
- Tabella 1 dai Rapporti ISS 09/03;
- Figura 7 dai Rapporti ISS 09/03;
- Figura 8 dai Rapporti ISS 09/03;
- Figura 9 dal sito web sigmaaldrich.com;
- Figura 10 dal sito web kairosafe.it;

- Figura 11 dal Vademecum dell'ordine dei biologi sulla biologia molecolare;
- Figura 12 dal Report on the implementation of the Pilot Action: Comparison between Membrane Filtration and Real Time PCR methods for microbiological detection in drinking water (settembre 2016);
- Figura 13 dal sito web thelabworldgroup.com;
- Figura 14 dal sito web thermofisher.com;
- Figura 15 dal sito web thermofisher.com;
- Tabella 2 dal Report on the implementation of the Pilot Action: Comparison between Membrane Filtration and Real Time PCR methods for microbiological detection in drinking water (settembre 2016);
- Tabella 3 dal Report on the implementation of the Pilot Action: Comparison between Membrane Filtration and Real Time PCR methods for microbiological detection in drinking water (settembre 2016);
- Tabella 4 dal Report on the implementation of the Pilot Action: Comparison between Membrane Filtration and Real Time PCR methods for microbiological detection in drinking water (settembre 2016);
- Tabella 5 dal Report on the implementation of the Pilot Action: Comparison between Membrane Filtration and Real Time PCR methods for microbiological detection in drinking water (settembre 2016);
- Figura 16 dal sito web thermofisher.com;
- Figura 17 dai Risultati delle analisi del sequenziamento da BMR Genomics Srl;
- Figura 18 dai Risultati delle analisi del sequenziamento da BMR Genomics Srl;
- Figura 19 dai Risultati delle analisi del sequenziamento da BMR Genomics Srl;
- Figura 20 dai Risultati delle analisi del sequenziamento da BMR Genomics Srl;
- Figura 21 dai Risultati delle analisi del sequenziamento da BMR Genomics Srl;
- Figura 22 dai Risultati delle analisi del sequenziamento da BMR Genomics Srl.

