

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

Dipartimento di Biomedicina Comparata ed Alimentazione

Corso di laurea magistrale in Biotecnologie per l'Alimentazione

TESI DI LAUREA

**Ricerca qualitativa di *Salmonella spp* e *Listeria monocytogenes*:
validazione del metodo alternativo di ricerca rapida in PCR Real-Time in
prodotti carnei ready-to-eat.**

Relatore:

Prof.ssa Barbara Cardazzo

Correlatore:

Dott.ssa Elisa Testa

Laureando:

Lorenzo Sastrucci

Matricola n. 2054450

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

Indice

ABSTRACT.....	6
1. INTRODUZIONE	8
1.1. Contestualizzazione del problema delle contaminazioni microbiche negli alimenti.....	8
1.1.1 Caratteristiche ecologiche e vie di contaminazione dei principali Foodborne Pathogenes	15
1.2. Importanza della rilevazione tempestiva e accurata delle contaminazioni microbiche	18
1.2.1. Metodi basati sulle colture batteriche/Microbiologia classica.....	18
1.2.2. Saggi immunologici	20
1.2.3. Metodi basati sulla reazione a catena della polimerasi	20
1.3. Importanza del limite di rilevazione (LOD) nella ricerca qualitativa di patogeni alimentari.....	25
1.4. Caratteristiche e patogenicità di <i>Salmonella spp</i> e <i>Listeria monocytogenes</i> ...	27
1.4.1. <i>Salmonella spp</i>	27
1.4.2. <i>Listeria monocytogenes</i>	35
2. SCOPO E CONTESTO.....	47
3. MATERIALI E METODI	49
3.1. Materiali.....	49
3.1.1. Selezione delle matrici	49
3.1.2. Selezione dei ceppi di prova utilizzati	50
3.1.3. Materiali e attrezzature.....	50

3.1.4. Terreni colturali utilizzati.....	51
3.2. Protocolli analitici utilizzati.....	52
3.2.1. Protocollo per la determinazione del LOD ₅₀ stimato (eLOD ₅₀)	52
3.2.2. Protocollo per la Ricerca qualitativa di <i>Salmonella spp</i> e <i>Listeria monocytogenes</i> in PCR Real-Time con metodo interno sviluppato dall'azienda.	57
3.2.3. Protocollo per la Ricerca qualitativa di <i>Salmonella spp</i>	65
3.2.4. Protocollo per la Ricerca qualitativa di <i>Listeria monocytogenes</i>	69
3.3. Analisi statistiche utilizzate	72
4. RISULTATI	73
4.1. Risultati dell'amplificazione con PCR real-time e conferma di vitalità dei campioni contaminati artificialmente	73
4.2. Determinazione dell'eLOD ₅₀	82
4.2.1. Limiti di Accettabilità.....	84
5. DISCUSSIONE	85
5.1. Interpretazione dei risultati.....	85
5.2. Considerazioni sulla sensibilità e specificità della tecnica.....	87
5.3. Confronto con altri metodi analitici.....	88
6. CONCLUSIONE	90
6.1. Riassunto dei risultati ottenuti e confronto rispetto agli obiettivi della ricerca prefissati	90
6.2. Possibili limitazioni del lavoro svolto e suggerimenti per studi futuri	91
7. BIBLIOGRAFIA.....	92

ABSTRACT

Questo lavoro, prodotto durante il tirocinio curricolare presso il laboratorio Biochimie Lab con sede in Campi Bisenzio (Firenze), si concentra sulla validazione di un metodo alternativo di ricerca qualitativa per la rilevazione di *Salmonella spp* e *Listeria monocytogenes* in prodotti carnei ready-to-eat. Questi patogeni rappresentano una significativa minaccia per la sicurezza alimentare in quanto possono causare gravi malattie nell'uomo quando consumati attraverso alimenti contaminati, specialmente per i soggetti più a rischio. Il metodo alternativo proposto si basa sulla tecnologia di amplificazione del DNA in tempo reale tramite PCR, offrendo vantaggi come tempi di esecuzione più rapidi e risultati immediati rispetto ai tradizionali metodi di coltura batterica. Una risposta rapida e accurata soddisfa l'esigenza di una diagnosi tempestiva per i prodotti con shelf-life relativamente breve, come i prodotti carnei ready-to-eat, contribuendo così a garantire la sicurezza alimentare.

La validazione del metodo è stata condotta secondo la Norma UNI EN ISO 16140-3:2021 e si è resa necessaria, giacché, secondo la norma, qualsiasi nuovo metodo introdotto successivamente alla sua pubblicazione deve essere verificato conformemente alla ISO 16140-3 prima dell'implementazione. Sono stati analizzati tramite il metodo alternativo una serie di campioni di prodotti carnei ready-to-eat pronti per la distribuzione, artificialmente inquinati con i patogeni oggetto di ricerca. L'assenza di *Salmonella spp* e *Listeria monocytogenes* è stata precedentemente comprovata attraverso metodi convenzionali (UNI EN ISO 6579-1:2017 e UNI EN ISO 11290-1:2017). Il Limite di Rilevazione 50% stimato ($eLOD_{50}$) ottenuto con il metodo alternativo è stato confrontato con quello ottenuto dal metodo attualmente impiegato dal laboratorio.

In conclusione, i risultati della validazione hanno dimostrato che il metodo alternativo di ricerca rapida in PCR Real Time è un valido strumento per la rilevazione di *Salmonella spp* e *Listeria monocytogenes* nei prodotti carnei ready-to-eat e che il metodo è stato correttamente verificato dal laboratorio, accertando che il laboratorio è in grado di poterlo applicare in maniera soddisfacente sulla matrice verificata.

1. INTRODUZIONE

1.1. Contestualizzazione del problema delle contaminazioni microbiche negli alimenti

Secondo l'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS), le “Foodborne Diseases” sono definite come malattie di natura infettiva o tossica causate dal consumo di alimenti, principalmente di origine animale, e acqua contaminati. Batteri (66%), sostanze chimiche (26%), virus (4%) e parassiti (4%) sono i principali agenti delle Foodborne Diseases (Desta Sisay, 2015).

Quando la causa principale di malattia veicolata da alimenti è un microrganismo, questo viene definito come “Foodborne Pathogene” (*Food Safety*, 2022). In particolare i batteri sono gli agenti eziologici di ben due terzi delle epidemie veicolate dagli alimenti.

Queste malattie si presentano generalmente in tre tipologie (Desta Sisay, 2015):

- a) **Infezioni**: malattia causata dall'ingestione di microrganismi patogeni oltre la dose minima infettante;
- b) **Intossicazioni**: malattia causata da una tossina prodotta da microrganismi tossigenici, che potrebbero non essere più presenti al momento dell'ingestione dell'alimento;
- c) **Tossinfezioni**: malattia causata da tossine prodotte da microrganismi patogeni che crescono contestualmente nell'intestino umano .

Circa il 60% di tutte le malattie umane ad oggi conosciute ha avuto origine animale. Di queste, circa il 75% delle malattie infettive umane emergenti è trasmesso dagli

animali vertebrati agli esseri umani attraverso il cosiddetto salto di specie (o “*spillover*”) (Bidaisee & Macpherson, 2014).

Queste malattie sono strettamente correlate alla presenza di microrganismi trasmissibili direttamente dagli animali all'uomo, noti come patogeni zoonotici. Le vie di diffusione di tali patogeni includono il contatto diretto tra esseri umani e animali, il contatto ambientale indiretto e/o il consumo di alimenti contaminati. Gli animali destinati alla produzione alimentare, come bovini, ovini, suini, pollame, rappresentano i principali serbatoi di questi patogeni (Heredia & García, 2018). Di conseguenza, i prodotti alimentari di origine animale sono i principali veicoli delle malattie trasmesse dagli alimenti (Chlebicz & Ślizewska, 2018) e il rischio di contrarre tali malattie, negli esseri umani, aumenta in relazione al consumo di alimenti di origine animale (Abebe et al., 2020).

Tra i prodotti destinati al consumo umano, carne, prodotti lattiero-caseari e uova sono le principali fonti attraverso le quali si verifica l'esposizione ai patogeni veicolati dagli alimenti. Il consumo di alimenti di origine animale è in costante aumento a causa della crescita demografica, dell'urbanizzazione, dell'aumento del reddito pro capite, della globalizzazione e dei cambiamenti nelle preferenze alimentari, che spesso includono una maggiore richiesta di proteine animali. Contestualmente a ciò è in aumento anche la domanda di prodotti animali altamente processati che, nonostante siano più lavorati, sono spesso più accessibili dal punto di vista economico perché venduti in confezioni da molti pezzi per abbattere i costi di produzione, oltre che essere oggetto di campagne di marketing molto aggressive che mirano a target specifici della popolazione. Tuttavia, poiché questi prodotti subiscono processi di trasformazione più complessi, sono soggetti a un maggior rischio di contaminazione. Entrambe queste tendenze hanno comportato un incremento dell'allevamento intensivo di animali e della lavorazione

su larga scala di prodotti alimentari (Heredia & García, 2018). Pratiche di lavorazione non adeguate possono aumentare la possibilità di contaminazione e diffusione di patogeni durante ogni fase della filiera produttiva, dall'allevamento al consumo (“*from farm to fork*”).

Staphylococcus aureus, alcune specie di *Salmonella*, alcune specie di *Campylobacter*, *Listeria monocytogenes* ed *Escherichia coli* sono solo alcuni dei principali patogeni che causano malattie, epidemie e decessi associati al consumo di prodotti alimentari contaminati. Tutto ciò comporta un impatto significativo sia sulla salute pubblica che su diversi settori economici (quali allevamento, produzione, trasformazione e distribuzione di prodotti agro-alimentari destinati al consumo umano), generando un problema su scala globale, ma che grava in particolar modo sulle nazioni in via di sviluppo (Abebe et al., 2020).

I sintomi caratterizzanti delle malattie di origine alimentare sono spesso limitati all'apparato gastrointestinale, tra cui nausea, vomito, diarrea, crampi addominali e altri sintomi variabili specifici dell'agente eziologico. Ma non è raro assistere a gravi complicazioni, come meningiti e endocarditi causate, ad esempio, dall'infezione di *Listeria monocytogenes*, soprattutto in determinate fasce della popolazione come quelle descritte dall'acronimo “YOPI” (Young, Old, Pregnant, Immunocompromised; cioè bambini, anziani, donne in gravidanza e persone immunocompromesse, come quelle affette da sindrome da immunodeficienza acquisita o da cancro o che hanno subito un trapianto d'organo) (Abebe et al., 2020).

I patogeni trovano principalmente ingresso nella filiera durante la fase di lavorazione dei prodotti a base di carne e/o nella lavorazione delle verdure. Tuttavia, è importante sottolineare che l'intera catena di produzione, compresa la manipolazione nei punti vendita al dettaglio e nei luoghi di consumo, è suscettibile a questa problematica. Una volta che un prodotto alimentare è stato contaminato e

sfugge al controllo delle autorità preposte alla sicurezza, la sua immissione nella distribuzione e il conseguente consumo umano, potrebbe innescare un'ampia diffusione dell'infezione, con il potenziale per scatenare un'epidemia di rapida propagazione (Hoagland et al., 2018).

Il Centro per il Controllo delle Malattie degli Stati Uniti (CDC) stima che uno statunitense su sei (cioè 55 milioni) contragga ogni anno almeno una malattia veicolata dagli alimenti. Nel 2017 negli Stati Uniti sono stati documentati 839 focolai legati agli alimenti, che hanno causato 14.471 casi segnalati di malattia, 822 ricoveri e 21 decessi (*National Outbreak Reporting System (NORS) | CDC, 2022*). Anche se il numero maggiore di malattie veicolate dagli alimenti è registrato in Asia e Africa (Fegan and Jenson, 2018), *Norovirus*, *Salmonella spp*, *Campylobacter spp*, *Bacillus spp*, *Listeria monocytogenes* ed *Escherichia coli* patogeni sono i principali Foodborne Pathogenes che causano malattie, focolai, ricoveri e decessi (Thakali & MacRae, 2021) in tutto il mondo.

Per quanto riguarda l'Europa, l'EFSA ha riportato (**Tabella 1**) 127.840 casi di infezione da *Campylobacter* in tutto il territorio europeo (di cui 1542 casi in Italia), 60.050 casi di Salmonellosi (3768 in Italia), 2.183 casi di Listeriosi (241 in Italia). Sulla base dei dati di ospedalizzazione e letalità, la listeriosi e l'infezione da *West Nile Virus* sono risultate le due malattie più gravi: quasi tutti i casi confermati con dati disponibili sull'ospedalizzazione per queste due malattie sono stati ricoverati (96,5% dei casi di listeriosi e 84,3% dei casi di infezione da *West Nile Virus*, rispettivamente). Il numero più elevato di decessi è stato associato alla listeriosi (196 decessi, pari al 13,7% dei casi), seguita dalla salmonellosi (71 decessi, pari allo 0,18% dei casi).

Tabella 1: Casi confermati notificati, ospedalizzazioni, decessi e focolai per le principali zoonosi segnalate in Europa nel 2021 – Fonte: EFSA/ECDC: EFSA and ECDC, 2022. The European Union One Health 2021 Zoonoses Report (*Rapporto One-Health Sulle Zoonosi Nell'Unione Europea, 2021*) [continua a pagina seguente]

Disease	Surveillance data on human cases (source: European Centre of Disease Control)									Foodborne outbreaks (source: EFSA)					
	Confirmed human cases	Hospitalisation			Outcome available		Deaths			Outbreaks	Cases	Hospitalisations and proportion of hospitalised cases		Deaths and case fatality	
		Reporting MSs ⁽¹⁾	Cases and proportion of hospitalised cases		N	%	Reporting MSs ⁽¹⁾	Deaths and case fatality				N	%	N	%
N	N	N	%	N	%	N	N	%	N	N	N	%	N	%	
Campylobacteriosis	127,840	15	10,469	23.2	91,177	71.3	16	26	0.03	249	1,051	134	12.7	6	0.6
Salmonellosis	60,050	16	11,785	38.1	38,658	64.4	16	71	0.18	773	6,755	1,123	16.6	1	0.1
Yersiniosis	6,789	13	508	32.5	3,596	53.0	21	0	0	21	125	14	11.2	0	0
STEC infections	6,084	17	901	42.2	4,366	71.8	20	18	0.41	31	275	47	13.5	0	0
Listeriosis	2,183	16	923	96.5	1,427	65.4	14	196	13.7	23	104	48	46.2	12	11.5
Tularaemia	876	10	112	50.7	341	38.9	11	2	0.59	0	0	0	–	0	–
Echinococcosis	529	13	51	42.1	270	51.0	16	0	0	0	0	0	–	0	–
Q fever	460	NA	NA	NA	270	58.7	11	4	1.5	0	0	0	–	0	–

Disease	Surveillance data on human cases (source: European Centre of Disease Control)									Foodborne outbreaks (source: EFSA)						
	Confirmed human cases	Hospitalisation			Deaths						Outbreaks	Cases	Hospitalisations and proportion of hospitalised cases		Deaths and case fatality	
		Reporting MSs ⁽¹⁾	Cases and proportion of hospitalised cases		Outcome available		Reporting MSs ⁽¹⁾	Deaths and case fatality		N			N	N	%	N
	N	N	%	N	%	N	N	%	N		N	N				
Brucellosis	162	10	36	60.0	59	36.4	11	0	0	1	2	2	100	0	–	
West Nile virus infection	152	6	70	84.3	152	100	8	11	7.2	NA	NA	NA	NA	NA	NA	

⁽¹⁾ MS: Stato membro; ⁽²⁾ STEC: *Escherichia coli* produttore di tossina Shiga; ⁽³⁾ NA: Non applicabile poiché non sono state raccolte informazioni per questa malattia.

Attualmente l'incremento di batteri zoonotici in possesso di geni di resistenza ad antibiotici, definiti "batteri multidrug-resistents", è motivo di grande preoccupazione per la salute pubblica. Gli antibiotici vengono utilizzati in agricoltura sia per il trattamento che la prevenzione delle malattie, ma è ben noto anche l'uso per scopi non medicinali, ad esempio come ottimizzatori dell'efficienza alimentare dell'animale e promotori della crescita (Bengtsson-Palme, 2017). In Europa e negli Stati Uniti vengono utilizzati più antibiotici nel settore della produzione animale rispetto al settore della salute umana (Caniça et al., 2019) ed esistono quindi delle associazioni tra l'uso di antibiotici nella produzione agricola e la resistenza ai biocidi nei patogeni umani (Verraes et al., 2013). L'uso regolare di antibiotici in animali da allevamento in ambienti densamente affollati esercita infatti una forte pressione selettiva a favore di batteri resistenti, portando alla selezione di ceppi resistenti (Koch et al., 2017).

La contaminazione alimentare, di origine microbiologica e/o chimica, rappresenta una crescente preoccupazione sia per i consumatori che per le autorità sanitarie. È di interesse comune investire costantemente in ricerca allo scopo di sviluppare metodi e protocolli per prevenire la possibile introduzione di contaminanti nella filiera alimentare e per identificare rapidamente le sorgenti e gli agenti responsabili della contaminazione. In particolare, un notevole impegno è rivolto allo sviluppo di strategie analitiche per il rilevamento e l'identificazione di tali contaminanti.

1.1.1 Caratteristiche ecologiche e vie di contaminazione dei principali Foodborne Pathogenes

I patogeni possono entrare in contatto con gli alimenti durante tutte le fasi della filiera. Tra le fonti coinvolte nei processi di contaminazione alimentare si possono evidenziare le seguenti (Thakali & MacRae, 2021):

- a) Contaminazione nelle fasi di raccolta/allevamento;
- b) Contaminazione esterna degli alimenti crudi dovuta a contaminazione ambientale;
- c) Trasporto delle materie prime allo stabilimento di lavorazione;
- d) Condizionamento degli alimenti, che comporta lo stoccaggio delle materie prime, il preriscaldamento, la disinfezione, la pulizia e le fasi di sterilizzazione;
- e) Fasi successive al trattamento termico (nel caso di alimenti precotti);
- f) Confezionamento degli alimenti;
- g) Trasporto degli alimenti confezionati;
- h) Stoccaggio e distribuzione degli alimenti confezionati.

Nelle aziende agricole si possono identificare diverse fonti di contaminazione da parte di patogeni per i prodotti freschi. Il movimento del bestiame e delle persone, l'uso di acqua di irrigazione contaminata, la presenza di terreno contaminato, l'utilizzo di compost e letame sono potenziali fonti di contaminazione (Ceuppens et al., 2014).

Le fasi di lavorazione sono più suscettibili alla contaminazione da patogeni rispetto a quelle di produzione. Campioni ambientali (suolo, feci, acqua), superfici a contatto con gli alimenti (nastro trasportatore, coltelli, utensili, ecc.) e superfici non a contatto con gli alimenti (pareti, scarichi, pavimenti, ecc.) scarsamente sanificate, mani dei lavoratori non sanificate, rimorchi e casse per il trasporto sono solo alcune

delle fonti di contaminazione più probabili. L'elevata contaminazione negli impianti di lavorazione della carne (probabilmente dovuta alla contaminazione crociata da carcasse di animali) e nelle sale di taglio e confezionamento può essere dovuta a una progettazione non igienica delle attrezzature di dissanguamento, spiumatura ed eviscerazione. La contaminazione crociata con patogeni di origine alimentare può verificarsi durante il trasporto o mentre gli animali attendono in stalla prima della macellazione (Barros et al., 2007). I punti che hanno mostrato i più alti livelli di contaminazione negli esercizi di vendita al dettaglio di carne, in ordine decrescente, sono: i box in acciaio inox, i tritadori, i coltelli, le impastatrici, le insacatrici per salsicce, i box in plastica e, nel macello, le attrezzature per la produzione degli insaccati, le piattaforme, i pavimenti e gli scarichi. I prodotti più contaminati sono generalmente quelli più lavorati, come la carne macinata (materia prima) e le salsicce fresche (prodotto finito), a indicare che le procedure di sicurezza alimentare devono essere applicate all'intera catena di produzione della carne, dal produttore al consumatore (Barros et al., 2007).

Per quanto riguarda i prodotti carnei si possono identificare tre fonti principali di batteri che causano malattie di origine alimentare:

- a) L'animale vivo, importante fonte di batteri sia zoonotici che non;
- b) L'ambiente di lavorazione, che può ospitare molti microrganismi se non adeguatamente sanificato;
- c) L'operatore umano, possibile portatore di batteri patogeni a causa di contaminazione crociata.

Gli animali vivi possono fungere da veicolo per i batteri presenti nel loro tratto intestinale. Durante la fase di macellazione, questi batteri possono contaminare la carcassa dell'animale e, in seguito, essere diffusi ai prodotti a base di carne, sia attraverso la carne tagliata che attraverso le superfici di lavorazione. La materia

fecale è una delle principali fonti di contaminazione e può raggiungere le carcasse sia per deposizione diretta sia per contatto indiretto attraverso attrezzature, lavoratori, impianti e aria (Borch & Arinder, 2002). Un'altra possibile via di contaminazione batterica è la "ricontaminazione", definita come la contaminazione di cibo dopo che questo è stato sottoposto a un processo di inattivazione microbiologica (es. trattamento termico) (Larsen et al., 2014).

Secondo il Regolamento n. 2073/2005 della Comunità Europea (CE 2073/2005, 2005), nella sezione riguardante le carcasse subito dopo la macellazione e i prodotti a base di carne, sono stati definiti parametri microbiologici di microrganismi mesofili definiti come "indicatori", i quali sono strettamente correlati al grado di sicurezza e qualità igienica del processo. La conta batterica totale (CBT) è un parametro legato alla qualità igienica del processo e allo stato di conservazione del prodotto; valori non accettabili (es. un valore di CBT medio giornaliero superiore a 5,0 log UFC/g) indicano che la carne è stata probabilmente lavorata in macello a una temperatura superiore (>0-4°C) a quella di quiescenza della maggior parte dei mesofili. Per quanto riguarda invece la conta dei coliformi totali (CT) e la conta degli *Escherichia coli* (EC), si fa riferimento a questioni igieniche legate a possibili contaminazioni di origine fecale e/o a contaminazioni crociate da parte dell'uomo. Dato che questi batteri hanno un'origine enterica, elevate quantità di CT ed EC sono comunemente associate a livelli rilevanti di patogeni intestinali (Jay et al., 2005). La normativa prescrive, come misure correttive, il miglioramento delle condizioni igieniche durante la macellazione e una revisione delle procedure di controllo del processo.

Pertanto, al fine di ridurre la contaminazione e la crescita microbica, è obbligatorio integrare nel settore della lavorazione della carne programmi di controllo della qualità, buone pratiche di produzione (GMP) e igiene (GHP), l'analisi dei rischi e dei

punti critici di controllo (HACCP), la valutazione del rischio microbiologico e la gestione della qualità (Borch & Arinder, 2002).

1.2. Importanza della rilevazione tempestiva e accurata delle contaminazioni microbiche

Alla luce di quanto detto nel capitolo precedente emerge l'importanza di contenere i patogeni ed è estremamente cruciale essere in grado di rilevare tali microrganismi nella maniera più tempestiva e precisa possibile. Pertanto, l'obiettivo prioritario dell'intera comunità scientifica è perfezionare continuamente i metodi di rilevazione che si configurano come un elemento fondamentale per identificare e monitorare il patogeno prima che possa sfociare in un'epidemia di difficile contenimento. Inizialmente la rilevazione e la diagnostica si sono basate sui metodi culturali (ancora in uso e tutt'altro che obsoleti), i primi metodi disponibili. Più recentemente in parallelo sono stati sviluppati metodi immunologici, come ad esempio gli "*enzyme-linked-immunosorbent-assays*" (anche conosciuti come "ELISA"), e metodi basati sulla biologia molecolare come la reazione a catena della polimerasi (PCR). Nel processo di sviluppo di un nuovo metodo, è fondamentale definire obiettivi che comprendano la rapidità, la sensibilità, la specificità e, allo stesso tempo, la sostenibilità dal punto di vista economico. I metodi di rilevazione sono stati classificati in diverse categorie in base ai loro principi, vantaggi e svantaggi.

1.2.1. Metodi basati sulle colture batteriche/Microbiologia classica

I metodi basati sulle colture batteriche sono stati i primi utilizzati per individuare tutti i microrganismi conosciuti, compresi specie e ceppi patogeni. Questi metodi forniscono informazioni sulla presenza di un particolare agente microbiologico. Questi metodi offrono un tasso di successo elevato (sebbene in parte operatore-dipendente) e sono in assoluto quelli più economicamente vantaggiosi. Tuttavia, il

principale inconveniente è dato dalla loro lentezza di esecuzione: va notificato che la gran parte dei metodi colturali richiede in linea di massima almeno 24-48 ore per fornire un risultato esatto. Quando si ha che fare con alimenti con una shelf life ridotta o ridottissima o, se è necessario, avere risultati in tempi estremamente rapidi, la lentezza di queste metodiche può essere problematica. I metodi colturali comprendono l'arricchimento in terreni selettivi (se previsto), la successiva semina su piastre di agar e vari test per l'identificazione della specie (Lee et al., 2015). Tuttavia, i metodi colturali costituiscono l'unico approccio in grado di determinare se il microrganismo presente all'interno dell'alimento sia effettivamente vitale, e quindi pericoloso in termini di sicurezza alimentare per il consumatore. Questo è particolarmente rilevante quando, trattando alimenti originati da matrici che fin dalle fasi iniziali di produzione sono quasi sicuramente ricche di contaminanti microbiologici, non è possibile escludere la presenza dei microrganismi, siano essi patogeni o meno, sebbene poi vengano poste in essere tutte le GMP atte a limitare la contaminazione microbiologica nel prodotto finito. Spesso i trattamenti termici e/o altre lavorazioni a freddo (ad esempio salatura, aggiunta di microrganismi competitors nel ruolo di starters, affumicatura, ecc.) comportano l'inattivazione del patogeno, che pertanto non mina la sicurezza del prodotto, ma che resta rilevabile alle tecniche molecolari perché il genoma del patogeno è presente nell'alimento, anche se in quantità limitate.

Per le ragioni sopra menzionate, i metodi colturali (sia classici, che rapidi) restano l'unico standard per accertare la reale pericolosità di un alimento in cui si rilevi la presenza di microrganismi patogeni.

1.2.2. Saggi immunologici

I test immunologici sono stati sviluppati perché sono più facili da eseguire e danno risultati più rapidi. Purezza e specificità degli anticorpi utilizzati giocano un ruolo importante nel successo dei test immunologici (Priyanka et al., 2016). Il saggio ELISA e il test di agglutinazione al lattice sono fra quelli più utilizzati. In particolare il test di agglutinazione al lattice o “latex test” (Mcgowan & Rubenstein, 1989), è una tecnica utilizzata in microbiologia per la conferma di determinati ceppi di microrganismi di interesse, tramite l'identificazione di antigeni specifici espressi dal campione biologico. La procedura coinvolge l'uso di particelle di lattice ricoperte da anticorpi specifici per l'antigene di interesse. Se il campione contiene il microrganismo che esprime l'antigene corrispondente avviene l'agglutinazione, con la conseguente formazione di aggregati visibili a occhio nudo (test positivo). Se il campione non contiene l'antigene specifico, le particelle di lattice rimangono separate e non si formeranno aggregati (test negativo). In contesto di sicurezza alimentare questo test è ampiamente utilizzato per confermare la sospetta presenza di patogeni: ad esempio, per quanto riguarda una colonia sospetta di *Salmonella spp.*, è sufficiente far reagire parte della colonia proveniente dalla coltura in piastra con la soluzione contenente le particelle di lattice legate ad antigeni flagellari e della superficie batterica. In questo modo è possibile, dopo pochi minuti, discriminare la presenza/assenza di *Salmonella spp* in base all'avvenuta/non avvenuta agglutinazione.

1.2.3. Metodi basati sulla reazione a catena della polimerasi

1.2.3.1. Reazione a Catena della Polimerasi

La Reazione a Catena della Polimerasi, detta anche PCR (acronimo di Polymerase Chain Reaction), ideata da Kary Mullis nel 1985, ha segnato un punto di svolta

nell'analisi del DNA, rivoluzionando l'intero settore della genetica molecolare rendendo possibile un tipo di approccio del tutto nuovo per lo studio e l'analisi dei geni. La tecnica, estremamente specifica e sensibile, permette la sintesi enzimatica in vitro di segmenti di DNA a partire da DNA stampo aumentando esponenzialmente il numero di molecole target di partenza (Mullis et al., 1986). Si tratta di una reazione di tipo ciclico, che può essere sostenuta un numero variabile di volte direttamente proporzionale alla quantità di amplificato target ottenuto. Per ogni gene è necessario lo sviluppo di coppie di primer specifici mentre per l'identificazione degli ampliconi (i prodotti della PCR) si utilizza la successiva colorazione con coloranti intercalanti al DNA. Alla quale segue l'elettroforesi su gel di agarosio.

In generale, i principali vantaggi della PCR sono la rapidità e la sensibilità del processo, essendo più veloce dei metodi basati sulle colture batteriche e dei test immunologici. Da quando è stata scoperta, la tecnica è stata ampiamente migliorata: attualmente il prodotto amplificato può essere ottenuto in soli 30 minuti e la distinzione tra ceppi è diventata molto più semplice grazie all'utilizzo di multiple coppie di primer.

1.2.3.2. PCR Real Time

La PCR Real-Time (o RT-PCR) rappresenta un metodo alternativo alla tradizionale PCR End-Point. In questo processo, la quantità di prodotto generato è costantemente monitorata durante l'intero ciclo di reazione, attraverso la misurazione istante per istante dell'intensità di fluorescenza emessa da specifici fluorofori impiegati come reporter, che emettono luce visibile solo quando si legano all'amplicone della sequenza bersaglio. Le variazioni nella fluorescenza emessa, misurate dopo ogni ciclo, riflettono direttamente la quantità di amplicone formata

ad ogni ciclo di reazione, ciò consente una rilevazione in tempo reale delle molecole di DNA target presenti all'inizio della reazione (Heid et al., 1996).

Nei primi cicli di reazione il prodotto amplificato è a bassa concentrazione e la fluorescenza data dai fluorofori impiegati viene difficilmente distinta dal rumore di fondo, noto come "*background*" o "*baseline*". Il numero di cicli necessari per raggiungere un'intensità di fluorescenza che supera la baseline è definito come ciclo soglia o "*threshold cycle*" (abbreviato in Ct o Cq). Oltre questo ciclo di reazione il segnale emesso diventa significativo e indica l'inizio dell'accumulo di amplificato. Il valore Ct tende a essere più alto quanto minore è la quantità di target iniziale presente nel campione. A mano a mano che la reazione prosegue, il prodotto di amplificazione inizia ad aumentare rapidamente restituendo un segnale di fluorescenza che cresce in maniera esponenziale (fase esponenziale), per poi saturarsi (fase di plateau), seguendo una cinetica analoga a quella della PCR tradizionale (Heid et al., 1996).

Dal momento in cui i processi di amplificazione e rilevazione sono simultanei, la Real-Time PCR offre notevoli vantaggi in termini di tempo e riduzione degli errori operativi, garantendo, in singleplex, una sensibilità non inferiore alla PCR tradizionale. L'utilizzo di un sistema chiuso minimizza il rischio di contaminazione, sia durante che dopo l'amplificazione.

Sebbene il segnale rilevato sia proporzionale alla quantità di amplificato che via via si produce durante la reazione, la quantificazione in RT-PCR non è mai precisa, perché non si tratta di una quantificazione diretta e dipende dalla cinetica di reazione, dalle condizioni di annealing e dalla qualità e quantità del DNA estratto. Si può avere un saggio quantitativo tramite una quantificazione assoluta (mediante l'utilizzo di standard noti) o una quantificazione relativa (tramite il confronto fra il Ct del campione e il Ct di un campione calibratore) (Higuchi et al., 1993).

Tuttavia, nei saggi qualitativi per la ricerca di patogeni, questo approccio viene di solito evitato. Questo perché, come verrà spiegato in seguito, patogeni come *Salmonella spp* e *Listeria monocytogenes* hanno dosi minime infettanti molto basse. Pertanto, l'attenzione principale si concentra sulla semplice rilevazione della presenza o assenza di tali patogeni, piuttosto che sulla quantificazione precisa, in quanto anche la presenza di poche colonie è sufficiente a rappresentare un potenziale rischio d'infezione. Inoltre, a causa della presenza di un processo di arricchimento selettivo iniziale del campione, mirato a migliorare la sensibilità della reazione, è impossibile determinare con certezza di quante UFC/g è cresciuto il patogeno, rendendo la quantificazione inutile in queste circostanze (Amato et al., 2017; Lee et al., 2015).

Attualmente, per la rilevazione in Real-Time PCR, vengono impiegati principalmente due approcci basati su molecole fluorescenti.

Il primo metodo fa uso di fluorofori intercalanti al DNA, come ad esempio il SYBR® Green: nella fase di estensione della reazione il colorante si intercala nella molecola di DNA e, una volta eccitato dallo strumento, emette fluorescenza in modo proporzionale al numero di copie di DNA prodotte. Il colorante si lega solamente al DNA double-strand e quindi rileverà qualsiasi prodotto di amplificazione a doppio filamento, anche non specifico (come dimeri di primer o prodotti della cross-reattività di sequenze off-target). Questo sistema rende non necessario incorporare un reporter fluorescente nei primer o l'utilizzo di sonde marcate specificatamente per una sequenza target, ciò consente di ridurre ampiamente i costi sperimentali.

Il secondo sistema si basa sull'utilizzo di sonde, come le sonde TaqMan®. Ogni sonda è un oligo-nucleotide sequenza-specifico per il gene target, legato covalentemente a due fluorofori: il Quencher (fluoroforo "accettore") e il Reporter (fluoroforo "donatore"). Queste sonde sfruttano per la rilevazione della fluorescenza il principio del trasferimento fra i due fluorofori e prevede che quando il Quencher e il Reporter

sono spazialmente vicini il segnale luminoso emesso dal Reporter venga assorbito dal Quencher risultando, quindi, in una non-emissione di luce. Viceversa durante la fase di estensione della reazione, grazie all'attività 5'→3' esonucleasica della DNA-polimerasi, i nucleotidi leganti Quencher e i nucleotidi leganti il Reporter saranno scalzati e, in seguito all'allontanamento delle due molecole, la fluorescenza emessa dal Reporter non sarà più tamponata dalla molecola Quencher determinando così un segnale fluorescente registrabile esattamente in corrispondenza della formazione dell'amplicone. I vantaggi principali dell'utilizzo di queste sonde sono principalmente due:

- a) Specificità di legame: le sonde sono progettate per legarsi in maniera specifica alla sequenza di DNA bersaglio, eliminando di fatto la rilevazione di segnale data dalla formazione di ampliconi aspecifici e dimeri di primer,
- b) Possibilità di allestire saggi multiplex: grazie alla disponibilità di fluorofori che emettono a lunghezza d'onda differente è possibile impiegare più sonde, ognuna specifica per un diverso target e legata a differenti fluorofori.

1.2.3.3. PCR Multiplex

L'impiego della PCR multiplex offre l'opportunità di rilevare simultaneamente più organismi bersaglio, apportando notevoli vantaggi in termini di tempo impiegato e risorse umane. Tuttavia, è importante considerare il rischio di una amplificazione non proporzionata, spesso associata a disparità nei primer utilizzati (ognuno specifico per una certa sequenza target). Per ovviare a questo problema, è stato sviluppato un sistema di PCR multiplex che fa uso di un primer universale, noto come UP-M-PCR. Questo sistema, applicato alla Real-Time PCR, è in grado di identificare simultaneamente e in tempo reale diversi agenti patogeni attraverso una procedura di PCR rapida e agevole, contribuendo in maniera significativa a

ridurre i tempi impiegati, la necessità di risorse umane e i costi complessivi del processo di identificazione (Yuan et al., 2009).

In definitiva i metodi basati sulla PCR rappresentano un approccio ampiamente diffuso per l'identificazione dei batteri, spesso utilizzati in via complementare o alternativa a metodi colturali per la loro rapidità di esecuzione e precisione nella risposta. Tuttavia, ci sono alcune difficoltà che richiedono lo sviluppo di protocolli migliorati, specialmente per fasi critiche come la lisi cellulare e l'estrazione dell'acido nucleico da matrici processate o particolarmente complesse. Inoltre, è importante sottolineare che nessun metodo basato sulla tecnica della PCR permette di distinguere tra cellule vive e cellule morte, non restituendo informazioni sull'effettiva vitalità del contaminante nel campione. Altre problematiche includono la prevenzione della contaminazione crociata, la gestione delle reazioni che potrebbero non avere successo a causa della presenza di sostanze inibitorie (come polisaccaridi, grassi, proteine e acidi umici) particolarmente abbondanti in matrici complesse e la generazione di segnali falsi positivi a causa del legame con sequenze di DNA off-target proveniente da fonti diverse (Sajali et al., 2018).

1.3. Importanza del limite di rilevazione (LOD) nella ricerca qualitativa di patogeni alimentari

Un aspetto cruciale nella valutazione delle prestazioni di un metodo di rilevazione è la determinazione del Limite di Rilevazione o, in inglese, Limit of Detection (da qui in poi indicato come LOD) (Lee et al., 2015). Il LOD è un parametro che definisce la concentrazione minima di un analita in grado di produrre un segnale diverso dal rumore di fondo, ma non necessariamente quantificabile con precisione. In altre parole, rappresenta la soglia al di sotto della quale l'analita in questione non può essere rilevato in modo affidabile dal metodo analitico assegnato. Esiste un LOD teorico (dato dall'effettiva capacità di rilevazione dello strumento e del metodo in

condizioni di perfezione assoluta dello strumento, reagente e test) e un LOD pratico (che tiene conto sia dell'effetto matrice sia di possibili fattori di interferenza quali temperature ambientali, vitalità del ceppo, inibitori di PCR, data di scadenza dei reagenti ecc.), il quale viene determinato a livello di singolo laboratorio sulla base della relazione operatore-metodo-strumento. In linea teorica il LOD pratico non può essere inferiore al LOD teorico.

Il LOD riveste un ruolo chiave nella ricerca qualitativa di patogeni alimentari. Fra le ragioni per l'importanza di questo parametro è fondamentale notare che il LOD riflette la sensibilità del metodo di rilevazione: un LOD basso indica che il metodo è in grado di distinguere dal bianco il segnale dato anche da piccole quantità di patogeni, rendendolo più efficace nella rilevazione di contaminazioni a bassa concentrazione. Nell'ambito della sicurezza alimentare, questa caratteristica è fondamentale per la sicurezza del consumatore, in quanto anche piccole quantità di patogeno (intese come UFC/g) possono causare l'insorgenza dell'infezione nell'ospite. Avere, quindi, un LOD basso, idealmente molto minore della dose infettiva, assicura la massima sicurezza nella porzione di alimento analizzato.

In definitiva, il calcolo del LOD è un aspetto critico nella ricerca qualitativa di patogeni alimentari. Oltre a definire la sensibilità del metodo di rilevazione, un LOD accuratamente calcolato è fondamentale per garantire che i patogeni alimentari siano identificati in modo affidabile e che i prodotti alimentari siano sicuri per il consumo umano.

1.4. Caratteristiche e patogenicità di *Salmonella spp* e *Listeria monocytogenes*

1.4.1. *Salmonella spp*

1.4.1.1. Eziologia del genere *Salmonella*

Il genere *Salmonella* comprende batteri Gram-negativi, appartenente al phylum *Pseudomonadota*, classe *Gammaproteobacteria*, ordine *Enterobacterales*, famiglia *Enterobacteriaceae*. Hanno forma bastoncellare di lunghezza compresa fra 2 μm e 5 μm e di larghezza compresa fra 0,2 μm e 1,5 μm . Sono anaerobi facoltativi e hanno capacità di movimento grazie a flagelli peritrichi. I microrganismi di questo genere hanno la capacità di metabolizzare i nutrienti attraverso vie definite come chimioorganotrofiche, che includono sia processi respiratori che fermentativi. Nella maggior parte dei casi, questi microrganismi non manifestano la fermentazione del lattosio (Carrasco et al., 2012). *Salmonella spp* cresce generalmente a un intervallo di temperatura compreso tra 5 e 47°C, con un optimum di 32 - 35°C. Tuttavia, alcuni sierotipi possono prosperare in un range di temperature ancora più esteso, che va dai 2°C ai 4°C fino a 54°C. Malgrado questa diversità, *Salmonella* è generalmente sensibile al calore ed è spesso distrutta da temperature di cottura di 70°C o superiori. Il pH necessario per la crescita di *Salmonella* varia da 4 a 9, con un intervallo ottimale tra 6,5 e 7,5. Inoltre, *Salmonella* richiede un substrato con un'elevata attività dell'acqua (a_w compresa tra 0,99 e 0,94) per la crescita, ma è in grado di sopravvivere in ambienti con un'attività dell'acqua notevolmente inferiore, come ad esempio nei cibi secchi ($a_w < 2$). Questi microrganismi possono addirittura prosperare in presenza di concentrazioni di cloruro di sodio comprese tra il 0,4% e il 4%. Questi fattori lavorano in sinergia per inibire la crescita di *Salmonella*, che può

essere completamente arrestata in condizioni di pH inferiore a 3,8, attività dell'acqua inferiore a 0,94 e temperature inferiori a 7°C (Jajere, 2019).

Salmonella è stata scoperta e isolata per la prima volta nel 1885 da Theobald Smith e Daniel Elmer Salmon, dai tessuti intestinali di maiali affetti da peste suina classica, nota anche come colera dei maiali. Attualmente, la maggior parte dei centri di riferimento per lo studio di *Salmonella* in tutto il mondo, compreso il Centers for Disease Control (CDC), adotta il sistema di nomenclatura raccomandato dall'Organizzazione Mondiale della Sanità (OMS). Questo sistema suddivide il genere in due specie principali, *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*, basandosi su differenze riscontrate nell'analisi delle sequenze del 16S rRNA. Sulla base delle proprietà biochimiche e della parentela genomica, la *S. enterica* è stata ulteriormente classificata in sei sottospecie, indicate con numeri romani: I. *S. enterica* subsp. *enterica*; II. *S. enterica* subsp. *salamae*; III. *S. enterica* subsp. *arizonae*; IIIa. *S. enterica* subsp. *diarizonae*; IV. *S. enterica* subsp. *houtenae*; e V. *S. enterica* subsp. *indica* (Rincón-Gamboa et al., 2021).

Salmonella enterica subsp. *enterica* (sottospecie I) è la sottospecie più frequentemente associata ai mammiferi ed è responsabile del 99% delle infezioni da *Salmonella* nell'essere umano e in altri animali a sangue caldo (compresi volatili). Nella letteratura scientifica, spesso si omette la menzione della sottospecie, concentrandosi invece sul sierotipo o "serovar" più comunemente utilizzato. Per esempio, *Salmonella enterica* sottospecie *enterica* sierotipo Typhi è di solito abbreviato come *Salmonella* ser. Typhi. Fino a oggi, sono stati identificati oltre 2600 sierotipi distinti in base a una combinazione unica di antigeni somatici O e flagellari H1 e H2. (Jajere, 2019)

1.4.1.2. Salmonellosi

La salmonellosi è l'infezione batterica causata dal genere *Salmonella*. È la più comune malattia batterica di origine alimentare a livello globale e rappresenta una minaccia per la salute pubblica a causa della sua alta endemicità, della difficoltà nell'adozione di misure di controllo e dei significativi tassi di morbilità e mortalità ad essa associati.

L'incidenza di malattie intestinali causate da *Salmonella* (sia tifoide che non tifoide) è più alta nei paesi in via di sviluppo, ma raggiunge numeri di notevole importanza anche nei paesi sviluppati (Eng et al., 2015). Globalmente solo a causa della gastroenterite, la forma più comune di infezione da NTS, si stimano all'anno 93,8 milioni di casi e 155.000 decessi (Abebe et al., 2020). Tipicamente, gli esseri umani si infettano attraverso l'ingestione di alimenti contaminati e, generalmente, pollame e uova sono riconosciuti come le principali fonti della malattia. La dose infettiva in acque o alimenti contaminati è molto bassa, stimata inferiore alle 10^4 unità (Bhan et al., 2005).

La gravità della malattia varia in base a diversi fattori, come la dose infettiva l'età, lo stato di salute e la capacità di risposta immunitaria dell'ospite e infine dal sierotipo. Un altro modo di classificare *Salmonella* spp. è, infatti, in base al tipo di sintomatologia della malattia (**Tabella 2**): esistono varianti tifoidee e varianti non tifoidee (NTS) che causano rispettivamente febbre enterica e gastroenterite (Eng et al., 2015).

Tabella 2. Fonte: Veterinary World, EISSN: 2231-0916

<i>Salmonella</i> serogroup/serotype	Hosts	Disease
D/Typhi	Humans	Septicemia, fever
A, B, C/Paratyphi	Humans	Septicemia, fever
B/Typhimurium	Humans, cattle, swine, horses, sheep, poultry, wild rodents	Gastroenteritis, septicemia, fever
D/Enteritidis	Humans, poultry, wild rodents	Gastroenteritis, septicemia, fever
D/Dublin	Cattle, swine, sheep	Gastroenteritis, abortion, septicemia, fever
B/Derby	Birds, swine	Gastroenteritis, septicemia
D/Gallinarum	Poultry	Gastroenteritis, septicemia
B/Abortusovis	Sheep	Septicemia, abortion
B/Abortusequi	Horses	Septicemia, abortion
C/Choleraesuis	Swine	Septicemia, fever

a) Il termine "febbre enterica" è utilizzato sia per la febbre tifoide (causata da *Salmonella* ser. Typhi) che per la febbre paratifoide (causata *Salmonella* ser. Paratyphi), poiché i due agenti eziologici causano sintomi clinici praticamente indistinguibili (Connor & Schwartz, 2005). Gli esseri umani sono l'unico serbatoio per i due ceppi di *Salmonella* tifoide. La febbre enterica è caratterizzata da un periodo di incubazione di circa una settimana, dopo il quale si manifesta con sintomi come mal di testa, dolore addominale e diarrea (o stitichezza), seguiti dall'insorgenza di febbre. Oltre alla febbre, i pazienti infetti possono sviluppare mialgia, bradicardia, epatomegalia (fegato ingrossato), splenomegalia (milza ingrossata) e macchie rosse sul petto e sull'addome (Bhan et al., 2005). La diarrea è più comunemente osservata nei bambini. Durante la malattia, si osserva un particolare andamento febbrile con una iniziale febbre a più bassa temperatura (> 37,5°C a 38,2°C) che si sviluppa lentamente in febbre ad alta temperatura (> 38,2°C a 41,5°C) nella seconda settimana. Se il paziente non viene trattato, la febbre può persistere per un mese o più. L'emorragia è una delle complicanze gastrointestinali più gravi che si verifica a seguito della perforazione delle placche di Peyer, aggregati linfoidi situati nell'ileo, con conseguente diarrea ematica (Bhan et al., 2005).

b) La gastroenterite o "influenza intestinale" è la condizione patologica causata da ceppi di *Salmonella* diversi da *S. Typhi* e *S. Paratyphi*, definiti come Non-Typhoid-*Salmonella* (NTS). Sulla base dei dati raccolti dalla WHO per il periodo 2001-2005, il sierotipo responsabile delle infezioni da NTS in tutto il mondo più comunemente isolato è stato *S. Enteritidis* (65%). Le infezioni da NTS sono caratterizzate da un'inflammatione del tratto gastrointestinale, accompagnata da sintomi come diarrea non emorragica, vomito, nausea, mal di testa, crampi addominali e mialgie. Rispetto alle infezioni da *Salmonella* ser. *Typhi* e *Salmonella* ser. *Paratyphi*, le infezioni da NTS, hanno un periodo di incubazione più breve (dalle 6 alle 12 ore) con sintomi solitamente autolimitanti che durano solo un massimo di 10 giorni (Acheson & Hohmann, 2001). Le complicazioni più gravi delle infezioni da NTS includono colecistite, pancreatite e appendicite, mentre la perforazione dell'ileo terminale (principale causa di diarrea emorragica) non è associata alle infezioni da NTS (Acheson & Hohmann, 2001). I neonati, i bambini piccoli, gli anziani e i soggetti immunocompromessi sono altamente suscettibili alle infezioni da NTS e sviluppano sintomi più gravi rispetto alle persone immunocompetenti (Scallan et al., 2011).

Entrambe le manifestazioni patologiche possono portare a setticemia, condizione in cui *Salmonella* riesce a penetrare la barriera intestinale e entrare nel circolo sanguigno. In condizioni gravi, la risposta immunitaria scatenata dalla setticemia può portare a shock settico, con un tasso di mortalità elevato. La manifestazione clinica della setticemia è più comunemente osservata nelle infezioni da NTS rispetto alle infezioni da *Salmonella* tifoide (Acheson & Hohmann, 2001).

1.4.1.3. Patogenesi di *Salmonella enterica*

Salmonella utilizza diversi fattori di virulenza per superare i meccanismi di difesa dell'organismo e colonizzare l'ospite. Questi fattori includono flagelli, capsula, plasmidi, sistemi di adesione e sistemi di secrezione del tipo 3 (T3SS) e la capacità di produrre sia endotossine che esotossine.

Tra i serovar *Typhi*, *Enteritidis* e *Typhimurium* sono state identificate (Prager et al., 1995) due esotossine particolari: l'enterotossina e la salmolisina, codificate rispettivamente dai geni *stn* e *slyA*. La salmolisina è emolitica ed è legata alla sintomatologia da diarrea emolitica della febbre enterica.

I flagelli situati sulla superficie cellulare di *Salmonella*, sono noti per essere un fattore di virulenza oltre che conferire motilità. Per minimizzare la risposta immunitaria dell'ospite, alcuni sierotipi di *Salmonella* riescono a variare l'espressione superficiale di flagellina, generando disomogeneità fenotipica negli antigeni flagellari (Asten & Dijk, 2005).

Anche le fimbrie svolgono un ruolo importante nella patogenesi di *Salmonella*: rappresentano i sistemi di adesione più comuni e rappresentano una fonte di diversità tra le varie serovar di questo genere. Consentono, infatti, al batterio di aderire alle cellule dell'ospite, agli alimenti e alle superfici industriali (come l'acciaio inossidabile) e sono anche implicate nella formazione di biofilm, l'emoagglutinazione e l'invasione cellulare (Jajere, 2019).

In *Salmonella* è stato osservato un particolare fenomeno, definito "specificità dell'ospite sierologico" o "adattamento dell'ospite sierologico", meccanismo che può rendere un serovar particolarmente virulento per una determinata specie animale, meno o addirittura avirulento per un'altra specie animale (Uzzau et al., 2001).

1.4.1.4. Legislazione

In accordo con il regolamento comunitario (CE) n. 2073/2005, che stabilisce gli standard e i criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari, la presenza di *Salmonella spp* non deve essere rilevabile (secondo il metodo di analisi di riferimento UNI EN ISO 6579-1), in una quantità pari a 25g di qualsiasi prodotto destinato alla commercializzazione per l'intero periodo di conservazione previsto (CE 2073/2005, 2005). Per alcuni prodotti identificati come particolarmente a rischio le quantità minime di analisi in cui deve essere assicurata l'assenza del patogeno possono essere maggiori (ad esempio pari a 125 g), oppure si richiede l'assenza su 5 UC (unità campionarie) da 25g ciascuna.

1.4.1.5. Serbatoi di infezione di *Salmonella spp*.

I sierotipi di *Salmonella* sono diffusi in natura e possono essere trovati sia nell'ambiente che nel tratto intestinale di molte specie animali, sia domestiche che selvatiche (Eng et al., 2015). Negli animali da allevamento, *Salmonella* può causare infezioni subcliniche senza manifestare alcun segno clinico di malattia. Questi animali vengono definiti "portatori" e sono uno dei motivi della permanenza di *Salmonella* negli allevamenti in quanto, come dei veri e propri serbatoi, possono diffondere con le feci il patogeno nell'ambiente.

Salmonella spp viene generalmente introdotto nella filiera nelle fasi iniziali della produzione. Mangime contaminato, acqua e altre fonti ambientali legate alla produzione sono potenziali fonti di *Salmonella* nella fase iniziale della filiera (Carrasco et al., 2012). Creus et al. hanno segnalato l'importanza sia del controllo microbiologico del mangime sia del suo trattamento (ad esempio acidificandolo) per ridurre o eliminare *Salmonella* da un allevamento (E. Creus et al., 2007).

Un altro punto critico è la fase di macellazione: una volta che *Salmonella* colonizza l'apparato digerente degli animali da reddito, le carcasse macellate possono essere contaminate direttamente, tramite il contatto con materia fecale infetta (essendo *Salmonella* un patogeno enterico) o indirettamente, per contaminazione crociata, tramite il contatto con superfici o operatori contaminati.

Pollame, suini e bovini sono comuni fonti di salmonellosi. In particolare la carne di avicoli (es. il pollame) rappresenta in assoluto il principale vettore di questo patogeno poiché l'apparato digerente e urinario terminano entrambi a livello di retto in un orifizio comune (cloaca), con un'unica via di espulsione di feci e urine. Questo fa sì che durante la macellazione, sia molto complesso eviscerare del tutto l'animale senza far venire a contatto feci/urine con la carne, contaminando facilmente la parte edibile dell'animale. Inoltre, nelle prime 24-48 ore di vita, il microbiota intestinale degli uccelli tende a non essere ben sviluppato, pertanto sono piuttosto suscettibili a infezioni sintomatiche e non di batteri enterici. Tramite mangimi addizionati con probiotici è possibile accelerare lo sviluppo del microbiota che funge da barriera per impedire agli agenti patogeni di insediarsi, tramite il meccanismo della cosiddetta "esclusione competitiva" (Ricke, 2021). Tuttavia, oltre ai prodotti carnei, anche una vasta gamma di altri prodotti alimentari come latte, prodotti lattiero-caseari, frutta, verdura e prodotti ittici possono essere fonti di infezione da *Salmonella* (Carrasco et al., 2012).

Errate pratiche di conservazione e cottura inadeguata sono le principali cause implicate nello sviluppo di salmonellosi nell'uomo, pertanto, è obbligatoria lungo la filiera l'implementazione del sistema HACCP e il relativo piano igienico-sanitario in tutte le aziende operanti nell'industria alimentare.

Nonostante ciò una parte significativa degli scenari di contaminazione avviene, sorprendentemente, nelle cucine domestiche dove la preparazione di cibi crudi

come la carne di pollame fresca può portare alla contaminazione crociata di *Salmonella* sulle mani, sugli utensili da cucina e sulle superfici a contatto con il cibo. Da queste superfici è stato possibile recuperare cellule di *Salmonella* fino a 6 ore dopo l'iniziale contaminazione. Pertanto, è importante educare alla sicurezza alimentare il consumatore, poiché il rischio di pratiche errate nella manipolazione dei cibi e di scarsa igiene è relativamente alto ed è impossibile da controllare all'interno dell'ambiente domestico: scarsa attenzione è stata rivolta a questo ultimo passaggio della catena "*from farm to fork*" (Carrasco et al., 2012).

1.4.2. *Listeria monocytogenes*

1.4.2.1. Eziologia del genere *Listeria*

Le specie di *Listeria* (*Listeria spp.*) comprendono batteri Gram-positivi appartenenti al phylum *Firmicutes*, classe *Bacilli*, ordine *Bacillales*. Hanno forma bastoncellare di lunghezza compresa fra 1 μm e 1,5 μm e di larghezza di circa 0,5 μm . Sono anaerobi facoltativi, non sporulanti e mobili (a temperature comprese tra 24 °C e 28 °C) grazie a flagelli peritrichi, ma la motilità viene persa al di sopra dei 30 °C (Abebe et al., 2020).

Sono batteri psicrofili: la temperatura di crescita di queste specie varia da 0,4°C a 45°C, con una temperatura di crescita ottimale pari a 37°C. Possono sopravvivere in substrati con attività dell'acqua relativamente bassa ($a_w < 0,90$) e tollerare condizioni saline (NaCl) fino al 20% (peso/volume soluzione). Crescono in un intervallo di pH compreso tra 4,4 e 9,6 (Matle et al., 2020).

Attualmente il genere *Listeria* include 17 specie riconosciute (*Listeria monocytogenes*, *Listeria seeligeri*, *Listeria ivanovii*, *Listeria welshimeri*, *Listeria marthii*, *Listeria innocua*, *Listeria grayi*, *Listeria fleischmannii*, *Listeria floridensis*, *Listeria aquatica*, *Listeria newyorkensis*, *Listeria cornellensis*, *Listeria rocourtiae*,

Listeria weihenstephanensis, *Listeria grandensis*, *Listeria riparia* e *Listeria booriae*). Questa classificazione è supportata da criteri di suddivisione tassonomica riconosciuti come ANib (Blast-based Average Nucleotide Identity) e DDH (DNA-DNA hybridization) (Chiara et al., 2015). Un'ulteriore categorizzazione suddivide il genere *Listeria* in due gruppi:

- a) *Listeria* sensu strictu, che include *L. monocytogenes*, *L. seeligeri*, *L. marthii*, *L. ivanovii*, *L. welshimeri*, and *L. innocua* (Chiara et al., 2015)
- b) *Listeria* sensu lato, che include le altre 11 specie (*L. grayi* e 10 specie di *Listeria* scoperte dal 2009) (Chiara et al., 2015)

Le *Listeria spp.* sono fenotipicamente molto simili, ma possono essere differenziate mediante test biochimici, tra cui il test di emolisi, test della produzione di D-xilosio, test del L-rhamnosio, test del mannitolo e test di motilità (Orsi & Wiedmann, 2016). Di queste, solo due specie (*L. monocytogenes* e *L. ivanovii*) sono considerate patogene per l'uomo e *L. monocytogenes* in particolare è conosciuto come uno dei patogeni umani a trasmissione alimentare emergente più pericoloso.

Le *Listeria spp.* sono per lo più contaminanti ambientali ubiquitari che abitano principalmente il suolo e le acque reflue e stagnanti. Anche gli animali possono fungere da vettori: *Listeria spp.* è stata infatti rilevata in una varietà di animali, tra cui ruminanti (isolata nel 5% del contenuto intestinale di animali sani) (Borucki & Call 2003), uccelli, fauna marina, insetti, zecche e crostacei (Van Vuuren 2001). Anche gli esseri umani sono portatori di *Listeria spp.* in quanto è stata isolata dal 5% al 10% dei campioni di feci di adulti sani (Churchill, Lee & Hall 2006). È stato inoltre osservato che *Listeria monocytogenes* non subisce alcun rallentamento nella crescita a 8°C e in condizioni di atmosfera modificata (Modified Atmosphere Packaging), tipologia di confezionamento molto utilizzata per i prodotti pronti al consumo o "ready-to-eat" (RTE), concludendo che la MAP non è adatta a prevenire la crescita di

questo patogeno in alimenti che fanno uso di tale tecnica di confezionamento (Culliney & Schmalenberger, 2020). Queste caratteristiche di ubiquità e resilienza rendono l'intero genere *Listeria* in grado di crescere e sopravvivere in condizioni ambientali non ordinarie, come quelle che si potrebbero trovare in impianti di lavorazione degli alimenti, risultando perciò un serio problema per l'intera catena di approvvigionamento alimentare.

1.4.2.2. *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes è un patogeno alimentare ampiamente diffuso in natura. È un batterio zoonotico a trasmissione alimentare che, a seguito del consumo di alimenti contaminati, è in grado di provocare malattie sia negli animali che negli esseri umani. È uno dei patogeni più virulenti che le agenzie di controllo e monitoraggio di tutto il mondo cercano di contenere, essendo la terza causa di morte associata alle malattie veicolate dagli alimenti in USA (Scallan et al., 2011). La presenza di *L. monocytogenes* negli alimenti ha, inoltre, importanti conseguenze economiche, come il ritiro dei prodotti dal mercato e una diminuzione delle vendite dei prodotti incriminati. A causa della loro natura ubiquitaria e della capacità di resistere a una vasta gamma di stress ambientali, come le variazioni di pH, temperatura e concentrazione salina, le specie di *Listeria* sono considerate patogeni alimentari di notevole rilevanza.

L'emergere di *L. monocytogenes* come patogeno a trasmissione alimentare risale al 1980, con la comparsa di casi sporadici di listeriosi associati al consumo di alimenti contaminati e molti focolai (tra cui quello in Svizzera nel 1983-1987 a causa di formaggio crudo a pasta molle e quello negli Stati Uniti nel 1983 a causa di latte pastorizzato in modo improprio) (Lekkas, 2016).

Con la comparsa di questi focolai, iniziò a emergere l'interesse per *L. monocytogenes* in ottica di sicurezza alimentare. Da allora, le infezioni di questo patogeno sono state collegate al consumo di alimenti contaminati, per lo più di origine animale, come prodotti lattiero-caseari, prodotti a base di carne, prodotti ittici e limitatamente anche verdure che sono state in contatto con acqua e suolo contaminati (Matle et al., 2020). Inoltre, l'aumento esponenziale negli ultimi anni della richiesta e dell'utilizzo di prodotti pronti al consumo è correlato all'aumento dei casi di listeriosi (EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) et al., 2018).

L. monocytogenes è stato suddiviso in 13 sierotipi (1/2a, 1/2b, 1/2c, 3a, 3b, 3c, 4a, 4ab, 4b, 4c, 4d, 4e, 7) sulla base degli antigeni somatici e flagellari. Dal 2005 tali sierotipi sono sostituiti da cinque sierogruppi genetici determinati mediante PCR: IIa (sierotipi 1/2a e 3a), IIb (sierotipi 1/2b e 3b), IIc (sierotipi 1/2c e 3c), IVb (sierotipi 4b, 4d e 4e) e L (altri sierotipi). I sierotipi 1/2a, 1/2b e 4b sono stati identificati come gli agenti causali predominanti della listeriosi nell'uomo (Dhama et al., 2015).

1.4.2.3. Listeriosi

La via più comune di infezione da listeriosi negli esseri umani è il consumo di alimenti contaminati e, solo sporadicamente, si presenta come malattia professionale tramite il contatto tra essere umano e animali infetti. L'incidenza della listeriosi è piuttosto bassa nella popolazione generale, ma rimane una malattia importante, con un tasso di ospedalizzazione superiore al 95% e un tasso di decesso superiore al 10% (Scallan et al., 2011). Si ipotizza che i casi realmente identificati siano una percentuale minima rispetto a quelli veramente effettivi, poiché spesso la diagnosi è tardiva, se non proprio assente e, nei casi più gravi (meningiti e endocarditi), si fa riferimento ad altre cause. La listeriosi è caratterizzata da un ampio spettro di sintomi, e viene suddivisa in due forme: (a) **listeriosi invasiva grave** e (b) **gastroenterite febbrile non invasiva** (Matle et al., 2020).

- a) La **listeriosi invasiva grave** è la forma responsabile dell'alto tasso di ricoveri ospedalieri e di decesso, che la rende una delle malattie di origine alimentare più gravi. Si verifica soprattutto in individui immunocompromessi e si manifesta con sepsi, meningite, endocardite, encefalite, meningoencefalite, setticemia e infezione cerebrale. L'endocardite si verifica nel 10% dei casi, mentre l'infezione cerebrale dovuta alla listeriosi negli adulti immunocompromessi è responsabile del 22% dei decessi. Le donne in gravidanza hanno un rischio 17 volte maggiore di contrarre la listeriosi invasiva, la quale si manifesta generalmente con sintomi simil-influenzali con o senza problemi gastrointestinali. Tuttavia, le conseguenze dell'infezione del feto o del neonato sono estremamente gravi e comprendono aborto, parto prematuro, polmonite e meningite (Matle et al., 2020).
- b) La **gastroenterite non invasiva** è la forma che tende a manifestarsi in adulti immunocompetenti ed è solitamente caratterizzata da gastroenterite febbrile e diarrea acquosa della durata di 2-3 giorni, spesso accompagnata da mal di testa e mal di schiena, unita a setticemia presente nelle forme più gravi. Questi sintomi sono solitamente autolimitanti e possono essere risolti in breve tempo senza richiedere l'intervento di un medico, situazione che verosimilmente porta a casi non diagnosticati e non segnalati (Matle et al., 2020).

La manifestazione di una forma di listeriosi rispetto all'altra dipende da diversi fattori, tra cui dall'età dell'individuo, dal suo stato immunitario, dalla dose infettiva, dalla modalità di infezione, dalla virulenza del ceppo ingerito e dallo stadio fisiologico. I segni clinici di questa malattia compaiono spesso dopo un lungo periodo di incubazione (da 1 giorno a 70 giorni), il che rende molto difficile la tracciabilità epidemiologica della fonte. La dose infettiva stimata per l'insorgenza

della listeriosi nella popolazione suscettibile va da 0,1 a 10 milioni di unità formanti colonie (UFC), mentre negli individui sani va da 10 a 100 milioni di UFC (Amato et al., 2017).

1.4.2.4. Patogenesi di *Listeria monocytogenes*

Il successo di *L. monocytogenes* nel causare un'infezione è dovuto alla sua caratteristica di essere un batterio intracellulare, in grado di promuovere la sua internalizzazione all'interno delle cellule dell'organismo infettato (**Figura 1**). *Listeria* possiede fattori di virulenza unici per invadere l'ospite e causare l'infezione: dopo essere stato ingerito attraverso alimenti contaminati, *L. monocytogenes* sopravvive all'esposizione ad alta acidità, sali biliari, attacchi infiammatori non specifici e enzimi proteolitici del sistema ospite. Una volta giunto a livello della mucosa intestinale, tramite residui di D-galattosio sulla sua superficie, si lega ai recettori del D-galattosio delle cellule ospiti. Le cellule di elezione del riconoscimento sono le cellule M e le placche di Peyer, le quali internalizzano il patogeno all'interno di un vacuolo fagosomale. Una volta all'interno, infatti, promuove la lisi del vacuolo, inizia a moltiplicarsi a livello intracellulare e si diffonde alle cellule adiacenti. Attraversa così la membrana intestinale ed entra nel flusso sanguigno, diventando un patogeno trasmesso dal sangue (causa di setticemia). Inoltre è in grado di eludere le cellule immunitarie e, una volta internalizzato in monociti, macrofagi o nei leucociti dell'ospite, crescere al loro interno. In questo modo il patogeno acquisisce la capacità di superare tre importanti barriere dell'organismo umano, ovvero l'epitelio intestinale, la barriera emato-encefalica e la placenta, per poi disseminarsi in altri distretti (Carvalho et al., 2014).

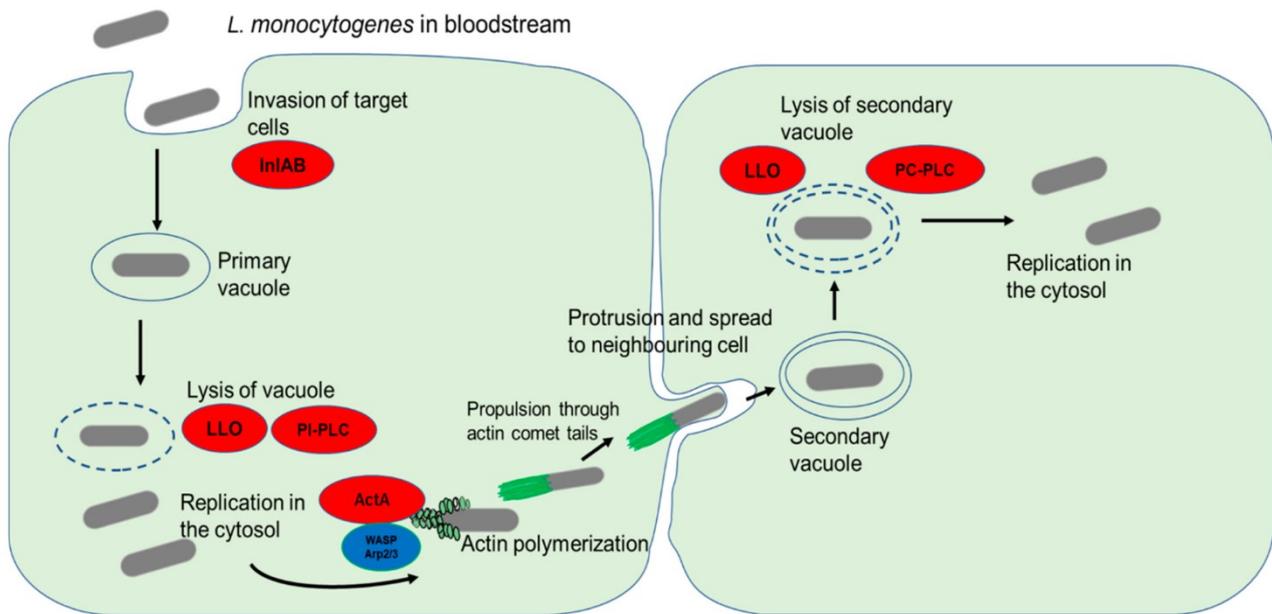


Figura 1: Patogenesi di *L. monocytogenes* in infezioni umane. Fonte: (Sibanda & Buys, 2022).

14.2.5. Legislazione

Per determinare se un prodotto alimentare è accettabile per il consumo umano si fa riferimento alla carica batterica di specifici microrganismi in esso contenuti. Gli standard microbiologici per la sicurezza alimentare variano tra i diversi paesi, ma rimandano a linee guida internazionali dettate dalla Commissione Internazionale sulle Specifiche Microbiologiche per gli Alimenti (ICMSF) e la Commissione del Codex Alimentarius (CAC) con l'obiettivo di proteggere la salute dei consumatori e facilitare il commercio internazionale. Il rispetto degli standard del CAC è volontario, ma molti governi e istituzioni non governative adottano le linee guida del CAC come base per la legislazione e gli standard microbiologici. È importante notare che gli standard e le linee guida promosse dal CAC sono datate 2007, lasciando un vuoto normativo di oltre 20 anni rispetto ai primi focolai attribuiti a *Listeria monocytogenes*.

Lo standard del CAC su *L. monocytogenes* si applica solo agli alimenti pronti al consumo o “ready-to-eat” (RTE) suddividendoli in due categorie in base alla capacità

di supportare o meno la crescita di *L. monocytogenes* (Codex Alimentarius Commission, 2007):

a) **Alimenti pronti per il consumo che non costituiscono terreno favorevole per la crescita di *L. monocytogenes*.** La crescita del microrganismo può essere controllata da fattori intrinseci come pH e aw. Sono considerati alimenti che non supportano la crescita del patogeno se hanno, ad esempio:

- un pH < 4,4;
- una aw < 0,92;
- una combinazione di fattori, ad esempio pH < 5,0 e aw < 0,94.

Tale crescita può essere controllata anche dal congelamento (durante il periodo in cui il prodotto rimane congelato). Inoltre, gli inibitori possono offrire un effetto sinergico con altri fattori estrinseci ed intrinseci.

b) **Alimenti pronti per il consumo che costituiscono terreno favorevole per la crescita di *L. monocytogenes*.** Un alimento RTE in cui si registra un aumento medio di 0,5 log CFU/g dei livelli di *L. monocytogenes* per un periodo temporale pari ad almeno la durata di conservazione prevista in condizioni ragionevolmente prevedibili di distribuzione, conservazione e uso è considerato un alimento in cui può verificarsi la crescita di *L. monocytogenes*.

A livello europeo lo standard microbiologico per *L. monocytogenes* per i prodotti alimentari RTE è in conformità con le linee guide del CAC e definisce, secondo il Regolamento n. 2073/2005 della Commissione Europea, standard microbiologici differenti per le due diverse categorie di alimenti (CE 2073/2005, 2005):

a) Per i prodotti alimentari RTE appartenenti al primo gruppo (che non supportano la crescita di *L. monocytogenes*) è richiesto un livello < 100 UFC/g durante la durata di conservazione.

b) Per prodotti appartenenti alla seconda categoria (dove può verificarsi la crescita di *L. monocytogenes*), prodotti alimentari RTE destinati al consumo infantile e prodotti alimentari ad uso medico, si applica una politica di tolleranza zero (assenza di *L. monocytogenes* in 25 g di campione alimentare o < 0.04 UFC/g).

1.4.2.6. *Listeria monocytogenes* nei prodotti alimentari

L. monocytogenes è stata isolata in una varietà di alimenti quali alimenti crudi, verdure fresche o soggette a una trasformazione minima, prodotti animali crudi, alimenti di origine animale come carne, prodotti carnei RTE (es. tartare), carne macinata, prodotti a base di carne fermentata, insaccati, pesce e prodotti ittici, latte non pastorizzato e prodotti lattiero-caseari (es. formaggio a pasta molle), ecc (Scallan et al., 2011). La preoccupazione principale relativa a questo patogeno riguarda la contaminazione post-trattamento termico, specialmente nei prodotti pronti per il consumo, che rappresentano una delle principali fonti di contaminazione di *L.monocytogenes* (**Figura 2**) . Per questa categoria di prodotti si utilizzano diverse tecniche, ad esempio la cottura *cook-and-chill* e la cottura sottovuoto. Durante la lavorazione *cook-and-chill*, il prodotto viene trattato termicamente, raffreddato rapidamente e posto nella confezione. Il confezionamento a freddo aumenta il rischio di contaminazione. Durante la cottura sottovuoto, le materie prime vengono confezionate sottovuoto e successivamente cotte in condizioni di temperatura e tempo controllate. Solitamente la temperatura è inferiore a 100°C e il tempo di cottura è più lungo rispetto alla cottura tradizionale (Borch & Arinder, 2002).

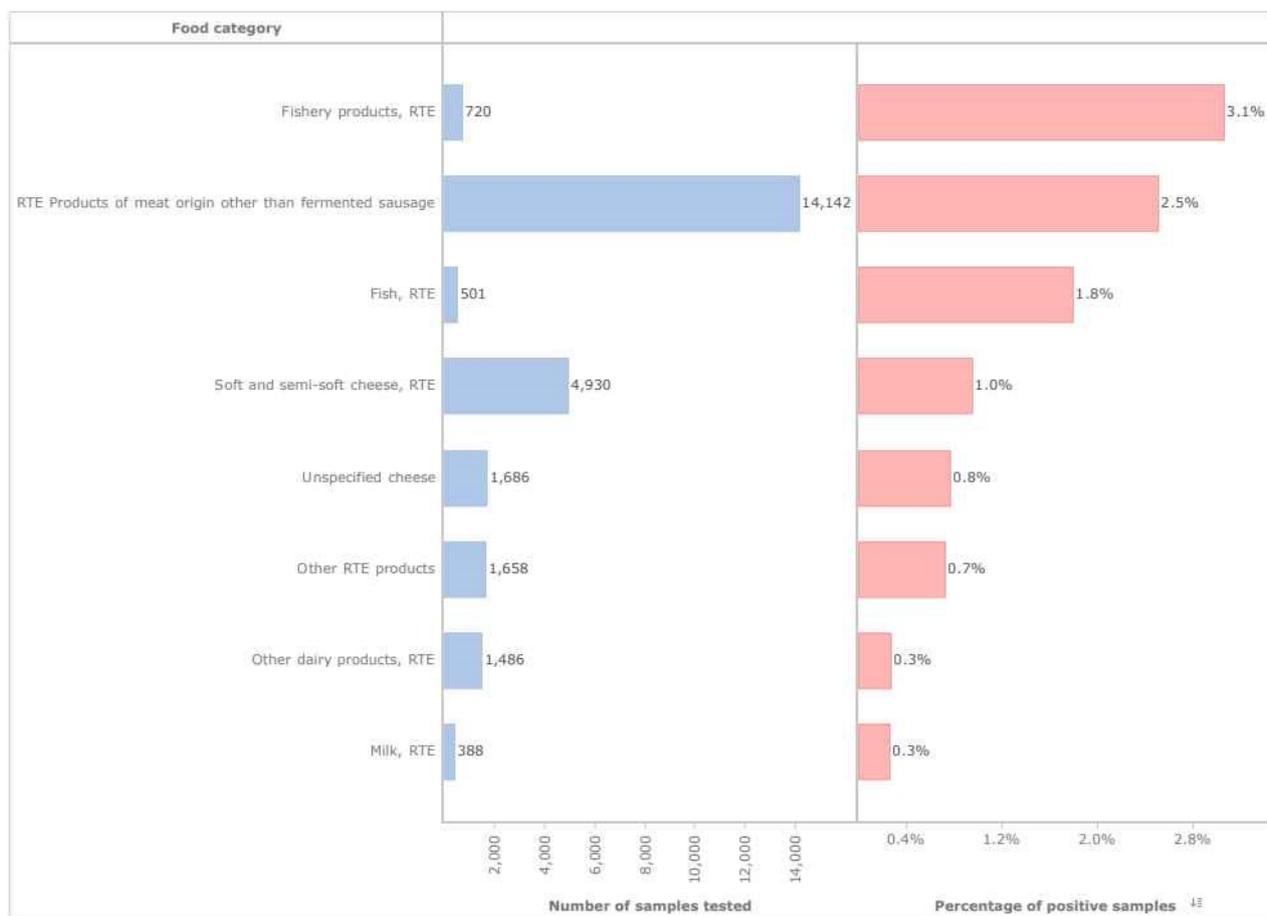


Figura 2: Numero di campioni analizzati e percentuale di campioni positivi a *Listeria monocytogenes* che superano il limite del criterio di sicurezza alimentare (FSC) di *L. monocytogenes* di 100 UFC/g per alimenti pronti al consumo specifici secondo il Regolamento (CE) n. 2073/2005, campionamento ufficiale da parte delle autorità competenti in Europa, durante la fase di produzione. (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control, 2017)

L. monocytogenes può entrare in contesti di trasformazione alimentare attraverso le materie prime in entrata e la circolazione di personale e attrezzature, colonizzando le superfici a contatto (o non a contatto) con gli alimenti. Questo batterio può aderire rapidamente e saldamente a superfici inerti comuni nell'industria alimentare come plastica, polipropilene, gomma, acciaio inossidabile, vetro e nello spazio tra due materiali diversi (ad esempio, plastica e acciaio inossidabile). Utilizzando disinfettanti alle concentrazioni raccomandate per l'industria alimentare, è possibile inattivare completamente *L. monocytogenes* in sospensione. Al contrario, procedure inadeguate di pulizia e disinfezione possono, comportare una persistenza del batterio, con ceppi definiti persistenti che si mantengono a lungo negli impianti di lavorazione alimentare (Thakali and MacRae, 2021).

Le ragioni di questa persistenza sono da associarsi all'organizzazione del batterio in biopellicole (o biofilm), questi tendono a formarsi più frequentemente in aree meno soggette a una pulizia accurata, come pavimenti e pareti con crepe o fessure, o su apparecchiature di difficile pulizia (es. affettatrici e tritacarne). La presenza di biofilm in queste zone può limitare l'efficacia dei processi di disinfezione. Tra i diversi fattori esaminati per comprendere il ruolo del biofilm nella persistenza di questi ceppi, sono stati identificati una diminuzione dell'attività metabolica, l'attivazione di uno stato di quiescenza, una minore capacità di penetrazione (attribuibile alla produzione di polisaccaride extracellulare) e inattivazione enzimatica di biocidi (Larsen et al., 2014).

L. monocytogenes riesce aderire alle superfici a densità batteriche che variano da 4 a 6 Log CFU/cm² (Ciccio et al., 2012). Questa caratteristica, unita alla sua abilità di crescere efficacemente a basse temperature, comunemente utilizzate nell'industria alimentare per la preparazione e la conservazione di una vasta gamma di prodotti, permette alle cellule di *Listeria* presenti nei biofilm di sopravvivere anche a

temperature di 4° o 10°C per un periodo di almeno 5 giorni (SMITH et al., 2004). L'adesione alla superficie avviene in poche ore, mentre la formazione effettiva del biofilm può richiedere diversi giorni. È stato dimostrato che i flagelli peritrichi facilitano l'adesione precoce all'acciaio inossidabile (Vatanyoopaisarn et al., 2000). Questo fenomeno favorisce la proliferazione dei ceppi persistenti e aumenta il rischio di contaminazione. Un processo di pulizia efficace dovrebbe essere in grado di rimuovere la maggior parte dei biofilm. In genere, sui materiali lisci a contatto con gli alimenti, sottoposti a una regolare pulizia e disinfezione quotidiana, è improbabile che si sviluppino biofilm spessi. (Holah e Gibson, 2000).

Listeria monocytogenes è capace di proliferare rapidamente in un intervallo di temperature compreso tra 8 e 12°C. Pertanto, è obbligatorio per legge, mantenere e rigorosamente controllare la catena del freddo nell'industria e nella distribuzione. Tuttavia, queste temperature critiche possono essere facilmente riscontrate, anche solo temporaneamente, nei frigoriferi domestici, dove la catena del freddo non è sottoposta ad alcun controllo da parte del consumatore finale. Abitudini errate, come lasciare il frigorifero aperto per brevi periodi o collocarvi alimenti ancora caldi (NSW Food Authority, 2009) (Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, 2021), possono comportare un innalzamento della temperatura interna del dispositivo fino a oltre 10°C per un breve lasso di tempo. Anche solo poche ore a questa temperatura possono offrire un ambiente favorevole alla crescita di patogeni psicofili, tra cui *Listeria monocytogenes*. Ciò aumenta significativamente il rischio di ingestione di alimenti contaminati nelle fasi finali della filiera.

2. SCOPO E CONTESTO

Affianco alla necessità di disporre di metodi normati, che assicurino uniformità ed elevata precisione nel risultato, oggi giorno c'è una crescente richiesta di metodi alternativi in grado di soddisfare le esigenze di un mercato sempre più dinamico e con flussi di merci in costante aumento. Queste nuove tecniche possono comportare vantaggi sia per le aziende che richiedono analisi, consentendo una riduzione dei tempi di attesa per i risultati, sia per i laboratori che le conducono, portando a una diminuzione dei costi complessivi. I metodi di analisi ufficiali, i cosiddetti *Gold Standard*, sono riconosciuti a livello internazionale dall'organismo di certificazione International Organization for Standardization (ISO) e godono di grande considerazione per la loro elevata precisione e accuratezza. Tuttavia, il principale svantaggio delle tecniche convenzionali è il tempo prolungato necessario per ottenere risultati definitivi.

In questo contesto, diventa cruciale l'introduzione di metodi alternativi che, come nel nostro caso, possano accelerare la produzione di risultati, mantenendo necessariamente un livello di sensibilità almeno pari a quello dei metodi *Gold Standard*, oltre a ridurre i costi, accelerare i tempi di analisi, adeguarsi a nuove esigenze imposte dal mercato e, possibilmente, ridurre l'impatto ambientale.

Questo elaborato è stato prodotto sulla base delle attività svolte durante il tirocinio curricolare presso il laboratorio Biochimie Lab, laboratorio conto terzi che si occupa di analisi alimentari nell'ambito dell'autocontrollo della filiera. L'obiettivo di questo lavoro è la ri-validazione di un metodo alternativo rapido per la ricerca qualitativa di *Salmonella spp* e *Listeria monocytogenes* mediante PCR Real-Time in prodotti a base di carne pronti al consumo umano.

Il presente lavoro si è reso necessario a fronte del processo di ri-validazione continua che il Laboratorio mette in atto per garantire tecniche di analisi al

contempo sensibili, rapide e convenienti. Nella fattispecie, si è rilevata la necessità di aggiornare il metodo già precedentemente validato a causa di modifiche sostanziali alle fasi di arricchimento che il Laboratorio ha ritenuto necessario mettere in atto e per l'adeguamento alla norma UNI EN ISO 16140-3:2021, che fornisce linee guida per la validazione dei metodi di rilevazione di tipo qualitativo e quantitativo (in campioni alimentari destinati al consumo umano, all'alimentazione animale, campioni ambientali legati al settore alimentare, produzione di mangimi e campioni provenienti dalla fase di produzione primaria). La norma UNI EN ISO 16140-3:2021 specifica, inoltre, che qualsiasi nuovo metodo introdotto nel laboratorio successivamente alla sua pubblicazione (quindi non retroattivamente) deve essere verificato secondo tale norma prima dell'implementazione. Il metodo precedente infatti era stato sviluppato nel corso del 2019, quando non erano ancora stata rilasciata la versione 2021 della Norma Tecnica di riferimento.

La validazione del metodo comprende due fasi principali:

- a) La verifica dell'implementazione del metodo, che mira a dimostrare la competenza del laboratorio che fa uso del metodo validato.
- b) La verifica delle matrici alimentari, che serve a dimostrare la competenza del laboratorio nell'applicare il metodo validato ai campioni alimentari sottoposti a test.

In questo studio, abbiamo selezionato prodotti a base di carne pronti al consumo (tartare) come campioni alimentari per condurre queste verifiche, sulla base di una valutazione interna dell'Azienda che ha ritenuto i prodotti RTE base carne come matrice di primario interesse per l'aggiornamento del Metodo. Il presente studio rientra nel piano di aggiornamento che prevedrà la verifica di altre 5 matrici di interesse specifico che non saranno trattate nel presente elaborato.

3. MATERIALI E METODI

3.1. Materiali

3.1.1. Selezione delle matrici

Conformemente a quanto stabilito dalla norma UNI EN ISO 16140-3:2021, per effettuare la verifica dell'implementazione di un metodo alternativo è essenziale considerare una matrice alimentare inclusa nella validazione del metodo e che sia rappresentativa delle matrici effettivamente analizzate nel laboratorio utilizzatore. È ben noto che la matrice alimentare può influenzare significativamente il risultato delle analisi. Diversi fattori, come la composizione dell'alimento, il microbiota di fondo (intrinsecamente presente nell'alimento), l'eventuale microbiota aggiunto per scopi tecnologici, nonché le caratteristiche intrinseche come pH, attività dell'acqua, contenuto di grassi e altri contaminanti, possono interagire con il metodo di analisi e potenzialmente compromettere l'affidabilità del risultato. Pertanto, per condurre una verifica accurata della matrice, è preferibile che il laboratorio utilizzatore scelga la matrice più problematica all'interno della specifica categoria di alimenti.

Per la categoria prodotti a base di carne pronti per il consumo è stata scelta la tartare di carne bovina, in quanto si tratta di un prodotto fresco che non deve avere un alto contenuto di microbiota di fondo ed è una matrice di interesse primario dal punto di vista commerciale per il laboratorio.

Il campione utilizzato per comporre le porzioni di prova deriva da diverse unità campionarie di tartare di carne bovina. Questi campioni, in precedenza analizzati dal laboratorio e risultati negativi per *Salmonella spp.* secondo il metodo UNI EN ISO 6579-1:2020 e per *Listeria monocytogenes* secondo il metodo UNI EN ISO 11290-1:2017, sono stati congelati per mantenere inalterata la composizione della matrice.

Successivamente, i campioni sono stati omogeneizzati e suddivisi in porzioni di prova conformi alle linee guida del protocollo di validazione del metodo (UNI EN ISO 16140-3:2021). Ogni singola porzione di prova è costituita da 25 grammi di matrice alimentare.

3.1.2. Selezione dei ceppi di prova utilizzati

I ceppi di prova sono stati scelti dalla collezione del laboratorio utilizzatore Biochimie Lab:

- a) il ceppo WDCM0030 “Vitroids” di *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (codice ATCC di riferimento 13076);
- b) il ceppo numero 1 HOB049LM di *Listeria monocytogenes* proveniente dalla collezione ufficiale dell’Istituto Zooprofilattico di Teramo (Centro di Riferimento Nazionale per *Listeria monocytogenes*).

Abbiamo selezionato specifici ceppi batterici i cui requisiti di crescita sono verosimilmente supportati dalla matrice alimentare oggetto di verifica. Ogni ceppo di prova è stato utilizzato in modo indipendente per contaminare/inquinare artificialmente ogni campione di prova con un'inoculazione a un livello ben definito, come dettagliato nella **Tabella 3**.

3.1.3. Materiali e attrezzature

- Apparecchi per la sterilizzazione a secco (forno) o sterilizzazione umida (autoclave), come specificato in ISO 7218.
- Bilancia tecnica di precisione (con sensibilità di 0.01 g)
- Incubatore, in grado di operare a 30 ± 1 °C
- Incubatore, in grado di operare a 37 ± 1 °C
- Incubatore, in grado di operare a 41.5 ± 1 °C

- Bagnomaria, in grado di operare tra 37 ± 1 °C e 50 ± 1 °C.
- Frigorifero, in grado di operare a 5 °C \pm 3 °C.
- Congelatore, in grado di operare a -20 °C \pm 5 °C.
- Apparecchio di tipo peristalsico per omogeneizzazione (es. Stomacher)
- Buste sterili per Stomacher (volume 400 ml)
- Anse sterili, di diametro approssimativo di 3 mm (volume di 10 μ l)
- Ago-spatola o ago da inoculazione sterili (volume di 1 μ l)
- Tubi, bottiglie o fiale sterili con tappi di capacità appropriata.
- Pipette graduate sterili o pipette automatiche, con capacità nominale di 25 ml, 10 ml e 1 ml.
- Piastre di Petri sterili, con un diametro approssimativo di 90 mm.
- Acqua per Biologia molecolare, DNA-free
- Micropipette (p1000, p100, p20)
- Puntali (1 mL, 100 μ L, 10 μ L con filtro)
- Tubetto Eppendorf per reazione di PCR (0,2 ml)
- Strumento per Real Time PCR AriaMx G8830A-64001

3.1.4. Terreni colturali utilizzati

- Brodo Brain Heart Infusion (BHI) conforme alla norma ISO 6888-1:2020
- Terreno non selettivo Tryptone Soy Agar (TSA) conforme alla norma ISO 11133:2020
- Terreno di arricchimento BPW Buffered Peptone Water conforme alla norma ISO 6579-1:2017
- Capsule RAPID'SalmonellaTM di BioRad (supplemento al terreno di arricchimento)
- Terreno di arricchimento Brodo di mezzo Fraser (HF) conforme alla norma ISO 11290-1:2017

- Terreno di isolamento RAPID'Salmonella agar™ di BioRad
- Terreno di isolamento RAPID'Listeria agar™ di BioRad
- Salmonella Latex test per la conferma di *Salmonella spp.* secondo la norma ISO 6579-1:2017
- Test del Ramnosio per la conferma di *Listeria monocytogenes* secondo la norma ISO 11290-1:2017

3.2. Protocolli analitici utilizzati

3.2.1. Protocollo per la determinazione del LOD₅₀ stimato (eLOD₅₀)

Secondo quanto previsto dalla norma UNI EN ISO 16140-3:2021, la caratteristica prestazionale richiesta per la ri-validazione di un metodo alternativo rapido per la ricerca qualitativa di un patogeno in un prodotto alimentare destinato al consumo umano è il cosiddetto LOD₅₀ stimato o "*estimated Limit of Detection at 50%*" (abbreviato in eLOD₅₀) inteso come la concentrazione minima di analita presente in un campione che ha una probabilità del 50% di essere identificato positivamente dal metodo di rilevazione. Questo parametro è importante perché fornisce informazioni sulla sensibilità del metodo: più basso è l'eLOD₅₀, più sensibile è il metodo. Durante la validazione di un metodo, vengono eseguiti test su campioni con concentrazioni conosciute del patogeno target, variando le concentrazioni fino a quando il metodo rileva positivamente il patogeno nel 50% dei test (e nel 50% dei casi non lo rileva). La concentrazione a cui ciò avviene è l'eLOD₅₀.

In sintesi, l'eLOD₅₀ è un parametro importante nella validazione dei metodi di rilevazione microbiologica poiché fornisce informazioni cruciali sulla sensibilità dei metodi qualitativi per la rilevazione di patogeni alimentari a basse concentrazioni. È stato preferito l'utilizzo di questo nuovo parametro, come indicatore dell'efficacia diagnostica di un metodo qualitativo, in tutti quei casi in cui una determinazione

accurata del LOD₅₀ non è possibile poiché il numero di campioni sottoposti a prova è inferiore rispetto al numero di campioni richiesto dalla norma UNI EN ISO 16140-2:2016, pertanto la parte 3 della suddetta norma si limita alla determinazione del LOD₅₀ stimato.

Il protocollo sperimentale seguito, descritto nella norma UNI EN ISO 16140-3:2021, atto a determinare l'eLOD₅₀ è stato specificatamente sviluppato nel caso in cui ci sia incertezza sul raggiungimento del livello di contaminazione desiderato delle porzioni di prova, come nel presente caso dove si è utilizzata una coltura senza previa conoscenza della concentrazione effettiva per l'inoculazione delle porzioni di prova.

3.2.1.1. Inoculazione delle porzioni di prova

La norma UNI EN ISO 16140-3:2021 prevede l'allestimento di dieci prove suddivise in quattro livelli di inoculazione. Per determinare il livello di inoculazione da utilizzare per inoculare la porzione di prova, utilizzare il valore di LOD₅₀ determinato precedentemente nello studio di validazione del metodo sulle stesse categorie di alimenti. I livelli di contaminazione saranno compresi dalle zero alle 9 volte il valore di LOD₅₀ e fra un livello di inoculazione e l'altro (eccetto il "bianco", privo di qualsivoglia contaminazione artificiale) è necessario tenere conto di un fattore di diluizione di 1:3 (come riportato in **Tabella 4**).

3.2.1.2. Determinazione del volume di inoculo:

- Per ottenere la sospensione per l'inoculazione, 100 µL dei ceppi selezionati sono stati prelevati dalle rispettive soluzioni madre mantenute inattivate alla temperatura stabile di 4°C e inoculati separatamente in 9 mL di brodo Brain Heart Infusion (BHI). In seguito sono stati incubati a 37°C per 24 ore in.
- Allo scopo di titolare la sospensione madre per l'inoculazione dei ceppi di prova, dopo il periodo di incubazione, ciascuna coltura in BHI è diluita in

modo seriale di un fattore 10 per nove volte (in totale si è ottenuto 9 diluizioni seriali dalla -1 alla -9 per ciascun ceppo di prova) in soluzione fisiologica con NaCl 0,9%. Ogni diluizione di ciascun ceppo di prova viene poi seminata in doppio su piastre di Tryptone Soy Agar (TSA), e incubata a 37°C per 22.5 ore.

- Dopo il periodo di incubazione è possibile determinare tramite una conta preliminare la concentrazione della sospensione madre in UFC/ml, riportata in **Tabella 5**.
- Ripetere la coltura di sospensione madre nelle stesse condizioni e tenere conto della concentrazione precedentemente determinata per preparare le diluizioni necessarie per coprire l'intervallo dei livelli di contaminazione per ciascun ceppo di prova. Si assume che la concentrazione di patogeno in ciascun livello di contaminazione sia raggiunta in modo coerente in quanto sono state mantenute le stesse condizioni di coltura.
- I diversi livelli di inoculazione preparati secondo il protocollo riportato in **Tabella 5**, sono introdotti direttamente nella sospensione iniziale (25 gr di matrice di prova + 225 mL di brodo di arricchimento) delle singole porzioni di prova. Dopo l'inoculazione, la sospensione è miscelata accuratamente e viene seguito il protocollo previsto per la ricerca qualitativa di entrambi i patogeni (UNI EN ISO 6579-1:2020 per la ricerca di *Salmonella spp.* e UNI EN ISO 11290-1:2017 per la ricerca di *Listeria monocytogenes*).

Tabella 3: Protocollo descritto dalla norma UNI EN ISO 16140-3:2021 per determinare l'eLOD₅₀ di un metodo qualitativo

	Livello di inoculazione/porzione di prova (25 g)				Numero totale di repliche
	Livello alto (pari a 9 x LOD ₅₀ /porzione di prova)	Livello intermedio (pari a 3 x LOD ₅₀ /porzione di prova)	Livello basso (pari 1 x LOD ₅₀ /porzione di prova)	Bianco (nessuna contaminazione)	
Numero di repliche per livello di inoculazione	1	4	4	1	10

Tabella 4: Volume di inoculazione effettivo per la contaminazione artificiale delle porzioni di prova.

	LOD ₅₀ dello studio di validazione del metodo su matrice "Tartare"	Numero di UFC per porzione di prova inoculate				
		Livello alto	Livello intermedio	Livello basso	Bianco	
Patogeni oggetto della prova	<i>Salmonella enterica</i> subsp. enterica	0,63 UFC/25 g secondo metodo AFNOR 7/11-12/05	6 UFC/25 g	2 UFC/25 g	1 UFC/25 g	0 UFC/25 g
	<i>Listeria monocytogenes</i>	0,7 UFC/25 g secondo metodo AFNOR 7/5-09/01	6 UFC/25 g	2 UFC/25 g	1 UFC/25 g	0 UFC/25 g

Tabella 5: Determinazione della concentrazione della sospensione madre per la contaminazione e del volume per l'inoculo dei diversi livelli di contaminazione (espressa in Unità formanti colonia per mL).

		Titolazione della sospensione madre per l'inoculazione	Volume effettivo per l'inoculo dei diversi livelli di contaminazione			
			Livello Alto	Livello Intermedio	Livello Basso	Bianco
Patogeni oggetto della prova	<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i>	7×10^8 UFC/mL	857 µL della diluizione ⁻⁷ + 9,15mL di soluzione fisiologica (Equivalente a 6 UFC/mL)	333 µL della soluzione del livello Alto di contaminazione (Equivalente a 2 UFC/mL)	167 µL della soluzione del livello Alto di contaminazione (Equivalente a 1 UFC/mL)	/
	<i>Listeria monocytogenes</i>	$1,6 \times 10^9$ UFC/mL	3,75 mL della diluizione ⁻⁸ + 6,25 mL di soluzione fisiologica (Equivalente a 6 UFC/mL)	333 µL della soluzione del livello Alto di contaminazione (Equivalente a 2 UFC/mL)	167 µL della soluzione del livello Alto di contaminazione (Equivalente a 1 UFC/mL)	/

3.2.2. Protocollo per la Ricerca qualitativa di *Salmonella spp* e *Listeria monocytogenes* in PCR Real-Time con metodo interno sviluppato dall'azienda

3.2.2.1. Estrazione di DNA

Kit di estrazione utilizzato: FASTfood Universal DNA extraction di Generon S.p.A. Il kit utilizzato è indicato per l'estrazione rapida di DNA da agenti patogeni di origine alimentare da colture batteriche, alimenti e mangimi da utilizzare in reazioni di amplificazione PCR.

PROCEDURA:

- Preparazione del Campione: Prelevare 1 mL del campione biologico dal medium arricchito e trasferirli in un tubo Eppendorf da 2ml sterile. Si preleva 1 ml da HF e 1 ml da BPW+Caps arricchiti, agitando la busta per risospendere eventuali colonie sedimentate sul fondo. Attenzione, pipettare il brodo dal lato filtrato del sacchetto per evitare di trascinare la matrice nelle eppendorf.
- Separazione della fase liquida dalla fase solida tramite centrifugazione a 13000 rpm per 5 minuti.
- Eliminazione del surnatante, mantenendo il pellet. Porre attenzione a asciugare bene il pellet, per evitare interferenti per la reazione PCR.
- Aggiunta di 200 µL di buffer unico di lisi e estrazione FAST FOOD Universal DNA extractor. Il buffer di estrazione deve essere a temperatura ambiente.
- Lisi termica del Campione a $98 \pm 2^\circ\text{C}$ per 15 minuti con agitazione simultanea a 1000 rpm .
- Diluire l'estratto 1:10 con 800 µL di acqua DNA free per biologia molecolare.
- Miscelare il contenuto nel tubetto Eppendorf per inversione per 3 volte.

- Lieve centrifugazione a 500 rpm per 1 minuto per coadiuvare la sospensione del DNA in soluzione.
- Il DNA così estratto può essere utilizzato immediatamente per l'amplificazione o stoccato ad una temperatura inferiore $\leq -20^{\circ}\text{C}$ per futuri utilizzi.

3.2.2.2. Allestimento della Reazione di PCR

Una volta estratto il DNA si procede con l'analisi per la ricerca qualitativa di *Salmonella spp* e *Listeria monocytogenes* mediante Real Time PCR.

Come kit di amplificazione è stato utilizzato il PATHfinder PMB64A-50 3-Plex Kit Real-Time PCR per ricerca simultanea di *Salmonella spp* e *Listeria monocytogenes* fornito da Generon S.p.A.

Il kit comprende:

- PATHfinder OLIGO Mix
- Generase ULTRA Mastermix
- Unico controllo positivo per *Listeria monocytogenes* e per *Salmonella spp*
- Controllo negativo
- Diluente

La PATHfinder OLIGO Mix è una miscela contenente i primer, le sonde marcate con il colorante FAM (*Salmonella spp*) e le sonde marcate con il colorante Cy5 (*L. monocytogenes*) che si legano in modo complementare alla singola sequenza bersaglio, dNTPs (deossinucleosidi trifosfato), un controllo interno di amplificazione (*Internal Amplification Control* o IAC) nel rispetto dei requisiti della norma ISO 22119, marcato con il colorante HEX e tutti gli altri reagenti necessari alla reazione.

Generase ULTRA Mastermix è invece una miscela contenente la Taq polimerasi.

PROCEDURA:

- Prima di effettuare l'analisi, si consiglia di lasciare i reagenti protetti dall'esposizione alla luce e a temperatura ambiente.
 - Agitare brevemente tutti i reagenti
 - Centrifugare a 13000 rpm per 30 sec.
 - Ricostituire la *Working Mastermix* aggiungendo l'intero contenuto della Generase ULTRA Mastermix e l'intero contenuto del DILUENTE nel tubo di PATHfinder OLIGO Mix in modo da ottenere un'unica miscela (riportata nell'elaborato solamente come "Mastermix") contenente tutto ciò che serve all'allestimento della reazione di amplificazione.
 - Procedere con l'impostazione dell'analisi, trasferendo l'aliquota di Mastermix e i campioni nei pozzetti della piastra. Per preparare ciascuna reazione occorre:
 - Per il Controllo Positivo, trasferire 15 μ L di Mastermix e 5 μ L di controllo positivo nei rispettivi pozzetti. Questi pozzetti conterranno tutti i componenti di reazione e il template di DNA di sia per *Listeria monocytogenes* che per *Salmonella spp.*
 - Per il Controllo Negativo, trasferire la stessa quantità, ovvero 15 μ L di Mastermix e 5 μ L di controllo negativo nei rispettivi pozzetti. Questi conterranno tutti i componenti di reazione eccetto i template di acido nucleico, allo scopo di identificare la presenza di eventuali ampliconi contaminanti.
 - Per i Campioni oggetto dell'analisi, trasferire 15 μ L di Mastermix e 5 μ L del campione sconosciuto nei pozzetti designati. Questo procedimento deve essere eseguito per ciascuno dei campioni da analizzare.
- Sia i controlli che ciascun campione vengono analizzati in duplicato. Il procedimento è stato descritto in modo schematico in **Figura 3**.

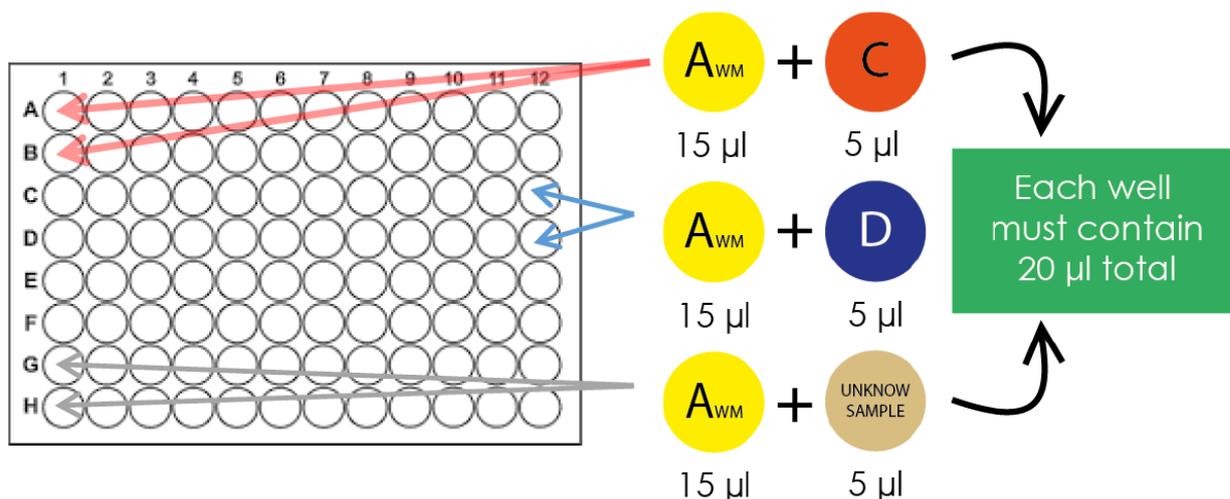


Figura 3: Schema di caricamento della piastra. La Mastermix ricostituita è indicata come “A_{WM}”, mentre controllo positivo è indicato come “C” e controllo negativo come “D”. (Fonte: Product Insert, Generon Real-Time PCR kit for *Salmonella* spp. and *Listeria m.* + IAC detection PMB64A-1-50)

- Una volta trasferite le aliquote nel pozzetto miscelare con brevi pipettate il volume caricato.
- Verificare la corretta configurazione del lettore dello strumento facendo corrispondere alle sonde contenute nella Mastermix le corrette lunghezze d’onda per la lettura del colorante FAM, del colorante Cy5 e del colorante HEX per il controllo d’amplificazione interno (IAC); come descritto in **Tabella 6**.

Tabella 6: Set up del lettore della Real Time PCR.

Target	Reporter Dye	Quencher Dye	Lunghezza d’onda di emissione
<i>Salmonella spp</i>	FAM	BHQ1-NFQ	520 nm (blu)
<i>Listeria monocytogenes</i>	CY5	BHQ2-NFQ	540 nm (rosso)
Controllo Interno di Amplificazione	HEX	BHQ1-NFQ	668 nm (verde)

- Avviare lo strumento secondo il seguente profilo termico:
 - 1 ciclo di **Hot-Start** (95°C per 3:00 min);
 - 45 cicli di **Amplificazione** (fase di *denaturation* a 95°C per 10 secondi e fase di *annealing + elengation + plate reading* a 60°C per 45 secondi).

La durata totale della reazione è di 1:16:24 ore.

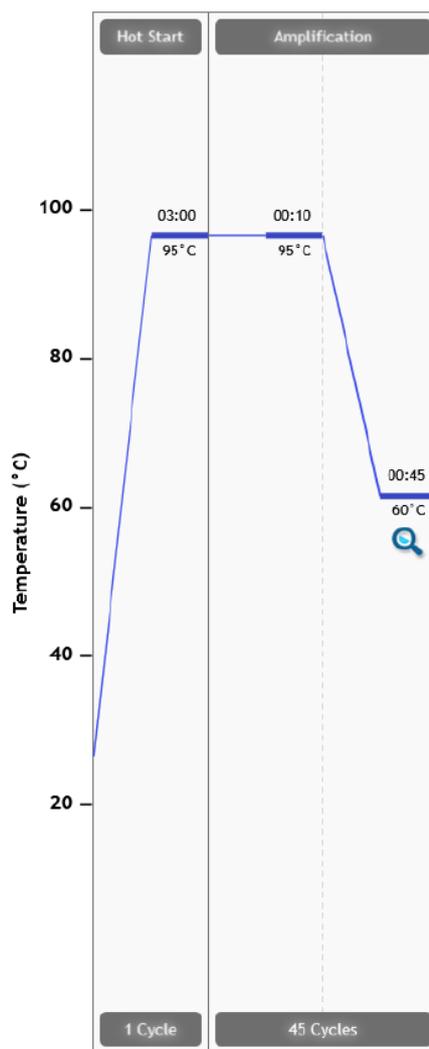


Figura 4: Diagramma delle fasi della reazione a catena della polimerasi utilizzata.

- Per ogni singolo campione, il software di lettura Agilent Aria v. 2.0 riporta dei grafici che mostrano l'andamento di ciascuno dei tre coloranti, FAM, HEX e Cy5. Viene identificato attraverso il software strumentale un valore di ciclo soglia (Cq) per ciascun colorante reporter. Questi valori sono utilizzati per determinare la presenza o meno del patogeno nel campione.

La sessione di PCR è valida solo se per i risultati ottenuti sono state soddisfatte le condizioni riportate in **Tabella 7**: un controllo negativo che non presenta

amplificazione dello IAC indica un'avvenuta inibizione della reazione, indipendente dal campione, pertanto l'amplificazione deve essere ripetuta:

Tabella 7: Condizioni per la corretta validità della reazione di amplificazione tramite kit di amplificazione PATHfinder PMB64A-50 3-Plex Kit Real-Time PCR.

Tipologia di Controllo	<i>Salmonella and Listeria m.</i>	Internal Amplification Control
Controllo Positivo	+	Non significativo
Controllo Negativo	-	+

Se la sessione è valida, i possibili risultati per un campione sconosciuto sono riportati in **Tabella 8** e in **Figura 5**: un campione per il quale lo IAC risulta negativo, indica un'avvenuta inibizione della reazione dipendente dal campione, pertanto è consigliabile rivedere la fase di estrazione.

Tabella 8: Profilo dei risultati dell'amplificazione tramite kit di amplificazione PATHfinder PMB64A-50 3-Plex Kit Real-Time PCR diviso per tipologia di campione.

Tipologia di campione	Risultato dell'amplificazione		
	<i>Salmonella</i>	<i>Listeria m.</i>	Internal Amplification Control
Campione positivo a <i>Salmonella spp</i> (Fig. 3a)	+	-	+
Campione positivo a <i>Listeria monocytogenes</i> (Fig. 3b)	-	+	+
Campione positivo a <i>Salmonella spp</i> e a <i>Listeria monocytogenes</i>	+	+	+
Campione negativo (Fig. 3c)	-	-	+
Campione per il quale la reazione è stata inibita (Fig. 3d)	-	-	-

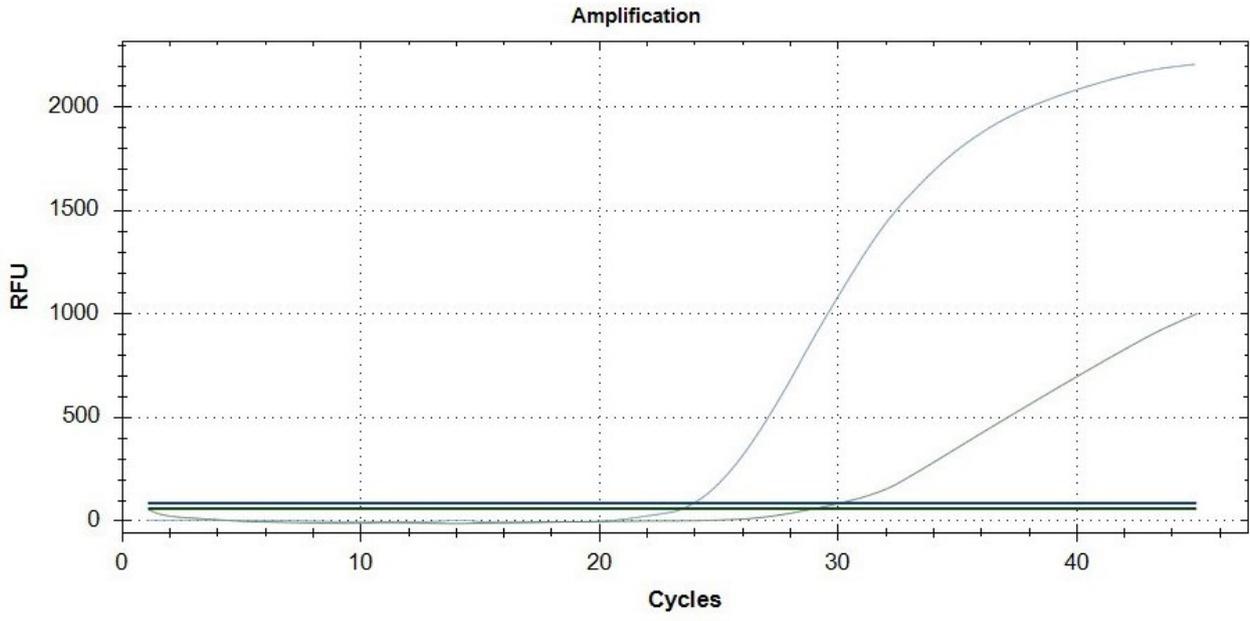


Figura 5a: Rappresentazione schematica di campione positivo per la ricerca di *Salmonella spp.*

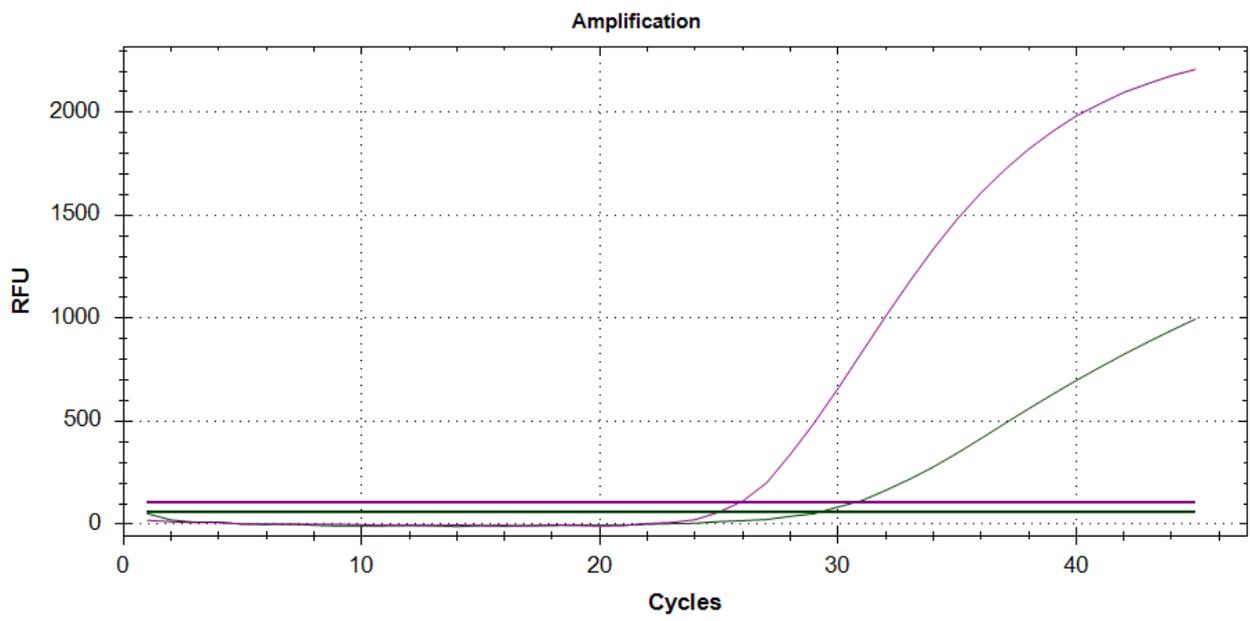


Figura 5b: Rappresentazione schematica di campione positivo per la ricerca di *Listeria monocytogenes*.

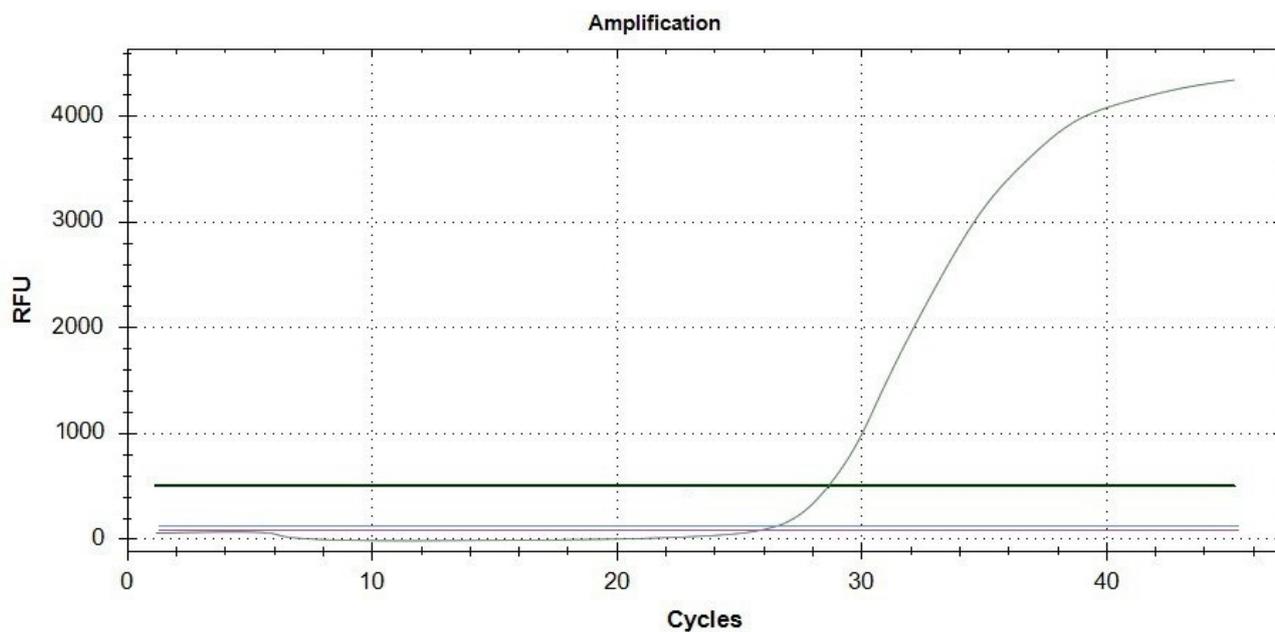


Figura 5c: Rappresentazione schematica di campione negativo per la ricerca di *Salmonella spp* e a *Listeria monocytogenes*.

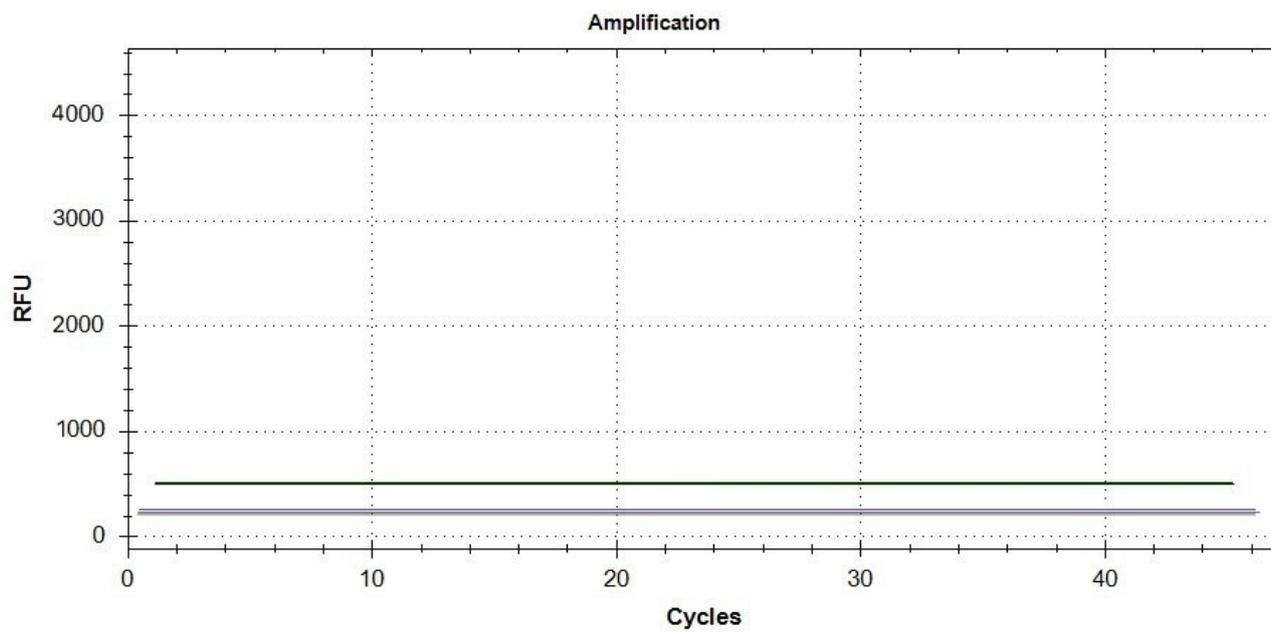


Figura 5d: Rappresentazione schematica di campione in cui c'è stata inibizione della reazione di amplificazione.

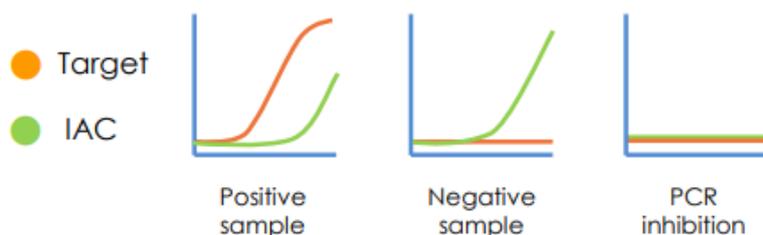


Figura 5e: Rappresentazione schematica della rilevazione del Controllo di Amplificazione Interno (Fonte: https://www.generon.it/import/Importazione/Documenti/Brochure%20PATHfinder_BR_EN_2022.pdf)

3.2.3. Protocollo per la Ricerca qualitativa di *Salmonella spp.*

3.2.3.1. Oggetto e campo di applicazione

Questo protocollo descrive un metodo alternativo per la ricerca qualitativa e la conferma di *Salmonella spp* secondo validazione AFNOR BRD 07/11-12/05 ed è stato utilizzato per la conferma di vitalità del campione risultato positivo alla PCR per *Salmonella spp*. Il metodo di riferimento è UNI EN ISO 6579-1-2017.

Il metodo è applicabile a:

- prodotti destinati al consumo umano e all'alimentazione degli animali;
- campioni ambientali nell'area di produzione e manipolazione degli alimenti;
- campioni provenienti dalla fase di produzione primaria, come polveri e tamponi.

Con questo metodo orizzontale si intende rilevare la maggior parte delle serovar di *Salmonella* e la maggior parte dei ceppi sia mobili che non mobili.

3.2.3.2. Procedura

Il metodo è articolato in tre fasi successive necessarie per la corretta rilevazione e tipizzazione del patogeno oggetto della ricerca.

1. **Arricchimento in terreno liquido selettivo**
2. **Isolamento su terreno cromogeno**
3. **Identificazione e conferma:** Esecuzione di subcolture di colonie riferibili ai patogeni ricercati e conferma per mezzo di appositi test biochimici e sierologici.

Il protocollo è stato validato per l'analisi di porzioni di prova di 25 g.

Per preparare la sospensione iniziale per la fase di arricchimento, aggiungere una quantità del campione (in peso o volume) a una quantità corrispondente di terreno liquido selettivo al fine di ottenere una diluizione 1:10. Aggiungere 25 g di campione a 225 ml di brodo di arricchimento selettivo. Si consiglia di preriscaldare il terreno di arricchimento a temperatura ambiente prima dell'uso.

La ricerca di *Salmonella* necessita di una fase di arricchimento in terreno selettivo in quanto questi microrganismi possono essere presenti in numero basso ed insieme ad un grande numero di altre *Enterobacteriaceae* o di altre famiglie di batteri.

Arricchimento selettivo

- Lasciare che il terreno di arricchimento, il brodo BPW, si equilibri a temperatura ambiente.
- Aggiungere una capsula di RAPID'Salmonella capsule ogni 225 mL di terreno e mescolare per inversione.
- Dal campione da analizzare prelevare asepticamente e in modo rappresentativo, quindi in più punti, 25 g di campione.
- Aggiungere alla porzione di prova 225 ml di BPW addizionato con RAPID'Salmonella capsule.
- Utilizzando un apparecchio di tipo peristaltico (Stomacher) omogenizzare la sospensione per circa 1 minuto.

- Incubare la sospensione a 41.5°C per 19 ore ± 3 ore.

Nota: Dopo l'incubazione, è consentito conservare l'arricchimento selettivo a 5±3 °C per un massimo di 72 ore.

Isolamento su terreno cromogeno

Dalla coltura ottenuta dal brodo di arricchimento selettivo, seminare per isolamento con un'ansa sterile da 10 µl la superficie di una piastra di RAPID'Salmonella agar in modo da ottenere colonie ben isolate.

Incubare le piastre capovolte a 37 ± 1°C per 24 ore ± 2 ore.

Identificazione

All'esame visivo le colonie di sospetta *Salmonella* crescono di colore viola/magenta, di dimensioni medio-piccole. Le colonie con morfologia sospetta devono essere confermate mediante l'utilizzo del latex test.



Figura 6: Colonie di *Salmonella* spp su piastre RAPID'Salmonella.

Conferma con Salmonella latex test

Il Salmonella latex test è stato selezionato come metodo preferenziale di conferma in quanto non necessita di alcuna incubazione e consente di ottenere un risultato nell'immediato, a differenza degli altri metodi descritti nella norma UNI EN ISO 6579-1-2017 che richiedono almeno 18 – 24 ore di incubazione.

- Contrassegnare le colonie sospette su ogni piastra seminata.
- Selezionare almeno 5 colonie di morfologia sospetta
- Se sono disponibili colonie ben isolate di una coltura pura sul terreno cromogeno di identificazione, la conferma biochimica può essere eseguita direttamente su una colonia sospetta e ben isolata dal terreno
- Portare i reagenti al lattice a temperatura ambiente.
- Agitare bene le sospensioni di lattice per assicurarne la completa omogeneità.
- Eliminare il lattice eventualmente trattenuto nel contagocce, al fine di ottenere una miscelazione ottimale.
- Distribuire una goccia di Test Latex all'interno di un sito predisposto sul cartoncino di reazione.
- Depositare una colonia su un'area di reazione e mescolarla con una goccia del Test Latex. Usando un'ansa pulita, depositare una parte della colonia su un'altra area del cartoncino di reazione e mescolarla con una goccia del reagente di controllo. Mescolare per 10–15 secondi. Ruotare delicatamente il cartoncino con un movimento circolare per un massimo di due minuti ed osservare se avviene agglutinazione.
- Interpretare i risultati del test
 - Risultato positivo: il risultato è positivo se l'agglutinazione del latex si verifica entro 2 minuti e non si verifica alcuna agglutinazione del latex

di controllo entro 2 minuti. Il risultato positivo indica la presenza di *Salmonella*.

- Risultato negativo: assenza di agglutinazione entro 2 minuti sia del latex test che del latex di controllo. La colorazione blu di fondo dell'area di reazione rimane invariata. Il risultato negativo indica che la colonia isolata non appartiene al genere *Salmonella*. Eventuali reazioni di agglutinazione tardive (oltre i 2 minuti) devono essere ignorate.
- Risultati non interpretabili: i risultati del test non possono essere interpretati se il latex test e il latex di controllo mostrano agglutinazione, in questi casi la coltura deve essere seminata di nuovo e controllata utilizzando test biochimici e sierologici.

3.2.4. Protocollo per la Ricerca qualitativa di *Listeria monocytogenes*

3.2.4.1. Oggetto e campo di applicazione

Questo protocollo descrive un metodo alternativo per la ricerca qualitativa e la conferma di *Listeria monocytogenes* secondo validazione AFNOR BRD 07/04-09/98 ed è stato utilizzato per la conferma di vitalità del campione risultato positivo alla PCR per *Listeria monocytogenes*. Il metodo di riferimento è UNI EN ISO 11290-1-2017.

Il metodo è applicabile a:

- prodotti destinati al consumo umano e all'alimentazione degli animali;
- campioni ambientali nell'area di produzione e manipolazione degli alimenti;
- campioni provenienti dalla fase di produzione primaria come polveri e tamponi.

3.2.4.2. Procedura

Il metodo è articolato in tre fasi successive necessarie per la corretta rilevazione e tipizzazione del patogeno oggetto della ricerca.

1. **Arricchimento in terreno liquido selettivo**
2. **Isolamento su terreno cromogeno**
3. **Identificazione e conferma:** Esecuzione di subcolture di colonie riferibili ai patogeni ricercati e conferma per mezzo di appositi test biochimici e sierologici.

Il protocollo è stato validato per l'analisi di porzioni di prova di 25 g.

Arricchimento selettivo

- Dal campione da analizzare prelevare asepticamente e in modo rappresentativo, quindi in più punti, 25g di campione e trasferirlo in una busta sterile per stomacher.
- Aggiungere 225 ml di brodo Mezzo Fraser (HF).
- Utilizzando un apparecchio di tipo peristaltico (es. Stomacher) omogenizzare la sospensione per circa 1 minuto.
- Incubare il campione a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ per 24 ore \pm 2 ore.

Nota 1: Dopo l'incubazione, è consentito conservare l'arricchimento selettivo a 5°C per un massimo di 72 ore.

NOTA 2: Durante l'incubazione può svilupparsi una colorazione nera, non indicativa di positività.

Isolamento su terreno cromogeno

- Al termine del periodo di incubazione, seminare per spatolamento 100 μl del brodo di arricchimento selettivo la superficie di una piastra di terreno cromogeno RAPID'Lmono in modo da ottenere colonie ben isolate.
- Incubare le piastre capovolte a 37°C per 24 ore \pm 2 ore.

Identificazione

Considerare come presunte colonie di *Listeria monocytogenes* le colonie di colore blu/verde, di dimensioni medio-piccole, senza alone giallo.

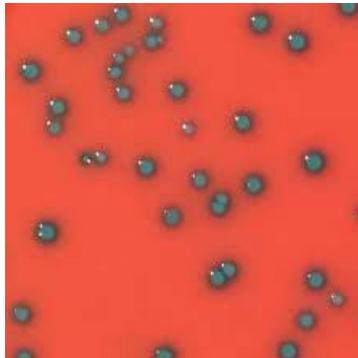


Figura 7: Colonie di *Listeria monocytogenes* su piastre RAPID'Lmono.

Le colonie di colore blu/verde con alone giallo (es. *L. ivanovii*), di colore bianco o giallo pallido con o senza alone giallo sono riconducibili a *Listeria spp.*, diverse da *L.monocytogenes*.

Tutte le colonie con morfologia sospetta devono essere confermate mediante l'utilizzo del test del ramnosio.

NOTA 1: Alcuni ceppi di *L. monocytogenes* esposti a condizioni di stress, in particolare a stress acido, possono mostrare un alone molto debole.

Conferma tramite test del ramnosio

Questo test consente la visualizzazione della fermentazione dei carboidrati ed è utilizzato per la conferma di *L. monocytogenes*, che è positiva per il L-ramnosio e negativa per il D-xilosio. La fermentazione dei carboidrati produce acido che diminuisce il pH del mezzo. Il bromocresolo viola è un colorante indicatore di pH: viola a $\text{pH} \geq 6.8$ e giallo a $\text{pH} \leq 5.2$. *L. monocytogenes* può fermentare il L-ramnosio ma non il D-xilosio. Questa differenza di metabolismo dei carboidrati genera un profilo che aiuta a differenziare *L. monocytogenes* dagli organismi che potrebbero dare un falso positivo sull'Agar cromogenico per *Listeria spp.*

È stato selezionato questo come principale test di conferma unico in quanto non tutti i ceppi di *Listeria monocytogenes* sono beta-emolitici, inoltre è molto rapido: in sole 6 ore è possibile osservare un viraggio colorimetrico del terreno.

- Contrassegnare le colonie di morfologia sospetta su ogni piastra seminata.
- Se sono disponibili colonie ben isolate sul terreno cromogeno di identificazione, la conferma biochimica può essere eseguita direttamente su una colonia sospetta e ben isolata dal terreno. È sufficiente un isolato confermato per ogni campione. Se la prima colonia è negativa, prelevare altre colonie presunte di *L. monocytogenes* dal terreno selettivo (fino a un massimo di cinque colonie da ogni piastra di terreno cromogeno).
- Eseguire il test di conferma per *L. monocytogenes* utilizzando ceppi di controllo positivi e negativi appropriati.
- Con un'ansa sterile prelevare la colonia di morfologia sospetta e stemperarla in una fiala di "Ramnosio Test".
- Incubare la fiala a 37°C per 6h (fino a 24h). Il viraggio del colore dal viola a giallo/arancione determina la positività del test.

3.3. Analisi statistiche utilizzate

L'analisi dei dati ottenuti dall'amplificazione dei campioni artificialmente inquinati con quantità crescenti di inoculo di *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enterica* e la loro rappresentazione grafica è stata eseguita tramite la piattaforma MATLAB.

4. RISULTATI

4.1. Risultati dell'amplificazione con PCR real-time e conferma di vitalità dei campioni contaminati artificialmente

Dopo aver contaminato artificialmente i campioni con quantità crescenti di inoculo di *Listeria monocytogenes* ceppo n°1 HOB049LM e *Salmonella enterica subsp. enterica* ceppo WDCM0030 "Vitroids (fare riferimento al paragrafo 3.2.1), è stato estratto il DNA utilizzando il protocollo riportato nel paragrafo 3.2.2.1. Il DNA è stato poi amplificato in PCR real-time secondo la procedura descritta nel paragrafo 3.2.2.2.

I risultati sono riportati nelle **Tabelle 9, 10, 11**. Le colonne *Well* e *WellName* indicano rispettivamente la posizione del pozzetto di carico e il nome ad esso assegnato. La colonna *Dye* specifica il colorante da rilevare, mentre con *Target* si identifica il corrispondente materiale genetico sottoposto ad amplificazione: in ogni pozzetto, viene rilevato contemporaneamente il colorante HEX (per il controllo interno di amplificazione) e uno tra FAM o Cy5 (a seconda del patogeno ricercato). Nella colonna *Threshold* è annotato il valore della fluorescenza soglia, che rappresenta la differenza tra la fluorescenza rilevata dallo strumento e quella della linea di base. Questo valore viene determinato automaticamente dal software AriaMx. La colonna *Cq* riporta il ciclo in cui il livello di fluorescenza rilevato supera in modo statisticamente significativo il valore impostato della fluorescenza soglia. Nella colonna *FinalCall*, il pozzetto in cui il valore di fluorescenza soglia è stato superato (e quindi il target è stato amplificato) è indicato con "+", mentre il pozzetto in cui il valore di fluorescenza soglia non è stato superato o è stato superato in modo non statisticamente significativo è indicato con "-".

In **Tabella 9** sono riportati i risultati dell'amplificazione del colorante HEX (il cui target associato è il controllo di amplificazione interno IAC). Mentre in **Tabella 10** e **11** sono riportati i risultati dell'amplificazione del colorante FAM (e il target genetico associato, identificato da Generon, per la ricerca qualitativa di *Salmonella spp*) e del colorante Cy5 (e il corrispondente target genetico per la ricerca qualitativa di *L.monocytogenes*). Per valutarne la distribuzione dei valori di ciclo soglia ottenuti sono stati poi calcolati i principali indici di dispersione (**Tabella 12**) e i dati sono stati riportati in un grafico boxplot (**Figura 8** e **Figura 9**).

Tabella 9: Report della rilevazione del Controllo Interno di Amplificazione (IAC) [continua a pagina seguente].

Well	WellName	Dye	Target	Threshold (ΔR)	Cq	FinalCall
A1	Salmo High	HEX	IAC	27464	28.04	+
A2	Salmo High	HEX	IAC	27464	28.28	+
A3	Salmo Med 1	HEX	IAC	27464	28.25	+
A4	Salmo Med 1	HEX	IAC	27464	28.24	+
A5	Salmo Med 2	HEX	IAC	27464	28.15	+
A6	Salmo Med 2	HEX	IAC	27464	27.83	+
A7	Salmo Med 3	HEX	IAC	27464	28.17	+
A8	Salmo Med 3	HEX	IAC	27464	28.49	+
A9	Salmo Med 4	HEX	IAC	27464	27.99	+
A10	Salmo Med 4	HEX	IAC	27464	28.80	+
A11	Salmo Low 1	HEX	IAC	27464	27.93	+
A12	Salmo Low 1	HEX	IAC	27464	28.43	+
B1	Salmo Low 2	HEX	IAC	27464	27.97	+
B2	Salmo Low 2	HEX	IAC	27464	28.50	+
B3	Salmo Low 3	HEX	IAC	27464	28.67	+
B4	Salmo Low 3	HEX	IAC	27464	28.32	+
B5	Salmo Low 4	HEX	IAC	27464	28.62	+
B6	Salmo Low 4	HEX	IAC	27464	27.96	+
B7	Salmo Bianco	HEX	IAC	27464	28.46	+
B8	Salmo Bianco	HEX	IAC	27464	27.80	+
B11	Controllo Positivo Salmo+	HEX	IAC	27464	27.34	+
B12	Controllo Negativo Salmo-	HEX	IAC	27464	29.14	+
G1	LMono High	HEX	IAC	27464	27.86	+
G2	LMono High	HEX	IAC	27464	27.97	+

G3	LMono Med 1	HEX	IAC	27464	27.84	+
G4	LMono Med 1	HEX	IAC	27464	27.84	+
G5	LMono Med 2	HEX	IAC	27464	27.99	+
G6	LMono Med 2	HEX	IAC	27464	27.56	+
G7	LMono Med 3	HEX	IAC	27464	27.96	+
G8	LMono Med 3	HEX	IAC	27464	27.84	+
G9	LMono Med 4	HEX	IAC	27464	28.10	+
G10	LMono Med 4	HEX	IAC	27464	27.92	+
G11	LMono Low 1	HEX	IAC	27464	27.91	+
G12	LMono Low 1	HEX	IAC	27464	27.93	+
H1	LMono Low 2	HEX	IAC	27464	28.14	+
H2	LMono Low 2	HEX	IAC	27464	28.09	+
H3	LMono Low 3	HEX	IAC	27464	27.99	+
H4	LMono Low 3	HEX	IAC	27464	28.03	+
H5	LMono Low 4	HEX	IAC	27464	27.87	+
H6	LMono Low 4	HEX	IAC	27464	28.08	+
H7	LMono Bianco	HEX	IAC	27464	27.92	+
H8	LMono Bianco	HEX	IAC	27464	28.12	+
H11	Controllo Positivo LMono+	HEX	IAC	27464	27.29	+
H12	Controllo Negativo LMono-	HEX	IAC	27464	28.03	+

Tabella 10: Report della rilevazione di *Salmonella spp.*

Well	WellName	Dye	Target	Cq	FinalCall
A1	Salmo High	FAM	Salmonel	16.32	+
A2	Salmo High	FAM	Salmonel	16.19	+
A3	Salmo Med 1	FAM	Salmonel	17.23	+
A4	Salmo Med 1	FAM	Salmonel	17.10	+
A5	Salmo Med 2	FAM	Salmonel	16.10	+
A6	Salmo Med 2	FAM	Salmonel	16.37	+
A7	Salmo Med 3	FAM	Salmonel	17.12	+
A8	Salmo Med 3	FAM	Salmonel	15.43	+
A9	Salmo Med 4	FAM	Salmonel	20.39	+
A10	Salmo Med 4	FAM	Salmonel	19.80	+
A11	Salmo Low 1	FAM	Salmonel	17.44	+
A12	Salmo Low 1	FAM	Salmonel	17.43	+
B1	Salmo Low 2	FAM	Salmonel	17.93	+
B2	Salmo Low 2	FAM	Salmonel	18.05	+
B3	Salmo Low 3	FAM	Salmonel	NoCq	-
B4	Salmo Low 3	FAM	Salmonel	NoCq	-
B5	Salmo Low 4	FAM	Salmonel	28.98	+
B6	Salmo Low 4	FAM	Salmonel	28.35	+
B7	Salmo Bianco	FAM	Salmonel	NoCq	-
B8	Salmo Bianco	FAM	Salmonel	NoCq	-
B11	Controllo Positivo Salmo+	FAM	Salmonel	23.01	+
B12	Controllo Negativo Salmo-	FAM	Salmonel	NoCq	-

Tabella 11: Report della rilevazione di *Listeria monocytogenes*.

Well	WellName	Dye	Target	Cq	FinalCall
G1	LMono High	CY5	Lmono	27.94	+
G2	LMono High	CY5	Lmono	27.78	+
G3	LMono Med 1	CY5	Lmono	37.07	+
G4	LMono Med 1	CY5	Lmono	NoCq	-
G5	LMono Med 2	CY5	Lmono	29.58	+
G6	LMono Med 2	CY5	Lmono	29.80	+
G7	LMono Med 3	CY5	Lmono	30.73	+
G8	LMono Med 3	CY5	Lmono	29.90	+
G9	LMono Med 4	CY5	Lmono	30.51	+
G10	LMono Med 4	CY5	Lmono	31.05	+
G11	LMono Low 1	CY5	Lmono	NoCq	-
G12	LMono Low 1	CY5	Lmono	36.50	+
H1	LMono Low 2	CY5	Lmono	32.11	+
H2	LMono Low 2	CY5	Lmono	31.43	+
H3	LMono Low 3	CY5	Lmono	33.87	+
H4	LMono Low 3	CY5	Lmono	34.95	+
H5	LMono Low 4	CY5	Lmono	NoCq	-
H6	LMono Low 4	CY5	Lmono	NoCq	-
H7	LMono Bianco	CY5	Lmono	NoCq	-
H8	LMono Bianco	CY5	Lmono	NoCq	-
H11	Controllo Positivo LMono+	CY5	Lmono	20.18	+
H12	Controllo Negativo LMono-	CY5	Lmono	NoCq	-

Tabella 12: Calcolo dei principali indici di dispersione dei valori dei Cicli Soglia rilevati dal lettore dello strumento durante l'amplificazione dei campioni contaminati con *Salmonella enterica subs. Enterica* e *Listeria monocytogenes*.

		Media	Deviazione Standard	Mediana	Scarto Interquartile (Q3-Q1)
Patogeni oggetto della prova	<i>Salmonella enterica subsp. enterica</i>	18.77	4.07	17.33	1,61
	<i>Listeria monocytogenes</i>	31.66	2.92	30.39	4,07

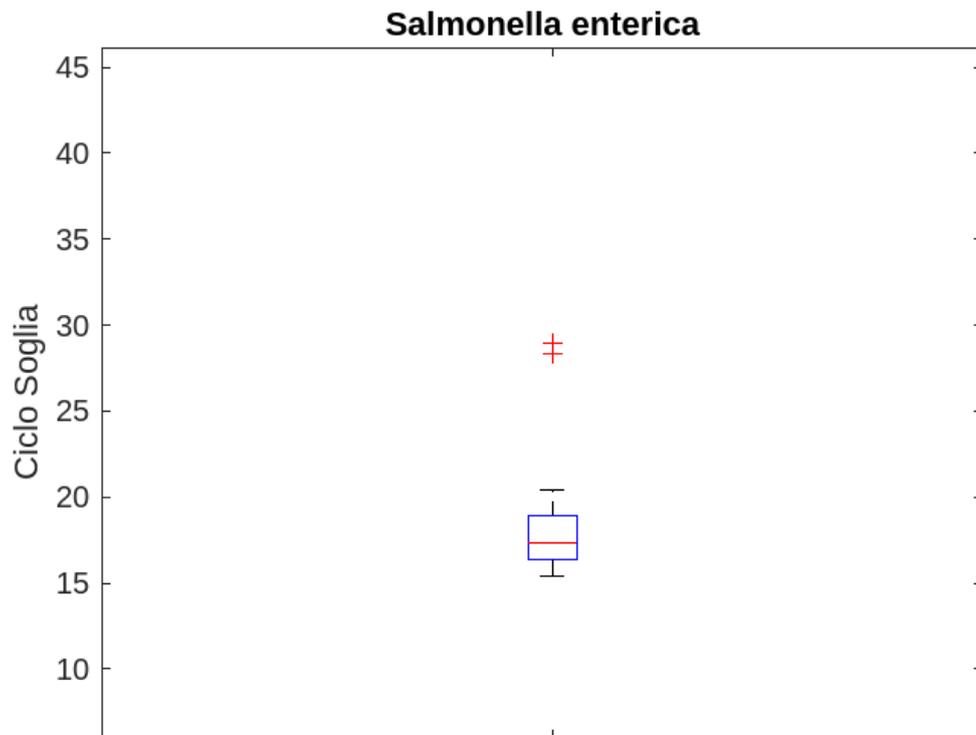


Figura 8: Grafico boxplot rappresentante la distribuzione dei valori dei Cicli Soglia (riportati sull'asse y) rilevati dal lettore dello strumento durante l'amplificazione dei campioni contaminati con *Salmonella enterica subs. enterica*. La reazione di amplificazione termina al 45° ciclo.

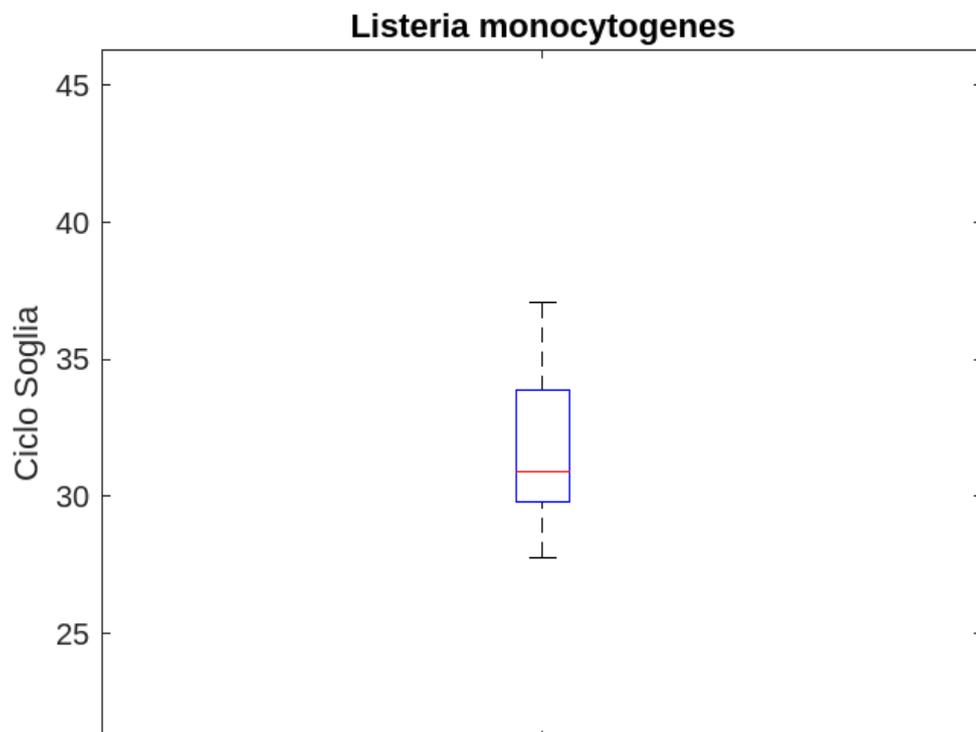


Figura 9: : Grafico boxplot rappresentante la distribuzione dei valori dei Cicli Soglia (riportati sull'asse y) rilevati dal lettore dello strumento durante l'amplificazione dei campioni contaminati con *Listeria monocytogenes*. La reazione di amplificazione termina al 45° ciclo.

Poiché il metodo richiede la conferma di vitalità della colonia per determinare l'effettiva pericolosità dell'alimento riguardo la sicurezza alimentare del consumatore, ogni campione di prova (10 per *Salmonella spp* e 10 per *Listeria monocytogenes*) è stato seminato in parallelo su piastre selettive. In **Tabella 13** sono riportati i risultati della ricerca qualitativa secondo metodo AFNOR BRD 07/11-12/05 per *Salmonella spp* (fare riferimento al paragrafo 3.2.3) e AFNOR BRD 07/04-09/98 per *L.monocytogenes* (fare riferimento al paragrafo 3.2.4).

Tabella 13: Risultati della ricerca qualitativa tramite semina su terreno selettivo di *Salmonella spp.* secondo il metodo AFNOR BRD 07/11-12/05 e *Listeria monocytogenes* secondo il metodo AFNOR BRD 07/04-09/98.

Piastra con relativo Livello di Inquinamento	Presenza di <i>Salmonella enterica subsp. enterica</i>	Presenza di <i>Listeria monocytogenes</i>
HIGH	+	+
MED 1	+	+
MED 2	+	+
MED 3	+	+
MED 4	+	+
LOW 1	+	+
LOW 2	+	+
LOW 3	-	+
LOW 4	-	+
BIANCO	-	-

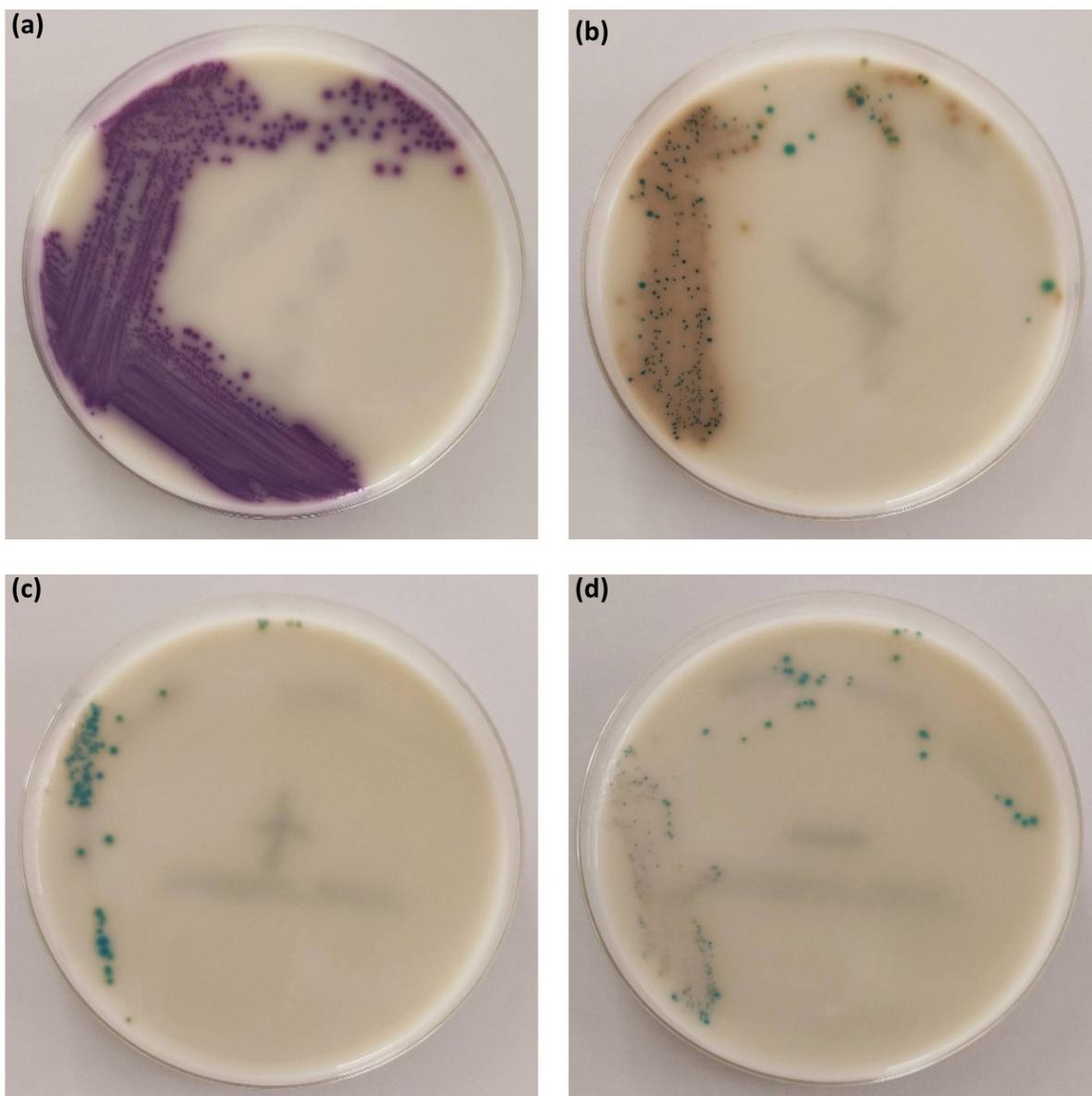


Figura 10: Foto della semina su terreno selettivo di alcuni campioni di prova arricchiti e contaminati con *Salmonella enterica subsp. enterica* ceppo WDCM0030 "Vitroids" secondo il metodo AFNOR BRD 07/11-12/05.

Nella piastra (a) è stato seminato il campione contaminato con livello di inoculazione alto;

Nella piastra (b) è stato seminato il campione contaminato con livello di inoculazione basso numero 3;

Nella piastra (c) è stato seminato il campione contaminato con livello di inoculazione basso numero 4;

Nella piastra (d) è stato seminato il campione bianco, che non ha subito alcuna contaminazione.

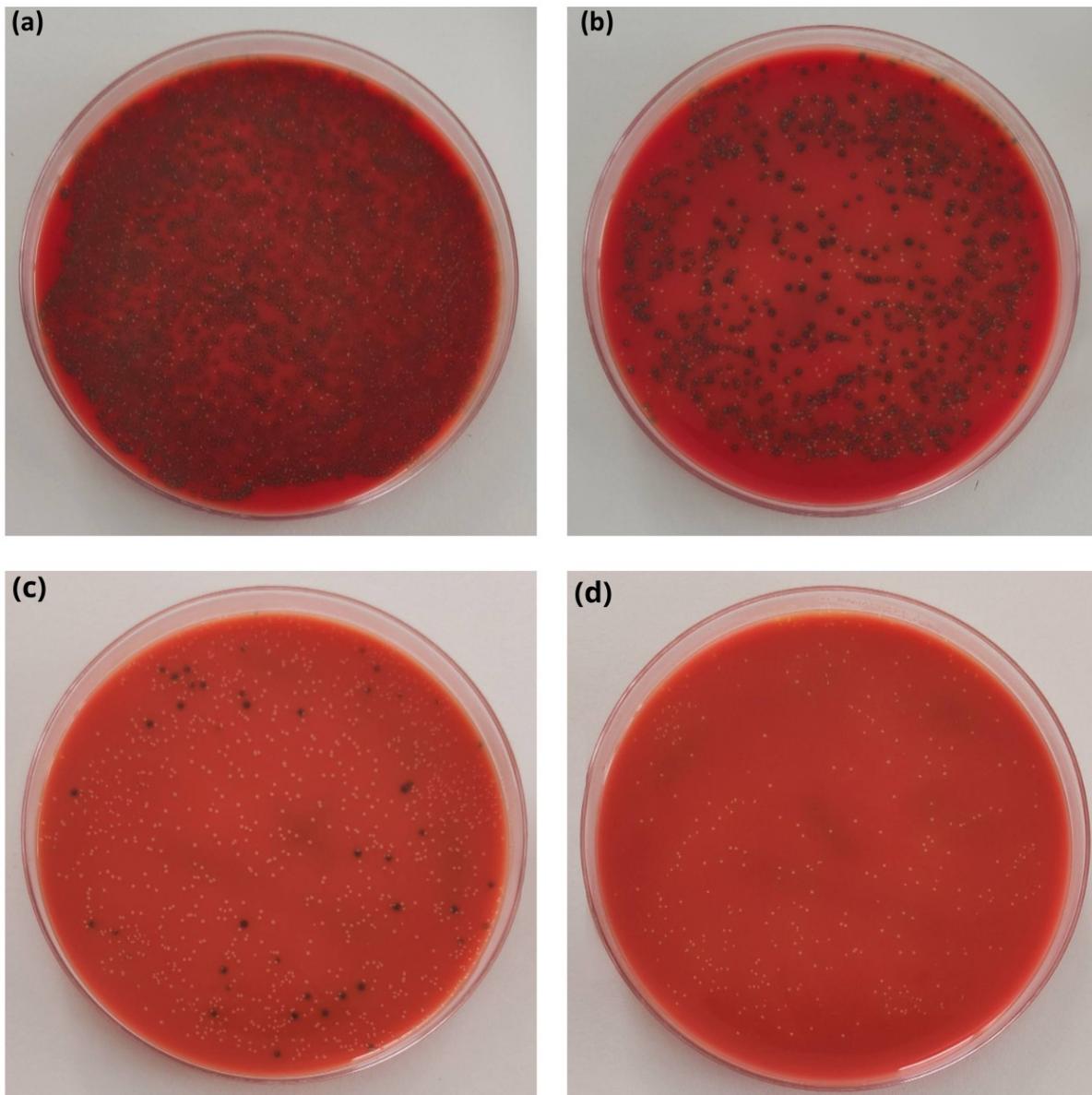


Figura 11: Foto della semina su terreno selettivo di alcuni campioni di prova arricchiti e contaminati con *Listeria monocytogenes* ceppo n°1 HOB049LM secondo il metodo AFNOR BRD 07/04-09/98.

Nella piastra (a) è stato seminato il campione contaminato con livello di inoculazione alto;

Nella piastra (b) è stato seminato il campione contaminato con livello di inoculazione medio numero 1;

Nella piastra (c) è stato seminato il campione contaminato con livello di inoculazione basso numero 4;

Nella piastra (d) è stato seminato il campione bianco, che non ha subito alcuna contaminazione.

4.2. Determinazione dell'eLOD₅₀

Registrando il numero di risultati positivi ottenuti a ciascun livello di inoculazione secondo il metodo alternativo oggetto della validazione e facendo riferimento al prospetto 6 del protocollo 1 descritto nella Norma tecnica UNI EN ISO 16140-3:2021 (riportato integralmente in **Tabella 14**) è possibile determinare l'eLOD₅₀ del metodo in implementazione sulle matrici in validazione.

Tabella 14: Determinazione dell'eLOD₅₀ in base al numero di risultati positivi per livello di contaminazione. Fonte: Norma tecnica UNI EN ISO 16140-3:2021 – protocollo 1 pag. 19, prospetto 6

Livello di inoculazione alto ¹⁾	Livello di inoculazione medio ²⁾	Livello di inoculazione basso ³⁾	Bianco	eLOD ₅₀ CFU/porzione di prova
1/1	4/4	4/4	0/1	< 1,0 x LIL ³⁾
1/1	4/4	3/4	0/1	= 0.5 x LIL
1/1	4/4	2/4	0/1	= 0.7 x LIL
1/1	4/4	1/4	0/1	= 1.0 x LIL
1/1	4/4	0/4	0/1	= 1.5 x LIL
1/1	3/4	4/4	0/1	= 0.7 x LIL
1/1	3/4	3/4	0/1	= 1.0 x LIL
1/1	3/4	2/4	0/1	= 1.3 x LIL
1/1	3/4	1/4	0/1	= 1.7 x LIL
1/1	3/4	0/4	0/1	= 2.3 x LIL
1/1	2/4	4/4	0/1	= 1.1 x LIL
1/1	2/4	3/4	0/1	= 1.5 x LIL
1/1	2/4	2/4	0/1	= 1.9 x LIL
1/1	2/4	1/4	0/1	= 2.6 x LIL
1/1	2/4	0/4	0/1	= 3.7 x LIL
1/1	1/4	4/4	0/1	Risultato non affidabile ⁴⁾
1/1	1/4	3/4	0/1	= 2.1 x LIL
1/1	1/4	2/4	0/1	= 2.8 x LIL
1/1	1/4	1/4	0/1	= 4.0 x LIL
1/1	1/4	0/4	0/1	= 6.3 x LIL
1/1	0/4	4/4	0/1	Risultato non affidabile ⁴⁾
1/1	0/4	3/4	0/1	= 3.0 x LIL
1/1	0/4	2/4	0/1	= 4.3 x LIL
1/1	0/4	1/4	0/1	= 6.7 x LIL
1/1	0/4	0/4	0/1	= 14.0 x LIL

1) High Inoculation Level = HIL

2) Medium Inoculation Level = MIL

3) Low Inoculation Level = LIL

4) La presenza di alcune delle combinazioni di risultati (indicate come "risultato non affidabile") è molto improbabile che si verifichi, pertanto l'esperimento deve essere ripetuto.

4.2.1. Limiti di Accettabilità

Secondo quanto previsto dalla norma UNI EN ISO 16140-3:2021, l'eLOD₅₀ determinato, per essere accettabile, non deve essere maggiore di 4 volte il valore del LOD₅₀ osservato nello studio di validazione. Nuovamente è stato utilizzato per la determinazione del limite di accettabilità il LOD₅₀ ottenuto dallo studio di validazione corrispondente ad analisi su matrice "tartare", la stessa matrice alimentare sottoposta a prova: il calcolo dei limiti di accettabilità è riportato in **Tabella 15**.

Inoltre si sottolinea che il livello in bianco non dovrebbe mai produrre risultati positivi, non avendo subito alcuna contaminazione. Di contro, per la valutazione dei risultati delle porzioni di prova contaminate con l'inoculo di livello alto (equivalente a 9 volte il valore di LOD₅₀ dello studio di validazione) si devono registrare solo risultati positivi. Nel caso in cui fosse stato riscontrato un risultato positivo per il livello in bianco o un risultato negativo per il livello di inoculazione alto, sarebbe stato necessario ripetere l'intero esperimento per tutti i livelli.

Tabella 15: Determinazione del valore e del limite di accettabilità dell'eLOD₅₀ per la validazione del metodo alternativo rapido per la ricerca qualitativa di *Salmonella spp* e *Listeria monocytogenes* mediante PCR Real-Time in prodotti RTE a base di carne bovina.

Microrganismo oggetto della ricerca	LOD ₅₀ ottenuto dallo studio di validazione	eLOD ₅₀ calcolato secondo ISO 16140-3:2021 – protocollo 1, prospetto 6	Limite di accettabilità (eLOD ₅₀ ≤ 4 x LOD ₅₀)
<i>Salmonella spp</i>	0.7 UFC/porzione di prova (25 g)	0,7 UFC/porzione di prova (25 gr)	2.8 UFC/porzione di prova (25 gr)
<i>Listeria monocytogenes</i>	0.63 UFC/porzione di prova (25 g)	0.5 UFC/porzione di prova (25 gr)	2.52 UFC/porzione di prova (25 g)

5. DISCUSSIONE

5.1. Interpretazione dei risultati

Come evidenziato nella **Tabella 9**, il controllo interno di amplificazione (IAC) è stato amplificato con successo ed è stato rilevato come un segnale positivo dallo strumento. Questo risultato indica che la reazione si è sviluppata correttamente in tutti i pozzetti, senza interferenze da parte di eventuali inibitori che avrebbero potuto compromettere l'efficienza del processo.

Come previsto, il campione bianco è risultato negativo per la ricerca di entrambi i patogeni sia nell'analisi in PCR sia nella conferma di vitalità tramite il metodo AFNOR BRD 07/11-12/05 (per *Salmonella spp*) e il metodo AFNOR BRD 07/04-09/98 (per *L.monocytogenes* (**Figura 10d** e **Figura 11d**), confermando l'assenza dei due microrganismi ricercati nella matrice di prova. Inoltre entrambi i campioni contaminati con livello di inoculo alto sono risultati positivi sia secondo il metodo rapido tramite saggio di Real Time PCR sia secondo il metodo di conferma utilizzato (**Figura 10a** e **Figura 11a**).

Dalle conferme di vitalità si può notare che, eccetto per i campioni contaminati con livello di inoculazione basso di *Salmonella enterica* subsp. *enterica* ceppo WDCM0030 "Vitroids" LOW3 e LOW4 (**Figura 10b** e **Figura 10c**) e, ovviamente, i campioni Bianchi, tutti i campioni sono stati contaminati con un inoculo vitale che dopo la fase di arricchimento è stato in grado di crescere sulla matrice di prova.

Il campione contaminato con un livello di inoculazione basso di *Salmonella enterica* LOW4 ha raggiunto il valore threshold di fluorescenza impostato a cicli di reazione molto avanzati (28.98 e 28.35) rispetto alla mediana degli altri campioni inquinati con lo stesso patogeno (17.33). Nonostante appaiano come outlier secondo il boxplot in **Figura 8**, ai fini della nostra analisi sono comunque da considerarsi dei

campioni positivi alla ricerca del patogeno secondo il saggio di Real Time PCR. Un valore di Cq così distante è probabilmente dovuto ad una minore quantità di DNA target all'interno del campione, anche dopo la fase di arricchimento selettivo. A sostegno di questa ipotesi è possibile osservare che il campione inquinato con *Salmonella enterica* LOW4 è risultato negativo alla conferma di vitalità su piastra (**Figura 10c**), indicando come il metodo molecolare sia in grado di identificare anche DNA appartenente a microrganismi non vitali.

I campioni contaminati con *Listeria monocytogenes* ceppo numero 1 HOB049LM al livello di inoculazione medio MID1 (**Figura 11b**) e al livello di inoculazione basso LOW1 sono risultati positivi alla semina su terreno selettivo, indicando che l'inoculo era vitale. Nella reazione di Real Time PCR, invece, è interessante notare che per ciascuno dei due campioni il segnale positivo di amplificazione (quindi di presenza del gene target del patogeno ricercato) rilevato dalla lettura della fluorescenza raggiunge il livello di soglia prefissato dallo strumento a cicli più avanzati (rispettivamente 37.07 e 36.50) rispetto ad altri campioni e solo in uno dei due replicati, mentre nell'altro non lo raggiunge proprio. Un ciclo soglia più alto indica che, in questo caso, il gene target dell'amplificazione potrebbe essere stato presente (sebbene non in misura quantificabile con una metodica qualitativa) in quantità minore, per via di un'estrazione non ottimale ad esempio, o esser stato amplificato più lentamente rispetto agli altri campioni.

Il campione contaminato con *Listeria monocytogenes* ceppo n°1 HOB049LM al livello di inoculazione basso LOW4 è risultato negativo nella ricerca qualitativa con il saggio Real Time PCR, ma positivo secondo il metodo AFNOR BRD 07/04-09/98 (**Figura 11c**), non venendo quindi correttamente discriminato dal metodo alternativo oggetto di validazione.

In definitiva il valore di eLOD₅₀ dello studio di verifica è accettabile in quanto ottenuto dalla stessa quantità di porzione di prova (25g) utilizzata nello studio di validazione e rientra nei limiti di accettabilità prefissati dalla norma UNI EN ISO 16140-3.

5.2. Considerazioni sulla sensibilità e specificità della tecnica

Emerge spontaneo domandarsi se consumare un alimento risultato positivo alla PCR rappresenti una minaccia per la salute del consumatore. La risposta è variabile, in quanto questo metodo funge da test di screening con una specificità elevata, in grado di segnalare con efficacia i campioni in cui l'analita è assente. Trattandosi di un saggio qualitativo, il processo di arricchimento è una fase cruciale per aumentare la concentrazione di analiti, ma nonostante ciò lo strumento vanta una sensibilità molto elevata: dalle 2.00×10^0 alle 2.00×10^3 copie genomiche per reazione di PCR (Purcell et al., 2016; Siala et al., 2017), superando di gran lunga la dose infettiva dei patogeni oggetto della ricerca; essa è in grado di individuare l'analita anche in campioni contenenti microrganismi non vitali e/o non coltivabili per condizioni di stress del microrganismo stesso. Di conseguenza, nell'ambito dell'autocontrollo quotidiano, è utile impiegare tali metodi di screening per discriminare nei tempi imposti dal mercato e dal produttore i campioni negativi e, solamente nei casi positivi, verificare mediante i metodi colturali (Gold Standard) la vitalità del patogeno. Questo approccio risulta essenziale per valutare accuratamente il reale rischio per la salute del consumatore, soprattutto in situazioni dove i prodotti hanno, per caratteristiche dell'alimento stesso, un tempo medio di conservazione inferiore alle tempistiche di analisi con i metodi colturali convenzionali.

5.3. Confronto con altri metodi analitici

I metodi Gold Standard per l'isolamento e l'identificazione di patogeni sono metodi di coltura convenzionali (come quelli definiti dalle norme UNI EN ISO 6579-1:2017 per *Salmonella spp* e 11290-1:2017 per *Listeria monocytogenes*), ampiamente utilizzati nei laboratori diagnostici alimentari per la loro rilevante combinazione di facilità d'uso, elevata sensibilità, affidabilità e costo operativo ragionevole. Tuttavia richiedono per completare l'analisi un periodo variabile di 3 - 5 giorni, dalla fase di pre-arricchimento all'identificazione, a seconda dei test biochimici adottati. Questi metodi seguono quattro fasi distinte: pre-arricchimento non selettivo, arricchimento selettivo, semina su agar di isolamento selettivo e test biochimici e sierologici (Lee et al., 2015). che consentono l'identificazione del patogeno a livello di specie.

D'altro canto, i metodi culturali alternativi validati dal laboratorio, pur rispettando le linee guida proposte dalle norme ISO, rivoluzionano l'approccio partendo direttamente dalla fase di arricchimento selettivo. L'utilizzo di terreni cromogeni consente una rilevazione più rapida, con enumerazione e identificazione dirette sulle piastre di isolamento, abbreviando significativamente i tempi di analisi a 2 - 3 giorni, incluso il periodo necessario per la conferma, rispetto ai metodi convenzionali.

Malgrado i metodi culturali siano economicamente convenienti, la loro limitazione emerge soprattutto quando il prodotto analizzato ha un tempo di conservazione inferiore alle tempistiche di analisi. In termini temporali, i saggi immunologici e molecolari emergono come le opzioni più vantaggiose, offrendo risultati in tempi significativamente più brevi (un giorno per la preparazione del campione e l'arricchimento selettivo e poche ore per la rilevazione). Tuttavia, va sottolineato che entrambi questi metodi, nonostante le loro prestazioni analitiche eccellenti in termini di specificità, presentano alcune criticità, come la bassa sensibilità degli

anticorpi e gli elevati costi operativi della PCR (Ferone et al., 2020). Determinati saggi ELISA, basati su anticorpi policlonali per la ricerca di *Salmonella spp*, mostrano una buona sensibilità, ma a costo di una specificità limitata per alcuni serovar del patogeno, con segnalazioni di cross-reattività degli antigeni (Schneid et al., 2006). Questa problematica, riscontrata sia nei test immunologici che molecolari, non rappresenta un ostacolo significativo poiché l'obiettivo principale è la rilevazione di *Salmonella spp* in generale.

In definitiva il laboratorio ritiene lo screening tramite Real Time PCR il metodo migliore per la ricerca qualitativa di *Salmonella spp* e *Listeria monocytogenes* in alimenti a base di carni crude ready-to-eat. Nonostante l'investimento in attrezzature e reagenti più costosi, la capacità di rilevare simultaneamente più microrganismi con un saggio di PCR Multiplex conferisce a questo metodo un vantaggio distintivo. Inoltre, per la matrice validata, l'effetto matrice non ostacola lo sviluppo della reazione di amplificazione, contribuendo alla robustezza complessiva del metodo.

6. CONCLUSIONE

6.1. Riassunto dei risultati ottenuti e confronto rispetto agli obiettivi della ricerca prefissati

I risultati della ricerca hanno pienamente verificato gli obiettivi prefissati per la validazione del metodo alternativo per la ricerca qualitativa di *Listeria monocytogenes* e *Salmonella spp* tramite Real Time PCR in prodotti a base di carne cruda ready-to-eat. Le due fasi della validazione specificate nella della norma UNI EN ISO 16140-3:2021, ossia la verifica dell'implementazione del metodo e la verifica delle matrici alimentari, hanno raggiunto l'esito atteso, verificando con dati empirici che sulla matrice validata, il LOD₅₀ stimato del metodo alternativo è minore o uguale del LOD₅₀ del metodo di riferimento (*Gold Standard*), pertanto è molto utile per accelerare i tempi di analisi e la produzione di risultati, adeguandosi alle nuove esigenze imposte dal mercato di un prodotto pronto per il consumo dalla breve shelf-life.

In conclusione il metodo è stato correttamente verificato dal laboratorio, accertando che il laboratorio Biochemie Lab è in grado di poterlo applicare in maniera soddisfacente sulla matrice verificata, giacché, secondo quanto previsto dalla norma UNI EN ISO 16140-3:2021, qualsiasi metodo validato introdotto nel laboratorio, successivamente alla pubblicazione della norma, dovrà essere verificato conformemente alla ISO 16140-3 prima dell'implementazione. Il laboratorio inoltre ha implementato la rivalutazione della LOD₅₀ del metodo nell'annuale piano di miglioramento e ricezione delle norme internazionali presente nel Sistema Qualità Aziendale.

6.2. Possibili limitazioni del lavoro svolto e suggerimenti per studi futuri

È importante riconoscere che, nonostante i successi raggiunti, il presente studio potrebbe presentare alcune limitazioni. In particolare, la matrice alimentare oggetto di validazione (ovvero la tartare di bovino), non è una matrice tradizionalmente problematica. Presenta infatti un basso livello di sostanze contaminanti e inibenti, pertanto è stato possibile estrarre DNA sufficiente per qualità e quantità affinché la reazione di amplificazione avvenga senza alcuna inibizione, consentendo l'utilizzo di un kit di estrazione di DNA commerciale che non prevede uno step di purificazione, permettendo di accorciare ulteriormente i tempi di analisi. Pertanto in futuro saranno condotte ulteriori indagini su altri tipi di matrici alimentari, allo scopo di valutare se il metodo garantisce la stessa applicabilità su scala più ampia.

Come già specificato, il presente studio rientra nel piano di aggiornamento previsto dal laboratorio che, in seguito alla verifica di altre 5 matrici di interesse, ha l'obiettivo di rendere il presente metodo alternativo applicabile ad una "limitata gamma di cibi del campo d'uso del laboratorio" (ovvero tipi di alimenti appartenenti ad una categoria validata di interesse primario per il laboratorio e che il laboratorio dichiara di analizzare).

7. BIBLIOGRAFIA

- Abebe, E., Gugsu, G., & Ahmed, M. (2020). Review on Major Food-Borne Zoonotic Bacterial Pathogens. *Journal of Tropical Medicine*, 2020, 1–19. <https://doi.org/10.1155/2020/4674235>
- Acheson, D., & Hohmann, E. L. (2001). Nontyphoidal Salmonellosis. *Clinical Infectious Diseases*, 32(2), 263–269. <https://doi.org/10.1086/318457>
- Amato, E., Filipello, V., Gori, M., Lomonaco, S., Losio, M. N., Parisi, A., Huedo, P., Knabel, S. J., & Pontello, M. (2017). Identification of a major *Listeria monocytogenes* outbreak clone linked to soft cheese in Northern Italy – 2009-2011. *BMC Infectious Diseases*, 17(1), 342. <https://doi.org/10.1186/s12879-017-2441-6>
- Asten, A. J. A. M., & Dijk, J. E. (2005). Distribution of “classic” virulence factors among *Salmonella* spp. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 44(3), 251–259. <https://doi.org/10.1016/j.femsim.2005.02.002>
- Barros, M. D. A. F., Nero, L. A., Monteiro, A. A., & Beloti, V. (2007). Identification of main contamination points by hygiene indicator microorganisms in beef processing plants. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27(4), 856–862. <https://doi.org/10.1590/S0101-20612007000400028>
- Bengtsson-Palme, J. (2017). Antibiotic resistance in the food supply chain: Where can sequencing and metagenomics aid risk assessment? *Current Opinion in Food Science*, 14, 66–71. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.01.010>

- Bhan, M., Bahl, R., & Bhatnagar, S. (2005). Typhoid and paratyphoid fever. *The Lancet*, 366(9487), 749–762. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(05\)67181-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(05)67181-4)
- Bidaisee, S., & Macpherson, C. N. L. (2014). Zoonoses and One Health: A Review of the Literature. *Journal of Parasitology Research*, 2014, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2014/874345>
- Borch, E., & Arinder, P. (2002). Bacteriological safety issues in red meat and ready-to-eat meat products, as well as control measures. *Meat Science*, 62(3), 381–390. [https://doi.org/10.1016/S0309-1740\(02\)00125-0](https://doi.org/10.1016/S0309-1740(02)00125-0)
- Caniça, M., Manageiro, V., Abriouel, H., Moran-Gilad, J., & Franz, C. M. A. P. (2019). Antibiotic resistance in foodborne bacteria. *Trends in Food Science & Technology*, 84, 41–44. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.08.001>
- Carrasco, E., Morales-Rueda, A., & García-Gimeno, R. M. (2012). Cross-contamination and recontamination by Salmonella in foods: A review. *Food Research International*, 45(2), 545–556. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.11.004>
- Carvalho, F., Sousa, S., & Cabanes, D. (2014). How *Listeria monocytogenes* organizes its surface for virulence. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 4. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2014.00048>
- Ceuppens, S., Hessel, C., Rodrigues, R., Bartz, S., Tondo, E., & Uyttendaele, M. (2014). Microbiological quality and safety assessment of lettuce production in

Brazil. *International Journal of Food Microbiology*, 181C, 67–76.

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.025>

Chiara, M., Caruso, M., D'Erchia, A. M., Manzari, C., Fracalvieri, R., Goffredo, E., Latorre, L., Miccolupo, A., Padalino, I., Santagada, G., Chiocco, D., Pesole, G., Horner, D. S., & Parisi, A. (2015). Comparative Genomics of *Listeria* Sensu Lato: Genus-Wide Differences in Evolutionary Dynamics and the Progressive Gain of Complex, Potentially Pathogenicity-Related Traits through Lateral Gene Transfer. *Genome Biology and Evolution*, 7(8), 2154–2172.
<https://doi.org/10.1093/gbe/evv131>

Chlebicz, A., & Śliżewska, K. (2018). Campylobacteriosis, Salmonellosis, Yersiniosis, and Listeriosis as Zoonotic Foodborne Diseases: A Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 15(5), 863.
<https://doi.org/10.3390/ijerph15050863>

Ciccio, P. D., Conter, M., Zanardi, E., Ghidini, S., Vergara, A., Paludi, D., Festino, A. R., & Ianieri, A. (2012). BIOFILMS IN FOOD PROCESSING. *Italian Journal of Food Science*, 24, 203–213.

Codex Alimentarius Commission. (2007). *GUIDELINES ON THE APPLICATION OF GENERAL PRINCIPLES OF FOOD HYGIENE TO THE CONTROL OF LISTERIA MONOCYTOGENES IN FOODS - CAC/GL 61*.

- Connor, B. A., & Schwartz, E. (2005). Typhoid and paratyphoid fever in travellers. *The Lancet Infectious Diseases*, 5(10), 623–628. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(05\)70239-5](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(05)70239-5)
- Culliney, P., & Schmalenberger, A. (2020). Growth Potential of *Listeria monocytogenes* on Refrigerated Spinach and Rocket Leaves in Modified Atmosphere Packaging. *Foods*, 9(9), 1211. <https://doi.org/10.3390/foods9091211>
- Desta Sisay, M. A. (2015). A Review on Major Food Borne Bacterial Illnesses. *Journal of Tropical Diseases*, 03(04). <https://doi.org/10.4172/2329-891X.1000176>
- Dhama, K., Karthik, K., Tiwari, R., Shabbir, M. Z., Barbuddhe, S., Malik, S. V. S., & Singh, R. K. (2015). Listeriosis in animals, its public health significance (food-borne zoonosis) and advances in diagnosis and control: A comprehensive review. *Veterinary Quarterly*, 35(4), 211–235. <https://doi.org/10.1080/01652176.2015.1063023>
- E. Creus, J.F.Pérez, B. Peralta, F. Baucells, & E. Mateu. (2007). Effect of Acidified Feed on the Prevalence of *Salmonella* in Market-age Pigs. *Zoonoses Public Health*, 54, 314–319. <https://doi.org/10.1111/j.1863-2378.2007.01069.x>
- EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ), Ricci, A., Allende, A., Bolton, D., Chemaly, M., Davies, R., Fernández Escámez, P. S., Girones, R., Herman, L., Koutsoumanis, K., Nørrung, B., Robertson, L., Ru, G., Sanaa, M., Simmons, M., Skandamis, P., Snary, E., Speybroeck, N., Ter Kuile, B., ... Lindqvist, R. (2018).

Listeria monocytogenes contamination of ready-to-eat foods and the risk for human health in the EU. *EFSA Journal*, 16(1).
<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2018.5134>

Eng, S.-K., Pusparajah, P., Ab Mutalib, N.-S., Ser, H.-L., Chan, K.-G., & Lee, L.-H. (2015). *Salmonella*: A review on pathogenesis, epidemiology and antibiotic resistance. *Frontiers in Life Science*, 8(3), 284–293.
<https://doi.org/10.1080/21553769.2015.1051243>

European Food Safety Authority & European Centre for Disease Prevention and Control. (2017). The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. *EFSA Journal*, 15(12). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.5077>

Fegan, N., & Jenson, I. (2018). The role of meat in foodborne disease: Is there a coming revolution in risk assessment and management? *Meat Science*, 144, 22–29. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2018.04.018>

Ferone, M., Gowen, A., Fanning, S., & Scannell, A. G. M. (2020). Microbial detection and identification methods: Bench top assays to omics approaches. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 19(6), 3106–3129.
<https://doi.org/10.1111/1541-4337.12618>

Food safety. (2022, May 19). World Health Organization.
<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/food-safety>

Frontiers in Ecol Environ—2017—Koch—Food-animal production and the spread of antibiotic resistance the role of.pdf. (n.d.).

Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., & Williams, P. M. (1996). *Real Time Quantitative PCR.* 6, 986–994.

Heredia, N., & García, S. (2018). Animals as sources of food-borne pathogens: A review. *Animal Nutrition,* 4(3), 250–255.
<https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.04.006>

Higuchi, R., Fockler, C., Dollinger, G., & Watson, R. (1993). Kinetic PCR Analysis: Real-time Monitoring of DNA Amplification Reactions. *Nature Biotechnology,* 11(9), 1026–1030. <https://doi.org/10.1038/nbt0993-1026>

Hoagland, L., Ximenes, E., Ku, S., & Ladisch, M. (2018). Foodborne pathogens in horticultural production systems: Ecology and mitigation. *Scientia Horticulturae,* 236, 192–206. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2018.03.040>

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna. (2021). *Com'è la temperatura del tuo frigorifero?*
<https://www.izsler.it/2021/04/28/come-la-temperatura-del-tuo-frigorifero/>

Jajere, S. M. (2019). A review of Salmonella enterica with particular focus on the pathogenicity and virulence factors, host specificity and antimicrobial resistance including multidrug resistance. *Veterinary World,* 12(4), 504–521.
<https://doi.org/10.14202/vetworld.2019.504-521>

- Jay, J. M., Martin J. Loessner, & David A. Golden. (2005). *Indicators of Food Microbial Quality and Safety in Modern Food Microbiology*.
- Larsen, M. H., Dalmaso, M., Ingmer, H., Langsrud, S., Malakauskas, M., Mader, A., Møretrø, T., Smole Možina, S., Rychli, K., Wagner, M., John Wallace, R., Zentek, J., & Jordan, K. (2014). Persistence of foodborne pathogens and their control in primary and secondary food production chains. *Food Control*, 44, 92–109. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.03.039>
- Lee, K.-M., Runyon, M., Herrman, T. J., Phillips, R., & Hsieh, J. (2015). Review of Salmonella detection and identification methods: Aspects of rapid emergency response and food safety. *Food Control*, 47, 264–276. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2014.07.011>
- Lekkas, P. (n.d.). *The Microbial Ecology Of Listeria Monocytogenes As Impacted By Three Environments: A Cheese Microbial Community; A Farm Environment; And A Soil Microbial Community*.
- Matle, I., Mbatha, K. R., & Madoroba, E. (2020). A review of Listeria monocytogenes from meat and meat products: Epidemiology, virulence factors, antimicrobial resistance and diagnosis. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research*, 87(1). <https://doi.org/10.4102/ojvr.v87i1.1869>
- Mcgowan, K. L., & Rubenstein, M. T. (1989). Use of a Rapid Latex Agglutination Test to Detect Salmonella and Shigella Antigens from Gram-Negative Enrichment

Broth. *American Journal of Clinical Pathology*, 92(5), 679–682.

<https://doi.org/10.1093/ajcp/92.5.679>

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., & Erlich, H. (1986). Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51(0), 263–273.

<https://doi.org/10.1101/SQB.1986.051.01.032>

National Outbreak Reporting System (NORS) | CDC. (2022). CDC.

<https://wwwn.cdc.gov/norsdashboard/>

NSW Food Authority. (2009). *Home fridge temperatures*. NSW Food Authority.

<https://www.foodauthority.nsw.gov.au/about-us/science/science-in-focus/home-fridge-temperatures>

Orsi, R. H., & Wiedmann, M. (2016). Characteristics and distribution of *Listeria* spp., including *Listeria* species newly described since 2009. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(12), 5273–5287. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7552-2>

Prager, R., Fruth, A., & Tschäpe, H. (1995). *Salmonella* enterotoxin (*stn*) gene is prevalent among strains of *Salmonella enterica* , but not among *Salmonella bongori* and other Enterobacteriaceae. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 12(1), 47–50. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.1995.tb00173.x>

- Priyanka, B., Patil, R., & Dwarakanath, S. (2016). A review on detection methods used for foodborne pathogens. *Indian Journal of Medical Research*, *144*(3), 327. <https://doi.org/10.4103/0971-5916.198677>
- Purcell, R. V., Pearson, J., Frizelle, F. A., & Keenan, J. I. (2016). Comparison of standard, quantitative and digital PCR in the detection of enterotoxigenic *Bacteroides fragilis*. *Scientific Reports*, *6*(1), 34554. <https://doi.org/10.1038/srep34554>
- Rapporto One-Health sulle zoonosi nell'Unione europea*. (2021). <https://www.epicentro.iss.it/zoonosi/rapporto-efsa-ecdc-zoonosi-ue-2021>
- REGOLAMENTO (CE) N. 2073/2005 DELLA COMMISSIONE*. (2005).
- Ricke, S. C. (2021). Strategies to Improve Poultry Food Safety, a Landscape Review. *Annual Review of Animal Biosciences*, *9*(1), 379–400. <https://doi.org/10.1146/annurev-animal-061220-023200>
- Rincón-Gamboa, S. M., Poutou-Piñales, R. A., & Carrascal-Camacho, A. K. (2021). Antimicrobial Resistance of Non-Typhoid Salmonella in Meat and Meat Products. *Foods*, *10*(8), 1731. <https://doi.org/10.3390/foods10081731>
- Sajali, N., Wong, S. C., Hanapi, U. K., Abu Bakar @ Jamaluddin, S., Tasrip, N. A., & Mohd Desa, M. N. (2018). The Challenges of DNA Extraction in Different Assorted Food Matrices: A Review. *Journal of Food Science*, *83*(10), 2409–2414. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14338>

- Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M.-A., Roy, S. L., Jones, J. L., & Griffin, P. M. (2011). Foodborne Illness Acquired in the United States—Major Pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, *17*(1), 7–15.
<https://doi.org/10.3201/eid1701.P11101>
- Schneid, A. D. S., Rodrigues, K. L., Chemello, D., Tondo, E. C., Ayub, M. A. Z., & Aleixo, J. A. G. (2006). Evaluation of an indirect ELISA for the detection of Salmonella in chicken meat. *Brazilian Journal of Microbiology*, *37*(3), 350–355.
<https://doi.org/10.1590/S1517-83822006000300027>
- Siala, M., Barbana, A., Smaoui, S., Hachicha, S., Marouane, C., Kammoun, S., Gdoura, R., & Messadi-Akrout, F. (2017). Screening and Detecting Salmonella in Different Food Matrices in Southern Tunisia Using a Combined Enrichment/Real-Time PCR Method: Correlation with Conventional Culture Method. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 2416.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02416>
- Sibanda, T., & Buys, E. M. (2022). *Listeria monocytogenes* Pathogenesis: The Role of Stress Adaptation. *Microorganisms*, *10*(8), 1522.
<https://doi.org/10.3390/microorganisms10081522>
- Thakali, A., & MacRae, J. D. (2021). A review of chemical and microbial contamination in food: What are the threats to a circular food system? *Environmental Research*, *194*, 110635.
<https://doi.org/10.1016/j.envres.2020.110635>

- Uzzau, S., Leori, G. S., Petruzzi, V., Watson, P. R., Schianchi, G., Bacciu, D., Mazzarello, V., Wallis, T. S., & Rubino, S. (2001). *Salmonella enterica* Serovar-Host Specificity Does Not Correlate with the Magnitude of Intestinal Invasion in Sheep. *Infection and Immunity*, 69(5), 3092–3099. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.5.3092-3099.2001>
- Vatanyoopaisarn, S., Nazli, A., Dodd, C. E. R., Rees, C. E. D., & Waites, W. M. (2000). Effect of Flagella on Initial Attachment of *Listeria monocytogenes* to Stainless Steel. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(2), 860–863. <https://doi.org/10.1128/AEM.66.2.860-863.2000>
- Verraes, C., Van Boxstael, S., Van Meervenne, E., Van Coillie, E., Butaye, P., Catry, B., De Schaetzen, M.-A., Van Huffel, X., Imberechts, H., Dierick, K., Daube, G., Saegerman, C., De Block, J., Dewulf, J., & Herman, L. (2013). Antimicrobial Resistance in the Food Chain: A Review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 10(7), 2643–2669. <https://doi.org/10.3390/ijerph10072643>
- Yuan, Y., Xu, W., Zhai, Z., Shi, H., Luo, Y., Chen, Z., & Huang, K. (2009). Universal Primer-Multiplex PCR Approach for Simultaneous Detection of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella* spp. In Food Samples. *Journal of Food Science*, 74(8), M446–M452. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2009.01321.x>