



**UNIVERSITÀ DEGLI  
STUDI DI NAPOLI  
“FEDERICO II”**



Istituto Zooprofilattico  
Sperimentale del Mezzogiorno  
Campania | Calabria

**PhD Tesi**  
**Development of rapid methods for the detection of pathogens  
bacteria in food**

**Sviluppo di metodi rapidi per la ricerca di batteri patogeni negli  
alimenti**

**Candidata**  
Daniela Cristiano

**Tutor**  
Prof. Dr Nicoletta Murru  
**Coordinatore**  
Prof. Paolo De Girolamo

**Co- tutor**  
Dr. Yolande Proroga

*“A Mio Figlio Leonardo, la mia luce”*

## INDICE

|                                                                                                                                           |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| <b>1. CAPITOLO INTRODUZIONE .....</b>                                                                                                     | <b>26</b> |
| 1.1. PANORAMICA GENERALE .....                                                                                                            | 26        |
| 1.1.1. LE NORME INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR<br>STANDARDIZATION: ISO NEL SETTORE ALIMENTARE .....                                       | 31        |
| 1.2. CONTAMINAZIONE MICROBICA DEGLI ALIMENTI .....                                                                                        | 33        |
| 1.2.1. <i>YERSINIA ENTEROCOLITICA</i> NEGLI ALIMENTI .....                                                                                | 34        |
| 1.2.2. METODI ISO PER LA RICERCA DI <i>YERSINIA ENTEROCOLITICA</i> .....                                                                  | 37        |
| 1.2.3. <i>SALMONELLA SPP</i> NEGLI ALIMENTI .....                                                                                         | 40        |
| 1.2.4. METODI NORMATI PER LA RICERCA DI <i>SALMONELLA SPP</i> .....                                                                       | 43        |
| 1.2.5. <i>VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS</i> , <i>VIBRIO CHOLERA</i> E <i>VIBRIO VULNIFICUS</i><br>NEGLI ALIMENTI .....                          | 47        |
| 1.2.6. METODO ISO PER LA RICERCA DI <i>VIBRIO SPP</i> .....                                                                               | 59        |
| <b>2. CAPITOLO BIBLIOGRAFIA .....</b>                                                                                                     | <b>52</b> |
| <b>3. CAPITOLO SCOPO .....</b>                                                                                                            | <b>61</b> |
| <b>4. CAPITOLO ARTICOLO 1: .....</b>                                                                                                      | <b>63</b> |
| <b>RICERCA DI <i>YERSINIA ENTEROCOLITICA</i> NEI PRODOTTI A BASE DI<br/>CARNE DI MAIALE: VALIDAZIONE DEI PROTOCOLLI DI ISOLAMENTO ...</b> | <b>63</b> |
| 4.1. INTRODUZIONE .....                                                                                                                   | 65        |
| 4.2. MATERIALI E METODI .....                                                                                                             | 68        |
| 4.2.1. CAMPIONAMENTO .....                                                                                                                | 68        |
| 4.2.2. RICERCA DI <i>Y. ENTEROCOLITICA</i> IN FETTE DI MAIALE CONTAMINATE<br>SPERIMENTALMENTE MEDIANTE SYBR GREEN PCR .....               | 69        |
| 4.2.3. RICERCA DI <i>Y. ENTEROCOLITICA</i> IN CAMPIONI DI CARNE<br>NATURALMENTE CONTAMINATI MEDIANTE SYBR GREEN PCR .....                 | 72        |
| 4.2.4. ANALISI DEI CEPPI ISOLATI DAI TERRENI IMPIEGATI PER LA<br>RICERCA DI <i>Y. ENTEROCOLITICA</i> MEDIANTE MALDI-TOF-MS .....          | 72        |
| 4.2.5. ANALISI STATISTICA .....                                                                                                           | 75        |
| 4.3. RISULTATI .....                                                                                                                      | 75        |
| 4.3.1. RECUPERO DI <i>Y. ENTEROCOLITICA</i> IN CAMPIONI CONTAMINATI<br>SPERIMENTALMENTE .....                                             | 75        |

|                                                                                                                                                                |            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 4.3.2. RILEVAZIONE DI <i>Y. ENTEROCOLITICA</i> MEDIANTE SYBR GREEN PCR<br>NEI PRODOTTI A BASE DI CARNE DI MAIALE .....                                         | 78         |
| 4.3.3. VALUTAZIONE DELLA FLORA BATTERICA PRESENTE NEI TERRENI DI<br>ARRICCHIMENTO E AGAR SELETTIVI .....                                                       | 80         |
| 4.4. DISCUSSIONI .....                                                                                                                                         | 88         |
| 4.5. BIBLIOGRAFIA .....                                                                                                                                        | 94         |
| <b>5. CAPITOLO ARTICOLO 2: .....</b>                                                                                                                           | <b>101</b> |
| <b>CONFRONTO TRA DIGITAL DROPLET PCR E REAL TIME PCR PER LA<br/>RICERCA DI <i>YERSINIA ENTEROCOLITICA</i> NELLE VERDURE .....</b>                              | <b>101</b> |
| 5.1. INTRODUZIONE .....                                                                                                                                        | 104        |
| 5.2. MATERIALI E METODI .....                                                                                                                                  | 108        |
| 5.2.1. PREPARAZIONE DELL'INOCULO .....                                                                                                                         | 108        |
| 5.2.2. CONTAMINAZIONE DI VERDURE A FOGLIA VERDE .....                                                                                                          | 108        |
| 5.2.3. ESTRAZIONE DEL DNA.....                                                                                                                                 | 109        |
| 5.2.4. REAL TIME PCR .....                                                                                                                                     | 110        |
| 5.2.5. VALUTAZIONE DEL LIVELLO MINIMO E MASSIMO PER IL<br>RILEVAMENTO DELL'AGENTE PATOGENO MEDIANTE DDPCR .....                                                | 111        |
| 5.2.6. SAGGIO DDPCR .....                                                                                                                                      | 112        |
| 5.2.7. CONFRONTO TRA RT PCR E DDPCR PER IL RILEVAMENTO DI<br><i>Y. ENTEROCOLITICA</i> IN VERDURE CONTAMINATE<br>SPERIMENTALMENTE.....                          | 113        |
| 5.2.8. ANALISI STATISTICA .....                                                                                                                                | 114        |
| 5.3. RISULTATI .....                                                                                                                                           | 114        |
| 5.3.1. RILEVAZIONE DI <i>Y. ENTEROCOLITICA</i> MEDIANTE RT PCR NELLE<br>VERDURE A FOGLIA VERDE CONTAMINATE SPERIMENTALMENTE<br>.....                           | 114        |
| 5.3.2. VALUTAZIONE DELLE PRESTAZIONI ANALITICHE DEL TEST DDPCR<br>PER RILEVARE IL DNA DI <i>Y. ENTEROCOLITICA</i> IN COLTURE PURE E<br>CAMPIONI VEGETALI ..... | 118        |
| 5.3.3. CONFRONTO TRA RT PCR E DDPCR NELLA RILEVAZIONE DI<br><i>Y. ENTEROCOLITICA</i> IN VERDURE A FOGLIA VERDE CONTAMINATE<br>SPERIMENTALMENTE .....           | 120        |
| 5.4. CONCLUSIONI .....                                                                                                                                         | 125        |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                     |            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 5.5. BIBLIOGRAFIA .....                                                                                                                                                                                                                                                             | 126        |
| <b>6. CAPITOLO ARTICOLO 3: .....</b>                                                                                                                                                                                                                                                | <b>136</b> |
| <b>RILEVAZIONE DEL PATOGENO <i>VIBRIO SPP</i> NEGLI ALIMENTI: STRATEGIA<br/>DI SCREENING BASATA SULLA PCR PER INDIVIDUARE RAPIDAMENTE I<br/>PATOGENI <i>V. PARAHAEMOLYTICUS</i>, <i>V. CHOLERA</i> E <i>V. VULNIFICUS</i> NEI<br/>MOLLUSCHIBIVALVI: RISULTATI PRELIMINARI .....</b> | <b>136</b> |
| 6.1. INTRODUZIONE .....                                                                                                                                                                                                                                                             | 139        |
| 6.2. MATERIALI E METODI .....                                                                                                                                                                                                                                                       | 142        |
| 6.2.1. CEPPI DI <i>VIBRIO</i> .....                                                                                                                                                                                                                                                 | 142        |
| 6.2.2. CEPPI DI <i>E. COLI</i> E <i>SALMONELLA TYPHIMURIUM</i> .....                                                                                                                                                                                                                | 142        |
| 6.2.3. INOCULO DELLA MATRICE ALIMENTARE .....                                                                                                                                                                                                                                       | 143        |
| 6.2.4. ESTRAZIONE DEL DNA .....                                                                                                                                                                                                                                                     | 145        |
| 6.2.5. q PCR .....                                                                                                                                                                                                                                                                  | 145        |
| 6.2.6. ISOLAMENTO ED IDENTIFICAZIONE BATTERICA MEDIANTE MALDI-<br>TOF-MS .....                                                                                                                                                                                                      | 146        |
| 6.2.7. VERIFICA DELLA MISURAZIONE MICROBIOLOGICA .....                                                                                                                                                                                                                              | 147        |
| 6.3. RISULTATI .....                                                                                                                                                                                                                                                                | 148        |
| 6.4. DISCUSSIONI.....                                                                                                                                                                                                                                                               | 151        |
| 6.5. CONCLUSIONI .....                                                                                                                                                                                                                                                              | 155        |
| 6.6. BIBLIOGRAFIA .....                                                                                                                                                                                                                                                             | 156        |
| <b>7. CAPITOLO ARTICOLO 4: .....</b>                                                                                                                                                                                                                                                | <b>161</b> |
| <b>UNA STRATEGIA ANALITICA RAPIDA PER RILEVARE LA <i>SALMONELLA</i><br/>NEGLI ALIMENTI .....</b>                                                                                                                                                                                    | <b>161</b> |
| 7.1. INTRODUZIONE .....                                                                                                                                                                                                                                                             | 163        |
| 7.2. MATERIALI E METODI .....                                                                                                                                                                                                                                                       | 166        |
| 7.2.1. CAMPIONI DI ALIMENTI CONTAMINATI SPERIMENTALMENTE PER<br>LA RICERCA DI <i>SALMONELLA</i> .....                                                                                                                                                                               | 166        |
| 7.2.2. CEPPI DI <i>SALMONELLA</i> .....                                                                                                                                                                                                                                             | 166        |
| 7.2.3. CONTAMINAZIONE SPERIMENTALE DELLA MATRICE ALIMENTARE<br>.....                                                                                                                                                                                                                | 167        |
| 7.2.4. ESTRAZIONE DEL DNA.....                                                                                                                                                                                                                                                      | 167        |
| 7.2.5. METODO DI EBOLLIZIONE .....                                                                                                                                                                                                                                                  | 168        |

|                                                                                                                                                                                                                                                                                        |            |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 7.2.6. METODO CON CHELEX .....                                                                                                                                                                                                                                                         | 168        |
| 7.2.7. REAL TIME PCR (q PCR) .....                                                                                                                                                                                                                                                     | 169        |
| 7.2.8. CONTAMINAZIONE SPERIMENTALE DELLA MATRICE ALIMENTARE<br>.....                                                                                                                                                                                                                   | 169        |
| 7.2.9. ESTRAZIONE DEL DNA E REAL TIME PCR (I) .....                                                                                                                                                                                                                                    | 170        |
| 7.2.10. RICERCA DI <i>SALMONELLA</i> IN CAMPIONI CONTAMINATI<br>SPERIMENTALMENTE UTILIZZANDO BPW PRERISCALDATO .....                                                                                                                                                                   | 170        |
| 7.2.11. ESTRAZIONE DEL DNA E REAL TIME PCR (II) .....                                                                                                                                                                                                                                  | 171        |
| 7.3. RISULTATI E DISCUSSIONI .....                                                                                                                                                                                                                                                     | 171        |
| 7.4. CONCLUSIONI .....                                                                                                                                                                                                                                                                 | 184        |
| 7.5. BIBLIOGRAFIA .....                                                                                                                                                                                                                                                                | 184        |
| <b>8. CAPITOLO DISCUSSIONI GENERALI .....</b>                                                                                                                                                                                                                                          | <b>189</b> |
| 8.1. VALUTAZIONE DEI PROTOCOLLI DI ISOLAMENTO PER <i>YERSINIA</i><br><i>ENTEROCOLITICA</i> NEI PRODOTTI A BASE DI CARNE DI MAIALE .....                                                                                                                                                | 189        |
| 8.2. CONFRONTO TRA DIGITAL DROPLET PCR E REAL TIME PCR PER LA<br>RICERCA DI <i>YERSINIA ENTEROCOLITICA</i> NELLE VERDURE .....                                                                                                                                                         | 192        |
| 8.3. RILEVAZIONE DEL PATOGENO <i>VIBRIO SPP</i> NEGLI ALIMENTI:<br>STRATEGIA DI SCREENING BASATA SULLA PCR PER INDIVIDUARE<br>RAPIDAMENTE I PATOGENI <i>V. PARAHAEMOLYTICUS</i> , <i>V. CHOLERAE</i> E <i>V.</i><br><i>VULNIFICUS</i> NEI MOLLUSCHIBIVALVI: RISULTATI PRELIMINARI..... | 193        |
| 8.4. UNA STRATEGIA ANALITICA RAPIDA PER RILEVARE LA <i>SALMONELLA</i><br>NEGLI ALIMENTI .....                                                                                                                                                                                          | 196        |
| 8.5. PROSPETTIVE FUTURE.....                                                                                                                                                                                                                                                           | 197        |
| 8.6. BIBLIOGRAFIA .....                                                                                                                                                                                                                                                                | 198        |

## **RINGRAZIAMENTI**

In primis vorrei ringraziare il mio relatore, la professoressa Nicoletta Murru, per avermi dato questa opportunità e per la sua immensa disponibilità.

Ringrazio la mia dirigente, la dottoressa T.R.Yolande Proroga, per avermi offerto la possibilità di svolgere il mio lavoro di tesi presso il suo Laboratorio di Microbiologia e Biotecnologie applicate agli Alimenti dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno di Portici.

È stato per me fondamentale il supporto di Maria Francesca e Silvia: senza il loro aiuto il mio lavoro non sarebbe stato così completo e il mio percorso sarebbe stato più difficile.

Mi è doveroso, infine, ringraziare i miei genitori ed il mio compagno di vita per tutto il supporto e l'amore che ogni giorno mi dimostrano, grazie a loro sono riuscita a raggiungere tanti traguardi nella mia vita.

## ELENCO ABBREVIAZIONI

|        |                                                        |
|--------|--------------------------------------------------------|
| ail:   | Attachment invasion locus                              |
| ASPW:  | Alkaline Saline Peptone Water                          |
| BPW:   | Buffer Peptone Water                                   |
| CIN:   | Agar selettivo Yersinia                                |
| DNA:   | Deoxyribonucleic acid                                  |
| EFSA:  | European Food Safety Authority                         |
| ISO:   | International Organization for Standardization         |
| MKTTN: | Muller Kauffmann Tetrathionate Novobiocin Broth        |
| Myf:   | Mucoid Yersinia factor                                 |
| PCR:   | Polymerase chain reaction                              |
| PSB:   | Peptone Sorbitol Bile Broth                            |
| pYV:   | Plasmid of Yersinia virulence                          |
| qPCR:  | Quantitative polymerase chain reaction (Real time PCR) |
| RVS:   | Rappaport Vassiliadis Soy Broth                        |
| SNA:   | Saline Nutrient Agar                                   |
| SPI:   | Salmonella Pathogenicity Island                        |
| spv:   | Salmonella plasmid virulence                           |
| TCBS:  | Tiosolfato Citrato Bile Saccarosio                     |
| TDH:   | Thermostable direct hemolysin                          |
| TRH:   | Thermostable related hemolysin                         |

XLD: Xylose Lysine Desoxycholate Agar

YE: *Yersinia enterocolitica*

Yst: *Yersinia* stable toxin

## ELENCO DELLE FIGURE

**4.1.** Conta batterica totale su piastre di agar CIN e PCA di campioni di carne suina (2 carcasse, 2 carne macinata e 2 fette) dopo arricchimento in PSB o ITC.

**4.2.** Famiglie batteriche identificate su CIN e PCA mediante MALDI-TOF in sei campioni di maiale (2 carcasse, 2 carne macinata e 2 fette) dopo arricchimento in PSB o ITC (25 °C) rispettivamente per uno, due e cinque o due giorni.

**5.1.** Rilevazione di *Y. enterocolitica* 4/O:3 mediante rtPCR in verdure a foglia contaminate artificialmente con due livelli batterici (MC, medio = 1–2 log CFU/g e HC, alto = 3 log CFU/g) e incubate per 14 giorni a quattro temperature (4, 10, 18 e 25 °C).

## ELENCO DELLE TABELLE

- 1.1. Schema di esecuzione della ISO 10273:2017.
- 1.2. Schema di esecuzione della ISO 18867:2015
- 1.3. Schema di esecuzione della UNI EN ISO 6579-1:2020
- 1.4. Schema di esecuzione del metodo AFNOR BRD 07/06- 07/04
- 1.5. Schema di esecuzione del ISO 21872-1:2017
- 4.1 . Rilevazione dei geni *ystB* e *ystA*, per la ricerca dei ceppi *Yersinia enterocolitica* 1A e 4/O:3, in fette di maiale contaminate artificialmente, mediante SYBR Green PCR. La temperatura di fusione di  $78,5 \pm 1$  °C ha indicato un risultato positivo (D.) del DNA estratto dal brodo PSB.
- 4.2 . Rilevazione del gene *ystB* mediante SYBR Green PCR utilizzato come target per *Y. enterocolitica* biotipo 1A in 35 campioni al 1°, 2° e 5° giorno di incubazione a 25 °C in brodo PSB.
- 4.3 Isolati (n. 960) identificati a livello di specie su piastre di agar CIN e PCA in due campioni di fette, due di carne macinata e due di carcasse di maiale incubati a 25°C in brodi di arricchimento PSB e ITC per uno, due e cinque giorni e per due giorni rispettivamente.
- 5.1. Quantificazione (copie/ $\mu$ l) di DNA estratto da colture pure diluizioni (da 1,5 a  $1,50 \times 10^8$  CFU /ml) di *Y. enterocolitica* e da

verdure a foglia contaminate artificialmente con la stessa carica patogena.

**5.2.** Confronto tra rtPCR e ddPCR nel rilevamento di *Y. enterocolitica* in verdure a foglia contaminate sperimentalmente incubate in parallelo a 4, 18 e 25 °C per 11 giorni.

**6.1.** Confronto tra Real-Time PCR e metodi di isolamento microbiologico secondo ISO 21872-1:2017 per la ricerca di *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* in molluschi contaminati sperimentalmente con due livelli batterici (LL, livello basso =  $1,5 \times 10^3$  CFU/ g; HL, livello alto:  $1,5 \times 10^5$  CFU/ g).

**7.1.** Rilevazione di *Salmonella* utilizzando il metodo per bollitura in verdure a foglia, contaminate artificialmente con due livelli d'inoculo(LC, basso = 1–10 CFU/25g; HC, alto = 10–102 CFU/25g CFU/g) e incubate per 20 ore.

**7.2.** Rilevazione di *Salmonella* utilizzando il metodo Chelex 100 in verdure a foglia contaminate artificialmente con due livelli d'inoculo (LC, basso = 1–10 CFU/25g; HC, alto = 10–102 CFU/25g) e incubate per 20 ore.

**7.3.** Rilevazione di *Salmonella* utilizzando il metodo di estrazione Chelex100 da 20 ml di omogenato di carne macinata (A), verdure a foglia verde (B) e mozzarella di bufala (C) contaminati artificialmente

con due livelli d'inoculo (LC, basso = 1–10 CFU/25g e HC, alto = (10–102 CFU/25g) e incubato in due terreni (BPW= Buffered Peptone Water e BPWC = Buffered Peptone Water with RAPID'S Salmonella Capsule) per 20 ore a due temperature (37°C e 42 °C).

**7.4.** Rilevamento di *Salmonella* da 1 ml e 20 ml di carne macinata (MM), verdure in foglia (LG), mozzarella di bufala (WBMC) e omogeneizzati di cozze (M) contaminati artificialmente con due livelli d'inoculo (LC, basso= 1–10 CFU/25g e HC, alto = (10–102 CFU/25g CFU/g) e incubati in acqua peptonata tamponata preriscaldata (41,5°C) utilizzando il metodo di estrazione Chelex100.

## RIASSUNTO

Nel corso del tempo il concetto di sicurezza alimentare è andato via via cambiando; infatti, è stato necessario sviluppare delle norme a tutela del consumatore, con lo scopo di controllare un alimento in tutte le fasi di produzione. Tutto ciò non è stato semplice e ancora oggi non lo è, perché l'argomento in questione risulta molto complesso ed in continua evoluzione. La prima svolta dal punto di vista normativo, metodologico e di tutela penale in materia di sicurezza alimentare, è avvenuta con l'emanazione della Legge 30 aprile 1962, n. 283 "Disciplina igienica della produzione e della vendita delle sostanze alimentari e delle bevande" e con la Legge 23 dicembre 1978, n. 833, che istituisce il Sistema Sanitario Nazionale (SSN). Ulteriori cambiamenti importanti di natura legislativa si sono avuti con l'entrata in vigore del Reg. (CE) n. 178/2002 dove: "stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare"; e con la traduzione normativa degli enunciati del Libro Bianco, riportati nei regolamenti che costituiscono il c.d. "Pacchetto Igiene".

Tutto questo ha portato ad una maggiore consapevolezza, di quanto fosse necessario avere più controlli nella produzione agro-alimentare, e quindi una maggiore qualità dei processi. A sostegno di questa esigenza una soluzione è stata l'introduzione nel mondo della produzione alimentare della certificazione dei processi, dei servizi e dei prodotti, da parte degli enti privati e/o pubblici, mediante applicazione delle norme “International Organization for Standardization” (ISO). La contaminazione dei cibi può avvenire in diversi modi, tutte le fasi di produzione, manipolazione e conservazione dei cibi, possono essere un rischio. Nel caso delle carni, ad esempio è fondamentale durante la macellazione, non intaccare il pacchetto intestinale, per evitare che il resto della carne destinata al consumo si contamini, così come per la produzione della frutta e verdura un fattore di contaminazione potrebbe essere l'acqua contaminata che viene impiegata per l'irrigazione o il lavaggio. Per non parlare dei rischi che ogni giorno ci sono negli ambienti casalinghi, per una cattiva gestione degli alimenti. Nonostante gli sforzi sostenuti dalle autorità sanitarie e dal mondo industriale, la contaminazione degli alimenti da parte dei microrganismi patogeni come *Salmonella*, *Yersinia*, *Vibrio* e tanti altri, è una eventualità che appare quasi inevitabile, e che può aver luogo in ogni fase della filiera di produzione. Questa criticità viene infatti confermata annualmente dai

report pubblicato dall'EFSA. Da qui nasce l'esigenza di ricorrere a metodiche analitiche affidabili in grado di dare nei tempi più brevi possibili, informazioni sull'origine e la diffusione di tali patogeni, in modo da tutelare il consumatore e gestire nel migliore dei modi eventuali tossinfezioni alimentari. Sulla base di quanto detto lo scopo del lavoro di questa tesi è stato quello di sviluppare metodi più rapidi e sensibili, per la ricerca di alcuni patogeni come *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus* ed *Salmonella spp.*

Per tanto nell'**Articolo 1** è stata valutata la capacità del metodo SYBR Green Real Time PCR di rilevare i ceppi di *Yersinia enterocolitica* (4/O:3 e 1A/O:5). Sono stati analizzati 35 campioni totali, costituiti da carne suina prelevata dalla vendita al dettaglio, e da tamponi effettuati sulle carcasse di maiale ai macelli. Sui campioni analizzati per *Y. enterocolitica*, è stata valutata anche la flora microbica contaminante, cresciute su piastre di agar CIN e su Total Plate Count Agar (PCA) mediante MALDI TOF-MS. L'identificazione è avvenuta dopo, un primo arricchimento in brodi PSB o ITC e successiva semina sul terreno selettivo CIN. Per la ricerca di *Yersinia enterocolitica* (4/O:3, 1A/O:5) è stata utilizzata la SYBR Green Real time PCR. Un gran numero di specie batteriche (10 su CIN e 18 su PCA) è stato isolato dopo

l'arricchimento in PSB, mentre dall'ITC sono stati recuperati 6 specie da CIN e 10 da PCA. Le *Yersiniaceae* erano la famiglia dominante nel primo giorno di incubazione, ma dal secondo giorno la percentuale di isolamento è diminuiti notevolmente. Le prove effettuate sui campioni sperimentalmente contaminati, hanno mostrato notevoli difficoltà, in quanto il biotipo 1A è stato sempre rilevato, a differenza del biotipo 4/O:3. Sulla base dei dati, l'arricchimento in PSB e ITC, attualmente proposti per il rilevamento di *Yersinia enterocolitica*, deve essere ulteriormente valutato e studiato per migliorare la capacità dei due terreni di isolare l'agente patogeno.

Nell'**Articolo 2** sono state utilizzate due piattaforme molecolari, la Real Time PCR e la Droplet Digital PCR (rtPCR e ddPCR), per valutare il comportamento della *Yersinia enterocolitica* in verdure a foglia verde contaminate sperimentalmente. Inoltre, è stata valutata la capacità del metodo di rilevare il patogeno dopo un'incubazione per undici giorni a differenti temperature. Confrontando i due metodi ci sono state differenze evidenti, tra i due approcci tecnici: solo la ddPCR ha rilevato il patogeno nei campioni con una concentrazione bassa di *Y.enterocolitica*. Inoltre, i risultati del presente lavoro hanno evidenziato, che sono di fondamentale importanza la durata e la temperatura di incubazione, per garantire la sopravvivenza e/o la

crescita di *Yersinia enterocolitica* nei vegetali. Infatti è stato notato che, alle temperature comprese tra 18 e 25 °C la concentrazione dell'agente patogeno diminuisce notevolmente durante il tempo l'incubazione. I risultati relativi alla rtPCR, mostrano che il metodo tende a sottostimare la reale prevalenza della *Y. enterocolitica* nelle verdure, e che la temperatura e il tempo attualmente proposti per *Y. enterocolitica* (25 °C per 24 ore), consentono di ottimizzare il rilevamento. In conclusione, la ddPCR può essere senza dubbio proposta come una strategia alternativa molto affidabile per il rilevamento rapido dell'agente patogeno nei campioni alimentari.

Nell' **Articolo 3** è stato valutato un metodo rapido basato sull'uso di una Real time PCR multiplex per rilevare *V.parahaemolyticus*, *V. vulnificus* e *V. cholerae* nei molluschi bivalvi. Trenta aliquote di molluschi bivalvi (*Mytilus galloprovincialis*) sono stati inoculati sperimentalmente con due livelli (basso ed alto) di *V.parahaemolyticus*, *V. vulnificus* e *V. cholerae*. I campioni sono stati analizzati parallelamente anche con il metodo di riferimento ISO 21872-1:2017. Il limite di rilevamento del metodo è stato del 50%, così distribuito 7,67 CFU/g per *V. cholerae*, 0,024 CFU/g per *V. vulnificus* e 1,36 CFU/g per *V. parahaemolyticus*. Il protocollo rtPCR per *V. vulnificus* e *V. cholerae*, è riuscito ad amplificare sia i campioni inoculati con il livello

più basso, che quelli con il livello più alto. Il metodo molecolare, inoltre, ha mostrato un tasso di concordanza del 100% con il metodo microbiologico di riferimento. Il protocollo rtPCR per il *V. parahaemolyticus*, non è mai riuscito ad amplificare i campioni contaminato con il livello basso, ma ha invece amplificato 14 campioni (93,33%) con il livello alto. In conclusione, la Real time PCR multiplex sviluppata si è rivelata affidabile per *V. vulnificus* e *V. cholerae*, mentre per *V. parahaemolyticus* i risultati sono sicuramente promettenti, ma vanno effettuate ulteriori prove. Il metodo proposto potrebbe rappresentare uno strumento di monitoraggio rapido e, se utilizzato, consentirebbe una gestione del controllo ufficiale degli alimenti, sicuramente più veloce e sicuro.

Nell'**articolo 4** è stata sviluppata una strategia analitica rapida, basata sull'uso della Real-Time PCR per ricercare la *Salmonella* in diverse matrici alimentari. Sono stati utilizzati diversi approcci per rilevare rapidamente la *Salmonella*, da campioni di verdure in foglia, carne macinata, mozzarella e cozze contaminati sperimentalmente. I protocolli testati includevano due metodi di estrazione (bollitura e Chelex 100), due brodi di arricchimento (BPW e BPW integrati con RAPID'S *Salmonella* Capsule) e due temperature di incubazione (37°C e 42°C). I risultati ottenuti dal presente lavoro hanno dimostrato, che

usando il brodo BPW preriscaldato per una notte a 41,5°C, ed utilizzando come metodo di estrazione quello con Chelex100, la *Salmonella* potrebbe essere rilevata già dopo quattro ore d'incubazione. Questo protocollo potrebbe rappresentare un metodo alternativo a quello di riferimento UNI EN ISO 6579-1:2020. L'applicazione di questa strategia analitica alternativa renderebbe tutto il processo più rapido, automatizzato e meno dispendioso, consentendo così, sia agli operatori del settore alimentare che le autorità competenti, di migliorare significativamente il controllo sui prodotti alimentari.

## **ABSTRACT**

Over time the concept of food safety has gradually changed; in fact, it was necessary to develop rules to protect the consumer, with the aim of controlling a food in all phases of production. All this was not simple and still is not simple today, because the topic in question is very complex and constantly evolving. The first turning point from a regulatory, methodological and extra-code criminal protection point of view in the field of food safety occurred with the enactment of Law 30 April 1962, n. 283 “Hygienic regulations for the production and sale of food and beverages” and with Law 23 December 1978, n. 833, which establishes the National Health System (NHS). Further important changes of a legislative nature occurred with the entry into force of Reg. (EC) no. 178/2002 “which establishes the general principles and requirements of food legislation, establishes the European Food Safety Authority and establishes procedures in the field of food safety”; and with the normative translation of the statements of the White Paper, which was then transcribed into the regulations that constitute the so-called “Hygiene Package”. All these legislative changes have given rise to greater awareness of how necessary it was to have more controls in agri-food production, and therefore greater quality of the processes. To support this need, one solution was the introduction of the certification

of processes, services and products into the world of food production by private or public bodies. These certifications were guaranteed through the application of the International Organization for Standardization standards, the so-called ISO. Food contamination can occur in different ways, some microorganisms are already present in the intestines of healthy animals and can come into contact with their meat (and then transmit it to those who eat it) during the slaughter process. Fruit and vegetables can also be contaminated if washed or irrigated with contaminated water. Furthermore, food contamination can also occur by operators during the handling, preparation and storage phases of food. Despite the efforts supported by health authorities and the industrial world, the contamination of foods by pathogenic microorganisms such as *Salmonella*, *Yersinia*, *Vibrio* and many others is an eventuality that appears almost inevitable and which can take place in each of the phases of the production chain . This criticality is in fact confirmed annually by the reports published by EFSA. Therefore, there is an increasingly felt need to resort to reliable analytical methods capable of providing information on the origin and spread of these pathogens and on product contamination in the shortest possible time, in order to protect the consumer as much as possible and manage any food poisoning in the best possible way. Based on what has been said,

the aim of the work of this thesis was to develop faster and more sensitive methods for the research of some pathogens such as *Yersinia enterocolitica*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae*, *Vibrio vulnificus* and *Salmonella* spp.

Therefore, in **Article 1**, the ability of the SYBR Green Real Time PCR method to detect *Yersinia enterocolitica* strains (4/O:3 and 1A/O:5) was evaluated. Thirty-five pork samples collected at the retail level and on pork carcasses were analyzed. On the samples analyzed for *Y. enterocolitica*, the non-*Yersinia* microbial community grown on CIN agar plates and on Total Plate Count Agar (PCA) after two different selective enrichments for *Yersinia* was also evaluated, using MALDI TOF-MS analysis. Identification occurred after enrichment in PSB or ITC broths and after sowing on CIN selective medium at different incubation times. For *Yersinia enterocolitica*, SYBR Green Real time PCR was used for the detection of strains (4/O:3, 1A/O:5) for both experimentally contaminated and naturally contaminated samples. A large number of different bacterial genera (10 on CIN and 18 on PCA) were recorded after enrichment in PSB, while in ITC, 6 and 10 genera were recovered on CIN and PCA, respectively. *Yersiniaceae* were the dominant family on the first day of incubation, but by the second day the isolation rate decreased significantly. The tests carried out on

experimentally contaminated samples showed considerable difficulties. The 1A biotype was always detected, while the 4/O:3 strain proved to be poorly competitive. Based on the data, enrichment in PSB and ITC, currently proposed for the detection of *Yersinia enterocolitica*, needs to be further evaluated and studied to increase the recovery capacity of the pathogen.

In **Article 2**, two molecular platforms, Real Time PCR and Droplet Digital PCR (rtPCR and ddPCR), were used to evaluate the behavior of *Yersinia enterocolitica* in experimentally contaminated green leafy vegetables, and the achievable detection rate was also evaluated. after incubation for eleven days at different temperatures. Comparing the two methods there were evident differences, in fact, between the two technical approaches: only ddPCR allowed the detection of the pathogen in green leaves when contaminated at low levels. Furthermore, the results of the present work highlighted the importance of the duration and temperature of incubation on the survival and/or growth of *Yersinia enterocolitica* in vegetables. In fact, at temperatures between 18 and 25 °C the concentration of the pathogen decreases considerably during incubation. Based on the data, the use of rtPCR leads to underestimating the real prevalence of pathogenic *Y. enterocolitica* in vegetables, while the temperature and time currently

proposed for *Y. enterocolitica* (25 °C for 24 hours) allow optimization of detection. In conclusion, ddPCR can undoubtedly be proposed as a reliable alternative strategy for rapid pathogen detection in food samples.

In **Article 3** we proceeded to develop a rapid method based on the use of real-time multiplex polymerase chain reaction (PCR) to detect *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* and *V. cholerae* in bivalve molluscs.

30 aliquots of bivalve molluscs (*Mytilus galloprovincialis*) were experimentally inoculated with two levels of *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* and *V. cholerae*. At the same time, the ISO 21872-1:2017 standard was used, which is a qualitative analysis. The limit of detection was 50%, and was 7.67 CFU/g for *V. cholerae*, 0.024 CFU/g for *V. vulnificus*, and 1.36 CFU/g for *V. parahaemolyticus*. For *V. vulnificus* and *V. cholerae*, the rtPCR protocol amplified the pathogens in the seeded samples at the lowest and highest levels. The evaluated molecular method therefore showed a 100% concordance rate with the reference microbiological method. *V. parahaemolyticus* was never detected in the samples contaminated with the lowest level and was detected in 14 samples (93.33%) seeded with the high level. In conclusion, the developed multiplex real-time PCR proved to be reliable for *V. vulnificus* and *V. cholerae*. The results for *V.*

*parahaemolyticus* are promising, but further analyzes certainly need to be carried out. The proposed method could represent a rapid monitoring tool and, if used, would allow management of official food control, certainly faster and safer.

In **Article 4**, a rapid strategy based on the use of Real-Time PCR to detect *Salmonella* in different food matrices was developed. Several approaches have been used to rapidly detect *Salmonella* from experimentally contaminated samples of leafy vegetables, ground meat, mozzarella, and mussels. The protocols tested included two extraction methods (boiling and Chelex 100), two enrichment broths (BPW and BPW supplemented with RAPID'S *Salmonella* Capsules), and two incubation temperatures (37°C and 42°C). By preheating the BPW to 41.5°C overnight, it was demonstrated that *Salmonella* could be detected in four hours by extracting DNA via the Chelex 100 method. Thus the application of the rapid, automated and low-cost alternative analytical strategy would allow both to food business operators and the competent authority to significantly improve the control of food products. This method could represent an innovative system to implement the evaluation of epidemic outbreaks, guaranteeing not only food safety but also rapid diagnosis in case of emergency.



# 1. INTRODUZIONE

## 1.1 PANORAMICA GENERALE

Il Codice di Hammurabi è una fra le più antiche raccolte di leggi scritte, risalente al XVIII secolo a.C. e appartenente alla civiltà babilonese. Già allora si è sentita l'esigenza di emanare norme che disciplinassero le filiere agroalimentari, dalla produzione primaria alla commercializzazione dei prodotti finiti. Hammurabi, fu il primo a porre le basi scritte per tutelare i consumatori dalle frodi alimentari, per garantire loro la qualità dei prodotti, stabilì anche di chi doveva essere la responsabilità, o del produttore o del venditore, nel caso ci fossero state delle anomalie. Lo stesso Hammurabi aveva, già previsto in base alla gravità del danno che veniva arrecato, che tipo di sanzioni dare ai responsabili, la sanzione massima prevedere, nei casi più gravi la pena di morte, come riportato nella legge 108 che cita: *"Se una taverniera tenutaria di una taverna non accetta frumento secondo il peso lordo per il pagamento della birra, ma prende denaro, o se ricevendo il frumento, annacqua la birra, sia condannata e gettata nell'acqua."* [1].

Un altro aspetto molto importante che emerge dal Codice di Hammurabi è la descrizione per la prima volta della figura del medico

veterinario, a testimonianza del fatto che già all'epoca questa figura esisteva, e non solo, già erano chiare quali responsabilità erano legate a questa figura, come citato nelle leggi 224 e 225. Legge 224:” *Qualora un chirurgo veterinario esegua una seria operazione su un asino od un bue, e lo curi, il proprietario pagherà come compenso al chirurgo un sesto di shekel*”. Legge 225:” *Qualora egli esegua una seria operazione su un asino od un bue, e lo uccida, pagherà al proprietario un quarto del suo valore*”. [2].

Nel corso del tempo il concetto di sicurezza alimentare è andato via via cambiando; infatti, è stato necessario sviluppare delle norme a tutela del consumatore, tali norme prevedevano, che un alimento venisse controllato in tutte le fasi di produzione. Tutto ciò non è stato semplice e ancora oggi non lo è, perché l'argomento in questione risulta molto complesso ed in continua evoluzione. La prima svolta “moderna” dal punto di vista normativo, metodologico e di tutela penale in materia di sicurezza alimentare, è avvenuta con l'emanazione della Legge 30 aprile 1962, n. 283 “Disciplina igienica della produzione e della vendita delle sostanze alimentari e delle bevande” e con la Legge 23 dicembre 1978, n. 833, che istituisce il Sistema Sanitario Nazionale (SSN). Un'ulteriore svolta epocale per quanto riguarda la tutela del consumatore è stata, l'entrata in vigore del Reg. (CE) n. 178/2002 “che stabilisce i

principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare". Anche la traduzione normativa degli enunciati del Libro Bianco dell'anno 2000 della Commissione della CE, che sono stati trascritti nei regolamenti costituenti il c.d. "Pacchetto Igiene", è stata di notevole importanza, tanto da renderli esecutivi in ambito comunitario dal 1° gennaio 2006. Il libro bianco è stato pubblicato il 12 gennaio del 2000, in seguito alle crisi alimentari degli anni '90 (BSE, afta epizootica) e alla necessità della Comunità Europea nel rispondere all'emergenza. Il libro Bianco aveva come obiettivo tutelare il consumatore e creare una vera e propria politica degli alimenti, poiché era già noto l'impatto che il settore alimentare aveva sulla società: *"La produzione e il consumo di alimenti è un fatto centrale di ogni società e ha ripercussioni economiche, sociali e, in molti casi, ambientali. Anche se la protezione della salute deve sempre avere carattere prioritario, si deve tenere conto anche di tali aspetti nello sviluppo di una politica degli alimenti. Inoltre, le condizioni e la qualità dell'ambiente, in particolare dell'ecosistema, possono influire sui diversi anelli della catena alimentare. La politica ambientale svolge quindi un ruolo importante al fine di assicurare alimenti sicuri ai consumatori. Il settore agro-alimentare è di grande importanza per*

*l'economia europea nel suo complesso. L'industria degli alimenti e delle bevande è uno dei principali settori industriali nell' UE”[3].*

Uno degli aspetti più importanti che emerge dal il Libro Bianco è la tutela del consumatore: *“Ai consumatori si dovrebbe offrire un'ampia gamma di prodotti sicuri e di alta qualità provenienti da tutti gli Stati membri. Questo è il ruolo essenziale del mercato interno. La catena della produzione alimentare sta diventando sempre più complessa. Ogni singolo anello di tale catena deve essere altrettanto forte degli altri se si vuole che la salute dei consumatori sia adeguatamente protetta. Tale principio deve valere indipendentemente dal fatto che gli alimenti vengano prodotti nella Comunità europea o importati da paesi terzi. Una politica efficace di sicurezza alimentare deve riconoscere la natura interrelata della produzione alimentare. Essa richiede la valutazione e il monitoraggio dei rischi che possono derivare alla salute dei consumatori dalle materie prime, dalle prassi agricole e dalla lavorazione degli alimenti; essa richiede un'efficace azione normativa per gestire tali rischi nonché la messa in atto e la gestione di sistemi di controllo onde sorvegliare e assicurare l'attuazione di tali norme. Ciascun elemento è parte di un ciclo: in tal modo, gli sviluppi della lavorazione degli alimenti possono richiedere cambiamenti delle normative vigenti, mentre il feed back fornito dai sistemi di controllo*

*può contribuire ad identificare e a gestire i rischi esistenti e quelli emergenti. Ciascuna parte del ciclo deve funzionare adeguatamente se si vogliono realizzare gli standard più elevati possibili di sicurezza alimentare. Tali fattori richiedono quindi un approccio completo e integrato alla sicurezza alimentare. Ciò non significa che l'UE debba essere l'unica responsabile di tutti gli aspetti della sicurezza alimentare. Resta il fatto però che tutti gli aspetti della sicurezza alimentare devono essere affrontati a livello di UE. Ad esempio, la normativa dell'UE deve poter essere fatta efficacemente rispettare negli Stati membri in linea con il principio di sussidiarietà. La responsabilità di fare applicare la legislazione deve rimanere precipuamente di competenza nazionale, regionale e locale. Tuttavia, il mercato interno implica che queste non siano esclusivamente responsabilità nazionali: ciascuno Stato membro è responsabile non solo nei confronti dei propri cittadini, ma di tutti i cittadini dell'UE e dei paesi terzi per quanto concerne gli alimenti prodotti sul suo territorio. ”[3]*

### **1.1.1 LE NORME INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION: ISO NEL SETTORE ALIMENTARE**

L'attenzione che si era sviluppata nei confronti del settore alimentare con la pubblicazione del Libro Bianco, ha dato consapevolezza della necessità di avere un maggiore controllo nella produzione agro-alimentare, e quindi una maggiore qualità dei processi. A sostegno di questa esigenza una soluzione è stata l'introduzione nel mondo della produzione alimentare, sia privati che pubblica, della certificazione dei processi, servizi e prodotti. Tali certificazioni, sono state ottenute dai vari enti, applicando le International Organization for Standardization, ossia le norme ISO. Le prime norme ISO risalgono al XX secolo quando furono creati i primi enti nazionali di standardizzazione. Il primo fu il British Standards Institution (BSI) nel 1901, seguito nel 1918 dall'American National Standards Institute (ANSI) ed infine nel 1917 dal Deutsches Institut für Normung (DIN). Lo scopo di questi enti all'inizio era quello di sviluppare standard nazionali per facilitare la produzione e il commercio di beni e servizi nel settore delle industrie come viti, bulloni e ingranaggi. Solo a partire dagli anni '60 e '70 le ISO furono introdotte anche in altri settori.[4] Una delle prime norme ISO che ancora oggi è sottoposta a continue revisioni, e viene applicata a qualsiasi settore, è la norma UNI EN ISO 9000 "Quality management

systems”, che pone le basi per una corretta gestione dei processi secondo il concetto di qualità. *“Un ‘organizzazione focalizzata sulla qualità promuove una cultura che ha per risultato comportamenti, attitudini, attività e processi tali da apportare valore attraverso il soddisfacimento delle esigenze e delle aspettative dei clienti e delle altre parti interessate rilevanti. La qualità dei prodotti e servizi di un’organizzazione è determinata dalla capacità di soddisfare i clienti e dell’impatto previsto e non previsto sulle parti interessate rilevanti. La qualità di prodotti e servizi comprende non solo le loro funzioni e prestazioni previste, ma anche il loro valore percepito e il beneficio per il cliente.”* [5]

La Norma ISO su citata dava e dà ancora oggi, delle linee guida sulla gestione di un processo di produzione che può riguardare qualsiasi settore, andando invece più nello specifico, nel settore alimentare una delle prime ISO è stata la 7218 scritta nel lontano 1985, ma ancora oggi in vigore con l’aggiornamento del 2013. La seguente norma descrive come deve essere organizzato un laboratorio di microbiologia, quali sono le principali strumentazioni, e le principali tecniche di ricerca e conteggio dei microrganismi. Inoltre, in caso di campioni positivi, all’interno della norma, vengono descritti anche quali test bisogna

effettuare per identificare il patogeno, e come va fatto il calcolo del conteggio per microrganismi ricercati. [6]

## **1.2 CONTAMINAZIONE MICROBICA DEGLI ALIMENTI**

La contaminazione dei cibi può avvenire in diversi modi. Alcuni batteri possono essere già naturalmente presenti all'interno di alcuni alimenti. Nel caso della carne, ad esempio, l'intestino di animali sani è naturalmente abitato da alcuni microrganismi, che durante la macellazione possono contaminare la carne destinata al consumo. Anche la frutta e verdura, se lavate o irrigate con acqua contaminata da feci animali o umane, possono essere una fonte di rischio per la salute umana. Uno dei principali alimenti contaminati da *Salmonella*, sono la carne di pollo ed i suoi derivati; infatti, se il patogeno è presente nel sistema ovarico delle galline può contaminare l'uovo, e rappresentare così una fonte di infezione. Anche i batteri del genere *Vibrio*, che sono normalmente presenti nelle acque, possono rappresentare una probabile fonte di contaminazione per i mitili e le ostriche, che, se consumati crudi, possono essere fonte di tossinfezione alimentare.

Le fonti di contaminazione dei cibi sono davvero innumerevoli, e possono avvenire anche durante la fase di manipolazione e

preparazione, da parte degli operatori. Un altro fattore da non sottovalutare è sicuramente il cibo cotto, che se non conservato in modo adeguato, può comunque rappresentare un rischio. Ecco perché è di fondamentale importanza la conservazione di un alimento mantenendo la catena del freddo, per ridurre così, quelli che possono essere i rischi di contaminazione degli alimenti. [7]

### **1.2.1 YERSINIA ENTEROCOLITICA NEGLI ALIMENTI**

La yersiniosi è una malattia che si sviluppa in seguito all'assunzione di un alimento o bevanda, contaminati dal batterio *Yersinia*, principalmente dalla specie *Yersinia enterocolitica*. Secondo i dati pubblicati dall'EFSA nel 2023, che riguardano gli ultimi 4 anni 2018-2022, la yersiniosi è stata la terza infezione gastrointestinale di origine alimentare più frequente.[8] La *Yersinia enterocolitica* è un batterio Gram-negativo a forma bastoncellare, è un anaerobio facoltativo, ed appartiene alla famiglia delle *Yersiniaceae*. La *Y. enterocolitica* è divisa in sei biotipi (1A, 1B, 2, 3, 4, 5) tutti patogeni per l'uomo, ad eccezione del biotipo 1A.[9]

La virulenza dei biotipi patogeni dipende dalla presenza di geni sia cromosomici che plasmidici. [10] I geni di virulenza cromosomica includono: locus di invasione e dell'attaccamento (*ail*), che codifica per

una proteina di superficie responsabile della resistenza del siero e dell'adesione alle cellule e alla matrice extracellulare; il gene di invasione (*inv*) che codifica per una proteina della membrana esterna che, legandosi alle integrine B1, media la traslocazione attraverso le cellule M delle placche di Peyer[11]; il fattore mucoide *Yersinia* (*myf*) che codifica per proteine responsabili dell'espressione e dell'assemblaggio di una struttura fibrillare; l'elemento reattivo dell'ospite P (*hreP*) codifica per una proteasi espressa specificamente durante l'infezione come pro-proteina, specifica per *Y. enterocolitica*, poiché non può essere trovata in altre specie di *Yersinia* [12]; la tossina stabile della *Yersinia* (*yst*) che può essere divisa in tre sottotipi (*ystA*, *ystB* e *ystC*) che codificano per l'enterotossina termostabile che svolge un ruolo nella diarrea durante l'infezione [13]. Inoltre, esistono diversi geni plasmidici di virulenza (*pYV*), tra cui l'adesina A (*yadA*), il cui prodotto è coinvolto nell'auto-agglutinazione, nella resistenza sierica e nell'adesione [14]; e il regolatore trascrizionale (*virF*), che codifica i geni plasmidici di virulenza attivatori delle proteine della membrana esterna di *Yersinia* (*yop regulon*) [15] che è quindi fondamentale per il sistema di secrezione di tipo III. I ceppi del biotipo 1A sono stati considerati non patogeni poiché non hanno il plasmide *pYV* e alcuni geni di virulenza cromosomica, cioè *ystA* e *myfA* [16], anche se è

presente inv, sembra essere non funzionale nella maggior parte dei ceppi 1A. [17]

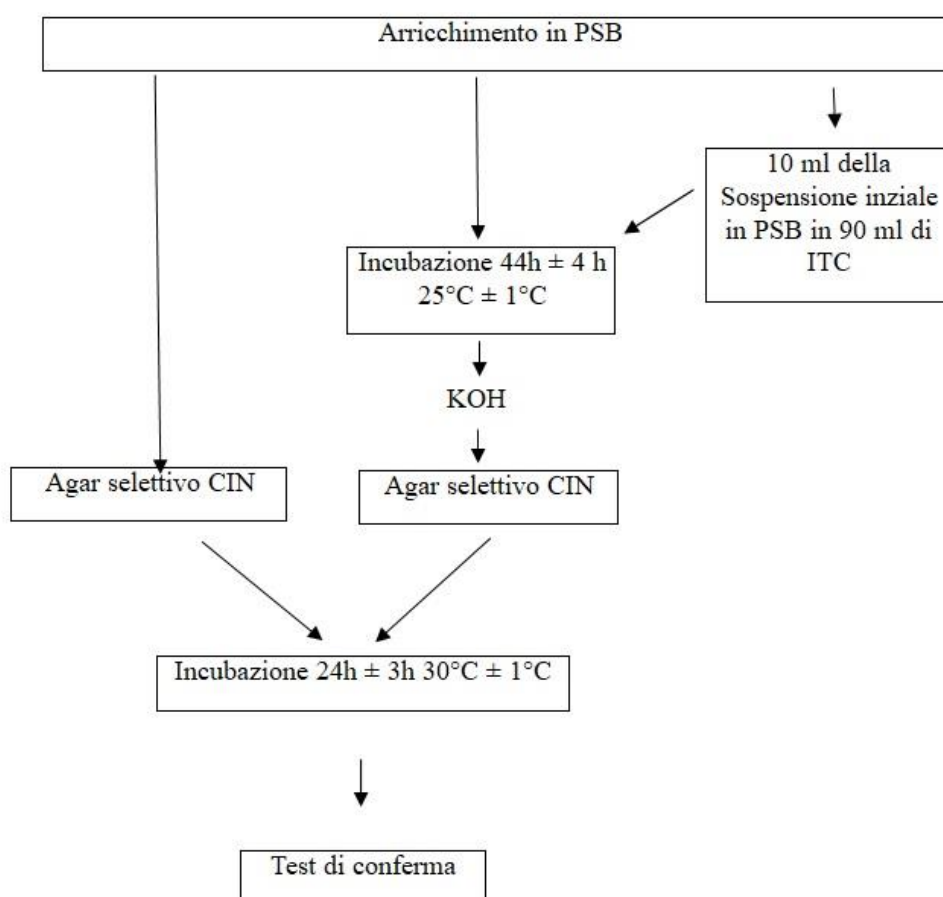
Tuttavia, questo biotipo è comunque considerato potenzialmente patogene, perché è stato isolato dalle feci di pazienti diarroici.[18]

Tra i vari sierotipi di *Yersinia enterocolitica* quello più comunemente associato a casi umani nell'UE è il sierotipo 4/O:3. [19] Questo dato è confermato anche dall'ultimo report dell'EFSA 2022 dove emerge che i bio-sierotipi più comuni di *Y. enterocolitica* nell'uomo sono stati 4/O3 (83,2%) e 2/O9 (15,1%). I principali alimenti segnalati come cause di tossinfezione da *Yersinia* sono stati "carne e prodotti a base di carne" (64,0%) seguite da "latte e prodotti lattiero-caseari" (18,9%) e "ortofrutta" (17,1%). [8]

## 1.2.2 METODI ISO PER LA RICERCA DI *YERSINIA ENTEROCOLITICA*

Il numero di alimenti contaminati è probabilmente sottostimato poiché attualmente i metodi microbiologici presentano diverse limitazioni. Il monitoraggio ufficiale di *Y. enterocolitica* nei campioni alimentari viene solitamente eseguito secondo la norma ISO 10273:2017[20] (Tabella 1.1)

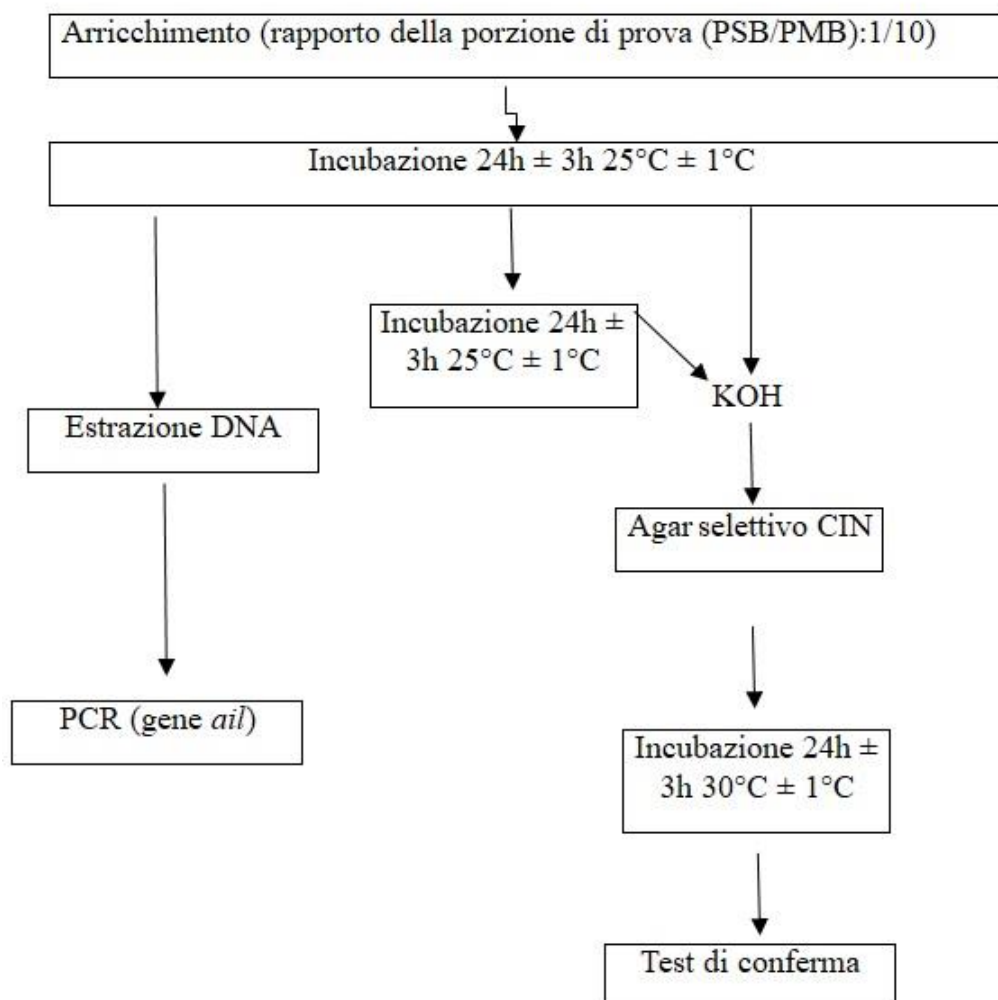
**Tabella 1.1** Schema di esecuzione della ISO 10273:2017



Tuttavia, questo metodo richiede molto tempo ed è inefficace [21] [22]. Negli ultimi anni sono stati sviluppati diversi metodi per l'isolamento della colonia, ma attualmente non sembra esistere una procedura perfetta in grado di recuperare la *Y. enterocolitica* patogena dagli alimenti. I principali metodi prevedono l'uso di brodo di arricchimento seguito dalla semina su terreni selettivi. Di questi metodi gli svantaggi sono la presenza di un'abbondante popolazione microbica naturale nei campioni e la bassa concentrazione di ceppi patogeni. Finora l'agar CIN è stato considerato il miglior terreno per l'isolamento delle colonie di *Y. enterocolitica*. Tuttavia, i batteri indigeni dei campioni possono crescere eccessivamente e coprire le colonie di *Y. enterocolitica* [23] [24]. Inoltre, la maggior parte dei batteri mostra la stessa morfologia delle colonie di *Y. enterocolitica* su agar CIN. Sfruttando la natura psicrotrofica di *Y. enterocolitica*, l'uso di metodi di arricchimento a freddo può migliorare il recupero dai campioni alimentari, poiché la temperatura di refrigerazione può sopprimere la crescita della popolazione microbica di fondo. Tuttavia, questa procedura richiede più di quattordici giorni di incubazione [25]. Sebbene l'isolamento della colonia sia un passaggio che non può essere evitato, i metodi molecolari possono migliorare la rilevazione di questo agente patogeno, poiché sono affidabili e richiedono meno tempo rispetto ai metodi

microbiologici. Il metodo di riferimento per la rilevazione della *Y. enterocolitica* patogena è la norma ISO 18867:2015[26] (Tabella 1.2.), che indica il gene *ail* come gene bersaglio per la Real time PCR. Tuttavia, la patogenicità di *Y. enterocolitica* non può essere determinata in modo affidabile sulla base del rilevamento di *ail* in una semplice PCR, poiché le sequenze omologhe al gene *ail* vengono ora rilevate più spesso nel biotipo 1A [27]. Pertanto, sono necessari studi volti a indagare la presenza e la distribuzione dei diversi geni nei ceppi di *Y. enterocolitica*, al fine di sviluppare una Real time PCR sonda-specifica, che oltre a determinare la presenza di *Y. enterocolitica* patogena, nei campioni alimentari in modo più specifico, possa anche ridurre i tempi di analisi.

**Tabella 1.2** Schema di esecuzione della ISO 18867:2015



### 1.2.3 *SALMONELLA SPP* NEGLI ALIMENTI

La salmonellosi nel 2022 è stata la seconda infezione gastrointestinale di origine alimentare più comunemente segnalata, ed è stata una delle principali cause di epidemie di origine alimentare negli Stati membri dell'Unione europea e nei paesi terzi. Nel 2022 i casi confermati di

salmonellosi umana sono stati 65.208, la tendenza generale delle infezioni da *Salmonella*, non ha mostrato alcun aumento o diminuzione significativa nel periodo 2018-2022. [8]

Le *Salmonelle* sono batteri Gram-negativi appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*. Il genere *Salmonella* comprende due specie, *S. bongori* e *S. enterica*, ed inoltre sei sottospecie: *S. enterica subsp. Arizonae*, *S. enterica subsp. diarizonae*, *S. enterica subsp. enterica*, *S. enterica subsp. houtenae*, *S. enterica subsp. indica* e *S. enterica subsp. salamae*. [28] La sottospecie enterica, a seconda dei suoi antigeni di superficie (O e H), può essere suddivisa in oltre 2600 sierotipi. Un'ulteriore suddivisione in due gruppi è quella basata sui diversi sintomi della malattia: *Salmonella* tifoidea e *Salmonella* non tifoidea. Mentre la *Salmonella* tifoidea è associata a un numero elevato di casi fatali, le infezioni da *Salmonella* non tifoidea negli esseri umani sono generalmente autolimitanti e non richiedono un trattamento antimicrobico. La *Salmonella* possiede fattori di virulenza sia cromosomiali che plasmidici. Tra i cromosomiali ci sono i geni per l'internalizzazione negli enterociti e nelle cellule epiteliali. Essi sono localizzati in due estese regioni di DNA cromosomale, note come “*Salmonella Pathogenicity Island*”, denominate rispettivamente SPI1 e SPI2. [29] SPI1 è essenziale per l'invasività della mucosa intestinale,

mentre SPI2 influenza la virulenza sistemica, favorisce la crescita intracellulare del germe e la sua sopravvivenza nei macrofagi. I fattori di virulenza plasmidici sono presenti soprattutto nei ceppi di *Salmonella* particolarmente virulenti, e sono caratterizzati dalla presenza di un plasmide di 8 kb chiamato *spv* (*Salmonella plasmid virulence*). La presenza di *spv* è stata riscontrata principalmente in ceppi isolati da infezioni umane rispetto ai ceppi isolati da campioni fecali o ambientali. I geni *spv* sembrano promuovere la fase macrofagica della malattia evitando così la distruzione del batterio da parte dei neutrofili. Un controllo così complesso della regolazione dei geni di invasione garantisce al batterio grande flessibilità nell'espressione genica, permettendogli di esprimere i geni di virulenza in condizioni diverse a seconda del sito di infezione, della risposta dell'ospite e della localizzazione del batterio. I diversi sierotipi di *Salmonella* possono essere trovati in un'ampia gamma di alimenti come pollame, pesce, uova, manzo e latticini. Tuttavia, mentre *S. Typhimurium* mostra una distribuzione ubiquitaria, altri sierotipi come ad esempio *S. Derby*, che sono principalmente isolati da carne di maiale e prodotti a base di carne di maiale, sono strettamente associati a una categoria alimentare. [30]

La trasmissione e la diffusione della *Salmonella* avviene principalmente

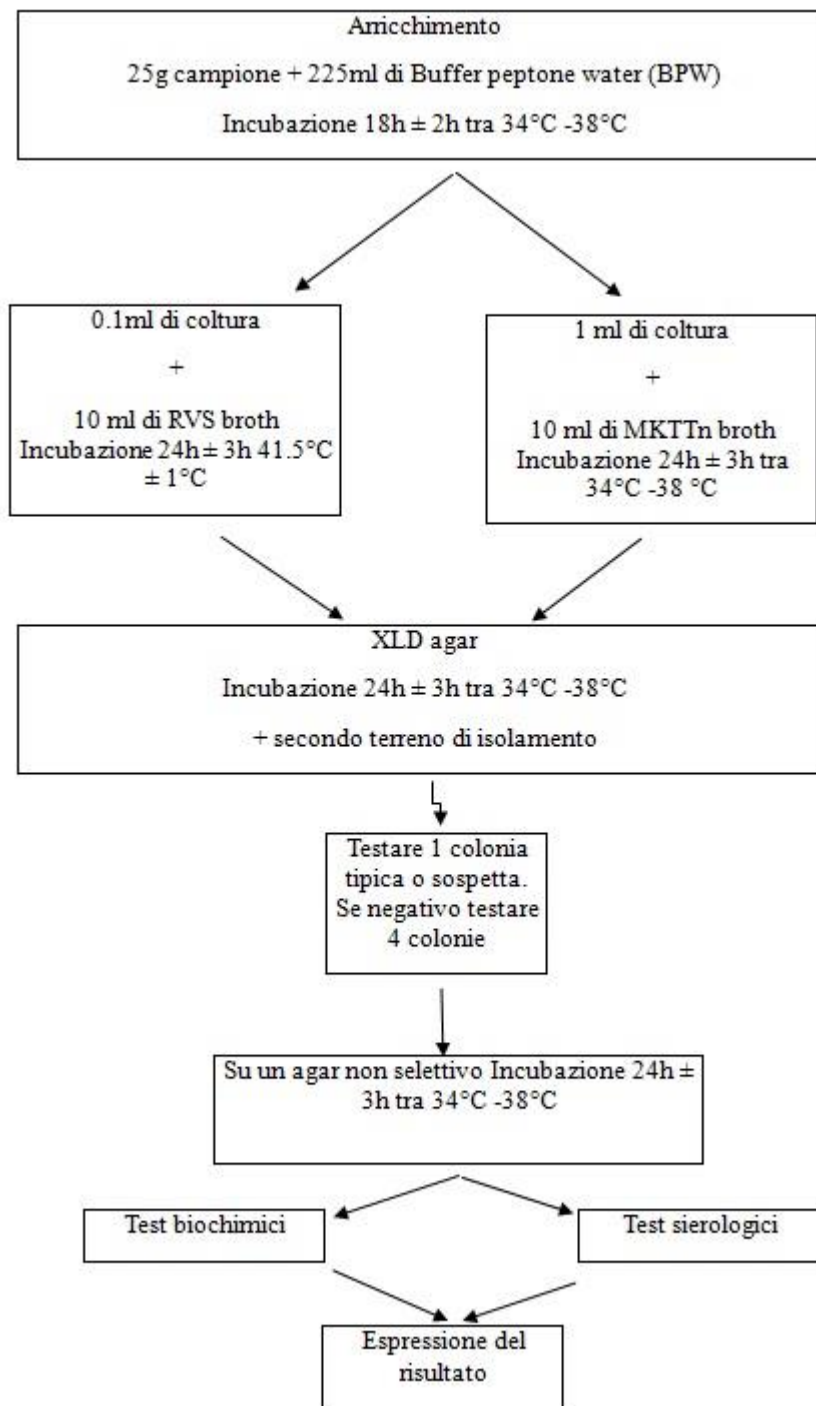
attraverso il contatto diretto con animali vivi o con il consumo di cibo o acqua contaminati. [28]

Secondo il report dell'EFSA 2022, i cinque principali sierotipi di *Salmonella* coinvolti nelle infezioni umane sono stati: *S. Enteritidis* (67,3%), *S. Typhimurium* (13,1%), *S. Typhimurium monofasico* (1,4,[5],12:i:-) (4,3%), *S. Infantis* (2,3%) e *S. Derby* (0,89 %), inoltre gli alimenti con i più alti livelli di contaminazione sono stati i prodotti a base di carne e carne di pollo. [8]

#### **1.2.4 METODI NORMATI PER LA RICERCA DI *SALMONELLA SPP***

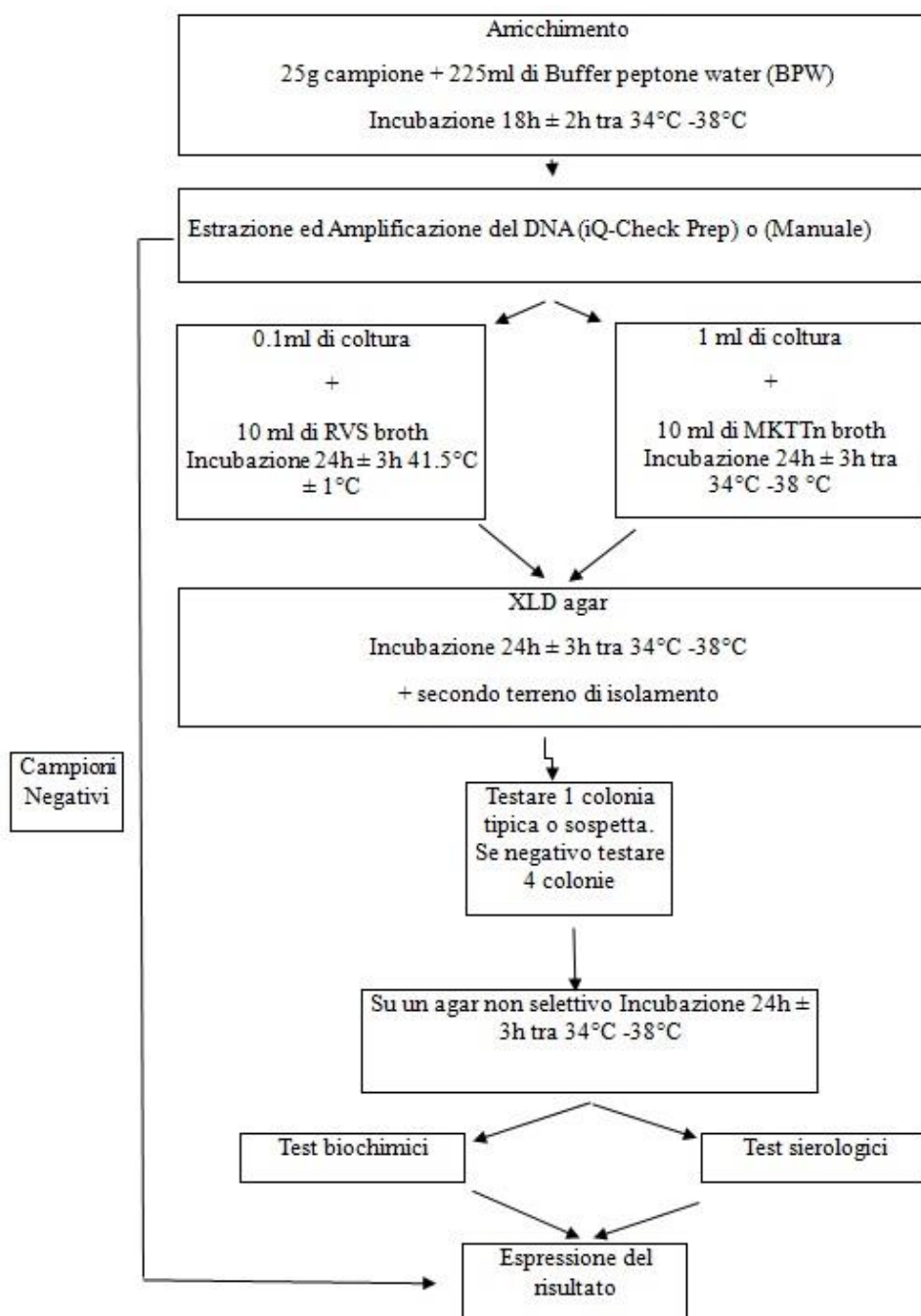
Il controllo ufficiale sugli alimenti per la ricerca di *Salmonella spp* viene eseguito secondo la norma UNI EN ISO 6579-1:2020 [31] (Tabella 1.3)

**Tabella 1.3** Schema di esecuzione della UNI EN ISO 6579-1:2020



L'isolamento dell'agente patogeno mediante il metodo di microbiologico convenzionale UNI EN ISO 6579-1, prevede l'uso di diversi terreni di coltura, dopo un pre-arricchimento in acqua peptonata tamponata per 18-24 ore che consente la crescita dei patogeni, ma prolunga il tempo di rilevazione [32]. Pertanto, l'intero processo, considerando anche la conferma biochimica e sierologica, richiede almeno cinque giorni per confermare la presenza dell'agente patogeno [32]. Il tempo necessario per l'analisi è incompatibile con la necessità di individuare precocemente la *Salmonella* negli alimenti in caso di epidemia, e quindi con la necessità di intervento in modo rapido sull'eventuale ritiro dell'alimento contaminato, che è stato già distribuito[33]. Sono stati proposti metodi molecolari, che si basano sull'utilizzo di PCR, per rilevare la *Salmonella* negli alimenti [34]; [35]; [36]. Uno di questi è il metodo AFNOR BRD 07/06-07/04 Ricerca di *Salmonella spp.* mediante Real Time PCR (Tabella 1.4)

**Tabella 1.4** Schema di esecuzione del metodo AFNOR BRD 07/06-07/04 Ricerca di *Salmonella* spp. mediante Real Time PCR



Tuttavia, anche questo metodo, che per i campioni negativi consente di dare un esito in circa due giorni, per i campioni positivi richiede tempi

più lunghi, almeno cinque giorni. Quindi per prevenire la distribuzione di alimenti contaminati sono necessari metodi più rapidi, che diano la possibilità di poter rilevare in modo precoce la *Salmonella*.

### **1.2.5 *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS*, *VIBRIO CHOLERA*E *E VIBRIO VULNIFICUS* NEGLI ALIMENTI**

Nell'acqua di mare sono presenti molti agenti batterici, come *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Proteus spp.*, tuttavia, la maggior parte delle malattie umane attribuite al microbiota naturale degli ambienti acquatici e dei frutti di mare sono causate da *Vibrio spp* [37].

I *Vibrio spp.* sono batteri gram-negativi e alofili ampiamente distribuiti nell'ambiente acquatico. Al genere *Vibrio* appartengono più di 100 specie di cui 13 sono state associate a infezione umana, e tra queste *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* sono le più importanti [38].

Le epidemie di *Vibrio cholerae* sono comuni sia nei paesi sviluppati che in quelli in via di sviluppo. Il *Vibrio cholerae* è responsabile di malattie diarroiche acute, e rappresenta a livello globale un'importante causa di morbilità e mortalità nelle popolazioni vulnerabili, che non hanno

accesso all'acqua pulita e alle strutture igienico-sanitarie. In particolare, nel 2021 i decessi associati al colera sono aumentati a livello globale. L'infezione è provocata dall'ingestione del microrganismo attraverso alimenti contaminati, il periodo di incubazione varia da due ore a cinque giorni [38].

Il *Vibrio parahaemolyticus* è principalmente associato a infezioni gastrointestinali ma può causare anche infezioni extraintestinali [39]. È considerato un patogeno emergente e l'infezione nell'uomo avviene principalmente a causa del consumo di alimenti contaminati, in particolare pesce e crostacei poco cotti [38];[40]. La virulenza del *Vibrio parahaemolyticus* dipende dalla presenza di due geni di virulenza: un'emolisina diretta termostabile (TDH) e un'emolisina correlata termostabile (TRH), codificati rispettivamente dai geni *tdh* e *trh*. Il *Vibrio parahaemolyticus* è spesso associato a infezioni umane negli Stati Uniti d'America, Cile e Giappone e, in misura minore, nell'Unione Europea [38].

Il *Vibrio vulnificus* può essere responsabile di gastroenterite correlata ai frutti di mare, ma è principalmente associato a infezione da ferita, e può causare setticemia anche fatali [39].

Negli ultimi anni, l'incidenza della vibriosi è aumentata probabilmente a causa del riscaldamento del mare a causa dei cambiamenti climatici

in tutto il mondo [37]. Infatti, oltre ai nutrienti e al sale, la temperatura è il fattore più importante che influenzala presenza di *Vibrio* spp. nell'acqua [39].

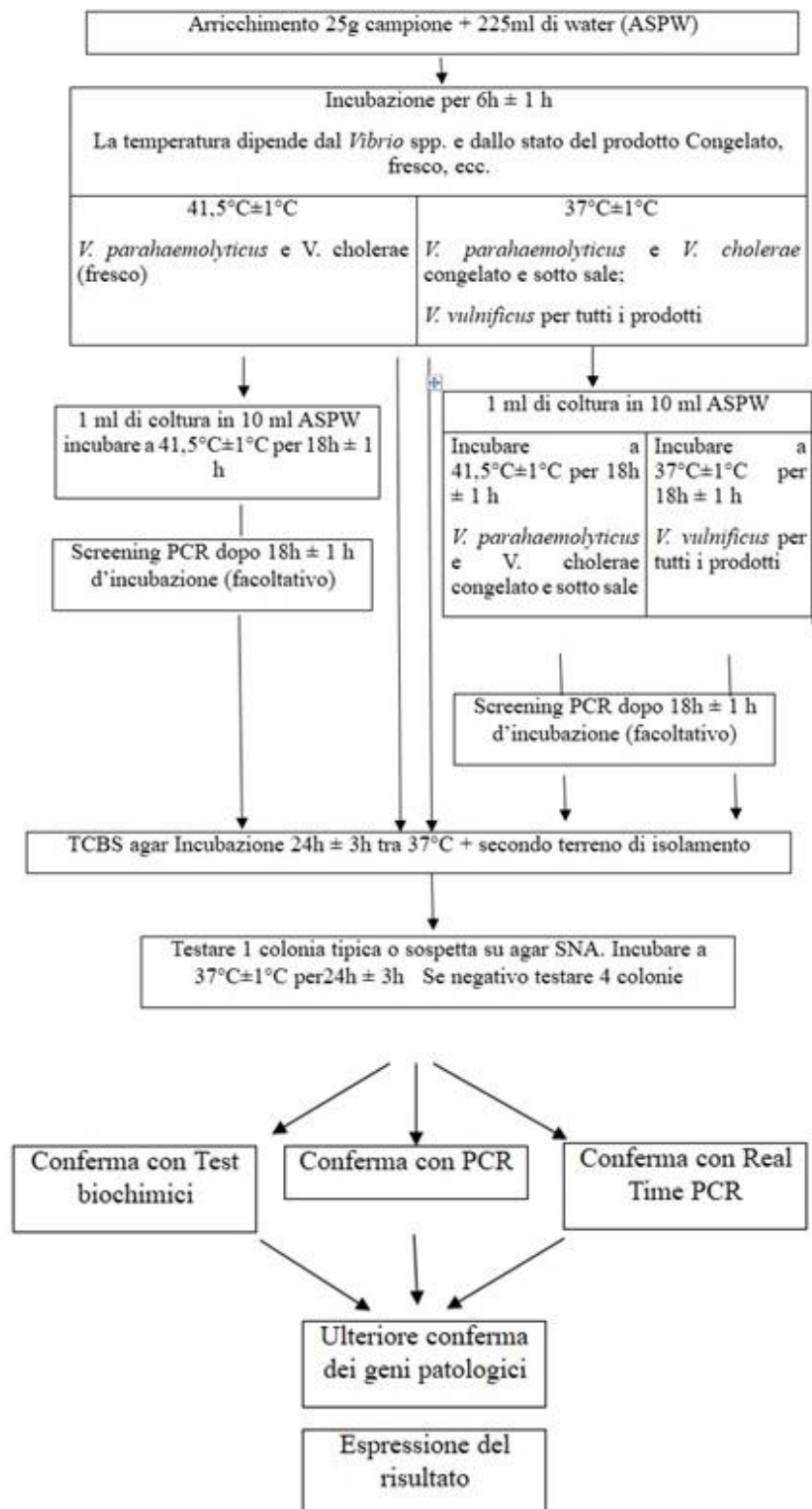
Inoltre, il *Vibrio* spp. è responsabile delle principali malattie legate al consumo di molluschi bivalvi. I molluschi essendo organismi che filtrano possono concentrare alghe unicellulari, batteri e altri contaminanti presenti nell'ambiente [41]. L'incidenza dei focolai di origine alimentare associati al consumo di molluschi è in aumento [42]. Infatti, secondo il report dell'EFSA 2022 nei Paesi Bassi, dove sono stati analizzati 185 campioni e 327 lotti di pesce crudo e crostacei (gamberetti) raccolti alla frontiera, è stata rilevata la presenza di *Vibrio* spp in alcuni campioni. Nello specifico è stato rilevato Il *V. cholerae* in 11/327 lotti testati, mentre il *V. parahaemolyticus* è stato rilevato in 18/185 campioni e in un 1/327 dei lotti testati, avendo così un totale di campioni positivi per *Vibrio* spp di 30, con una percentuale di positività del 5,9%.[8]

### **1.2.6 METODO ISO PER LA RICERCA DI VIBRIO SPP.**

I metodi normati che vengono utilizzati nei controlli ufficiali degli alimenti per la ricerca di *Vibrio* spp., nello specifico *V.cholerae*, *V.parahaemolyticus* e *V.vulnificus*, comportano l'uso di terreni selettivi

che sono poco costosi e semplici, ma richiedono molto tempo per l'esecuzione dell'analisi, fino a 5 giorni. La norma di riferimento è la ISO 21872-1:2017, la quale include anche i metodi molecolari per il rilevamento delle diverse specie di *Vibrio*. Tuttavia, l'utilizzo di tre PCR simplex, è ancora considerato dispendioso in termini di tempo e denaro [43]. (Tabella 1.5) Quindi lo sviluppo di metodi rapidi è fondamentale, per condurre un controllo adeguato dei prodotti contaminati, identificare rapidamente le fonti di epidemia e prevenire la diffusione della malattia [43].

**Tabella 1.5** *Schema di esecuzione del ISO 21872-1:2017 per la ricerca di Vibrio spp.*



## 2. BIBLIOGRAFIA

1. Codice Hammurabi: legge 108
2. Codice Hammurabi: legge 224 e 225
3. Libro bianco sulla sicurezza alimentare Bruxelles, 12.1.2000  
COM (1999) 719 def
4. <https://sicert.net/storia-e-sviluppo-delle-norme-iso/>
5. UNI EN ISO 9000:2015 “Sistemi di gestione per la qualità”
6. EN ISO 7218:2007/A1:2013 “Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations”
7. Istituto Superiore di Sanità <https://www.epicentro.iss.it/>
8. EFSA The European Union One Health 2022 Zoonoses Report
9. A. Bancercz-kisiel. The most important virulence markers of *Yersinia enterocolitica* and their role during infection 1–14 Genes (2018), 10.3390/genes9050235.
10. Cornelis, G.U.Y.R., 1995. MyfF, an element of the network regulating the synthesis of fibrillae in *Yersinia enterocolitica* . These include : MyfF , an Element of the Network Regulating the Synthesis of Fibrillae in *Yersinia enterocolitica* 177.

11. Nelson, K.M., Young, G.M., Al, N.E.T., Mmun, I.N.I., 2001. Identification of a Locus Involved in Systemic Dissemination of *Yersinia enterocolitica* 69, 6201–6208. doi:10.1128/IAI.69.10.6201
12. Wagner, K., Schilling, J., Fa, S., Schmidt, M.A., Heusipp, G., 2009. A Regulatory Network Controls Expression of the In Vivo-Expressed HreP Protease of *Yersinia enterocolitica* 191, 1666–1676. doi:10.1128/JB.01517-08
13. Glenn M. Young and Virginia L. Miller. Identification of novel chromosomal loci affecting *Yersinia enterocolitica* pathogenesis. *Molecular Microbiology* (1997)25(2), 319–328
14. M. Skurnik, H. Wolf-Watz. Analisi del gene *yopA* che codifica i determinanti della virulenza Yop1 di *Yersinia* spp. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1989.tb00198.x>
15. Guy R. Cornelis, Anne Boland, Aoife P. Boyd, Cecile Geuijen, Maite Iriarte, Cécile Neyt, Marie-Paule Sory, Isabelle Stainier. The Virulence Plasmid of *Yersinia*, an Antihost Genome. <https://doi.org/10.1128/membr.62.4.1315-1352.1998>
16. Sharon M. Tennant, Travis H. Grant, Roy M. Robins-Browne Pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* biotype 1° FEMS Immunology & Medical Microbiology, Volume 38, Issue 2,

September 2003, Pages 127–137, [https://doi.org/10.1016/S0928-8244\(03\)00180-9](https://doi.org/10.1016/S0928-8244(03)00180-9)

17. D E Pierson, S Falkow. Nonpathogenic isolates of *Yersinia enterocolitica* do not contain functional *inv*-homologous sequences  
<https://doi.org/10.1128/iai.58.4.1059-1064.1990>
18. R. Paixão, L.Z. Moreno, D. Dirani, S. De Gobbi, D. Cristine, E. Hofer, M.H. Matté, T. Sebastiana, P. Ferreira, V. Tulio, D.M. Gomes, B. Leticia, P. Costa, A.M. Moreno. Characterization of *Yersinia Enterocolitica* Biotype 1A Strains Isolated from Swine Slaughterhouses and Markets 2013
19. B. Torres, F. Martins, C. Vieira, D. Augusto, L. Silva, F. Germano, P. Alvarenga, J. Libero, M. Emilene, M. Campos-galvão, R. Seiti, J. Pfrimer, S. Bersot, L. Augusto  
*Yersinia enterocolitica* in a Brazilian pork production chain: Tracking of contamination routes, virulence and antimicrobial resistance  
1. Int. J. Food Microbiol., 276 (2018), pp. 5-9, [10.1016/j.ijfoodmicro.2018.03.028](https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.03.028).
20. ISO 10273:2017 Metodo orizzontale per la ricerca di *Yersinia enterocolitica* patogena
21. Damme, I. Van, Berkvens, D., Botteldoorn, N., Dierick, K., Wits, J., Pochet, B., Zutter, L. De, 2013. Evaluation of the ISO 10273: 2003

- method for the isolation of human pathogenic *Yersinia enterocolitica* from pig carcasses and minced meat. *Food Microbiol.* 36, 170–175.  
doi:10.1016/j.fm.2013.05.007
22. Fredriksson-ahomaa, M., Stolle, A., Korkeala, H., 2006. Molecular epidemiology of *Yersinia enterocolitica* infections.  
doi:10.1111/j.1574-695X.2006.00095.x
  23. M De Guisti 1, E De Vito, A Serra, B Quattrucci, A Boccia, L Pacifico, A Ranucci, G Ravagnan, C Chiesa  
Occurrence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in slaughtered pigs and pork products.
  24. S. Toora, E. Budu-Amoako, R.F. Ablett, J. Smith  
Evaluation of different antimicrobial agents used as selective supplements for isolation and recovery of *Yersinia enterocolitica*  
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1994.tb03046.x>
  25. Petsios, S., Fredriksson-ahomaa, M., Sakkas, H., Papadopoulou, C., 2016. International Journal of Food Microbiology Conventional and molecular methods used in the detection and subtyping of *Yersinia enterocolitica* in food. *Int. J. Food Microbiol.* 237, 55–72.  
doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.015
  26. ISO 18867:2015 Reazione di polimerizzazione a catena (PCR) per la ricerca di *Yersinia enterocolitica* patogena

27. Bancarz-kisiel, A., 2018. The Most Important Virulence Markers of *Yersinia enterocolitica* and Their Role during Infection 1–14.  
doi:10.3390/genes9050235
  
28. Immacolata La Tela, Maria Francesca Peruzzy, Nicola D'Alessio, Fabio Di Nocera, Francesco Casalnuovo, Maria Rosaria Carullo, Davide Cardinale, Daniela Cristiano, and Federico Capuano.  
Serotyping and Evaluation of Antimicrobial Resistance of *Salmonella* Strains Detected in Wildlife and Natural Environments in Southern Italy.  
*Antibiotics* 2021, 10, 353.<https://doi.org/10.3390/antibiotics10040353>
  
29. Sandra L. Marcus, John H. Brumell, Cheril G. Pfeifer, B. Brett Finlai: *Salmonella* pathogenicity islands: big virulence in small packages *Microbes and Infection*, 2, 2000, 145–156;
  
30. Maria Francesca Peruzzy, Federico Capuano, Yolande Thérèse Rose Proroga, Daniela Cristiano, Maria Rosaria Carullo and Nicoletta Murru.  
Antimicrobial Susceptibility Testing for *Salmonella* Serovars Isolated from Food Samples: Five-Year Monitoring (2015–2019)  
*Antibiotics* 2020, 9(7), 365;  
<https://doi.org/10.3390/antibiotics9070365>

31. UNI EN ISO 6579-1:2020 Metodo orizzontale per la ricerca, conta e la sierotipizzazione della *Salmonella spp* – Parte 1 Ricerca di *Salmonella spp*
32. Wang, M., Zhang, Y., Tian, F., Liu, X., Du, S., Ren, G., Wang, J., & Zhang, D. (2021).  
Overview of Rapid Detection Methods for Salmonella in Foods: Progress and Challenges. <https://doi.org/10.3390/foods101>
33. Heymans, R., Vila, A., van Heerwaarden, C. A. M., Jansen, C. C. C., Castelijns, G. A. A., van der Voort, M., & Biesta-Peters, E. G. (2018).  
Rapid detection and differentiation of Salmonella species, Salmonella Typhimurium, and Salmonella Enteritidis by multiplex quantitative PCR. PLoS ONE, 13(10).  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0206316>
34. Liu, L., Zhao, G., Li, X., Xu, Z., Lei, H., & Shen, X. (2022).  
Development of rapid and easy detection of Salmonella in food matrices using RPA-CRISPR/Cas12a method. LWT, 162.  
<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113443>
35. Machado, I., Garrido, V., Hernandez, L. I., Botero, J., Bastida, N., San-Roman, B., Grilló, M. J., & Hernandez, F. J. (2019).

Rapid and specific detection of Salmonella infections using chemically modified nucleic acid probes. *Analytica Chimica Acta*, 1054, 157–166. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2018.12.027>

36. Öz, Y. Y., Sönmez, Ö. İ., Karaman, S., Öz, E., Unal, C. B., & Karataş, A. Y. (2020).

Rapid and sensitive detection of Salmonella spp. in raw minced meat samples using droplet digital PCR. *European Food Research and Technology*, 246(10), 1895–1907. <https://doi.org/10.1007/s00217-020-03531-x>

37. Baker-Austin C, Oliver J D, Alam M, Ali A, Waldor M K, Qadri F, Martinez-Ur 2018.

*Vibrio* spp. infections. *Nat. Rev. Dis. Prim.* 4.  
doi: 10.1038/s41572-018-0005-8.

38. Castello A, Alio V, Sciortino S, Oliveri G, Cardamone C, Butera G, Costa A 2022.

Occurrence and Molecular Characterization of Potentially Pathogenic *Vibrio* spp. in Seafood Collected in Sicily. *Microorganisms* 11, 53.  
doi: 10.3390/microorganisms11010053

39. Fleischmann S, Herrig I, Wesp J, Stiedl J, Reifferscheid G, Strauch E , Alter T, Brennholt N 2022.

Prevalence and Distribution of Potentially Human Pathogenic *Vibrio* spp. on German North and Baltic Sea Coasts. *Front.*

*Cell. Infect. Microbiol.* 12, 1–15. doi: 10.3389/fcimb.2022.846819.

40. Ma J Y, Zhu X K , Hu R G, Qi Z Z, Sun W C, Hao Z P, Cong W, Kang YH 2023.

A systematic review, meta-analysis and meta-regression of the global prevalence of foodborne *Vibrio* spp. infection in fishes: A persistent public health concern.

*Mar. Pollut. Bull.* 187, 114521. doi: 10.1016/j.marpolbul.2022.114521.

41. La Tela I, Peruzy M F, D'Alessio N, Di Nocera F, Casalnuovo F, Carullo M R, Cardinale D, Cristiano D, Capuano F 2021.

Serotyping and evaluation of antimicrobial resistance of salmonella strains detected in wildlife and natural environments in southern Italy. *Antibiotics* 10, 1–13. doi: 10.3390/antibiotics10040353.

42. Marceddu M, Lamon S, Consolati S G, Ciulli S, Mazza R, Mureddu A., Meloni D 2017.

Determination of salmonella spp., e. coli vtec, vibrio spp., and norovirus gi-gii in bivalve molluscs collected from growing natural beds in sardinia (Italy).

*Foods* 6, 1–8. doi: 10.3390/foods6100088.

43. Wang Y, Salazar J K 2016.

Culture-Independent Rapid Detection Methods for Bacterial Pathogens and Toxins in Food Matrices. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 15, 183–205. doi: 10.1111/1541-4337.12175.

### 3. SCOPO

I pericoli microbiologici rappresentano ancora oggi, uno dei principali problemi che possono condizionare in maniera sostanziale, gli scambi di alimenti al livello internazionale. Le modalità, il numero di persone coinvolte e gli alimenti implicati nelle tossinfezioni alimentari si sono evoluti nel tempo. Le cause di infezione vanno ricercate, non solo negli alimenti di origine animale, ma anche in altre categorie di alimenti. Nonostante gli sforzi sostenuti dalle autorità sanitarie e dal mondo industriale, la contaminazione degli alimenti da parte dei microrganismi patogeni come *Salmonella spp*, *Yersinia spp*, *Vibrio spp* ed altri, è una eventualità che appare quasi inevitabile, e soprattutto può aver luogo in ogni fase della filiera produttiva. Questa criticità viene confermata costantemente dai reports pubblicati dall'EFSA. L'ampliamento delle conoscenze sui fattori che condizionano la crescita di tali patogeni, nonché sullo sviluppo di metodologie rapide ed innovative per la loro identificazione e rintracciabilità, costituisce una valida premessa, per l'attuazione di nuove strategie atte a garantire una maggiore sicurezza del consumatore. Da ciò l'importanza di sviluppare metodiche analitiche sempre più affidabili in grado di dare nei tempi più brevi possibili, informazioni sull'origine e la diffusione di tali patogeni nei prodotti alimentari.

Lo scopo generale di questa tesi è stato quindi, quello di sviluppare metodi che fossero più rapidi e sensibili, per la ricerca di alcuni patogeni come *Yersinia enterocolitica* nelle matrici carne (Articolo 1) e vegetali (Articolo 2). Per la ricerca di *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio cholerae* e *Vibrio vulnificus* nei molluschi bivalvi (Articolo 3) e per la ricerca di *Salmonella spp*, nei formaggi, nella carne, nei vegetali e nei molluschi bivalvi. (Articolo 4). Per sviluppare i vari metodi sono state eseguite un numero notevole di prove, con lo scopo, non solo di ridurre i tempi di analisi, ma di verificare che i nuovi metodi fossero conformi e sovrapponibili a quelli di riferimento che vengono impiegati per i controlli ufficiali.

## 4. ARTICOLO 1

### **RICERCA DI *YERSINIA ENTEROCOLITICA* NEI PRODOTTI A BASE DI CARNE DI MAIALE: VALUTAZIONE DEI PROTOCOLLI DI ISOLAMENTO**

M.F. Peruzzy, M. Aponte, Y.T.R. Proroga, F. Capuano, D. Cristiano, E. Delibato, K. Houf, N. Murru

Food Microbiology (2020) Volume 92

<https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103593>

### **RIASSUNTO**

Il metodo convenzionale per la ricerca di *Yersinia enterocolitica* nei campioni alimentari è generalmente considerato inadeguato. Ciò è dovuto molto probabilmente dalla presenza di una forte competizione microbiologica ed anche da un basso livello di contaminazione dell'agente patogeno. Nel seguente lavoro il metodo impiegato per rilevare i ceppi (4/O:3, 1A/O:5) negli alimenti contaminati sperimentalmente e naturalmente, è stato SYBR Green Real time PCR. Per lo studio invece della flora microbica competitiva, isolata, dopo l'arricchimento in PSB e ITC, sul terreno selettivo CIN a diversi tempi di incubazione, è stato utilizzato il MALDI-TOF MS. I ceppi isolati dopo l'arricchimento in PSB hanno mostrato una maggiore diversità di

genere batterico (10 su CIN e 18 su PCA), rispetto a quelli isolati dall'arricchimento in ITC (6 su CIN e 10 su PCA).

Dai risultati ottenuti è emerso che le *Yersiniaceae* erano la famiglia dominante nel primo giorno di incubazione, ma a partire dal secondo giorno la percentuale di isolamento diminuiva considerevolmente. Per i campioni contaminati sperimentalmente che sono stati analizzati, si è riscontrata una difficoltà nel rilevare i ceppi (4/O:3, 1A/O:5), in quanto è stato sempre rilevato il biotipo 1A, mentre il ceppo 4/O:3 si è rivelato scarsamente competitivo con la flora microbica presente nel campione. Sulla base dei dati, i mezzi di arricchimento PSB e ITC, attualmente proposti per il rilevamento di *Y. enterocolitica*, devono essere migliorati per promuovere con successo il recupero dell'agente patogeno.

**Parole chiave:** *Yersinia enterocolitica* 4/O:3, *Y. Enterocolitica* 1A/O:5, “Flora microbica competitiva”, MALDI-TOF MS ,SYBR Green PCR in tempo reale.

## 4.1 INTRODUZIONE

La yersiniosi, è causata principalmente dalla specie *Yersinia* ( *Y.* ) *enterocolitica*, ed è la quarta zoonosi batterica di origine alimentare più comunemente segnalata nell'Unione europea ( EFSA Autorità europea per la sicurezza alimentare, 2019 ). La *Y. enterocolitica* è un Gram-negativo a forma bastoncellare, anaerobio facoltativo, appartenente alla famiglia delle *Yersiniaceae*. La *Y. enterocolitica* è divisa in sei biotipi (1A, 1B, 2, 3, 4, 5) tutti patogeni per l'uomo, ad eccezione del biotipo 1A ( Bancerz-kisiel, 2018 ). Il biotipo 1A è sempre stato considerato avirulento perché non presenta il gene di virulenza cromosomica ( *ail* , *ystA* ) ed il plasmide pYV ( Paixão et al., 2013 ). Tuttavia, poiché questo biotipo è stato isolato dalle feci di pazienti diarroici, è oggi considerato potenzialmente patogeno ( Tuompo et al., 2017 ). La *Y. enterocolitica* può essere ulteriormente suddivisa in più di 70 sierotipi , ma il bio-sierotipo 4/0:3 è quello più comunemente associato alle infezioni umane ( Torres et al., 2018 ). I suini sono considerati i principali serbatoi di *Y. enterocolitica* e la carne di maiale e i suoi prodotti sono stati identificati come le principali fonti di infezione umana ( Petsios et al., 2016 ). Tuttavia, l'incidenza del patogeno è probabilmente sottostimata in quanto l'isolamento e l'identificazione sono complicati dalla presenza di una ricca e varia flora

di accompagnamento sulle piastre dell'agar di isolamento, che combinata con un basso livello di *Y. enterocolitica* nei campioni, spesso determina risultati *falsi negativi* ( Petsios et al., 2016 ). Sebbene le tecniche molecolari basate su target genomici specie-specifici possano migliorare il tasso di rilevamento di *Y. enterocolitica* negli alimenti, rimane necessaria una successiva fase di isolamento per caratterizzare l'isolato. Il metodo di riferimento, ISO 10273, per l'isolamento di *Y. enterocolitica* prevede un arricchimento in brodi selettivi [ad es. peptone sorbitolo bile (PSB) e irgasan-ticarcillina-potassio clorato (ITC)] e l'isolamento su terreni agar selettivi, seguiti poi da test biochimici per la conferma della specie ( Zadernowska et al., 2014 ). Secondo l'Organizzazione internazionale per la standardizzazione, l'agar Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin (CIN) è il terreno di riferimento per l'isolamento di *Y. enterocolitica* , le colonie tipiche appaiono di colore rosso scuro con bordo traslucido e con un aspetto caratteristico a forma di "occhi di bue"( Petsios et al., 2016). Tuttavia, sebbene questo agar di isolamento contenga antimicrobici selettivi che inibiscono la crescita di altri batteri, alcuni microrganismi sfuggono a questa soppressione e occasionalmente mostrano addirittura la morfologia tipica della colonia di *Y. enterocolitica* ( Morka et al., 2018 ). Attualmente mancano conoscenze

sulla crescita di microrganismi non appartenenti alla famiglia delle *Yersinie* nei brodi di arricchimento e sull'agar CIN, e sul loro impatto nel recupero dei ceppi di *Y. enterocolitica*. Inoltre, i test biochimici convenzionali per l'identificazione e la conferma di *Yersinia* spp. richiedono molto tempo ( Peruzy et al., 2019b ). La spettrometria di massa (MALDI-TOF MS) è emersa come un buon metodo rapido e accurato per l'identificazione di diversi microrganismi ricercati in campioni sia clinici che alimentari ( Cherkaoui et al., 2010 ; Peruzy et al . , 2019a ; Yu et al., 2019 ). Gli scopi del presente lavoro erano: i) valutare il rilevamento dei ceppi di *Y. enterocolitica* (4/O:3 e 1A/O:5) in campioni di alimenti contaminati sperimentalmente mediante SYBR Green Real time PCR , ii) studiare la presenza di *Y. enterocolitica* su carcasse di maiale e in diversi prodotti a base di carne suina raccolti dalla vendita al dettaglio, e iii) valutare la flora microbica competitiva cresciuta su piastre di agar CIN e su Total Plate Count Agar (PCA) mediante MALDI –TOF MS.

## **4.2 MATERIALI E METODI**

### **4.2.1 CAMPIONAMENTO**

I prodotti a base di suini esaminati sono stati i seguenti: fettine, carne macinata, salumi e salsicce fresche. Tutti i campioni di circa 200-300 g sono stati acquistati al dettaglio nella regione Campania (Italia meridionale). Inoltre, le carcasse di maiale sono state campionate direttamente dopo la macellazione, ma prima del raffreddamento. Per ciascuna carcassa, quattro aree (10 x 10 cm ciascuna) sono state tamponate utilizzando delle spugne sterili (WPB01245WA, Sigma-Aldrich) reidratate con 10 mL di acqua peptonata (PW; CM0009, Oxoid, Basingstoke, Regno Unito). I siti di campionamento delle carcasse sono stati: prosciutto, schiena (lombo, vicino alla superficie del taglio), guancia e pancia (vicino alla superficie del taglio). Il campionamento è stato effettuato secondo le indicazioni previste dal Regolamento UE 2073/2005. Successivamente, i quattro tamponi per carcassa sono stati raggruppati ed elaborati come un unico campione. Tutti i campioni sono stati mantenuti a 4°C fino all'analisi.

#### 4.2.2 RICERCA DI *Y. ENTEROCOLITICA* IN FETTE DI MAIALE CONTAMINATE SPERIMENTALMENTE MEDIANTE SYBR GREEN PCR

Per individuare il giorno ottimale per il recupero di *Yersinia* durante la fase di arricchimento, campioni di fette di maiale sono state contaminate sperimentalmente con *Y. enterocolitica* biotipo 1A sierotipo O:5 (1A/O:5) e con *Y. enterocolitica* patogena biotipo 4 sierotipo O:3 (4/O:3). Entrambi i ceppi derivavano dalla Collezione di *Enterobatteri* patogeni dell'Istituto Superiore di Sanità (Roma, Italia). I ceppi sono stati rivitalizzati in Tryptone Soy Broth (TSB; CM0129, Oxoid, Basingstoke, UK) e incubati a 30 °C per 24 ore, prima di contaminare le fette di maiale, i livelli impiegati per la contaminazione con il ceppo patogeno sono stati i seguenti: livello basso di inoculo ( $10^2 - 10^3$  CFU / g – LC), medio ( $10^2 - 10^3$  CFU/g – MC) ed alto ( $10^4 - 10^5$  CFU/g – HC). Il ceppo non patogeno di *Y. enterocolitica* 1A è stato inoculato solo a concentrazioni basse e medie. I livelli di contaminazione sono stati determinati mediante conteggio preliminare su Plate Count Agar (PCA; CM0325, Oxoid). La preparazione dei campioni è stata eseguita nel seguente modo, in una busta da stomacher sterile sono stati pesati 25 g di campioni di carne di maiale, ai quali sono

stati aggiunti 225 mL (1:10 peso/peso) di brodo Peptone-Sorbitolo-Bile (PSB; 4022702, Biolife, Milano Italia), e poi sono stati omogenati per 3 min a 230 giri al minuto utilizzando un omogeneizzatore peristaltico (BagMixer®400 P, Interscience, Saint Nom, Francia). Gli omogenati sono stati poi contaminati con i ceppi di *Y. enterocolitica* ai livelli di contaminazione sopra indicati. Dopo l'inoculazione, i campioni sono stati agitati manualmente per un minuto per ottimizzare la distribuzione dell'inoculo. I campioni contaminati con biotipo 1A sono stati incubati a 25 °C. I campioni contaminati con il biotipo 4/O:3 sono stati incubati in parallelo a 25 e 10 °C per 8 giorni. Per valutare il recupero di *Y. enterocolitica*, il DNA è stato estratto dai brodi PSB al tempo zero (d-0) e ai giorni 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 utilizzando Chelex-100 -metodo con resina (1422822, Biorad, Hercules, CA, USA). Nel dettaglio, due ml di ciascun omogenato sono stati trasferiti in una provetta da 2 ml e centrifugati per 10 minuti a  $10.000 \times g$  a 4 °C. Il surnatante è stato scartato, il pellet risospeso in 300 µL di Chelex 100 al 6% mediante vortex e incubato a 56°C per 20 minuti e per ulteriori 8 minuti a 100°C. La sospensione è stata immediatamente raffreddata su ghiaccio per 1 minuto e centrifugata per 5 minuti a 10.000 g a 4°C. Il gene *ystA* è stato utilizzato come bersaglio per il rilevamento di *Y. enterocolitica* 4/O:3 ( Peruzy et al., 2017 ). Tre µL di DNA sono stati

aggiunti a 22  $\mu\text{L}$  di mastermix contenente 12,5  $\mu\text{L}$  di Qiagen QuantiTect SYBR Green PCR Kit (1x), 0,025  $\mu\text{L}$  di forward *ystA* -F (5'-ATCGACACCAATAACCGCTGAG-3'), 0,025  $\mu\text{L}$  di reverse primer *ystA* -R (5'-CCAATCACTACTGACTTCGGCT-3') e 9,45  $\mu\text{L}$  di  $\text{H}_2\text{O}$ . La presenza del biotipo 1A è stata valutata utilizzando il gene *ystB* come bersaglio ( Peruzzy et al., 2017 ). Tre  $\mu\text{L}$  di DNA sono stati aggiunti a 22  $\mu\text{L}$  di mastermix contenente: 12,5  $\mu\text{L}$  di Qiagen QuantiTect SYBR Green PCR Kit (1x), 0,0375  $\mu\text{L}$  di forward *ystB* -F (5'-GTACATTAGGCCAAGAGACG-3'), 0,0375  $\mu\text{L}$  di reverse primer *ys tB* -R (5'-GCAACATACCTCACAACACC-3') e 9,425  $\mu\text{L}$  di  $\text{H}_2\text{O}$ . La fluorescenza di SYBR Green e la curva di fusione sono state generate utilizzando il sistema CFX96 (Bio-Rad). Una temperatura di fusione specifica ( $T_m$ ) di  $78,5 \pm 1^\circ\text{C}$  ha indicato un risultato positivo per entrambi i target. Due mL dell'omogenato dei campioni arricchiti con PSB sono stati raccolti prima che il ceppo di *Y. enterocolitica* fosse inoculato per verificare l'assenza dell'agente patogeno mediante SYBR Green PCR.

#### **4.2.3 RICERCA DI *Y. ENTEROCOLITICA* IN CAMPIONI DI CARNE NATURALMENTE CONTAMINATI MEDIANTE SYBR GREEN PCR**

Sono stati analizzati campioni di carne macinata (n = 7), a fette (n = 7), salame (n = 7), salsicce (n = 7) e sette campioni di carcasse di maiale per rilevare *Y. enterocolitica*. Dieci grammi di campioni o dieci mL di eluati di spugna sono stati omogeneizzati in brodo PSB (90 mL) per 3 minuti a 10.000× *g* e incubati a 25 °C fino a 5 giorni. L'estrazione del DNA dai brodi PSB è stata eseguita mediante Chelex-100 come descritto sopra dopo uno, due e cinque giorni di incubazione. La SYBR Green PCR è stata effettuata come descritto in dettaglio nella Sez. 4.2.2.

#### **4.2.4 ANALISI DEI CEPPI ISOLATI DAI TERRENI IMPIEGATI PER LA RICERCA DI *Y. ENTEROCOLITICA* MEDIANTE MALDI-TOF MS**

Campioni di fette di maiale (n = 2), carne macinata (n = 2) e campioni di spugne effettuate su carcasse di maiale sono stati analizzati per la presenza di *Y. enterocolitica*. Dieci grammi di campioni o dieci mL di brodo ottenuto dalle spugne sono stati omogeneizzati in brodo PSB (90 mL) come descritto sopra. Successivamente, 10 mL di ciascun omogenato sono stati trasferiti in 90 mL di brodo Irgasan–Ticarcillin–Potassium chlorate (ITC; 1361, CONDA, Torrejón de Ardoz, Spagna)

con supplemento ITC (6051, CONDA, Torrejón de Ardoz, Spagna). Entrambi i brodi ITC e PSB sono stati incubati a 25 °C rispettivamente per 2 e 5 giorni. Per la ricerca di *Y. enterocolitica* mediante SYBR Green PCR, il DNA è stato estratto dai brodi PSB al giorno 1, 2 e 5, così come dai brodi ITC al 2° giorno. La procedura seguita è stata la stessa descritta nella sezione 4.2.2. Inoltre, ai giorni 1, 2 e 5, gli arricchimenti di PSB dei sei diversi campioni di carne di maiale sono stati sottoposti a diluizioni seriali in base dieci in Buffered Peptone Water (BPW; CM0509, Oxoid) seguite da semina per spatolamento su Cefsulodin-Irgasan-Novobiocin (CIN ; CM0653, Oxoid) con *Yersinia* Selective Supplement (SR0109, Oxoid), e su PCA. Gli arricchimenti in ITC come indicato dal metodo ISO (ISO: 10273:2017) sono stati seminati su CIN e PCA solo al giorno 2 (d-2). Dalle piastre scelte per il conteggio, 20 colonie sono state prelevate in modo casuale e seminate per isolamento su PCA. Mediante MALDI-TOF MS sono stati identificati un totale di 960 ceppi isolati dalle piastre di CIN (n = 480) e PCA (n = 480). Per la procedura di “estrazione con etanolo/acido formico” secondo la procedura della Bruker Daltonics, le singole colonie sono state prelevate e risospese in 800 µL di TSB e incubate a 28 °C per 24 ore. Successivamente, le colture sono state centrifugate (1533× g a 4 °C, 10 minuti), il surnatante è stato eliminato

ed il pellet è stato lavato due volte con 500  $\mu$ L di acqua Milli-Q. Dopo la centrifugazione, il surnatante è stato scartato e il pellet risospeso in 100  $\mu$ L di acqua Milli-Q con 50  $\mu$ L di acido formico e 50  $\mu$ L di acetonitrile. Dopo la miscelazione mediante pipetta e successiva centrifugazione ( $1533\times g$  a 4 °C, 10 minuti), un  $\mu$ L del surnatante è stato inoculato su una piastra da 96 spot e lasciato asciugare a temperatura ambiente. Successivamente, il campione è stato coperto con un  $\mu$ L di soluzione di matrice contenente 10 mg/mL di acido  $\alpha$ -ciano-4-idrossicinnamico in acetonitrile, acqua deionizzata e acido trifluoroacetico (50:47,5:2,5, [vol/vol/vol]). I campioni sono stati elaborati nello spettrometro di massa Microflex™ LT MALDI-TOF (Bruker Daltonics) dotato di laser ad azoto(11/4337 nm) operante in modalità di rilevamento lineare di ioni positivi utilizzando MALDI Biotyper Automation Control 2.0 (Bruker Daltonics). Le identificazioni sono state ottenute confrontando gli spettri di massa con il database Bruker MSP (versione DB5989) utilizzando il software Bruker Compass (Bruker Daltonics) con le impostazioni predefinite. I criteri di punteggio identificativo sono stati classificati secondo i criteri di identificazione del produttore; punteggi compresi tra 2,0 e 3,0 indicavano un'identificazione della specie altamente probabile, tra 1,7 e 1,99 un'identificazione certa di genere e probabile specie, mentre

valori inferiori a 1,7 indicavano un'identificazione non affidabile. L'analisi è stata ripetuta quando gli spot non hanno prodotto alcun picco.

#### **4.2.5 ANALISI STATISTICA**

Per confrontare le conte batteriche, l'analisi della varianza unidirezionale (ANOVA) è stata calcolata mediante il pacchetto software PAST (<https://folk.uio.no/ohammer/past/>). Un valore di probabilità inferiore a 0,05 ( $p < 0,05$ ) è stato definito statisticamente significativo.

### **4.3 RISULTATI**

#### **4.3.1 RECUPERO DI *Y. ENTEROCOLITICA* IN CAMPIONI CONTAMINATI SPERIMENTALMENTE**

La presenza dei geni *ystB* e *ystA* nei due ceppi di *Y. enterocolitica* utilizzati nel presente lavoro è stata confermata prima dell'inoculazione nei campioni di carne. Il ceppo biotipo 1A, con il gene *ystB* come bersaglio, è stato sempre rilevato nei campioni inoculati a bassa e media concentrazione durante l'intero periodo (Tabella 4.1). Il ceppo biotipo 4/O:3 con il gene *ystA* come bersaglio non è mai stato rilevato nei campioni al livello più basso ( $10-10^2$  CFU/g), indipendentemente dalla temperatura di incubazione (Tabella 4.1). D'altra parte, nelle fette di maiale contaminate con il livello intermedio del patogeno, *Y.*

*enterocolitica* 4/O:3 è stata rilevata dal primo fino al terzo giorno in brodo PSB incubato a 25 °C, e dal quinto giorno fino al giorno 8 quando l'incubazione è stata effettuata a 10 °C ( Tabella 4.1 ). Nei campioni con il livello più alto ( $10^4 - 10^5$  CFU/g), il ceppo 4/O:3 è stato rilevato dal giorno 1 al 7 e dal giorno 2 all'8 nei campioni incubati rispettivamente a 25 e 10 °C ( Tabella 4.1 ).

**Tabella 4.1** . Rilevazione dei geni *ystB* e *ystA*, per la ricerca dei ceppi *Yersinia enterocolitica* 1A e 4/O:3, in fette di maiale contaminate artificialmente, mediante SYBR Green PCR. La temperatura di fusione di  $78,5 \pm 1$  °C ha indicato un risultato positivo (D.) del DNA estratto dal brodo PSB.

| Livello<br>inoculo                                                                                          | Giorni          |           |           |           |           |           |           |           |           |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
|                                                                                                             | d-0             | d-1       | d-2       | d-3       | d-4       | d-5       | d-6       | d-7       | d-8       |
| <i>Presenza di Yersinia enterocolitica 1A (D.) mediante rilevamento del gene ystB – incubazione a 25 °C</i> |                 |           |           |           |           |           |           |           |           |
| LC <sup>a</sup>                                                                                             | nD <sup>b</sup> | <b>D.</b> | <b>D.</b> | <b>D.</b> | <b>D.</b> | <b>D.</b> | <b>D.</b> | <b>D.</b> | <b>D.</b> |
| MC                                                                                                          | nD              | <b>D.</b> | <b>D.</b> | <b>D.</b> | <b>D.</b> | <b>D.</b> | <b>D.</b> | <b>D.</b> | <b>D.</b> |

*Presenza di Yersinia enterocolitica 4/O:3 (D.) mediante rilevamento del gene ystA - incubazione a 25 °C*

|    |    |           |           |           |           |           |           |           |    |
|----|----|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|----|
| LC | nD | nD        | nD        | nD        | nD        | nD        | nD        | nD        | nD |
| MC | nD | <b>D.</b> | <b>D.</b> | <b>D.</b> | nD        | nD        | nD        | nD        | nD |
| HC | nD | <b>D.</b> | <b>D.</b> | <b>D.</b> | <b>D.</b> | <b>D.</b> | <b>D.</b> | <b>D.</b> | nD |

*Presenza di Yersinia enterocolitica 4/O:3 (D.) mediante rilevamento del gene ystA - incubazione a 10 °C*

|    |    |    |           |           |           |           |           |           |           |
|----|----|----|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| LC | nD | nD | nD        | nD        | nD        | nD        | nD        | nD        | nD        |
| MC | nD | nD | nD        | nD        | nD        | <b>D.</b> | <b>D.</b> | <b>D.</b> | <b>D.</b> |
| HC | nD | nD | <b>D.</b> | <b>D.</b> | <b>D.</b> | <b>D.</b> | <b>D.</b> | <b>D.</b> | <b>D.</b> |

<sup>a</sup>LC: Bassa ( $10^2$ – $10^3$  CFU/g – LC); Livello di inoculo del patogeno MC medio ( $10^2$ – $10^3$  CFU/g – MC) e HC alto ( $10^4$ – $10^5$  CFU/g – HC).

<sup>b</sup>nD: Non rilevabile.

#### **4.3.2 RILEVAZIONE DI Y. ENTEROCOLITICA MEDIANTE SYBR GREEN PCR NEI PRODOTTI A BASE DI CARNE DI MAIALE**

Nei 35 campioni analizzati, il gene *ystA* non è mai stato rilevato, mentre il gene *ystB* è stato amplificato in 13 su 35 (37,14%) ( Tabella 4.2 ). Nel dettaglio, il gene *ystB* è stato rilevato in un campione di carcassa, due fette di maiale, quattro salsicce fresche e sei campioni di carne macinata ( Tabella 4.2 ). Inoltre, nella carne macinata, il gene *ystB* è stato rilevato anche nel brodo ITC al giorno 2. In otto campioni (4/7salsicce, 3/7 carne macinata, 1/7 fetta di carne), il gene *ystB* è stato recuperato durante tutto il periodo di incubazione, mentre in un campione di carcassa è stato rilevato solo a partire dal secondo giorno. In un campione di carne macinata, il gene è stato rilevato solo al 1° e al 2° giorno di incubazione, mentre in due campioni di carne macinata e in una fetta di maiale solo al 2° giorno di incubazione (Tabella 4.2 ) .

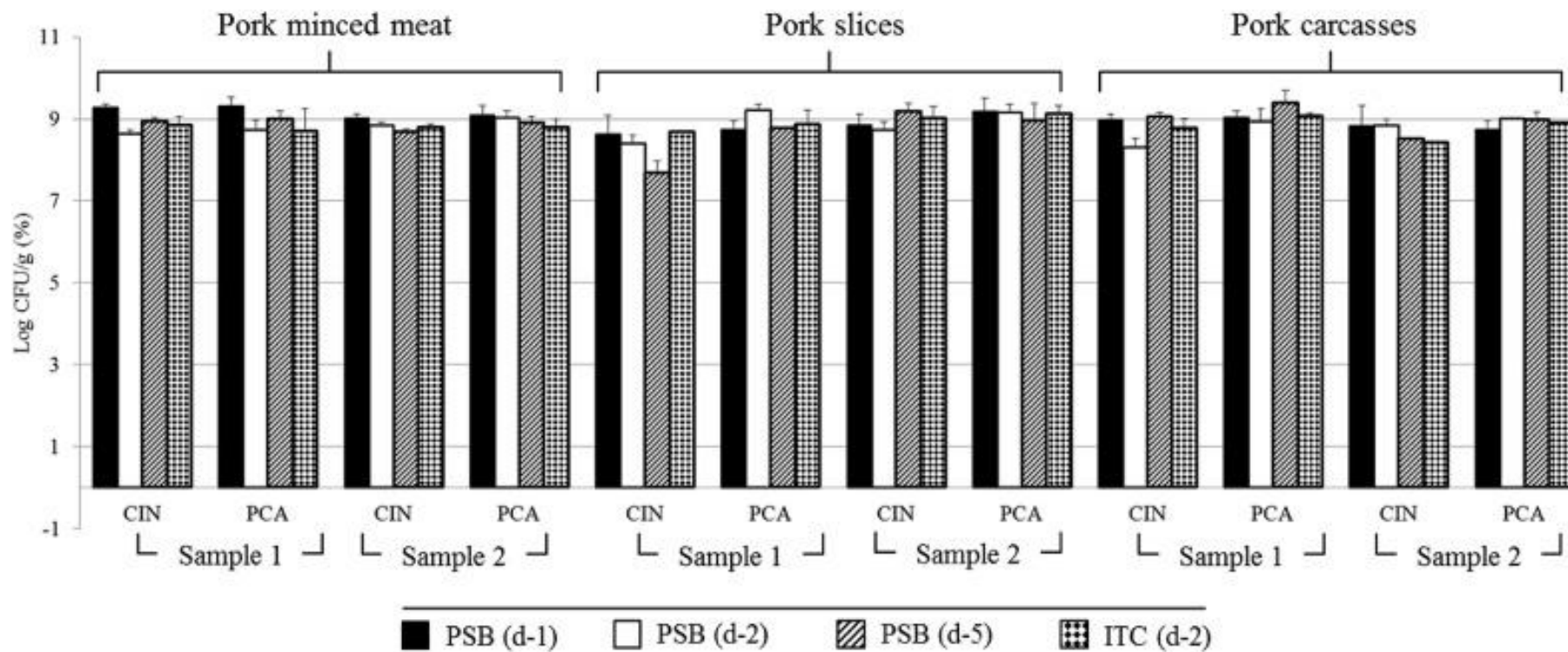
**Tabella 4.2** . Rilevazione del gene *ystB* mediante SYBR Green PCR utilizzato come target per *Y. enterocolitica* biotipo 1A in 35 campioni al 1°, 2° e 5° giorno di incubazione a 25 °C in brodo PSB.

|                                    |                |   | Giorni |     |     |
|------------------------------------|----------------|---|--------|-----|-----|
| Prodotti a base di carne di maiale | N. di campioni |   | d-1    | d-2 | d-5 |
| Salame                             | 7              | 7 | nD     | nD  | nD  |
| Salsicce                           | 7              | 3 | nD     | nD  | nD  |
|                                    |                | 4 | D.     | D.  | D.  |
|                                    |                | 1 | nD     | nD  | nD  |
|                                    |                | 2 | nD     | D.  | nD  |
| Carne macinata                     | 7              | 1 | D.     | D.  | nD  |
|                                    |                | 3 | D.     | D.  | D.  |
|                                    |                | 5 | nD     | nD  | nD  |
|                                    |                | 1 | nD     | D.  | nD  |
| Fette di carne                     | 7              | 1 | D.     | D.  | D.  |
|                                    |                | 6 | nD     | nD  | nD  |
|                                    |                | 1 | nD     | D.  | D.  |
| Carcasse                           | 7              | 6 | nD     | nD  | nD  |
|                                    |                | 1 | nD     | D.  | D.  |

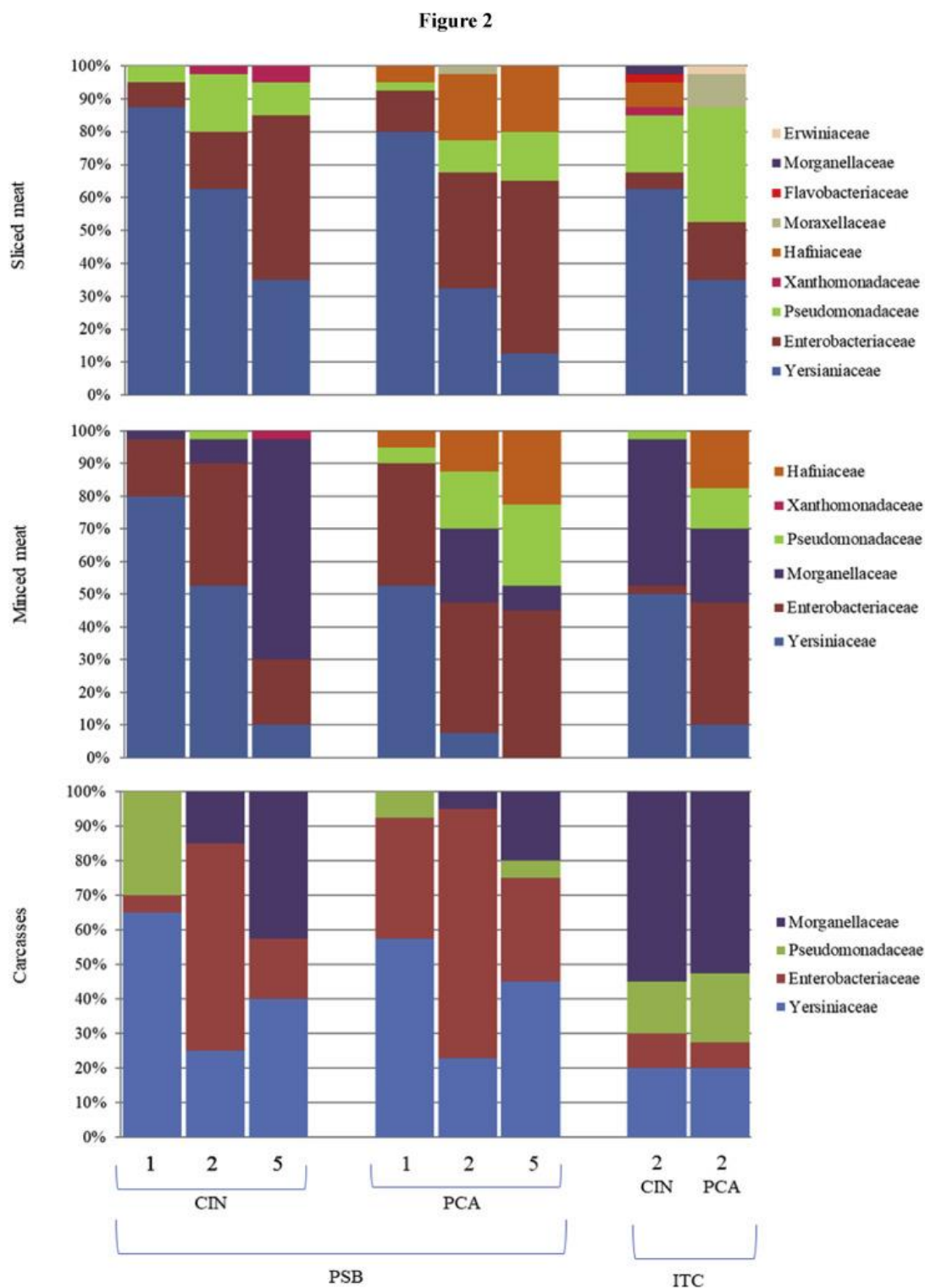
### 4.3.3 VALUTAZIONE DELLA FLORA BATTERICA PRESENTE NEI TERRENI DI ARRICCHIMENTO E AGAR SELETTIVI

L'arricchimento dei sei campioni di carne di maiale è stato effettuato in brodo PSB e ITC. Entrambi i brodi di arricchimento sono stati poi seminati sulle piastre di agar selettivo CIN e PCA. I risultati della conta batterica su ciascuna piastra sono mostrati in Fig. 4.1. Le conte batteriche sugli agar CIN e PCA non hanno mostrato differenze significative ( $p > 0,05$ ), ed erano in tutti i casi superiori a 8 Log CFU/g o cm<sup>2</sup> il 1° giorno di arricchimento in PSB, ed il 2° giorno in ITC, indipendentemente dal campione analizzato. Da ciascuna piastra CIN e PCA, 20, per un totale di 960 colonie sono state selezionate casualmente e ulteriormente analizzate mediante MALDI-TOF MS. In generale, indipendentemente dal giorno di incubazione, gli isolati batterici su piastre di agar dopo l'incubazione su PSB potevano essere assegnati a cinque famiglie, 10 generi e 22 specie su CIN e a nove famiglie, 18 generi e 40 specie su PCA. Gli isolati batterici su CIN e PCA dopo l'incubazione su ITC (giorno 2) potevano essere assegnati rispettivamente a 4 famiglie, 6 generi e 11 specie e a 6 famiglie, 10 generi e 20 specie. Nelle fette di carne, al 1° giorno di incubazione, i membri della famiglia *Yersiniaceae* sono stati quelli identificati più

frequentemente sia sull'agar CIN (96, 80,8%) che su quello PCA (68, 65,8%), ma le percentuali d'isolamento sono diminuite dal 2° giorno di incubazione. Un ulteriore diminuzione si è avuta al 5° giorno di incubazione per entrambi i terreni. (Figura 4.2 ). Lo stesso andamento è notato sia per la carne macinata che per i campioni di carcasse. Al giorno 2, l'arricchimento in PSB ha fornito una distribuzione familiare grosso modo sovrapponibile a quella ottenuta dall'arricchimento in ITC ( Fig. 4.2 ).



**Figura 4.1.** Conta batterica totale su piastre di agar CIN e PCA di campioni di carne suina (2 carcasse, 2 carne macinata e 2 fette) dopo arricchimento in PSB o ITC.



**Figura 4.2.** Famiglie batteriche identificate su CIN e PCA mediante MALDI-TOF in sei campioni di maiale (2 carcasse, 2 carne macinata e 2 fette) dopo arricchimento in PSB o ITC (25 °C) rispettivamente per uno, due e cinque o due giorni.

La distribuzione delle specie è riportata in Tabella 4.3 . Dopo il 1° giorno di incubazione, *Serratia* spp. era il genere dominante con 92 isolati raccolti su CIN (76,7%) e 75 su PCA (62,5%). Al 2° giorno di incubazione in PSB, *Citrobacter* spp. (n.50, 41,7%) insieme a *Serratia* spp. (n. 49, 40,8%) erano i generi più comunemente presenti sul terreno CIN, mentre *Proteus* spp. era quello dominante (n. 45, 37,5%) sul PCA (Tabella 4.3). Dall'arricchimento in ITC, la flora batterica era composta principalmente da *Serratia* (n = 64, 53,8%) e *Morganella* spp. (n = 40, 33,3%) su CIN, e *Morganella* (n = 30, 25%), *Pseudomonas* (n = 27, 22,5%) e *Serratia* spp. (n. 26, 21,7%) su PCA. Al 5° giorno di incubazione, quasi il 60% della flora batterica era equamente distribuita nei due generi *Citrobacter* e *Serratia* spp. (28,3% ciascuno) su CIN, ed anche *Morganella* (n = 23, 19,2%) e *Providencia* spp. (n = 21, 17,5%) sono stati segnalati frequentemente. Dal PCA al 5° giorno, i membri dei generi *Pseudomonas* (n = 25, 20,3%), *Serratia* (n = 24, 20%), *Proteus*, *Citrobacter*, *Morganella*, *Hafnia* e *Vagococcus* spp. sono stati frequentemente identificati.

**Tabella 4.3** Isolati (n. 960) identificati a livello di specie su piastre di agar CIN e PCA in due campioni di fette, due di carne macinata e due di carcasse di maiale incubati a 25°C in brodi di arricchimento PSB e ITC rispettivamente per uno, due e cinque giorni, e per due giorni.

| Genus                | Species            | Meat Slices |    |   |     |   |   | Minced Meat |     |     |    |    |     | Carcasses |   |     |     |     |    |    |     |   |   |     |     |
|----------------------|--------------------|-------------|----|---|-----|---|---|-------------|-----|-----|----|----|-----|-----------|---|-----|-----|-----|----|----|-----|---|---|-----|-----|
|                      |                    | PSB         |    |   |     |   |   | ITC         |     | PSB |    |    |     |           |   | ITC |     | PSB |    |    |     |   |   | ITC |     |
|                      |                    | CIN         |    |   | PCA |   |   | CIN         | PCA | CIN |    |    | PCA |           |   | CIN | PCA | CIN |    |    | PCA |   |   | CIN | PCA |
|                      |                    | 1           | 2  | 5 | 1   | 2 | 5 | 2           | 2   | 1   | 2  | 5  | 1   | 2         | 5 | 2   | 2   | 1   | 2  | 5  | 1   | 2 | 5 | 2   | 2   |
| <i>Acinetobacter</i> | <i>guillouiae</i>  |             |    |   | 1   |   |   |             |     |     |    |    |     |           |   |     |     |     |    |    |     |   |   |     |     |
|                      | <i>agrestis</i>    |             |    |   | 1   |   |   | 1           |     |     |    |    |     |           |   |     |     |     | 1  |    |     |   |   |     |     |
| <i>Buttiauxella</i>  | <i>ferragutiae</i> |             |    |   | 1   |   |   |             |     |     |    |    |     |           |   |     |     |     |    |    |     |   |   |     |     |
|                      | <i>gaviniae</i>    |             |    |   |     |   |   |             |     | 1   |    |    |     |           |   |     |     |     |    |    |     |   |   |     |     |
|                      | <i>izardii</i>     |             |    |   | 1   |   |   |             |     |     |    |    |     |           |   |     |     |     |    |    |     |   |   |     |     |
|                      | <i>braakii</i>     | 2           | 1  |   |     |   |   |             |     | 1   |    |    |     |           |   |     | 4   |     |    |    |     |   | 1 | 1   |     |
| <i>Citrobacter</i>   | <i>freundii</i>    | 4           | 19 |   |     | 6 |   | 2           | 3   | 6   | 14 | 8  | 2   | 1         | 3 | 1   |     | 1   | 26 | 6  | 2   | 2 | 3 | 3   | 2   |
|                      | <i>gillenii</i>    |             |    |   | 3   | 7 | 1 |             |     |     |    | 1  |     |           |   |     |     |     |    |    |     |   |   |     |     |
| <i>Empedobacter</i>  | <i>brevis</i>      |             |    |   |     | 1 |   |             |     |     |    |    |     |           |   |     |     |     |    |    |     |   |   |     |     |
|                      | <i>asburiae</i>    |             |    |   |     |   |   |             |     |     |    |    |     |           |   |     |     |     |    | 4  | 1   |   |   |     |     |
| <i>Enterobacter</i>  | <i>cloacae</i>     |             |    |   |     |   |   |             |     |     |    |    |     |           |   |     |     |     |    | 1  |     |   |   |     |     |
|                      | <i>kobei</i>       |             |    |   |     |   |   |             |     |     |    |    |     |           |   |     |     |     |    | 2  |     |   |   |     |     |
| <i>Escherichia</i>   | <i>coli</i>        |             |    |   |     |   |   |             |     |     |    |    |     |           |   |     |     |     |    | 1  | 2   | 2 |   |     |     |
| <i>Ewingella</i>     | <i>americana</i>   |             |    |   |     |   |   | 1           |     |     |    |    |     |           |   |     |     |     |    |    |     |   |   |     |     |
| <i>Hafnia</i>        | <i>alvei</i>       |             |    |   | 2   | 8 | 3 |             | 4   |     |    | 2  | 5   | 9         |   | 7   |     |     |    |    |     |   |   |     |     |
| <i>Klebsiella</i>    | <i>oxytoca</i>     |             |    |   |     | 1 |   |             |     |     |    | 1  |     | 1         |   |     |     |     | 1  |    | 3   |   |   |     |     |
| <i>Kluyvera</i>      | <i>intermedia</i>  |             |    |   |     |   |   |             |     | 1   |    |    |     |           |   |     |     |     |    |    |     |   |   |     |     |
| <i>Lelliottia</i>    | <i>amnigena</i>    |             |    |   | 2   |   |   |             |     |     |    |    |     |           |   |     |     |     | 1  |    |     |   |   |     |     |
| <i>Morganella</i>    | <i>morganii</i>    |             |    |   |     | 1 |   |             |     | 3   | 10 |    | 9   | 3         |   | 18  | 9   |     | 6  | 13 |     | 2 | 8 | 22  | 21  |
| <i>Pantoea</i>       | <i>agglomerans</i> |             |    |   |     |   |   | 1           |     |     |    |    |     |           |   |     |     |     |    |    |     |   |   |     |     |
| <i>Proteus</i>       | <i>hauseri</i>     |             |    |   |     |   |   |             |     |     |    | 8  | 14  | 8         |   | 8   |     | 2   |    | 33 | 4   |   |   |     |     |
|                      | <i>vulgaris</i>    |             |    |   |     |   |   |             |     |     |    |    | 1   | 2         |   | 7   |     |     |    |    |     |   |   |     |     |
| <i>Providencia</i>   | <i>heimbachae</i>  |             |    |   |     |   |   |             |     | 1   |    | 6  |     |           |   |     |     |     |    |    |     |   |   |     |     |
|                      | <i>rettgeri</i>    |             |    |   |     |   |   |             |     |     |    | 11 |     |           |   |     |     |     | 4  |    |     |   |   |     |     |

| Genus            | Species           | Sliced meat |    |     |    |     |     |     |     | Minced Meat |     |     |     |     |     |     |     | Carcasses |     |    |    |               |   |   |   |
|------------------|-------------------|-------------|----|-----|----|-----|-----|-----|-----|-------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----------|-----|----|----|---------------|---|---|---|
|                  |                   | PSB         |    |     |    | ITC |     |     |     | PSB         |     |     |     | ITC |     |     |     | PSB       |     |    |    | ITC           |   |   |   |
|                  |                   | CIN         |    | PCA |    | CIN | PCA | CIN | PCA | CIN         | PCA | CIN | PCA | CIN | PCA | CIN | PCA | CIN       | PCA |    |    |               |   |   |   |
|                  |                   | 1           | 2  | 5   | 1  | 2   | 5   | 2   | 2   | 1           | 2   | 5   | 1   | 2   | 5   | 2   | 2   | 1         | 2   | 5  | 1  | 2             | 5 | 2 | 2 |
| Pseudomonas      | agarici           |             |    |     |    |     |     |     |     |             |     |     |     |     |     |     |     |           |     |    |    |               |   |   | 1 |
|                  | azotoformans      |             |    |     |    |     | 1   |     |     |             |     |     |     |     |     |     |     |           |     |    |    |               |   |   |   |
|                  | brassicacearum    |             |    |     |    |     |     |     |     |             |     |     |     |     |     |     |     |           |     |    |    |               |   | 1 |   |
|                  | brenneri          |             |    |     |    |     |     |     |     |             |     |     |     |     |     |     |     |           |     |    |    |               |   |   | 1 |
|                  | chlororaphis      |             |    |     |    |     |     |     |     |             |     |     | 3   |     |     |     |     |           |     |    |    |               |   |   |   |
|                  | cichorii          |             |    |     |    |     |     |     |     |             |     |     | 1   | 3   |     |     |     |           |     |    |    |               |   |   |   |
|                  | fluorescens       |             | 2  |     |    |     |     |     |     |             |     |     |     |     |     |     |     | 3         |     |    |    |               |   |   |   |
|                  | fragi             |             |    |     | 1  | 2   | 4   |     |     |             |     | 1   | 2   | 1   |     |     |     |           |     |    |    | 1             |   |   |   |
|                  | fulva             |             |    |     |    |     |     |     |     |             |     |     |     |     |     |     |     | 3         |     |    |    |               | 1 | 1 |   |
|                  | fuscovaginae      |             |    |     |    | 2   | 1   |     | 10  |             |     |     |     | 5   |     | 1   |     |           |     | 1  | 1  |               |   |   |   |
|                  | graminis          |             |    |     |    |     | 1   |     | 4   |             |     |     |     |     |     |     |     |           |     |    |    |               |   |   |   |
|                  | kilonensis        |             |    |     |    |     |     |     |     |             |     |     | 1   |     |     | 4   |     |           |     |    |    |               |   |   |   |
|                  | libanensis        |             | 1  |     |    |     |     |     |     |             | 1   |     |     |     |     |     |     |           |     |    |    |               |   |   |   |
|                  | lundensis         |             |    |     |    |     |     |     |     |             |     |     | 1   | 1   |     |     |     |           |     |    |    |               |   |   |   |
|                  | Pseudoalc. putida |             |    |     |    |     |     |     |     |             |     |     |     |     |     | 1   |     | 6         |     | 1  |    |               | 4 | 4 |   |
|                  | rhodesiae         |             | 2  | 1   |    |     | 2   |     |     |             |     |     |     |     |     |     |     |           |     |    |    |               |   |   |   |
|                  | synxantha         | 2           | 2  | 3   |    |     | 3   |     |     |             |     |     |     |     |     |     |     |           |     |    |    |               |   |   |   |
| taetrolens       |                   |             |    |     |    | 1   |     |     |     |             |     |     |     |     |     |     |     |           | 1   |    |    |               |   |   |   |
| Rahnella         | aquatilis         | 3           | 1  |     | 2  | 1   |     | 1   | 2   |             |     | 1   |     |     |     |     | 1   | 1         | 1   |    |    |               |   |   |   |
| Raoultella       | ornithinolytica   |             |    |     |    |     |     |     | 1   |             |     | 1   |     |     |     |     |     |           | 1   |    |    |               |   |   |   |
| Serratia         | fonticola         |             | 2  |     |    | 1   |     |     |     |             |     |     |     |     |     |     |     |           |     |    |    |               |   |   |   |
|                  | grimesii          | 1           | 1  | 1   |    |     |     |     |     |             |     |     |     |     |     | 1   |     |           |     |    | 1  |               |   |   |   |
|                  | liquefaciens      | 31          | 21 | 12  | 32 | 7   | 6   | 36  | 14  | 5           | 18  |     | 4   | 1   |     | 7   |     | 25        | 1   | 16 | 22 | $\frac{1}{7}$ | 8 | 8 |   |
|                  | plymuthica        |             |    |     |    |     |     |     |     | 3           |     |     |     |     |     |     |     |           |     |    |    |               |   |   |   |
|                  | proteamaculans    | 3           | 1  | 1   |    | 5   |     |     |     | 23          | 1   | 4   | 16  | 1   |     | 12  | 4   |           |     | 1  |    |               |   |   |   |
| Stenotrophomonas | maltophilia       |             | 1  | 2   |    | 1   |     |     |     |             |     | 1   |     |     |     |     |     |           |     |    |    |               |   |   |   |
| Vagococcus       | fluvialis         |             |    |     | 1  | 7   |     |     |     |             |     |     |     | 4   |     |     |     |           |     |    |    |               |   |   |   |
| Yersinia         | enterocolitica    |             |    |     |    |     |     |     |     |             | 2   |     | 1   |     |     |     |     |           |     |    |    |               |   |   |   |
|                  | intermedia        |             |    |     |    |     |     |     |     | 1           |     |     | 1   |     |     |     |     |           |     |    |    |               |   |   |   |

Indipendentemente dal mezzo di arricchimento, tutti i ceppi isolati da CIN erano Gram-negative e le specie appartenenti ai generi *Ewingella*, *Kluyvera* e *Providencia* spp. sono stati isolati solo da questo agar. D'altro canto *Acinetobacter*, *Buttiauxella*, *Empedobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Hafnia*, *Klebsiella*, *Lelliotta*, *Pantoea* e *Vagococcus* spp. sono stati recuperati solo da piastre di PCA. Per quanto riguarda le specie *Yersinia*, *Y. enterocolitica* e *Y. intermedia* sono state entrambe recuperate da campioni di carne macinata ( Tabella 4.3 ). Nel dettaglio, in uno dei campioni, al 2° giorno di incubazione dopo l'arricchimento in PSB, sono stati identificati due isolati da CIN come *Y. enterocolitica*, ed uno da PCA come *Y. intermedia*. Nell'altro campione, al 1° giorno di incubazione dopo l'arricchimento in PSB, una colonia da PCA era *Y. enterocolitica*, ed una da CIN *Y. intermedia*.

#### 4.4 DISCUSSIONE

Il presente lavoro si è concentrato sui limiti e sulle debolezze dei metodi convenzionali attualmente proposti per *Yersinia* spp. per la ricerca nei prodotti a base di carne di maiale. La SYBR Green PCR è stata utilizzata per rilevare *Yersinia* in diversi campioni di carne inoculati sperimentalmente con *Y. enterocolitica* patogena biotipo 4/O:3 e ceppo non patogeno 1A/O:5. Sono state osservate differenze tra il

comportamento di entrambi i biotipi; infatti, è stata sempre rilevata solo la *Y. enterocolitica* 1A non patogena. Inoltre, la rilevazione della *Y. enterocolitica* 4/O:3 patogena in campioni contaminati con livelli di LC ( $10-10^2$  CFU/g) si è rivelata sempre infruttuosa. Tali risultati destano particolare preoccupazione, perché nel cibo, l'agente patogeno solitamente si trova a basse concentrazioni ( Petsios et al., 2016 ). Probabilmente, l'ostacolo associato all'isolamento di *Y. enterocolitica* 4/O:3 potrebbe derivare dal basso numero di cellule patogene presenti nel campione, e dal gran numero di microrganismi competitivi cresciuti nel terreno liquido selettivo (PSB) ( Fredriksson-ahomaa e Korkeala, 2003 ). D'altro canto, la crescita del biotipo 1A non sembra essere influenzata. Pertanto, poiché *Y. enterocolitica* 4/O:3 è un concorrente più debole, gli altri batteri presenti nel mezzo di arricchimento potrebbero crescere eccessivamente, pregiudicando così la sua rilevazione ( Bari et al., 2011). Inoltre, secondo i presenti risultati, la temperatura di incubazione (10 o 25 °C) influenza fortemente il giorno ottimale di rilevamento di *Y. enterocolitica*. Quando la temperatura di incubazione è fissata a 25 °C, che è effettivamente quella indicata dai metodi ISO (ISO: 10273:2017), il gene bersaglio potrebbe essere rilevato solo durante i primi tre giorni di incubazione, e solo se il livello di contaminazione è di almeno  $10^2$  –

$10^3$  CFU/g (MC). Ciò è coerente con i risultati di Van Damme et al. (2013). Secondo questi autori, un'incubazione di due giorni ha permesso la migliore rilevazione del patogeno con il metodo coltura-dipendente, rispetto ad un'incubazione di cinque giorni. Al contrario, a  $10^\circ\text{C}$ , e alla stessa dimensione dell'inoculo ( $10^2$ – $10^3$  CFU/g), *Y. enterocolitica* ha mostrato un comportamento opposto: il patogeno è stato rilevato nelle fette di maiale già al quinto giorno di incubazione. Poiché *Y. enterocolitica* è un batterio psicrofilo può quindi crescere a temperatura di refrigerazione, è stato precedentemente riportato che l'incubazione a  $4^\circ\text{C}$  può migliorare il tasso di rilevamento perché l'agente patogeno può superare la flora mesofila presente nel campione. Secondo i risultati attuali, con l'incubazione a  $10^\circ\text{C}$ , la soglia di rilevamento non cambia, ma è necessario un tempo di incubazione più lungo. In realtà, è noto che a  $4^\circ\text{C}$  il tempo di incubazione può durare fino a tre settimane (Savin et al., 2012), e questo rappresenta un ulteriore svantaggio.

Quando sono stati analizzati campioni naturalmente contaminati, il gene *ystA* utilizzato come target per la rilevazione di *Y. enterocolitica* 4/O:3 non è mai stato amplificato, mentre il gene *ystB*, utilizzato come target per il biotipo 1A, è stato rilevato frequentemente. Il biotipo 1A è stato considerato non patogeno,

sebbene negli ultimi anni sia stato associato a casi di yersiniosi nell'uomo ( Strydom et al., 2019 ). I risultati del presente studio concordano pienamente con le ricerche precedentemente pubblicate ( Lucero-Estrada et al., 2020 ; Sirghani et al., 2018): il biotipo 1A è il biotipo isolato e/o rilevato più frequentemente. Escludendo errori metodologici correlati alla SYBR Green PCR, un migliore isolamento/rilevamento del biotipo 1A potrebbe non essere necessario a causa della sua prevalenza nel campione, ma piuttosto a causa di una maggiore tolleranza alle condizioni prevalenti nel brodo di arricchimento. Per caratterizzare la microflora presente sull'agar CIN, e sull'agar PCA non selettivo, sono state identificate colonie raccolte casualmente mediante MALDI TOF MS . Come previsto, le conte batteriche totali erano leggermente più elevate sul PCA, ma non è stata notata alcuna differenza significativa (  $p > 0,05$  ) *tra i due terreni* ( Fig. 4.1 ). Anche se le cariche batteriche sono rimaste quasi costanti dal 2° al 5° giorno di incubazione sia su CIN che su PCA, le specie batteriche sono cambiate notevolmente durante questo intervallo di tempo. Nel dettaglio, le *Yersiniaceae* sono state la famiglia dominante sia su CIN che su PCA dopo arricchimento in PSB al 1° giorno di incubazione, ma già a partire dal 2° giorno la percentuale del suo isolamento è diminuita notevolmente, indipendentemente dal campione di carne (Fig. 4.2 ). I

risultati di questa seconda serie di studi confermano ulteriormente la scarsa competitività dei membri della famiglia delle *Yersinaceae*. Inoltre, la durata dell'incubazione sembra essere un aspetto cruciale: il miglior recupero del genere *Yersinia* si ottiene con un arricchimento mai superiore alle 48 h, successivamente la microflora batterica presente ha una crescita eccessiva nel brodo PSB, mettendo così a rischio il rilevamento dell'agente patogeno. Probabilmente, i terreni di arricchimento solitamente adottati, nonostante la presenza di sorbitolo e sali biliari nel PSB e di irgasan, ticarcillina e clorato di potassio nell'ITC, non sono sufficientemente selettivi, portando così alla crescita di batteri diversi da *Yersinia* nel campione. Rispetto al PCA, la biodiversità della comunità microbica riflette la maggiore selettività del CIN, dovuta alla presenza di cefsulodina, irgasan e novobiosina, indipendentemente dal brodo (PSB o ITC) utilizzato per l'arricchimento (Fig. 2). Tuttavia, un gran numero di generi non *Yersinia* crescevano sull'agar CIN; soprattutto diverse colture appartenenti a *Serratia* e *Citrobacter* spp. sono stati isolati su questo terreno. Infatti *Serratia*, *Citrobacter*, *Morganella* e *Providencia* spp. possono produrre colonie abbastanza simili a *Y. enterocolitica* (Petsios et al., 2016). Le specie *Y. enterocolitica* e *Y. intermedia* sono state isolate da campioni di carne macinata ma solo durante i primi due giorni

di incubazione in PSB. L'isolamento di *Y. intermedia* non deve essere sottovalutato in quanto è classificata come specie simile a *Y. enterocolitica* ed è stata associata a malattie umane e animali ( Imori et al., 2017 ). Qui è stata caratterizzata per la prima volta la flora batterica competitiva, che cresce nei terreni di arricchimento utilizzati per la ricerca di *Y. enterocolitica*. Secondo i dati, la popolazione microbica presente nei mezzi di arricchimento è in gran parte influenzata dal tempo e dalla temperatura di incubazione, svolgendo un ruolo cruciale nella capacità del metodo di rilevare l'agente patogeno. Sulla base dei risultati, sono ancora necessari ulteriori agenti inibitori o componenti selettivi in grado di promuovere il recupero delle specie *Yersinia*. Inoltre, dal momento del ritrovamento di diversi biotipi all'interno del genere *Yersiniae*, ulteriori esperimenti basati sull'uso di ulteriori biotipi, anche come miscele, potrebbero migliorare il potenziale della Real-Time PCR come strumento supplementare per la ricerca di questo patogeno.

## 4.5 BIBLIOGRAFIA

A. Bancerz-kisiel

The most important virulence markers of *Yersinia enterocolitica* and their role during infection 1–14

Genes (2018), 10.3390/genes9050235

L. Bari, M.A. Hossain, K. Isshiki, D. Ukuku

Behavior of *Yersinia enterocolitica* in Foods 2011

J. Pathog. (2011), 10.4061/2011/420732

A. Cherkaoui, J. Hibbs, S. Emonet, M. Tangomo, M. Girard, P. Francois, J. Schrenzel

Comparison of two matrix-assisted laser desorption ionization-time of Flight mass Spectrometry methods with conventional phenotypic identification for routine identification of bacteria to the species level

J. Clin. Microbiol., 48 (2010), pp. 1169-1175, 10.1128/JCM.01881-09

I. Van

Damme, D. Berkvens, N. Botteldoorn, K. Dierick, J. Wits, B. Pochelet, L. De Zutter

Evaluation of the ISO 10273: 2003 method for the isolation of human pathogenic *Yersinia enterocolitica* from pig carcasses and minced meat

Food Microbiol., 36 (2013), pp. 170-175, 10.1016/j.fm.2013.05.007

EFSA (European Food Safety Authority)

The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017

EFSA J., 17 (12) (2019), p. 276, 10.2903/j.efsa.2018.5500

M. Fredriksson-Ahomaa, H. Korkeala

Low occurrence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in clinical

Food Environ. Samples Methodol. Prob., 16 (2003), pp. 220-229, 10.1128/CMR.16.2.220

P.F.M. Imori, J. Passaglia, R.A. Souza, L.B. Rocha, J.P. Falcão

Virulence-related genes, adhesion and invasion of some *Yersinia enterocolitica*-like strains suggests its pathogenic potential

Microb. Pathog., 104 (2017), pp. 72-77, 10.1016/j.micpath.2017.01.008

C. Lucero-Estrada, G.I. Favier, M.E. Escudero

An overview of *Yersinia enterocolitica* and related species in samples of different origin from San Luis, Argentina

Food Microbiol., 86 (2020), p. 103345, 10.1016/j.fm.2019.103345

K. Morka, J. Bania, A. Korzeniowska-

kowal, K. Korzekwa, K. Guz-regner, G. Bugla-p

Identification of *Yersinia enterocolitica* Isolates from Humans, Pigs and Wild Boars by MALDI TOF MS 1–10

(2018)

R. Paixão, L.Z. Moreno, D. Dirani, S.

De Gobbi, D. Cristine, E. Hofer, M.H. Matté, T. Sebastiana, P. Ferreira, V. Tulio, D.M. Gomes, B. Leticia, P. Costa, A.M. Moreno

Characterization of *Yersinia Enterocolitica* Biotype 1A Strains Isolated from Swine Slaughterhouses and Markets 2013

(2013)

M.F. Peruzzy, N. Murru, A.G. Perugini, F. Capuano, E. Delibato, R.  
. Mercogliano, H. Korkeala, Y.T.R. Proroga

Evaluation of virulence genes in *Yersinia enterocolitica* strains  
using SYBR Green real-time PCR

Food Microbiol., 65 (2017), pp. 231-  
235, 10.1016/j.fm.2017.03.004

M.F. Peruzzy, N. Murru, Z. Yu, M. Cnockaert, M. Joossens, Y.T.R.  
Proroga, K. Houf

Determination of the microbiological contamination in minced  
pork by culture dependent and 16S amplicon sequencing analysis

Int. J. Food Microbiol., 290 (2019), pp. 27-  
35, 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.09.025

M.F. Peruzzy, N. Murru, Z. Yu, P. Kerkhof, B. Neola, M. Joossens,  
Y.T.R. Proroga, K. Houf

Assessment of Microbial Communities on Freshly Killed Wild  
Boar Meat by MALDI-TOF MS and 16S rRNA Amplicon  
Sequencing

Int. J. Food Microbiol., 301 (2019), pp. 51-60, 10.1016/j.ijfoodmicro.2019.05.005

S. Petsios, M. Fredriksson-ahomaa, H. Sakkas, C. Papadopoulou  
Conventional and molecular methods used in the detection and subtyping of *Yersinia enterocolitica* in food

Int. J. Food Microbiol., 237 (2016), pp. 55-72, 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.015

C. Savin, A. Leclercq, E. Carniel  
Evaluation of a single procedure allowing the isolation of enteropathogenic *Yersinia* along with other bacterial enteropathogens from human stools

PLoS One, 7 (2012), 10.1371/journal.pone.0041176

K. Sirghani, T. Zeinali, A. Jamshidi  
Detection of *Yersinia enterocolitica* in retail chicken meat, Mashhad, Iran

J. Pathog. (2018), pp. 1-4, 10.1155/2018/1286216

H. Strydom, J. Wang, S. Paine, K. Dyet, K. Cullen, J. Wright

Evaluating sub-typing methods for pathogenic *Yersinia enterocolitica* to support outbreak investigations in New Zealand

Epidemiol. Infect., 147 (2019), pp. 1-7, 10.1017/S0950268819000773

B. Torres, F. Martins, C. Vieira, D. Augusto, L. Silva, F. Germano, P. Alvarenga, J. Libero, M. Emilene, M. Campos-galvão, R. Seiti, J. Pfrimer, S. Bersot, L. Augusto

*Yersinia enterocolitica* in a Brazilian pork production chain: Tracking of contamination routes, virulence and antimicrobial resistance

Int. J. Food Microbiol., 276 (2018), pp. 5-9, 10.1016/j.ijfoodmicro.2018.03.028

R. Tuompo, T. Hannu, E. Huovinen, L. Sihvonen, A. Siitonen, M. Leirisalo-repo

*Yersinia enterocolitica* biotype 1A: A possible new trigger of reactive arthritis

Rheumatol. Int., 37 (2017), pp. 1863-1869, 10.1007/s00296-017-3816-0

Z. Yu, M.F. Peruzy, C. Dumolin, M. Joossens, K. Houf

Assessment of food microbiological indicators applied on poultry carcasses by culture combined MALDI-TOF MS identification and 16S rRNA amplicon sequencing

Food Microbiol. (2019), 10.1016/j.fm.2019.01.018

A. Zadernowska, W. Chajęcka-wierzchowska, L. Łaniewska

*Yersinia enterocolitica* : A dangerous, but often ignored, foodborne pathogen

Foodborne Pathogen 9129

<https://doi.org/10.1080/87559129.2013.853775> (2014)

## 5. ARTICOLO 2

### **CONFRONTO TRA DIGITAL DROPLET PCR E REAL TIME PCR PER LA RICERCA DI *YERSINIA ENTEROCOLITICA* NELLE VERDURE**

D. Cristiano, M.F. Peruzzy, M. Aponte, A. Mancusi, Y.T.R. Proroga, F.

Capuano, N. Murru

International Journal of Food Microbiology 2021, 354 (2021) 109321,

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109321>

#### **RIASSUNTO**

La yersiniosi, la quarta zoonosi più comunemente segnalata nell'Unione europea, è causata dal consumo di alimenti contaminati dal batterio *Yersinia enterocolitica*. Il numero di casi umani e di campioni di alimenti contaminati è probabilmente sottostimato poiché i metodi molecolari convenzionali attualmente proposti per il rilevamento di *Yersinia enterocolitica* hanno dimostrato di avere diversi limiti. Le criticità legate alla rilevazione di *Yersinia enterocolitica* nella carne e/o nei prodotti a base di carne sono già state studiate, mentre mancano ancora dati sui possibili limiti dei metodi molecolari per la rilevazione di *Yersinia enterocolitica* nelle verdure. Secondo il metodo ISO (ISO 18867:2015), la reazione a catena della polimerasi in tempo reale

(rtPCR) dovrebbe essere adottata per il rilevamento di *Yersinia enterocolitica*, anche se si è rivelata affetta da alcuni errori. Recentemente, la Droplet Digital PCR (ddPCR) è stata introdotta come strumento utile per rilevare e quantificare diversi batteri patogeni in matrici alimentari complesse. Tuttavia, la sua potenziale applicazione per il rilevamento di *Yersinia enterocolitica* nelle verdure non è mai stata studiata prima. Nel presente studio sono state utilizzate due piattaforme molecolari (rtPCR e ddPCR) per valutare il comportamento del patogeno in verdure a foglia verde contaminate sperimentalmente (*Lactuca sativa* L.) e per valutare il tasso di rilevamento dopo l'incubazione per undici giorni a diverse temperature. Dal confronto sono emerse notevoli differenze tra i due approcci tecnici: solo la ddPCR ha consentito il rilevamento dell'agente patogeno nelle verdure quando contaminate a bassi livelli. Inoltre, i risultati del presente lavoro hanno evidenziato quanto sia importante la durata e la temperatura di incubazione, per la sopravvivenza e/o la crescita di *Yersinia enterocolitica* nelle verdure, infatti sia 18 che a 25 °C la concentrazione del patogeno diminuisce considerevolmente durante l'incubazione. Sulla base dei dati, l'uso della rtPCR porta a sottostimare la reale prevalenza della *Y. enterocolitica* patogena nelle verdure, mentre la temperatura e il tempo attualmente proposti per *Y.*

*enterocolitica* (25 °C per 24 ore) consentono di ottimizzare il rilevamento. Per concludere, la ddPCR può essere senza dubbio proposta come una strategia alternativa affidabile per la ricerca rapida del patogeno nei campioni alimentari.

**Parole chiave:** Digitale Droplet PCR; Verdure a foglia verde; Real time-PCR; *Y. enterocolitica*.

## 5.1 INTRODUZIONE

Le verdure, garantendo un adeguato apporto di elementi essenziali come vitamine e minerali, rappresentano una componente importante di una dieta sana ( Berger et al., 2010 ). Inoltre, prove scientifiche indicano che il consumo di verdura, insieme alla frutta, può aiutare a prevenire una serie di malattie della società moderna (ad esempio cancro e malattie cardiovascolari) ( Vojkovská et al., 2017 ). Tuttavia, è ormai noto che le verdure, in particolare le verdure a foglia verde, possono diventare veicolo di trasmissione di agenti patogeni umani ( Berger et al., 2010 ). Diversi fattori che si verificano “dalla fattoria alla tavola”, come la qualità insoddisfacente delle fonti di irrigazione e dell’acqua di risciacquo, l’applicazione di letame compostato in modo improprio e la manipolazione non igienica, possono contribuire alla sopravvivenza di agenti patogeni umani in tali alimenti (Ssemanda et al. , 2018 ). Poiché le verdure vengono consumate principalmente crude, la presenza di agenti patogeni rappresenta un importante problema di salute pubblica ( Berger et al., 2010 ; Efsa, 2013 ; Markland et al., 2018 ). Nell'Unione Europea (UE), le verdure sono state recentemente associate a diverse epidemie di origine alimentare causate da *Escherichia coli* produttore della tossina

Shiga (STEC), *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* e norovirus (Boqvist et al., 2018). Tuttavia, sono stati rilevati anche altri agenti patogeni di origine alimentare, come *Yersinia (Y.) enterocolitica* (Bari et al., 2011). La *Y. enterocolitica* è un patogeno enterico appartenente alla famiglia delle *Yersiniaceae* (Adeolu et al., 2016). La specie *Y. enterocolitica* può essere divisa in sei biotipi 1A, 1B, 2, 3, 4, 5 e più di 70 sierotipi diversi (Gupta et al., 2015). Ad eccezione del biotipo 1A, tutti i biotipi sono patogeni per l'uomo (Platt-samoraj et al., 2017). Il biotipo 1A non ospita né il plasmide di virulenza *pYV*, né i geni di virulenza cromosomica (*ail*, *yst A*), e di solito si ritiene che sia avirulento (Paixão et al., 2013). Tuttavia, è stata recentemente associata a casi di yersiniosi nell'uomo (Strydom et al., 2019). Tra i vari sierotipi, *Y. enterocolitica* 4/0:3 è il sierotipo più comunemente associato a casi umani nell'UE (Torres et al., 2018). Di fatto, nel 2019, la yersiniosi è stata la quarta zoonosi più comunemente segnalata nell'UE con 6961 casi confermati, principalmente associati al consumo di carne suina e prodotti derivati (EFSA ed ECDC, 2021). Nello stesso anno sono stati segnalati anche 76 campioni Ready To Eat (RTE) positivi per *Y. enterocolitica* (EFSA ed ECDC, 2021). In ogni caso, nel corso degli anni, casi sporadici di yersiniosi sono stati collegati anche al consumo

di latte crudo, latticini , formaggi, tofu, frutti di mare e verdure crude ( Lee et al., 2004 ), recentemente con insalata e spinaci freschi. ( Espenhain et al., 2019 ). Tuttavia, il numero dei casi è probabilmente sottostimato poiché la segnalazione di *Yersinia* non è obbligatoria in diversi Stati membri e anche perché gli attuali metodi per l'isolamento (UNI EN ISO 10273:2017) e la ricerca (UNI EN ISO/TS 18867:2015) del patogeno hanno dimostrato di avere numerose limitazioni ( Peruzzy et al., 2020a ). Il comportamento di *Y. enterocolitica* nella carne e/o nei prodotti a base di carne contaminati sperimentalmente, e di quali possono essere i punti critici relative ai metodi di riferimento per l'isolamento/ricerca, sono stati al centro di numerosi studi ( Peruzzy et al., 2020a ; Petsios et al., 2016 ; Van Damme et al., 2013 ). D'altra parte, i possibili limiti e debolezze dei metodi molecolari convenzionali attualmente proposti per la ricerca di *Yersinia spp.* nella lattuga, non sono stati ancora studiati. Il metodo ISO (ISO 18867:2015) per la ricerca di *Y. enterocolitica* prevede l'uso della rtPCR dopo arricchimento in PSB per 24 ore  $\pm$  3 a 25 °C come primo passaggio. Solo in caso di campioni positivi per rtPCR è richiesto l'isolamento su terreni agar selettivi. Negli ultimi anni, la rtPCR è stata utilizzata con successo per il rilevamento qualitativo e quantitativo del DNA bersaglio in un'ampia varietà di campioni ( Law et al.,

2014 ). Tuttavia, la sensibilità dell'amplificazione agli inibitori può portare a risultati negativi ( Wang et al., 2018 ). Recentemente, la ddPCR è stata introdotta come strumento utile per rilevare e quantificare il DNA bersaglio in matrici alimentari complesse ( Persson et al., 2018 ). Questa tecnica si basa sulla frammentazione del DNA presente nei campioni, che successivamente vengono inglobati in decine di migliaia di goccioline di acqua e olio, prima del ciclo termico ( Hindson et al., 2011 ). Questo metodo è stato utilizzato con successo per la quantificazione accurata di *Bacillus cereus*, *Salmonella typhimurium* e *Campylobacter spp.* in campioni alimentari ( Persson et al., 2018 ; Peruzzy et al., 2020b ; Porcellato et al., 2016 ; Wang et al., 2018 ), ma la sua applicazione per il rilevamento di *Y. enterocolitica* nelle verdure non è mai stata valutata. Poiché mancano ancora dati sui problemi associati al rilevamento di *Y. enterocolitica* nelle verdure, lo scopo del presente studio è stato quello di studiare per la prima volta il comportamento di *Y. enterocolitica* in verdure a foglia verde contaminate sperimentalmente ( *Lactuca sativa* L.), dopo un'incubazione a temperature diverse. La rtPCR, ovvero la tecnica attualmente proposta per il rilevamento di *Y. enterocolitica*, è stata confrontata con la ddPCR, una tecnologia all'avanguardia.

## **5.2 MATERIALI E METODI**

### **5.2.1 PREPARAZIONE DELL'INOCULO**

La *Y. enterocolitica* biotipo 1A sierotipo O:5 (1A/O:5) e biotipo 4 sierotipo O:3 (4/O:3) patogeno, sono stati ottenuti dalla Collezione Enterobatteri Patogeni dell'Istituto Superiore di Sanità (Roma), Italia). Entrambi i ceppi sono stati rivitalizzati per due volte in Tryptone Soy Broth (TSB; CM0129, Oxoid, Basingstoke, UK) e incubati a 30 °C per 24 ore. Successivamente, sono state preparate diluizioni seriali in base dieci della coltura in TSB e la concentrazione delle cellule è stata misurata mediante semina su Plate Count Agar (PCA; CM0325, Oxoid) dopo incubazione a 30 °C per 24 ore.

### **5.2.2 CONTAMINAZIONE DI VERDURE A FOGLIA VERDE**

Campioni di verdure a foglia verde (circa 200-300 g) sono stati acquistati in diversi supermercati della Regione Campania (Sud Italia) e trasportati a 4 °C al laboratorio entro 1 ora. Campioni da 25 grammi sono stati posti in una busta da stomacher sterile, sono stati aggiunti 224 ml di brodo Peptone-Sorbitolo-Bile (PSB; 4.022.702, Biolife, Milano Italia), ed omogenati per 3 minuti a 230 giri al minuto utilizzando un omogeneizzatore peristaltico (BagMixer400 P, Interscience, Saint

Nom, Francia). Ciascun omogenato è stato inoculato con 1 ml della sospensione batterica : (i) inferiore a 1 (LC: concentrazione bassa), (ii) compresa tra 1 e 2 (MC: concentrazione media) e (ii) 2–3 (HC: concentrazione alta) log CFU, come indicato nella Sezione 5.2.1 . Il ceppo 1A/O:5 è stato inoculato solo a concentrazioni medie e alte. I campioni seminati con *Y. enterocolitica* 1A/O:5 sono stati incubati a 25 °C per 7 giorni, mentre i campioni inoculati con il biotipo 4/O:3 sono stati incubati in parallelo a 25, 18, 10 e 4 °C per 14 giorni.

### **5.2.3 ESTRAZIONE DEL DNA**

Il DNA è stato estratto da ciascun campione al tempo zero (d-0) e ad ogni giorno di incubazione utilizzando il metodo con Chelex-100 (1.422.822, Biorad, Hercules, CA, USA). Nel dettaglio, 2 ml di ciascun omogenato sono stati trasferiti in una provetta da 2 ml e centrifugati per 10 minuti a 10.000 *g* a 4°C. Il surnatante è stato eliminato, mentre il pellet è stato risospeso in 300 µl di Chelex 100 al 6% mediante vortex, incubato a 56°C per 20 minuti e a 100°C per ulteriori 15 minuti. La sospensione è stata centrifugata per 5 minuti a 10.000 *g* a 4°C. Per le analisi molecolari, la concentrazione del DNA è stata standardizzata a 35–50 ng/µl.

## 5.2.4 REALE TIME PCR

Il gene *ail* è stato utilizzato come bersaglio per il rilevamento di *Y. enterocolitica* 4/O:3 secondo la norma UNI EN ISO/TS 18867:2017. 2,5 µl di DNA sono stati aggiunti a 22,5 µl di mastermix PCR contenente 12,5 µl di HotStarTaq Master Mix (1×) (203,443, Qiagen, Hilden, Germania), 300 nM di entrambi i primer *ail* -F (5'-GGT TAT GCA CAA AGC CAT GTA AA -3') e *ail* -R (5'-AAA CGA ACC TAT TAC TCC CCA GTT-3'), 125 nM di *ail* -tmp-probe (5'-FAM-AAC CTG AAG TAC CGT TAT GAA CTC GAT GA-BHQ1-3'), 250 nM di entrambi i primer per il controllo di amplificazione interno (IAC) pUC 18-F (5'-TGT CGT GCC AGC TGC ATT A-3') pUC 18-R (5'-GAG CGA GGA AGC GGA AGA g-3'), sonda Tm-pUC18 da 100 nM (5'-HEX – AAT CGG CCA ACG CGC GG – BHQ1-3') e 8,165 µl di H<sub>2</sub>O. La reazione è stata condotta a 95 ° C per 10 min, seguiti da 45 cicli a 95 ° C per 10 s e 60 ° C per 30 s. Le reazioni di amplificazione sono state eseguite con la piattaforma Bio-Rad CFX96, utilizzando una piastra da 96 pozzetti, della Bio-Rad (Pleasanton, CA). La presenza del biotipo 1A è stata valutata utilizzando SYBR Green PCR e il gene *ystB* è stato utilizzato come bersaglio seguendo la procedura di Peruzy et al. (2017) .

### 5.2.5 VALUTAZIONE DEL LIVELLO MINIMO E MASSIMO PER IL RILEVAMENTO DELL'AGENTE PATOGENO MEDIANTE DDPCR

Per valutare le prestazioni del metodo ddPCR per la quantificazione del DNA di *Y. enterocolitica* in campioni alimentari, sono state utilizzate diverse concentrazioni di colture pure di *Y. enterocolitica* biotipo 4/O:3. Le prove sono state condotte su campioni di foglie verdi contaminate sperimentalmente. Diluizioni seriali in base dieci della coltura di *Y. enterocolitica* 4/O:3 sono state preparate in TSB e la concentrazione batterica è stata misurata utilizzando gli standard di torbidità McFarland. Inizialmente, sono state testate in triplicato le colture pure con concentrazione da 1,50 a  $1,50 \times 10^8$  CFU/ml (1,50,  $1,50 \times 10^1$ ,  $1,50 \times 10^2$ ,  $1,50 \times 10^3$ ,  $1,50 \times 10^4$ ,  $1,50 \times 10^5$ ,  $1,50 \times 10^6$ ,  $1,50 \times 10^7$  e  $1,50 \times 10^8$ ). Successivamente, la ddPCR è stata eseguita sulle verdure a foglia contaminate artificialmente con gli stessi livelli di inoculo precedentemente testati, più altri cinque livelli nell'intervallo  $3 \times 10^3$ – $1,25 \times 10^4$  CFU/g. Il campionamento delle verdure a foglia verde è stato eseguito come sopra indicato ( Sezione 4.2.2 ), ma in questo caso, dopo l'inoculazione, i campioni sono stati incubati per soli 30 minuti a temperatura ambiente prima delle analisi. Le diluizioni con

concentrazione da  $1,5 \times 10^3$  a  $1,5 \times 10^8$  CFU/ml, sono state ripetute otto volte, utilizzando otto campioni di verdura a foglia verde.

### 5.2.6 SAGGIO DDPCR

Il DNA è stato estratto direttamente da diluizioni seriali di colture di *Y. enterocolitica* in TSB nonché da ciascun campione vegetale addizionato senza arricchimento (verdure a foglia verde in PSB per soli 30 minuti). Per l'ottimizzazione del test ddPCR, il protocollo di estrazione del DNA, il set di primer e le sonde erano gli stessi utilizzati per l'rtPCR. In particolare, le reazioni ddPCR sono state eseguite utilizzando 1× ddPCR Supermix per sonda (Bio-Rad, Pleasanton, CA) e il volume finale della reazione era di 22 µl. Venti µl della reazione ddPCR sono stati utilizzati per generare la miscela di goccioline in una cartuccia da 8 pozzetti e nel generatore di goccioline QX200 (Bio-Rad). L'emulsione (40 µl) è stata quindi trasferita su una piastra da 96 pozzetti e amplificata utilizzando le stesse condizioni descritte per rtPCR. I prodotti della PCR sono stati denaturati a 98°C per 10 minuti e mantenuti a 4°C fino alla lettura delle goccioline. La velocità di rampa utilizzata nel ddPCR era di 2 °C/s. La piastra da 96 pozzetti è stata quindi trasferita al lettore di gocce QX200 (Bio-Rad). L'acquisizione e l'analisi dei dati sono state effettuate con il software QuantaSoft

versione 1.7 (Bio-Rad). La soglia di ampiezza della fluorescenza utilizzata per la discriminazione delle goccioline positive e negative nel software QuantaSoft è stata impostata tra 2000 e 2200. I valori di concentrazione sono stati calcolati dal software QuantaSoft (in copie/μl) e moltiplicati per 22 (il volume iniziale della PCR) per ottenere il numero assoluto di copie aggiunte alla reazione PCR.

#### **5.2.7 CONFRONTO TRA RTPCR E DDPCR PER IL RILEVAMENTO DI *Y. ENTEROCOLITICA* IN VERDURE CONTAMINATE SPERIMENTALMENTE**

Per confrontare la capacità di rilevamento della rtPCR e ddPCR, è stata utilizzata *Y. enterocolitica* biotipo 4/O:3 per contaminare sperimentalmente campioni di verdure a foglia verde. La preparazione dell'inoculo, il campionamento e la contaminazione dei campioni sono stati eseguiti come indicato nella Sezione 5.2.2 . I campioni sono stati incubati in parallelo a 25, 18 e 4 °C per 11 giorni. Il DNA è stato estratto da ciascun omogenato al tempo zero (d-0) e ai giorni 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10 e 11. L'estrazione del DNA, l'rtPCR e il test ddPCR sono stati eseguiti come sopra descritto.

## **5.2.8 ANALISI STATISTICA**

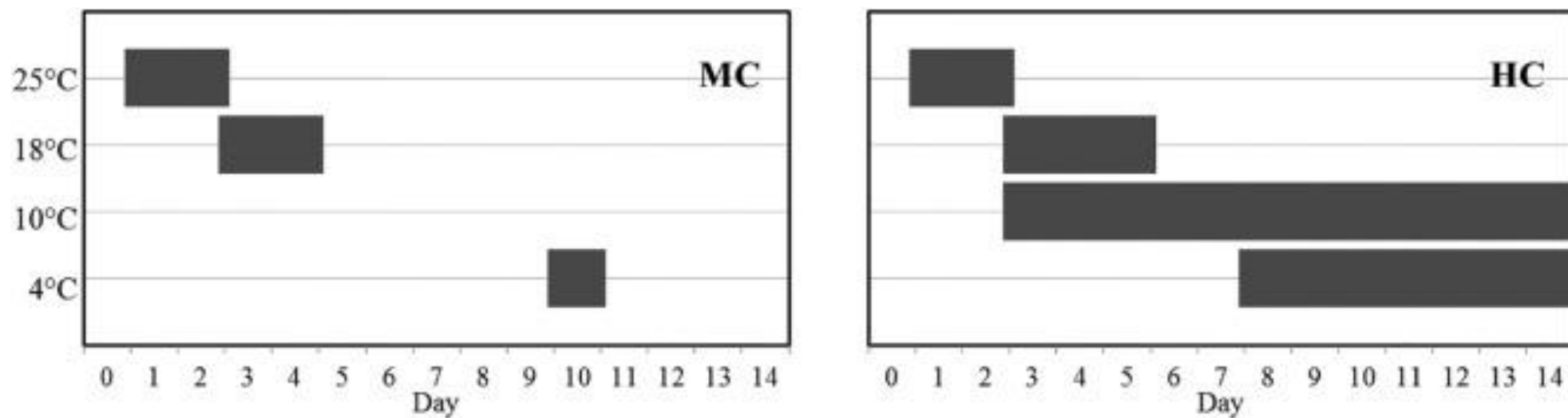
L'analisi di concordanza (coefficiente kappa di Cohen) è stata effettuata confrontando i risultati di rtPCR e ddPCR dopo incubazione a tre temperature diverse (4 °C, 18 °C e 25 °C). La concordanza può essere considerata eccellente o coerente se il coefficiente kappa di Cohen è compreso rispettivamente tra 0,85 e 1,00 o 0,81 e 0,84. Se questo valore è compreso tra 0,61 e 0,80 la concordanza è moderata mentre per valori inferiori a 0,60 la concordanza può essere considerata non significativa.

## **5.3 RISULTATI E DISCUSSIONE**

### **5.3.1 RILEVAZIONE DI *Y. ENTEROCOLITICA* MEDIANTE RTPCR NELLE VERDURE A FOGLIA CONTAMINATE SPERIMENTALMENTE.**

In un primo studio la rtPCR è stata utilizzata come strumento qualitativo per rilevare *Y. enterocolitica*. La presenza dei geni *ail* e *ystb* nei due biotipi di *Y. enterocolitica* 4/O:3 e 1A/O:5, è stata confermata prima dell'inoculazione nei campioni. Il biotipo 1A è stato rilevato in tutti i campioni (dati non mostrati), mentre il biotipo 4/O:3 non è mai stato rilevato nei campioni seminati al livello più basso (< 1 log CFU/g), indipendentemente dalla temperatura di incubazione (dati non mostrati). D'altra parte, nelle verdure contaminate con un livello

di patogeno compreso tra 1 e 2 log/CFU, la *Y. enterocolitica* 4/O:3 è stata rilevata al 3° e 4° giorno in brodo PSB incubato a 18 °C, e al giorno 10 quando l'incubazione è stata effettuata a 4 °C ( Fig. 5.1 ). Quando i campioni sono stati seminati con il livello più alto (3 log CFU/g), il ceppo 4/O:3 è stato rilevato solo ai giorni 2 e 3 a 25 °C, dal giorno 3 fino al giorno 5 a 18 °C, infine dal giorno 3 e dal giorno 8 fino alla fine, in campioni incubati rispettivamente a 10 e 4 °C ( Fig. 5.1).



**Figura 5.1.** Rilevazione di *Y. enterocolitica* 4/O:3 mediante rtPCR in verdure a foglia contaminate artificialmente con due livelli d'inoculo (MC, medio = 1–2 log CFU/g e HC, alto = 3 log CFU/g) e incubate per 14 giorni a quattro temperature (4, 10, 18 e 25 °C).

Come già riportato da Peruzy et al. (2020a) per la carne suina, il biotipo 1A nelle verdure si è dimostrato sempre efficace, mentre il rilevamento del ceppo 4/O:3 è fortemente influenzato dalla temperatura. Il tempo di incubazione più breve che ha consentito il rilevamento di *Y. enterocolitica* è stato osservato come previsto a 25 °C. Infatti, i metodi ISO (UNI EN ISO/TS 18867:2015) fissano l'incubazione dell'arricchimento PSB a 25 °C per 24 ore prima della rtPCR. Nonostante ciò, secondo i risultati, il metodo ISO era inefficace per il rilevamento tramite rtPCR quando il patogeno era presente a un basso livello di concentrazione ed a 25 °C, il target era amplificato solo nei campioni seminati con la concentrazione più alta. Tali risultati destano particolare preoccupazione poiché, nei campioni alimentari, l'agente patogeno è solitamente presente a basse concentrazioni ( Petsios et al., 2016 ). I risultati sono in accordo con quelli riportati per la carne suina ( Peruzy et al., 2020a )dove utilizzando lo stesso ceppo di *Y. enterocolitica* è stata rilevata solo quando il livello di contaminazione era di almeno  $10^2$  CFU/g.

### 5.3.2 VALUTAZIONE DELLE PRESTAZIONI ANALITICHE DEL TEST DDPCR PER RILEVARE IL DNA DI *Y. ENTEROCOLITICA* IN COLTURE PURE E CAMPIONI VEGETALI

Negli esperimenti eseguenti, la ddPCR è stata utilizzata per analizzare il DNA estratto da colture pure di *Y. enterocolitica* e da verdure contaminate senza una precedente incubazione. Quando il DNA è stato estratto direttamente dalle colture, il LOD<sub>95%</sub> era  $1,5 \times 10^2$  CFU/ml con un valore quantitativo di  $0,12 \pm 0,09$  copie/ $\mu$ l (media  $\pm$  SD), ma la ddPCR non è riuscita a quantificare il DNA quando il livello della popolazione del patogeno era superiore a  $10^6$  CFU/ml ( Tabella 5.1). Il LOD<sub>95%</sub> nei campioni di lattuga contaminata era ancora più alto:  $3,0 \times 10^3$  CFU/ml con un valore quantitativo di  $0,09 \pm 0,02$  copie/ $\mu$ l (media  $\pm$  SD). È probabile che tale incoerenza sia correlata alla matrice vegetale che può influenzare l'efficienza dell'estrazione del DNA ( Tabella 5.1).

**Tabella 5.1.** Quantificazione (copie/ $\mu$ l) di DNA estratto da colture pure (da  $1,5$  a  $1,50 \times 10^8$  CFU /ml) di *Y. enterocolitica* e da verdure a foglia contaminate artificialmente con la stessa concentrazione batterica.

| Concentration CFU/ml | Copies/ $\mu$ l        |                                      |
|----------------------|------------------------|--------------------------------------|
|                      | Pure culture           | Artificially contaminated vegetables |
| $1.50 \times 10^8$   | Saturated <sup>a</sup> | 3980                                 |
| $1.50 \times 10^7$   | Saturated              | $386.4 \pm 26.32$                    |
| $1.50 \times 10^6$   | 2780                   | $25.75 \pm 4.60$                     |
| $1.50 \times 10^5$   | $184.9 \pm 23.75^b$    | $4.09 \pm 1.49$                      |
| $1.50 \times 10^4$   | $21.68 \pm 8.50$       | $0.38 \pm 0.17$                      |
| $1.25 \times 10^4$   | np                     | $0.32 \pm 0.13$                      |
| $1.00 \times 10^4$   | np                     | $0.20 \pm 0.11$                      |
| $7.50 \times 10^3$   | np                     | $0.19 \pm 0.11$                      |
| $5.00 \times 10^3$   | np                     | $0.13 \pm 0.10$                      |
| $3.00 \times 10^3$   | np                     | $0.09 \pm 0.02$                      |
| $1.50 \times 10^3$   | $1.16 \pm 0.48$        | nd                                   |
| $1.50 \times 10^2$   | $0.12 \pm 0.09$        | nd                                   |
| $1.50 \times 10$     | nd                     | nd                                   |
| 1.5                  | nd                     | nd                                   |

np = analysis not performed.

nd = not detectable.

<sup>a</sup> DNA concentration at which the signal of the assay was saturated.

<sup>b</sup> Mean  $\pm$  standard deviation (SD).

### 5.3.3 CONFRONTO TRA RTPCR E DDPCR NELLA RILEVAZIONE DI *Y. ENTEROCOLITICA* IN VERDURE A FOGLIA VERDE CONTAMINATE SPERIMENTALMENTE

Per indagare se il basso tasso di rilevamento di *Y. enterocolitica* osservato nell'esperimento precedente fosse correlato ad errori metodologici, rtPCR e ddPCR sono stati utilizzati in parallelo per un'analisi qualitativa. Mediante rtPCR, la *Y. enterocolitica* 4/O:3 è stata rilevata solo a 4 °C e solo all'undicesimo giorno quando le verdure erano contaminate con il livello più basso di agente patogeno ( Tabella 5.2). Nei campioni contaminati con il livello intermedio, l'agente patogeno è stato rilevato l'11° giorno a 4°C e il 2° e 3° giorno a 18°C. Quando i campioni sono stati seminati al livello più alto (3 log CFU/g), il ceppo 4/O:3 è stato rilevato dal 3° all'11° giorno a 4 °C, dal 1° al 4° a 18 °C e al giorno 1 e 2 a 25 °C ( Tabella 5.2). In altre parole, i dati sul tasso di rilevamento di *Y. enterocolitica* si sovrapponevano a quelli ottenuti nel primo studio: il target non è mai stato amplificato nei campioni seminati con il livello più basso e anche quando la concentrazione dell'inoculo era di ~2 log CFU/g, è stata osservata una bassa capacità di rilevamento. A differenza della prima prova, a 18 e 25 °C nei campioni seminati con il livello di inoculo più alto, il target era già amplificato il primo giorno di incubazione.

**Tabella 5.2.** Confronto tra rtPCR e ddPCR nel rilevamento di *Y. enterocolitica* in verdure a foglia contaminate sperimentalmente incubate in parallelo a 4, 18 e 25 °C per 11 giorni

| Temperature        | Inoculum level  | Days  |       |       |       |       |       |       |       |       |
|--------------------|-----------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                    |                 | d-1   | d-2   | d-3   | d-4   | d-7   | d-8   | d-9   | d-10  | d-11  |
| rtPCR <sup>b</sup> |                 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 4 °C               | LC <sup>a</sup> |       |       |       |       |       |       |       |       | 43.37 |
|                    | MC              |       |       |       |       |       |       |       |       | 38.05 |
|                    | HC              |       |       | 41.05 | 37.62 | 44.13 | 38.76 | 42.12 | 40.07 | 36.03 |
| 18 °C              | LC              |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|                    | MC              |       | 38.53 | 38.89 |       |       |       |       |       |       |
|                    | HC              | 31.70 | 32.21 | 34.06 | 37.94 |       |       |       |       |       |
| 25 °C              | LC              |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|                    | MC              |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
|                    | HC              | 33.17 | 39.08 |       |       |       |       |       |       |       |
| ddPCR <sup>c</sup> |                 |       |       |       |       |       |       |       |       |       |
| 4 °C               | LC              |       |       |       | 0.28  | 1.20  | 8.90  | 7.40  | 9.30  | 6.20  |
|                    | MC              |       | 2.90  | 0.58  | 4.40  | 4.20  | 1.70  | 2.10  | 2.60  | 2.90  |
|                    | HC              | 0.90  | 1.80  | 2.30  | 7.30  | 2.40  | 2.00  | 2.30  | 2.80  | 11.60 |
| 18 °C              | LC              | 3.40  |       |       |       |       |       |       |       |       |
|                    | MC              | 13.10 | 14.20 |       | 6.80  | 5.30  |       |       |       |       |
|                    | HC              | 64.20 | 43.40 | 11.70 | 3.10  | 0.80  | 0.55  | 1.00  |       |       |
| 25 °C              | LC              | 0.08  | 1.00  | 1.00  | 0.49  |       |       |       |       |       |
|                    | MC              | 3.00  | 2.00  |       |       |       |       |       |       |       |
|                    | HC              | 39.7  | 9.30  | 1.00  |       | 100   |       |       |       |       |

<sup>a</sup> LC: Low (<1 log CFU/g); MC medium (1–2 log CFU/g) and HC high (3 log CFU/g) pathogen's inoculum level.

<sup>b</sup> Cycle threshold (Ct).

<sup>c</sup> Copies/g.

Mediante ddPCR, la *Y. enterocolitica* è stata rilevata dal 4° all'11° giorno in campioni seminati con meno di 1 log CFU/g a 4 °C, dal 2° all'11° giorno in campioni inoculati con la concentrazione intermedia e dal 1° alla fine nei campioni seminati al livello più alto ( Tabella 5.2). A 4 °C la concentrazione più alta dell'agente patogeno è stata osservata al giorno 10 (9,3 copie/μl), 4 (4,4 copie/μl) e 11 (11,6 copie/μl), rispettivamente nei campioni seminati con il livello basso, medio e alto. A 18 °C, la *Y. enterocolitica* è stata rilevata il 1° giorno nei campioni seminati con meno di 1 log CFU/g, dal 1° al 7° giorno nei campioni inoculati con la concentrazione intermedia e dal 1° al 9° giorno nei campioni seminati al massimo livello. A 25 °C la *Y. enterocolitica* è stata rilevata dal 1° al 4° giorno nei campioni seminati con meno di 1 log CFU/g, il 1° e il 2° giorno nei campioni inoculati con la concentrazione intermedia e dal 1° al 7° nei campioni seminate al livello più alto ( Tabella 5.2). A 18 e 25 °C, la concentrazione di *Y. enterocolitica* è diminuita considerevolmente durante il tempo di incubazione nei campioni seminati con la concentrazione media, così come nei campioni con la concentrazione più alta ( Tabella 5.2). Dal confronto sono emerse notevoli differenze tra i due approcci tecnici: mediante ddPCR il patogeno è stato rilevato anche in campioni seminati

con meno di 1 log CFU/g, a 18 e 25 °C, già nel primo giorno di incubazione. Inoltre, a 4 °C, la ddPCR è stata comunque in grado di rilevare il patogeno con il livello basso, ma solo dal giorno 4 in poi. Inoltre, l'analisi di concordanza (coefficiente kappa di Cohen) è stata effettuata confrontando i risultati di rtPCR e ddPCR dopo incubazione a 4, 18 e 25 °C per valutare l'affidabilità inter-test. Il coefficiente kappa di Cohen ha mostrato una concordanza bassa o moderata tra i metodi molecolari; infatti, la K di Cohen era di 0,51, 0,22 e 0,29 rispettivamente a 4, 18 e 25 °C. Risultati simili sono stati osservati confrontando i risultati dei test effettuati a diverse concentrazioni del patogeno (Basso = 0,37; Medio = 0,40; Alto = 0,26). Durante il primo test, è stato riscontrato che la ddPCR presentava una saturazione della reazione a una concentrazione di 2780 copie/μl. Quando i campioni alimentari contaminati artificialmente sono stati analizzati con ddPCR, non è stata registrata alcuna saturazione, ma è stato osservato anche un LOD 10 volte superiore a quello riportato per le colture pure. Tali risultati sono in linea con quelli riportati da Cremonesi et al. (2016) e Wang et al. (2018) . La maggiore sensibilità della ddPCR rispetto alla rtPCR è stata già notata in precedenza ( Persson et al., 2018 ; Porcellato et al., 2016 ; Wang et al., 2018 ) e le differenze sono state attribuite alla maggiore tolleranza della

ddPCR agli inibitori derivanti da matrici alimentari ( Villamil et al., 2020 ). Nella tecnica ddPCR, le molecole di DNA bersaglio sono distribuite in migliaia di piccole goccioline che costituiscono un compartimento di reazione separato e questo probabilmente porta ad una maggiore resistenza agli inibitori ( Wang et al., 2018 ). Nonostante sia più costosa e dispendiosa in termini di tempo rispetto alla rtPCR ( Persson et al., 2018 ), la ddPCR è attualmente lo strumento più affidabile per rilevare l'agente patogeno nei campioni alimentari e ciò è particolarmente importante quando è richiesta tolleranza zero nel controllo alimentare ( Wang et al., 2018 ). Oltre ai problemi metodologici, i risultati del presente lavoro evidenziano il ruolo del tempo e della temperatura di incubazione sulla sopravvivenza e/o sulla crescita di *Y. enterocolitica* nelle verdure: a 18 e 25 °C la velocità di rilevamento del patogeno diminuisce considerevolmente durante l'incubazione. A 25 °C, già nel 2° giorno di incubazione è stata osservata una notevole riduzione del numero di copie/μl anche nei campioni seminati con il livello più alto. Come già riportato per la carne, variazioni di concentrazione e quindi problemi nella rilevazione di *Y. enterocolitica* possono derivare dall'abbondante popolazione microbica sicuramente presente anche nei vegetali. La microflora naturale può crescere in modo eccessivo rispetto alla *Y.*

*enterocolitica* 4/O:3, ma ciò non influenza la crescita del biotipo 1A ( Fredriksson-ahomaa e Korkeala, 2003 ; Peruzzy et al., 2020a ). Il tasso di rilevamento più elevato osservato a 4 °C deve essere correlato alla capacità di *Y. enterocolitica* di resistere e persino di crescere a basse temperature ( Li et al., 2020 ). Tuttavia, per il rilevamento nei campioni alimentari è necessario un tempo di incubazione di almeno quattro giorni.

## 5.4 CONCLUSIONI

È stato studiato per la prima volta il comportamento di *Y. enterocolitica* in verdure a foglia verde, contaminate sperimentalmente, incubate alle condizioni di temperatura e tempo attualmente proposte per la sua rilevazione tramite rtPCR. Inoltre, l'applicazione della ddPCR per il rilevamento di *Y. enterocolitica* non è mai stata valutata prima. Sulla base dei risultati, il tasso di rilevamento di *Y. enterocolitica* nei campioni cambia durante il periodo di incubazione ed è risultato essere fortemente influenzato dalla temperatura e dal tempo. In realtà, le condizioni attualmente proposte per questo patogeno (25 °C per 24 ore) consentono il tasso di rilevamento più elevato, ma la rtPCR ha dimostrato di portare a una sottostima della reale prevalenza del patogeno nelle verdure. Tale problema può essere proficuamente

superato mediante l'adozione della ddPCR, che si è rivelata una strategia più affidabile per il rilevamento rapido dell'agente patogeno nei campioni alimentari. Tuttavia, come riportato in precedenza ( Peruzy et al., 2020a , Peruzy et al., 2020b ), problemi nel rilevamento di *Y. enterocolitica* possono derivare anche dalla presenza di una flora competitiva, quindi ulteriori ricerche per comprendere come queste popolazioni microbiche possono interferire con la crescita dell'agente patogeno, sono ancora necessari.

## 5.5 BIBLIOGRAFIA

Adeolu et al., 2016

M. Adeolu, S. Alnajar, S. Naushad, R.S. Gupta

Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov

Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 66 (2016), pp. 5575-5599

Bari et al., 2011

Bari, L., Hossain, M.A., Isshiki, K., Ukuku, D., 2011. Behavior of *Yersinia enterocolitica* in Foods. J. Pathog. 2011. <https://doi.org/10.4061/2011/420732>.

<https://doi.org/10.1099/ijsem.0.001485>

Berger et al., 2010

C.N. Berger, S.V. Sodha, R.K. Shaw, P.M. Griffin, D. Pink, P. Hand, G. Frankel

Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens

Environ. Microbiol., 12 (2010), pp. 2385-2397

<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02297.x>

Boqvist et al., 2018

S. Boqvist, K. Söderqvist, I. Vågsholm

Food safety challenges and One Health within Europe

Acta Vet. Scand., 60 (2018), pp. 1-13

<https://doi.org/10.1186/s13028-017-0355-3>

Cremonesi et al., 2016

P. Cremonesi, C. Cortimiglia, C. Picozzi, G. Minozzi, M. Malvisi, M. Luini, B. Castiglioni

Development of a droplet digital polymerase Chain Reaction for rapid and simultaneous identification of common foodborne pathogens in soft cheese

Front. Microbiol., 7 (2016), pp. 1-10

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01725>

EFSA, 2013

EFSA Panel on Biological Hazards (BIOHAZ) Panel; Scientific Opinion on the risk posed by pathogens in food of non-animal origin. Part 1 (outbreak data analysis and risk ranking of food/pathogen combinations). EFSA J. 2013;11(1):3025. [138 pp.] doi:<https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3025>.

EFSA and ECDC, 2021

EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2021. The European Union One Health 2019 zoonoses report. EFSA J. 2021;19(2):6406, 286 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6406>.

Espenhain et al., 2019

L. Espenhain, M. Riess, L. Müller, S. Colombe, S. Ethelberg, E. Litrup, C. Jernberg, S. Kühlmann-Berenzon, M. Lindblad, N. Kühn Hove, M. Torpdahl, M.J. Mörk

Cross-border outbreak of *Yersinia enterocolitica* O3 associated with imported fresh spinach, Sweden and Denmark, March 2019

Euro Surveill., 24 (24) (2019), Article 1900368

Fredriksson-ahomaa and Korkeala, 2003

M. Fredriksson-ahomaa, H. Korkeala

Low occurrence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in clinical, food, and environmental samples: a methodological problem

Clin. Microbiol. Rev., 16 (2003), pp. 220-229

<https://doi.org/10.1128/CMR.16.2.220>

Gupta et al., 2015

V. Gupta, P. Gulati, N. Bhagat, M.S. Dhar, J.S. Virdi

Detection of *Yersinia enterocolitica* in food: an overview

Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., 34 (2015), pp. 641-650

<https://doi.org/10.1007/s10096-014-2276-7>

Hindson et al., 2011

B.J. Hindson, K.D. Ness, D.A. Masquelier, P. Belgrader, N.J. Heredia, A.J. Makarewicz, I.J. Bright, M.Y. Lucero, A.L. Hiddessen, T.C. Legler, T.K. Kitano, M.R. Hodel, J.F. Petersen, P.W. Wyatt, E.R. Steenblock, P.H. Shah, L.J. Bousse, C.B. Troup, J.C. Mellen, D.K. Wittmann, N.G. Erndt, T.H. Cauley, R.T. Koehler, A.P. So, S. Dube, K.A. Rose, L. Montesclaros, S. Wang, D.P. Stumbo, S.P. Hodges, S. Romine, F.P. Milanovich, H.E. White, J.F. Regan, G.A. Karlin-Neumann, C.M. Hindson, S. Saxonov, B.W. Colston

High-throughput droplet digital PCR system for absolute quantitation of DNA copy number

Anal. Chem., 83 (2011), pp. 8604-8610

<https://doi.org/10.1021/ac202028g>

Law et al., 2014

J.W.F. Law, N.S.A. Mutalib, K.G. Chan, L.H. Lee

Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations

Front. Microbiol., 5 (2014), pp. 1-19

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00770>

Lee et al., 2004

T.S. Lee, S.W. Lee, W.S. Seok, M.Y. Yoo, J.W. Yoon, B.K. Park, K.  
D. Moon, D.H. Oh

Prevalence, antibiotic susceptibility, and virulence factors of *Yersinia*  
*enterocolitica* and related species from ready-to-eat vegetables  
available in Korea

J. Food Prot., 67 (2004), pp. 1123-1127

<https://doi.org/10.4315/0362-028X-67.6.1123>

Li et al., 2020

C. Li, J. Murugaiyan, C. Thomas, T. Alter, C. Riedel

Isolate specific cold response of *Yersinia enterocolitica* in  
Transcriptional, proteomic, and membrane physiological changes

Front. Microbiol., 10 (2020), pp. 1-16

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03037>

Markland et al., 2018

S.M. Markland, D. Ingram, K.E. Kniel, M. Sharma

Water for agriculture: the convergence of sustainability and safety

Preharvest Food Saf. (2018), pp. 143-157

<https://doi.org/10.1128/9781555819644.ch8>

Paixão et al., 2013

R. Paixão, L.Z. Moreno, D. Dirani, S. De  
Gobbi, D. Cristine, E. Hofer, M.H. Matté, T. Sebastiana, P. Ferreira,  
V. Tulio, D.M. Gomes, B. Leticia, P. Costa, A.M. Moreno

Characterization of *Yersinia enterocolitica* Biotype 1A strains isolated  
from swine slaughterhouses and markets

The Scient. World J., 2013 (2013)

Persson et al., 2018

S. Persson, R. Eriksson, J. Lowther, P. Ellström, M. Simonsson

Comparison between RT droplet digital PCR and RT real-time PCR for  
quantification of noroviruses in oysters

Int. J. Food Microbiol., 284 (2018), pp. 73-83

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.06.022>

Peruzy et al., 2017

M.F. Peruzy, N. Murru, A.G. Perugini, F. Capuano, E. Delibato, R. M  
ercogliano, H. Korkeala, Y.T.R. Proroga

Evaluation of virulence genes in *Yersinia enterocolitica* strains using  
SYBR Green real-time PCR

Food Microbiol., 65 (2017), pp. 231-235

<https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.03.004>

Peruzy et al., 2020a

M.F. Peruzzy, M. Aponte, Y.T.R. Proroga, F. Capuano, D. Cristiano, E. Delibato, K. Houf, N. Murru

*Yersinia enterocolitica* detection in pork products: Evaluation of isolation protocols

Food Microbiol., 92 (2020), p. 103593

<https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103593>

Peruzzy et al., 2020b

Maria

Francesca Peruzzy, Y.T.R. Proroga, F. Capuano, F. Corrado, S. Santonicola, D. De Medici, E. Delibato, N. Murru

Detection and quantification of *Campylobacter* in foods: New analytic approaches to detect and quantify *campylobacter* spp. in food samples

Ital. J. Food Saf., 9 (2020), pp. 88-92

<https://doi.org/10.4081/ijfs.2020.8591>

Petsios et al., 2016

S. Petsios, M. Fredriksson-ahomaa, H. Sakkas, C. Papadopoulou

International Journal of Food Microbiology Conventional and molecular methods used in the detection and subtyping of *Yersinia enterocolitica* in food

Int. J. Food Microbiol., 237 (2016), pp. 55-72

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.015>

Platt-samoraj et al., 2017

A. Platt-samoraj, K. Syczyło, A. Szczerba-turek, A. Bancerkisiel, A. Jabłon, J. Pajdak, N. Oshakbaeva, W. Szweda

Presence of ail and ystB genes in Yersinia enterocolitica biotype 1A isolates from game animals in Poland

Vet. J., 221 (2017), pp. 11-13

<https://doi.org/10.1016/j.tvjl.2017.01.013>

Porcellato et al., 2016

D. Porcellato, J. Narvhus, S.B. Skeie

Detection and quantification of Bacillus cereus group in milk by droplet digital PCR

J. Microbiol. Methods, 127 (2016), pp. 1-6

<https://doi.org/10.1016/j.mimet.2016.05.012>

J.N. Ssemanda, M.W. Reij, G. van Middendorp, E. Bouw, R. van der Plaats, E. Franz, C.M. Muvunyi, M.C. Bagabe, M.H. Zwietering, H. J oosten

Foodborne pathogens and their risk exposure factors associated with farm vegetables in Rwanda

Food Control, 89 (2018), pp. 86-96

<https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.12.034>

Strydom et al., 2019

H. Strydom, J. Wang, S. Paine, K. Dyet, K. Cullen, J. Wright

Evaluating sub-typing methods for pathogenic *Yersinia enterocolitica* to support outbreak investigations in New Zealand

Epidemiol. Infect., 147 (2019), pp. 1-7

<https://doi.org/10.1017/S0950268819000773>

Torres et al., 2018

B. Torres, F. Martins, C. Vieira, D. Augusto, L. Silva, F. Germano, P. Alvarenga, J. Libero, M. Emilene, M. Campos-galvão, R. Seiti, J. Pfrimer, S. Bersot, L. Augusto

*Yersinia enterocolitica* in a Brazilian pork production chain: tracking of contamination routes, virulence and antimicrobial resistance

Int. J. Food Microbiol., 276 (2018), pp. 5-9

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.03.028>

Van Damme et al., 2013

I. Van I.  
VDamme, D. Berkvens, N. Botteldoorn, K. Dierick, J. Wits, B. Pochet  
, L. De Zutter

Evaluation of the ISO 10273 : 2003 method for the isolation of human pathogenic *Yersinia enterocolitica* from pig carcasses and minced meat

Food Microbiol., 36 (2013), pp. 170-175

<https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.05.007>

Villamil et al., 2020

C. Villamil, M.N. Calderon, M.M. Arias, J.E. Leguizamon

Validation of droplet digital Polymerase Chain Reaction for *Salmonella* spp. quantification

Front. Microbiol., 11 (2020)

<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01512>

Vojkovská et al., 2017

H. Vojkovská, P. Myšková, T. Gelbíčová, A. Skočková, I. Koláčková, R. Karpíšková

Occurrence and characterization of food-borne pathogens isolated from fruit, vegetables and sprouts retailed in the Czech Republic

Food Microbiol., 63 (2017), pp. 147-152

<https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.11.012>

Wang et al., 2018

M. Wang, J. Yang, Z. Gai, S. Huo, J. Zhu, J. Li, R. Wang, S. Xing, G. Shi, F. Shi, L. Zhang

Comparison between digital PCR and real-time PCR in detection of *Salmonella typhimurium* in milk

Int. J. Food Microbiol., 266 (2018), pp. 251-256

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.12.011>

## 6. ARTICOLO 3

### **RILEVAZIONE DEL PATOGENO *VIBRIO SPP.* NEGLI ALIMENTI: STRATEGIA DI SCREENING BASATA SULLA PCR PER INDIVIDUARE RAPIDAMENTE I PATOGENI *V. PARAHAEMOLYTICUS*, *V. CHOLERAE* E *V. VULNIFICUS* NEI MOLLUSCHI BIVALVI: RISULTATI PRELIMINARI**

Orlandina Di Maro, Yolande T.R. Proroga, Silvia Castellano, Anna Balestrieri, Federico Capuano, Enrico Arletti, Michelangelo Vietina, Melissa Bizzarri, Nicoletta Murru, Maria Francesca Peruzzy, Daniela Cristiano

Italian Journal of Food Safety (2024):  
doi:10.4081/ijfs.2024.11635

### **RIASSUNTO**

La maggior parte delle malattie umane attribuite ai frutti di mare sono causate da *Vibrio* (*V.*) *spp.* e le specie più comunemente segnalate sono *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* e *V. cholerae*. I metodi convenzionali per il rilevamento delle specie *Vibrio* (ISO 21872-1:2017) prevedono l'uso di terreni selettivi che sono economici e

semplici ma richiedono molto tempo. Il presente lavoro mirava a sviluppare un metodo rapido basato sull'uso di una Real-Time PCR multiplex, per rilevare *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* e *V. cholerae* nei molluschi bivalvi. Trenta aliquote di molluschi bivalvi (*Mytilus galloprovincialis*) sono state contaminate sperimentalmente con due differenti livelli d'inoculo dei ceppi *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* e *V. cholerae*. La norma ISO 21872-1:2017 è stata utilizzata in parallelo per l'analisi qualitativa. Il LOD50 era 7,67 CFU/g per *V. cholerae*, 0,024 CFU/g per *V. vulnificus* e 1,36 CFU/g per *V. parahaemolyticus*. Per *V. vulnificus* e *V. cholerae* è stato dimostrato che il protocollo Real-Time PCR amplifica i patogeni nei campioni seminati con i livelli più bassi e più alti, quindi il metodo molecolare valutato ha mostrato un tasso di concordanza del 100% con il metodo microbiologico di riferimento. Il *V. parahaemolyticus*, invece non è mai stato rilevato nei campioni contaminati con il livello più basso, ed è stato soltanto rilevato in 14 campioni (93,33%) seminati con la concentrazione più alta. In conclusione, la Real-Time PCR multiplex sviluppata si è rivelata affidabile per *V. vulnificus* e *V. cholerae*. I risultati per *V. parahaemolyticus* sono promettenti ma sono necessarie ulteriori analisi. Il metodo proposto potrebbe rappresentare uno strumento di

monitoraggio rapido e, se utilizzato, sarebbe un vantaggio per la sicurezza alimentare.

**Parole chiave:** *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*, *V. cholerae*, Real-Time PCR

## 6.1 INTRODUZIONE

Nell'acqua di mare si ritrovano frequentemente differenti agenti patogeni, come *Escherichia coli*, *Salmonella spp.*, *Proteus spp.*, tuttavia, la maggior parte delle malattie umane attribuite al microbiota naturale degli ambienti acquatici e dei frutti di mare sono causate da *Vibrio (V.) spp* ( Baker-Austin et al., 2018). I *Vibrio spp.* sono batteri gram-negativi e alofili ampiamente distribuiti nell'ambiente acquatico in tutto il mondo. Al genere *Vibrio* appartengono più di 100 specie di cui 13 sono state associate a infezioni umane e tra queste *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus* e *Vibrio vulnificus* sono le più importanti (Castello et al., 2022). Le epidemie di *Vibrio cholerae* sono comuni sia nei paesi sviluppati che in quelli in via di sviluppo. *Vibrio cholerae* è responsabile di malattie diarroiche acute e rappresenta a livello globale un'importante causa di morbidità e mortalità nelle popolazioni vulnerabili che non hanno accesso all'acqua pulita e alle strutture igienico-sanitarie. In particolare, nel 2021 i decessi associati al colera sono aumentati a livello globale. L'infezione è provocata dall'ingestione del microrganismo attraverso alimenti contaminati e il periodo di incubazione varia da due ore a cinque giorni (Castello et al., 2022). Il *Vibrio parahaemolyticus* è principalmente associato a infezioni gastrointestinali ma può causare anche infezioni

extraintestinali (Fleischmann et al., 2022). È considerato un patogeno emergente e l'infezione nell'uomo avviene principalmente a causa del consumo di alimenti contaminati, in particolare pesce e crostacei poco cotti (Castello et al., 2022; Ma et al., 2023). La virulenza del *Vibrio parahaemolyticus* dipende dalla presenza di due geni di virulenza: un'emolisina diretta termostabile (TDH) e un'emolisina correlata termostabile (TRH), codificati rispettivamente dai geni *tdh* e *trh*. Il *Vibrio parahaemolyticus* è spesso associato a infezioni umane negli Stati Uniti d'America, Cile e Giappone e, in misura minore, nell'Unione Europea (Castello et al., 2022). Il *Vibrio vulnificus* può essere responsabile di gastroenterite correlata ai frutti di mare, ma è principalmente associato a infezione da ferita che può portare a setticemia e persino alla morte (Fleischmann et al., 2022). Negli ultimi anni, l'incidenza della vibriosi è aumentata probabilmente a causa del riscaldamento del mare a causa dei cambiamenti climatici in tutto il mondo (Baker-Austin et al., 2018). Infatti, oltre ai nutrienti e al sale, la temperatura è il fattore più importante che influenzala presenza di *Vibrio spp.* nelle acque (Fleischmann et al., 2022). Inoltre, il *Vibrio spp.* è responsabile delle principali malattie batteriche trasmesse dal consumo di molluschi bivalvi. I molluschi essendo organismi che filtrano possono concentrare alghe unicellulari, batteri e altri

contaminanti diluiti nell'ambiente (La Tela et al., 2021). L'incidenza dei focolai di origine alimentare associati al loro consumo è in aumento (Marceddu et al., 2017). Storicamente, l'*Escherichia coli* è stato utilizzato come batterio indicatore per misurare la potenziale presenza di altri agenti patogeni. Tuttavia, l'uso di *E. coli* è stato recentemente messo in discussione poiché è stato dimostrato che è scarsamente predittivo della presenza di microrganismi adattati all'ambiente acquatico (*Vibrio spp.*) (Marceddu et al., 2017). Metodi convenzionali per la ricerca di *Vibrio spp.* comportano l'uso di terreni selettivi che sono poco costosi e semplici, ma richiedono molto tempo (fino a 5 giorni). I metodi molecolari inclusi nella norma ISO 21872-1:2017 per il rilevamento delle diverse specie di *Vibrio* in un campione alimentare hanno ridotto i tempi di rilevamento. Tuttavia, l'utilizzo della PCR a tre simplex è ancora considerato dispendioso in termini di tempo e denaro. Lo sviluppo di metodi rapidi è importante per condurre un controllo adeguato dei prodotti contaminati, identificare rapidamente le fonti di epidemia e prevenire la diffusione della malattia (Wang e Salazar, 2016). Pertanto, lo scopo del presente studio è stato lo sviluppo di un metodo rapido basato sull'uso di una Real-Time PCR multiplex (qPCR), per rilevare *V. parahaemolyticus*, inclusi ceppi potenzialmente enteropatogeni, *V. vulnificus* e *V. cholerae* nei molluschi bivalvi.

## **6.2 MATERIALI E METODI**

### **6.2.1 CEPPI DI *VIBRIO***

Sono stati utilizzati in questo studio *V. parahaemolyticus* ATCC 17802, *V. cholera* ATCC 9459, *V. vulnificus* Ring test LGC 2021 IB forniti dalla collezione dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Sud Italia. I ceppi batterici sono stati rivitalizzati prima in acqua peptonata salina alcalina (ASPW – Biolife Italia) ) per 18 ore a 37 °C, e poi seminati in Blood Agar (CM0055, OXOID, Basingstoke, UK ) ed incubati a 37 °C per 18 ore. Successivamente, diluizioni seriali in base dieci della coltura, sono state preparate in ASPW e la concentrazione cellulare è stata misurata mediante semina su agar sangue dopo incubazione a 37 °C per 24 ore.

### **6.2.2 CEPPI DI *E. COLI* E *SALMONELLA TYPHIMURIUM***

Sono stati utilizzati in questo studio i ceppi di *E. coli* e *Salmonella typhimurium* forniti dalla collezione dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Sud Italia. I ceppi batterici sono stati prima rivitalizzati in Buffered Peptone Water (BPW – CM1049, OXOID, Basingstoke, UK) e incubati a 37 °C per 18 ore, e poi sono stati seminati su Blood Agar sempre per 18 ore a 37 °C. Successivamente, sono state

preparate diluizioni seriali in base dieci della coltura in BPW e la concentrazione cellulare è stata misurata mediante semina su agar PCA (PCA, CM0325, OXOID, Basingstoke, Regno Unito) dopo incubazione a 37 °C per 24 ore.

### **6.2.3 INOCULO DELLA MATRICE ALIMENTARE**

Sessanta aliquote di molluschi bivalvi (*Mytilus galloprovincialis*) sono state raccolte in diversi allevamenti di molluschi lungo la costa Campana, Italia meridionale. Per verificare l'assenza di *Vibrio spp.*, *E. coli* e *Salmonella*, le aliquote sono state prima analizzate rispettivamente mediante UNI EN ISO 21872-1:2017, UNI ISO TS 16649-1:2018 e UNI EN ISO 6579-1:2020. Per individuare il protocollo ottimale per il rilevamento di *Vibrio*, trenta aliquote sono state contaminate sperimentalmente con *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* e *V. cholerae*. In particolare, venticinque grammi di polpa e di liquido intervallare di ciascuna aliquota, sono stati posti in una busta da stomacher sterile, sono stati aggiunti 195 mL (1:10, P/P) di acqua peptonata salina alcalina (ASPW – Biolife Italia), e poi sono stati omogenati per 3 minuti a 230 giri al minuto utilizzando un omogeneizzatore peristaltico (BagMixer®400 P, Interscience, Saint Nom, Francia). Per la rilevazione delle specie *Vibrio*, 15 aliquote sono

state inoculate con 10 mL di diluizioni con una carica batterica di  $1,5 \times 10^3$  CFU/25g di *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* e  $1,5 \times 10^3$  CFU/25g di *V. cholerae* (bassa concentrazione), e 15 aliquote con una concentrazione di  $1,5 \times 10^6$  CFU/ 25 g di *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* e  $1,5 \times 10^5$  CFU/ 25 g di *V. cholerae* (alte concentrazioni) come indicato nell'Allegato E della norma ISO 21872-1:2017. Trenta aliquote sono state contaminate sperimentalmente con *E. coli* e *Salmonella typhimurium* (controlli negativi). In particolare, venticinque grammi di polpa e di liquido intervallare di ciascuna aliquota sono stati posti in una busta da stomacher sterile, sono stati aggiunti 205 mL (1:10, P/P) di Acqua Peptonata Salina Alcalina (ASPW – Biolife Italia), e sono stati omogeneizzati per 3 minuti a 230 giri al minuto utilizzando un omogeneizzatore peristaltico (BagMixer®400 P, Interscience, Saint Nom, Francia). Successivamente, 15 aliquote sono state inoculate con 10 mL di diluizioni di *E. coli* e 10 mL di *Salmonella typhimurium* entrambe con concentrazione batterica di  $1,5 \times 10^3$  CFU/ g (bassa concentrazione), e 15 aliquote con concentrazione di  $1,5 \times 10^5$  CFU/ g (alta concentrazioni).

Dopo l'inoculazione, tutti i campioni sono stati agitati per 1 minuto per ottimizzare la distribuzione dell'inoculo e quindi sono stati incubati a 37°C per 18 ore. Dopo l'incubazione, 1 mL di ciascun omogenato

incubato è stato sottoposto alla fase di estrazione del DNA. Inoltre, i campioni seminati con la specie *Vibrio* sono stati testati parallelamente alla norma ISO 21872-1:2017.

#### **6.2.4 ESTRAZIONE DEL DNA**

Il DNA è stato estratto utilizzando il metodo con Chelex-100 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) ogni colonia di ciascun ceppo, è stata sospesa in 300 µL di Chelex 100 al 6% mediante vortex e incubata per 20 minuti a 56°C. e ancora per 8 minuti a 100°C. La sospensione è stata immediatamente raffreddata su ghiaccio per 1 minuto e centrifugata per 5 minuti a 10.000 ×g a 4°C (Peruzy et al., 2020). 5 µL di DNA estratto sono stati utilizzati come modello per la qPCR.

#### **6.2.5 qPCR**

Per la rilevazione di *Vibrio spp.* è stato utilizzato il kit *Vibrio* Multiplex Screening Assay (Generon). Il kit ha consentito l'identificazione individuale dei geni di virulenza: i geni dell'emolisina diretta termostabile (*tdh*) e dell'emolisina correlata a TDH (*trh*) in *V. parahaemolyticus*, il gene dell'emolisina (*vvhA*) in *V. Vulnificus* e la presunta citotossina (*rtxA*) in *V. cholerae*. Le sequenze di primers di *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* utilizzate nel presente lavoro sono riportate nella norma UNI EN ISO 21872-1:2017 mentre quelle di *V.*

*cholerae* sono riportate nello studio di Chow et al., (2001). Il kit conteneva il PATHfinder OLIGO Mix, il GENERase ULTRA Plus Mastermix, il diluente e un controllo positivo e negativo. Inoltre, il kit includeva un controllo interno non competitivo (IAC) per determinare l'inibizione nei campioni biologici e identificare risultati falsi negativi. La reazione è stata condotta a 95°C per 3 minuti, seguita da 45 cicli a 95°C per 10 s e 1 ciclo a 60°C per 45 s. Le reazioni di amplificazione sono state eseguite con la piattaforma Bio-Rad CFX96, utilizzando una piastra PCR multipla a 96 pozzetti, di Bio-Rad. In attesa dei risultati della RT-PCR, i brodi di arricchimento sono stati conservati a 4°C.

#### **6.2.6 ISOLAMENTO E IDENTIFICAZIONE BATTERICA MEDIANTE MALDI-TOF MS**

I campioni positivi alla PCR sono stati seminati in CHROMagarVibrio e agar tiosolfato-citrato-bilesalsaccarosio (TCBS) e incubati a 37 °C per 24 ore. Le colonie di presunto *Vibrio spp.* le colonie sono state analizzate mediante la spettrometria di massa (MALDI-TOF MS) (Bruker Daltonics, Brema, Germania). In breve, gli isolati sono stati seminati in duplicato su una piastra da 96 spot (Bruker Daltonics, Brema, Germania) e lasciati asciugare a temperatura ambiente. Successivamente, sono stati ricoperti con una soluzione di matrice da 1µL contenente 10 mg/mL di acido  $\alpha$ -ciano-4-idrossicinnamico in

acetonitrile, acqua deionizzata e acido trifluoracetico (50:47,5:2,5, [vol/vol/vol]). Lo standard Maldi per test batterici di Bruker (Bruker Daltonics) è stato utilizzato come calibrazione di massa e standard di riferimento prima di ciascuna serie di misurazioni. I campioni sono stati elaborati nello spettrometro di massa MALDI-TOF Microflex™ LT/SH (Bruker Daltonics) dotato di un laser ad azoto, funzionante in modalità di rilevamento lineare di ioni positivi utilizzando MALDI Biotyper Automation Control 2.0 (Bruker Daltonics). Le identificazioni sono state ottenute confrontando gli spettri di massa con il database Bruker MSP utilizzando il software Bruker Compass (Bruker Daltonics) con le impostazioni predefinite. I criteri di punteggio identificativo sono stati classificati in base ai criteri di identificazione del produttore; punteggi compresi tra 2,0 e 3,0 indicavano un'identificazione della specie altamente probabile, tra 1,7 e 1,99 un'identificazione certa di genere e probabile specie, mentre valori inferiori a 1,7 indicavano un'identificazione non affidabile. L'analisi è stata ripetuta quando gli spot non hanno prodotto alcun picco.

## **6.2.7 VERIFICA DELLA MISURAZIONE MICROBIOLOGICA**

Per calcolare il limite di rilevamento del 50% (LOD50), sono state ripetute cinque volte le analisi, di un campione contaminato con il

livello più alto, di un campione con il livello più basso e di un campione negativo. Il LOD50 è stato calcolato utilizzando il Limit of Detection Program for Qualitative Microbiology Methods (FDA-2002). Per valutare la variazione interindividuale, le analisi sono state ripetute da diversi operatori. In particolare, secondo la norma ISO 21872-1:2017, due operatori hanno ripetuto l'analisi su cinque campioni positivi selezionati casualmente e cinque campioni negativi selezionati casualmente. I diversi operatori hanno analizzato gli stessi 10 campioni selezionati.

### **6.3 RISULTATI**

Quando *V. vulnificus* e *V. cholerae* sono stati inoculati sperimentalmente in campioni di molluschi bivalvi per verificare l'applicabilità del metodo molecolare, i patogeni sono stati sempre rilevati, sia con il valore più basso ( $1,5 \times 10^3$  CFU/ g) che con quello più alto ( $1,5 \times 10^5$  CFU/ g) (Tabella 6.1) e non sono mai stati rilevati nei campioni negativi. *V. parahaemolyticus* non è mai stato rilevato nei campioni negativi e al livello più basso ed è stato rilevato in 14 campioni (93,33%) seminati con la concentrazione più alta (Tabella 6.1). La soglia del ciclo (Ct) variava da 25,57 a 38,46 per *V. vulnificus*, da 20,25 a 27,43 per *V. cholerae* e da 27,55 a 31,56 per *V.*

*parahaemolyticus*. Il metodo molecolare valutato ha mostrato un tasso di concordanza del 100% tra i diversi operatori e del 100% con il metodo microbiologico tradizionale di riferimento (EN/ISO 21872-1:2017). In particolare, i due operatori coinvolti nell'esperimento hanno rilevato correttamente le specie *Vibrio* nei campioni positivi e non in quelli negativi. Il LOD50 era 7,67 CFU/g per *V. cholerae* (intervallo di riferimento: 6,26 – 20,56 ufc/25gr), 0,024 CFU/g per *V. vulnificus* (intervallo di riferimento: 8,46 – 17,91 ufc/25gr) e 1,36 CFU/g per *V. parahaemolyticus* (intervallo di riferimento: 0,32 – 0,57 ufc/25gr). Inoltre, *Salmonella* ed *E. coli* inoculati sperimentalmente non sono mai stati rilevati.

**Tabella 6.1.** Confronto tra Real-Time PCR e metodi di isolamento microbiologico secondo ISO 21872-1:2017 per la ricerca di *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* in molluschi contaminati sperimentalmente con due livelli batterici (LL, livello basso =  $1,5 \times 10^3$  CFU/ g; HL, livello alto:  $1,5 \times 10^5$  CFU/ g).

| Samples | Vibrio Multiplex screening assay |    |                            |      |                      |    | ISO 21872-1:2017   |    |                            |    |                      |    |
|---------|----------------------------------|----|----------------------------|------|----------------------|----|--------------------|----|----------------------------|----|----------------------|----|
|         | <i>V. Cholerae</i>               |    | <i>V. parahaemolyticus</i> |      | <i>V. vulnificus</i> |    | <i>V. Cholerae</i> |    | <i>V. parahaemolyticus</i> |    | <i>V. vulnificus</i> |    |
|         | LL                               | HL | LL                         | HL   | LL                   | HL | LL                 | HL | LL                         | HL | LL                   | HL |
| 1       | +                                | +  | N.D.                       | +    | +                    | +  | +                  | +  | +                          | +  | +                    | +  |
| 2       | +                                | +  | N.D.                       | +    | +                    | +  | +                  | +  | +                          | +  | +                    | +  |
| 3       | +                                | +  | N.D.                       | +    | +                    | +  | +                  | +  | +                          | +  | +                    | +  |
| 4       | +                                | +  | N.D.                       | +    | +                    | +  | +                  | +  | +                          | +  | +                    | +  |
| 5       | +                                | +  | N.D.                       | +    | +                    | +  | +                  | +  | +                          | +  | +                    | +  |
| 6       | +                                | +  | N.D.                       | N.D. | +                    | +  | +                  | +  | +                          | +  | +                    | +  |
| 7       | +                                | +  | N.D.                       | +    | +                    | +  | +                  | +  | +                          | +  | +                    | +  |
| 8       | +                                | +  | N.D.                       | +    | +                    | +  | +                  | +  | +                          | +  | +                    | +  |
| 9       | +                                | +  | N.D.                       | +    | +                    | +  | +                  | +  | +                          | +  | +                    | +  |
| 10      | +                                | +  | N.D.                       | +    | +                    | +  | +                  | +  | +                          | +  | +                    | +  |
| 11      | +                                | +  | N.D.                       | +    | +                    | +  | +                  | +  | +                          | +  | +                    | +  |
| 12      | +                                | +  | N.D.                       | +    | +                    | +  | +                  | +  | +                          | +  | +                    | +  |
| 13      | +                                | +  | N.D.                       | +    | +                    | +  | +                  | +  | +                          | +  | +                    | +  |
| 14      | +                                | +  | N.D.                       | +    | +                    | +  | +                  | +  | +                          | +  | +                    | +  |
| 15      | +                                | +  | N.D.                       | +    | +                    | +  | +                  | +  | +                          | +  | +                    | +  |

## 6.4 DISCUSSIONI

Tra i *Vibrio spp.*, il *V. cholerae*, *V. vulnificus* e *V. parahaemolyticus* sono considerati i patogeni umani clinicamente più rilevanti (Ma et al., 2023). L'infezione umana è generalmente associata al consumo di molluschi che vengono generalmente consumati vivi/crudi o leggermente cotti (Savini et al., 2021). Il riscaldamento, infatti, è una misura efficace per ridurre l'infezione da agenti patogeni e quindi il maggior rischio di infezione umana è legato al consumo di cibi crudi o poco cotti. Nell'ultimo anno, il consumo di prodotti a base di pesce crudo è diventato più popolare tra i consumatori, e pertanto si prevede che il numero di infezioni da *Vibrio* aumenterà (Ma et al., 2023). Nel 2021, sono state segnalate all'Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA), tre epidemie di origine alimentare causate da *Vibrio parahaemolyticus*, e una causata da *Vibrio cholerae* (non tossico). In particolare, l'epidemia di origine alimentare causata dal *Vibrio cholerae* è stata la prima da quando l'EFSA ha iniziato a raccogliere dati sulle epidemie di origine alimentare (EFSA, 2022). La ricerca di *Vibrio spp.*, e quindi la sua prevalenza è significativamente influenzata dai metodi di rilevamento. Ad oggi, i metodi di riferimento utilizzati per la ricerca di *Vibrio* si basano principalmente su tecniche basate sulla microbiologia. I metodi microbiologici tradizionali, che prevedono

l'uso di terreni selettivi, erano solitamente considerati i metodi gold standard per il rilevamento dei patogeni, tuttavia, negli ultimi anni, per ridurre i tempi di rilevamento, sono stati introdotti nelle routine quotidiane di laboratorio test basati sugli acidi nucleici per rilevare batteri patogeni in diversi alimenti. Per il rilevamento del *Vibrio*, da giugno 2017 la reazione a catena della polimerasi (PCR) è stata introdotta nella norma ISO/TS 21872–1:2017 come alternativa ai metodi tradizionali a causa della maggiore efficienza. Tuttavia, il metodo incluso nella norma ISO/TS 21872–1:2017, che prevede l'uso di tre PCR real-time simplex e diverse temperature di reazione, richiede ancora tempo per il rilevamento. Nel presente studio è stata sviluppata una piattaforma molecolare, basata su una Real-Time PCR multiplex, per determinare la presenza simultanea di diversi *Vibrio spp.* nei molluschi. A causa della presenza di noti inibitori della PCR nei molluschi, per rilevare *Vibrio spp.* uno IAC non competitivo è stato incluso nel test Real-Time PCR per evitare risultati falsi negativi (Messelhäusser et al., 2010). Questo sistema PCR in tempo reale era basato sul rilevamento dei geni *tdh* e *trh* in *V. parahaemolyticus*, *vvhA* in *V. vulnificus* e *rtxA* in *V. cholerae*. Secondo una nostra ricerca, studi sui metodi che utilizzavano Real-Time PCR multiplex per la ricerca di *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* e *V. cholerae* sono vecchi e limitati.

Nello studio di Garrido-Maestu et al., (2014), per il rilevamento simultaneo di *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* e *V. cholerae* sono stati utilizzati i geni *tlh*, *vvhA* e *ompW*. Kim e Lee (2014) hanno sviluppato un test Multiplex Real-Time PCR per il rilevamento di *V. anguillarum*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* nei prodotti ittici. Pertanto, sebbene esistano diversi possibili bersagli per il rilevamento di *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* e *V. cholerae*., i geni specifici utilizzati nel presente lavoro (*tdh* e *trh* in *V. parahaemolyticus*, *vvhA* in *V. vulnificus* e *rtxA* in *V. cholerae*) sono evidenziati nella norma ISO 21872–1:2017 come marcatori essenziali per identificare i ceppi patogeni all'interno di queste specie di *Vibrio*. A nostra conoscenza, il presente lavoro descrive il primo test Real-Time PCR per la rilevazione simultanea dei geni *tdh*, *trh*, *vvhA* e *rtxA* in combinazione con un controllo di amplificazione interno nei molluschi. Secondo la norma ISO/TS 21872–1:2017, per la rilevazione di *V. cholerae* deve essere eseguita una PCR tradizionale (endpoint PCR). La PCR in tempo reale utilizzata nel presente lavoro potrebbe essere un'alternativa promettente alla PCR endpoint. Anche se la tecnologia Real-Time PCR è stata sviluppata principalmente per la quantificazione dei batteri, il suo utilizzo nelle analisi qualitative, come eseguite nel presente lavoro, non deve essere sottovalutato. Rispetto alla PCR endpoint, la Real-Time

PCR è più precisa e più rapida, poiché non richiede la preparazione di gel, ed è più sicura, poiché non è necessario il bromuro di etidio (Ahmed et al., 2009). Per quanto riguarda il LOD50, i risultati sono in contrasto con altri metodi precedentemente sviluppati per il rilevamento di vibroni singoli o multipli. Un limite di rilevamento più elevato è stato determinato per *V. parahaemolyticus* da Garrido et al., (2012) e Garrido-Maestu et al., (2014), e per *V. vulnificus* nello studio di Han e Ge, (2010) e Garrido- Maestu et al., (2014). In particolare, nello studio di Garrido et al., (2012) il limite di rilevazione determinato per *V. parahaemolyticus* nei mitili bolliti e congelati era di 6 CFU/25 g per *tdh*, 11 CFU/25 g per *trh1* e 8 CFU/25 g per *trh2*, nello studio di Han e Ge, (2010) il limite di rilevamento determinato per *V. vulnificus* nelle ostriche spillate senza alcun arricchimento era di 10<sup>4</sup> CFU/g con RT-LAMP e 107 CFU/g mediante PCR e nello studio di Garrido- Maestu et al., (2014), era di 3 CFU/25 g per *V. vulnificus*, 7 CFU/25 g per *V. parahaemolyticus* e 4 CFU/25 g per *V. cholerae*. Le differenze possono derivare da fattori quali inibitori della PCR, limitazioni nella progettazione dei primer o interferenze da parte di organismi strettamente correlati che possono influenzare la sensibilità (Bustin, S. A., et al., 2020). Inoltre, il protocollo Real-Time PCR ha dimostrato di

amplificare solo *V. vulnificus*, *V. cholerae* e *V. parahaemolyticus* e non *Salmonella* ed *E. coli* inoculati sperimentalmente nei campioni.

## 6.5 CONCLUSIONI

A livello globale, le specie *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* e *V. vulnificus* rappresentano i più importanti patogeni batterici associati al consumo di frutti di mare. In diversi paesi sono stati introdotti criteri o linee guida sulla sicurezza alimentare per limitare i rischi di esposizione dei consumatori di prodotti ittici al *Vibrio spp.* Per questo motivo è essenziale sviluppare metodi rapidi e altamente specifici per il rilevamento di questi agenti patogeni alimentari. Nel presente studio è stato sviluppato un metodo rapido basato sull'uso di una Multiplex Real-Time PCR, per rilevare *V. parahaemolyticus*, inclusi ceppi potenzialmente enteropatogeni, *V. vulnificus* e *V. cholerae* nei molluschi bivalvi. La procedura complessiva richiede circa 24 ore compreso il periodo della coltura di arricchimento, ottenendo un metodo più veloce, più semplice e meno costoso rispetto ai metodi convenzionali e ad altri metodi molecolari. La Multiplex Real-Time PCR sviluppata si è rivelata affidabile per *V. vulnificus* e *V. cholerae*. I risultati per *V. parahaemolyticus* sono promettenti ma sono necessarie ulteriori analisi. Il metodo proposto potrebbe rappresentare uno

strumento di monitoraggio rapido e, se utilizzato, rappresenterebbe un vantaggio per la sicurezza alimentare. Tuttavia, espandere l'ambito della ricerca per raccogliere una gamma più ampia di dati, è fondamentale per convalidare questi risultati. Ciò comporterebbe la conduzione di esperimenti su una serie più ampia di molluschi bivalvi, sia campioni contaminati sperimentalmente che naturalmente. Inoltre, sarebbe necessario esplorare varie matrici per avere una conferma completa e solida dei dati ottenuti. Questo approccio più ampio rafforzerà la validità e l'affidabilità dei risultati della ricerca.

## **6.6 BIBLIOGRAFIA**

Ahmed A, Engelbert M F M, Boer K R, Ahmed N, Hartskeerl R A 2009. Development and validation of a Real-Time PCR for detection of pathogenic *Leptospira* species in clinical materials. PLoS One 4, 4–11. doi: 10.1371/journal.pone.0007093.

Baker-Austin C, Oliver J D, Alam M, Ali A, Waldor M K, Qadri F, Martinez-Ur 2018. *Vibrio* spp. infections. Nat. Rev. Dis. Prim. 4. doi: 10.1038/s41572-018-0005-8.

Bustin, S A, Mueller R, Nolan T 2020. Parameters for successful PCR primer design. Quantitative Real-Time PCR: Methods and Protocols, 5-22.

Castello A, Alio V, Sciortino S, Oliveri G, Cardamone C, Butera G, Costa A 2022. Occurrence and Molecular Characterization of Potentially Pathogenic *Vibrio* spp. in Seafood Collected in Sicily. *Microorganisms* 11, 53. doi: 10.3390/microorganisms11010053.

Chow K H, Ng T K, Yuen K Y, Yam W C 2001. Detection of RTX toxin gene in *Vibrio cholerae* by PCR. *J. Clin. Microbiol.* 39, 2594–2597. doi: 10.1128/JCM.39.7.2594-2597.2001.

EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2022. The European Union One Health 2021 Zoonoses Report. *EFSA Journal* 2022;20(12):7666, 273 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.7666>

Fleischmann S, Herrig I, Wesp J, Stiedl J, Reifferscheid G, Strauch E, Alter T, Brennholt N 2022. Prevalence and Distribution of Potentially Human Pathogenic *Vibrio* spp. on German North and Baltic Sea Coasts. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 12, 1–15. doi: 10.3389/fcimb.2022.846819.

Garrido-Maestu A, Chapela M J, Peñaranda E, Vieites J M, Cabado A G 2014. In-house validation of novel multiplex Real-Time PCR gene combination for the simultaneous detection of the main human pathogenic vibrios (*Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and

*Vibrio vulnificus*). *Food Control* 37, 371–379. doi: 10.1016/j.foodcont.2013.09.026.

Garrido A, Chapela MJ, Ferreira M, Atanassova M, Fajardo P, Lago J, Vieites J.M. Cabado AG 2012. Development of a multiplex Real-Time PCR method for pathogenic *Vibrio parahaemolyticus* detection (tdh+ and trh+). *Food Control* 24, 128–135. doi: 10.1016/j.foodcont.2011.09.015.

Han F, Ge B 2010. Quantitative detection of *Vibrio vulnificus* in raw oysters by Real-Time loop-mediated isothermal amplification. *Int. J. Food Microbiol.* 142, 60–66. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.05.029.

Kim J Y, Lee J L 2014. Multipurpose assessment for the quantification of *Vibrio* spp. and total bacteria in fish and seawater using multiplex Real-Time polymerase chain reaction. *J. Sci. Food Agric.* 94, 2807–2817. doi: 10.1002/jsfa.6699.

La Tela I, Peruzzy M F, D'Alessio N, Di Nocera F, Casalnuovo F, Carullo M R, Cardinale D, Cristiano D, Capuano F 2021. Serotyping and evaluation of antimicrobial resistance of salmonella strains detected in wildlife and natural environments in southern Italy. *Antibiotics* 10, 1–13. doi: 10.3390/antibiotics10040353.

Ma J Y, Zhu X K , Hu R G, Qi ZZ, Sun W C, Hao Z P, Cong W, Kang YH 2023. A systematic review, meta-analysis and meta-regression of the global prevalence of foodborne *Vibrio* spp. infection in fishes: A persistent public health concern. *Mar. Pollut. Bull.* 187, 114521. doi: 10.1016/j.marpolbul.2022.114521.

Marceddu M, Lamon S, Consolati S G, Ciulli S, Mazza R, Mureddu A., Meloni D 2017. Determination of salmonella spp., e. coli vtec, vibrio spp., and norovirus gi-gii in bivalve molluscs collected from growing natural beds in sardinia (Italy). *Foods* 6, 1–8. doi: 10.3390/foods6100088.

Messelhäusser U, Colditz J, Thäringen D, Kleih W, Höller C, Busch U 2010. Detection and differentiation of *Vibrio* spp. in seafood and fish samples with cultural and molecular methods. *Int. J. Food Microbiol.* 142, 360–364. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.07.020.

Peruzy M F, Proroga Y T R, Capuano F, Corrado F, Santonicola S, De Medici D, Delibato E, Murru N 2020. Detection and quantification of campylobacter in foods: New analytic approaches to detect and quantify campylobacter spp. in food samples. *Ital. J. Food Saf.* 9, 88–92. doi: 10.4081/ijfs.2020.8591.

Savini F, Giacometti F, Tomasello F, Pollesel M, Piva S, Serraino A, De Cesare A 2021. Assessment of the impact on human health of the presence of norovirus in bivalve molluscs: What data do we miss? *Foods* 10. doi: 10.3390/foods10102444.

Wang Y, Salazar J K 2016. Culture-Independent Rapid Detection Methods for Bacterial Pathogens and Toxins in Food Matrices. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 15, 183–205. doi: 10.1111/1541-4337.12175.

## **7. ARTICOLO 4**

### **UNA STRATEGIA ANALITICA RAPIDA PER RILEVARE LA *SALMONELLA* NEGLI ALIMENTI**

Autori: Daniela Cristiano, Silvia Castellano, Andrea Mancusi, Yolande Thérèse Rose Proroga, Elisabetta Delibato, Maria Francesca Peruzzy, Nicoletta Murru

#### **RIASSUNTO**

I metodi convenzionali per la ricerca della *Salmonella* nei campioni alimentari sono lunghi e richiedono molto tempo, fino a cinque giorni per l'identificazione dell'agente patogeno. Per prevenire la distribuzione di alimenti contaminati sono necessari metodi rapidi per la diagnosi precoce della *Salmonella*. Lo scopo del presente studio era la valutazione di una strategia rapida basata sull'uso della Real-Time PCR per rilevare la *Salmonella* in diverse matrici alimentari. Sono stati utilizzati diversi approcci per rilevare rapidamente la *Salmonella* da campioni di verdure in foglia, carne macinata, mozzarella e cozze contaminati sperimentalmente. I protocolli testati includevano due metodi di estrazione (ebollizione e Chelex 100), due brodi di arricchimento (BPW e BPW integrati con RAPID'S *Salmonella*

Capsule) e due temperature di incubazione (37°C e 42°C). Preriscaldando il BPW a 41,5°C durante la notte, estraendo il DNA attraverso il metodo con Chelex 100, la *Salmonella* potrebbe essere rilevata in quattro ore. In conclusione, l'applicazione della strategia analitica rapida, automatizzata e a basso costo consentirebbe sia agli operatori del settore alimentare che all'autorità competente di migliorare significativamente il controllo dei prodotti alimentari. Questo metodo potrebbe rappresentare un sistema innovativo per migliorare la valutazione dei focolai epidemici, garantendo non solo la sicurezza alimentare ma anche una diagnosi rapida in caso di emergenza.

**Parole chiavi:** *Salmonella*; Real-Time PCR; tempo minimo di pre-arricchiamento

## 7.1 INTRODUZIONE

Nell'Unione Europea (UE), la salmonellosi è la seconda zoonosi più frequentemente segnalata e la principale causa di epidemie di origine alimentare. Nel 2022, nell'UE sono stati segnalati un totale di 65.208 casi di salmonellosi umana con un tasso di notifica di 15,3 per 100.000 abitanti [1]. In Italia, la salmonellosi è l'infezione di origine alimentare più segnalata, con oltre 3500 casi segnalati ogni anno [2]. L'infezione da *Salmonella* nell'uomo si manifesta solitamente come gastroenterite autolimitante con nausea, crampi addominali, vomito e diarrea. Tuttavia, in alcuni casi, può essere pericoloso per la vita, soprattutto nei bambini piccoli (< 5 anni), negli anziani e negli adulti immunocompromessi [3]. Il genere *Salmonella* è composto da due specie: *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori*. La *Salmonella enterica* (S.) può essere ulteriormente suddivisa in sei sottospecie e, in base ai suoi antigeni di superficie (O e H), in oltre 2600 sierotipi di cui il 99% è associato a infezioni animali e umane [4]. Nel 2022, i sierotipi di *Salmonella* più comunemente segnalati nelle infezioni umane sono stati *S. enteritidis*, *S. typhimurium* e *S. typhimurium* monofasica, [5],12:i:-). I sierotipi di *Salmonella* vivono nel tratto gastrointestinale di un'ampia gamma di animali domestici e selvatici. Possono raggiungere l'uomo in seguito al contatto diretto con animali infetti o

attraverso il consumo di alimenti contaminati. L'agente patogeno può sopravvivere in tutti i tipi di alimenti, ad es. carne, prodotti a base di carne, pesce, prodotti della pesca, frutta, verdura, spezie ed erbe aromatiche [5]. Le principali fonti di infezione umana sono le uova e i prodotti a base di uova, seguiti da carne suina e prodotti derivati” e “prodotti da forno [6]. Tuttavia, un’ampia gamma di alimenti, come i latticini e le verdure, sono implicati nella salmonellosi. Diversi fattori che si verificano dalla produzione al consumo, come la scarsa igiene durante la macellazione o la raccolta, la lavorazione, il trasporto e la manipolazione, possono contribuire alla sopravvivenza della *Salmonella* in tali prodotti alimentari [7]. A livello europeo (UE), è stato implementato il controllo della *Salmonella* dalla fattoria alla tavola, con piani di controllo conformi alla legislazione europea [8]. Secondo il Reg. (CE) 2073/2005 e successive modifiche, è richiesta l'assenza di *Salmonella* in diverse categorie di alimenti quali carne macinata e preparazioni di carne, latticini, verdure pronte e cozze. L'isolamento dell'agente patogeno viene generalmente eseguito tramite metodi analitici di riferimento che sono affidabili e sensibili, ma lunghi e dispendiosi in termini di tempo. Il metodo ISO (ISO 6579-1:2017/Amd 1:2020) per il rilevamento dei patogeni prevede l'uso di diversi terreni ed agar dopo un pre-arricchimento, in acqua peptonata tamponata e fasi

di arricchimento selettivo che consentono la crescita del patogeno, ma prolungano il tempo di rilevamento [8]. Pertanto, l'intero processo, considerando anche la conferma biochimica e sierologica, richiede almeno cinque giorni per confermare la presenza dell'agente patogeno [8]. La tempistica delle analisi è incompatibile con l'esigenza di individuare precocemente la *Salmonella* negli alimenti, sia per intervenire tempestivamente sia per prevenire la distribuzione di alimenti contaminati in caso di focolai epidemici. [9]. Sono stati proposti metodi molecolari, come i metodi basati sulla PCR, per rilevare la *Salmonella* negli alimenti pre-arricchiti [3,10,11]. Questi metodi, tuttavia, richiedono almeno 8 ore per la fase di pre-arricchimento e più di un giorno per l'intero processo (a seconda della tipologia dei campioni alimentari). Lo scopo del presente studio è stato lo sviluppo di un metodo qualitativo rapido basato sull'uso della Real-Time PCR per rilevare la *Salmonella* in diverse matrici alimentari in un tempo di analisi totale di 7 ore.

## **7.2 MATERIALI E METODI**

### **7.2.1.CAMPIONI DI ALIMENTI CONTAMINATI SPERIMENTALMENTE PER LA RICERCA DI *SALMONELLA***

Campioni di verdure in foglia (LG), carne macinata (MM), mozzarella di bufala (WBMC) e cozze (M) sono stati acquistati in diversi supermercati della Regione Campania (Sud Italia). Tutti i campioni di circa 200–300 g sono stati trasportati al laboratorio a 4 °C entro 1 ora. I campioni sono stati analizzati prima dell'inoculo del ceppo di *Salmonella* con la norma ISO 6579-1:2017/Amd 1:2020 per valutare l'assenza dell'agente patogeno.

### **7.2.2 CEPPI DI *SALMONELLA***

*Salmonella typhimurium*, prelevata dalla Collezione *Salmonella* del Centro di Tipizzazione *Salmonella* della Regione Campania (Dipartimento di Microbiologia Alimentare, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Portici, NA, Italia), è stata utilizzata per contaminare i campioni. I ceppi sono stati rivitalizzati due volte in agar nutrient (NA; (NA; CM0003, Oxoid, Basingstoke, UK) e incubati a 37 °C per 24 ore. Le colonie sono state poi trasferite in Buffered Peptone Water (BPW; CM0509, Oxoid, Basingstoke, UK) ed i livelli di inoculo

sono stati determinati mediante conteggio su Plate Count Agar (PCA; CM0325, Oxoid). I campioni sono stati contaminati con livelli d'inoculo sia basso (1–10 CFU/25 g – LC) che alto (10–102 CFU/25 g – HC).

### **7.2.3 CONTAMINAZIONE SPERIMENTALE DELLA MATRICE ALIMENTARE**

Venticinque grammi di campioni di carne macinata e verdure a foglia verde sono stati posti in una busta sterile da stomacher ai quali sono stati aggiunti 224 ml di BPW, successivamente sono stati omogenati per 3 minuti a 230 giri al minuto utilizzando un omogeneizzatore peristaltico (Bag-Mixer®400 P, Interscience, Saint Nom, Francia). Ciascun omogenato è stato contaminato con 1 ml dei due livelli d'inoculo, come indicato nella Sezione 7.2.2. I campioni contaminati sono stati incubati a 37 °C per 20 ore. Durante questa fase, 2 ml di terreno di pre-arricchimento a diversi tempi di incubazione (0, 2, 4, 5, 6, 7, 8 e 20 ore) sono stati raccolti e sottoposti ad estrazione del DNA.

### **7.2.4 ESTRAZIONE DEL DNA**

Il DNA è stato estratto da ciascun omogenato al tempo zero (T-0) e dopo 2 (T-2), 4 (T-4), 5 (T-5), 6 (T-6), 7 (T-7), 8 (T-8) e 20 (T-20) ore di incubazione. Il DNA dall'omogenato di verdure a foglia verde è stato

estratto utilizzando i metodi di ebollizione (sezione 7.2.5) e Chelex 100 (sezione 7.2.6).

### **7.2.5 METODO PER BOLLITURA**

Un ml di ciascun omogenato è stato trasferito in una provetta da 2 ml. La sospensione cellulare è stata centrifugata per 10 minuti a 14.000 g. Il surnatante è stato eliminato con attenzione e il pellet è stato risospeso in 100 µl di acqua distillata priva di DNasi-RNasi mediante vortex. La soluzione è stata incubata per 10 minuti a 100°C e centrifugata per 5 minuti a 14.000 g a 4°C. Un'aliquota da 5 ml del surnatante è stata utilizzata come DNA modello nella Real time PCR.

### **7.2.6 METODO CON CHELEX100**

Dieci ml di ciascun omogenato sono stati trasferiti in una provetta da 15 ml e centrifugati per 10 minuti a 10.000xg a 4°C. Il surnatante è stato eliminato e il pellet è stato risospeso in 300 µl di Chelex 100 al 6% mediante vortex e incubato a 56 °C per 20 minuti e ulteriori 8 minuti a 100 °C. La sospensione è stata immediatamente raffreddata su ghiaccio per 1 minuto e centrifugata per 5 minuti a 10.000 g a 4°C. Un'aliquota di 5 ml del surnatante è stata utilizzata come DNA modello nella Real time PCR.

### **7.2.7 REAL-TIME PCR (QPCR)**

Per valutare la presenza di *Salmonella* è stato utilizzato il “iQ-Check Real-Time PCR Kit” (Bio-Rad, Hercules, CA, USA), seguendo le raccomandazioni del produttore.

### **7.2.8 CONTAMINAZIONE SPERIMENTALE DELLA MATRICE ALIMENTARE**

Venticinque grammi di campioni di mozzarella, verdura a foglia verde, e carne macinata sono stati posti in una busta da stomacher sterile, sono stati aggiunti 224 ml di Buffered Peptone Water sterile (BPW; CM0509, Oxoid, Basingstoke, UK), e sono stati omogenati per 3 minuti a 230 giri al minuto utilizzando un omogeneizzatore peristaltico (BagMixer400 P, Interscience, Saint Nom, Francia). In metà dei campioni, una capsula RAPID'S *Salmonella* (3564710, Bio-Rad, Hercules, California, USA) è stata aggiunta al BPW (BPWC). Ciascun omogenato è stato inoculato con 1 ml delle sospensioni batteriche come indicato nella Sezione 7.2.1. I campioni contaminati sono stati incubati a 37 °C o 42 °C per 20 ore, durante questa fase, 20 ml di terreno di pre-arricchimento a diversi tempi di incubazione (0, 2, 4, 5, 6, 7, 8 e 20 ore) sono stati raccolti e sottoposti ad estrazione del DNA.

### **7.2.9 ESTRAZIONE DEL DNA E REAL TIME PCR (I)**

Il DNA è stato estratto da 20 ml di ciascun omogenato al tempo zero (T-0) e dopo 2 (T-2), 4 (T-4), 5 (T-5), 6 (T-6), 7 (T -7), 8 (T-8) e 20 (T-20) ore di incubazione utilizzando il metodo Chelex 100 (sezione 7.2.7). La Real time PCR è stata eseguita utilizzando il "kit PCR iQ-Check Real-Time" (sezione 7.2.8).

### **7.2.10 RICERCA DI *SALMONELLA* IN CAMPIONI CONTAMINATI SPERIMENTALMENTE UTILIZZANDO BPW PRERISCALDATO**

Venticinque grammi di campioni di verdure a foglia verde, carne macinata, mozzarella di bufala e cozze sono stati posti in una busta da stomacher sterile, sono stati aggiunti 224 ml di Buffered Peptone Water sterile (BPW; CM0509, Ox-oid, Basingstoke, UK), e sono stati omogenati per 3 minuti a 230 giri al minuto utilizzando un omogeneizzatore peristaltico (BagMixer®400 P, Interscience, Saint Nom, Francia ) Prima dell'uso, il BPW è stato riscaldato durante la notte a 41,5°C. Ciascun omogenato è stato inoculato con 1 ml di sospensione batterica come indicato nella Sezione 7.2.1. I campioni contaminati sono stati incubati a 37 °C per 20 ore.

### **7.2.11 ESTRAZIONE DEL DNA E REAL-TIME PCR (II)**

Il DNA è stato estratto da 1 e 20 ml di ciascun omogenato dopo 4 (T-4), 5 (T-5), 6 (T-6) e 20 (T-20) ore di incubazione utilizzando il metodo Chelex 100 (sezione 7.2.7). La Real time PCR è stata eseguita utilizzando il "iQ-Check Real-Time PCR Kit" (sezione 7.2.8).

## **7.3 RISULTATI E DISCUSSIONI**

Negli ultimi anni sono stati utilizzati diversi metodi colturali e molecolari per la rilevazione della *Salmonella* negli alimenti. Questi metodi, sebbene affidabili, sono ancora lunghi e richiedono molto tempo [3,10,11]. La maggior parte di questi metodi utilizza una fase di pre-arricchimento necessaria per diluire la sostanza inibitrice e consentire la crescita della *Salmonella* [12]. Nel presente lavoro sono stati eseguiti diversi studi per disporre di tecniche sensibili e affidabili per rilevare rapidamente la *Salmonella spp.* nei campioni alimentari. I metodi basati sulla PCR richiedono protocolli di estrazione efficienti per il rilevamento dei patogeni. Nel presente lavoro sono stati testati due metodi di estrazione: metodi per bollitura e Chelex 100. I metodi sono metodi di estrazione del DNA senza solventi e sono entrambi convenienti e veloci [13]. Nella prima prova, è stato utilizzato il metodo per bollitura, per estrarre il DNA batterico da campioni di verdure a

foglie verdi. Sebbene il metodo per bollitura sia utilizzato in tutto il mondo per l'estrazione del DNA in diverse matrici alimentari [14], nel presente studio si è rivelato inefficace per la rilevazione precoce della *Salmonella* nelle verdure poiché l'agente patogeno veniva rilevato solo dopo 20 ore (Tabella 7.1).

**Tabella 7.1.** Rilevazione di *Salmonella* utilizzando il metodo per bollitura in verdure a foglia, contaminate artificialmente con due livelli d'inoculo (LC, basso = 1–10 CFU/25g; HC, alto = 10–102 CFU/25g CFU/g) e incubate per 20 ore.

| Leafy green samples |                        |                     |      |
|---------------------|------------------------|---------------------|------|
| Inoculum level      | Incubation Temperature | Hours of incubation | qPCR |
| LC                  | 37°C                   | 0                   | N.D. |
|                     |                        | 2                   | N.D. |
|                     |                        | 4                   | N.D. |
|                     |                        | 5                   | N.D. |
|                     |                        | 6                   | N.D. |
|                     |                        | 7                   | N.D. |
|                     |                        | 8                   | N.D. |
|                     |                        | 20                  | D.   |
| HC                  |                        | 0                   | N.D. |
|                     |                        | 2                   | N.D. |
|                     |                        | 4                   | N.D. |
|                     |                        | 5                   | N.D. |
|                     |                        | 6                   | N.D. |
|                     |                        | 7                   | N.D. |
|                     |                        | 8                   | N.D. |
|                     |                        | 20                  | D.   |

<sup>a</sup>N.D. = Not detectable

<sup>b</sup>D = Presence

Quando è stato utilizzato il metodo Chelex 100 per l'estrazione del DNA, la *Salmonella* è stata rilevata dalla 6a e 7a ora di incubazione fino

alla fine rispettivamente nei campioni contaminati con il livello basso (0–10 CFU/25 g) ed alto (10–10<sup>2</sup> CFU/25 g) (Tabella 7.2).

**Tabella 7.2.** Rilevazione di *Salmonella* utilizzando il metodo Chelex 100 in verdure a foglia contaminate artificialmente con due livelli d'inoculo (LC, basso = 1–10 CFU/25g; HC, alto = 10–10<sup>2</sup> CFU/25g) e incubate per 20 ore.

| Leafy green samples |                        |      |                     |      |
|---------------------|------------------------|------|---------------------|------|
| Inoculum level      | Incubation temperature | Tem- | Hours of incubation | qPCR |
| LC                  | 37°C                   |      | 0                   | N.D. |
|                     |                        |      | 2                   | N.D. |
|                     |                        |      | 4                   | N.D. |
|                     |                        |      | 5                   | N.D. |
|                     |                        |      | 6                   | D.   |
|                     |                        |      | 7                   | D.   |
|                     |                        |      | 8                   | D.   |
|                     |                        |      | 20                  | D.   |
|                     |                        |      |                     |      |
| HC                  | 37°C                   |      | 0                   | N.D. |
|                     |                        |      | 2                   | N.D. |
|                     |                        |      | 4                   | N.D. |
|                     |                        |      | 5                   | N.D. |
|                     |                        |      | 6                   | N.D. |
|                     |                        |      | 7                   | D.   |
|                     |                        |      | 8                   | D.   |
|                     |                        |      | 20                  | D.   |
|                     |                        |      |                     |      |

<sup>a</sup>N.D. = Not detectable  
<sup>b</sup>D = Presence

I risultati sono in contrasto con quelli di Dmitric et al., (2018) in cui il metodo Chelex 100 era efficace nel rilevare l'agente patogeno inoculato sperimentalmente a diverse concentrazioni in diversi alimenti, ma dopo 24 ore di incubazione. Il metodo Chelex 100 ha prodotto risultati

migliori rispetto al metodo per bollitura e quindi è stato utilizzato per estrarre il DNA da verdure a foglia, carne macinata, mozzarella di bufala e cozze nelle prove successive. Un altro approccio utilizzato nel presente lavoro per ridurre il tempo di rilevamento includeva il cambiamento delle formulazioni del brodo BPW, e della temperatura di incubazione. In particolare, le capsule RAPID'*Salmonella* che sono integratori selettivi, sono state aggiunte alla metà dei campioni preparati in BPW (Tabella 7. 3).

**Tabella 7.3.** Rilevazione di *Salmonella* utilizzando il metodo di estrazione Chelex100 da 20 ml di omogenato di carne macinata (A), verdure a foglia verde (B) e mozzarella di bufala (C) contaminati artificialmente con due livelli d'inoculo (LC, basso = 1–10 CFU/25g e HC, alto = (10–102 CFU/25g) e incubato in due terreni (BPW= Buffered Peptone Water e BPWC = Buffered Peptone Water with RAPID'S *Salmonella* Capsule) per 20 ore a due temperature (37°C e 42 °C).

A

| Food sam-<br>ples | Enrichment me-<br>dium | Inoculum le-<br>vel | Hours of incuba-<br>tion | Incubation Temperature |      |
|-------------------|------------------------|---------------------|--------------------------|------------------------|------|
|                   |                        |                     |                          | 37°C                   | 42°C |
| Minced<br>meat    | BPW                    | LC                  | 0                        | N.D.                   | N.D. |
|                   |                        |                     | 2                        | D.                     | D.   |
|                   |                        |                     | 4                        | D.                     | D.   |
|                   |                        |                     | 5                        | D.                     | D.   |
|                   |                        |                     | 6                        | D.                     | D.   |
|                   |                        |                     | 7                        | D.                     | D.   |
|                   |                        |                     | 8                        | D.                     | D.   |
|                   |                        |                     | 20                       | D.                     | D.   |
|                   |                        | HC                  | 0                        |                        |      |
|                   |                        |                     | 2                        | D.                     |      |
|                   |                        |                     | 4                        | D.                     | D.   |
|                   |                        |                     | 5                        | D.                     | D.   |
|                   |                        |                     | 6                        | D.                     | D.   |
|                   |                        |                     | 7                        | D.                     | D.   |
|                   |                        |                     | 8                        | D.                     | D.   |
|                   |                        |                     | 20                       | D.                     | D.   |
|                   | BPWC                   | LC                  | 0                        | N.D.                   | N.D. |
|                   |                        |                     | 2                        | D.                     |      |
|                   |                        |                     | 4                        | D.                     |      |
|                   |                        |                     | 5                        | D.                     |      |
|                   |                        |                     | 6                        | D.                     |      |
|                   |                        |                     | 7                        | D.                     |      |
|                   |                        |                     | 8                        | D.                     |      |
|                   |                        |                     | 20                       | D.                     | D.   |
|                   | BPWC                   | HC                  | 0                        |                        |      |
|                   |                        |                     | 2                        | D.                     |      |
|                   |                        |                     | 4                        |                        |      |
|                   |                        |                     | 5                        |                        |      |
|                   |                        |                     | 6                        |                        | D.   |
|                   |                        |                     | 7                        |                        |      |
|                   |                        |                     | 8                        | D.                     | D.   |
|                   |                        |                     | 20                       | D.                     | D.   |

B

| Food samples | Enrichment medium | Inoculum level | Hours of incubation | Incubation Temperature |      |
|--------------|-------------------|----------------|---------------------|------------------------|------|
|              |                   |                |                     | 37°C                   | 42°C |
| Leafy green  | BPW               | LC             | 0                   |                        |      |
|              |                   |                | 2                   | D.                     |      |
|              |                   |                | 4                   | D.                     | D.   |
|              |                   |                | 5                   | D.                     |      |
|              |                   |                | 6                   | D.                     | D.   |
|              |                   |                | 7                   | D.                     |      |
|              |                   |                | 8                   | D.                     |      |
|              |                   |                | 20                  | D.                     | D.   |
|              |                   | HC             | 0                   |                        |      |
|              |                   |                | 2                   | D.                     |      |
|              |                   |                | 4                   | D.                     | D.   |
|              |                   |                | 5                   | D.                     | D.   |
|              |                   |                | 6                   | D.                     |      |
|              |                   |                | 7                   | D.                     | D.   |
|              |                   |                | 8                   | D.                     |      |
|              |                   |                | 20                  | D.                     | D.   |
|              | BPWC              | LC             | 0                   |                        |      |
|              |                   |                | 2                   | D.                     | D.   |
|              |                   |                | 4                   | D.                     | D.   |
|              |                   |                | 5                   | D.                     | D.   |
|              |                   |                | 6                   | D.                     | D.   |
|              |                   |                | 7                   | D.                     | D.   |
|              |                   |                | 8                   | D.                     | D.   |
|              |                   |                | 20                  | D.                     | D.   |
|              |                   | HC             | 0                   |                        |      |
|              |                   |                | 2                   | D.                     | D.   |
|              |                   |                | 4                   | D.                     | D.   |
|              |                   |                | 5                   | D.                     | D.   |
|              |                   |                | 6                   | D.                     | D.   |
|              |                   |                | 7                   | D.                     | D.   |
|              |                   |                | 8                   | D.                     | D.   |
|              |                   |                | 20                  | D.                     | D.   |

C

| Food sam-<br>ples                            | Enrichment me-<br>dium | Inoculul level | Hours of incuba-<br>tion | Incubation Temperature |      |
|----------------------------------------------|------------------------|----------------|--------------------------|------------------------|------|
|                                              |                        |                |                          | 37°C                   | 42°C |
| Water buf-<br>falo moz-<br>zarella<br>cheese | BPW                    | LC             | 0                        |                        |      |
|                                              |                        |                | 2                        |                        |      |
|                                              |                        |                | 4                        |                        |      |
|                                              |                        |                | 5                        |                        |      |
|                                              |                        |                | 6                        |                        |      |
|                                              |                        |                | 7                        |                        |      |
|                                              |                        |                | 8                        |                        |      |
|                                              |                        |                | 20                       | D.                     | D.   |
|                                              |                        |                | 0                        |                        |      |
|                                              |                        |                | 2                        |                        |      |
|                                              | BPWC                   | HC             | 4                        |                        |      |
|                                              |                        |                | 5                        |                        |      |
|                                              |                        |                | 6                        |                        |      |
|                                              |                        |                | 7                        |                        | D.   |
|                                              |                        |                | 8                        |                        |      |
|                                              |                        |                | 20                       | D.                     | D.   |
|                                              |                        |                | 0                        |                        |      |
|                                              |                        |                | 2                        |                        |      |
|                                              |                        |                | 4                        |                        |      |
|                                              |                        |                | 5                        |                        |      |
|                                              | BPWC                   | LC             | 6                        |                        |      |
|                                              |                        |                | 7                        |                        |      |
|                                              |                        |                | 8                        |                        |      |
|                                              |                        |                | 20                       | D.                     | D.   |
|                                              |                        |                | 0                        |                        |      |
|                                              |                        |                | 2                        |                        |      |
|                                              |                        |                | 4                        | D.                     |      |
|                                              |                        |                | 5                        |                        |      |
|                                              |                        |                | 6                        |                        |      |
|                                              |                        |                | 7                        |                        |      |
|                                              |                        |                | 8                        |                        |      |
|                                              |                        |                | 20                       | D.                     | D.   |

Poiché il protocollo proposto dal produttore delle capsule RAPID'*Salmonella* per il recupero della *Salmonella* richiede l'incubazione del brodo a una temperatura di 42°C, tutti gli omogenati indipendentemente dalla presenza della capsula (BPW e BPWC) sono stati incubati sia 37°C e 42°C. Inoltre, a differenza della prova

precedente, per l'estrazione del DNA con il metodo Chelex 100 sono stati utilizzati 20 ml di ciascun omogenato. Nella carne macinata, quando BPW è stato utilizzato come terreno non selettivo di prearricchimento per il rilevamento della *Salmonella*, il patogeno è stato rilevato dalla 2a ora di incubazione fino alla fine nei campioni seminati inoculati con il livello più basso indipendentemente dalla temperatura di incubazione (37 °C e 42°C), mentre è stata rilevata dalla 2a e dalla 4a ora nei campioni seminati con il livello più alto e incubati rispettivamente a 37°C e 42°C. Quando la capsula RAPID'S *Salmonella* è stata aggiunta al BPW, nei campioni incubati a 37 °C e seminati con una carica batterica < 10 CFU/g, la *Salmonella* è stata rilevata dalla 2a ora di incubazione, mentre è stata rilevata solo dopo 20 ore nei campioni contaminato con la concentrazione più alta (Tabella 7.3A). Quando i campioni sono stati seminati con il livello più alto, il ceppo è stato rilevato solo alla 2a, 8a e 20a ora a 37 °C e alla 6a, 8a e 20a ora nei campioni incubati a 42 °C (Tabella 7.3A). Nelle verdure a foglia verde, il patogeno è stato rilevato nei campioni incubati a 37°C dalla 2a ora di incubazione fino alla fine indipendentemente dalla carica batterica e dai terreni utilizzati (BPW e BPWC). Quando gli omogenati sono stati incubati in BPW a 42°C, la *Salmonella* è stata rilevata solo alla 4a, 6a e 20a ora nei campioni seminati con una carica batterica < 10 CFU/g e

alla 4a, 5a, 7a e 20a ora nei campioni testati con il livello più alto. Nei campioni a foglie verdi incubate in BPWC, la *Salmonella* è stata rilevata dopo due ore di incubazione indipendentemente dalla carica batterica utilizzata per contaminarle (Tabella 7.3B). Nel presente studio, per i campioni a foglia verde, l'uso di una quantità maggiore di omogenato per l'estrazione del DNA ha prodotto risultati migliori rispetto a quelli ottenuti con 10 ml. Il recupero della *Salmonella* dalle carni macinate e dalle verdure a foglia verde, è stato influenzato dalla temperatura di incubazione del brodo e, nel caso della carne macinata, anche dalla presenza della capsula di *Salmonella* RAPID'S. Anche se è stato riportato che *S. typhimurium* è termotollerante a 45 °C (Pesingi et al., 2017) e che una temperatura superiore a 37 °C può ridurre la flora di fondo [15], l'uso di una temperatura di incubazione di 42°C non è risultato efficace per il rilevamento della *Salmonella* sia nella carne macinata che nelle verdure. Infatti, la temperatura proposta dalla norma ISO 6579-1:2017/Amd 1:2020 (37 °C) ha consentito un recupero migliore e più rapido dell'agente patogeno. Per quanto riguarda la carne suina, i risultati sono in contrasto con quelli riportati da Fachmann et al (2017) che sono riusciti a recuperare *Salmonella* in campioni incubati a 41,5 °C. Tuttavia, nello studio di Fachmann et al (2017) sono stati utilizzati un livello di contaminazione artificiale più elevato e un BPW

preriscaldato. Nella mozzarella di bufala, il patogeno è stato rilevato nei campioni seminati con il livello più basso solo dopo 20 ore di incubazione, indipendentemente dai terreni utilizzati (BPW e BPWC) e dalla temperatura di incubazione dei terreni (37 e 42°C). Quando è stato utilizzato il livello di contaminazione più elevato, il ceppo è stato rilevato solo dopo 20 ore di incubazione nei campioni incubati in BPW a 37° e in quelli incubati in BPWC a 42°C. La *Salmonella* è stata rilevata rispettivamente alla 7a e 20a ora di incubazione nei campioni incubati in BPW a 42°C e alla 4a e 20a ora nel formaggio incubato in BPWC a 37°C (Tabella 7.3C). Anche se si tratta di ipotesi, poiché non sono state testate nella presente ricerca, le difficoltà nella rilevazione precoce della *Salmonella* potrebbero derivare dall'abbondante popolazione microbica presente nella mozzarella di bufala insieme al basso livello di contaminazione iniziale. Nell'ultima prova, il BPW è stato preriscaldato a 41,5 °C e la *Salmonella* è stata sempre rilevata nella carne macinata, nella mozzarella di bufala e nelle cozze a partire dalla 4a ora di incubazione, indipendentemente dalla carica batterica e dalla quantità di omogenato utilizzato per l'estrazione del DNA (1 ml e 20 ml). Nei campioni a foglia verde, il patogeno è stato sempre rilevato, tranne quando è stato utilizzato 1 ml per l'estrazione del DNA in

campioni seminati con il livello più basso alla 4a ora di incubazione  
(Tabella 7.4).

**Tabella 7.4.** Rilevamento di *Salmonella* da 1 ml e 20 ml di carne macinata (MM), verdure in foglia (LG), mozzarella di bufala (WBMC) e omogeneizzati di cozze (M) contaminati artificialmente con due livelli d'inoculo (LC, basso= 1–10 CFU/25g e HC, alto = (10–10<sup>2</sup> CFU/25g CFU/g) e incubati in acqua peptonata tamponata preriscaldata (41,5°C) utilizzando il metodo di estrazione Chelex100.

| Temperatura terreno | Livello d'inoculo | Temperatura d'incubazione | Ore d'incubazione | Estrazione DNA |    |      |    |       |    |      |    |
|---------------------|-------------------|---------------------------|-------------------|----------------|----|------|----|-------|----|------|----|
|                     |                   |                           |                   | 1 ml           |    |      |    | 20 ml |    |      |    |
|                     |                   |                           |                   | MM             | LG | WBMC | M  | MM    | LG | WBMC | M  |
| 41.5 °C             | LC                | 37°C                      | 4                 | D.             |    | D.   | D. | D.    | D. | D.   | D. |
|                     |                   |                           | 5                 | D.             | D. | D.   | D. | D.    | D. | D.   | D. |
|                     |                   |                           | 6                 | D.             | D. | D.   | D. | D.    | D. | D.   | D. |
|                     |                   |                           | 20                | D.             | D. | D.   | D. | D.    | D. | D.   | D. |
|                     | HC                |                           | 4                 | D.             | D. | D.   | D. | D.    | D. | D.   | D. |
|                     |                   |                           | 5                 | D.             | D. | D.   | D. | D.    | D. | D.   | D. |
|                     |                   |                           | 6                 | D.             | D. | D.   | D. | D.    | D. | D.   | D. |
|                     |                   |                           | 20                | D.             | D. | D.   | D. | D.    | D. | D.   | D. |

A noi risulta, che questo è il primo studio in cui lo stesso metodo rapido si è dimostrato efficace per campioni di carne, formaggio, verdure e cozze contaminati sperimentalmente. L'uso di un brodo preriscaldato ha avuto un effetto significativo sulla crescita della *Salmonella* che era rilevabile dopo alcune ore di incubazione. La maggior parte dei metodi proposti negli ultimi anni da diversi autori comportano un breve tempo di arricchimento della coltura (a seconda del tipo di campioni alimentari) ma procedure complesse di preparazione del campione che prolungano il tempo di rilevamento [3,16,17]. Nel presente studio, l'intero processo di rilevamento della *Salmonella* dai campioni alimentari non richiede più di sette ore poiché comporta una manipolazione minima dei campioni e non più di 4 ore di arricchimento della coltura. Inoltre, nei campioni alimentari è stata rilevata anche una piccola quantità di *Salmonella*. La capacità di questo metodo di rilevare un basso numero di cellule microbiche negli alimenti è molto importante considerando che solo un'unità formante colonie di *Salmonella* può causare un'infezione umana (M. Wang et al., 2021). Nel presente lavoro, la qPCR è stata utilizzata come strumento qualitativo per rilevare l'agente patogeno da campioni alimentari. Diversi autori nelle loro ricerche hanno proposto un protocollo che prevede l'utilizzo della PCR tradizionale (endpoint PCR) [11,19,20]. La qPCR, rispetto alla PCR endpoint, è più precisa, più rapida e più sicura in quanto non richiede elaborazioni post-PCR (es. preparazione di gel) e l'uso del bromuro di etidio (Peruzy et al., 2020).

## 7.4 CONCLUSIONI

In conclusione, nel presente lavoro, diverse strategie di pre-rilevamento come diversi brodi di pre-arricchimento, diversi metodi di estrazione del DNA e diversi volumi di pre-arricchimento sono stati combinati con un kit molecolare al fine di definire un approccio analitico rapido e robusto. Preriscaldando il BPW a 41,5°C per una notte, ed estraendo il DNA con il metodo Chelex 100, la *Salmonella* potrebbe essere rilevata in quattro ore. Il metodo rapido presentato potrebbe potenzialmente rilevare questo agente patogeno in meno di 7 ore. I vantaggi di questo metodo sono l'essere automatizzato e applicato contemporaneamente a un gran numero di campioni. I risultati di questo lavoro potrebbero essere utilizzati per implementare il controllo alimentare attraverso l'applicazione di una strategia analitica rapida, automatizzata e a basso costo. Inoltre, questo metodo potrebbe fornire un sistema innovativo per la valutazione tempestiva delle epidemie, garantendo la sicurezza alimentare e una diagnosi rapida in caso di emergenza.

## 7.5 BIBLIOGRAFIA

1. EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2023<sup>2</sup>. The European Union One Health 2022 Zoonoses Report. EFSA Journal. 2023;21:e8442. DOI: 10.2903/j.efsa.2023.8442
2. Leati, M.; Busani, L.; Zaccherini, A.; Ruocco, L.; Amato, S.D.; Villa, L.; Barco, L.; Ricci, A.; Cibir, V. The Challenging Task to Select *Salmonella* Target Serovars in Poultry : The Italian Point of View. 2021.

3. Liu, L.; Zhao, G.; Li, X.; Xu, Z.; Lei, H.; Shen, X. Development of Rapid and Easy De-tection of Salmonella in Food Matrics Using RPA-CRISPR/Cas12a Method. *LWT* 2022, 162, doi:10.1016/j.lwt.2022.113443.
4. Ferrari, R.G.; Rosario, D.K.A.; Cunha-Neto, A.; Mano, S.B.; Figueiredo, E.E.S.; Conte-Juniora, C.A. Worldwide Epidemiology of Salmonella Serovars in Animal-Based Foods: A Meta-Analysis. *Appl Environ Microbiol* 2019, 85, 1–21, doi:10.1128/AEM.00591-19.
5. Peruzzy, M.F.; Proroga, Y.T.R.; Capuano, F.; Mancusi, A.; Montone, A.M.I.; Cristiano, D.; Balestrieri, A.; Murru, N. Occurrence and Distribution of Salmonella Serovars in Car-casses and Foods in Southern Italy: Eleven-Year Monitoring (2011–2021). *Front Microbiol* 2022, 13, 1–10, doi:10.3389/fmicb.2022.1005035.
6. EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2022. The European Union One Health 2021 Zoonoses Report. *EFSA Journal* 2022;20(12):7666, 273 pp. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2022.76>.
7. Ehuwa, O.; Jaiswal, A.K.; Jaiswal, S. Salmonella, Food Safety and Food Handling Practices. *Foods* 2021, 10, doi:10.3390/foods10050907.

8. Wang, M.; Zhang, Y.; Tian, F.; Liu, X.; Du, S.; Ren, G.; Wang, J.; Zhang, D. Overview of Rapid Detection Methods for Salmonella in Foods: Progress and Challenges. 2021, doi:10.3390/foods101.
9. Heymans, R.; Vila, A.; van Heerwaarden, C.A.M.; Jansen, C.C.C.; Castelijns, G.A.A.; van der Voort, M.; Biesta-Peters, E.G. Rapid Detection and Differentiation of Salmonella Species, Salmonella Typhimurium and Salmonella Enteritidis by Multiplex Quantitative PCR. PLoS One 2018, 13, doi:10.1371/journal.pone.0206316.
10. Öz, Y.Y.; Sönmez, Ö.İ.; Karaman, S.; Öz, E.; Unal, C.B.; Karataş, A.Y. Rapid and Sensitive Detection of Salmonella Spp. in Raw Minced Meat Samples Using Droplet Digital PCR. European Food Research and Technology 2020, 246, 1895–1907, doi:10.1007/s00217-020-03531-x.
11. Machado, I.; Garrido, V.; Hernandez, L.I.; Botero, J.; Bastida, N.; San-Roman, B.; Gril-ló, M.J.; Hernandez, F.J. Rapid and Specific Detection of Salmonella Infections Using Chemically Modified Nucleic Acid Probes. Anal Chim Acta 2019, 1054, 157–166, doi:10.1016/j.aca.2018.12.027.
12. Dmitric, M.; Vidanovic, D.; Matovic, K.; Sekler, M.; Saric, L.; Arsic, M.; Karabasil, N. In-House Validation of Real-Time PCR Methods for Detecting the *INV A* and *TTR* Genes of Salmonella Spp. in Food. J Food Process Preserv 2018, 42, doi:10.1111/jfpp.13455.

13. Pacheco, J.I.M.; Anjos, K.B.A. dos; Silva, I.V.; Okar, R.G.; Rodrigues, S.M.B.D.; Franca-bandiera, A.I.; Rodriguez, M.C. Comparison of Two Affordable DNA Extraction Methods for Molecular Detection of Salmonella Isolates from Broiler Farm's Boot Swabs. *Research, Society and Development* 2023, 12, e28312139618, doi:10.33448/rsd-v12i1.39618.
14. Dimitrakopoulou, M.-E.; Stavrou, V.; Kotsalou, C.; Vantarakis, A. Boiling Extraction Method VS Commercial Kits for Bacterial DNA Isolation from Food Samples. *J Food Sci Nutr Res* 2020, 03, doi:10.26502/jfsnr.2642-11000057.
15. Daquigan, N.; Grim, C.J.; White, J.R.; Hanes, D.E.; Jarvis, K.G. Early Recovery of Salmonella from Food Using a 6-Hour Non-Selective Pre-Enrichment and Reformulation of Tetrathionate Broth. *Front Microbiol* 2016, 7, doi:10.3389/fmicb.2016.02103.
16. Du, M.; Li, J.; Liu, Q.; Wang, Y.; Chen, E.; Kang, F.; Tu, C. Rapid Detection of Trace Salmonella in Milk Using an Effective Pretreatment Combined with Droplet Digital Polymerase Chain Reaction. *Microbiol Res* 2021, 251, doi:10.1016/j.micres.2021.126838.
17. Wang, J.; Li, Y.; Chen, J.; Hua, D.; Deng, H.; Li, Y.; Liang, Z.; Huang, J. Rapid Detection of Food-Borne Salmonella Contamination Using IMBs-QPCR Method Based on PagC Gene. *Brazilian Journal of Microbiology* 2018, 49, 320–328, doi:10.1016/j.bjm.2017.09.001.

18. Shen, W.; Chen, H.; Geng, J.; Wu, R.A.; Wang, X.; Ding, T. Prevalence, Serovar Distribution, and Antibiotic Resistance of *Salmonella* Spp. Isolated from Pork in China: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Int J Food Microbiol* 2022, 361, 109473, doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109473.
19. Vinayaka, A.C.; Ngo, T.A.; Kant, K.; Engelsmann, P.; Dave, V.P.; Shahbazi, M.A.; Wolff, A.; Bang, D.D. Rapid Detection of *Salmonella* Enterica in Food Samples by a Novel Approach with Combination of Sample Concentration and Direct PCR. *Biosens Bioelectron* 2019, 129, 224–230, doi:10.1016/j.bios.2018.09.078.
20. Sahu, B.; Singh, S.D.; Behera, B.K.; Panda, S.K.; Das, A.; Parida, P.K. Rapid Detection of *Salmonella* Contamination in Seafoods Using Multiplex PCR. *Brazilian Journal of Microbiology* 2019, 50, 807–816, doi:10.1007/s42770-019-00072-8.

## **8. DISCUSSIONI GENERALI**

Con la globalizzazione e l'arrivo dei social network l'approccio al cibo è completamente cambiato. Oggi anche i più giovani sono molto più predisposti a provare ogni tipo di cucina. Questo rappresenta un ulteriore pericolo a quelli già esistenti, perché molto spesso non si è a conoscenza di quali possono essere i rischi che si possono celare, nel mangiare o manipolare un alimento. Il consumo di cibo è aumentato negli ultimi anni in maniera esponenziale e con esso anche il rischio di tossinfezioni. Attualmente i metodi che vengono impiegati per la ricerca dei patogeni negli alimenti, sono tutti metodi che richiedono un tempo di analisi minimo di 3 giorni, per campioni negativi, fino ad un massimo anche di 7-10 per i positivi. Sono tempi troppo lunghi che non consentono di gestire in maniera rapida, eventuali casi di tossinfezioni, allerte o problemi di contaminazioni all'interno delle filiere di produzione. Sulla base di quanto detto lo scopo di questa tesi è stato quello di sviluppare dei metodi rapidi per la ricerca di *Y. enterocolitica*; *Salmonella spp*; *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* e *V. cholerae*.

### **8.1 VALUTAZIONE DEI PROTOCOLLI DI ISOLAMENTO PER *YERSINIA ENTEROCOLITICA* NEI PRODOTTI A BASE DI CARNE DI MAIALE**

Per la ricerca di *Y. enterocolitica*, il presente lavoro si è concentrato sui limiti e sulle debolezze dei metodi convenzionali attualmente proposti. La SYBR Green PCR è stata utilizzata per la ricerca di *Yersinia* in diversi campioni di carne inoculati sperimentalmente con ceppi di biotipo 4/O:3 e 1A/O:5. Sono state

osservate differenze tra il comportamento di entrambi i biotipi; infatti, è stata sempre rilevata solo la *Y. enterocolitica* biotipo 1A non patogena, mentre la patogena (4/O:3) è stata rilevata solo nei campioni con i livelli d'inoculo a concentrazioni più alte. Tali risultati destano particolare preoccupazione, perché nel cibo l'agente patogeno solitamente si trova a basse concentrazioni ( Petsios et al., 2016 ). Probabilmente, l'ostacolo associato all'isolamento di *Y. enterocolitica* 4/O:3 potrebbe derivare dal basso numero di cellule patogene presenti nel campione, e dal gran numero di microrganismi competitivi cresciuti nel terreno selettivo (PSB ) ( Fredriksson-ahomaa e Korkeala, 2003 ). Molto probabilmente la *Y. enterocolitica* 4/O:3 è meno competitiva degli altri batteri presenti nel mezzo di arricchimento, questo comporta una crescita eccessivamente delle flora batterica mista, e pregiudica la sua rilevazione ( Bari et al., 2011). Inoltre, secondo i presenti risultati, la temperatura di incubazione (10 o 25 °C) influenza fortemente il giorno ottimale di rilevamento di *Y. enterocolitica*. Quando la temperatura di incubazione è fissata a 25 °C, secondo la ISO 10273:2017, il gene bersaglio potrebbe essere amplificato solo durante i primi tre giorni di incubazione, e solo se il livello di contaminazione è almeno di  $10^2 - 10^3$  CFU/g (MC). Ciò è coerente con i risultati di Van Damme et al. (2013). Secondo i quali già al secondo giorno è stato rilevato il patogeno con il metodo microbiologico, rispetto ad un'incubazione di cinque giorni. Al contrario, a 10 °C, e alla stessa concentrazione batterica ( $10^2 - 10^3$  CFU/g), la *Y. enterocolitica* ha mostrato un comportamento opposto: è stata rilevata soltanto al

quinto giorno di incubazione. Secondo i risultati attuali, con l'incubazione a 10 °C, la soglia di rilevamento non cambia, ma è necessario un tempo di incubazione più lungo, e questo rappresenta uno svantaggio. I risultati ottenuti dai campioni naturalmente contaminati, hanno confermato quanto ottenuto dai dati sperimentali, ossia il gene *ystA* utilizzato come target per la rilevazione di *Y. enterocolitica* 4/O:3 non è mai stato amplificato, mentre il gene *ystB*, utilizzato come target per il biotipo 1A, è stato rilevato frequentemente. I risultati del presente studio concordano pienamente con le ricerche precedentemente pubblicate ( Lucero-Estrada et al., 2020 ; Sirghani et al., 2018): dove il biotipo 1A , è il biotipo isolato e/o rilevato più frequentemente. Escludendo errori metodologici correlati alla SYBR Green PCR, un migliore isolamento/rilevamento del biotipo 1A potrebbe non essere necessariamente legato alla sua prevalenza nel campione, ma piuttosto ad una sua maggiore capacità di competere con la microflora presente nel brodo di arricchimento. Un ulteriore aspetto che è stato approfondito in questo lavoro di tesi, è la caratterizzazione della flora batterica competitiva isolata sull'agar CIN e PCA, mediante MALDI TOF MS . Non è stata notata alcuna differenza significativa ( $p > 0,05$ ) tra i due terreni, la famiglia delle *Yersiniaceae* sono state quelle maggiormente isolate sia su CIN che su PCA dopo l'arricchimento in PSB al 1° giorno di incubazione, ma già a partire dal 2° giorno la percentuale è diminuita notevolmente. I risultati di questa seconda serie di studi confermano ulteriormente la scarsa competitività dei membri della famiglia delle *Yersinaceae*, ed inoltre,

confermano che la durata dell'incubazione sembra essere un aspetto cruciale: il miglior recupero del genere *Yersinia* si ottiene con un arricchimento mai superiore alle 48 h, passato questo tempo la microflora batterica presente ha una crescita eccessiva nel brodo PSB, diminuendo così la capacità di rilevare il patogeno. Probabilmente, i terreni di arricchimento solitamente adottati, nonostante la presenza di sorbitolo e sali biliari nel PSB e di irgasan, ticarcillina e clorato di potassio nell'ITC, non sono sufficientemente selettivi, portando così alla crescita di batteri diversi da *Yersinia* nel campione.

Sulla base dei risultati, sono necessari ulteriori studi atti a valutare l'utilizzo di ulteriori agenti inibenti o altri elementi selettivi, che siano in grado di migliorare il recupero delle specie *Yersinia* nei terreni impiegati.

## **8.2 CONFRONTO TRA DIGITAL DROPLET PCR E REAL TIME PCR PER LA RICERCA DI *YERSINIA ENTEROCOLITICA* NELLE VERDURE**

Un altro studio molto interessante è stato quello di valutare per la prima volta il comportamento di *Y. enterocolitica* in verdure a foglia verde contaminate sperimentalmente, incubate alle condizioni di tempo e temperatura attualmente proposte, per ricercarla mediante l'applicazione di Real time PCR e Digital Droplet PCR (ddPCR), che fino ad ora non era ancora stata valutata. Sulla base dei risultati, il tasso di rilevamento di *Y. enterocolitica* nei campioni, cambia durante il periodo di incubazione, così come già dimostrato nel precedente

lavoro. In realtà, le condizioni attualmente proposte per questo patogeno (25 °C per 24 ore) consentono il tasso di rilevamento più elevato, ma la rtPCR ha dimostrato di sottostimare la reale prevalenza del patogeno nelle verdure. Tale problema può essere superato mediante l'adozione della ddPCR, che si è rivelata una strategia molto più affidabile per il rilevamento rapido dell'agente patogeno nei campioni alimentari. Tuttavia, come riportato in precedenza ( Peruzy et al., 2020a , Peruzy et al., 2020b ), problemi nel rilevamento di *Y. enterocolitica* possono derivare anche dalla presenza di una flora microbica competitiva. Sono quindi necessarie ulteriori ricerche per comprendere come queste popolazioni batteriche possono interferire con la crescita dell'agente patogeno.

### **8.3 RILEVAZIONE DEL PATOGENO *VIBRIO SPP.* NEGLI ALIMENTI: STRATEGIA DI SCREENING BASATA SULLA PCR PER INDIVIDUARE RAPIDAMENTE I PATOGENI *V. PARAHAEMOLYTICUS*, *V. CHOLERA*E E *V. VULNIFICUS* NEI MOLLUSCHI BIVALVI: RISULTATI PRELIMINARI**

Nell'ultimo anno, il consumo di prodotti a base di pesce crudo si è diffuso notevolmente tra i consumatori, e pertanto si prevede che il numero di infezioni da *Vibrio* aumenterà (Ma et al., 2023). Nel 2021, sono state segnalate all'Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA) tre epidemie di origine alimentare causate da *Vibrio parahaemolyticus* e una causata da *Vibrio cholerae* (non tossico). In particolare, l'epidemia di origine alimentare causata dal *Vibrio*

*cholerae* è stata la prima, da quando l'EFSA ha iniziato a raccogliere dati sulle epidemie di origine alimentare (EFSA, 2022). Ad oggi, i metodi di riferimento utilizzati per rilevare il *Vibrio* si basano principalmente su metodi microbiologici tradizionali, che prevedono l'uso di terreni selettivi, per il rilevamento dei patogeni, ma negli ultimi anni, per ridurre i tempi di analisi, sono stati introdotti nelle routine quotidiane di laboratorio, test basati sugli acidi nucleici per rilevare batteri patogeni in diversi alimenti. (ISO/TS 21872–1:2017). Tuttavia, il metodo incluso nella norma ISO/TS 21872–1:2017, che prevede l'uso di tre Real-time PCR simplex a diverse temperature di reazione, richiede molto tempo per il rilevamento. Nel presente studio è stata quindi sviluppata una piattaforma molecolare, basata su una Real-Time PCR multiplex, per determinare la presenza simultanea di diversi *Vibrio spp.* nei molluschi bivalvi. Questo sistema di PCR in tempo reale si è basato sul rilevamento dei geni *tdh* e *trh* in *V. parahaemolyticus*, *vvhA* in *V. vulnificus* e *rtxA* in *V. cholerae*. A noi risulta che, gli studi sui metodi basati su test multiplex Real-Time PCR mirati alla ricerca di *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* e *V. cholerae* sono vecchi e limitati. Nello studio di Garrido-Maestu et al., (2014), per il rilevamento simultaneo di *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* e *V. cholerae* sono stati utilizzati i geni *tlh*, *vvhA* e *ompW*. Kim e Lee (2014) hanno sviluppato un test Real-Time PCR Multiplex per il rilevamento di *V. anguillarum*, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* nei prodotti ittici. Pertanto, sebbene esistano diversi possibili bersagli per il rilevamento di *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* e *V. cholerae*., i geni specifici

utilizzati nel presente lavoro (*tdh* e *trh* in *V. parahaemolyticus*, *vvhA* in *V. vulnificus* e *rtxA* in *V. cholerae*) sono indicati nella norma ISO 21872–1:2017 come marcatori essenziali per identificare i ceppi patogeni all'interno di queste specie di *Vibrio*. Sulla base di ricerche bibliografiche effettuate, il presente lavoro è il primo a descrivere una Real-Time PCR multiplex per la rilevazione simultanea dei geni *tdh*, *trh*, *vvhA* e *rtxA*, in campioni di molluschi bivalvi. La Real Time PCR utilizzata nel presente lavoro potrebbe essere un'alternativa promettente alla PCR endpoint così come indicato dalla ISO, in quanto risulta molto più precisa, più rapida e sicura, poiché non richiede la preparazione di gel, e non è necessario il bromuro di etidio (Ahmed et al., 2009). A livello globale, le specie *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae* e *V. vulnificus* rappresentano i più importanti patogeni batterici associati al consumo di frutti di mare. Per questo motivo è essenziale sviluppare metodi rapidi e altamente specifici per il rilevamento di questi agenti patogeni. Nel presente lavoro la procedura sviluppata richiede complessiva circa 24 ore, compresa la fase microbiologia, questo ci permette di affermare che il metodo sviluppato è molto più veloce, semplice e meno costoso, rispetto ai metodi microbiologici e molecolari ad oggi impiegati. La Real-Time PCR multiplex sviluppata si è rivelata affidabile per *V. vulnificus* e *V. cholerae*. I risultati per *V. parahaemolyticus* sono promettenti ma sono necessarie ulteriori analisi. Il metodo proposto potrebbe rappresentare un valido strumento di monitoraggio rapido, inoltre espandendo l'ambito della ricerca, anche ad altre

categorie di alimenti, questo ci consentirebbe di applicare questo metodo per il controllo ufficiale degli alimenti.

## **8.4 UNA STRATEGIA ANALITICA RAPIDA PER RILEVARE LA *SALMONELLA* NEGLI ALIMENTI**

Per sviluppare un metodo rapido per la ricerca di *Salmonella*, nel presente lavoro, diverse strategie analitiche, come diversi brodi di pre-arricchimento, diversi metodi di estrazione del DNA e diversi volumi di pre-arricchimento, sono stati testati con un kit molecolare, al fine di definire un approccio analitico rapido e robusto. Preriscaldando il BPW a 41,5°C per una notte, ed estraendo il DNA con il metodo Chelex 100, la *Salmonella* potrebbe essere rilevata in quattro ore. Il metodo rapido presentato potrebbe potenzialmente rilevare questo agente patogeno in meno di 7 ore. I vantaggi di questo metodo sono l'essere automatizzato e applicato contemporaneamente a un gran numero di campioni. I risultati di questo lavoro potrebbero essere utilizzati per implementare il controllo degli alimenti attraverso l'applicazione di una strategia analitica rapida, automatizzata e a basso costo. Inoltre, questo metodo potrebbe fornire un sistema innovativo per la valutazione tempestiva delle epidemie, in quanto consentirebbe di fare una diagnosi rapida in caso di emergenze, garantendo così una maggiore sicurezza alimentare. Per questo motivo sono in corso ulteriori prove per applicare questo metodo sviluppato ai controlli ufficiali.

## **8.5 PROSPETTIVE FUTURE**

Sulla base dei risultati ottenuti durante questo lavoro, possiamo dire che i metodi sviluppati sono molto validi, e che potrebbero essere utilizzati in alternativa o a supporto di quelli normati, che al momento vengono applicati per analizzare i campioni del controllo ufficiale. Ulteriori studi sono sicuramente necessari, sia per rendere applicabili questi metodi a più matrici, sia per estendere questi protocolli anche ad altri patogeni trasmissibili con gli alimenti. L'esigenza di ridurre i tempi di analisi risulta, così come riferito anche dall'EFSA, un elemento fondamentale per garantire ai consumatori una maggiore tutela. Ridurre i tempi significa dare ai medici, nei casi di tossinfezione alimentare, un supporto sia nella fase di diagnosi che di terapia, aumentando così la probabilità di guarigione del paziente. Ridurre i tempi significa gestire in modo molto più rapido eventuali allerte alimentari, con una maggiore probabilità di bloccare le partite in commercio riducendo così la possibilità di diffusione di malattie. Per tutte queste ragioni, pertanto, è di fondamentale importanza continuare a sviluppare nuovi metodi e ricercare sempre nuovi patogeni emergenti.

## 8.6 BIBLIOGRAFIA

Ahmed A, Engelbert M F M, Boer K R, Ahmed N, Hartskeerl R A 2009. Development and validation of a Real-Time PCR for detection of pathogenic *Leptospira* species in clinical materials. PLoS One 4, 4–11. doi: 10.1371/journal.pone.0007093.

C. Lucero-Estrada, G.I. Favier, M.E. Escudero

An overview of *Yersinia enterocolitica* and related species in samples of different origin from San Luis, Argentina

Food Microbiol., 86 (2020), p. 103345, 10.1016/j.fm.2019.103345.

Garrido-Maestu A, Chapela M J, Peñaranda E, Vieites J M, Cabado A G 2014. In-house validation of novel multiplex Real-Time PCR gene combination for the simultaneous detection of the main human pathogenic vibrios (*Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and *Vibrio vulnificus*). Food Control 37, 371–379. doi: 10.1016/j.foodcont.2013.09.026.

J. Pathog. (2011), 10.4061/2011/420732

I. Van Damme, D. Berkvens, N. Botteldoorn, K. Dierick, J. Wits, B. Pochet, L. De Zutter

Evaluation of the ISO 10273: 2003 method for the isolation of human pathogenic *Yersinia enterocolitica* from pig carcasses and minced meat

Food Microbiol., 36 (2013), pp. 170-175, 10.1016/j.fm.2013.05.007

Kim J Y, Lee J L 2014. Multipurpose assessment for the quantification of *Vibrio* spp. and total bacteria in fish and seawater using multiplex Real-Time polymerase chain reaction. J. Sci. Food Agric. 94, 2807–2817. doi: 10.1002/jsfa.6699

L. Bari, M.A. Hossain, K. Isshiki, D. Ukuku

Behavior of *Yersinia enterocolitica* in Foods 2011

Peruzy et al., 2020a

M.F. Peruzy, M. Aponte, Y.T.R. Proroga, F. Capuano, D. Cristiano, E. Delibato, K. Houf, N. Murru

*Yersinia enterocolitica* detection in pork products: Evaluation of isolation protocols

Food Microbiol., 92 (2020), p. 103593

<https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103593>

Peruzy et al., 2020b

M.Francesca Peruzy, Y.T.R. Proroga, F. Capuano, F. Corrado, S. Santonicola, D. De Medici, E. Delibato, N. Murru

Detection and quantification of *Campylobacter* in foods: New analytic approaches to detect and quantify *campylobacter* spp. in food samples

Ital. J. Food Saf., 9 (2020), pp. 88-92

<https://doi.org/10.4081/ijfs.2020.8591>

M. Fredriksson-ahomaa, H. Korkeala

Low occurrence of pathogenic *Yersinia enterocolitica* in clinical

Food Environ. Samples Methodol. Prob., 16 (2003), pp. 220-229, 10.1128/CMR.16.2.220

Ma J Y, Zhu X K , Hu R G, Qi Z Z, Sun W C, Hao Z P, Cong W, Kang Y H 2023. A systematic review, meta-analysis and meta-regression of the global prevalence

of foodborne *Vibrio* spp. infection in fishes: A persistent public health concern. Mar. Pollut. Bull. 187, 114521. doi: 10.1016/j.marpolbul.2022.114521.

S. Petsios, M. Fredriksson-ahomaa, H. Sakkas, C. Papadopoulou

Conventional and molecular methods used in the detection and subtyping of *Yersinia enterocolitica* in food

Int. J. Food Microbiol., 237 (2016), pp. 55-72, 10.1016/j.ijfoodmicro.2016.08.015