



# UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

INTERFACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA, MEDICINA E  
CHIRURGIA E AGRARIA

CORSO DI LAUREA MAGISTRALE IN BIOTECNOLOGIE PER L'ALIMENTAZIONE

Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene  
Veterinaria

TESI DI LAUREA

## **VALUTAZIONE DI METODICHE CLASSICHE E INNOVATIVE PER LA RICERCA DI *SALMONELLA* SPP. IN ALIMENTI DESTINATI AL CONSUMO UMANO**

**Relatore:** dr.ssa Alessandra PICCIRILLO

**Correlatore:** dr. Riccardo ZUCCHERATO  
dr. ssa Alessandra MONDIN

**Laureanda:** Emanuela Scalco

Anno Accademico 2010-2011

## 1. Premessa e Scopo

Spesso si crede che i maggiori pericoli per la salute umana vengano dai composti chimici (ad esempio i pesticidi) presenti negli alimenti. In realtà la maggior parte dei rischi è attribuibile ad agenti biologici.

È noto che esistono malattie che possono trasmettersi dagli animali all'uomo e viceversa, mentre di solito non si trasmettono da uomo a uomo. Queste malattie, definite zoonosi, comprendono un gruppo eterogeneo d'infezioni, che possono essere di natura batterica, virale, parassitaria e causate da agenti non convenzionali (prioni).

Le zoonosi conosciute sono numerose (oltre 200 secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità) e il loro studio costituisce uno dei settori di maggior interesse della medicina umana e veterinaria. La trasmissione di malattia all'uomo può essere causata da alimenti derivati da animali infetti o portatori asintomatici di microrganismi, ma anche da contaminazione dell'alimento durante il processo produttivo o le fasi di conservazione e preparazione domestica. Ciò detto, la sicurezza microbiologica degli alimenti in commercio e la prevenzione della trasmissione degli agenti di zoonosi è priorità assoluta degli operatori sanitari nel campo della sicurezza alimentare. Infatti, molteplici sono le misure di controllo delle infezioni zoonotiche: piani di eradicazione o di controllo negli animali vivi, autocontrollo da parte degli operatori del settore alimentare e applicazione dei criteri microbiologici di sicurezza alimentare (Reg. CE 2073/2005).

Il Piano Nazionale Integrato (PNI o MANCP), ai sensi del Regolamento (CE) n.882/2004, descrive il "Sistema Italia" dei controlli ufficiali in materia di alimenti, mangimi, sanità e benessere animale e sanità delle piante ed è finalizzato alla razionalizzazione delle attività, mediante un'opportuna considerazione dei rischi e un adeguato coordinamento di tutti i soggetti istituzionali coinvolti.

Per l'ampia varietà delle materie trattate, il Piano 2011-2014, nasce dall'intensa e proficua collaborazione tra il Ministero della Salute, punto di contatto nazionale, e diverse Amministrazioni ed è stato approvato in Conferenza Stato-Regioni con l'Intesa del 16 dicembre 2010. Questo dimostra che i controlli alimentari sono materia di interesse nazionale da parte del Legislatore per garantire una sicurezza alimentare al consumatore.

Molte sono le infezioni che possono derivare dall'ingestione di materiale infetto, ma in questo studio affronteremo le *Salmonellosi*.

L'importanza del controllo delle malattie a trasmissione alimentare, e delle infezioni da *Salmonella* in particolare, a livello di produzione primaria, è stata recentemente ribadita dalla nuova normativa europea sulle zoonosi (Direttiva 2003/99 e Regolamento 2160/2003), che identifica nel controllo di filiera lo strumento cardine per la prevenzione di questa patologia nell'uomo.

Un'importante novità è rappresentata dal fatto che grazie a queste norme è stato introdotto il monitoraggio e il controllo negli animali dei sierotipi di *Salmonella* prevalenti nell'uomo. Tali disposizioni avranno come conseguenza il costante aggiornamento dei sistemi di sorveglianza, sia nell'uomo che negli animali, allo scopo di poter affrontare con tempestività le eventuali variazioni epidemiologiche.

Le infezioni alimentari sopravvengono a seguito del consumo di alimenti contenenti microrganismi che, una volta raggiunto l'intestino umano, si moltiplicano (infezione enteroinvasiva) e possono o meno produrre delle tossine (infezione enterotossica).

Le infezioni alimentari sono numerose e possono essere sostenute da microrganismi riconosciuti già da tempo come patogeni, da microrganismi di recente identificazione, ma dei quali la manifestazione morbosa era già da tempo nota (patogeni emergenti), e da microrganismi opportunisti che in particolari condizioni dell'ospite (debilitazione, etc.) prendono il sopravvento.

Uno degli aspetti importanti di queste infezioni è la loro relazione con l'ambiente animale. Il serbatoio naturale di diversi microrganismi è costituito, infatti, da animali che non manifestano necessariamente la malattia e questo fattore rende spesso difficile il controllo e la prevenzione di tali infezioni.

Le salmonellosi sono gastroenteriti causate dall'ingestione di microrganismi appartenenti al genere *Salmonella*, in particolare a specie che non hanno habitat umano, ma con le quali l'uomo viene in contatto attraverso l'ambiente e numerosi animali domestici (cani, gatti, pollame, suini, bovini, roditori, etc.). Per determinare la gastroenterite, le *Salmonelle* devono essere ingerite in numero elevato a seconda del loro potere infettante e della sensibilità individuale dell'ospite.

Le salmonellosi sono infezioni alimentari di interesse internazionale. Molti sono i casi di malattia dovuti all'ingestione di alimenti contaminati e l'infezione da *Salmonella* occupa il secondo posto nelle infezioni da alimenti contaminati. L'EFSA, infatti, riporta che nel 2008 ci sono stati 131.468 casi confermati d'infezione da parte del microorganismo in Europa. Questo comporta di dover cercare, prevenire e controllare questo tipo di infezione alimentare (EFSA, 2010).

La *Salmonella* è un microrganismo appartenente alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, Gram negativo, asporigeno, generalmente mobile per la presenza di flagelli peritrichi, aerobio-anaerobio facoltativo, catalasi positivo, ossidasi negativo, prevalentemente lattosio e indolo negativo, che cresce sui comuni terreni anche in presenza di sali biliari.

La sua caratteristica più importante è la capacità di infettare gli animali, che diventano così degli importanti serbatoi dell'infezione e trasferirsi all'uomo attraverso gli alimenti ingeriti.

L'incidenza delle salmonellosi rappresenta, ancora oggi, un rilevante problema di sanità pubblica per la maggior parte dei paesi industrializzati. Tra i diversi sierotipi un ruolo primario è sicuramente rivestito da *S. Enteritidis* che insieme a *S. Typhimurium* rappresentano, da diversi anni, gli agenti più frequentemente implicati in episodi d'infezione dell'uomo.

Il metodo colturale classico per la determinazione della *Salmonella* negli alimenti necessita di tempi piuttosto lunghi, ed è quindi sempre più sentita l'esigenza di avere a disposizione dei metodi rapidi e sensibili, allo scopo di realizzare programmi di monitoraggio più tempestivi ed efficaci. Per soddisfare

queste esigenze, in questi ultimi anni è stato sviluppato un grande numero di metodi di *screening*.

In questo studio abbiamo voluto testare metodi alternativi per l'identificazione della *Salmonella* in matrici alimentari. Tutti i campioni (preparazioni a base di carne di bovino, suino, pollo, tacchino e coniglio) sono stati testati con il metodo microbiologico classico, seguendo la procedura ISO 6579:2002/Co1:2004, che descrive il protocollo di analisi per il rilievo del microrganismo in alimenti per il consumo umano. Siccome l'isolamento di *Salmonella* con le tecniche microbiologiche classiche richiede tempi di incubazione relativamente lunghi necessari per la crescita del microrganismo, gli stessi campioni sono stati sottoposti a un altro protocollo di analisi: metodo immunoenzimatico rapido VIDAS® certificato AFNOR. Questo test è considerato un valido test di *screening*. Infine, i campioni sono stati analizzati con la *real time* PCR, un metodo molecolare alternativo per l'identificazione di *Salmonella* spp. Ai fini del presente lavoro sono stati confrontati i risultati ottenuti alla metodica classica, immunoenzimatica e molecolare paragonando la sensibilità, specificità e accuratezza dei metodi. Sono stati, inoltre, messi in evidenza i vantaggi e le limitazioni dei vari protocolli di analisi, cercando di individuare quale potesse essere il metodo migliore per identificare la presenza o assenza di *Salmonella* spp. nei campioni in esame.

## 2. Introduzione

### 2.1 Il Microorganismo

Il genere *Salmonella* appartiene alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*, microorganismi bastoncellari, Gram negativi, asporigeni, generalmente mobili per la presenza di flagelli peritrichi, aerobi-anaerobi facoltativi, catalasi positivi, ossidasi negativi, prevalentemente lattosio e indolo negativi che crescono sui comuni terreni anche in presenza di sali biliari. La famiglia delle *Enterobacteriaceae* comprende numerosi generi di interesse alimentare, come *Escherichia*, *Shigella*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter* e molti altri. La loro identificazione è possibile in base ad una serie di caratteri biochimici come la capacità di utilizzare particolari substrati, la presenza di particolari enzimi, produzione di specifici prodotti metabolici e la loro capacità di fermentare determinati zuccheri. All'interno del genere *Salmonella* esiste un gran numero di sierotipi, distinti sulla base della diversa composizione degli antigeni somatici e flagellari e talvolta anche in base ad alcuni caratteri biochimici. Dai primi isolamenti ad oggi la classificazione del genere *Salmonella* è stata più volte rimaneggiata. Se inizialmente i ceppi di *Salmonella* isolati da diverse forme cliniche o da diversi ospiti venivano considerati come specie distinte, lo studio degli antigeni somatici (O) e flagellari (H) iniziato da White e portato avanti da Kauffmann (1966), portò alla descrizione di un enorme numero di sierotipi che sostituirono, nella nomenclatura, le specie precedentemente identificate. Le classificazioni delle salmonelle sono tante, ma tra queste quelle più conosciute e utilizzate sono quella di Kauffmann-White, per quanto riguarda la tipizzazione in base al sierotipo, e quella di Le Minor per quanto riguarda la suddivisione in sottospecie.

Il genere *Salmonella* è distinto in due sole specie, *S. enterica* e *S. bongori*. La specie enterica è a sua volta suddivisa in sei sottospecie: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae*, *indica*. Oggi si conoscono più di 2.400 sierotipi della specie enterica e il sierotipo non è più identificativo di specie, pertanto la nomenclatura non la riporta più in corsivo. D'altro canto, i nomi sono mantenuti solamente per i sierotipi appartenenti a *S. enterica* subsp. *enterica* (es. *S. Typhimurium*), mentre quelli ascrivibili alle altre sottospecie vengono identificati attraverso le relative formule antigeniche. L'attuale classificazione che deriva da quella di Kauffmann-White e quella di Le Minor riflette la presente tassonomia delle *Salmonelle*.

### **2.1.1 Classificazione secondo Kauffmann-White**

Kauffmann nel 1931 presentò lo schema di classificazione delle *Salmonelle*, in uso fino ai nostri giorni e universalmente accettato. In realtà egli riscrisse, ampliandolo, uno schema precedente elaborato da Schultze, White e Scott. Lo schema si basa sul fatto che:

- a) il genere è rappresentato da bastoncini gram-negativi, aerobi, non sporigeni, per lo più mobili, che crescono bene sui comuni terreni, fermentano il glucosio e riducono i nitrati e non l'indolo, non idrolizzano l'urea, il VP, l'adonite, e non fermentano il saccarosio; con alcune eccezioni, non fermentano il lattosio;
  
- b) esistono 4 sotto-generi (denominati I, II, III, IV) differenziabili in base a poche prove biochimiche (Tabella 1), come indicato dallo schema di Kauffmann del 1966;

- c) i ceppi con la medesima formula antigenica, anche se con differenze biochimiche (ad esempio, fermentare o meno un certo zucchero oppure produrre e non produrre H<sub>2</sub>S) appartengono allo stesso sierotipo.

**Tabella 1.** Test biochimici per la suddivisione del genere *Salmonella* in quattro sotto-generi.

Test	I	II	III	IV
Fermentazione dulcitate	+	+	-	-
Fermentazione lattosio	-	-	+	-
Fermentazione salicina	-	-	-	+
Fermentazione malonato	-	+	+	-
Crescita in terreno KCN	-	-	-	+

### 2.1.2 Classificazione secondo Le Minor

Le sei sottospecie di *S. enterica* sono distinguibili in base alle prove biochimiche sotto elencate e che consentono anche di differenziare *S. enterica* da *S. bongori*. I sierotipi di *S. enterica* subsp. *enterica* sono spesso indicati con un nome che usualmente è correlato al luogo geografico, nel quale il sierotipo è stato per la prima volta isolato. Il nome viene scritto in lettere romane e la prima lettera è maiuscola. I sierotipi appartenenti alle altre sottospecie sono designati con le loro formule antigeniche, seguite dal nome della sottospecie (Tabella 2), come indicato da Le Minor (Le Minor *et al.*, 1987).

**Tabella 2.** Classificazione delle salmonelle.

Specie	Sottospecie		Numero sottospecie				
<i>S. enterica</i>	<i>enterica</i>		I				
	<i>salamae</i>		II				
	<i>arizonae</i>		IIIa				
	<i>diarizonae</i>		IIIb				
	<i>houtenae</i>		IV				
	<i>indica</i>		VI				
<i>S. bongori</i>			V				

Test	<i>S. enterica</i>						<i>S. bongori</i>
	I	II	IIIa	IIIb	IV	VI	V
Fermentazione:							
<i>dulcitate</i>	+	+	-	-	-	+/-	+
<i>lattosio</i>	-	-	-	+	-	+/-	-
<i>salicina</i>	-	-	-	-	+	-	-
<i>sorbitolo</i>	+	+	+	+	+	-	-
<i>malonato</i>	-	+	+	+	-	-	-
<i>d(+)-tartrato</i>	+	-	-	-	-	-	-
Crescita in terreno KCN	-	-	-	-	+	-	+
ONPG	-	-	-	+	-	+/-	+

La cellula batterica di una *Salmonella* possiede numerosi antigeni e tra questi quelli più conosciuti sono gli antigeni somatici (O), termostabili e resistenti all'azione di acidi e alcool, gli antigeni ciliari (H), termolabili e l'antigene Vi (da virulenza).

#### – Antigene O

L'antigene O è presente sulla membrana esterna della cellula batterica, associato a molecole di lipopolisaccaride (LPS) ed è formato da due parti: la prima, più interna, è composta da cinque carboidrati ed è comune a tutti gli enterobatteri; la seconda, più esterna, è formata da catene saccaridiche, ciascuna delle quali contiene una sequenza di alcuni oligosaccaridi. Dal differente posizionamento degli oligosaccaridi nelle catene dipende la diversità degli antigeni somatici. Attualmente si conoscono 65 diversi antigeni O identificati con numeri arabi. Le salmonelle che presentano analogie nella struttura dell'antigene O vengono comunemente e per convenzione riunite in sierogruppi (A, B, C).

#### – Antigeni H

Nelle specie mobili di *Salmonella* (sono eccezioni *S. Gallinarum* e *S. Pullorum* che sono immobili) sono presenti gli antigeni flagellari o ciliari, meglio conosciuti come antigeni H, indicati con lettere minuscole dell'alfabeto o con numeri. Oggi se ne conoscono circa 35, sono di natura proteica, vengono distrutti dal calore e possono presentarsi in due fasi, chiamate fase 1 e fase 2. Gli antigeni di fase 1 e 2 possono presentarsi contemporaneamente al momento delle prove di agglutinazione. Spesso però una *Salmonella* bifasica sviluppa solo una delle due fasi e per completare la tipizzazione è necessario indurre l'inversione di fase (inibizione della fase identificata), in modo da far esprimere al germe anche la fase latente. Alcuni sierotipi di *Salmonella*, chiamati monofasici, possiedono generalmente antigeni di fase, come nel caso di *Salmonella* Enteritidis (formula antigenica 1,9,12:g,m-). Pochissime specie hanno 3 fasi sierologiche H e sono dette "trifasiche" (ad esempio *Salmonella* II con struttura antigene 44:z29-e,n,x:z42). Raramente le salmonelle possono perdere la struttura antigenica H, diventando immobili. Questo aspetto corrisponde ad una variazione reversibile, chiamata HO→O. Il fenomeno può dipendere dalla presenza, nella coltura in vitro, di sieri aggiunti che inibiscono lo sviluppo e la funzionalità dei flagelli.

#### – Antigene Vi

Alcune salmonelle presentano anche un terzo tipo di antigene, chiamato Vi (da virulenza), e gli stipti che lo possiedono risultano essere più virulenti (*S. Typhi*, *S. Paratyphi C*, *S. Dublin*). Esso ha la caratteristica di mascherare gli antigeni O, rendendoli inagglutinabili dai sieri somatici, per cui è necessario in questi casi riscaldare a 100 °C per 1 ora la sospensione batterica per renderla nuovamente agglutinabile. L'antigene Vi delle salmonelle corrisponde agli antigeni K (capsulari) degli altri enterobatteri. Il fenomeno della perdita di agglutinabilità con i sieri somatici è conosciuto come variazione reversibile, denominata V→W.

## 2.2 Infezione nel Mondo

La normativa sul controllo delle malattie a trasmissione alimentare ha subito, negli ultimi anni, dei cambiamenti radicali, a partire dal Libro Bianco e dal Regolamento 178/2002, fino alla recente emanazione della Direttiva 2003/99 e del Regolamento 2160/2003. Tali norme nascono dalla necessità di dare un segnale nuovo in questo settore, con l'intento di riacquisire da parte degli organi ufficialmente preposti alla tutela della salute pubblica la fiducia dei consumatori, seriamente compromessa a seguito delle crisi alimentari che hanno contraddistinto la fine del secolo scorso (BSE, diossina, etc.). Tali norme danno al consumatore un ruolo centrale nel "sistema sicurezza", sia come figura da tutelare che come destinataria di tutte le informazioni relative alle problematiche alimentari, e individuano la necessità, per coloro che si trovino a gestire i rischi alimentari, di avere a disposizione dati scientifici certi, che permettano di quantificare il rischio per la popolazione e di valutare l'impatto di eventuali misure di controllo.

Ai Paesi Membri viene richiesto di mettere in atto piani di monitoraggio mirati alla definizione della situazione sanitaria delle popolazioni animali, allo scopo di stabilire successivamente degli specifici obiettivi di riduzione della prevalenza di infezione per i patogeni prevalenti nell'uomo, creando quindi una fortissima necessità di collegamento fra i sistemi di sorveglianza attivi in campo umano e in campo veterinario.

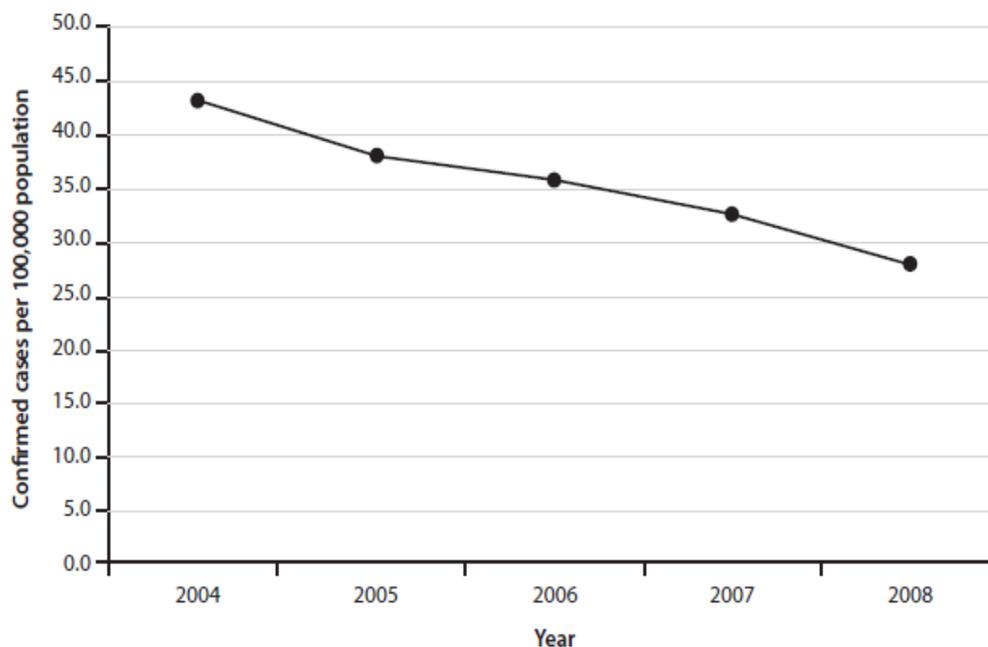
L'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) ha riportato che le infezioni da *Salmonella* sono la seconda causa di infezioni alimentari nell'uomo dopo quelle causate da *Campylobacter*. L'EFSA, infatti, riporta che nel 2008, ci sono stati 131.468 casi di salmonellosi umana confermata in 27 Paesi membri dell'UE (26,4 casi su 100.000 abitanti) (Tabella 3). Il numero di casi di salmonellosi umana è diminuito negli ultimi 5 anni anche di diverse migliaia. Nel 2008, infatti, i casi di salmonella sono stati 131.468 rispetto ai 195.947 del 2004. Inoltre, tra il 2007 e il 2008, si è registrato un calo del 13,5% negli Stati Membri. Il *trend* decrescente degli ultimi cinque anni di salmonellosi è molto significativo (Figura 1). Su 17 Stati membri, 10 mostrano un decremento

significativo, mentre 7 evidenziano un *trend* in aumento, accentuando il bisogno a continuare la prevenzione ed incoraggiando gli sforzi per un controllo contro le salmonellosi umane a livello europeo. Nel quinquennio in esame, la diminuzione più rilevante si è rivelata in Austria e Slovenia (-24%), mentre l'aumento medio più alto per anno è stato determinato in Estonia (+35%) e a Cipro (+24%). La Germania e la Repubblica Ceca hanno registrato una notevole diminuzione dei casi confermati nel 2008 rispetto al 2007, una riduzione di 12.491 e 6.948 casi, rispettivamente. Nonostante 17 Paesi Membri riportino un aumento nel numero dei casi confermati, il loro numero totale è decresciuto di 20.530 casi nel 2008, rispetto al 2007, grazie alla riduzione dei casi riportati in Germania e Repubblica Ceca. Nove Stati Membri e l'Islanda hanno registrato un aumento del 30% nel numero di casi confermati. Uno dei Paesi maggiormente colpiti è la Danimarca, dove il numero di casi riportati è più che raddoppiato (da 1.662 casi nel 2007 a 3.669 casi nel 2008). Questo aumento è stato causato da un'epidemia nazionale di *S. Typhimurium*. Da ciò si evince che il 49,5% dei casi confermati nei Paesi Membri è da ricercare in Germania, Repubblica Ceca e Regno Unito (Tabella 3).

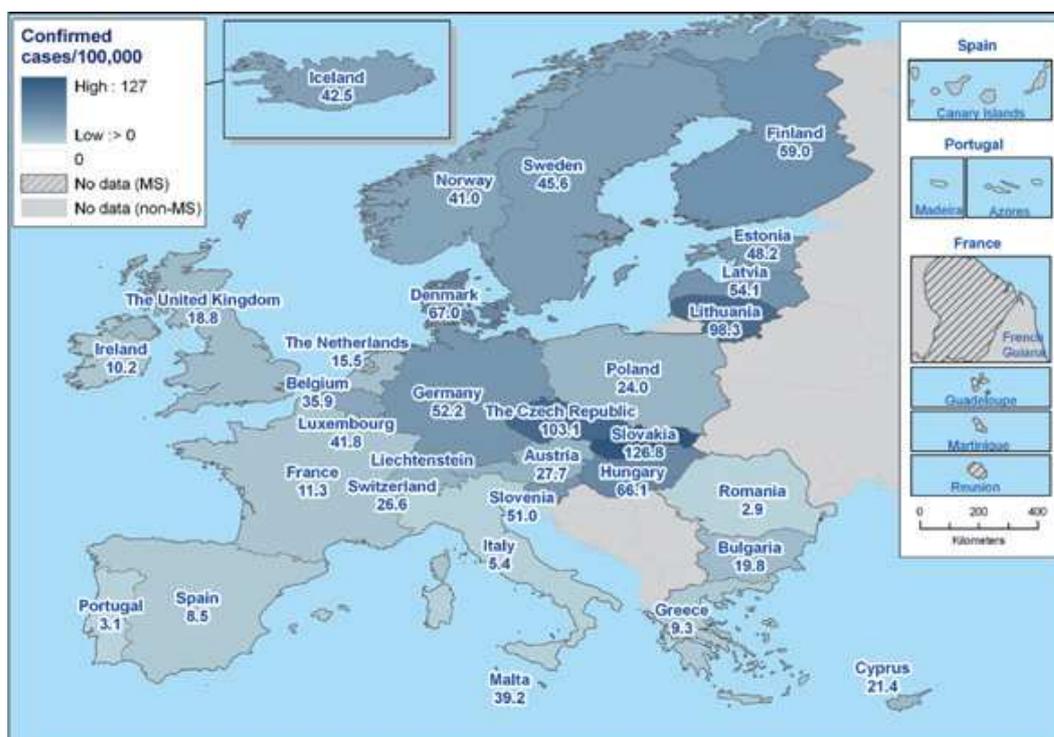
La Figura 2 illustra la distribuzione geografica delle percentuali dei casi confermati nell'UE. Il confronto, però, tra i vari Paesi Membri deve essere fatto con cautela, poiché la sensibilità usata nella rilevazione dei dati varia tra Paese e Paese. Ecco perché un'analisi effettuata tra diversi anni piuttosto che tra vari Paesi risulta più attendibile.

Dal 2007 al 2008, come si può notare c'è stata una sostanziale diminuzione dei casi di enteriti umane causate da *Salmonella* spp. Gli Stati membri dell'UE hanno migliorato i programmi di prevenzione e controllo per l'infezione da *Salmonella*. Durante il primo anno dalla realizzazione dei piani di controllo, 20 Paesi membri hanno riscontrato la riduzione di *Salmonella* spp. I dati del 2008 suggeriscono che i nuovi piani di controllo per la *Salmonella* spp hanno avuto un impatto positivo sulla salute pubblica, riducendo i casi di salmonellosi umana (EFSA, 2010).

**Figura 1.** Casi confermati di salmonellosi umana riportati da 24 Stati Membri dal 2004 al 2008.



**Figura 2.** Percentuale di casi confermati di salmonellosi umana nell'Unione Europea nel 2008 (casi per 100.000 abitanti).



**Tabella 3.** Casi di salmonellosi umana riportati nel periodo 2004-2008 e percentuali (su 100.000 abitanti) nel 2008.

Country	Report type <sup>2</sup>	2008			2007	2006	2005	2004
		Cases	Confirmed cases	Confirmed cases/100,000				
Austria	C	2,312	2,310	27.7	3,375	4,787	5,164	7,286
Belgium	C	3,831	3,831	35.9	3,973	3,693	4,916	9,545
Bulgaria <sup>3</sup>	A	1,622	1,516	19.8	1,136	-	-	-
Cyprus	C	169	169	21.4	158	99	59	89
Czech Republic	C	10,872	10,707	103.1	17,655	24,186	32,860	30,724
Denmark	C	3,669	3,669	67.0	1,662	1,662	1,798	1,538
Estonia	C	647	647	48.2	430	453	312	135
Finland	C	3,126	3,126	59.0	2,737	2,574	2,478	2,248
France	C	7,186	7,186	11.3	5,510	6,008	5,877	6,352
Germany	C	42,909	42,909	52.2	55,400	52,575	52,245	59,947
Greece	C	1,064	1,039	9.3	706	825	1,234	1,438
Hungary	C	7,166	6,637	66.1	6,575	9,389	7,820	7,557
Ireland	C	447	447	10.2	440	420	348	416
Italy	C	3,232	3,232	5.4	4,499	5,164	5,004	6,696
Latvia	C	1,229	1,229	54.1	619	781	615	480
Lithuania	C	3,308	3,308	98.3	2,270	3,479	2,348	1,854
Luxembourg	C	202	202	41.8	163	308	211	-
Malta	C	161	161	39.2	85	63	66	79
Netherlands <sup>4</sup>	C	1,627	1,627	15.5	1,245	1,667	1,388	1,520
Poland	A	9,609	9,149	24.0	11,155	12,502	15,048	15,958
Portugal	C	348	332	3.1	482	387	468	691
Romania <sup>3</sup>	A	624	624	2.9	620	-	-	-
Slovakia	C	7,336	6,849	126.8	8,367	8,242	10,766	12,667
Slovenia	C	1,033	1,033	51.0	1,346	1,519	1,519	3,247
Spain	C	3,833	3,833	8.5	3,658	5,117	6,048	7,109
Sweden	C	4,185	4,185	45.6	3,930	4,056	3,168	3,562
United Kingdom	C	11,511	11,511	18.8	13,802	14,055	12,784	14,809
<b>EU Total</b>		<b>133,258</b>	<b>131,468</b>	<b>26.4</b>	<b>151,998</b>	<b>164,011</b>	<b>174,544</b>	<b>195,947</b>
Iceland	C	134	134	42.5	93	116	86	-
Liechtenstein	C	2	0	0	1	14	-	-
Norway	C	1,941	1,941	41.0	1,649	1,813	1,482	1,567
Switzerland	C	2,051	2,051	26.6	1,802	1,786	1,877	1,910

## 2.3 Infezione nell'Uomo

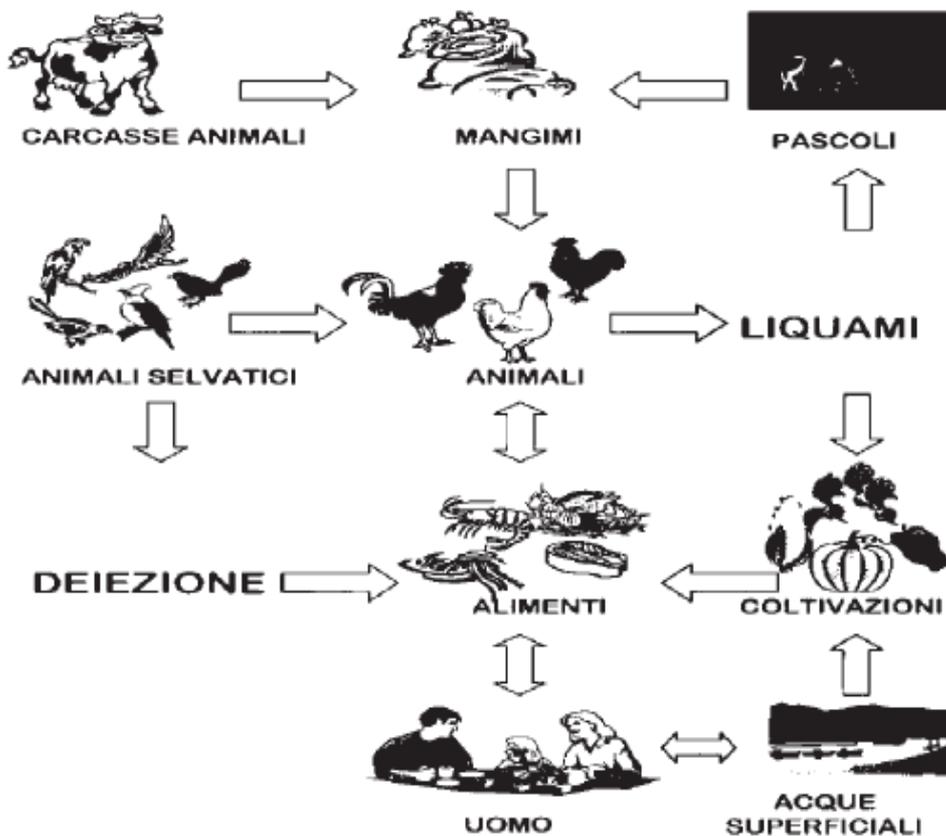
### 2.3.1 Epidemiologia delle infezioni da *Salmonella*

La salmonellosi è una zoonosi, cioè una malattia infettiva che può essere trasmessa naturalmente fra i vertebrati e l'uomo.

Il ciclo biologico di *Salmonella* spp. si presenta notevolmente complesso in quanto coinvolge animali, alimenti e ambiente (Figura 3) (Humphrey, 2000).

Le fonti principali di contaminazione sono costituite da animali infetti e dai portatori asintomatici, i quali costituiscono i serbatoi responsabili del mantenimento dell'infezione in allevamento, ma anche della disseminazione su terreni, pascoli e acque superficiali (Ruffo, 1998; Fisker et al., 2003). Essi, infatti, albergano le salmonelle e possono eliminarle abbondantemente con le feci, le urine o altri escreti o secreti (Ricci, 2005).

**Figura 3.** Vie di trasmissione delle salmonelle in natura (Zavanella, 2001).



Da un punto di vista epidemiologico le salmonelle vengono suddivise in due grandi gruppi: salmonelle adattate all'ospite e salmonelle non adattate all'ospite. Le salmonelle adattate all'ospite riescono prevalentemente ad infettare una sola specie animale. Nelle specie bersaglio sono generalmente causa di malattie a sintomatologia conclamata, setticemiche, spesso gravi (Carattoli & Ricci, 2001). Di questo gruppo fanno parte i sierotipi *S. Gallinarum* per il pollame, *S. Dublin* per i bovini, *S. Abortusovis* per le pecore, *S. Choleraesuis* e *S. Typhisuis* per i suini, e sierotipi che infettano solo l'uomo. Le salmonelle adattate all'uomo possono causare gravi forme sistemiche, come il tifo e il paratifo (*S. Typhi* e *S. Paratyphi A* e *C*) e si trasmettono da uomo a uomo senza ospiti intermedi, prevalentemente attraverso il circuito oro-fecale (La Placa, 1991).

Le salmonelle non adattate all'ospite non presentano alcuna specificità d'ospite e sono quindi in grado di infettare sia l'uomo sia animali di diverse specie e possono causare forme morbose di gravità estremamente variabile a seconda del sierotipo, della dose infettante, delle modalità di infezione e delle caratteristiche intrinseche all'ospite (età, specie, stato immunitario, etc.) (Rondanelli et al., 2005). Queste salmonelle investono un ampio interesse perché sono le principali cause di tossinfezioni alimentari nell'uomo.

I due sierotipi che sono storicamente associati alla salmonellosi umana sono *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*. La maggior parte delle infezioni da *S. Enteritidis*, essendo un sierotipo fortemente adattato alle specie avicole, è correlata al consumo di uova o di prodotti derivati, soprattutto se contenenti uova crude o poco cotte (maionese, tiramisù, salse, gelati). In molti casi vengono anche associate al consumo di carne di pollo, spesso contaminata in seguito all'imbrattamento delle carcasse con materiale fecale durante la macellazione. *S. Typhimurium*, invece, è un germe ubiquitario, in grado di colonizzare, infettare e usare come *reservoir* un'ampia gamma di specie animali. Sia *S. enteritidis* sia *S. typhimurium* comprendono diversi fagotipi, in grado di regolare ed esprimere con notevole variabilità i geni associati ai meccanismi di virulenza e di specificità d'ospite (Ricci, 2005).

### 2.3.2 Manifestazioni cliniche

Le *Salmonelle* rappresentano uno dei più comuni agenti eziologici di enteriti a trasmissione oro-fecale, insieme ad altri enterobatteri quali *Shigelle* ed *E. coli*. In neonati, bambini e adulti con precarie condizioni immunitarie, si assiste talvolta al passaggio da una forma enterica a una forma sistemica con complicanze a livello di vari organi. In Italia si contano circa 20 decessi all'anno dovuti a salmonellosi, generalmente in fasce d'età superiori ai 55 anni.

### 2.3.3 Gastroenteriti

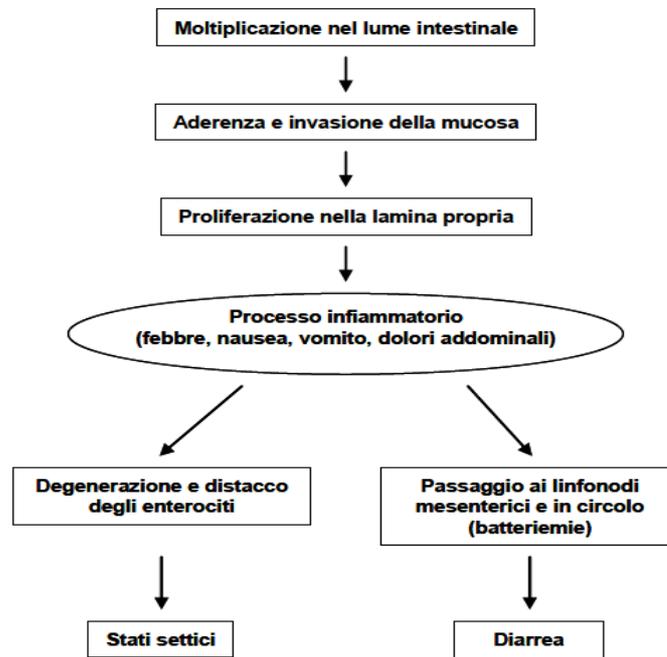
Il processo patogenetico, riassunto in Figura 4, ha inizio subito dopo l'ingestione. Una volta ingerito, i batteri colonizzano l'intestino, invadono la mucosa intestinale e stimolano la migrazione transepiteliale dei leucociti polimorfonucleati (PMN) con induzione di diarrea. Successivamente, penetrano nelle cellule e vengono inglobati nei fagosomi e, senza subire alcuna alterazione, vanno a localizzarsi sulla lamina propria. Ed è a livello di questa struttura che replicano rapidamente, provocando un processo infiammatorio con congestione, edema e afflusso di polimorfonucleati e monocito-macrofagi. In questa prima fase la liberazione di lipopolisaccaride batterico provoca febbre, nausea, vomito e dolori addominali. Il vomito (alimentare, acquoso o biliare) è particolarmente intenso e precoce nel bambino. I dolori addominali possono essere diffusi o localizzati all'epigastrio. Dopo circa 10-20 ore insorge la diarrea, determinata sia dalla degenerazione e dal distacco degli enterociti che dalla loro sofferenza funzionale. Questa evoluzione bifasica della sintomatologia si riscontra nella maggior parte dei pazienti con gastroenterite da *Salmonella*. Le feci inizialmente molli e acquose, possono presentare nel secondo o terzo giorno di malattia tracce di muco misto a sangue (Darwin & Miller, 1999; Tauxe & Pavia, 1998). I sintomi più frequenti sono la diarrea nel 50-100% dei casi, i dolori addominali nel 40-90%, la febbre nel 40-80%, la nausea e il vomito nel 20-50% e in circa il 50% dei pazienti con diarrea si riscontra sangue nelle feci (Bisbini et al., 2000; Van Duynhoven et al., 2002; Holt, 2003; D'Argenio, 1999).

La sintomatologia regredisce in 2-4 giorni e nella gran parte dei casi la guarigione è completa, ma il soggetto può rimanere portatore ed eliminare i batteri con le feci. In soggetti molto giovani o immunocompromessi, l'infezione può propagarsi dall'intestino e divenire sistemica (Darwin & Miller, 1999). Le salmonelle possiedono, infatti, diversi fattori di virulenza, necessari ad attuare tutte le varie fasi dell'infezione (Wallis & Galyov, 2000):

- sistemi di difesa che permettono la sopravvivenza in ambienti a pH acido, utili per superare la barriera gastrica (Slauch et al, 1997);
- fattori che intervengono al momento della colonizzazione dell'intestino, permettendo al batterio di aderire efficacemente alle cellule del lume intestinale (fimbrie di tipo 1 e 3) (BaumL et al, 1997);
- fattori che consentono di attraversare l'epitelio intestinale a livello delle placche di Peyer o di sopravvivere nei macrofagi (enzimi PhoP e PhoQ) (Gunn et al, 2000).

Ognuno di questi è codificato da geni strutturali di modificazione e di regolazione. Le salmonelle sono in grado di elaborare: una tossina termolabile di natura proteica, simile alla enterotossina CT del colera e alla tossina termolabile LT di *E. coli*, un fattore proteico termolabile prodotto dalla membrana batterica, capace di alterare la morfologia delle cellule epiteliali della mucosa intestinale; un lipopolisaccaride (LPS), costituente la membrana batterica, dotato di proprietà endotossica e di resistenza alla lisi (Zavanella, 2001). Una volta avvenuta l'ingestione del microorganismo, lo sviluppo di un'infezione sintomatica dipende dal numero di batteri ingeriti (la dose minima infettante è ipotizzata tra  $10^2$  e  $10^3$  cellule), ma può variare a seconda del sierotipo e delle condizioni dell'ospite. Sono più colpiti da salmonellosi gli individui molto giovani o anziani e quelli con il sistema immunitario compromesso. Anche i fattori ambientali giocano un ruolo non trascurabile, essendo comprovato l'effetto nocivo della temperatura elevata, del grado di umidità, del sovraffollamento e dell'inquinamento chimico (Zavanella, 2001).

**Figura 4.** Processo patogenetico delle infezioni da *Salmonella*.



### 2.3.4 Infezioni extraintestinali

Le forme sistemiche, che possono presentarsi come batteriemie, setticemie e infezioni localizzate, si sviluppano soprattutto nei bambini e in pazienti immunocompromessi, come conseguenza di gastroenteriti acute. A tali patologie sembrano essere associati in particolare alcuni sierotipi, come *S. Choleraesuis* e *S. Dublin* e in misura minore *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium* (Santos et al, 2001). Il passaggio da una semplice enterite a una forma sistemica è dovuto alla resistenza della *Salmonella* al *killing* fagocitario all'interno dei granulociti e dei monocito-macrofagi. I batteri trasportati dai fagociti possono passare ai linfonodi mesenterici e quindi in circolo, inducendo semplici batteriemie sintomatiche o manifestazioni settiche con o senza localizzazioni metastatiche (Figura 4). La manifestazione di una forma sistemica dipende sia da fattori intrinseci del microrganismo sia dalle capacità difensive dell'ospite. Tali capacità sono poco efficienti nel neonato e nei pazienti immunocompromessi, nei quali, come è noto, sono compromesse sia il

fenomeno dell'opsonizzazione sia l'attività funzionale dei monociti e dei granulociti neutrofili (Darwin & Miller, 1999).

## **2.4 Infezione negli Animali**

### **2.4.1 Serbatoi animali**

Nel ciclo epidemiologico di *Salmonella* gli animali fungono da principali serbatoi. Il ciclo di diffusione è molto complesso e comprende un rilevante intreccio di passaggi tra animali, ambiente e uomo. In assenza d'interventi di pulizia e disinfezione nei vari settori, allevamento, incubatoi, macello, la *Salmonella* e la contaminazione può diventare persistente. Ciò è dovuto alla notevole resistenza del batterio nell'ambiente: un ambiente d'allevamento vuoto contaminato, non disinfettato e in presenza di materiale organico presenta ancora *Salmonelle* vitali dopo un anno.

Diversi sierotipi possono prediligere diverse specie animali; alcuni sono considerati specifici per una specie animale (es. *S. Gallinarum* nei polli), altri sono definiti ospite-adattati, in quanto prediligono un ospite rispetto agli altri (es. *S. Dublin* per i bovini, *S. Hadar* per i volatili, *S. Enteritidis* per le galline ovaiole). Altri sierotipi sono invece ubiquitari, come *S. Typhimurium*. Il ruolo di serbatoio viene svolto da numerose specie animali sia da reddito che da compagnia. I bovini sono spesso colonizzati da *S. Dublin* e *S. Typhimurium*, con infezioni di diversa durata e tipo di manifestazione clinica. *S. Dublin* può persistere nell'ospite molto a lungo, in alcuni casi anche tutta la vita e spesso induce gravi forme di malattia. L'infezione da *S. Typhimurium* ha una durata generalmente inferiore ed è abitualmente associata a enterite cronica (Brackelsberg et al., 1997; Allerberger et al., 2002). Nelle specie aviarie sono presenti sierotipi specie-specifici, come *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*.

Un ruolo di minore importanza nella diffusione delle *Salmonelle* è rivestito dagli animali da compagnia. Particolarmente frequente è la colonizzazione nelle tartarughe e altri rettili, spesso con sierotipi rari (CDC, 2003). Anche le specie selvatiche possono fungere da serbatoio.

## 2.4.2 Vie di trasmissione

La trasmissione di *Salmonella* all'uomo avviene principalmente attraverso l'ingestione di alimenti di origine animale contaminati, anche se possono verificarsi casi per contatto diretto con gli animali o di trasmissione interumana (Tauxe & Pavia, 1998). Ancora da chiarire il ruolo degli alimenti d'origine vegetale che possono essere contaminati da *Salmonella* attraverso la dispersione delle deiezioni animali nell'ambiente. La contaminazione ambientale di suolo, acque superficiali, ambienti di lavoro, può favorire la diffusione e il contatto delle salmonelle con le specie animali recettive e con l'uomo.

## 2.4.3 Manifestazioni cliniche

Le infezioni da *Salmonella* possono interessare sia gli animali a sangue caldo che a sangue freddo. Spesso sono asintomatiche, ma talvolta possono indurre malattia, principalmente a carico dell'apparato digerente. Alcuni sierotipi possono dare forme sistemiche, come setticemia, aborto o localizzarsi in vari organi. Come per l'uomo, la via principale di trasmissione è quella oro-fecale e le fonti più frequenti di contaminazione sono gli alimenti, le acque, l'ambiente. Per alcuni sierotipi, in particolare *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*, risulta particolarmente importante la trasmissione verticale che comporta, ad esempio nelle specie avicole, il passaggio dell'infezione dai riproduttori alla progenie. I soggetti asintomatici svolgono un ruolo importante nel mantenere l'infezione in allevamento. La diffusione della *Salmonella* è, inoltre, favorita da fattori come le condizioni igieniche e il sovraffollamento dell'allevamento, condizioni di stress, parto, infezioni virali concomitanti. In genere, gli animali giovani sono più sensibili degli adulti.

L'intero processo che porta alla gastroenterite si compone di tre fasi: la colonizzazione intestinale, l'invasione del rivestimento epiteliale e la perdita di liquido. Le *Salmonelle* dopo aver raggiunto i villi dell'ileo e del colon iniziano a moltiplicarsi, infettano le cellule e raggiungono la lamina propria, dove continua

la replicazione e avviene la fagocitosi e il trasporto ai linfonodi. La risposta infiammatoria indotta stimola la liberazione di prostaglandine che inducono a loro volta la liberazione di acqua nel lume intestinale. In generale, le manifestazioni cliniche sono diarrea, vomito, inappetenza, dolori addominali. A questi quadri clinici si associano anche innalzamento della temperatura, depressione, shock e, nei casi più gravi, la morte. Se le salmonelle riescono a passare nel circolo sanguigno, si ha setticemia e disseminazione in vari organi (cuore, polmoni, cervello, linfonodi, ecc.), con gravi manifestazioni cliniche.

I sierotipi e le manifestazioni cliniche associate all'infezione variano al variare della specie animale. Nei bovini i sierotipi di maggiore importanza sono *S. Dublin* e *S. Typhimurium*. Le enteriti da *S. Dublin* si manifestano nei vitelli di 3-6 settimane con febbre, anoressia, depressione, diarrea e morte in pochi giorni, mentre negli adulti l'infezione si presenta con febbre, diarrea emorragica, aborto al 6°-7° mese. La mortalità può essere elevata. La salmonellosi ovicaprina è molto diffusa e i principali sierotipi responsabili sono *S. Dublin* e *S. Typhimurium*. L'infezione si presenta con astenia, diarrea, sete intensa e morte entro 24 ore. Nella pecora si ha inoltre l'infezione da *S. Abortusovis* che induce come unica manifestazione l'aborto. Il principale sierotipo coinvolto nell'infezione dei suini è *S. Choleraesuis*, che può dare due diverse forme di malattia: la forma setticemica e la forma enterocolitica. La forma setticemica provoca morte improvvisa e si manifesta in animali con età inferiore a 4 mesi e raramente in individui adulti. La forma enterocolitica si manifesta fra lo svezzamento e il 4° mese con emissioni di feci liquide, febbre, anoressia e disidratazione. Frequente l'infezione con *S. Derby*, che ha in genere decorso asintomatico. Negli equini i principali sierotipi sono *S. Abortusequi*, responsabile di aborto e *S. Typhimurium*, responsabile di enterite. Nell'infezione dei volatili sono implicati sia alcuni sierotipi ospite-specifici (*S. Pullorum* e *S. Gallinarum*), che altri non adattati all'ospite (*S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, ecc.). *S. Pullorum* è l'agente eziologico della pullorosi (diarrea bianca bacillare), che colpisce soprattutto il pollo, ma è stata segnalata anche in tacchini, anatre, piccioni, faraone, fagiani e vari uccelli selvatici. Anche se la malattia può essere contratta a qualsiasi età, la probabilità che l'animale sia contagiato diminuisce

con l'età. L'infezione si trasmette per lo più per via verticale, per la deposizione di uova infette da parte di galline portatrici. I soggetti che sopravvivono rimangono portatori e possono contaminare l'ambiente. *S. Gallinarum* è l'agente della tifo del pollo e del tacchino, è rara nel pulcino, anche se la trasmissione può avvenire attraverso l'uovo. Il contagio avviene per mezzo della contaminazione di acqua e alimenti da parte dei soggetti portatori o ammalati. Le infezioni con altri sierotipi possono manifestarsi come enteriti o nei casi più gravi con setticemia nei pulcini nelle prime due settimane di vita (paratifo aviario). La mortalità varia da pochi casi a circa l'80% degli infetti. La trasmissione ai pulcini di *S. Enteritidis* e più raramente di *S. Typhimurium* può avvenire per via verticale (infezione ovarica), mentre altri sierotipi danno l'infezione penetrando attraverso la porosità del guscio contaminato da feci infette. Anche gli animali da compagnia sono soggetti a infezione da *Salmonella*. Nei cani e nei gatti l'infezione si manifesta come un'enterite nei soggetti giovani. L'infezione è frequente nei rettili con decorso generalmente asintomatico e la problematica in questo caso è principalmente associata alla possibile trasmissione all'uomo.

## **2.5 Alimenti**

### **2.5.1 Alimenti e derivati di origine animale**

L'ubiquitarietà e la capacità di crescita delle salmonelle a temperature comprese fra 7 °C e 46 °C fa sì che qualsiasi alimento manipolato o conservato in modo non corretto possa essere fonte di infezione. Molti episodi sono causati dal tempo prolungato intercorso fra la preparazione o la cottura dell'alimento e il consumo, che rendono possibile la moltiplicazione dei batteri presenti, con aumento della dose infettante e quindi una maggiore probabilità di causare infezione. Anche il ruolo degli operatori della catena alimentare può essere rilevante, in quanto è stato dimostrato che una non corretta manipolazione di materie prime contaminate (carni, uova) può causare un'estesa contaminazione ambientale che, anche in conseguenza dell'elevata capacità delle *Salmonelle* di

sopravvivere nell'ambiente, può essere causa di contaminazione e cross-contaminazione di alimenti pronti per essere consumati. Un esempio è stato un episodio epidemico dovuto a carne di tacchino contaminata da *S. Agona* e *S. Hadar*, che, dopo la cottura, era stato conservato a temperatura ambiente per alcune ore e successivamente riscaldato (Synnott et al., 1998).

Per quanto riguarda la catena di macellazione, la presenza di salmonelle è generalmente causata da contaminazione fecale ed è direttamente proporzionale all'entità dell'infezione nell'animale e alle carenze igieniche in fase di macellazione. La contaminazione a livello delle masse muscolari è di solito infrequente, ma aumenta a seguito di processi di lavorazione per la produzione di carni macinate o insaccati freschi. Per questo motivo tali prodotti, se cotti o stagionati in modo non sufficiente, possono divenire veicoli d'infezione.

Nelle carni avicole, la contaminazione da *Salmonella* dipende principalmente dalle modalità di allevamento del pollame. Ogni allevamento può contenere migliaia di capi, e questa concentrazione di potenziali ospiti fornisce alle salmonelle l'opportunità di diffondersi in modo estremamente rapido tra gli animali. La stessa condizione si ritrova durante il trasporto dall'allevamento al macello, che avviene sempre in condizione di sovraffollamento. Nel corso della macellazione, poi, le salmonelle possono passare da una carcassa all'altra, in seguito ai fenomeni di contaminazione crociata che si verificano durante la lavorazione. Le uova e i prodotti derivati rappresentano un importante veicolo di *Salmonella*, soprattutto *S. Enteritidis*. La contaminazione dell'uovo può avvenire nell'ovaio per trasmissione verticale, nella cloaca e al momento della deposizione, principalmente a seguito di contaminazione fecale dei nastri trasportatori delle uova. Negli ultimi due casi le salmonelle si trovano sulla superficie del guscio e possono penetrare nell'uovo a seguito di microlesioni del guscio stesso o attraverso i pori, che permettono gli scambi gassosi fra l'esterno e l'interno. La penetrazione delle salmonelle nelle uova è facilitata dalla presenza di umidità sulla superficie delle uova stesse, che modifica la tensione superficiale. Questo fenomeno è alla base della decisione della Commissione Europea (EFSA, 2010) di non rendere obbligatoria la

refrigerazione delle uova durante la fase di commercializzazione, al fine di evitare che eventuali interruzioni della catena del freddo possano provocare la formazione di condensa sul guscio, facilitando la penetrazione di microrganismi eventualmente presenti sulla sua superficie. All'interno dell'uovo la contaminazione si localizza a livello della membrana vitellina e dello strato di albume che la circonda. Nelle uova fresche il numero di salmonelle presente è estremamente basso ed, essendo l'albume un substrato povero di ferro, la moltiplicazione dei microrganismi avviene solamente in seguito a penetrazione degli stessi nel tuorlo, come effetto di variazioni nella permeabilità della membrana vitellina. Tali variazioni avvengono in modo direttamente proporzionale al tempo e alla temperatura di conservazione: in uova contaminate conservate a temperature inferiori a 20 °C, l'invasione del tuorlo comincia dopo circa tre settimane, mentre a temperature comprese fra 20 e 30 °C la crescita microbica avviene rapidamente, nel giro di pochi giorni. Da tali considerazioni emerge l'importanza della temperatura di conservazione delle uova come fattore critico. La maggior parte dei casi di tossinfezione alimentare da *S. Enteritidis* sono correlati non tanto alle uova, ma al consumo di prodotti a base d'uovo, quali maionese e dolci preparati con uova crude, in cui la moltiplicazione dei microrganismi presenti avviene in seguito al mantenimento dei prodotti a temperatura ambiente per tempi anche brevi, venendo a mancare quei fattori limitanti la crescita batterica che abbiamo descritto nelle uova in guscio.

### **2.5.2 Altri alimenti**

Oltre ai più comuni alimenti di origine animale, numerosi episodi di tossinfezione alimentare sono stati associati ad alimenti particolari. Basti ricordare l'episodio che si verificò in Inghilterra e nel Galles a causa di uno snack a base di mais contaminato da *S. Agona* (Killalea et al., 1996) e quello causato da germogli di soia contaminati da *S. Saintpaul* (O'Mahoney M et al., 1990). Anche prodotti a base di cioccolato, che in genere non creano particolari preoccupazioni grazie al loro basso tenore in acqua, hanno causato episodi

rilevanti di salmonellosi. Un esempio si è verificato negli anni '70 in Canada e negli Stati Uniti causato da *S. Eastbourne* (Craven et.al., 1975) e altri legati alla presenza di *S. Napoli* in cioccolato di origine italiana (Gill et al., 1983; Gizzarelli et al., 1983). Il dato interessante di entrambi gli episodi è la dose infettante molto bassa, se confrontata con quella normalmente associata all'infezione da *Salmonella*, spiegabile dall'effetto protettivo dell'alimento, particolarmente ricco in sostanze lipidiche, nei confronti dell'acidità gastrica.

## **2.6 Ambiente**

Sebbene gli animali e gli alimenti di origine animale rappresentino gli ospiti principali delle salmonelle, esse sono riscontrate anche nell'ambiente (acque, suolo, alimenti di origine vegetale), grazie alla contaminazione attraverso le feci sia di origine umana sia animale. L'ambiente rappresenta un ottimo serbatoio di mantenimento per molti sierotipi, anche per quelli che normalmente non si riscontrano negli animali da allevamento e nell'uomo. *Salmonella* è molto comune nelle acque reflue, attraverso le quali può diffondersi in ambienti acquatici come torrenti, fiumi, laghi e rappresentare una fonte di contaminazione del suolo e di conseguenza anche dei vegetali (Lemarchand & Lebaron, 2002). L'utilizzo delle acque reflue per irrigazione rappresenta una fonte diretta di contaminazione che è favorita da vegetali con denso fogliame, in quanto proteggono i microrganismi dall'esposizione a fattori ambientali quali radiazioni solari, temperature elevate ed essiccamento e offre loro una superficie ottimale di crescita (Melloul et al., 2001). Anche gli animali al pascolo inducono una contaminazione diretta del suolo che, attraverso dilavamento della pioggia può trasportare la contaminazione fino ai bacini idrici (Lemarchand & Lebaron, 2002).

## 2.7 Identificazione della *Salmonella* spp.

Numerose tecniche sono state messe a punto per il rilievo di *Salmonella* negli alimenti. Viene, però, indicato come unico metodo validato il protocollo d'analisi riportato nella procedura ISO 6579:2002+Co1:2004, che descrive un metodo orizzontale per la ricerca di *Salmonella* spp. in alimenti destinati al consumo umano e zootecnico. Il metodo colturale classico per la determinazione della *Salmonella* negli alimenti necessita, però, di tempi piuttosto lunghi ed è quindi sempre più sentita l'esigenza di avere a disposizione dei metodi rapidi e sensibili, al fine di realizzare programmi di monitoraggio più tempestivi ed efficaci.

Per soddisfare queste esigenze, in questi ultimi anni è stato sviluppato un grande numero di metodi diagnostici alternativi, quali:

- Agglutinazione al lattice
- Immunofluorescenza (FA)
- Conduttanza/Impedenza
- Filtrazione su membrana (MF)
- Isolamento in terreno semi-solido (MSRV)
- *Enzyme Linked Fluorescent Assay* (ELFA)
- *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay* (ELISA)
- *Polymerase Chain Reaction* (PCR)
- *Real time-PCR*

Queste sono tecniche che consentono di riconoscere la presenza di *Salmonelle* direttamente nel campione in esame o dopo semina del campione in un terreno liquido (fase di pre-arricchimento o di arricchimento). Il riconoscimento della *Salmonella* avviene a livello di genere, per cui si arriva all'identificazione del microrganismo ricercato.

Nei paragrafi successivi sono spiegate dettagliatamente le procedure impiegate per lo svolgimento del lavoro, cioè metodica classica e i due metodi alternativi immunoenzimatico e *real time* PCR.

### 2.7.1 Metodo classico

Le *Salmonelle* crescono facilmente su terreni sintetici. Nei terreni liquidi (Brodo nutritivo, *Trypticase Soy Broth*, *Brain Heart Broth*, ecc) sviluppano con intorbidamento uniforme, raggiungendo dopo 18-24 ore d'incubazione a +37 °C una concentrazione di circa  $10^9$  batteri per ml. Anche nei terreni liquidi d'arricchimento (Brodo selenito, Brodo tetrionato, ecc) il grado di sviluppo è buono, seppure leggermente inferiore o uguale a quello ottenibile in brodi non selettivi ( $10^8/10^9$  germi per ml dopo 24 ore a +37 °C). Su terreni solidi non selettivi, seminati in piastre di Petri, si osservano, dopo incubazione a +37 °C per 24 ore, colonie rotonde, del diametro di 2-3 mm, a margine netto, convesse, incolore, generalmente a superficie liscia, lucente (fase S) e raramente a superficie opaca e ruvida (fase R). Questi aspetti corrispondono a una variazione reversibile chiamata liscia/ruvida o *smooth/rough*. In provetta, sui medesimi terreni "a becco di clarino" seminati sulla parte inclinata (*slant*), la crescita si presenta sotto forma di una patina omogenea, translucida, di consistenza cremosa e raramente con tendenza ad assumere un aspetto "filante", se prelevata con l'ansa. In quest'ultimo caso è difficile allestire sospensioni acquose (ad es. in soluzione fisiologica) o nei sieri diagnostici agglutinanti. Questo aspetto corrisponde ad una variazione reversibile chiamata mucoide/non mucoide. Su Agar sangue le colonie hanno dimensioni leggermente maggiori rispetto ai comuni terreni solidi e non presentano emolisi. Sui terreni solidi selettivi e/o differenziali le colonie hanno diametro inferiore e colorazioni diverse. In provette di *Triple Sugar Iron Agar* (TSI) seminate per striscio e infissione al fondo del terreno, le salmonelle crescono in genere abbondantemente, mostrando uno *slant* alcalino (rosso) e un fondo acido (giallo), mascherato dalla formazione di solfuro di ferro (reazione H<sub>2</sub>S positiva),

accompagnato spesso dalla formazione di bolle di gas, originate dalla fermentazione del glucosio.

➤ Caratteristiche terreni selettivi

- BGA (*Brilliant green agar*). Il BGA contiene lattosio e saccarosio che, se fermentati dai batteri, cambia colore in un verde brillante, altrimenti si ha un viraggio verso il colore rosso. Le colonie si presentano come colonie rosse circondate da terreno rosso. Il terreno ha un'elevata azione inibitrice nei confronti di *E. coli*, *Proteus* e *Pseudomonas*. Si può utilizzare anche il terreno solido XLT-4, una variante del terreno XLD con l'aggiunta di Tergitol-4 che inibisce la crescita di vari batteri in particolar modo *Proteus*.
- MSR/V (*Rappaport Vassiliadis semi-solid medium modified*) è un terreno semisolido che aiuta a ridurre il tempo di risposta, in quanto le colonie che crescono sono probabilmente colonie di *Salmonella* spp. La *Salmonella* su questo terreno si presenta sottoforma di una patina bianca.

Altri terreni, che si utilizzano, hanno le seguenti caratteristiche:

- TSI (*Triple sugar iron agar*) si basa sulla fermentazione di tre zuccheri (lattosio, saccarosio, destrosio) e sulla produzione di idrogeno solforato. È un terreno per l'identificazione presuntiva delle *Enterobacteriaceae*.
- SIM (*Sulfide indole motility*) terreno semisolido in provetta per la differenziazione di batteri enterici sulla base della produzione di idrogeno solforato (+), indolo (-) e sulla motilità (+). La trasformazione del triptofano in indolo è evidenziata utilizzando il reattivo di Kovacs che nel caso della *Salmonella* non virerà a rosso scuro, in quanto indolo negativa.
- *Urea agar base* è un terreno utilizzato per l'evidenziazione della produzione di ureasi da parte dei batteri (*Salmonella* spp. ureasi -).

## 2.7.2 Metodo immunoenzimatico

ELFA è l'acronimo dell'espressione *Enzyme Linked Fluorescent Assay*, un metodo di analisi immunologica usato per rilevare l'eventuale presenza di un antigene in un campione oppure per misurare la concentrazione di anticorpi nel plasma sanguigno. Il termine ELFA sta a significare che il dosaggio unisce la specificità della reazione antigene-anticorpo (reazione immunologica) con la sensibilità di un semplice dosaggio spettrofotometrico di un enzima. Nell'ambito dei vari metodi immunoenzimatici, la denominazione ELFA si riferisce esclusivamente ai sistemi in fase eterogenea, sistemi in cui anticorpi o antigeni sono adsorbiti o legati a un substrato solido (O'Keeffe, 2000).

L'antigene è una molecola che può legarsi ad una specifica immunoglobulina, grazie ad una struttura specifica detta epitopo. Una singola molecola di antigene può contenere diversi epitopi riconosciuti da anticorpi differenti. L'anticorpo (o immunoglobulina) è una glicoproteina del siero con una peculiare struttura quaternaria che le conferisce una forma a "Y". Sono costituiti da una regione costante, comune a tutte le immunoglobuline appartenenti allo stesso isotipo e una regione variabile che contiene invece il sito di combinazione con l'antigene e che è quindi variabile a seconda della specificità dell'anticorpo per un dato antigene. L'ELFA ha una elevata selettività nei confronti degli analiti da determinare. L'anticorpo, infatti, è in grado di riconoscere specificamente l'antigene che ha portato alla sua formazione. La costante di affinità per la formazione dei complessi antigene-anticorpo è estremamente elevata e, benché la reazione sia di tipo reversibile, l'equilibrio è di gran lunga spostato verso la formazione dei complessi antigene-anticorpo. La tecnica si basa sul fatto che, con adatti procedimenti, è possibile coniugare gli anticorpi di un siero con alcuni enzimi (perossidasi, fosfatasi alcalina, beta-galattosidasi) senza alterarne la capacità di combinazione con gli antigeni corrispondenti. Gli enzimi utilizzati sono in grado di catalizzare una reazione su un idoneo substrato (ad esempio la tetrametilbenzidina) con la formazione di un prodotto terminale colorato che permette così di evidenziare la quantità di antigene presente.

VIDAS<sup>®</sup> *Salmonella* è un test immunoenzimatico, che permette l'individuazione di antigeni di *Salmonella* con il metodo ELFA (*Enzyme Linked Fluorescent Assay*) attraverso il sistema automatizzato VIDAS<sup>®</sup>. Il test utilizza un cocktail di anticorpi di cattura ad alta specificità, diretti contro gli antigeni O e H della salmonella, e permette l'individuazione di ceppi mobili e immobili. I coni (SPR<sup>®</sup>), monouso (simili a puntali da 1ml), servono sia da fase solida che da sistema di pipettamento. L'interno del cono è ricoperto di anticorpi anti-*Salmonelle* adsorbiti sulla sua superficie. Gli altri reattivi della reazione immunologica sono pronti per l'uso e pre-distribuiti nella cartuccia. Tutte le fasi del test sono realizzate automaticamente dallo strumento; sono costituite da una successione di cicli di aspirazione/rilascio del mezzo di reazione. Un'aliquota del brodo di arricchimento viene introdotta nella cartuccia. Gli antigeni presenti si legano agli anticorpi anti-*Salmonella* fissati sulle pareti interne del cono. I componenti non legati vengono eliminati tramite lavaggio. In seguito, gli anticorpi coniugati, marcati con la fosfatasi alcalina, sono aspirati/rilasciati dal cono e si fissano agli antigeni di *Salmonella*, a loro volta legati agli anticorpi adesi alla parete del cono. Dalle nuove fasi di lavaggio eliminano il coniugato con il fissato. Nella fase finale di rilevazione il substrato (4-Metil-umbelliferil fosfato) viene aspirato/rilasciato dal cono; l'enzima del coniugato ne catalizza l'idrolisi in un prodotto fluorescente (4-Metil-umbelliferone). L'intensità della fluorescenza emessa è misurata a 450 nm.

Alla fine del test, i risultati sono analizzati automaticamente dallo strumento che fornisce il valore del test per ogni campione. Questo valore viene confrontato con dei valori di riferimento interni (soglie) ed ogni risultato viene interpretato (positivo, negativo). Risulta un valido test diagnostico di *screening*, ma deve essere confermato dalla metodica classica.

### 2.7.3 Metodo molecolare *real time* PCR

La *real time* PCR è' una tecnica che può essere usata per trovare infinitesimali quantità di un agente infettivo presente in un campione, aumentando in modo esponenziale la quantità di una specifica sequenza nucleotidica del microrganismo, attraverso un processo di sintesi diretta del DNA. La tecnica passa attraverso tre successive fasi:

1. Estrazione del DNA dai batteri dopo pre-arricchimento tradizionale a +37 °C per 6 ore.
2. Amplificazione della sequenza di geni (selezionati perchè caratteristici), mediante aggiunta di appropriati oligonucleotidi (*primer*).
3. Ibridizzazione dei prodotti amplificati con oligonucleotidi (*probe*)

La novità della PCR sta nella fase 2, dove intervengono i *primer*, corti segmenti di DNA complementari alle terminazioni 5' e 3' della sequenza da amplificare e dove l'estensione dei *primer* ad opera della DNA polimerasi produce due filamenti di DNA che sono copie identiche del filamento originale. Ad ogni ciclo, il numero di copie del DNA aumenta di  $2^n$ , dove n è il numero dei cicli; consentendo di visualizzare, così, sequenze di nucleotidi capaci di dare informazioni utili per individuare un genere o una specie batterica.

E' possibile evidenziare le *Salmonelle* già da una brodocoltura del campione in pre-arricchimento, oppure da un ceppo già isolato. Sfortunatamente questa tecnica non distingue le cellule batteriche morte da quelle vive. Una metodica valida per la diagnosi di salmonella è quella proposta di Rahn e Coll. modificata (Mioni, 2001).

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. I due tipi di molecole maggiormente utilizzati per identificare gli amplificati in *real time* PCR sono gli agenti intercalanti SYBRGreen® e le sonde fluorogeniche TaqMan®.

Il confronto fra il protocollo con SYBRGreen® (più economico) e con sonde TaqMan® (più specifico) depone a favore di quest'ultima metodica. Questo è dovuto a problematiche legate all'uso di SYBRGreen® in quanto questa molecola non è in grado di rilevare solo gli amplificati specifici, ma si lega a tutti i dsDNA che si formano nella reazione e che sono solo parzialmente risolvibili effettuando un protocollo di dissociazione per l'analisi delle temperature di Melting ( $T_m$ ) dei prodotti ottenuti.

Il protocollo che utilizza la chimica con sonde TaqMan® per la ricerca di prodotti di PCR offre invece numerosi vantaggi, sia rispetto alle tecniche classiche di PCR, sia rispetto alle tecniche di chimica intercalante. Non richiede, infatti, un protocollo di dissociazione e ha una maggiore specificità, dovuta all'utilizzo di specifiche sonde oligonucleotidiche. Uno dei limiti della *real time* PCR è legato all'inibizione dell'azione della Taq polimerasi da parte di sostanze presenti nei campioni sperimentali. Questo limite è tutt'altro che trascurabile e rende necessario un espediente efficace per evidenziare risultati falsamente negativi (Abdulmawjood et al., 2002; Malomy et al., 2003; Burggraf and Olgemoller, 2004; Nolte, 2004).

Per questo, per un monitoraggio più efficace e sicuro del processo di amplificazione, è possibile utilizzare, come identificatori della procedura, molecole standard. Tali molecole, possono essere endogene o esogene. I controlli interni endogeni sono costituiti da geni già presenti nel campione e che in genere vengono amplificati da *primer* universali. Questo tipo di controllo ha il vantaggio di monitorare la qualità della sospensione di DNA presente nel campione. I controlli interni esogeni vengono invece aggiunti artificialmente al campione e sono molecole appositamente disegnate. Se il controllo viene disegnato in modo da essere amplificato dagli stessi *primer* della reazione di PCR principale è definito *mimic*, trattandosi di una molecola che è in grado di imitare e/o mimare il comportamento del DNA stampo primario nella reazione di amplificazione (Drosten et al., 2000; Elnifro et al., 2000; Jacobson et al., 2003; Hoorfar et al., 2003; Malony et al., 2003; Hoorfar et al., 2004; Nolte, 2004). Se invece la molecola viene disegnata in modo da essere amplificata da *primer* differenti rispetto alla reazione di PCR principale, si deve effettuare una *real*

*time* PCR multiplex. A differenza del controllo *mimic* questo, non avendo gli stessi siti di riconoscimento, non interferisce con l'amplificazione del DNA target della reazione principale. Entrambi i tipi di controllo sono comunque efficaci per il monitoraggio semplice e veloce della PCR, evidenziando l'eventuale presenza di fenomeni di inibizione dell'amplificazione.

TaqMan® *Salmonella* enterica Detection Kit è un kit che aiuta nell'identificazione rapida e accurata del microrganismo in alimenti a consumo umano. Questa procedura analitica associa rapidi tempi di analisi a un'alta specificità permettendo la ricerca diretta della *Salmonella* enterica tramite l'identificazione di una regione specifica del DNA del patogeno amplificando una regione del gene *Hind* I. Secondo quanto dichiarato dal produttore, con questo kit si possono rilevare fino a 1-10 copie di DNA per campione. Il kit prevede anche un controllo interno rendendolo quindi in grado di monitorare in modo più efficace e sicuro il processo di amplificazione evidenziando falsi negativi dovuti alla presenza nel campione di inibitori della reazione di polimerizzazione del DNA.



### 3. Materiali e Metodi

#### 3.1 Campioni

In questo studio è stato analizzato un totale di 370 campioni di preparati di carne diversa (Tabella 4). Per testare la validità dei risultati, nella fase iniziale del lavoro, 32 campioni sono stati contaminati con ceppi di riferimento di *S. Choleraesuis* e *S. Typhimurium*. I campioni contaminati sono così ripartiti: 8 di macinato bovino, 8 di petto di pollo, 8 di hamburger suino e 8 di arrosticini di tacchino. Tutti questi sono stati trattati allo stesso modo. In particolare, la contaminazione dei campioni è così suddivisa:

- 1 campione contaminato con *E. coli*;
- 3 campioni con *Salmonella* spp. con carica diversa (bassa, media e alta);
- 3 campioni con *Salmonella* spp. pastorizzati per 15 minuti a 100°C sempre con carica diversa (bassa, media e alta);
- 1 campione negativo (precedentemente congelato per più di 48 ore);

Infine, i restanti 338 campioni, sono stati analizzati senza l'aggiunta del ceppo vivo/morto, determinando così l'assenza o la presenza di *Salmonella* direttamente nel campione.

**Tabella 4.** Tipologia dei campioni presi in esame con le relative quantità.

<b>TIPOLOGIA CAMPIONI ANALIZZATI</b>	<b>NUMERO CAMPIONI</b>
<b>PREPARATI DI BOVINO</b>	
Salsiccia	32
Macinato	45
Hamburger	12
Bistecca	5
<b>PREPARATI DI POLLO</b>	
Arrosticini	21
Petto	33
Crocchette	17
Hamburger	15
Alette	15
Pelle	1
Cotoletta	13
Spiedini	23
<b>PREPARATI DI SUINO</b>	
Salsiccia	15
Macinato	21
Hamburger	17
Lonza	12
<b>PREPARATI DI TACCHINO</b>	
Petto	17
Arrosticini	22
Cotoletta	13
Hamburger	12
<b>PREPARATI DI CONIGLIO</b>	
Pezzi	6
<b>TOTALE CAMPIONI</b>	<b>370</b>

### 3.2 Metodo classico

Il metodo classico microbiologico fa riferimento alla procedura ISO 6579:2002+Co1:2004. Questo metodo si compone di 4 fasi:

- 1) pre-arricchimento non selettivo in acqua peptonata tamponata (BPW);
- 2) arricchimento in terreno selettivo *Rappaport Vassiliadis* con soia (brodo RVS) e Brodo di Muller-Kauffmann al tetrionato-novobiocina (brodo MKTTn);
- 3) semina su piastra di terreno selettivo BGA e Agar XLD (Agar verde brillante e Xilosio Lisina Desossicolato);
- 4) test biochimici di conferma.

I terreni utilizzati sono stati preparati come descritto nell'appendice A.

#### 3.2.1 Preparazione del campione

1. A 25 g del campione alimentare in esame, in un sacchetto per stomacher, aggiungere 225 ml di BPW
2. Omogeneizzare il campione nello stomacher per 1 minuto
3. Incubare la sospensione ottenuta a 37°C per 18h ± 2 h
4. Dopo l'incubazione, trasferire 0,1 ml della coltura in una provetta contenente 10 ml del brodo RSV e 1 ml della coltura in una provetta contenente 10 ml di terreno MKTTn
5. Incubare il brodo RSV inoculato a 41,5 °C ± 1 °C per 24 h ± 3 h e il brodo MKTTn inoculato a 37 °C ± 1 °C per 24 h ± 3 h

### 3.2.2 Isolamento ed identificazione

1. Inoculare con un'ansa da batteriologia, la coltura in RVS, sulla superficie del primo terreno selettivo XLD e del secondo terreno selettivo BGA
2. Ripetere il punto 1 inoculando la coltura derivante dal brodo MKTTn
3. Capovolgere le piastre e incubarle a  $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ .
4. Dopo  $24\text{ h} \pm 3\text{ h}$  esaminare le piastre ricercando la presenza di colonie tipiche di *Salmonella*

Le colonie tipiche di *Salmonella* su agar XLD hanno un centro nero e una zona leggermente trasparente di colore rossiccio a causa del viraggio di colore dell'indicatore. Le varianti negative della *Salmonella* H<sub>2</sub>S (per esempio *S. Paratyphi A*) sull'agar XLD sono rosa con un centro rosa più scuro. La *Salmonella* lattosio positiva su agar XLD appare gialla con o senza annerimento. Le colonie tipiche di *Salmonella* su BGA sono rosse, circondate da terreno rosso vivo.

### 3.2.3 Prove di conferma

Dopo aver osservato le colonie su terreno selettivo solido si passa alla fase successiva che consiste nei test di conferma. Di seguito è descritto come bisogna procedere.

1. Prelevare 5 colonie tipiche o sospette per la conferma biochimica
2. Eseguire uno striscio di ogni colonia selezionata su piastra di Nutrient Agar (NA) in modo da avere colonie ben isolate
3. Incubare le piastre inoculate a 37°C per 24 ore
4. Con un'ansa da infissione, inoculare le colture ottenute dalle colonie selezionate al punto 2, inoculando il fondo mediante infissione e strisciando la superficie del becco di clarino dell'agar
5. Incubare a 37°C per 24 ore
6. Interpretare i cambiamenti di terreno come segue:

a) fondo

- giallo                      positivo per il glucosio (glucosio utilizzato)
- rosso o invariato      negativo per il glucosio (glucosio non utilizzato)
- nero                        formazione di solfuro di idrogeno
- bolle o fratture        formazione di gas a partire dal glucosio

b) superficie inclinata

- giallo                      positivo per il lattosio e/o saccarosio (lattosio e/o saccarosio utilizzati)
- rosso o invariato      negativo per il lattosio e il saccarosio (né lattosio né saccarosio utilizzati)

Le colture tipiche di *Salmonella* mostrano superfici inclinate alcaline (rosse) con formazione di gas e fondo acido (giallo) con (nel 90% circa dei casi) formazione di solfuro di idrogeno (che annerisce l'agar).

Quando si isola una *Salmonella* lattosio positiva (es. *S. Thyphi* e *S. Parathyphi*), la superficie inclinata del TSI è gialla. Pertanto, la conferma preliminare delle colture di *Salmonella* non deve essere basata solamente sui risultati della prova su agar TSI.

1. Prova della decomposizione dell'urea; decarbossilazione della L-Lisina; ricerca della  $\beta$ -galattosidasi; reazione Voges-Proskauer; reazione all'indolo vengono effettuate utilizzando il kit miniaturizzato API rapiD 20E
2. Seguire le istruzioni del kit
3. Porre una goccia di siero omnivalente/polivalente salina su un vetrino
4. Disperdere per mezzo di un'ansa batteriologica parte della colonia isolata in Nutrient Agar
5. Scuotere delicatamente il vetrino compreso tra 10 e 20 oscillazioni
6. Osservare l'agglutinazione se è avvenuta su sfondo nero

### 3.3 Metodo ELFA

Sono state seguite le indicazioni fornite dalla ditta produttrice del kit VIDAS® Salmonella (SLM), Biomérieux (Francia).

Il **KIT VIDAS SLM** è composto da:

a) Cartucce SLM (STR) pronte all'uso:

La cartuccia è composta da 10 pozzetti ricoperti da un foglio di alluminio sigillato ed etichettato, su cui è stampato un codice a barre che corrisponde al codice del test, al numero di lotto e alla data di scadenza della confezione. L'etichetta, in corrispondenza del primo pozzetto, è ritagliata per facilitare l'introduzione del campione. L'ultimo pozzetto è una cuvetta che consente la lettura in fluorimetria. I pozzetti intermedi contengono i diversi reattivi necessari all'analisi.

La descrizione della cartuccia è la seguente:

Pozzetti	Reattivi
1	Pozzetto del campione: depositarvi 500 µl di brodo di arricchimento riscaldato
2	Tampone di prelavaggio: TRIS – NaCl (150 mmol/l) – Tween + conservante (400 µl)
3-4-5-7-8-9-	Tampone di lavaggio: TRIS – NaCl (150 mmol/l) – Tween pH 7,6 + conservante (600 µl)
6	Coniugato: anticorpi policlonali anti-Salmonella marcati con fosfatasi alcalina + conservante (400 µl)
10	Cuvetta di lettura contenente il substrato: 4-Metil-umbelliferil fosfato (0,6 mmol/l) + Dietanolamina* (0,62 mmol/l, ossia 6,6%, pH 9,2) + conservante (300 µl)

\*Reattivo Irritante

b) Coni SLM (SPR) pronti all'uso:

Durante la produzione il cono viene sensibilizzato con anticorpi monoclonali specifici per gli antigeni di superficie della *Salmonella*.

Ogni cono è contrassegnato con il codice "SLM". I coni, monouso, servono sia da fase solida che da sistema di pipettamento. L'interno del cono è ricoperto da anticorpi anti-Salmonella adsorbiti sulla sua superficie.

c) Standard SLM (S1):

Costituito da antigene di *Salmonella* purificato ed inattivo + conservante + stabilizzante proteico. L'ambito fiduciario è indicato sulla scheda MLE con la menzione "Standard (S1) RFV Range".

d) Controllo positivo SLM (C1):

Antigene di *Salmonella* purificato e inattivato + conservante + stabilizzante proteico.

e) Controllo negativo SLM (C2):

Tampone TRIS – NaCl (150 mmol/l) – Tween pH 7,6 + conservante.

f) Scheda MLE:

Scheda delle specifiche tecniche contenente i dati forniti dalla casa produttrice per la calibrazione del test.

Di seguito è riportato il protocollo operativo da seguire per l'esecuzione del test.

### **3.3.1 Pre-arricchimento**

Per questa fase fare riferimento al paragrafo 3.2.1 dal punto 1 al punto 3.

### **3.3.2 Arricchimento**

1. Dopo incubazione trasferire 0,1 ml della sospensione in 10 ml di brodo SX2
2. Incubare per 22-26 ore a  $42 \pm 1^\circ\text{C}$
3. Dopo incubazione omogeneizzare il brodo SX2
4. Trasferire 0,5 ml del brodo SX2 nel pozzetto del campione della cartuccia del kit
5. Scaldare a  $131^\circ\text{C}$  per 15 minuti utilizzando VIDAS® Heat and Go
6. Estrarre la cartuccia e lasciarla raffreddare per 10 minuti
7. Eseguire il test VIDAS®
8. Conservare il brodo SX2 a  $2-8^\circ\text{C}$  per una eventual e conferma

### **3.3.3 Conferma dei risultati**

Tutti i risultati positivi ottenuti con il VIDAS® SLM devono essere confermati. La conferma si esegue partendo dal brodo SX2 non scaldato conservato a  $2-8^\circ\text{C}$  e deve essere iniziata entro 72 ore dalla fine dell'incubazione del brodo selettivo a  $42 \pm 1^\circ\text{C}$ .

### **3.4 Metodo Molecolare**

Il TaqMan® *Salmonella* enterica Detection Kit (Applied Biosystems) viene applicato secondo le indicazioni fornite dal produttore.

### 3.4.1 Estrazione del DNA

1. Dal campione, preparato come precedentemente descritto (paragrafo 3.2.1 dal punto 1 al punto 3) prelevare 1 ml e metterlo in una microprovetta sterile da 2 ml
2. Centrifugare per 5 minuti a 13000rpm
3. Eliminare il surnatante senza toccare il *pellet*
4. Risospendere il *pellet* con 100 µl di Prepman® Ultra Sample Preparation Reagent
5. Vortexare la provetta miscelando il contenuto
6. Incubare a 100°C per 10 minuti
7. Centrifugare per 3 minuti alla massima velocità
8. Trasferire 50 µl del surnatante in una nuova microprovetta sterile (a questo punto il campione può essere stoccato a 4°C per un mese)
9. Diluire, in una microprovetta sterile, 10 µl del campione di DNA con 90 µl di RNase-free water

### 3.4.2 Amplificazione del DNA

1. Calcolare il numero di campioni da analizzare tenendo conto che ogni campione deve essere analizzato in doppio e che bisogna inserire in ciascuna piastra i seguenti controlli:
  - un controllo positivo ottenuto estraendo il DNA da una matrice alimentare inquinata con un ceppo di *Salmonella* enterica
  - bianco reagente: controllo negativo della MasterMix con acqua al posto del DNA
2. Preparare un volume di miscela di reazione adeguato al numero di campioni da analizzare secondo le indicazioni fornite in Tabella 5
3. Mettere in ciascun pozzetto 18µl di miscela di reazione
4. Aggiungere in ciascun pozzetto 12µl di DNA o di acqua
5. Chiudere la piastra, inserirla nello strumento ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems) e far partire la corsa con i parametri indicati in Tabella 6

**Tabella 5.** Preparazione della Mix di reazione.

COMPONENTI	DOSI PER UN CAMPIONE
2X Environmental Master Mix (EMM)	15 µL
10X Target Assay Mix (TAM)	3 µL
Volume totale	18 µL

**Tabella 6.** Parametri per l'ABI PRISM 7700.

	ABI-PRISM 7700
1. Denaturazione	95 °C, 10 min
2a Denaturazione	95 °C, 15 sec
2b Anneal/Extend	60 °C, 1 min
Numero di cicli	45

I risultati vengono interpretati secondo i seguenti criteri:

- a) Verificare la qualità dei risultati ottenuti nella piastra attraverso il risultato ottenuto per i controlli (controllo positivo, controllo interno e bianco)
- b) Attribuire positività ai campioni in cui lo strumento rilevi presenza di segnale specifico per *Salmonella* enterica; negatività ai campioni in cui lo strumento non rilevi presenza di segnale specifico per il patogeno ma segnale specifico per IPC (*Lysteria monocytogenes*); inibizione ai campioni in cui non venga rilevata alcun segnale
- c) Ripetere l'analisi sui campioni inibiti tramite nuova estrazione del campione o l'utilizzo di DNA in reazione più diluito

### **3.4.3 Conferma dei risultati**

Tutti i risultati positivi ottenuti con il TaqMan® *Salmonella enterica* Detection Kit devono essere confermati con il metodo microbiologico classico in quanto con questo tipo di analisi non è possibile differenziare fra *Salmonella* viva o morta.

Infatti, la *real time* PCR non differenzia la presenza di *Salmonella* viva o morta. Per questo la presenza di *Salmonella* pastorizzata è risultata positiva all'analisi dando il problema di campioni falsamente positivi. Per ovviare a questo problema è stato messo a punto un protocollo analogo di seguito descritto.

### **3.5 Metodo Molecolare alternativo**

Il metodo prevede le stesse fasi del protocollo "classico" ma prevede l'utilizzo, per l'estrazione del DNA, non dell'omogenato ma di un campione in terreno selettivo liquido RSV o da MKTTn.

### **3.6 Analisi dei dati**

I risultati ottenuti con i vari metodi (classico, immunoenzimatico e molecolare) sono stati inseriti in appositi fogli Excel per determinare la sensibilità, la specificità e l'accuratezza dei metodi utilizzati. L'analisi statistica su cui si basa il metodo, fa riferimento alla ISO 16140:2003. Questa norma detta le basi per il calcolo dei parametri nei metodi qualitativi. Infatti, con il termine sensibilità (SE), si intende la capacità di identificare correttamente i campioni positivi. In termini di probabilità, la sensibilità è la probabilità che un campione positivo sia realmente positivo. Possiamo anche dire che la sensibilità è la proporzione di campioni positivi che risultano positivi al test.

$$\text{sensibilità}(SE) = \frac{P}{P + FN} \times 100$$

dove:

P = risultato positivo

FN = Falso negativo

Con specificità (SP), invece, si intende la capacità di identificare correttamente i campioni negativi. E' la probabilità, espressa come percentuale, che un risultato negativo sia effettivamente negativo. Possiamo anche dire che la specificità è la proporzione di campioni negativi che risultano negativi al test.

$$\text{specificità}(SP) = \frac{N}{N + FP} \times 100$$

dove:

N = risultato negativo

FP = Falso positivo

Infine l'accuratezza misura la concordanza tra il risultato del test, positivo o negativo, ed il reale stato del campione (viene anche definita validità). Per accuratezza (AC), quindi, si intende il grado di concordanza, espressa in percentuale, tra il "valore noto" e il metodo in esame.

$$\text{accuratezza}(AC) = \frac{P + N}{P + N + FP + FN} \times 100$$

dove:

P = risultato positivo

N = risultato negativo

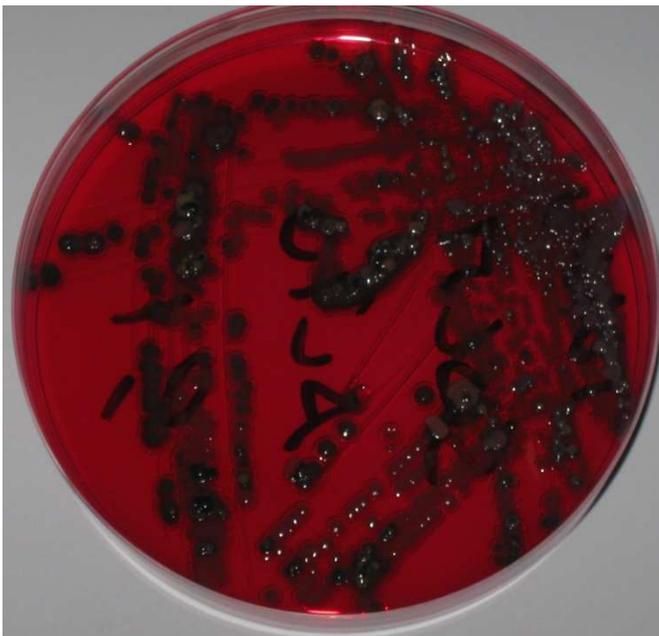
FP = Falso positivo

FN = Falso negativo

## 4. Risultati

### 4.1 Metodo Classico

I risultati ottenuti con il metodo classico sono stati determinati dalle prove di conferma biochimica effettuate su 5 colonie isolate, caratteristiche o presunte (Figura 5). Dopo la reazione positiva al TSI (Figura 6) e alla prova dell'agglutinazione, si prosegue con il RapiD20E (Figura 7), come descritto nella procedura trattata precedentemente. I risultati ottenuti sono stati inseriti in un foglio Excel per il calcolo dei parametri presi in esame in questo studio (Tabella 7).



**Figura 5.** Campione positivo in piastra XLD.



**Figura 6.** Campione positivo in TSI.



**Figura 7.** Campione positivo alla salmonella con prove di conferma al metodo microbiologico classico.

#### **4.2 Metodo Immunoenzimatico**

Anche in questo caso, i risultati ottenuti sono stati inseriti nel foglio Excel, come per il metodo microbiologico (Tabella 8). Sono stati inseriti i risultati analizzati con il VIDAS® (il sistema automatizzato emette un report, Figura 8, decretando la presenza o l'assenza di Salmonella). I risultati positivi a questo metodo di *screening* sono stati confermati con l'analisi microbiologica, ma non tutti i campioni determinati positivi hanno avuto esito positivo con il test di conferma della ISO 6579:2002 + Co1:2004.

Lab. CHELAB

Salmonella (SLM - I1) - DSVID R4.3.0 DSPTC R6.1

VIDAS : 1 - sezione(i) 437, 438, 439  
Operatore : db2bmx  
Numero di lotto : 110407-0

Completata :  
29 giu 2010 12:17:55

Calibratore usato per questo esame :  
Completata : 29 giu 2010 12:19:15  
S1 RFV : 3344

Negativo < 0.23

Positivo >= 0.23

Posizione	ID Campione	Esame		Valore Test	Interpretazione
		RDF	RFV		
A-1	S1	59	3334		Standard
A-2	S1	67	3355		Standard
A-3	C1	56	3956	1.18	Positivo
A-4	C2	60	200	0.05	Negativo
A-5	17	54	190	0.05	Negativo
A-6	18	54	183	0.05	Negativo
D-1	19	58	189	0.05	Negativo
D-2	20	60	183	0.05	Negativo
D-3	21	55	190	0.05	Negativo
D-4	22	61	186	0.05	Negativo
D-5	23	61	184	0.05	Negativo
D-6	24	56	185	0.05	Negativo
E-1	25	62	190	0.05	Negativo
E-2	26	60	187	0.05	Negativo
E-3	27	62	185	0.05	Negativo

**Figura 8.** Report emesso dal Vidas®.

### 4.3 Metodo Molecolare

I risultati ottenuti applicando il protocollo consigliato dalla ditta produttrice del kit sono riassunti nella tabella 9. Dalle figure 9 e 10 si possono vedere campioni risultati positivi (curve di amplificazione) alla presenza di *Salmonella* con amplificazione del controllo interno. Il metodo previsto dal protocollo della ditta fornitrice ha dato la presenza di campioni falsamente positivi come si vede dalla Tabella 9. Per ovviare a questo problema è stato messo a punto un protocollo alternativo di preparazione del campione. Per questo la presenza di *Salmonella* pastorizzata è risultata positiva all'analisi dando il problema di campioni falsamente positivi.

#### 4.4 Metodo Molecolare Alternativo

I campioni vengono considerati come nel paragrafo 4.3. Il protocollo messo a punto in questo studio ha permesso l'eliminazione dei campioni falsamente positivi (Tabella 10). Questo ha portato ad una maggiore accuratezza nel rilevare la presenza di Salmonella nei campioni.

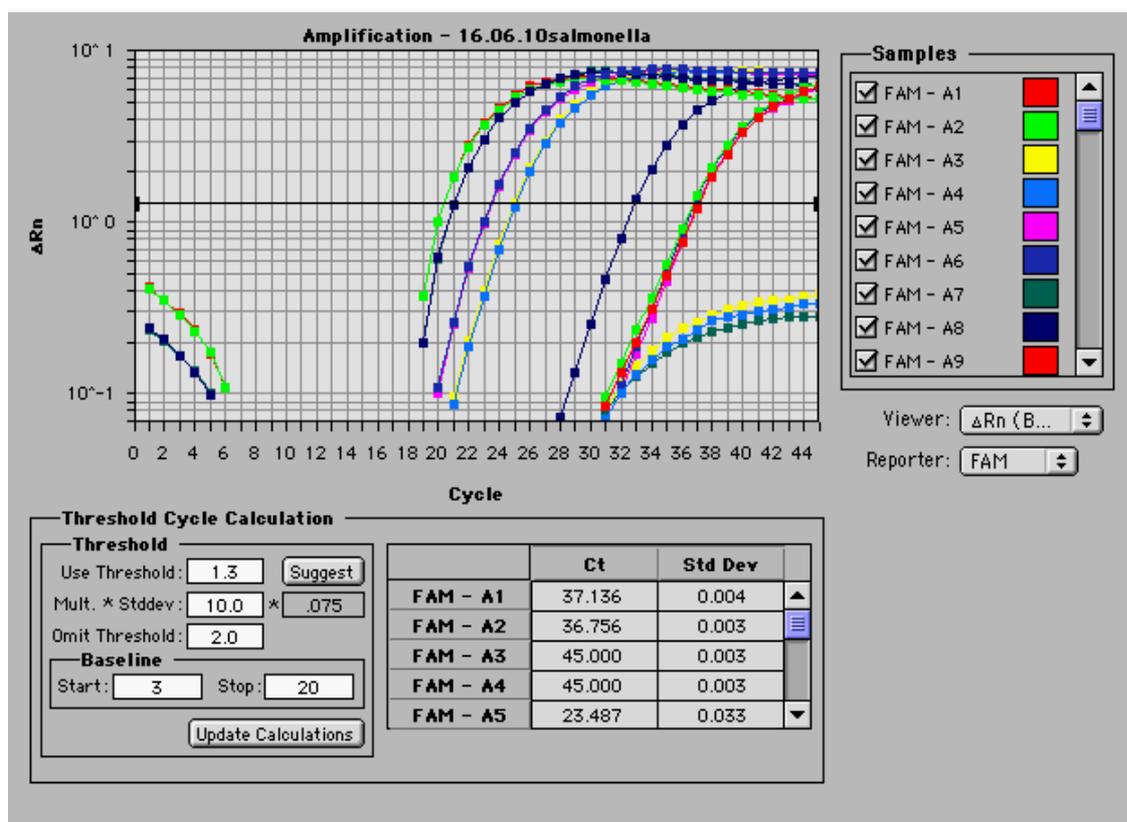
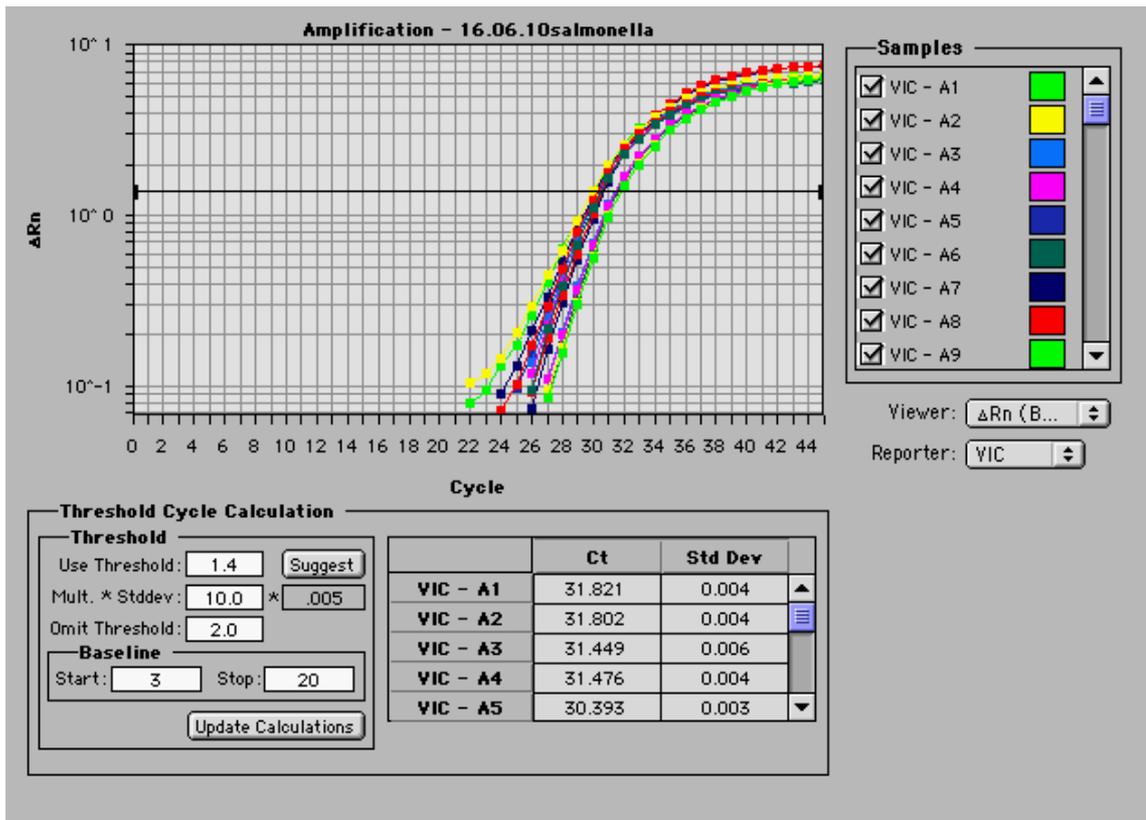


Figura 9. Curve di amplificazione di alcuni campioni.



**Figura 10.** Amplificazione del controllo interno alla reazione.

Data inizio e fine analisi	Matrice	P (vero positivo)	N (vero negativo)	FN (falso negativo)	FP (falso positivo)	Sensibilità %	Specificità %	Accuratezza %
31/05/2010	salsiccia di bovino	11	19	2		83	100	93
	macinato di bovino	18	24	3				
	hamburger di bovino	7	5					
	bistecca di bovino	1	4					
	arrosticini di pollo	8	11	2				
	petto di pollo	13	16	4				
	crocchette di pollo	7	7	3				
	hamburger di pollo	3	12					
	alette di pollo	7	6	2				
	pelle di pollo	1						
	cotoletta di pollo	3	10					
	spiedini di pollo	8	15					
	salsiccia di suino	5	6	4				
	macinato di suino	6	15					
	hamburger di suino	3	14					
	lonza di suino	4	6	2				
	petto di tacchino	9	7	1				
	arrosticini di tacchino	7	12	3				
	cotoletta di tacchino	4	8	1				
	hamburger di tacchino	3	9					
31/08/2010	coniglio intero	1	5					

**Tabella 7.** Verifica dei parametri accuratezza, sensibilità e specificità per il metodo microbiologico qualitativo.

**Tabella 8.** Verifica dei parametri accuratezza, sensibilità e specificità per il metodo immunoenzimatico.

Data inizio e fine analisi	Matrice	P (vero positivo)	N (vero negativo)	FN (falso negativo)	FP (falso positivo)	Sensibilità %	Specificità %	Accuratezza %
31/05/2010	salsiccia di bovino	11	20		1	100	95	96
	macinato di bovino	18	27					
	hamburger di bovino	7	5					
	bistecca di bovino	1	4					
	arrosticini di pollo	8	12		1			
	petto di pollo	13	20					
	crocchette di pollo	7	7		3			
	hamburger di pollo	3	12					
	alette di pollo	7	6		2			
	pelle di pollo	1						
	cotoletta di pollo	3	10					
	spiedini di pollo	8	15					
	salsiccia di suino	5	8		2			
	macinato di suino	6	15					
	hamburger di suino	3	14					
	lonza di suino	4	6		2			
	petto di tacchino	9	7		1			
	arrosticini di tacchino	7	15					
	cotoletta di tacchino	4	8		1			
	hamburger di tacchino	3	9					
31/08/2010	coniglio intero	1	5					

**Tabella 9.** Verifica dei parametri accuratezza, sensibilità e specificità per il metodo molecolare.

Data inizio e fine analisi	Matrice	P (vero positivo)	N (vero negativo)	FN (falso negativo)	FP (falso positivo)	Sensibilità %	Specificità %	Accuratezza %
31/05/2010	salsiccia di bovino	11	14		7	100	70	80
	macinato di bovino	18	22		5			
	hamburger di bovino	7	5					
	bistecca di bovino	1	4					
	arrosticini di pollo	8	8		5			
	petto di pollo	13	12		8			
	crocchette di pollo	7	4		6			
	hamburger di pollo	3	10		2			
	alette di pollo	7	5		3			
	pelle di pollo	1						
	cotoletta di pollo	3	8		2			
	spiedini di pollo	8	14		1			
	salsiccia di suino	5	3		7			
	macinato di suino	6	10		5			
	hamburger di suino	3	13		1			
	lonza di suino	4	2		6			
	petto di tacchino	9	5		3			
	arrosticini di tacchino	7	10		5			
	cotoletta di tacchino	4	6		3			
	hamburger di tacchino	3	6		3			
31/08/2010	coniglio intero	1	5					

Data inizio e data fine analisi	Matrice	P (vero positivo)	N (vero negativo)	FN (falso negativo)	FP (falso positivo)	Sensibilità %	Specificità %	Accuratezza %
31/05/2010	salsiccia di bovino	11	21			100	100	100
	macinato di bovino	18	27					
	hamburger di bovino	7	5					
	bistecca di bovino	1	4					
	arrosticini di pollo	8	13					
	petto di pollo	13	20					
	crocchette di pollo	7	10					
	hamburger di pollo	3	12					
	alette di pollo	7	8					
	pelle di pollo	1						
	cotoletta di pollo	3	10					
	spiedini di pollo	8	15					
	salsiccia di suino	5	10					
	macinato di suino	6	15					
	hamburger di suino	3	14					
	lonza di suino	4	8					
	petto di tacchino	9	8					
	arrosticini di tacchino	7	15					
	cotoletta di tacchino	4	9					
	hamburger di tacchino	3	9					
31/08/2010	coniglio intero	1	5					

**Tabella 10.** Verifica dei parametri accuratezza, sensibilità e specificità per il metodo molecolare alternativo.



## 5. Discussione e Conclusioni

In questo studio sono state comparate, a fine diagnostico, la tecnica microbiologica classica, l'immunoenzimatica e la *real time PCR*. Si è potuto così evidenziare attraverso i parametri presi in esame (sensibilità, specificità e accuratezza) che il metodo più affidabile e sicuro è la *real time PCR* con una sonda specifica tipo TaqMan®.

Dall'elaborazione dei dati dei protocolli d'analisi del metodo microbiologico, immunoenzimatico e molecolare si nota che la maggior specificità del metodo si ha con il metodo classico con il 100%. Questo è dovuto al fatto che se la *Salmonella* all'interno dell'alimento è morta non cresce su piastra. Una limitazione, però, di quest'ultimo è la minor sensibilità al microrganismo. Infatti, nei campioni inoculati con una concentrazione molto bassa di *Salmonella* (1 colonia alla  $10^8$ ) non è stata rilevata. Si nota, infatti, che i test alternativi di *screening* hanno una sensibilità maggiore al microrganismo, 100% contro l'83% del metodo classico. I metodi di *screening*, infatti, devono evitare risultati falsamente negativi, anche se questo diminuisce la specificità del metodo (95% per il metodo ELFA e 70% per la *real time PCR*). Infatti, maggiore è la sua sensibilità, minore è la sua specificità. Per questo quando si mette a punto un test diagnostico bisogna equilibrare questi due parametri in base alle esigenze del caso.

Il metodo immunoenzimatico è risultato un valido test di *screening* diminuendo le tempistiche del metodo microbiologico per i campioni risultati negativi; mentre i campioni risultati positivi devono essere comunque confermati dalla metodologia classica, in quanto è l'unico metodo ufficiale per l'identificazione di *Salmonella*.

Il metodo molecolare ad una prima analisi non sembra essere un test di *screening* affidabile. Infatti, questa metodica presenta delle limitazioni legate alla possibilità di ottenere risultati falsamente positivi dovuti alla presenza nel campione di *Salmonella* pastorizzata. Al fine di migliorare l'affidabilità

diagnostica del metodo, in questo lavoro si è messo a punto un protocollo *real time PCR* internamente controllato partendo da un terreno liquido selettivo. Questo ha eliminato la presenza di campioni falsamente negativi. Il microrganismo presente pastorizzato nell'omogenato ad un ulteriore passaggio in terreno di arricchimento viene diluito a tal punto da non rilevare più il DNA *target*; mentre se il microrganismo è vivo all'interno dell'alimento si trova più concentrato che partendo dall'omogenato. Questo però ha aumentato i tempi dei risultati attendibili. Con il protocollo alternativo si è riusciti ad aumentare la specificità e l'accuratezza del metodo. In caso di positività i risultati devono essere confermati dal metodo microbiologico, anche se con il protocollo alternativo abbiamo avuto risultati più accurati e attendibili.

Concludendo, i risultati della valutazione del confronto delle metodiche ha evidenziato che la *real time PCR* con il metodo alternativo risulta avere maggior sensibilità, specificità e accuratezza dei risultati. In particolare, il protocollo applicato ai campioni alimentari si è rivelato efficace sia nell'identificare i campioni positivi, sia nello svelare campioni falsamente positivi per la presenza di *Salmonella* pastorizzata risultando quindi più affidabile al fine diagnostico. L'unica limitazione evidenziata dal lavoro è l'aumento del tempo di esecuzione del test. Infatti, per la rimozione dei campioni falsamente positivi si rende necessaria la diluizione del campione in un terreno di arricchimento con successiva incubazione di quest'ultimo. Se presente il microrganismo cresce, mentre se è morto il suo DNA *target* viene diluito ulteriormente. Per ovviare a questo problema si potrebbe amplificare l'RNA *target*, ma la sua estrazione risulta più difficile vista la struttura dell'RNA stesso. Da questo studio è emerso che il metodo ELFA è un valido metodo di *screening*, anche se è meno specifico della *real time PCR*, ma in caso di campioni positivi deve essere confermato dal metodo microbiologico classico.

## 6. Bibliografia

1. Abdulmawjood A., Roth S., and Bülte M. (2002). Two methods for construction of internal amplification controls for the detection of *Escherichia coli* O157 by polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes*. 16: 335-9.
2. Allerberger F, Liesegang A, Grif K et.al. Occurrence of *Salmonella enterica* serovar Dublin in Austria. *Eurosurv* 2002;7(4):65-70.
3. Baumler AJ, Tsolis RM, Heffron F. Fimbrial adhesions of *Salmonella* Typhimurium. *Adv Exp Med Biol* 1997;412:149-58.
4. Brackelsberg CA, Nolan LK, Brown J. Characterization of *Salmonella* Dublin and *Salmonella* Typhimurium (Copenhagen) Isolates from cattle. *Vet Res Com* 1997;21:409-20.
5. Bisbini P, Leoni E, Nanetti A. An outbreak of *Salmonella* Hadar associated with roast rabbit in a restaurant. *Eur J Epidemiol* 2000;16:613-8.
6. Burggraf S. and Olgemöller B. (2004). Simple technique for internal control of real-time amplification assays. *Clin Chem*. 50: 819-25.
7. Carattoli A., Ricci A. (2001) – Infezioni da *Salmonella* – *Microbiologia Medica* – 16(1):12-21.
8. CDC. Reptile-Associated Salmonellosis-Selected States, 1998-2002. *MMWR* 2003;52(49):1206-1209.

9. Craven PC, Mackel DC, Baine WB, Barker WH, Gangarosa EJ. International outbreak of *Salmonella* Eastbourne infection traced to contaminated chocolate. *Lancet* 1975;1(7910):788-92.
10. Darwin KH, Miller VL. Molecular basis of the interaction of *Salmonella* with the intestinal mucosa. *Clinic Microbiol Rev* 1999;12(3):405-28.
11. Drosten C., Weber M., Seifried E and Roth WK. (2000). Evaluation of a new PCR assay with competitive internal control sequence for blood donor screening. *Transfusion*. 40: 718-24.
12. EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ); Scientific Opinion on a quantitative estimate of the public health impact of setting a new target for the reduction of *Salmonella* in laying hens. *EFSA Journal* 2010; 8(4):1546.
13. Elnifro E.M., Ashshi A.M., Cooper R.J. and Klapper P.E. (2000). Multiplex PCR: optimization and application in diagnostic virology. *Clin Microbiol Rev*. 13: 559-70.
14. Fisker N., Vinding K., Molbak K., Hornstrup M. K (2003) – Clinical review of nontyphoid *Salmonella* infections from 1991 to 1999 in a Danish county – *Clinical Infectious Diseases* 2003 – 37(4):47-52.
15. Gill ON, socket PN, Bartlett CL, Vaile MS, Rowe B, Gilbert RJ, Dulake C, Murrell HC, Salmaso S. Outbreak of *Salmonella* Napoli infection caused by contaminated chocolate bars. *Lancet* 1983;1(8324):574-7.
16. Gizzarelli S, Salmaso S, Toti L, Zanoni D. Microbiologic investigation of chocolate contaminated with *Salmonella* Napoli. *Nuovi Ann Ing Microbiol* 1983;34(5):347-52.

17. Gunn JS, Ernst RK, McCoy AJ, Miller SI. Constitutive mutation of the *Salmonella enteric serovar Typhimurium* transcriptional virulence regulator *phoP*. *Infect Immun* 2000;68(6):3758-62.
18. Holt J. Multistate outbreak of *Salmonella Typhimurium* infections associated with iced cake. *Eurosurv* 1999;4(2):24-6.
19. Hoorfar J., Cook N., Malorny B., Wagner M., De Medici D., Abdulmawjood A. and Fach P. (2003). Making internal amplification control mandatory for diagnostic PCR. *J Clin Microbiol.* 4: 5835.
20. Hoorfar J., Cook N., Malorny B., Wagner M., De Medici D., Abdulmawjood A. and Fach P. (2004). Diagnostic PCR: making internal amplification control mandatory. *Lett Appl Microbiol.* 38: 79-80.
21. Humprey T. (2000) – *Salmonella Typhimurium* definitive tipe 104, a multiresistent *Salmonella* – *International Journal of Food Microbiology* 2001 – 67:173-186.
22. International Organization for Standardization. General Guidance on metodos for detection of *Salmonella*. ISO 6579:2002 + Co1:2004.
23. International Organization for Standardization, Microbiology of food and animal feeling stuffs – Protocol for the validation of alternative methods. ISO 16140:2003
24. Jacobson M., Englund S. and Ballagi-Pordány A. (2003). The use of a mimic to detect polymerase chain reaction-inhibitory factors in feces examined for the presence of *Lawsonia intracellularis*. *J Vet Diagn Invest.* 15: 268-73.

25. Kauffmann F (1966). Classificazione e nomenclatura dei sub-genus I e IV delle Salmonelle, Zbl. Ref. , 202, 484
26. Kauffmann F (1966). Diagnosi biochimica differenziale delle Enterobacteriaceae, The Bacteriology of Enterobacteriaceae, Munskgaard Ed., Copenhagen,
27. Killalea D, Ward LR, Roberts D, de Louvois J, Sufi F, Stuart JM, Wall PG, Susman M, Schwieger M, Sanderson PJ, Fisher IST, Mead PS, Gill ON, Bartlett CLR, Rowe B. International epidemiological and microbiological study of outbreak of Salmonella Agona infection from a ready to eat savoury snack in England and Wales and the United States. BMJ 1996;313:1105-7.
28. La Placa M. (1991) – Principi di microbiologia medica – sesta edizione – Società editrice Esculapio – Pag: 34-93, 147-289, 294-305, 593-597.
29. Le Minor L. *et al.*(1987). Designation of *Salmonella enterica* sp. as the type and only species of the genus *Salmonella*. *Int J System Bacteriol* ,37:465
30. Lemarchand K, Lebaron P. Influence of mutation frequency on the persistence of Salmonella enteric serotypes in natural waters. FEMS Microbiol Ecol 2002;41:125-31.
31. Melloul AA, Hassani L, Rafouk L. Salmonella contamination of vegetables irrigated with untreated wastewater. World J Microbiol & Biotech 2001;17:207-9.
32. Mioni R. (2001, Com. pers.), PCR per rilevazione delle salmonella in campioni di acqua peptonata. Modifica della metodica descritta in Rahn K. e Coll., Amplification o fan invA gene sequence of Salmonella

typhimurium by polymerase chain reaction as a specific method of detection of salmonella, *Molecular and Cellular Probes*, 1992, 6, 271.

33. Malorny B., Tassios P.T., Rådström P., Cook N., Wagner M., Hoorfar J. (2003). Standardization of diagnostic PCR for the detection of foodborne pathogens. *Int J Food Microbiol.* 83: 39-48.
34. Nolte F.S. (2004). Novel internal controls for real time PCR assay. *Clin Chem.* 5: 801-802.
35. O'Mahoney M, Cowden J, Smith B, Lynch D, Hall M, Rowe B, Teare EL, Tettmar RE, Rampling AM, Coles M, Gilbert RJ, Kingcott E, Bartlett CLR. An outbreak of Salmonella Saintpaul infection associated with bean sprouts. *Epidemiology and Infection* 1990;104:229-35.
36. O'Keeffe M. Residue analysis in food. Principles and applications. 1a ed., Harwood Academic Publishers, O'Keeffe M., Amsterdam (The Netherlands), 2000.
37. Ricci A. (2005) – Aspetti microbiologici delle salmonellosi in medicina veterinaria – Trattato sulle infezioni e tossinfezioni alimentari, Rondanelli E. G., Fabbri M., Marone P. – Selecta Medica.
38. Ricci A. (2005) – Piani di sorveglianza delle salmonellosi nell'allevamento avicolo: l'attività del centro di referenza – Il controllo delle Salmonelle in campo avicolo: presente e futuro, SIPA-INTERVET – Pag: 4-6
39. Rondanelli M., Bonisio A., Giacosa A. (2005) – Infezioni da salmonelle in patologia umana – Trattato sulle infezioni e tossinfezioni alimentari, Rondanelli E. G., Fabbri M., Marone P. – Selecta Medica.
40. Ruffo G. (1998) – Enterobatteri – Trattato di malattie infettive degli animali – Farina R., Scatozza F. Editor – Selecta Medica – Pag: 283-299.

41. Santos RL, Zhang S, Tsolis RM. Animal model of Salmonella infections: enteritis versus typhoid fever. *Microb Infect* 2001;3:1335-44.
42. Slauch J, Taylor R, Maloy S. Survival in a cruel world: how *Vibrio cholera* and *Salmonella* respond to an unwilling host. *Genes Dev* 1997;11:1761-74.
43. Synnott MB, Bridley M, Gray J, Dawson JK. An outbreak of *Salmonella* Agona infection associated with precooked turkey meat. *Commun Dis Public Health* 1998;1(3):176-9.
44. Tauxe RV, Pavia AT. Salmonellosis: nontyphoidal. In: Evans AS, Brachman PS (Ed.). *Bacterial infection of humans: epidemiology and control*. New York: 3rd ed. Plenum Medical Book Co.; 1998. p.613-630.
45. The Community Summary Report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from animals and food in the European Union in 2004-2007. Scientific Report of EFSA - Published: 27 April 2010
46. The Community Summary Report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008. *EFSA Journal*; 2010 8(1):1496 [410 pp.]. doi:10.2903/j.efsa.2010.1496 European Food Safety Authority
47. Van Duynhoven Y, Widdowson MA, Jager TF. *Salmonella enterica* serotype enteritidis phage type 4b outbreak associated with bean sprouts. *Emerg Infect Dis* 2002;8(4):440-3.
48. Wallis TS, Galyov EE. Molecular basis of *Salmonella*-induced enteritis. *Mol Microb* 2000;36:997-1005.

49. Zavanella M. (2001) – Tipizzare le salmonelle – Fondazione iniziative zooprofilattiche e zootecniche, Brescia – 1:23-26; 2:27-28; 3:31-33; 4:34-37.

## NORMATIVE

1. REGOLAMENTO. (CE) N 2073/2005 DELLA COMMISSIONE del 15 Novembre 2005, sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari (Testo rilevante ai fini del SEE).
2. REGOLAMENTO (CE) N.882/2004, DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 29 aprile 2004 relativo ai controlli ufficiali intesi a verificare la conformità alla normativa in materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali
3. DIRETTIVA n. 2003/99/CE DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 17 novembre 2003 sulle misure di sorveglianza delle zoonosi e degli agenti zoonotici, recante modifica della decisione 90/424/CEE del Consiglio e che abroga la direttiva 92/117/CEE del Consiglio.
4. REGOLAMENTO N. 2160/2003 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 17 novembre 2003 sul controllo della salmonella e di altri agenti zoonotici specifici presenti negli alimenti.
5. REGOLAMENTO N. 178/2002 DEL PARLAMENTO EUROPEO E DEL CONSIGLIO del 28 gennaio 2002 che stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare.
6. LIBRO BIANCO SULLA SICUREZZA ALIMENTARE – Bruxelles, 12.1.2000 COM (1999) 719 def.



## APPENDICE A

Preparazione dei terreni utilizzati nei vari metodi.

### 1 **Acqua peptonata tamponata (BPW)**

Composizione:

Digestione enzimatica di caseina	10 g
Cloruro di sodio	5 g
Fosfato bisodico dodecaidrato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )	9 g
Fosfato diidrogeno di potassio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	1.5 g
Acqua distillata	1000 ml

Sciogliere i componenti o il terreno completo disidratato nell'acqua, se necessario mediante riscaldamento.

Regolare il pH con NaOH o HCl, se necessario, in modo tale che dopo la sterilizzazione sia uguale  $7.0 \pm 0.2$  a  $25\text{ }^\circ\text{C}$ .

Distribuire il terreno in contenitori di adeguata capacità.

Sterilizzare in autoclave a  $121\text{ }^\circ\text{C} \pm 1\text{ }^\circ\text{C}$  per 15 minuti.

Normalmente il laboratorio utilizza il terreno già pronto in forma liquida o disidratata presente in commercio, seguire le istruzioni indicate dal produttore.

### 2 **Rappaport Vassiliadis con soia (brodo RVS)**

Composizione:

Digestione enzimatica di soia	4.5 g
Cloruro di sodio	7.2 g
Fosfato diidrogeno di potassio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	1.26 g

Fosfato idrogeno bipotassio (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	0.18 g
Magnesio cloruro (anidro)	13.58 g
Verde di malachite	0.036 g
Acqua distillata	1000 ml

Sciogliere il terreno completo disidratato nell'acqua, riscaldando delicatamente a bagnomaria se necessario.

Regolare il pH con NaOH o HCl, se necessario, in modo tale che dopo la sterilizzazione sia uguale  $5.2 \pm 0.2$  a 25 °C.

Distribuire 10 ml in provette con tappo a vite di adeguata capacità.

Sterilizzare in autoclave a  $115 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$  per 15 minuti.

Il laboratorio normalmente utilizza il terreno già pronto in forma disidratata presente in commercio, seguire le istruzioni indicate dal produttore.

### **3 Brodo di Muller-Kauffmann al tetrionato-novobiocina (brodo MKTTn)**

#### 3.1 Base

Composizione:

Estratto di carne	4.3 g
Digestione enzimatica di caseina	8.6 g
Cloruro di sodio (NaCl)	2.6 g
Carbonato di calcio (CaCO <sub>3</sub> )	38.7 g
Tiosolfato di sodio pentaidrato	47.8 g

Bile di bue per batteriologia	4.78 g
Verde brillante	9.6 mg
Acqua distillata sterile	1000 ml

Sciogliere il terreno completo disidratato nell'acqua mediante ebollizione per 5 minuti.

Regolare il pH, se necessario in modo tale che sia  $8.0 \pm 0.2$  a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Mescolare con cura il terreno.

Il terreno di base può essere conservato per 4 settimane a  $3\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.2 Soluzione iodio-ioduro

Composizione:

Iodio	20 g
Ioduro di potassio (KI)	25 g
Acqua distillata	100 ml

Sciogliere completamente lo ioduro di potassio in 10 ml di acqua, quindi aggiungere lo iodio e diluire fino a 100 ml con acqua sterile. Non riscaldare.

Conservare la soluzione preparata al buio a temperatura ambiente in un contenitore chiuso ermeticamente.

### 3.3 Soluzione di novobiocina

Composizione:

Sale sodico di novobiocina	0.04 g
Acqua distillata	5 ml

Sciogliere il sale sodico di novobiocina in acqua e sterilizzare mediante filtrazione.

Conservare fino a 4 settimane a  $3\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

### 3.4 Terreno completo

Composizione:

terreno di base (3.1)	1000 ml
Soluzione iodio-ioduro (3.2)	20 ml
Soluzione di novobiocina (3.3)	5 ml

Aggiungere in condizioni sterili 5 ml della soluzione di novobiocina (3.3) a 1000 ml di terreno di base (3.1). Mescolare, quindi aggiungere 20 ml della soluzione iodio ioduro (3.2). Mescolare bene.

Distribuire 10 ml di terreno in condizioni sterili in provette sterili con tappo a vite di capacità adeguata.

Il terreno completo deve essere utilizzato lo stesso giorno della sua preparazione.

Il laboratorio normalmente utilizza il terreno in forma disidratata presente in commercio, seguire le istruzioni indicate dal produttore.

## 4 Agar XLD (Xilosio Lisina Desossicolato)

Composizione:

Estratto di lievito in polvere	3 g
Cloruro di sodio (NaCl)	5 g
Xilosio	3.75 g
Lattosio	7.5 g

Saccarosio	7.5 g
Cloruro monoidrato di L-Lisina	5 g
Tiosolfato di sodio	6.8 g
Citrato di ferro (III) ammoniacale	0.8 g
Rosso fenolo	0.08 g
Sodio desossicolato	1 g
Agar	da 9 g a 18 g1)
Acqua distillata	1000 ml

1) Secondo il potere gelificante dell'agar.

Sciogliere i componenti di base disidratati o il terreno completo di base disidratato nell'acqua, mediante riscaldamento, con frequente agitazione, fino a inizio ebollizione del terreno. Evitare il surriscaldamento.

Aggiustare il pH con NaOH o HCl, se necessario, in modo tale che dopo la sterilizzazione sia uguale a  $7.4 \pm 0.2$  a 25 °C.

Riscaldare con frequente agitazione fino all'ebollizione del terreno e allo scioglimento dell'agar. Non surriscaldare.

Trasferire immediatamente nel bagno d'acqua da 44 °C a 47 °C, agitare e versare nelle piastre e lasciare solidificare.

Immediatamente prima dell'uso essiccare accuratamente le piastre di agar sotto cappa a flusso laminare.

Conservare le piastre fino a 5 giorni a  $3 \text{ °C} \pm 2 \text{ °C}$  .

Il laboratorio normalmente utilizza il terreno pronto presente in commercio.

## 5 Agar BGA (Brillant Green Agar)

Composizione:

Estratto di carne	5 g
Peptone batteriologico	10 g
Estratto di lievito	3 g
Sodio fosfato monoacido	1 g
Sodio fosfato biacido	0.6 g
Lattosio	10 g
Saccarosio	10 g
Rosso fenolo	0.09 g
Verde brillante	0.0047 g
Ferro ammonio citrato	0.020 g
Agar n°1	12 g
Acqua distillata	1000 ml

Sciogliere i componenti in bagno bollente, non sterilizzare, raffreddare e dispensare da 10 ml a 12 ml in piastre petri sterili di diametro 90 mm.

PH finale =  $6.9 \pm 0.2$  a 25 °C (misurare il pH con il piaccametro ed eventualmente correggerlo con soluzioni di NaOH o HCl).

Il laboratorio normalmente utilizza il terreno pronto in forma disidratata presente in commercio, seguire le istruzioni indicate dal produttore.

## 6 Agar nutritivo

Composizione:

Estratto di carne	3 g
Peptone	5 g
Agar	da 9 a 18 g 1)
Acqua distillata	1000 ml

1) Secondo il potere gelificante dell'agar.

Sciogliere i componenti o il terreno disidratato nell'acqua, se necessario mediante riscaldamento.

Regolare il pH con NaOH o HCl, se necessario, in modo tale che dopo la sterilizzazione sia uguale a  $7.0 \pm 0.2$  a 25 °C.

Distribuire il terreno di coltura in bottiglie di capacità adeguata.

Sterilizzare a  $121 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$  per 15 minuti.

Trasferire circa 15 ml del terreno fuso in piastre Petri sterili e lasciare solidificare.

Immediatamente prima dell'uso essiccare accuratamente le piastre di agar sotto cappa a flusso laminare.

Il laboratorio normalmente utilizza il terreno pronto in forma disidratata presente in commercio, seguire le istruzioni indicate dal produttore.

## **7 Agar TSI (Agar addizionato con tre zuccheri e ferro)**

Composizione:

Estratto di carne	3 g
Estratto di lievito	3 g
Peptone	20 g

Cloruro di sodio (NaCl)	5 g
Lattosio	10 g
Saccarosio	10 g
Glucosio	1 g
Citrato di ferro (III)	0.3 g
Tiosolfato di sodio	0.3 g
Rosso fenolo	0.024 g
Agar	da 9 a 18 g 1)
Acqua distillata	1000 ml

1) Secondo il potere gelificante dell'agar.

2)

Sciogliere i componenti o il terreno disidratato nell'acqua, se necessario mediante riscaldamento.

Regolare il pH con NaOH o HCl, se necessario, in modo tale che dopo la sterilizzazione sia uguale a  $7.4 \pm 0.2$  a 25 °C.

Distribuire il terreno in quantità di 10 ml nelle provette di prova.

Sterilizzare in autoclave a  $121 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$  per 15 minuti.

Lasciare sedimentare in posizione inclinata per produrre un fondo dello spessore da 2.5 cm a 5 cm.

Il laboratorio normalmente utilizza il terreno pronto in forma disidratata presente in commercio, seguire le istruzioni indicate dal produttore.

## **8 Kit miniaturizzati presente in commercio api20 E o RapiD 20 E e suoi reagenti (bioMérieux).**

Vengono utilizzati questi kit per le prove che utilizzano i seguenti reagenti e terreni descritti nella norma ISO 6579:2002:

- Agar addizionato con urea;
- Terreno per la decarbossilazione della L-Lisina;
- Reagente per la produzione della  $\beta$ -galattosidasi;
- Reagenti per la reazione Voges-Proskauer;
- Reagenti per la produzione dell'indolo.

## **9 Soluzione salina fisiologica**

Cloruro di sodio (NaCl) 8.5 g

Acqua distillata 1000 ml

Sciogliere il cloruro di sodio nell'acqua.

Regolare il pH con NaOH o HCl, se necessario, in modo tale che dopo la sterilizzazione sia uguale a  $7.0 \pm 0.2$  a 25 °C.

Distribuire la soluzione in contenitori di adeguata capacità e sterilizzare in autoclave a  $121 \text{ °C} \pm 1 \text{ °C}$  per 15 minuti.

**10** NaOH 1M;

**11** HCl 1 M.

## **12 Brodo SX2 (SX2-T)**

Composizione:

Peptone di caseina o di carne (bovina o suina) 15g

Sistema tampone 20g

Miscela di Sali 20g

Estratto di lievito	5g
Glucosio	0.5g
Agenti selettivi	0.25g
Acqua purificata	1000ml

pH 6.6

il laboratorio utilizza il terreno già pronto in provette da 10ml presente in commercio.



## **Ringraziamenti**

Desidero ringraziare tutte le persone che mi sono state vicine durante la stesura della tesi. In particolar modo desidero ringraziare i miei genitori, per avermi dato la possibilità di intraprendere la carriera universitaria. Un grandissimo ringraziamento va a mia sorella Erika e a mio fratello Marco, per essermi stati sempre vicini in questi due anni e per avermi aiutato nei momenti di difficoltà. Ringrazio la Prof.ssa Piccirillo per avermi accolto come tesista e la Dott.ssa Mondin per avermi indirizzato sempre verso la strada giusta da intraprendere. Ringrazio inoltre la Prof.ssa Menandro per avermi motivato ad iscrivermi a questo corso di laurea. Un ringraziamento a Dino, per l'aiuto nella stesura della tesi e per l'enorme pazienza dimostratami. Un ringraziamento particolare va alle mie colleghe di lavoro, che con la loro disponibilità mi hanno permesso di finire gli studi. Infine desidero ringraziare tutti gli amici d'infanzia e i ragazzi conosciuti in questi anni di università.



# Indice

1. Premessa e Scopo	Pag. 1
2. Introduzione	Pag.5
2.1 Il Microrganismo	Pag. 5
2.1.1 <i>Classificazione secondo Kauffmann-white</i>	Pag. 6
2.1.2 <i>Classificazione secondo Le Minor</i>	Pag. 7
2.2 Infezione nel Mondo	Pag. 10
2.3 Infezione nell'Uomo	Pag. 14
2.3.1 <i>Epidemiologia delle infezioni da Salmonella</i>	Pag. 14
2.3.2 <i>Manifestazioni cliniche</i>	Pag. 16
2.3.3 <i>Gastroenteriti</i>	Pag. 16
2.3.4 <i>Infezioni extraintestinali</i>	Pag. 18
2.4 Infezione negli Animali	Pag. 19
2.4.1 <i>Serbatoi animali</i>	Pag. 19
2.4.2 <i>Vie di trasmissione</i>	Pag. 20
2.4.3 <i>Manifestazioni cliniche</i>	Pag. 20
2.5 Alimenti	Pag. 22
2.5.1 <i>Alimenti e derivati di origine animale</i>	Pag. 22
2.5.2 <i>Altri alimenti</i>	Pag. 24
2.6 Ambiente	Pag. 25
2.7 Identificazione della <i>Salmonella</i> spp.	Pag. 26
2.7.1 <i>Metodo classico</i>	Pag. 27
2.7.2 <i>Metodo immunoenzimatico</i>	Pag. 29
2.7.3 <i>Metodo molecolare real time PCR</i>	Pag. 31
3. Materiali e Metodi	Pag. 35
3.1 Campioni	Pag. 35
3.2 Metodo Classico	Pag. 37
3.2.1 <i>Preparazione del campione</i>	Pag. 37
3.2.2 <i>Isolamento ed identificazione</i>	Pag. 38

3.2.3 <i>Prove di conferma</i>	Pag. 38
3.3 Metodo ELFA	Pag. 40
3.3.1 <i>Pre-arricchimento</i>	Pag. 42
3.3.2 <i>Arricchimento</i>	Pag. 42
3.3.3 <i>Conferma dei risultati</i>	Pag. 42
3.4 Metodo Molecolare	Pag. 42
3.4.1 <i>Estrazione del DNA</i>	Pag. 43
3.4.2 <i>Amplificazione del DNA</i>	Pag. 43
3.4.3 <i>Conferma dei risultati</i>	Pag. 45
3.5 Metodo Molecolare Alternativo	Pag. 45
3.6 Analisi dei Dati	Pag. 45
4. Risultati	Pag. 47
4.1 Metodo Classico	Pag. 47
4.2 Metodo Immunoenzimatico	Pag. 48
4.3 Metodo Molecolare	Pag. 49
4.4 Metodo Molecolare Alternativo	Pag. 50
5. Discussione e Conclusione	Pag. 57
6. Bibliografia	Pag. 59
Appendice A	Pag. 67