

Caleidoscopio

Italiano



Giulia Volpe, Elisabetta Delibato,
Leucio Orefice, Giuseppe Palleschi

Tossinfezioni alimentari e metodiche recenti ed innovative per la ricerca dei batteri patogeni responsabili

Direttore Responsabile
Sergio Rassu

190

... il futuro ha il cuore antico  MEDICAL SYSTEMS SpA

Caleidoscopio

Italiano



**Giulia Volpe, Elisabetta Delibato¹,
Leucio Orefice¹, Giuseppe Palleschi**

Dip. Scienze e Tecnologie Chimiche - Università "Tor Vergata", Roma. ¹Istituto Superiore di Sanità, Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari, Roma

Tossinfezioni alimentari e metodiche recenti ed innovative per la ricerca dei batteri patogeni responsabili

**Direttore Responsabile
Sergio Rassu**

190

... il futuro ha il cuore antico  **MEDICAL SYSTEMS SpA**

ISTRUZIONI PER GLI AUTORI



INFORMAZIONI GENERALI. *Caleidoscopio* pubblica lavori di carattere monografico a scopo didattico su temi di Medicina. La rivista segue i requisiti consigliati dall'International Committee of Medical Journal Editors. Gli Autori vengono invitati dal Direttore Responsabile. La rivista pubblica anche monografie libere, proposte direttamente dagli Autori, redatte secondo le regole della Collana.

TESTO. La monografia deve essere articolata in paragrafi snelli, di rapida consultazione, completi e chiari. I contenuti riportati devono essere stati sufficientemente confermati. E' opportuno evitare di riportare proprie opinioni dando un quadro limitato delle problematiche. La lunghezza del testo può variare dalle 60 alle 70 cartelle dattiloscritte ovvero 100-130.000 caratteri (spazi inclusi). Si invita a dattilografare su una sola facciata del foglio formato A4 con margini di almeno 25 mm. Usare dovunque doppi spazi e numerare consecutivamente. Ogni sezione dovrebbe iniziare con una nuova pagina.

FRONTESPIZIO. Deve riportare il nome e cognome dell'Autore(i) -non più di cinque- il titolo del volume, conciso ma informativo, la Clinica o Istituto cui dovrebbe essere attribuito il lavoro, l'indirizzo, il nome e l'indirizzo dell'Autore (compreso telefono, fax ed indirizzo di E-mail) responsabile della corrispondenza.

BIBLIOGRAFIA. Deve essere scritta su fogli a parte secondo ordine alfabetico seguendo le abbreviazioni per le Riviste dell'Index Medicus e lo stile illustrato negli esempi:

1) Björklund B., Björklund V.: Proliferation marker concept with TPS as a model. A preliminary report. *J. Nucl. Med. Allied. Sci* 1990 Oct-Dec, VOL: 34 (4 Suppl), P: 203.

2 Jeffcoate S.L. e Hutchinson J.S.M. (Eds): *The Endocrine Hypothalamus*. London. Academic Press, 1978.

Le citazioni bibliografiche vanno individuate nel testo, nelle tabelle e nelle legende con numeri arabi tra parentesi.

TABELLE E FIGURE. Si consiglia una ricca documentazione iconografica (in bianco e nero eccetto casi particolare da concordare). Figure e tabelle devono essere numerate consecutivamente (secondo l'ordine di citazione nel testo) e separatamente; sul retro delle figure deve essere indicato l'orientamento, il nome dell'Autore ed il numero. Le figure realizzate professionalmente; è inaccettabile la riproduzione di caratteri scritti a mano libera. Lettere, numeri e simboli dovrebbero essere chiari ovunque e di dimensioni tali che, se ridotti, risultino ancora leggibili. Le fotografie devono essere stampe lucide, di buona qualità. Gli Autori sono responsabili di quanto riportato nel lavoro e dell'autorizzazione alla pubblicazione di figure o altro. Titoli e spiegazioni dettagliate appartengono alle legende, non alle figure stesse. Su fogli a parte devono essere riportate le legende per le figure e le tabelle.

UNITÀ DI MISURA. Per le unità di misura utilizzare il sistema metrico decimale o loro multipli e nei termini dell'International system of units (SI).

ABBREVIAZIONI. Utilizzare solo abbreviazioni standard. Il termine completo dovrebbe precedere nel testo la sua abbreviazione, a meno che non sia un'unità di misura standard.

PRESENTAZIONE DELLA MONOGRAFIA. Riporre il dattiloscritto, le fotografie, una copia del testo in formato .doc oppure .rtf, ed copia di grafici e figure in formato Tiff con una risoluzione di almeno 240 dpi, archiviati su CD in buste separate.

Il dattiloscritto originale, le figure, le tabelle, il dischetto, posti in busta di carta pesante, devono essere spediti al Direttore Responsabile con lettera di accompagnamento. L'autore dovrebbe conservare una copia a proprio uso. Dopo la valutazione espressa dal Direttore Responsabile, la decisione sulla eventuale accettazione del lavoro sarà tempestivamente comunicata all'Autore. Il Direttore responsabile deciderà sul tempo della pubblicazione e conserverà il diritto usuale di modificare lo stile del contributo; più importanti modifiche verranno eventualmente fatte in accordo con l'Autore. I manoscritti e le fotografie se non pubblicati non si restituiscono.

L'Autore riceverà le bozze di stampa per la correzione e sarà Sua cura restituirle al Direttore Responsabile entro cinque giorni, dopo averne fatto fotocopia. Le spese di stampa, ristampa e distribuzione sono a totale carico della Medical Systems che provvederà a spedire all'Autore cinquanta copie della monografia. Inoltre l'Autore avrà l'opportunità di presentare la monografia nella propria città o in altra sede nel corso di una serata speciale.

L'Autore della monografia cede tutti i pieni ed esclusivi diritti sulla Sua opera, così come previsti dagli artt. 12 e segg. capo III sez. I L. 22/4/1941 N. 633, alla Rivista *Caleidoscopio* rinunciando agli stessi diritti d'autore (ed acconsentendone il trasferimento ex art. 132 L. 633/41).

Tutta la corrispondenza deve essere indirizzata al seguente indirizzo:

Restless Architect of Human Possibilities sas
Via Pietro Nenni, 6
07100 Sassari

Caleidoscopio

Italiano

Editoriale

Ho letto questa monografia con vero piacere, curiosità e... in un batter d'occhio. Ritengo infatti che gli Autori abbiano scritto questo lavoro pensando proprio al lettore, a collega che si pone il problema della diagnosi di un quadro di tossinfezione alimentare e non sa in quale sequenza, secondo quale priorità, quali agenti ricercare e soprattutto come ricercarli. L'esperienza degli Autori nei Centri di Eccellenza e di controllo istituzionale la pone quale assoluto punto di riferimento sull'argomento per tutti coloro che vorranno rivedere le proprie conoscenze alla luce non solo delle attuali possibilità ma anche a quella del prossimo futuro di cui gli Autori sono anticipatori proprio per il ruolo di pionieri che hanno da sempre ricoperto.

La Dott.ssa Giulia Volpe ha conseguito la laurea in Scienze Biologiche presso l'Università degli Studi di Roma "La Sapienza". Ha ottenuto borse di studio presso il CNR, e presso l'Istituto Superiore di Sanità, è stata titolare di contratti ed assegni di ricerca, è attualmente dipendente dell'Università di Roma "Tor Vergata", Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche. Nei vari anni di studio e di lavoro ha acquisito notevole esperienza nel settore biosensoristico. Ha collaborato e collabora a progetti di ricerca riguardanti lo sviluppo di sensori enzimatici e di immunosistemi per la determinazione di sostanze di interesse ambientale, clinico e soprattutto alimentare. Particolare rilievo ha assunto lo studio degli immunosensori applicati alla determinazione dei batteri patogeni negli alimenti. Il lavoro è confluito nella realizzazione di numerose pubblicazioni scientifiche su prestigiose riviste nazionali e internazionali.

La Dott.ssa Elisabetta Delibato laureata in Scienze Biologiche presso l'Università degli Studi di Roma "La Sapienza", si è specializzata in Biochimica Clinica presso l'Università degli Studi di Roma "Tor Vergata". Contrattista per diversi anni presso l'Istituto Superiore di Sanità, dove è attualmente dipendente di ruolo nel Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari. Qui svolge attività istituzionale nell'ambito del controllo ufficiale (microbiologico) degli alimenti di origine animale

e delle bevande. Svolge attività ispettiva presso i laboratori periferici del SSN e partecipa a trials europei per la messa a punto di metodi alternativi per la determinazione di microrganismi patogeni negli alimenti. Svolge attività di ricerca riguardante lo sviluppo di metodiche molecolari, in particolare PCR e PCR-Real Time, inerenti alla ricerca di batteri e virus negli alimenti, come dimostrato dalle diverse pubblicazioni su riviste nazionali e internazionali.

Il Dott. Leucio Orefice, laureato in Medicina e Chirurgia, specializzato in Igiene e Medicina Preventiva, Primo ricercatore presso il Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari, dell'Istituto Superiore di Sanità, ha svolto fin dal 1980 mansioni afferenti principalmente all'Igiene e Microbiologia alimentare. All'attività pratica di laboratorio, sia a livello di ricerca applicata, che di espletamento di controlli istituzionali, si è affiancata l'attività didattica, di consulenza tecnica ed ispettiva.

Ha pubblicato numerosi lavori sperimentali, in gran parte su riviste internazionali. I temi di studio hanno riguardato, tra l'altro, gli enterobatteri patogeni, la determinazione di parametri microbiologici significativi in prodotti alimentari di o.a. in seguito all'applicazione di specifiche tecnologie produttive, l'autocontrollo e l'HACCP nella filiera produttiva, l'Analisi del Rischio applicata ai problemi microbiologici, i processi di stabilizzazione e l'applicazione delle atmosfere modificate, l'utilizzazione delle prove bioscologiche nelle emergenze alimentari; i criteri microbiologici di valutazione della salubrità degli alimenti.

Il Prof. Giuseppe Palleschi è Direttore del Dipartimento di Scienze e Tecnologie Chimiche dell'Università di Roma Tor Vergata dal 1995 ad oggi. Laurea Honoris Causa conferita dall'Università di Bucarest, Romania nell'anno 2000 L'attività del prof. Palleschi, ordinario di Chimica Analitica, è centrata sullo sviluppo di sensori chimici e biologici da più di 20 anni nel settore Medico, alimentare ed ambientale con più di 200 pubblicazioni, rassegne, capitoli su libri e riviste scientifiche internazionali sugli argomenti. Egli ha una notevole esperienza scientifica internazionale avendo lavorato per 3 anni negli USA, in Giappone ed in Inghilterra presso i maggiori centri di eccellenza nell'area dei sensori chimici e biosensori. E' stato invitato a congressi internazionali e presso molte Università e centri di ricerca come Oxford, Manchester, Newcastle, Cranfield, il Centro GBF in Germania e presso le Università di New Orleans e New York ed il Tokyo Institute of Technology. Il prof. Palleschi è coordinatore di 4 progetti europei, e partner di altri 3 progetti. Ha contratti di ricerca Nazionali in collaborazione con i maggiori Istituti di ricerca pubblica e con Industrie.

Sergio Rassu

Capitolo 1 - Tossinfezioni alimentari

Le tossinfezioni alimentari (TA) rappresentano, ancora oggi, un serio problema di sanità pubblica per la loro relativa frequenza (con elevata morbilità correlata) e per l'alto numero di soggetti che possono essere colpiti in un singolo evento epidemico. Esse comprendono manifestazioni patologiche fino a vere e proprie malattie, in genere a carattere gastroenterico acuto, alla cui origine vi è il consumo di cibi contaminati da microrganismi patogeni e/o loro metaboliti tossici.

In particolare, le tossinfezioni alimentari, da un punto di vista metodologico, possono essere classificate in:

- a) *infezioni*, quando l'agente eziologico che genera la sindrome o la malattia è rappresentato da batteri patogeni vitali ingeriti con gli alimenti contaminati in grado di riprodursi nei tessuti dell'ospite;
- b) *intossicazioni*, quando la patologia è causata da tossine, in genere preformate, elaborate negli alimenti dagli stessi microrganismi: in tal caso la presenza di microrganismi vitali all'atto dell'ingestione non è necessaria per il prodursi della manifestazione patologica.

Le due condizioni possono talvolta coesistere dando così luogo ad una vera e propria sindrome mista tossico-infettiva. D'altra parte, ad alcune specie microbiche patogene (es. *B. cereus*) appartengono simultaneamente ceppi prevalentemente infettivi o prevalentemente tossigeni.

Le tossinfezioni alimentari si manifestano in genere dopo un breve periodo d'incubazione (da 1-2 ore a qualche giorno) con tipiche manifestazioni a carico dell'apparato digerente quali nausea, vomito, diarrea (nel *botulismo* prevale la stipsi e, comunque, i sintomi più rilevanti sono di tipo neurologico; nella *listeriosi* i sintomi gastrointestinali sono in genere modesti e spesso passano inosservati oppure vengono interpretati come di origine influenzale); i casi si manifestano spesso in forma epidemica fra coloro che hanno consumato gli alimenti contaminati [1].

Va sottolineato che gli alimenti, contaminati da batteri patogeni responsabili di tossinfezioni alimentari, possono presentare alterazioni dei caratteri organolettici tali da consentire di sospettarne la pericolosità, tuttavia in diversi casi viene conservata l'apparenza di commestibilità [1].

Un significato preminente nella genesi delle tossinfezioni è rivestito dalle caratteristiche di patogenicità dell'agente eziologico introdotto con l'alimento, le quali si possono correlare alla D.I.M. (Dose Minima Infettante) oppure alla DL₅₀. La D.I.M. indica il numero più basso di germi capace di provocare il fenomeno tossinfettivo; la DL₅₀ indica, invece, il numero approssimativo di microrganismi in grado di provocare l'insorgenza della

tossinfezione in circa il 50% degli individui che hanno ingerito i microrganismi e/o le loro tossine [2].

Numerosi sono i fattori che possono causare la presenza di microrganismi patogeni in un alimento:

- a) la contaminazione microbica delle materie prime e degli ingredienti e/o additivi in genere;
- b) la contaminazione, anche crociata, che può avvenire durante i processi di lavorazione e preparazione con origine da svariate sorgenti, quali gli addetti e gli operatori in genere, le superfici di lavoro, gli utensili e le attrezzature, l'aria e le superfici dei locali;
- c) la contaminazione che può avvenire nelle fasi di confezionamento, di conservazione e distribuzione dell'alimento a partire dai contenitori e dagli imballaggi.

La presenza di microrganismi patogeni o loro tossine in un alimento può essere invece modulata, in senso accrescitivo o diminutivo, da:

- a) le caratteristiche intrinseche della matrice alimentare (pH, potenziale redox "rH", acqua libera "A_w", sostanze naturali ad attività antimicrobica, etc.)
- b) la presenza concomitante e le caratteristiche della flora microbica saprofitaria;
- c) i tempi, le temperature e l'ambiente di conservazione;
- d) le particolari tecniche di preparazione a livello di ristorazione collettiva e domestica, specie se condotte con scarse cautele igieniche.

La concomitanza di numerosi fattori che portano ad un rischio più o meno elevato per il consumatore e la difficoltà di poter prevedere (empiricamente o con analisi mirate) le condizioni di effettivo pericolo, ha portato in tempi recenti, grazie all'ausilio dei nuovi sistemi informatici, allo sviluppo di modelli matematico-statistici di microbiologia predittiva. Tali modelli sono in grado di stimare con buona attendibilità l'effetto combinato di numerosi parametri sullo sviluppo potenziale di microrganismi pericolosi o indesiderati, a partire da certe condizioni prefissate. Ciò unitamente ai *challenge test* industriali (test di simulazione di condizioni diverse, anche critiche, cui l'alimento può essere sottoposto, per verificare il relativo comportamento dei parametri chimico-microbiologici), alle informazioni sui consumi medi ed alle curve dose-risposta ottenute in sperimentazioni animali e con l'ausilio di volontari umani, sta consentendo, per diversi pericoli individuati, la valutazione quantitativa o semi-quantitativa del rischio a livello di popolazione esposta.

Aspetti parziali della valutazione del rischio, quali la quantità di alimento ingerito o le caratteristiche della matrice alimentare, rientrano tutte nella complessa analisi globale che va dalle materie prime al pasto pronto per il consumo.

Quando si esegue una valutazione del rischio si effettua, in primo luogo una *individuazione dei pericoli* (una lista positiva di quelli più frequenti e noti in una determinata filiera), poi si passa a quella che viene definita una *caratterizzazione dei pericoli* (una individuazione della loro gravità intrinseca), la quale unitamente alla *valutazione dell'esposizione* permette una stima del rischio connesso a ciascun pericolo.

In tal senso, i principali fattori implicati nella *caratterizzazione dei pericoli* legati all'agente patogeno sono:

- capacità e velocità di replicazione;
- infettività (attitudine a superare le difese dell'ospite);
- virulenza (attitudine a provocare danni);
- capacità di utilizzare scambi di materiale genetico (ad es. ai fini della antibiotico-resistenza);
- attitudine a permanere nell'ospite anche dopo la manifestazione della malattia e ad essere eliminato per lunghi periodi.

Altri fattori implicati nella *caratterizzazione dei pericoli* legati invece all'ospite sono:

- età, sesso ed altre caratteristiche fenotipiche;
- caratteristiche genotipiche (es. profilo HLA);
- stato nutrizionale ed abitudini alimentari;
- stato del sistema immunitario (anche della popolazione di appartenenza);
- precedenti esposizioni a fattori di rischio;
- malattie o traumi intercorrenti e/o pregressi;
- interventi chirurgici rilevanti;
- stato di gravidanza.

Fattori intrinseci legati alla matrice alimentare che coinvolgono la microecologia microbica e che possono modificare la potenziale patogenicità dell'agente o ridurne-incrementarne il numero, sono in parte già stati citati:

- contenuto in macro e micro-nutrienti;
- A_w ;
- pH ed rH;
- presenza, quantità e tipologia della microflora saprofitaria.

In termini meno schematici, è ovvio che un alimento non può essere considerato alla stregua di un vettore inerte di microrganismi in quanto è in grado di modulare l'attività e quindi l'azione patogena dei microrganismi stessi. I processi di antagonismo microbico, dovuti alla flora saprofitica caratteristica dell'alimento, quelli di inibizione, esercitata da sfavorevoli condizioni di pH, e quelli di antibiosi, dovuti a sostanze naturali, sono in grado di inibire alcuni germi patogeni pervenuti, riducendone la carica a livelli non più significativi sotto il profilo tossinfettivo o, addirittura, di causarne la completa eliminazione.

D'altra parte è pur noto che sono maggiormente recettivi alle *noxae* patogene i neonati e gli anziani, i malati cronici e in particolare gli immunocompromessi, come pure gli individui soggetti a stress o sottoposti a eccessivi carichi di lavoro [3].

Attuali strategie per la prevenzione delle tossinfezioni alimentari e dei rischi alimentari in genere

Il significato che l'alimentazione riveste nel portare a contatto agenti estranei potenzialmente nocivi con i tessuti dell'organismo può essere paragonabile a quello della respirazione in termini di importanza e continuità; pertanto sia l'igienicità e la salubrità del cibo che la qualità dell'aria sono elementi fondamentali per la tutela della salute.

Per garantire la sicurezza igienico-sanitaria degli alimenti, l'obbligo dell'implementazione di un sistema di autocontrollo da parte delle imprese, ha rappresentato un'innovazione importante nel settore alimentare italiano. La normativa europea 93/43/CEE recepita dal D.Lgs n.155/1997 ha stabilito che tutte le imprese coinvolte nella preparazione, trasformazione, fabbricazione, confezionamento, deposito, trasporto e vendita degli alimenti, debbano adottare una procedura di autocontrollo nell'ambito della propria attività. L'autocontrollo si realizza soprattutto in attività basate sui principi del sistema HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point), il quale a sua volta presuppone già attive *le buone pratiche igieniche* (GHP = Good Hygienic Practices) nell'ambito delle più generali *norme di buona fabbricazione* (GMP = Good Manufacturing Practices).

Il sistema HACCP viene adottato come elemento-cardine per ridurre in modo significativo o possibilmente eliminare i rischi microbiologici (e non solo) nell'intera filiera alimentare (dal produttore primario al consumatore finale), riducendo così la perdita e la distruzione dei prodotti danneggiati o pericolosi[4-5]. Si tratta quindi di un sistema rigoroso di contenimento del rischio basato su misure preventive, che non si affida all'analisi del prodotto finito (quest'ultima, eseguita periodicamente secondo i previsti *criteri microbiologici*, è ancora necessaria, ma solo per attuare la *verifica del sistema*).

Per l'attuazione di un efficace ed utile sistema di contenimento del rischio, bisogna poi tener conto, che per ogni pericolo è necessario individuare ed assicurare un *obiettivo di sicurezza alimentare* (FSO = Food Safety Objective) al termine della filiera produttiva. Tale obiettivo deve essere adeguato ad un prestabilito *appropriato livello di protezione per la popolazione* (ALOP = Appropriate Level Of Protection) definito dalle autorità governative. Un ALOP consiste in genere, in termini di rischio tollerabile, nel non superare un determinato numero di casi di malattia per anno in rapporto ad

una specifica combinazione tipologia alimentare-agente patogeno. Ogni FSO dovrebbe essere raggiunto frazionandone il conseguimento lungo le varie sezioni della catena alimentare e per ogni sezione dovrebbe essere raggiunto un adeguato *obiettivo di performance* (PO = Performance Objective) attraverso l'applicazione mirata delle misure di controllo (GHP, HACCP). Tutto ciò potrebbe significare concretamente che durante il processo produttivo il pericolo viene abbattuto di una prefissata quantità rispetto al supposto livello iniziale (ad esempio ad 1/100). L'autorità governativa dovrà vigilare sull'intera filiera, ben sapendo questa volta cosa andare a controllare nei vari segmenti, fatto che dovrebbe ulteriormente incrementare la fiducia nel sistema di vigilanza e in definitiva nella sicurezza degli alimenti.

Sia il sistema HACCP che i vari criteri ed obiettivi citati devono periodicamente adattarsi ai cambiamenti, quali sviluppi della progettazione, novità nelle procedure di lavorazione, mutamenti tecnologici, come pure alle possibili richieste di un più elevato standard sanitario per la popolazione.

Per garantire un'efficacia prevenzione delle tossinfezioni alimentari è necessaria, comunque, un'adeguata educazione sanitaria del consumatore e una maggiore attenzione per l'igiene a livello domestico, per ridurre al minimo i rischi microbiologici legati alle ultime fasi che precedono il consumo dei prodotti alimentari.

Aspetti epidemiologici generali delle TA

Le tossinfezioni alimentari sono un problema mondiale poiché sono diffuse anche nei paesi sviluppati che hanno standard igienico-sanitari abbastanza elevati. Nei Paesi industrializzati si stima che fino a circa il 30% della popolazione sia colpito ogni anno da un episodio tossinfettivo.

L'Organizzazione Mondiale della Sanità riporta che in anni recenti alcuni milioni di persone, in prevalenza bambini nei paesi in via di sviluppo, sono morti in seguito a malattie diarroiche. La maggior parte di questi decessi è correlabile ad infezioni acquisite con gli alimenti o con l'acqua. Le malattie diarroiche, se frequenti, comportano anche malnutrizione che, di per sé, costituisce un ulteriore fattore di rischio per altre gravi patologie [3].

Negli Stati Uniti, si ritiene che annualmente decine di milioni di persone siano colpite da tossinfezioni alimentari, con centinaia di migliaia di ospedalizzazioni e migliaia di decessi [6].

Altri dati americani riportati su MMWR (*Morbidity and Mortality Weekly Report*, www.cdc.gov/mmwr/index.html) indicano che nel trascorso decennio si sono registrati negli USA migliaia di episodi di tossinfezioni che hanno coinvolto oltre un centinaio di migliaia di persone.

A parte l'elevato numero di casi di malattia, le tossinfezioni alimentari

sono alla base di danni economici legati alle giornate lavorative perse dai pazienti affetti e alle ricadute commerciali dovute al blocco di prodotti o alla perdita d'immagine dei produttori e commercianti coinvolti.

Tra i recenti fattori di diffusione delle TA, occorre ricordare:

- a) l'industrializzazione dei processi di produzione, che pur avendo contribuito alla riduzione di tutti quegli episodi tossinfettivi dovuti alle produzioni artigianali o casalinghe, ha portato alla possibilità di più ampie contaminazioni di alimenti nei casi in cui le linee produttive risultino contaminate;
- b) l'incremento del consumo collettivo presso mense ed esercizi di ristorazione, con conseguente manipolazione da parte di un numero crescente di persone e con la possibilità di un ampio coinvolgimento di soggetti;
- c) l'incremento nella mobilità delle produzioni alimentari, dovuto anche agli scambi internazionali, con la necessità di lunghi periodi di conservazione ed una maggiore probabilità di interruzione della catena del freddo;
- d) l'incremento di specie microbiche emergenti, dovuto spesso all'effetto selettivo delle nuove tecnologie di produzione e conservazione.

L'incidenza globale nel nostro paese è difficile da stimare, anche perché gran parte degli episodi non viene segnalata, pur rientrando tra le patologie con obbligo di denuncia (D.M. 15 dicembre 1990). La tempestività della segnalazione dovrebbe consentire, alle autorità territorialmente competenti, di poter svolgere tutti gli accertamenti necessari ad evidenziare l'origine e la causa dell'eventuale focolaio epidemico.

Capitolo 2 - Batteri patogeni responsabili di tossinfezioni alimentari

Salmonella sp., *Escherichia coli* (varianti enteropatogene), *Campylobacter* sp., *Clostridium* sp., *Staphylococcus aureus*, sono tra gli agenti eziologici batterici maggiormente implicati nelle tossinfezioni alimentari ed a questi si aggiunge, per l'importanza delle eventuali sequele, *Listeria monocytogenes*. Anche numerosi altri agenti batterici (*B. cereus*, *Y. enterocolitica*, *V. parahaemolyticus*, ecc.) rivestono un ruolo nella genesi di episodi tossinfettivi, tuttavia, per la loro minore rilevanza, ne ometteremo in questa sede la descrizione.

Salmonelle

Attualmente si conoscono oltre 2400 sierotipi di *Salmonella*, ed il genere è distinto in due sole specie, *S. enterica* e *S. bongori*. La specie enterica è a sua volta suddivisa in sei sottospecie: subsp. *enterica*, subsp. *salamae*, subsp. *arizonae*, subsp. *diarizonae*, subsp. *houtenae*, subsp. *indica* [7]. In realtà solo i sierotipi appartenenti a *S. enterica* subsp. *enterica* (*S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Derby*, *S. London*, *S. Infantis*, *S. Give*, ecc.) sono in grado di colonizzare sia l'intestino dell'uomo che degli animali a sangue caldo causando infezioni prevalentemente localizzate nel tenue.

Le salmonelle resistono in parte al congelamento, all'insaccamento ed alla salatura, pertanto la contaminazione e la sopravvivenza negli alimenti può verificarsi durante tutto il processo produttivo; l'inquinamento può anche avvenire successivamente alla cottura per contaminazione crociata a partire da prodotti crudi. Le uova possono contaminarsi nell'ovidutto o, più frequentemente solo a livello del guscio dopo la deposizione, ad opera di materiale fecale.

Le Salmonelle sono sensibili all'azione dell'acidità gastrica, dalla quale vengono parzialmente protette dalla contemporanea ingestione di cibo. La flora microbica saprofitaria intestinale sembra possedere un certo effetto inibente sulla colonizzazione da parte delle salmonelle, probabilmente mediante diversi meccanismi, quali la competizione per i fattori nutritivi, la produzione di acidi grassi a catena corta che mantengono un pH acido e la produzione di particolari sostanze battericide.

Tuttavia, per alcuni sierotipi la malattia si manifesta anche in seguito all'ingestione di un numero limitato di cellule microbiche, le quali si moltiplicano rapidamente ed inducono la sintomatologia quando hanno raggiunto un livello dell'ordine di o superiore ad 1×10^6 cellule [8].

Oltre a provocare le classiche infezioni gastroenteriche alcune *Salmonelle* (*S. Typhi*, *S. Paratyphi*) sono in grado di penetrare attraverso la barriera epiteliale, moltiplicarsi nel tessuto linfonodale ed invadere il torrente circolatorio, causando un'infezione sistemica.

In Italia negli anni più recenti più del 60% dei sierotipi patogeni isolati dall'uomo, dagli animali domestici e dagli alimenti, è risultato costituito da *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*. A questi seguono altri sierotipi quali *S. Derby*, *S. Infantis*, *S. Hadar*. Ciò che risulta evidente è che i sierotipi prevalenti negli alimenti si ritrovano frequentemente negli animali domestici e nell'uomo. A tal proposito, nel biennio 2001-2002 il sierotipo più frequente è stato *S. Typhimurium* (46,8%), seguito da *S. Enteritidis* (26,6%), *S. Infantis* (5,0%), e *S. Derby* (2,0%). Nel periodo tra il 2000 e il 2002 la percentuale di casi umani da *S. Enteritidis* è gradatamente diminuita dal 40-50%, osservato costantemente negli anni '90, a circa il 20%. La maggior parte degli isolamenti in questo periodo ha riguardato il gruppo di età compreso tra 1 e 5 anni (40,7%), seguito dagli adulti tra 15 e 64 anni (31,0%). Il 34,5% degli isolamenti si riferisce a pazienti ospedalizzati. I pazienti, dai quali provengono gli isolamenti inviati al sistema di sorveglianza nazionale, hanno manifestato per la maggior parte un'infezione acuta (77,4%). [9].

I casi denunciati annualmente, sia in Italia che in Europa, non costituiscono che una piccola frazione del totale e sono dell'ordine di 10.000-80.000 casi rispettivamente. In base alle segnalazioni pervenute attraverso la rete telematica Enter-net, si è potuto stimare che in Europa nel 1998 il 59% dei casi di salmonellosi nell'uomo era riferibile a *S. Enteritidis* fagotipo PT4, il 42% a *S. Typhimurium* DT104, il 33% a *S. Hadar* PT2, il 14% a *S. Virchow* PT26 (Enter-net Quarterly Report Q1 1999).

Negli Stati Uniti, a fronte dei circa 40.000 casi di salmonellosi dichiarati annualmente, si stima che ci siano realmente circa un milione e quattrocentomila casi, con più di mille decessi.

Epidemie di tossinfezioni possono prodursi anche a grande distanza dal focolaio di origine. Nel 2003, ad esempio, in Olanda è stato registrato un notevole aumento delle infezioni prodotte da *S. enterica* sierotipo Java negli allevamenti di polli [10].

Localmente tale incremento non si è riflesso sui casi umani, mentre in Scozia nello stesso periodo sono stati segnalati numerosi isolamenti clinici con la medesima origine clonale [11].

Le salmonellosi sono ubiquitarie e presentano un picco di prevalenza nei mesi estivi. Le gastroenteriti, che rappresentano la manifestazione clinica più diffusa, fanno seguito ad un breve periodo di incubazione dopo l'ingestione di cibi o di acqua contaminati e sono caratterizzate essenzialmente da un'insorgenza acuta con dolori addominali, diarrea, nausea e vomito [12]. L'insorgenza delle gastroenteriti da *Salmonella* è più spesso la conseguenza

dell'ingestione di cibi di origine animale (prodotti carnei o a base di uova), contaminati più spesso da *S. Enteritidis* e *S. Typhimurium*.

Le salmonellosi hanno in genere un carattere epidemico, con frequente interessamento di piccole comunità. Molto pericolose sono le epidemie intraospedaliere che possono colpire soggetti a rischio (lattanti, gestanti, immunodepressi ecc.) e che spesso sono sostenute da ceppi poliantibiotico-resistenti.

Un ruolo importante nella trasmissione delle salmonellosi rivestono inoltre i portatori. I soggetti guariti continuano spesso ad eliminare le salmonelle con le feci per diversi mesi e sono stati descritti casi di eliminazione protratta fino a circa due anni.

Escherichia coli

Escherichia coli è un ospite normale dell'organismo umano in cui rappresenta la specie predominante della comunità batterica Gram-negativa aerobia-anaerobia facoltativa residente nell'intestino crasso. I diversi ceppi si possono distinguere sierologicamente sulla base dei tre principali antigeni di superficie (O, H, K).

Alcuni stipiti di *E. coli* sono gli agenti eziologici di enteriti, particolarmente gravi nei bambini nella prima infanzia, in conseguenza dell'ingestione di alimenti contaminati.

A seconda del meccanismo patogenetico alla base dell'azione enteropatogena, si distinguono diversi gruppi di *E. coli* patogeni di cui quelli di più frequente riscontro nella patologia umana sono i seguenti:

- *E. coli* enteropatogeni (EPEC);
- *E. coli* enteroinvasivi (EIEC);
- *E. coli* enterotossigeni (ETEC);
- *E. coli* enteroemorragici (EHEC).

L'azione patogena degli stipiti EPEC ed EIEC è essenzialmente legata al danneggiamento diretto o indiretto delle mucose intestinali. Nell'azione patogena degli stipiti ETEC ed EHEC invece, gioca un ruolo essenziale la produzione di tossine denominate rispettivamente enterotossine LT-ST e tossine *shiga-toxins* (Stx, dette anche verocitotossine) [12].

Il ceppo più spesso coinvolto nelle tossinfezioni alimentari è *E. coli* O:157 che appartiene al gruppo EHEC. *E. coli* O157:H7 è stato identificato nel 1976 e descritto per la prima volta come patogeno umano nel 1982 negli Stati Uniti [3] nonostante i metodi di sierotipizzazione usati fossero disponibili da molto tempo. La malattia più grave che provoca, la sindrome uremico-emolitica (da verocitotossina), era stata descritta fin dagli anni '50 in Svizzera. E' portatore di fagi in grado di dirigere la sintesi di molecole del gruppo delle shiga-

toxins, che si attivano in particolari condizioni, ad esempio in seguito all'esposizione a dosi subletali di alcuni antimicrobici. Oltre che nell'intestino degli animali contaminati (soprattutto bovini) il microrganismo tende facilmente a persistere nell'ambiente esterno, persino nell'ambiente idrico.

La patogenicità di *E. coli* O:157, che rappresenta il prototipo del gruppo degli EHEC, è dovuta ad un meccanismo multifattoriale non ancora completamente compreso. Tuttavia, almeno due fattori critici essenziali nella patogenesi delle manifestazioni cliniche sono stati ampiamente descritti:

- la capacità di aderire alle cellule della mucosa intestinale con un meccanismo caratteristico denominato "attachement and effacement" (A/E) che comporta l'adesione del batterio all'enterocita (fase A), mediante una proteina, codificata dal gene *eae*, e la conseguente distruzione dei microvilli (fase E); solo i ceppi che posseggono tali capacità sarebbero in grado di dar luogo alla diarrea emorragica;
- la produzione di potenti tossine denominate verocitotossine (VT) che agendo a livello del colon provocano crampi addominali, nausea, vomito e diarrea ematica. Le VT possono diffondersi nel circolo ematico legandosi, attraverso recettori glicolipidici, alle membrane cellulari di organi bersaglio, in particolare i reni (dando luogo alla Sindrome Uremico- Emolitica: SEU) e il sistema nervoso centrale (complicanze nervose).

A livello molecolare, il gene *stx1* codifica per la verocitotossina 1 (VT1), che differisce per un solo aminoacido dalla tossina di *Shigella dysenteriae*; il gene *stx2* codifica per la verocito-tossina 2, diversa dalla precedente e con una sequenza in parte variabile (tanto che si parla di un gruppo di tossine VT2). I geni *stx* sono portati da batteriofagi temperati integrati nel cromosoma batterico.

Negli anni 80 il problema delle infezioni da EHEC sembrava ristretto al Nord America e alla Gran Bretagna [13-14]. Quasi tutti gli episodi erano di origine alimentare e il veicolo implicato era rappresentato da hamburger o comunque carne bovina cotta in modo non adeguato. Per tale motivo l'infezione divenne nota al pubblico come "*hamburger disease*". Nel corso degli anni '90, le infezioni da *E. coli* O:157 sono emerse come grave problema di sanità pubblica anche nel resto del mondo industrializzato come Europa Continentale, Giappone, Australia; in Europa un quadro epidemiologico abbastanza simile a quello riportato negli USA è stato descritto in Gran Bretagna, dove l'incidenza delle infezioni da *E. coli* O:157 è elevata e ogni anno vengono segnalati numerosi episodi epidemici [15].

In Italia, il primo caso di infezione da *E. coli* O:157 è stato descritto nel 1988, quando è stato stabilito dall'Istituto Superiore di Sanità un sistema di sorveglianza nazionale della SEU in età pediatrica [16]. Tra il 1998 e il 1997 il sistema di sorveglianza ha identificato oltre 200 casi di questa sindrome con

un'incidenza media di 0,2-0,3 casi per 100000 residenti nella fascia di età 0-15 anni. Anche se questa incidenza è relativamente bassa rispetto a quella riportata in altri paesi dell'Europa centrale, la SEU anche nel nostro paese costituisce una delle principali cause di insufficienza renale acuta nell'infanzia. In Italia, infatti, *E. coli* O:157 è stato isolato da diverse matrici: carni bovine macinate, filtri del latte bovino, latte di massa bovino o ovino [16-17].

Attualmente l'Istituto Superiore di Sanità coordina un sistema di sorveglianza delle infezioni da *E. coli* O:157 e da altri EHEC e partecipa per l'Italia ad una rete Europea di laboratori di riferimento che ha come obiettivo la sorveglianza di queste infezioni a livello europeo. I dati sulle infezioni da EHEC in Italia dal 1988 in poi sono disponibili sul sito web dell'Istituto Superiore di Sanità (<http://www.iss.it/laboratori/leb/enternet>).

Listeria monocytogenes

Listeria monocytogenes deve la sua denominazione al fatto che le infezioni da essa provocate nell'uomo e negli animali sono caratterizzate dalla presenza di un elevato numero di monociti nel sangue circolante. Sebbene l'aumento dei monociti circolanti, nelle infezioni batteriche, sia abbastanza frequente, l'elevato numero di tali cellule prodotto in risposta all'infezione listeriosa è assolutamente peculiare [12].

Il batterio è stato descritto per la prima volta nel 1927 da Murray, che lo aveva isolato da giovani conigli deceduti per leucocitosi mononucleare. E' un piccolo bastoncino (1-5 mm di lunghezza), gram-positivo, emolitico, sprovvisto di capsula, asporigeno e mobile per la presenza di flagelli polari; è in grado di crescere tra 1°C e 45°C, in presenza di una concentrazione salina maggiore del 10% e con un optimum di temperatura compreso tra 30 °C e 37 °C. L'organismo si moltiplica facilmente in condizioni aerobiche o microaerofile, meglio a valori di pH elevati (fino a 9,6). La crescita però è assente o moderata in condizioni completamente anaerobiche e la moltiplicazione è inibita da valori di pH inferiori a 5,6 [3]. La *Listeria monocytogenes* è ampiamente distribuita nell'ambiente, dove può sopravvivere per lunghi periodi anche in condizioni non ottimali; in effetti, il microrganismo è abbastanza resistente a varie condizioni sfavorevoli quali il congelamento (la carica di *Listeria monocytogenes* si riduce di un solo logaritmo dopo 10 mesi di conservazione a -18°C, in varie matrici alimentari), lo scongelamento e l'essiccamento. L'ambiente naturale rappresenta quindi un "serbatoio" di contaminazione da cui il microrganismo può diffondersi alla catena alimentare. Soltanto dopo il 1980 la *Listeria monocytogenes* è stata riconosciuta come patogeno alimentare e la principale via di trasmissione è rappresentata proprio dal consumo di alimenti contaminati nel corso delle varie fasi di produzione e trasformazione.

La *Listeria monocytogenes* è stata isolata infatti da una grande varietà di alimenti crudi o sottoposti a trattamenti: latte crudo, prodotti lattiero-caseari, carni avicole, uova, prodotti carnei, prodotti di salumeria. Il microrganismo può sopravvivere e moltiplicarsi durante la conservazione degli alimenti; è in grado di moltiplicarsi alle basse temperature fino al limite di 1-1,5°C e può sopravvivere alle temperature di congelamento.

La listeriosi ha prevalentemente un andamento sporadico, ma sono stati segnalati in Europa episodi che hanno coinvolto un grande numero di persone. I dati relativi all'incidenza della malattia nel nostro paese sono piuttosto rari, è assai probabile però che la listeriosi sia sottostimata. In altri paesi, come il Regno Unito e la Francia, vi è un numero più rilevante di casi, da 300 a 1000 l'anno. Il Center for Disease Control (CDC) indica un grado di infezione annua tra 2 e 12 casi per milione di abitanti [3, 18-20]. La virulenza di *Listeria monocytogenes* è dovuta tra l'altro alla capacità di questo patogeno di penetrare e moltiplicarsi nelle cellule dell'ospite nel corso dell'infezione. I batteri si fissano ad un recettore della membrana cellulare per mezzo di una proteina parietale, l'internalina, che permette la fagocitosi dei batteri da parte delle cellule epiteliali (enterociti). I batteri internalizzati sono in grado di uscire dal fagosoma, lisando la membrana vacuolare per mezzo di un'esotossina proteica, la listeriolisina (o emolisina). Liberi nel citoplasma i batteri inducono rapidamente la polimerizzazione dell'actina, si replicano e spostandosi lungo le fibre di actina generano delle protrusioni che facilitano il passaggio diretto dei batteri nelle cellule adiacenti.

La listeriosi si presenta prevalentemente come evento sporadico ed è considerata una malattia contagiosa. Sia per gli animali che per gli uomini appartenenti alle categorie a rischio, il numero di patogeni in grado di provocare l'infezione può non essere molto elevato (in alcuni casi tra 100 e 1000 cellule/g di alimento).

Le forme cliniche da cui la *Listeria* viene isolata più frequentemente sono rappresentate da quelle che interessano il sistema nervoso (meningiti, meningoccefaliti), quelle che riguardano il sistema riproduttivo che causano aborti e mortalità neonatale, quelle che, più recentemente, si manifestano come sindrome gastroenterica febbrile a carico di individui sani. I sintomi di quest'ultima forma comprendono: febbre, dolori addominali, cefalea, astenia.

Campylobacter

La tassonomia del genere *Campylobacter* è stata ampiamente riveduta, soprattutto nel corso dell'ultimo decennio [21]. Attualmente la famiglia di appartenenza è quella delle Campylobacteriaceae (in precedenza Spirillaceae), che comprende tre generi distinti: *Campylobacter*, *Arcobacter*, *Helicobacter*.

L'etimologia dei nomi dei tre generi è riconducibile alla tipica morfologia che appare (non sempre) all'osservazione al microscopio ottico dopo colorazione di Gram: bastoncelli ricurvi con forma ad "esse" (singola/multipla) le specie appartenenti al genere *Campylobacter*; spirilli elicoidali le specie appartenenti al genere *Helicobacter*; batteri incurvati ad arco le specie appartenenti al genere *Arcobacter* [12].

I *Campylobacter* sono batteri non sporigeni, ossidasi positivi, estremamente mobili per la presenza di uno o due flagelli polari. Dotati di metabolismo respiratorio, non fermentano gli zuccheri e per moltiplicarsi necessitano di una ridotta tensione di ossigeno (5-10% di O₂) sono quindi microaerofili. *C. jejuni* e in minor misura *C. coli* sono le specie più spesso incontrate nei laboratori di microbiologia clinica come causa di enterocolite nell'uomo [22]. Queste specie, a differenza della maggior parte delle altre, presentano un optimum di temperatura piuttosto elevato: 42 °C.

Il principale serbatoio dei *Campylobacter* patogeni è rappresentato dal tratto alimentare di un'ampia varietà di animali selvatici e domestici a sangue caldo [23]. Vengono comunemente isolati nel pollame e in altri volatili, nei bovini e nei suini. *C. jejuni* e *C. coli* sembrano avere un serbatoio preferenziale: *C. jejuni* è associato prevalentemente al pollame [24], ma viene isolato anche da bovini, ovini, cani, gatti e volatili da cortile; *C. coli* viene isolato preferenzialmente nei suini [22, 25] ma si ritrova anche nel pollame, nei bovini e negli ovini.

Dal momento che *Campylobacter* è un comune componente della flora intestinale degli animali a sangue caldo, la carne viene facilmente contaminata durante la macellazione e l'eviscerazione.

La patogenesi dell'infezione da *Campylobacter* comprende fattori specifici del microrganismo e dell'ospite. Lo stato di salute dell'ospite, l'età e l'immunità umorale derivante da precedenti esposizioni, influenzano il risultato clinico dell'infezione. D'altra parte diversi fattori di virulenza del microrganismo (molecole che favoriscono l'adesione e l'invasione, proteine di membrana, flagelli e motilità, fattori citotossici, etc) contribuiscono alla patogenesi dell'infezione.

Nei paesi dove esiste una sorveglianza di laboratorio delle infezioni da *Campylobacter*, risulta frequente che il numero di isolamenti di questo microrganismo ecceda (anche notevolmente in alcune circostanze) quello degli isolamenti di *Salmonella*. In Francia, la prevalenza delle infezioni da *Campylobacter* risulta uguale a quella delle infezioni da *Salmonella*, mentre in Olanda la prevalenza risulta più elevata di quella delle salmonellosi. In Danimarca, le campilobatteriosi sono notevolmente aumentate negli ultimi anni e in Svizzera la loro prevalenza rimane elevata nonostante l'attuazione di efficaci programmi di sorveglianza sul serbatoio animale. In Italia non esiste, a tutt'oggi, un sistema di sorveglianza di laboratorio per le infezioni da

Campylobacter; tuttavia, i risultati di diversi studi effettuati ad “hoc” e di studi multicentrici [3, 26] evidenziano come anche nel nostro Paese le infezioni da *Campylobacter* giochino un ruolo primario nel vasto scenario delle infezioni intestinali.

Clostridium botulinum

Al *Cl. botulinum* venne attribuito questo nome perché la malattia da esso provocata è stata inizialmente associata al consumo di carni insaccate (dal latino *botulus* = salsiccia). E' un batterio Gram positivo di forma bastoncella-re, anaerobio, sporigeno, comunemente reperibile nell'ambiente.

Cl. botulinum, insieme ai pochi clostridi correlati (ceppi di *Cl. barati* e *Cl. butyricum*, agenti di casi di botulismo in USA, in Italia, in Cina e India) produce una categoria di potenti neurotossine di natura proteica (pochi nanogrammi sono sufficienti a provocare la malattia), generalmente termolabili.

Attualmente si conoscono 7 diversi ceppi di *Cl. botulinum* indicati con altrettante lettere dell'alfabeto (da A a G). Tutti hanno in comune la caratteristica di produrre le neurotossine specifiche, ma si differenziano tra loro per l'attività proteolitica, per la specificità nei confronti dell'ospite e per una certa distribuzione geografica: i ceppi A, B (con i sottotipi “proteolitico” e “non proteolitico”) ed E (più raramente F) sono responsabili del botulismo umano.

Le spore sono dotate di notevole resistenza all'invecchiamento e agli agenti fisici e chimici (calore, essiccamento, solventi organici ecc.). In genere sopravvivono a temperature di 100° C per diverse ore ed al riscaldamento a 120° C per diversi minuti. Considerata la loro diffusione ambientale, la relativa contaminazione degli alimenti è un evento non eccezionale. La presenza di spore è potenzialmente molto rischiosa nel caso in cui, nei prodotti alimentari in cui vengono a trovarsi, si presentino condizioni idonee al loro sviluppo. In condizioni favorevoli, infatti la spora botulinica si trasforma nella forma vegetativa in grado di produrre le tossine. I fattori che limitano la crescita dei clostridi produttori di tossina botulinica nei cibi sono il livello di ossigeno, la temperatura, il pH, l' A_w , la presenza di conservanti e la flora microbica competitiva.

Il botulismo alimentare è una patologia causata dall'ingestione di cibi contenenti tossine botuliniche. La sua incidenza è bassa (negli Stati Uniti come in Italia, vengono descritti qualche decina di nuovi casi ogni anno), ma la mortalità ad esso associata è molto alta. La maggior parte dei casi è legata all'ingestione di alimenti conservati con tecniche domestiche, anche se sono descritti casi legati all'uso di prodotti commerciali. I cibi epidemiologicamente più coinvolti sono rappresentati dalle carni conservate non cotte e dalle conserve vegetali impropriamente sterilizzate.

La patogenesi del botulismo è riconducibile all'azione delle neurotossine, attive in dosi infinitesimali: pochi miliardesimi di grammo di tossina pura sono letali (si tratta di uno dei veleni più potenti conosciuti in natura) [3, 27]. Si tratta di proteine ad elevato peso molecolare, scarsamente termostabili (vengono distrutte dall'ebollizione protratta per 10 minuti), che non vengono inattivate dagli enzimi proteolitici gastro-intestinali. L'attività neurotossica, evidente sul sistema nervoso periferico dell'uomo e di diverse specie animali, si esplica principalmente attraverso il blocco della trasmissione dell'impulso nervoso: a livello presinaptico viene infatti inibita la liberazione del neurotrasmettitore acetilcolina dalle vescicole sinaptiche.

Clinicamente il botulismo conclamato è quindi caratterizzato da una paralisi flaccida della muscolatura scheletrica, che inizia a livello dei muscoli oculomotori e si estende progressivamente portando, nel 60% dei casi, alla morte del paziente per paralisi dei muscoli respiratori o arresto cardiaco [3, 12].

Clostridium perfringens

È un bacillo Gram-positivo (1-1,5 x 3-5 μm) sporigeno (con spore di forma ovale e, in genere, in posizione subterminale), immobile; è anaerobio, ma si sviluppa anche in presenza di piccole quantità di ossigeno.

Sono stati identificati diversi sierotipi di *Clostridium perfringens* indicati con le prime lettere dell'alfabeto, ma soltanto gli stipti appartenenti al gruppo A sono patogeni per l'uomo (gangrena gassosa e intossicazioni alimentari), mentre gli altri rivestono importanza solo nel campo della patologia animale [12].

Perché compaia la tipica tossinfezione è necessaria l'ingestione con gli alimenti contaminati di un'elevata carica di microrganismi vitali (almeno 10^6 germi).

Un'enterotossina di natura proteica prodotta durante la sporulazione provocherebbe l'inibizione del metabolismo energetico, della sintesi macromolecolare e delle funzioni di membrana, con alterazioni morfologiche nelle cellule dell'epitelio intestinale e accumulo di liquido e di elettroliti nel lume intestinale. Essa quindi sarebbe la responsabile dei fenomeni diarroici, anche se l'effetto sarebbe potenziato dalla concomitante attività lecitinasica del germe.

In relazione alla capacità di resistenza alle temperature è stato evidenziato che i ceppi tossigeni presentano una minore tolleranza rispetto a quelli non tossigeni che mostrano, alla temperatura di 100 °C, una resistenza maggiore e variabile tra il 20 e il 100%.

Dal punto di vista epidemiologico, occorre ricordare che il *Cl. perfringens* è notevolmente diffuso, specialmente nel suolo, nelle acque superficiali e nel-

l'intestino dei mammiferi (canidi in particolare, suini). Le spore sopravvivono per lunghissimo tempo nell'ambiente esterno. Una volta pervenute negli alimenti, la loro germinazione viene favorita da insufficienti processi di cottura che creano condizioni ottimali per lo sviluppo (bassa tensione di ossigeno), e dai lunghi intervalli di tempo tra cottura e consumo che permettono il raggiungimento di cariche microbiche elevate, senza che si manifestino, in genere, variazioni sensibili dei caratteri organolettici.

Gli alimenti maggiormente implicati sono soprattutto i prodotti carnei, ma sono coinvolti anche i prodotti della pesca, il latte, i gelati, i prodotti di pasticceria.

Staphylococcus aureus

Il genere *Staphylococcus* comprende varie specie, tra le quali la più importante è *S. aureus*, che comprende la maggioranza degli stafilococchi patogeni per l'uomo. *S. aureus* (o piogene) è un microrganismo normalmente presente nella flora batterica della cute umana e nelle polveri degli ambienti antropizzati. E' oggetto di studi da diversi decenni nel tentativo di meglio comprendere i meccanismi che regolano la sua potenziale patogenicità. Il termine "coccus" indica la sfericità della cellula; *staphylococcus* si riferisce alla formazione di associazioni cellulari a grappolo; *aureus* indica invece la colorazione giallo-dorata che assumono le colonie che si sviluppano in alcuni terreni agarizzati. Positivo alla colorazione di Gram, immobile e asporigeno, anaerobio facoltativo, è un saprofito delle mucose e della cute di uomo ed animali. Elevate concentrazioni saline (NaCl > 7,5%) generalmente inibiscono lo sviluppo della maggior parte dei batteri, ma non dell'*S. aureus* (né delle altre Micrococcacee).

I fattori responsabili della patogenicità batterica [12] sono riportati nello schema seguente:

<i>Esotossine</i>	Citotossine (emolisine) α , β , γ , δ Leucocidina Tossina epidermolitica (alcuni stipiti) Enterotossine (in circa la metà degli stipiti) Tossina della shock-sindrome o TSST-1 (alcuni stipiti) Tossine pirogene (alcuni stipiti)
<i>Esoenzimi</i>	Coagulasi Stafilochinasi Ialuronidasi Proteasi

Enzimi lipolitici
DNAsi (termonucleasi, ecc.)

Comp. strutturali Capsula
Proteina A
Coagulasi legata
Catalasi e superossidodismutasi

La coagulasi e la termonucleasi sono enzimi che rivestono particolare interesse nell'esame di un alimento sospetto; la produzione di coagulasi, infatti, costituisce un indice significativo di patogenicità del germe, mentre la termonucleasi, così denominata per le sue caratteristiche di spiccata termoresistenza (20' a 120°C), è abbastanza correlata alla produzione di enterotossine. Queste ultime, peraltro, possono essere reperibili anche negli alimenti che, in seguito a trattamento termico, non presentano più cellule vitali di stafilococchi.

Le enterotossine stafilococciche sono proteine (p.m. circa $3,5 \times 10^4$ dalton) che vengono prodotte a $10 \div 45^\circ\text{C}$ e pH $5 \div 8$, con NaCl $0 \div 10\%$ e $A_{\text{W}} \geq 0,86$. Resistono ad un trattamento termico condotto a 100°C per 30 minuti e all'azione degli enzimi gastrointestinali, sono croioresistenti (possono resistere negli alimenti fino a 18 mesi), crioresistenti ed acido-resistenti [28]. Ne sono stati identificati una decina di tipi, (A, B, C₁, C₂, C₃, D, E..) diversificati tra loro sotto il profilo antigenico. Affinché si abbia manifestazione clinica è necessario ingerire da 100-200 ng a di $1 \mu\text{g}$ enterotossine e affinché tale quantità si accumuli nell'alimento contaminato da *S. aureus*, è necessario che il germe raggiunga un livello pari a 5×10^5 - 1×10^6 cellule per grammo di alimento (secondo alcuni autori, in casi particolari sono sufficienti 5×10^4 cellule/g).

I sintomi sono rappresentati principalmente da nausea, vomito e talvolta diarrea, che insorgono da 1 a 6 ore dopo l'ingestione di cibo contaminato.

Le preparazioni alimentari più comunemente implicate, sono quelle elaborate, manipolate, ad elevato contenuto proteico, poco acide e impropriamente refrigerate dopo la cottura: carni (es.: arrostiti, polpettoni), prodotti a base di carne, pesci anche affumicati, ovoprodotti (maionese, ecc.), paste farcite, prodotti di pasticceria (specie se ripieni di crema). Ricordiamo anche i prodotti lattiero caseari ottenuti con latte crudo o ricontaminati dopo il trattamento termico (ricotta, ecc.). Essendo poi lo stafilococco resistente ad alte concentrazioni di cloruro di sodio, anche i prodotti sottoposti a salagione (prosciutto ed altri salumi, baccalà ed altri pesci salati, ecc.) possono essere fonte di tossinfezione. Tra le carni, quelle macinate presentano il maggior rischio a causa delle numerose manipolazioni cui sono sottoposte e della maggiore superficie di esposizione. La contaminazione dei cibi può avvenire prima o dopo la cottura; il periodo più critico, talvolta molto lungo, è comun-

que quello che intercorre tra la cottura ed il momento del consumo. In questo intervallo di tempo, se l'alimento viene lasciato a temperatura ambiente (20-40°C) ed esposto all'aria, si creano possibilità di contaminazione e di sviluppo, con eventuale produzione di tossina. L'assenza o la scarsità di microflora competitiva facilitano tra l'altro la moltiplicazione dello stafilococco.

L'intossicazione stafilococcica è una patologia che si verifica soprattutto nei paesi sviluppati la cui popolazione si nutre sovente di alimenti complessi e manipolati. L'uomo è il principale responsabile della contaminazione degli alimenti, in particolare di quelli che subiscono manipolazioni durante le fasi di produzione, commercializzazione e somministrazione.

In Europa, dal 1988 al 1992, *S. aureus* si è reso responsabile di poco più del 5% di tutti gli episodi epidemici riportati alle autorità sanitarie. In una recente indagine (2004) volta a valutare la presenza di stafilococchi potenzialmente enterotossici in alimenti commercializzati in Italia, è emersa la loro larga diffusione (tra i campioni esaminati, il latte crudo, la ricotta, il prosciutto, la carne macinata e le preparazioni a base di carne, erano contaminati in percentuali che andavano dal 10% al 50% circa).

I casi risultano comunque fortemente sottostimati, in quanto trattandosi di una patologia generalmente lieve, di norma il paziente colpito non fa ricorso alle prestazioni mediche, per cui l'episodio rimane ignorato.

Negli anni più recenti ha destato preoccupazione il diffondersi di ceppi meticillino-resistenti (MRSA), importanti perché non solo resistenti a tutti i beta-lattamici ma, spesso, anche a vari altri importanti antibiotici. Il pericolo viene dal fatto che i ceppi di MRSA possiedono un potenziale epidemico e si affiancano alle preesistenti infezioni ospedaliere da ceppi ordinari invece di limitarsi a sostituirle. Nei Paesi Bassi la politica adottata a livello nazionale per prevenire la diffusione di *S. aureus* meticillino-resistente ha comunque mostrato che è possibile eliminarli dagli ospedali e far in modo che non diventino endemici. E' opportuna tuttavia una politica comune a livello europeo per far fronte a questo problema.

Per *S. aureus* [29], sono previsti della direttiva 94/65/CE, limiti specifici nelle carni macinate e nelle preparazioni di carni.

Capitolo 3 - Metodiche rapide e innovative

Come in parte già descritto nel capitolo precedente, i patogeni alimentari implicati in contaminazioni dirette e indirette degli alimenti risultano essere principalmente *Salmonella*, *Clostridium* (*C. perfringens*; *C. botulinum*), *Campylobacter*, *Staphylococcus* (*S. aureus*), *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*. Le contaminazioni possono verificarsi in ogni fase della produzione, dalle materie prime alla trasformazione, conservazione, preparazione fino al consumo degli alimenti. L'ingestione di tali patogeni o delle loro tossine contenute nei cibi è in grado di provocare stati morbosi ad andamento generalmente acuto meglio conosciuti come *tossinfezioni alimentari*. Nonostante l'applicazione di nuove misure di controllo dei rischi microbiologici nell'ambito della filiera produttiva più capillari, quali l'HACCP, l'incidenza delle tossinfezioni alimentari causate da microorganismi patogeni tende a permanere elevata.

L'ampio impiego di nuovi metodi di rintraccio rapido delle fonti di infezione nello studio degli eventi epidemici ed il miglioramento continuo delle tecniche diagnostiche, hanno contribuito in tempi recenti a far meglio conoscere e comprendere il problema.

Il miglioramento delle tecniche diagnostiche ha permesso di evidenziare agenti che pur in circolazione erano ignorati. Inoltre, microorganismi con nuove caratteristiche, emerse anche in seguito ad un processo di adattamento alle nuove condizioni trasformativo-produttive e di distribuzione degli alimenti, hanno fatto la loro comparsa sulla scena.

Da ciò l'importanza di ricorrere a metodiche analitiche affidabili in grado di dare, nei tempi più brevi possibili, informazioni sull'origine e la diffusione dei microorganismi e sulla contaminazione dei prodotti.

Considerate le implicazioni che possono avere i risultati degli accertamenti analitici, è comprensibile che nell'applicazione di una *norma* sia necessario far ricorso a metodi che offrano particolari garanzie per quanto riguarda l'affidabilità dei risultati conseguibili.

Classificazione ed impiego dei metodi analitici microbiologici

I metodi che offrono sufficienti garanzie per entrare a far parte di un criterio microbiologico, convenzionalmente definiti *metodi standard*, devono essere stati sottoposti ad una serie di particolari verifiche (cosiddette *procedure di validazione*) che ne comprovino l'affidabilità e quindi l'applicabilità su larga scala nelle condizioni previste.

Fanno parte dei *metodi standard* quelli che vengono riportati esplicitamente nei criteri microbiologici emanati dagli Stati (o da comunità di Stati, ad es. CE) o da organizzazioni sovranazionali che rappresentano gli Stati membri (es. OMS, Codex Alimentarius), ma anche tutti gli altri metodi riportati nelle gazzette ufficiali (*metodi ufficiali*) e quindi di applicazione obbligatoria nell'ambito territoriale specifico, ogni qualvolta si presentino le circostanze previste dalla normativa stessa. Tutti questi metodi possono essere definiti come *metodi normati* [30-31].

Fanno parte ancora dei *metodi standard* i metodi emanati da Enti di Normazione (es. ISO = International Organization for Standardization, FIL/IDF = International Dairy Federation ecc.) o da Organismi internazionali o nazionali di riconosciuta rilevanza nel settore (es. AOAC = Association of Official Agricultural Chemists, FDA = Food and Drugs Administration, ecc.).

In particolari situazioni possono sorgere esigenze locali che prevedono ricerche non comuni (esami su produzioni specifiche, ecc.) o possono verificarsi eventi di natura più o meno contingente che richiedono la necessità di una risposta analitica nei tempi più brevi possibili (emergenze sanitarie, analisi di prodotti dal ciclo commerciale molto breve). Ciò può richiedere l'utilizzo di metodiche mirate o di metodiche particolarmente rapide.

In questi casi, in mancanza di *metodi standard* adatti allo scopo, si può ricorrere ad altri metodi basati sulla *letteratura scientifica* disponibile o a metodi *interni* o infine a *metodi commerciali* purché rispondenti a requisiti minimi di affidabilità e quindi che siano stati almeno sottoposti a validazione interna.

I metodi microbiologici, nel loro insieme, possono essere classificati come metodi di *screening* e metodi di *conferma*. I primi si basano sulla capacità di fornire indicazioni presuntive sulla presenza / assenza di un microrganismo e/o tossina; i secondi, invece, conducono ad un'inequivocabile identificazione del microrganismo. A volte lo stesso metodo, se applicato fino ad un determinato stadio, funge come metodo di *screening*, mentre se condotto sino allo stadio finale vale come metodo di *conferma*.

È importante nella selezione dei metodi, considerare l'orientamento attuale verso metodi orizzontali, cioè metodi nel cui campo di applicazione rientri il maggior numero possibile di matrici alimentari.

Parametri fondamentali concernenti l'affidabilità di un metodo

Per verificare l'affidabilità di un metodo è necessario sottoporlo ad una procedura di validazione durante la quale vengono individuate le caratteristiche del metodo stesso (precisione, accuratezza, sensibilità, specificità, limi-

te minimo di rilevabilità, limite minimo di quantificazione), le sue limitazioni (praticabilità ed applicabilità), le possibili condizioni modificative (robustezza) [30, 32].

Un metodo può essere validato mediante l'analisi di materiali di riferimento certificati o confrontandolo con altri metodi normati, anche mediante saggi interlaboratorio.

Precisione

La precisione di un metodo è il grado di concordanza tra i risultati ottenuti analizzando con uno stesso metodo, in numerose prove indipendenti sotto condizioni definite, uno stesso materiale da saggio. Tale termine comprende i concetti di *ripetibilità* (concordanza tra i risultati ottenuti in diverse prove da uno stesso operatore, nell'ambito dello stesso laboratorio, utilizzando lo stesso metodo, lo stesso materiale da saggio, le stesse apparecchiature, in un breve intervallo di tempo) e *riproducibilità* (concordanza tra i risultati ottenuti in diverse prove effettuate da operatori diversi, in laboratori diversi, utilizzando lo stesso metodo, lo stesso materiale da saggio ed in un più ampio intervallo di tempo).

Accuratezza

L'accuratezza di un metodo è definita come il grado di concordanza fra il valore medio di una serie sufficientemente ampia di misure ed il valore vero o di riferimento (dedotto con sistemi diversi ma di provata affidabilità) e viene espressa come percentuale del valore vero. In microbiologia la preventiva determinazione del valore vero presenta difficoltà non trascurabili dovute alla continua modificazione della vitalità dei microrganismi e alla dinamica di trasformazione delle biomolecole.

Sensibilità

Stima della capacità di un metodo a discriminare tra piccole differenze nel contenuto dell'analita o microrganismo bersaglio. Aumenta con il diminuire dei falsi negativi.

Specificità

Stima della capacità di un metodo di individuare selettivamente un determinato analita o microrganismo bersaglio. Tale parametro aumenta al diminuire dei falsi positivi.

Limite di rilevabilità

Il contenuto più basso di un analita o di un microrganismo rilevabile in modo statisticamente significativo.

Limite di quantificazione

E' il più basso livello di analita che può essere determinato in concomitanza con caratteristiche soddisfacenti di accuratezza e precisione.

Robustezza

È la misura della capacità di un metodo di rimanere valido in seguito a piccole variazioni delle condizioni operative.

Praticabilità ed applicabilità

I metodi devono essere fattibili, quindi devono utilizzare reagenti e attrezzature commercialmente disponibili, oltre che ad un costo accessibile.

Metodiche applicabili alla determinazione dei patogeni alimentari

La contaminazione da parte di microrganismi patogeni negli ambienti di produzione alimentare può provocare ritardi antieconomici nei tempi di lavorazione e distribuzione, se non addirittura il completo blocco della produzione o ancora il ritiro di lotti già avviati al commercio.

Le metodiche tradizionali sono abbastanza affidabili, ma spesso richiedono diversi giorni per l'identificazione presuntiva e la caratterizzazione delle specie batteriche; infatti, esse prevedono la crescita in diversi terreni colturali, vari test biochimici di conferma e prove sierologiche per distinguere i diversi ceppi di una stessa specie.

Per tale motivo è generalmente sentita la necessità di disporre di metodiche rapide che possano condurre alla risposta nel tempo più breve possibile. Così, inizialmente, si è dato gradualmente spazio a metodiche "rapide" basate sugli stessi procedimenti dei metodi colturali classici, ma "miniaturizzate". Tali metodiche, però, non riuscivano a soddisfare tutte le aspettative. Così, agli inizi degli anni '80 sono stati sviluppati diversi metodi immunologici e tecniche molecolari per l'analisi del DNA, in seguito applicati anche alle analisi microbiologiche di routine [33-34].

I metodi colturali classici

Tali metodi hanno l'obiettivo di isolare e/o numerare, mediante l'impiego di terreni colturali, esclusivamente i microrganismi presenti nei campioni da sottoporre ad analisi senza contaminare l'ambiente o gli stessi operatori. Si rende così indispensabile l'adozione di alcune precauzioni, tra cui l'osservanza di accurate condizioni di asepsi nelle fasi di prelievo, trasporto ed analisi, nonché l'adozione di adeguate norme di igiene personale degli operatori addetti.

Le metodiche classiche si articolano in genere in una serie di fasi successive che, quando tutte presenti, sono essenzialmente il *prearricchimento*, l'*arricchimento selettivo*, l'*isolamento*, l'*identificazione* (presuntiva) e la *conferma*. L'esecuzione di queste fasi comporta in alcuni casi tempi di analisi relativamente lunghi (4-5 e più giorni).

Le fasi di *prearricchimento-arricchimento*, realizzate in mezzo colturale liquido, vengono previste quando si suppone che i germi presenti nel campione siano stressati ed in presenza di abbondante flora saprofitaria. In genere il primo arricchimento (o prearricchimento) è, ove possibile, non selettivo ed essenzialmente rivolto ad innalzare il numero dei microrganismi. Il secondo arricchimento, pur non essendo efficiente come il primo, serve soprattutto a limitare lo sviluppo della flora accessoria e concorrente rispetto a quello dei microrganismi-bersaglio, i quali dovrebbero avere qualche vantaggio nello svilupparsi in quelle condizioni. L'isolamento, effettuato utilizzando terreni selettivi agarizzati, permette talvolta l'identificazione presuntiva delle colonie del microrganismo in esame. Dopo questa fase, un'aliquota significativa delle colonie sospette deve essere sottoposta, ai test biochimico-morfologico-sierologici di *conferma*.

Le metodiche rapide

Questi metodi presentano il vantaggio di poter fornire in genere i risultati nell'arco di 1-2 giorni quindi, nell'ambito di un sistema di autocontrollo, consentono di prendere decisioni tempestive riguardanti il rilascio di lotti di prodotto o la possibilità del loro ritiro dal commercio, contribuendo così all'aumento della sicurezza e della fiducia del consumatore.

Qui citiamo le metodiche molecolari che hanno come bersaglio specifiche sequenze geniche del DNA batterico e che impiegano la *Polymerase Chain Reaction* (PCR), ed i metodi immunologici, in particolare i saggi ELISA, che hanno come bersaglio determinati antigeni (in genere di superficie) e che impiegano anticorpi specifici supportati da vari sistemi di reazione e rivelazione. La maggior parte delle metodiche rapide fornisce una risposta qualitativa, ma non mancano sistemi che forniscono una risposta semiquantitativa o quantitativa.

Molte metodiche rapide per aumentare la consistenza del bersaglio e quindi la sensibilità, hanno in comune una fase "classica" di *prearricchimento* per quanto ridotta [35-36].

Gran parte di queste metodiche deve ancora essere sottoposta a validazione da parte degli enti preposti. In attesa e ove possibile, i risultati dovrebbero essere confermati dai metodi *standard*.

Amplificazione del DNA batterico (PCR)

La tecnica della PCR (*Reazione a Catena della Polimerasi*, Kary Mullis, 1983) è un sistema di amplificazione enzimatica di uno specifico segmento di DNA ad opera della Taq-polimerasi (DNA-polimerasi termostabile inizialmente isolata dal batterio *thermus aquaticus*) secondo la relazione esponenziale $y=2^n$ (con n = numero di cicli di amplificazione ed y = resa della reazione).

L'amplificazione ciclica avviene in un apparecchio adatto allo scopo (Thermal Cycler) ed è resa possibile in quanto i prodotti dell'estensione dei primer (inneschi) sintetizzati nel ciclo n fungono da ulteriore stampo per il ciclo $n+1$. La PCR richiede la conoscenza delle sequenze che delimitano la regione da amplificare (*target*). Il DNA contenente la sequenza target viene denaturato ad alta temperatura (95°C) e quindi viene fatto ibridare con i primers presenti in eccesso nella miscela di reazione; questa fase (di *annealing*) richiede una temperatura inferiore (60°C). Successivamente viene effettuata, con la *Taq Polimerasi*, l'estensione delle due catene a partire dalle terminazioni 3'-OH dei primers, ad una temperatura di (72°C). Si compie un ulteriore ciclo di denaturazione termica, ibridazione ed estensione degli inneschi. Questo ciclo (Fig. 1 e Fig. 2) viene ripetuto per 30 o più volte. La reazione viene completata con un tempo di estensione finale, che dura alcuni minuti, con lo scopo di ottenere prodotti il più possibile completi e consentire quindi una polimerizzazione di tutte le molecole iniziate. Quindi si procede all'arresto della reazione mediante raffreddamento a 4°C.

Dopo circa 30 cicli sono presenti circa 1 miliardo di copie (2^{n-1}) [3, 37-38].

Prima di procedere all'amplificazione è necessario effettuare una fase di estrazione dell'acido nucleico dai microrganismi oggetto della ricerca. Per tale estrazione si può effettuare un trattamento termico [3] ad elevate temperature (es. *bollitura*), Fig. 3, o utilizzare il sistema *Nucleospin*, o ancora la *lisi alcalina* [39]. Altre soluzioni sono l'uso combinato di detergenti (SDS) e di proteinasi K, oppure l'impiego di fenolo-cloroformio. Successivamente, pochi microlitri dell'estratto di ciascun campione vengono trasferiti in una provetta contenente una miscela di reazione con tampone, cloruro di magnesio, nucleotidi, coppia di primers e *Taq polimerasi*. La funzione di tali reagenti può essere così riassunta: il tampone di reazione, che deve essere un prodotto compatibile con la polimerasi, contiene due sali quali cloruro di potassio (KCl), Tris cloruro (Tris); l' $MgCl_2$ rappresenta un parametro critico in quanto stabilizza il legame degli inneschi (*primers*) al filamento stampo; i deossinucleotidi (dATP, dGTP, dCTP, dTTP), che devono essere in lieve eccesso rispetto ai prodotti finali della reazione; i primers la cui lunghezza è compresa tra le 20-30 basi devono avere un contenuto di GC compreso tra 45-50% e la temperatura di annealing (o ibridazione) del primo primer deve essere quasi uguale a quella del secondo primer, poiché se le due temperature di

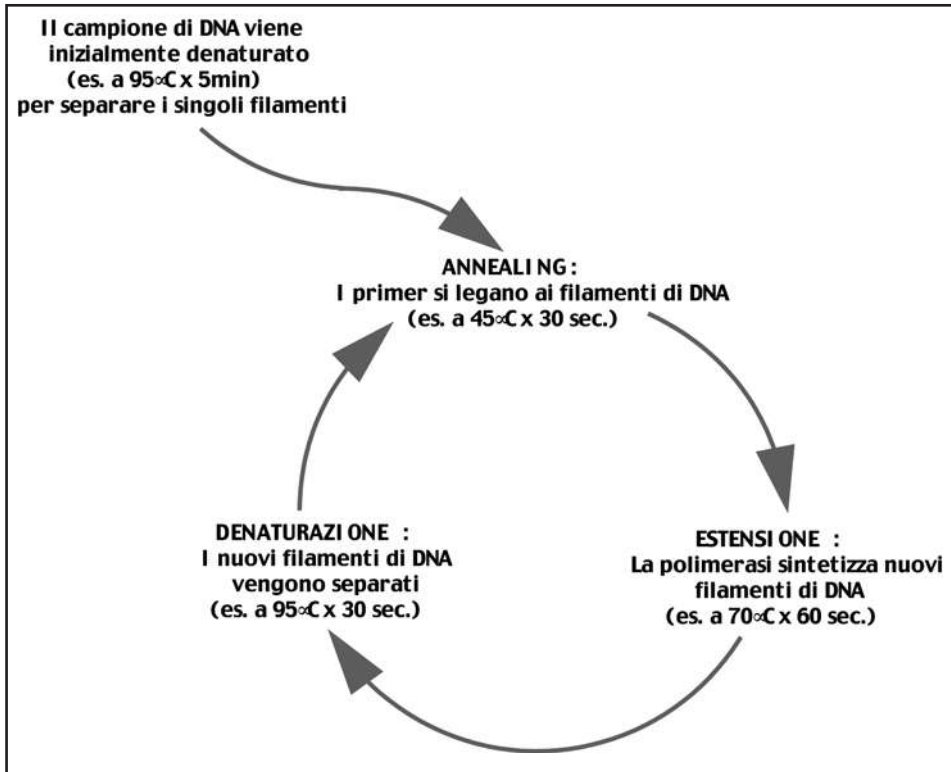


Figura 1. Schema di un ciclo di PCR comprendente le fasi di annealing, estensione e denaturazione del DNA.

annealing differiscono si possono verificare delle amplificazioni asimmetriche o a singolo filamento; la *Taq-Polimerasi*, enzima normalmente impiegato, ha attività polimerasica 5' - 3' durante la polimerizzazione, ma non ha attività esonucleasica 3' - 5' che gli consentirebbe di correggere eventuali errori di incorporazione. Esistono anche kit commerciali con le miscele già pronte.

La verifica dell'avvenuta amplificazione e l'accertamento che il frammento amplificato corrisponda effettivamente alla sequenza bersaglio attesa, vengono effettuati mediante corsa elettroforetica su gel d'agarosio addizionato di Bromuro di Etidio. Il gel viene formato in una cella provvista dell'apposito pettine. Un colorante viene addizionato all'amplificato per evidenziare la progressione della corsa. Al termine della corsa, il gel viene rimosso dalla cella ed osservato al transilluminatore UV, acquisendo l'immagine tramite fotocamera. La presenza o meno di bande luminose nei *lanes* relativi alle diverse diluizioni e/o campioni denota l'eventuale presenza di DNA batterico, la cui posizione viene riferita ad un *marker* di peso molecolare noto.

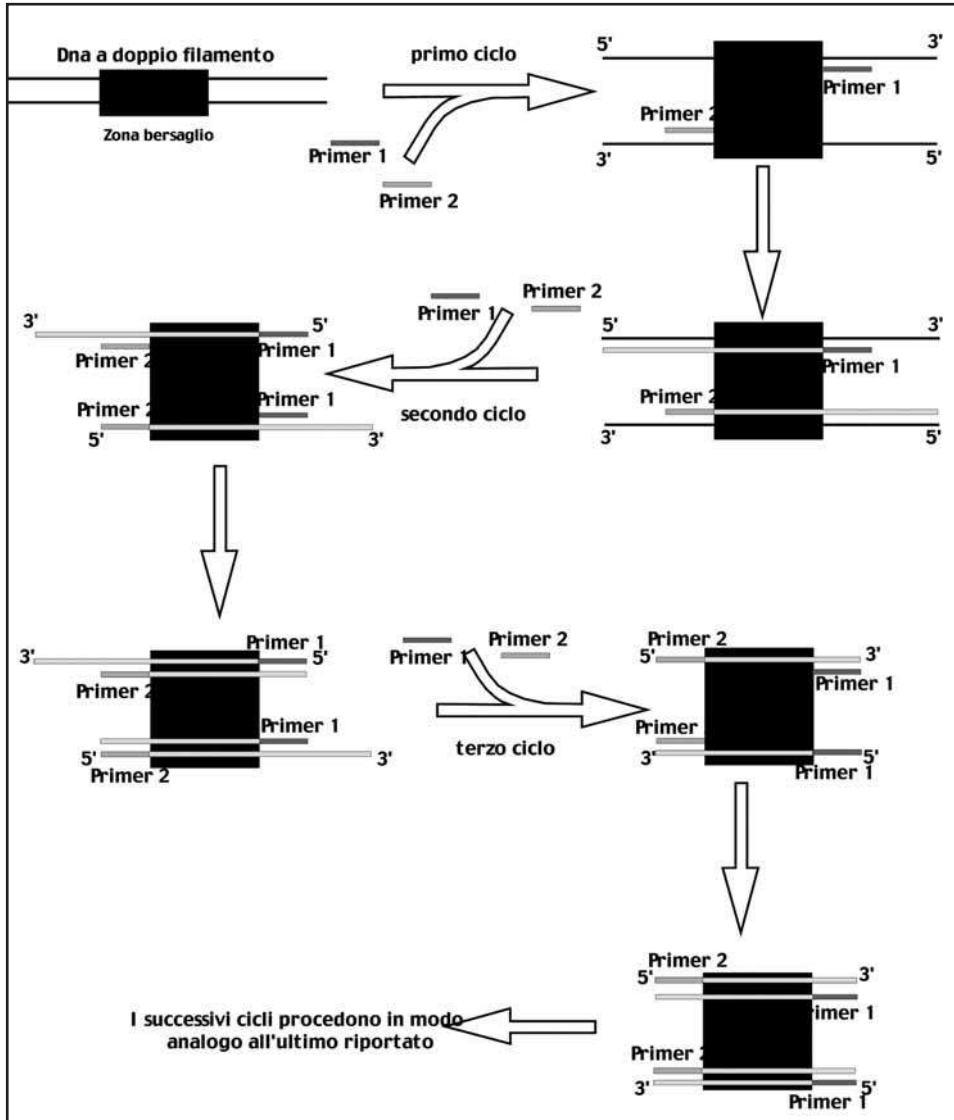


Figura 2. Meccanismo della reazione a catena della polimerasi (N.B.: il verso dell'estensione è 5' -> 3' nel nuovo filamento ma, se si fa riferimento al filamento-stampo, è ovviamente 3' -> 5'; si noti che nello schema le estremità 3'-5' sono riportate solo sui filamenti stampo).

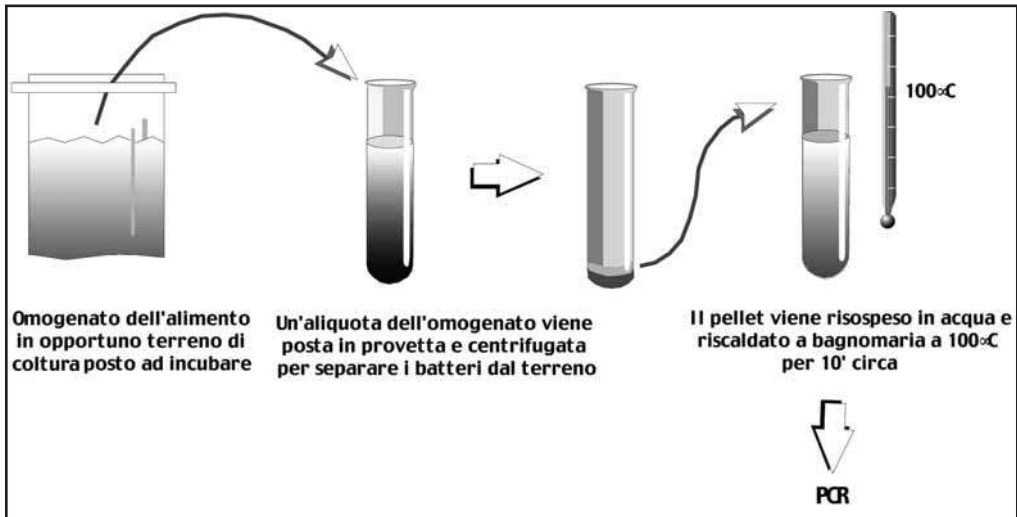


Figura 3. Esempio di estrazione del DNA batterico da un campione alimentare.

In ogni reazione PCR si deve predisporre, in parallelo al campione, un controllo positivo contenente la sequenza bersaglio da amplificare e un controllo negativo che non contiene tale sequenza ed è costituito da tutti i reagenti impiegati per l'amplificazione.

Negli ultimi anni, per la PCR su matrice alimentare, si è ravvisata l'opportunità di introdurre un controllo interno (IC) per potere evidenziare eventuali inibizioni della matrice ed evitare quindi i falsi negativi [40-41]. Il riscontro della positività per l'IC, in assenza di positività del campione, indica che il campione è veramente negativo. In Fig. 4 è riportato un gel di agarosio, di una PCR con controllo interno, per la determinazione della salmonella. Nei pozzetti (2-7) sono stati analizzati campioni di carne (bovino, suino, pollo) per accertare la presenza del patogeno. I campioni da 2 a 5 sono risultati positivi per salmonella (429 bp), i campioni 6 e 7 negativi ed in essi compare soltanto la banda relativa all'IC (240 bp).

Il controllo interno viene prodotto, mediante una prima PCR, a partire da un tratto di DNA plasmidico estraneo o da un tratto di DNA dello stesso bersaglio, esterno o interno al DNA target. Durante una seconda PCR tale IC viene coamplificato con il DNA target. Se nel campione non è presente il microorganismo bersaglio verrà rivelato solo il controllo interno, dimostrando così l'avvenuta reazione e la mancanza di inibizione da parte della matrice.



Figura 4. PCR con controllo interno per la determinazione della Salmonella: 1 = marker 100-bp DNA ladder plus, 2-7 = campioni di carne, 8 = controllo positivo (brodocoltura di Salmonella, 429 bp) , 9 = controllo interno (240 bp), 10 = controllo negativo (tutti i reagenti escluso il DNA).

Nested PCR

La Nested-PCR consiste nell'esecuzione di una seconda amplificazione successiva alla prima, utilizzando una nuova coppia di primers che fiancheggiano una sequenza interna al segmento bersaglio della prima reazione [3]. Essa, oltre ad essere un metodo di conferma specifico e di facile esecuzione, nello stesso tempo aumenta il limite di sensibilità della prima PCR.

In questo caso, la *specificità* aumenta in quanto vengono amplificati prevalentemente i prodotti della prima PCR realmente corrispondenti alla sequenza-bersaglio, infatti diminuisce la probabilità di amplificare per errore quelle zone che non rientrano nel bersaglio e che costituiscono il rumore di fondo della reazione.

La *sensibilità* viene ovviamente incrementata in quanto rispetto alla prima PCR il numero di frammenti-bersaglio è maggiore ed aumenta la resa della reazione; in tal caso anche concentrazioni molto basse del DNA batterico, presenti nel campione da analizzare, possono essere evidenziate tramite elettroforesi su gel.

L'esecuzione della Nested-PCR richiede comunque maggiori accorgimenti per evitare il rischio di contaminazioni da DNA estraneo.

Multiplex PCR

In questo caso vi sono due o più sequenze-bersaglio nel DNA contenuto nel campione da analizzare. Trova applicazione in varie situazioni diagnostiche, quando, oltre a identificare una specie microbica, se ne voglia verificare contemporaneamente la presenza di uno o più sierotipi (ad es. *Salmonella enterica*, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium), oppure nel caso si voglia accertare simultaneamente la presenza di due o più specie microbiche nel campione.

Vengono prodotti contemporaneamente e nella stessa provetta diversi amplificati, grazie all'impiego di diverse coppie di primers, ciascuna specifica per un ben determinato bersaglio [42].

PCR quantitativa

L'uso della PCR quantitativa si sta affermando negli ultimi anni in quanto, oltre ai vantaggi di una PCR classica (sensibilità, specificità e rapidità di risposta) permette la determinazione presuntiva del numero di microrganismi presenti in campioni alimentari potenzialmente contaminati [39, 43-45].

Tra le metodiche di PCR quantitativa proposte la tecnica più innovativa e probabilmente la più semplice è la PCR *Real-Time* (PCR-RT). Tale metodica permette di misurare "step by step" (in tempo reale) la fluorescenza che si genera durante la reazione a catena per effetto di diverse reazioni biochimiche, utilizzando, in alternativa, due sistemi di rilevamento dell'accumulo dei prodotti di PCR:

- coloranti che si legano specificamente ai doppi filamenti di DNA;
- sonde legate a molecole fluorescenti.

Il primo sistema utilizza coloranti fluorescenti che non interferiscono con la reazione di PCR e dotati della caratteristica di intercalarsi nella doppia elica di DNA. L'aumento della fluorescenza (F) corrisponde all'aumento del numero di copie dell'amplicone. Il colorante che sembra dare i migliori risultati è il SYBR Green 1 (Fig. 5) di cui non è ancora completamente noto il meccanismo di interazione con il DNA. Questi coloranti si legano indiscriminatamente a qualunque doppio filamento di DNA ed in qualunque suo punto; l'aspecificità dei legami colorante-DNA permette l'impiego con diversi bersagli. Va notato che reazioni di amplificazione diverse potranno dare, a parità di concentrazione iniziale del target, segnali diversi che saranno funzione della lunghezza dell'amplificato; infatti, dato che più di una molecola di colorante potrà legarsi al DNA, amplificati lunghi genereranno un segnale più intenso di quelli corti.

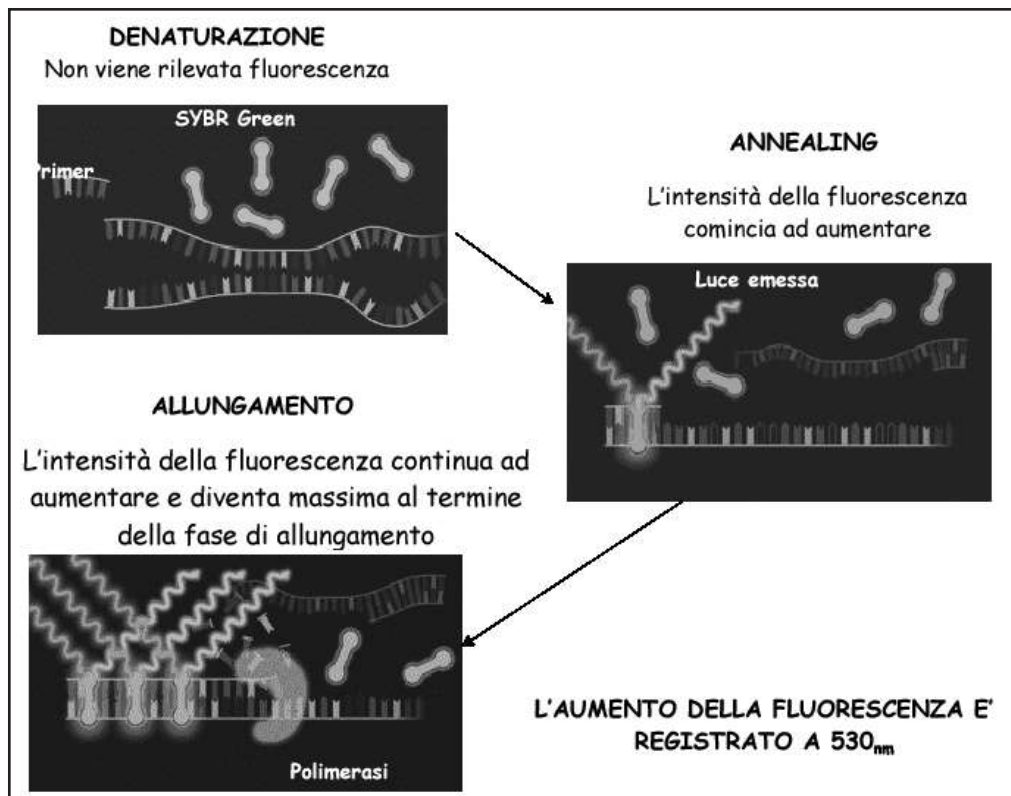


Figura 5. PCR quantitativa (Real Time): rivelazione mediante SYBR Green.

Per sopperire alle carenze di specificità del SYBR Green, viene generalmente effettuata l'analisi della curva di melting che consente di identificare il prodotto di amplificazione specifico rispetto a prodotti aspecifici. Al termine della PCR la temperatura viene lentamente aumentata inducendo un decremento della fluorescenza; infatti, a mano a mano che la temperatura viene incrementata, aumenta il numero di molecole di DNA che si denatura con conseguente liberazione del SYBR Green intercalato che non è più in grado di emettere fluorescenza. Riportando in grafico la fluorescenza in funzione della temperatura si ottiene la cosiddetta curva di melting. La temperatura in corrispondenza della quale si ha un repentino decremento della fluorescenza corrisponde alla temperatura di melting (T_m) del prodotto, specifica per ogni amplicone. Elaborando matematicamente (mediante software) la curva di melting e riportando sull'asse delle ascisse la temperatura (T) e sull'asse delle ordinate $-\Delta F/\Delta T$ si ottiene un diagramma di derivata prima, vale a dire un tracciato a forma di picco in cui è possibile valutare con maggiore precisione

(rispetto alla curva iniziale) la T_m che corrisponde alla temperatura del punto di massimo del picco (Fig. 6).

La PCR SYBR Green, che in questi ultimi anni sta sostituendo la PCR classica, è stata utilizzata con successo per la determinazione di differenti batteri patogeni quali: *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *E. coli*, *Campylobacter* [46-47].

Il secondo sistema di rivelazione, dotato di maggiore specificità, prevede l'utilizzo di sonde fluorescenti. Queste sonde, infatti, si legano al DNA (in una zona interna al DNA target) poco prima della coppia di primer, e durante l'amplificazione costituiscono un sistema di rilevamento dell'accumulo dei prodotti estremamente specifico. Le sonde sono marcate con un "reporter" fluorescente all'estremità 5' e un "quencher", capace di assorbire la radiazione fluorescente emessa dal "reporter", all'estremità 3'. Quando la sonda è intatta, la fluorescenza del "reporter" è soppressa dalla vicinanza del "quencher" limitando l'emissione da parte del reporter, così che il segnale risulta essere molto basso. Quando la sonda, dopo essersi specificamente legata alla sequenza complementare del DNA bersaglio viene degradata dall'attività 5'-esonucleasica della *Taq polimerasi*, il "reporter" viene separato dal "quencher" e quindi potrà emettere piena fluorescenza alla sua specifica lunghezza d'onda (Fig. 7). Il vantaggio di questa tecnica è che l'elevata specificità e l'utilizzo di sonde legate a molecole che emettono fluorescenza a diverse lunghezze d'onda permettono di poter distinguere contemporaneamente amplificati generati da diverse reazioni. Poiché, durante la PCR, viene liberata una mole-

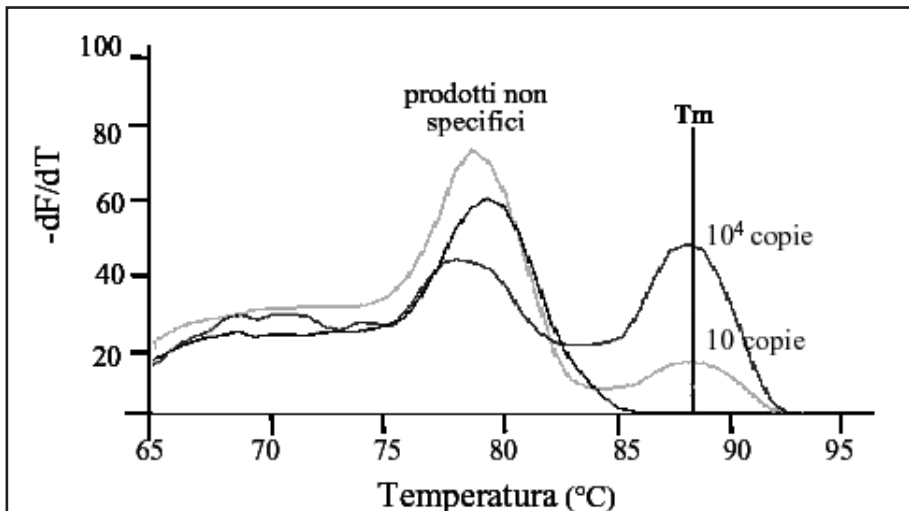


Figura 6. Derivata negativa della curva di melting: l'individuazione della T_m , specifica per ogni amplicone, permette di discriminare amplificati specifici da prodotti non specifici.

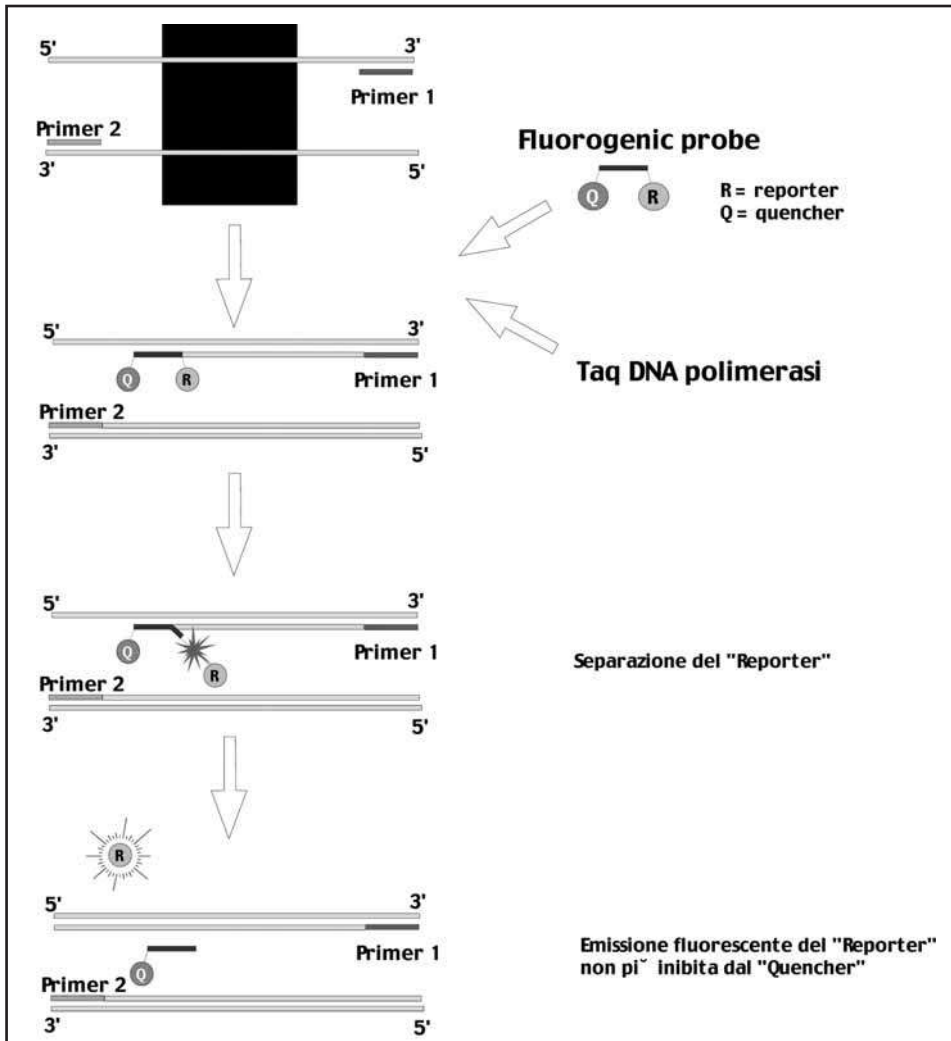


Figura 7. Meccanismo d'azione delle sonde marcate con fluorocromi per rilevare l'andamento della duplicazione nel corso della PCR quantitativa (Real-Time).

cola di "reporter" per ogni copia di DNA duplicata, la fluorescenza che si accumula è proporzionale (in ogni momento) alla quantità dello specifico prodotto di PCR. Lo svantaggio dell'utilizzo di sonde fluorescenti è rappresentato dal fatto che devono essere sintetizzate differenti sonde per rilevare sequenze diverse.

Sia che vengano utilizzati coloranti che sonde, la misura viene seguita in tempo reale in un “thermal cycler” dotato di un’opportuno dispositivo fluorimetrico. Il ciclo della PCR in cui viene rivelato un aumento significativo della fluorescenza è definito come ciclo soglia (Ct).

Si può risalire alla quantità di DNA iniziale in base ad una *retta di taratura* che pone in relazione i Ct con la quantità iniziale di DNA bersaglio; il ciclo soglia verrà raggiunto in un numero di cicli inversamente proporzionale alla quantità di target iniziale (Fig. 8). Numerose applicazioni della PCR-RT con sonde fluorescenti sono riportate in letteratura per la determinazione di batteri patogeni [48-49].

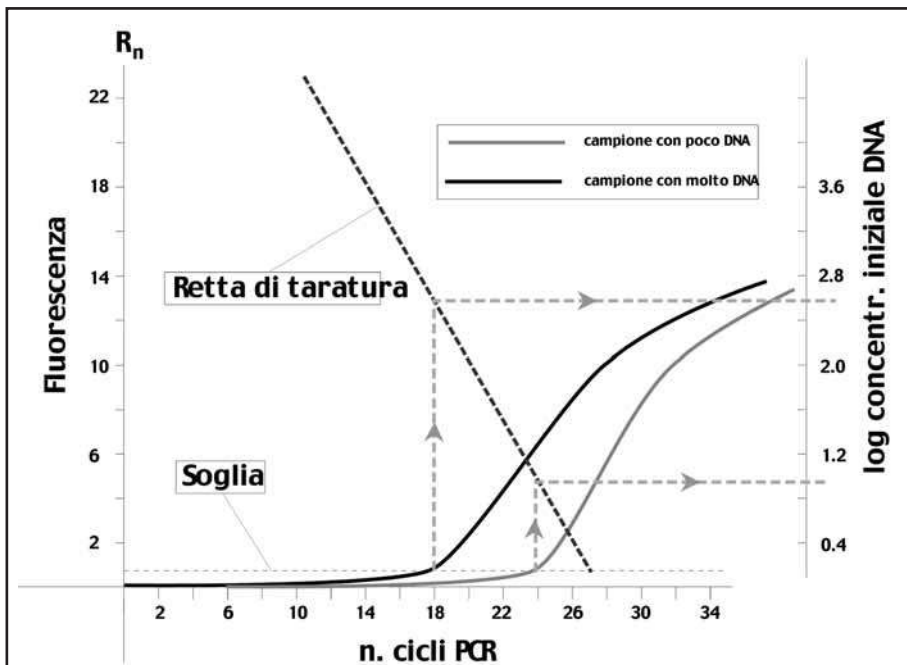


Figura 8. PCR quantitativa (Real-Time): determinazione del DNA.

Saggi ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

I saggi immunoenzimatici sono dosaggi di legame basati sulle interazioni antigene-anticorpo, che utilizzano come traccianti reazioni enzimatiche. L’anticorpo o l’antigene sono infatti coniugati con un enzima in modo che l’antigene da dosare possa essere determinato mediante una misura di attività enzimatica. In particolare, i saggi immunoenzimatici in fase eterogenea

(ELISA) si basano sia sul metodo competitivo che non competitivo (a sandwich) [50-51]. I primi prevedono l'immobilizzazione dell'antigene o dell'anticorpo su fase solida; quando è l'antigene ad essere immobilizzato (Fig 9) l'aggiunta di anticorpi specifici coniugati con un enzima marcatore e di campioni contenente l'antigene da dosare, comporta una competizione tra l'antigene immobilizzato e quello libero (standard o campione) per l'anticorpo marcato. Dopo un periodo di incubazione, l'eccesso di analita e di anticorpo vengono rimossi mediante lavaggio. Viene quindi aggiunto il sub-

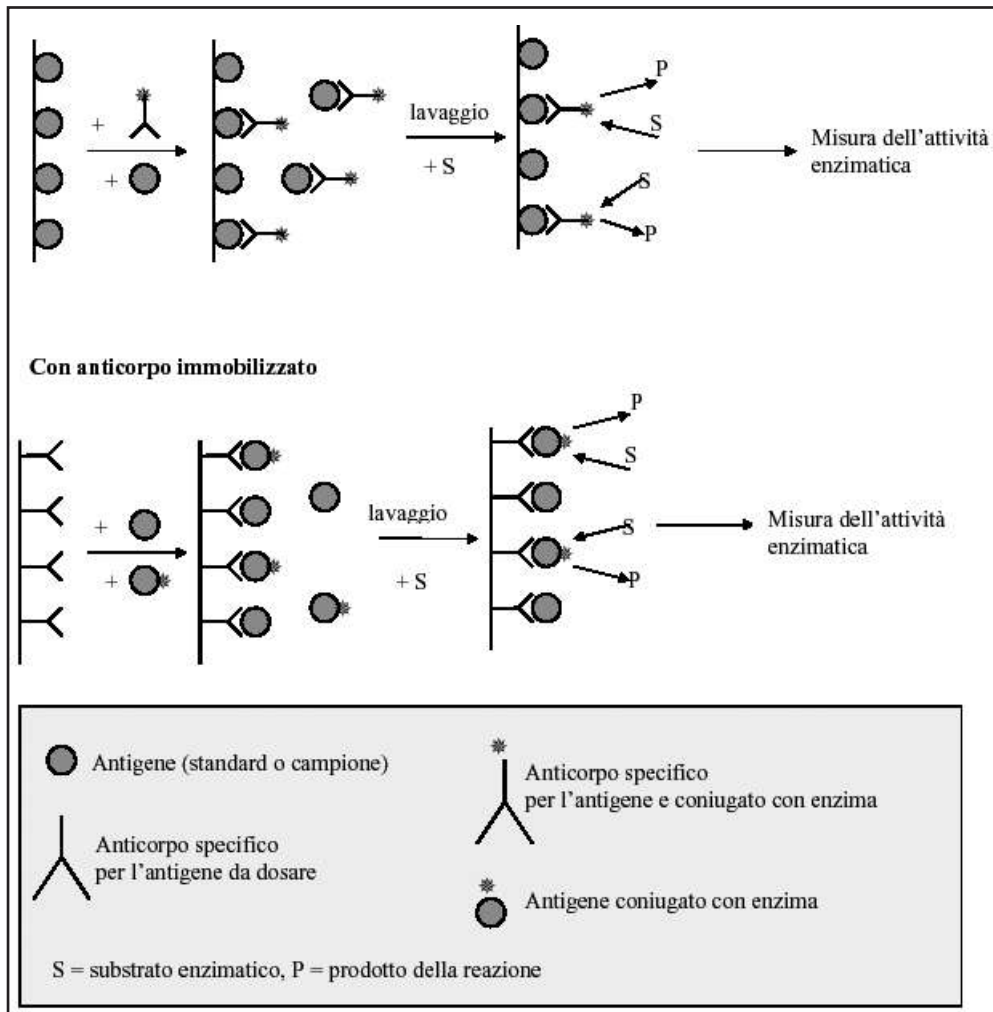


Figura 9. Schema di saggi ELISA di tipo competitivo.

strato enzimatico ed il segnale generato dal prodotto di reazione viene appropriatamente rilevato. Tale segnale è inversamente proporzionale alla quantità di antigene presente nel campione. Nel caso in cui è l'anticorpo ad essere immobilizzato su un fase solida la competizione avverrà tra l'antigene libero e quello marcato (Fig. 9).

In un dosaggio competitivo del primo tipo, anziché marcare l'anticorpo specifico (anticorpo primario), come già descritto sopra, si può ricorrere ad un anticorpo secondario coniugato con l'enzima. L'anticorpo secondario è un anticorpo specifico per le γ -globuline dell'animale impiegato per ottenere l'anticorpo primario. Il dosaggio, detto competitivo indiretto, avviene quindi secondo lo schema riportato in Fig. 10.

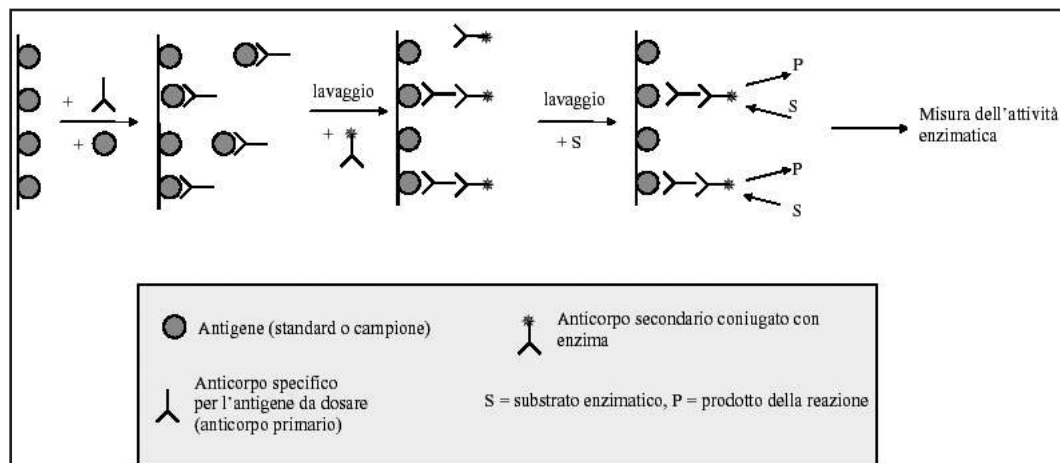


Figura 10. Schema di un saggio ELISA di tipo competitivo indiretto.

I saggi immunoenzimatici con una configurazione a sandwich prevedono l'immobilizzazione dell'anticorpo e la successiva addizione sia del campione (contenente l'antigene da dosare) che di un secondo anticorpo coniugato con l'enzima marcatore. Dopo un periodo di incubazione l'eccesso di reagenti viene eliminato mediante lavaggio e viene quindi addizionato il substrato enzimatico (Fig. 11). In questo caso, a differenza della competizione, il segnale generato dal prodotto della reazione sarà direttamente proporzionale alla concentrazione dell'analita presente nel campione.

Le tecniche di rilevamento più comunemente usate per la determinazione dell'attività enzimatica sono: la fluorimetria [52-53], la chemiluminescenza [54-55] e la colorimetria [56].

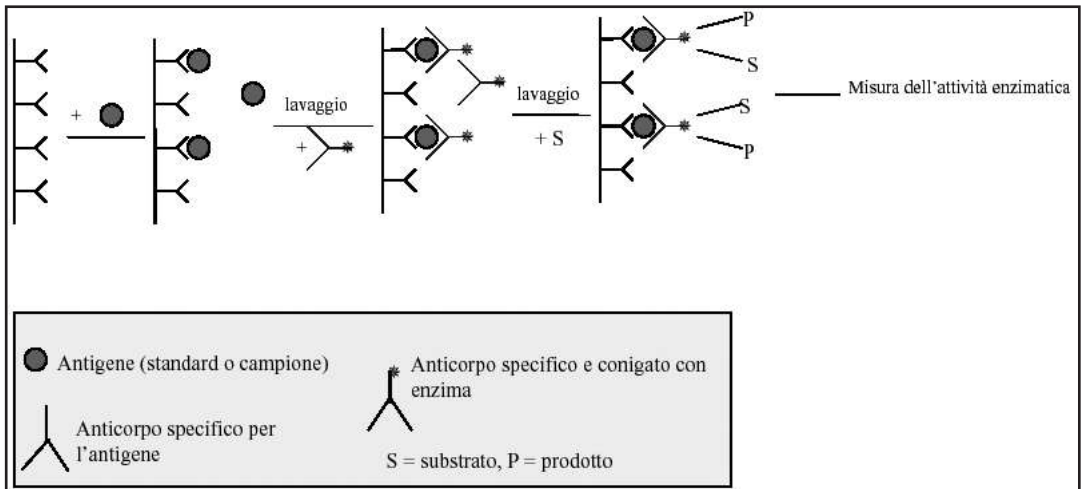


Figura 11. Schema di un saggio ELISA di tipo sandwich.

Immunosensori

In questi ultimi anni sono stati sviluppati un grande numero di immunosensori, vale a dire saggi ELISA in cui il materiale biologico viene accoppiato ad un trasduttore di segnale. Si tratta di una particolare classe di biosensori; un biosensore viene definito come uno strumento analitico in cui è presente un elemento biologico strettamente connesso o integrato con un trasduttore di segnale [57-58]. Generalmente il materiale biologico è rappresentato da uno o più enzimi, anticorpi, batteri, cellule, tessuti viventi animali o vegetali che interagiscono con il substrato che si vuole determinare e sono responsabili della specificità del sensore. Il segnale che viene registrato in seguito all'interazione del materiale biologico con l'analita da determinare può essere di tipo elettrochimico (biosensori amperometrici e potenziometrici), luminoso (biosensori ottici), calorico (biosensori termici), sonoro (biosensori acustici). Un'altra classe di biosensori di notevole interesse è rappresentata dai biosensori di massa o piezoelettrici basati sul cambiamento nella frequenza di oscillazione di un cristallo piezoelettrico in seguito alla variazione di massa, generata dall'interazione del materiale biologico con l'analita, sulla sua superficie.

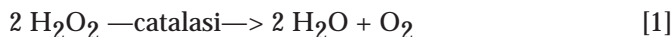
I biosensori che offrono però migliori garanzie per le applicazioni analitiche in termini di sensibilità, riproducibilità e selettività sono quelli elettrochimici (potenziometrici ed amperometrici). Ricordiamo che una misura potenziometrica consiste nel rilevare un potenziale di membrana tramite due elettrodi di riferimento posti da entrambi i lati della membrana stessa. Se un

lato della membrana è immerso in una soluzione di riferimento a composizione chimica costante e l'altro lato è immerso in una soluzione che contiene una specie che interagisce selettivamente con essa, si produce ai due lati della membrana una variazione di potenziale che viene registrata da un apposito strumento detto potenziometro. I sensori che permettono di effettuare misure potenziometriche sono i così detti elettrodi selettivi per ioni; per citarne solo alcuni ricordiamo l'elettrodo a vetro per la misura del pH, quello a sodio, potassio, calcio ed ammonio.

Una misura amperometrica, invece, consiste nel rilevare una corrente che passa tra due elettrodi (uno di lavoro e l'altro di riferimento) ai quali è stata applicata una differenza di potenziale costante; i due elettrodi immersi in una soluzione costituiscono una cella elettrochimica. Se in soluzione avviene una reazione tale da produrre o da consumare una specie elettroattiva, si misura un passaggio di corrente dovuto ad una riduzione od ossidazione che avviene all'elettrodo di lavoro opportunamente polarizzato ad un prefissato valore di potenziale. I sensori amperometrici più comuni sono l'elettrodo ad ossigeno (elettrodo di Clark), ad acqua ossigenata, elettrodi basati su mediatori ed elettrodi a NADH [57].

Nel caso degli immunosensori, quelli elettrochimici permettono di combinare l'elevata selettività della reazione antigene-anticorpo con un'eccellente sensibilità ed un ampio intervallo lineare di misura che sono caratteristici dei metodi elettrochimici [59]. In quest'ambito, la misura dell'attività enzimatica può essere effettuata con sistemi potenziometrici, che utilizzano elettrodi a gas e ionoselettivi, e con sistemi amperometrici basati su elettrodi di platino, oro, grafite, carbone etc. Nel 1979 Boitieux et al. [60] hanno descritto uno dei primi immunosensori enzimatici potenziometrici, con una configurazione a sandwich, per la determinazione dell'antigene di superficie dell'epatite B (HBsAg). Anticorpi anti-HBsAg sono stati immobilizzati su dischi di gelatina ed immersi in una soluzione contenente l'antigene. Seguiva una fase di lavaggio durante la quale i dischi venivano incubati con il secondo anticorpo marcato con la perossidasi (HRP). Dopo incubazione ed ulteriore lavaggio, i dischi venivano montati su elettrodi ionoselettivi a ioduro. Poiché la perossidasi catalizza la reazione di ossidoriduzione n^0 [4], immergendo gli elettrodi in una soluzione contenente acqua ossigenata e iodio, l'attività perossidasi veniva misurata potenziometricamente mediante conversione dello iodio in ioduro.

Per la realizzazione di immunosensori amperometrici gli enzimi maggiormente impiegati come marcatori sono la catalasi, la glucosio ossidasi (GOD), la fosfatasi alcalina (AP) e la perossidasi (HRP). Tali enzimi sono caratterizzati da un'elevata stabilità e da un alto numero di turnover allo scopo di massimizzare l'amplificazione del segnale. Le reazioni da essi catalizzate sono:



L'attività enzimatica della catalasi può essere determinata misurando il consumo di O_2 con elettrodo ad ossigeno di Clark, quella della glucosio ossidasi monitorando il consumo di ossigeno o la produzione di acqua ossigenata con un elettrodo ad H_2O_2 . Immunosensori amperometrici che utilizzano tali enzimi come marcatori sono riportati in letteratura [61-64].

La fosfatasi alcalina e la perossidasi sono enzimi capaci di interagire con differenti substrati i cui prodotti di reazione se elettrochimicamente attivi, vanno ad ossidarsi (come per la reazione catalizzata da AP) o a ridursi (come per la reazione catalizzata da HRP) alla superficie di un opportuno elettrodo adeguatamente polarizzato, generando un segnale di corrente direttamente proporzionale alla quantità di enzima.

Un ampio numero di substrati sono riportati in letteratura per la misura elettrochimica dell'attività enzimatica della fosfatasi alcalina [65-66], sebbene la maggior parte dei metodi descritti utilizzava, almeno inizialmente, il fenilfosfato [67]. Questo composto è elettrochimicamente inattivo, ma l'idrolisi enzimatica produce fenolo che può essere facilmente ossidato a potenziali intorno a +800 mV (*versus* un elettrodo di riferimento di Ag/AgCl). E' proprio utilizzando tale substrato che Brook *et al.* [68] nel 1992 hanno sviluppato un immunosensore amperometrico per la determinazione della salmonella in culture pure e negli alimenti.

Sono stati testati substrati alternativi che producono, quando idrolizzati, composti che si ossidano ad un potenziale meno anodico di quello necessario per l'ossidazione del fenolo. Così il para-aminofenilfosfato (pAPP), il cui prodotto di reazione si ossida ad un potenziale intorno a + 50 mV (*vs.* Ag/AgCl), è stato definito come il miglior substrato per la determinazione amperometrica dell'attività enzimatica [69]. E' per tale ragione che, in questi ultimi anni, sono stati realizzati numerosi saggi immunoenzimatici amperometrici basati su tale substrato [70-72].

Per la misura amperometrica dell'attività perossidasi i substrati maggiormente utilizzati [73-76] sono lo ioduro di potassio, l'drochinone, il ferrocene, ed i derivati del ferrocene. Recentemente la 3,3', 5,5'-tetrametilbenzidina (TMB) è stata impiegata per misurare l'attività perossidasi usando la tecnica FIA (Flow Injection Analysis) accoppiata ad un elettrodo di carbone vetroso mantenuto ad un potenziale di +100 mV (*vs* Ag/AgCl) [77]. Per effet-

tuare tali misure, una valvola ad iniezione è stata inserita in sistema a flusso costituito da una cella elettrochimica collegata ad una pompa peristaltica che trasportava un'opportuna soluzione tampone ad un'opportuna velocità di flusso. Quando la corrente di fondo raggiungeva un valore stabile, le soluzioni da analizzare venivano iniettate nel flusso attraverso la valvola, generando una variazione di corrente che veniva opportunatamente registrata (Fig. 12).

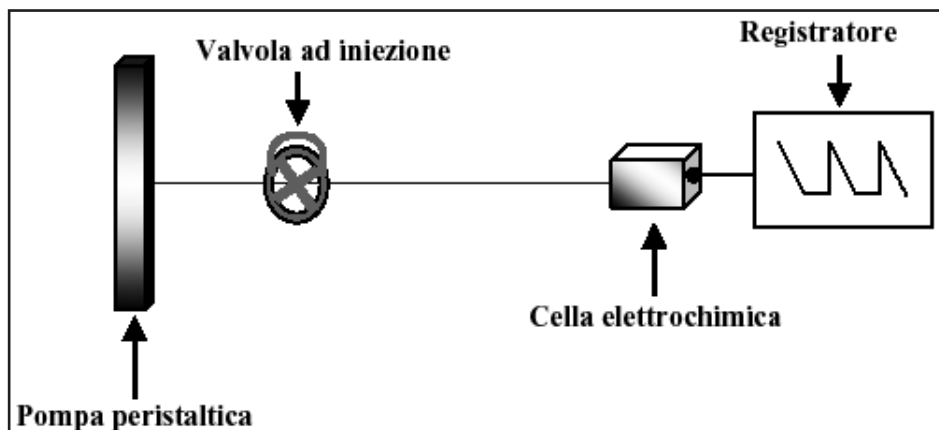


Figura 12. Schema di un sistema FIA (Flow Injection Analysis) con rivelazione elettrochimica.

La combinazione della misura elettrochimica con la tecnica FIA fa sì che si possano eseguire un elevato numero di analisi, la riproducibilità è estremamente alta, le calibrazioni sono facili da effettuare e la tecnica è automatizzabile.

Nelle pagine che seguono sono descritti alcuni esempi significativi di immunosensori per la determinazione di alcuni batteri patogeni.

Immunosensori per batteri patogeni

Nel 1997, Ye *et al.* hanno sviluppato un immunosensore piezoelettrico, accoppiato alla tecnica FIA, per la determinazione della *Salmonella Typhimurium* [78].

Con questo tipo di biosensore è possibile rilevare direttamente i batteri senza dover ricorrere all'uso di marcatori. Anticorpi anti-salmonella sono stati opportunamente immobilizzati sulla superficie di un cristallo piezoelettrico e fatti interagire con cellule batteriche. Come si può osservare dalla Fig. 13, solo le cellule di salmonella si legano agli anticorpi specifici ed in seguito a questa interazione la massa del cristallo aumenta mentre la sua frequenza

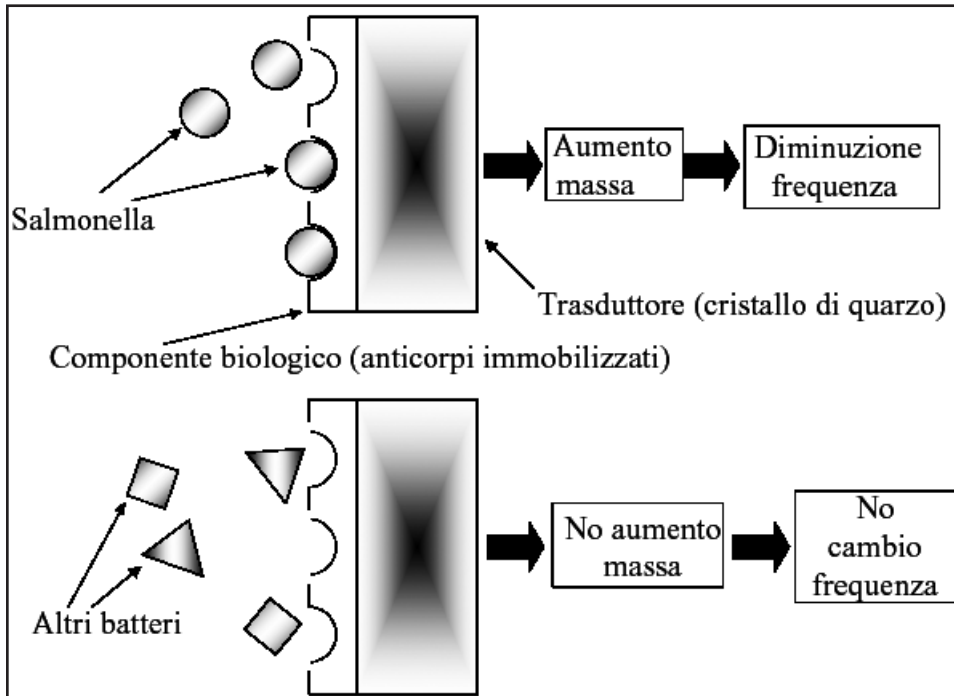


Figura 13. Principio di funzionamento di un immunosensore piezoelettrico per la determinazione della salmonella.

di oscillazione diminuisce proporzionalmente. La curva di calibrazione è stata effettuata preparando, per ogni contrazione di salmonella da testare, cinque cristalli sensibili (con anticorpi anti-salmonella) e due cristalli di riferimento (trattati come i cristalli sensibili ma senza anticorpi immobilizzati). Ogni cristallo è stato inserito in una cella a flusso in cui fluiva tampone trasportato da una pompa peristaltica (Fig. 14). Dopo stabilizzazione della frequenza di oscillazione, pochi microlitri di una sospensione cellulare di *S. Typhimurium* (10^5 cells/mL - 10^9 cells/mL) venivano iniettati (mediante apposita valvola) nel flusso e trasportati in cella sulla superficie del cristallo. Per permettere una migliore interazione tra gli anticorpi e le cellule, la pompa veniva fermata 1 minuto dopo l'iniezione e la frequenza di base veniva registrata come F1. Dopo 25 minuti di interazione anticorpi-cellule, una nuova frequenza di oscillazione veniva registrata come F2. Il cristallo veniva poi rimpiazzato con nuovi cristalli e l'analisi veniva ripetuta 5 volte. La variazione di frequenza del cristallo sensibile ($\Delta F_s = F1_s - F2_s$) meno la variazione di frequenza del cristallo di riferimento ($\Delta F_r = F1_r - F2_r$) veniva infine messa in relazione con la concentrazione *S. Typhimurium*.

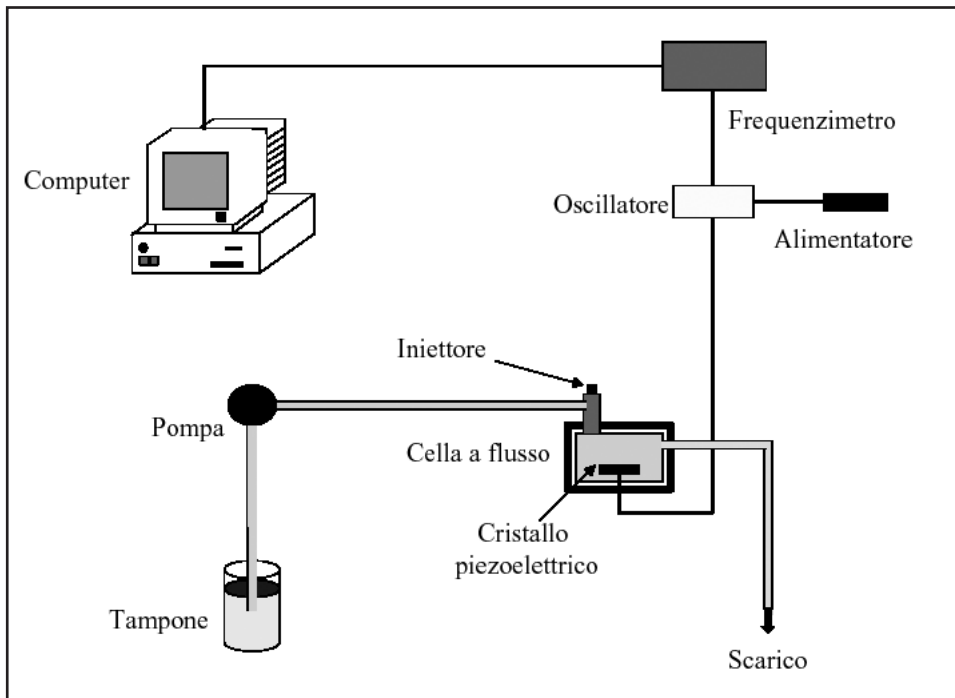


Figura 14. Schema del sistema FIA- immunosensore piezoelettrico.

Il maggiore svantaggio della tecnologia basata sui sensori piezoelettrici consiste nella rigenerazione della superficie del cristallo; tale problema potrà essere superato solo se verranno costruiti e commercializzati piccoli cristalli piezoelettrici di basso costo da utilizzare come dispositivi "usa e getta".

Croci *et al.* [36] hanno recentemente proposto un saggio ELISA elettrochimico per la determinazione di differenti sierotipi di salmonella in campioni di carne. Anticorpi monoclonali e policlonali-HRP, specifici per salmonella, sono stati impiegati in un "format" di tipo sandwich utilizzando una convenzionale piastra ELISA come supporto per l'immobilizzazione. Al termine della catena immunologica una soluzione di TMB + H₂O₂ veniva addizionata nei pozzetti della piastra e, dopo incubazione, la reazione enzimatica veniva bloccata con sodio azide. L'attività enzimatica veniva misurata iniettando la miscela di ciascun pozzetto in un sistema FIA accoppiato con una cella elettrochimica il cui elettrodo di lavoro (carbone vetroso) era polarizzato ad un potenziale di + 100 mV (vs Ag/AgCl). Esperimenti con differenti sierotipi di salmonella (*S. Derby* e *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*), e con altri batteri comunemente presenti negli alimenti (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Citrobacter freundii*, *Yersinia enterocolitica*) hanno

evidenziato una specificità di risposta nei confronti delle salmonelle (Fig. 15) ed assenza di cross-reattività per la rimanente flora microbica. Il sistema è stato poi utilizzato per analizzare campioni di carne di maiale, pollo e manzo. In accordo con la legislazione europea che stabilisce assenza di salmonella in 25 g di prodotto, sono stati analizzati campioni sperimentalmente contaminati (aggiungendo a 25 g di carne 1-10 cellule di salmonella) e campioni non sperimentalmente contaminati. Parallelamente sono state effettuate analisi con il metodo culturale classico. Tutti i campioni sono stati trattati secondo lo schema riportato in Fig. 16: 25 g di carne sono stati omogeneizzati con 225 mL di brodo di prearricchimento (buffered peptone water = acqua peptonata tamponata) in uno stomacher per 1-2 minuti ed incubati a 37 °C. Aliquote (10 mL) sono state prelevate a 2, 3, 4, 5, 6 e 24 ore di incubazione, filtrate attraverso una garza e centrifugate per 15 min a 3000 rpm. Il supernatante è stato scartato ed il pellet risospeso in 10 mL di PBS (phosphate buffer saline) e bollito per 5 min; il volume è stato poi riportato al valore iniziale (10 mL con PBS). Tutte le aliquote prelevate sono state analizzate in ELISA; il metodo culturale classico è stato eseguito soltanto sull'aliquote prelevata dopo 24 h come stabilito dalla procedura.

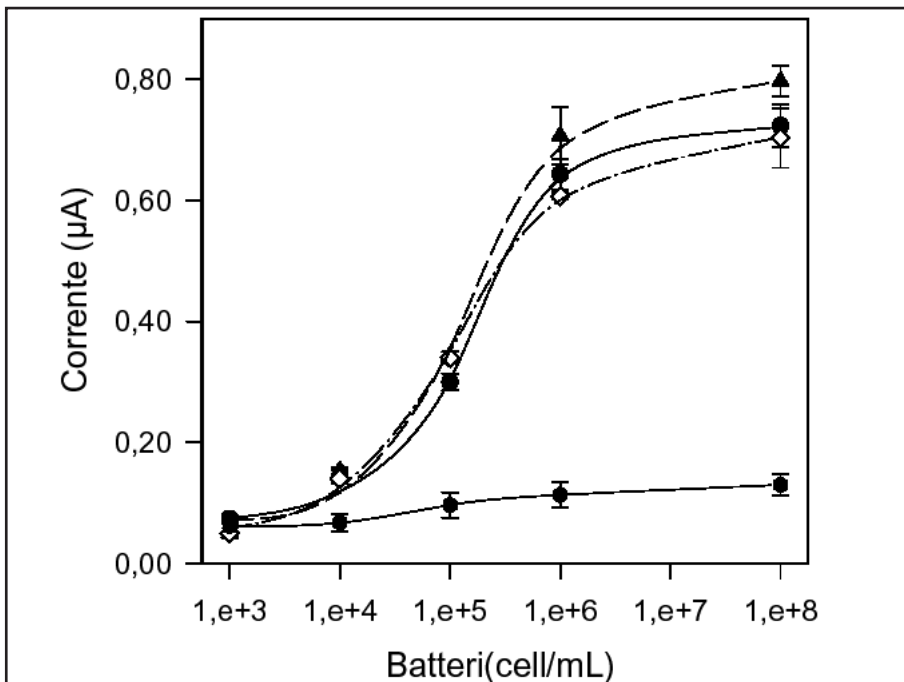


Figura 15. Curve di calibrazione per *S. Enteritidis* (▲), *S. Derby* (●), *Typhymurium* (◇), altri batteri comunemente presenti negli alimenti (●).

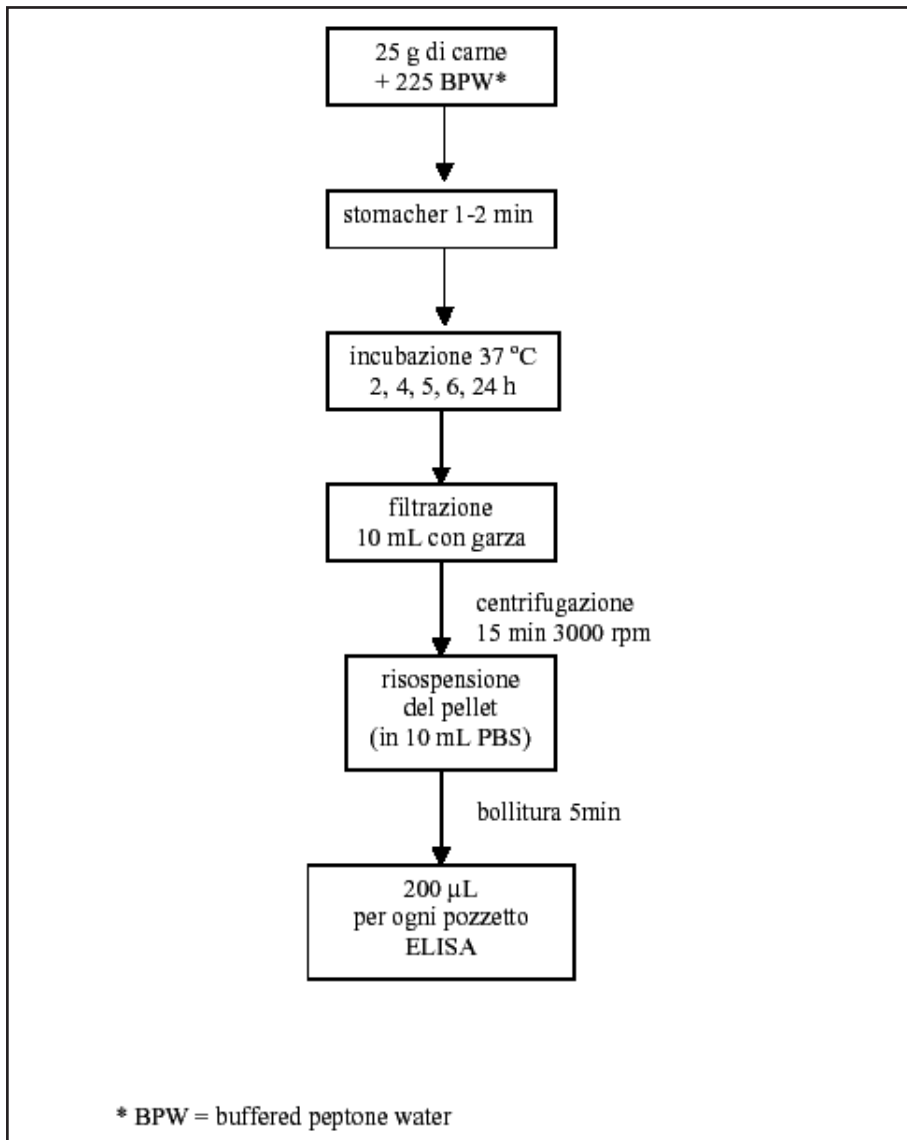


Figura 16. Schema del trattamento dei campioni per la determinazione della salmonella.

La Fig. 17 mostra i risultati ottenuti quando i campioni sperimentalmente contaminati, con 1-10 cellule di *S. Enteritidis*, sono stati analizzati in ELISA. Come si può osservare, il tempo minimo di prearricchimento neces-

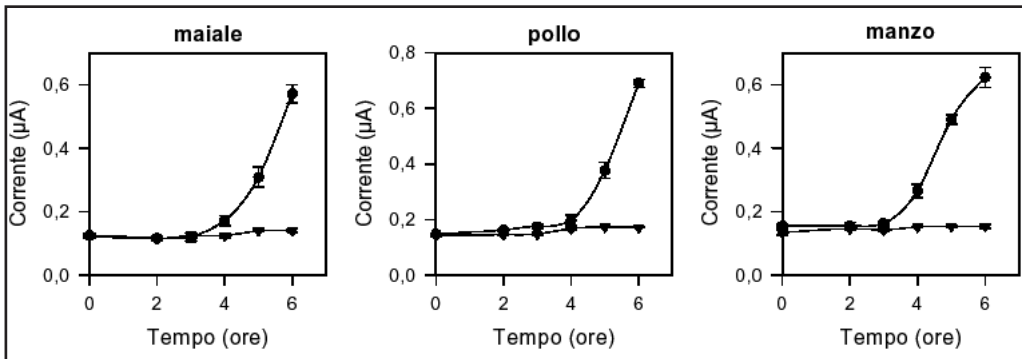


Figura 17. Analisi, mediante ELISA elettrochimico, di campioni di maiale, pollo e manzo (25 g) sperimentalmente contaminati con 1-10 cellule di *S. Enteritidis* (●) e stessi campioni non contaminati (▼).

sario per avere un incremento del segnale era variabile; ciò era probabilmente dovuto alla differente concentrazione dei microrganismi competitori naturalmente presenti nei campioni analizzati. In ogni caso, 5 ore di prearricchimento erano sufficienti per rilevare la presenza di salmonella; il metodo culturale classico ha confermato i risultati.

Nel caso dei campioni non sperimentalmente contaminati soltanto due dei dieci analizzati sono risultati positivi per salmonella sia con l'ELISA che con il metodo culturale classico. Usando il test di agglutinazione i due sierotipi sono stati isolati e identificati come *S. Infantis* e *S. Anatum*. L'isolamento di questi due sierotipi ha dimostrato l'efficienza dell'ELISA elettrochimico nel rilevare la presenza anche di altri sierotipi oltre a quelli inizialmente testati (*S. Enteritidis*, *S. Derby*, *S. Typhimurium*). Il sistema sviluppato, affidabile, semplice e rapido (poche ore rispetto ai 4-5 giorni del metodo culturale classico) rappresenta quindi un valido candidato per l'inclusione in piani di autocontrollo da parte delle industrie alimentari.

Recentemente, particelle immunomagnetiche (IMBs = immunomagnetic beads) sono state impiegate nella realizzazione di saggi immunoelettrochimici per la determinazione della *S. Typhimurium* e dell'*E. coli* [79-80]. Questa tecnica, denominata Enzyme Linked Immunomagnetic Electrochemistry (ELIME), riesce a combinare la selettività degli anticorpi, immobilizzati sulle particelle magnetiche, con la rapidità e la sensibilità della rivelazione elettrochimica. Le particelle magnetiche (1-5 mm di diametro) sono costituite da una dispersione di materiale magnetico (Fe_2O_3 e Fe_3O_4) ricoperta da un sottile guscio polimerico che racchiude il materiale magnetico e provvede a definire l'area superficiale per l'adsorbimento o per l'accoppiamento con una grande varietà di molecole. Esse risultano un ottimo supporto solido per una

gran varietà di separazioni biomagnetiche, manipolazioni molecolari e separazioni per affinità. Queste particelle possono essere ricoperte con anticorpi selezionati e funzionare come reagenti di immunoriconoscimento selettivo [81-82]. Sono facili da maneggiare, offrono la possibilità di essere mantenute in sospensione durante le reazioni, assicurano un rapido ed efficiente legame con l'analita e, nello stesso tempo, offrono la possibilità di recupero quantitativo grazie ad un magnete; tali proprietà facilitano quindi l'estrazione e il riconoscimento delle molecole bersaglio.

Relativamente alla misura dei batteri patogeni, i saggi ELIME sviluppati (di tipo sandwich) impiegavano le particelle magnetiche come supporto per l'immobilizzazione di specifici anticorpi. Tutte le reazioni della catena immunologica avvenivano all'interno di provette (poste in apposito agitatore rotante) e, tra un passaggio e l'altro, le particelle venivano bloccate sul fondo delle provette con l'ausilio di un dispositivo magnetico e la soluzione sovrastante veniva scartata per aspirazione. Al termine della catena immunologica le particelle immunomagnetiche venivano concentrate, con l'aiuto di un piccolo magnete, sulla superficie dell'elettrodo di lavoro di un sensore di tipo "screen printed", vale a dire di un sensore miniaturizzato, di basso costo, stampato mediante tecnica serigrafica ed utilizzabile come "usa e getta" (Fig. 18). Essendo la fosfatasi alcalina l'enzima impiegato come marcatore della

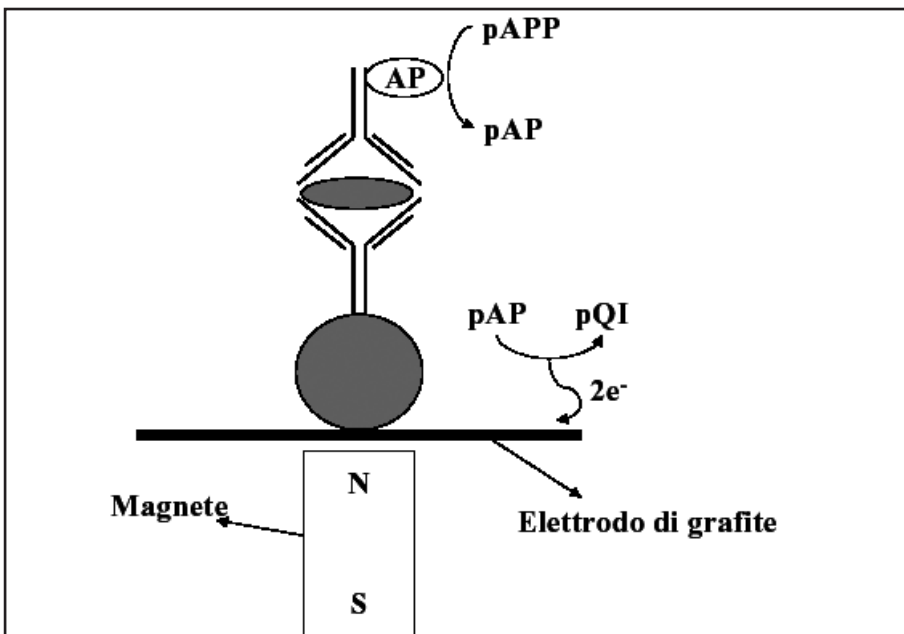


Figura 18. Schema del saggio ELIME: particelle immunomagnetiche concentrate sulla superficie di un elettrodo di grafite che funge da trasduttore di segnale.

reazione antigene-anticorpo, pochi microlitri di substrato p-aminofenilfosfato (pAPP) o 1-naftilfosfato venivano depositati sul sensore e dopo pochi minuti l'attività enzimatica veniva misurata mediante tecniche elettrochimiche estremamente sensibili e rapide quali la voltammetria ad onda quadra (SWV = Square Wave Voltammetry) e la voltammetria differenziale ad impulsi (DPV = Differential Pulsed Voltammetry).

Altri interessati immunosensori per la determinazione dei batteri patogeni sono riportati in letteratura [84-89].

Biosensori a DNA

Recentemente sono stati sviluppati vari tipi di biosensori basati sull'identificazione del DNA batterico [90-95]. Si tratta di dispositivi analitici in cui un tratto specifico di DNA batterico a singolo filamento viene immobilizzato sulla superficie di un trasduttore di segnale ed è libero di ibridizzare con la sua sequenza complementare, quando essa è presente nel campione da analizzare. Il principio di base è quello di rilevare il riconoscimento molecolare tra le due singole catene e trasformarlo, mediante il trasduttore, in un segnale facilmente misurabile.

Poiché i batteri possono essere presenti in un campione in piccolissime quantità, il processo di ibridizzazione deve essere preceduto da un fase di amplificazione tramite PCR [92].

Accanto alla rivelazione di tipo piezoelettrico, in cui la frequenza di oscillazione del cristallo diminuisce in seguito al processo di ibridizzazione, in letteratura sono riportati differenti approcci di tipo elettrochimico per rilevare l'evento di ibridizzazione. Marazza *et al.* [96] hanno usato la daunomicina (molecola aromatica planare) come agente intercalante ed indicatore elettrochimico dell'avvenuta formazione dei duplex; Wang *et al.* [97] e Lucarelli *et al.* [98] hanno invece sfruttato l'ossidazione della guanina.

Un interessante approccio consiste nell'uso di una apposita sonda libera da guanine e contenente inosina come sostituta della citosina. Tale sonda, immobilizzata sulla superficie del trasduttore, riesce a rilevare direttamente la formazione del DNA duplex, mediante l'ossidazione delle guanine presenti nel filamento di DNA target [99]. Recentemente un ulteriore approccio, basato sull'utilizzo di complessi di cationi metallici come $\text{Co}(\text{bipyridil})_3^{+3}$, è stato usato per sviluppare sensori a DNA per batteri patogeni quali *E. coli* e *Micobacterium tuberculosis* [95].

Conclusioni

Il consumo di alimenti, conservati e preparati in condizioni non idonee, rappresenta tuttora uno dei principali problemi di sanità pubblica, soprattutto in relazione alle tossinfezioni dovute alla presenza accidentale nei prodotti di microrganismi patogeni o di loro tossine. Tali microrganismi sono in grado di provocare contaminazioni dirette e indirette degli alimenti che possono verificarsi in ogni fase della produzione, dalle materie prime alla trasformazione, conservazione utilizzazione degli alimenti.

I test microbiologici convenzionali, basati sulla capacità dei microrganismi di svilupparsi e di formare colonie visibili, sono molto sensibili ed economici ma richiedono successivi "steps" colturali e necessitano di tempi piuttosto lunghi. Con l'implementazione del sistema HACCP da parte delle industrie alimentari si è generalmente accresciuta l'esigenza di disporre di metodi di analisi semplici, rapidi ed affidabili per accertare la presenza di batteri patogeni negli alimenti. In particolare, saggi che possano essere completati in poche ore potrebbero essere inclusi nel monitoraggio di alcuni CCP e comunque consentirebbero di adottare rapide azioni correttive in caso di positività. Per soddisfare queste esigenze, in questi ultimi anni sono stati sviluppati metodiche rapide basate su reazioni molecolari o immunologiche. Gran parte di queste metodiche deve ancora essere sottoposta a circuiti di validazione da parte degli enti preposti. Solo allora tali sistemi potranno essere utilizzati in alternativa a quelli tradizionali, per l'evidenziazione dei diversi parametri microbiologici.

Bibliografia

- 1 Barbuti S., Bellelli E., Fara G.M., Giammanco G.: Igiene e medicina preventiva. Bologna. Monduzzi Editore, 1981.
- 2 AA.VV.: Corso teorico pratico: Le prove biotossicologiche nella valutazione della salubrità degli alimenti. Serie rapporti interni ISS 90/2, 1990.
- 3 De Felip G.: Recenti sviluppi di igiene e microbiologia degli alimenti. Tecniche Nuove, Milano, 2001.
- 4 Buchanan R.L., Whiting R.C.: Risk assesment: a means for linking HACCP plans and public health. *J. Food Prot.*, 1998, 61 (11): 1531.
- 5 National Advisory Committee on Microbiological Criteria For Foods: Hazard Analysis and Critical Point principles and applications guidelines. *J. Food Prot.* 1998, 61 (6): 762.
- 6 Mead P.S., Slutsker L., Dietz V., McCaig L.F., Bresee J.S., Shapiro C., Griffin P.M., Tauxe R.V. Food-related illness and death in the United States. *Emerg. Infect. Dis.* 1999, 5 : 607.
- 7 Tindall B.J., Grimont P.A., Garrity G.M., Euzeby J.P.: Nomenclature and taxonomy of the genus *Salmonella*. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2005, 55:521.
- 8 Boyd R. F.: *Microbiologia generale*. Palermo. Medical Books, 1992.
- 9 Caprioli A., Luzzi I., Tozzi A.E., Lana S.: Le infezioni gastroenteriche. L'uomo, gli animali, gli alimenti e l'ambiente : nuovi scenari epidemiologici. ISTISAN congressi 2003, 03/C5.
- 10 Van Pelt W., Van der Zee H., Wannet W.J., Van de Giessen A.W., Mevius D.J., Bolder N.M., Komijn R.E, Van Duynhoven Y.T.: Explosive increase of *Salmonella* Java in poultry in the Netherlands: consequences for public health. *Eurosurveillance* 2003, 8: 31.
- 11 Brown D.J., Mather H., Browning L.M., Coia J.E.: Investigation of Human Infections with *Salmonella* Enterica serovar Java in Scotland and possible association with imported poultry. *Eurosurveillance* 2003, 8: 35.
- 12 La Placa M.: *Principi di microbiologia medica*. Bologna. Società editrice Esculapio, 2000.
- 13 Karmali M.A.: Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 1989, 2: 15.
- 14 Griffin P.M. Tauxe R.V.: The epidemiology of infection caused by *Escherichia coli* O157: H7, other enterohemorrhagic *Escherichia coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol. Rev.* 1991, 13: 60.
- 15 Kaper J. B., O'Brien A. D.: *Escherichia coli* O157:H7 and other Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* Strains. Washington. American Society for Microbiology, 1998.
- 16 Caprioli A., Minelli F., Morabito S., Tozzi A. E.: Zoonosi emergenti: le

- infezioni da *Escherichia coli* O:157 e da altri *E. coli* verocitotossina-produttori in Italia. Notiziario dell'Istituto Superiore di Sanità 1997, 10.
- 17 Rubini S., Cardati G., Amati S., Manna G., Onorati R., Caprioli A., Morabito S.: Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* O157: H7 in sheep milk. *Vet. Rec.* 1999, 144: 56.
 - 18 Costantini A., Gianfranceschi M.: Valutazione della patogenicità e virulenza della *Listeria monocytogenes*. Rapporto ISTISAN 1992, 92/36.
 - 19 Aureli P., Fiorucci G.C., Carili D., Marchiaro G., Novaro O., Leone L., Salmasso S.: An outbreak of febrile gastroenteritis associated with corn contaminated by *Listeria monocytogenes*. *New Eng. J. Med.*, 2000, 342: 1236.
 - 20 Southwick M.D., Purich D.L.: Intarcellular pathogenesis of listeriosis. *New Engl. J. Med.* 1996, 21: 770.
 - 21 Vandamme P., Goossen H.: Taxonomy of *Campylobacter*, *Arcobacter* and *Helicobacter*, a review. *Zentralbl. Bakteriol.* 1992, 276: 447.
 - 22 Nielsen E. M., Engberg J. and Madsen M: Distribution of serotypes of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from Danish patients, poultry, cattle, and swine. *Fems Immuno. Med. Microbiol.* 1997, 19: 47.
 - 23 Wooldridge K. G. and Ketley J. M.: *Campylobacter*-host cell interactions. *Trends Microbiol.* 1997, 5: 96.
 - 24 Nachamkin I., Blaser M.J. and Tompkins L. S.: *Campylobacter jejuni*: Current status and future trends. Washington. American Society for Microbiology, 1992.
 - 25 Rosef O., Gondrosen B., Kapperud G., and Underdal B.: Isolation and characterization of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from domestic animals in Norway. *Appl. Environ. Microbiol.* 1983, 46: 855.
 - 26 Caprioli A., Pezzella C., Morelli R., Giammanco A., Arista S., Crotti D: Enteropathogens associated with childhood diarrhoea in Italy. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 1996, 15: 876.
 - 27 Franciosa G., Fenicia L., Gianfranceschi M., Ferrini A.M., Cannoni V., Deluca S., Aureli P.: *Clostridium botulinum* spores and toxin in mascarpone cheese and other milk products. *J. Food. Prot.* 1999, 62: 867.
 - 28 Halpin-Diohnalek, M.I., Marth E.H.: *Staphylococcus aureus*: production of extracellular compounds and behavior in foods-a review. *J. Food Prot.* 1989, 52: 267.
 - 29 Regolamento recante norme di attuazione della direttiva 94/65/CE, relativa ai requisiti applicabili all'immissione sul mercato di carni macinate e di preparazione di carni. *Gazzetta Ufficiale Italiana* n° 199 del 27/08/1998.
 - 30 Scalfaro C., Delibato E., Orefice L.: Metodi di ricerca di batteri patogeni negli alimenti, *Industrie alimentari*, 2004, 43: 1257.
 - 31 De Medici D., Orefice L.: Assicurazione della qualità nel laboratorio bio-

- logico per il controllo ufficiale degli alimenti. Rapporto ISTISAN, 1997, 97/28
- 32 Coni E., Croci L., Draisci R., Gianfranceschi M., Pisolini B., Sanzini E., Stacchini A.: Linee guida per l'assicurazione della qualità nei laboratori preposti al controllo ufficiale degli alimenti. Rapporto ISTISAN, 1996, 96/1.
 - 33 Rijpens N. and Herman M.F.:Molecular methods for identification and detection of bacterial food pathogens. *J. AOAC Int.*, 2002, 85(4): 984.
 - 34 Orefice L., Aureli P.: Metodi e limiti microbiologici nel controllo degli alimenti. Atti del Convegno:I controlli microbiologici degli alimenti - le normative italiana ed europea - metodi ufficiali e rapidi: costi, problematiche ed applicabilità. Milano, 23 ottobre 1997. Morgana ed. scientifiche e tecniche.
 - 35 Swaminathan B., Feng P.: Rapid detection of food-borne pathogenic bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 1994, 48: 401.
 - 36 Croci L., Delibato E, Volpe G, Palleschi G.: A rapid electrochemical ELISA for the detection of *Salmonella* in meat samples. *Anal. Lett.* 2001, 34(15): 2597.
 - 37 Mullis K.: La scoperta della reazione a catena della polimerasi. *Le Scienze* 1990, 262: 32.
 - 38 Marin M.G. : Tecniche di amplificazione genica: dal laboratorio alla pratica clinica. Milano. Sorbona, 1996.
 - 39 De Medici D., Croci L., Delibato E., Di Pasquale S., Filetici E., Toti L.: Evaluation of DNA extraction methods for use in combination with SYBR Green I Real-Time PCR to detect *Salmonella Enterica* serovar Enteritidis in poultry. *Appl. Environ. Microbiol.* 2003, 69(6): 3456.
 - 40 Hoorfar J., Cook N., Malorny B., Wagner M., De Medici D., Abdulmawjood A., Fach P.: Making internal amplification control mandatory for diagnostic PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2003, 41(12): 5835.
 - 41 Croci L., Delibato E., Volpe G., De Medici D. and Palleschi G.: Comparison of PCR, electrochemical ELISA and the standard cultural method for detecting salmonella spp. in meat products. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004; 70(3): 1393.
 - 42 Byoung-Kwon H., Yadilka M., Schreiber E., Bhunia K., Nakatsu H.:Subtyping of foodborne and environmental isolates of *Escherichia coli* by multiplex-PCR, rep-PCR, PFGE, ribotyping and AFLP. *J. of Microbiol. Methods.* 2003, 53 (3): 387.
 - 43 Fukushima H., Tsunomori Y., Seki R.: Duplex real-time SYBR green PCR assays for detection of 17 species of food or waterborne pathogens in stools. *J. Clin. Microbiol.* 2003, 41: 5134.
 - 44 Sails A.D., Fox A.J., Bolton F.J., Wareing D.R., Greenway D.L.: A real-time PCR assays for the detection of *Campylobacter jejuni* in foods after enrichment culture. *Appl. Environ Microbiol.* 2003; 69: 1383-90.

- 45 Tamada Y., Nakaoka Y., Nishimori K., Doi A., Kumaki T., Uemura N., Tanaka K., Makino S.I., Sameshima T., Akiba M., Nakazawa M. and Uchida I.: Molecular typing and epidemiological study of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium isolates from cattle by fluorescent amplified-fragment length polymorphism fingerprinting and pulsed-field gel electrophoresis. *J. Clin. Microbiol.* 2001, 39: 1057.
- 46 Inglis G.D., Kalischuk LD. : Direct quantification of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter lanienae* in feces of cattle by real-time quantitative PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 2004, 70 (4): 2296-2306.
- 47 Wang X., Jothikumar N., Griffiths M.W. : Enrichment and DNA extraction protocols for the simultaneous detection of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in raw sausage meat with multiplex real-time PCR. *J Food Prot.* 2004, 67(1):189-92.
- 48 Perelle S., Josefsen M., Hoorfar J., Dilasser F., Grout J., Fach P.: A LightCycler real-time PCR hybridization probe assay for detecting food-borne thermophilic *Campylobacter*. *Molec. Cell. Prob.* 2004, 18: 321-327
- 49 Malorny B., Paccassoni E., Fach P., Bunge C., Martin A., Helmuth R.: Diagnostic real-time PCR for Detection of *Salmonella* in food. *Appl. Environm. Microbiol.* 2004, 70 (12): 7046-7052
- 50 Roda A.: Tecniche immunologiche con marcatori non isotopici. Milano. Emmezzeta Editoriale, 1988.
- 51 Ishikawa E., Miyai K., Kawai T.: Dosaggi immunoenzimatici. (Traduzione italiana di G. Scutari). Padova. Piccin, 1986.
- 52 Meker V.M., Bystryak S.M.: Application of o-phenylendiamine as a fluorogenic substrate in peroxidase-mediated enzyme-linked immunosorbent assay. *Anal. Chim. Acta* 1992, 264: 359.
- 53 Shridi F.A., Chitranukroh A., Poufarzaneh M., Billing B.H., Ekeke G.: A direct fluoroimmunoassay for conjugated chenodeoxycholic acid using antibody coupling to magnetisable particles. *Ann. Clin. Biochem.*, 1980, 17(4):188.
- 54 Botchkareva A.E., Eremin S.A., Montoya A., Manclus J.J., Mickova B., Rauch P., Fini F., Girotti S.: Development of chemiluminescent ELISAs to DDT and its metabolites in food and environmental samples. *J. Immunol. Methods.* 2003, 283: 45.
- 55 Marquette C.A., Coulet P.R., Blum L. J.: Semi-automated membrane chemiluminescent immunosensor for flow injection analysis of okadaic acid in mussels. *Anal. Chim. Acta* 1999, 398: 173.
- 56 Chang T.C., Huang S.H.: An enzyme-linked immunosorbent assay for rapid detection of *Staphylococcus aureus* in processed foods. *J. Food Prot.* 1994, 57: 184.
- 57 Palleschi G.: Biosensori i medicina. *Caleidoscopio*. Genova. Medical System, 1989.

- 58 Carunchio V.: *Biotechnologie e chimica analitica*. Roma. Aracne editrice, 2001.
- 59 Thompson R.Q., Barone G.C., Halsall H.B., Heineman W.R.: Comparison of methods for following alkaline phosphatase catalysis: spectrophotometric versus amperometric detection. *Anal. Biochem.*, 1991, 192: 90.
- 60 Boitieux J.L., Desmet G, Thomas D.: An antibody electrode, preliminary report on a new approach in enzyme immunoassay. *Clin. Chem.*, 1979, 25: 318.
- 61 Boitieux J.L., Thomas D., Desmet G.: Oxygen electrode-based enzyme immunoassay for the amperometric determination of hepatitis B surface antigen. *Anal. Clin. Acta* 1984, 163: 309.
- 62 Itagaki H., Hakoda Y., Suzuki Y., Haga M.: Drug sensor : an enzyme immunoelectrode for theophylline. *Chem. Pharm. Bull.*, 1983, 31: 1283.
- 63 Xu Y., Suleiman A.A.: Reusable amperometric immunosensor for the determination of cortisol. *Anal. Lett.* 1997, 30: 2675.
- 64 Keay R.W., McNeil C.J.: Separation-free electrochemical immunosensor for rapid determination of atrazine. *Biosensors Bioelectron.* 1998, 13: 963
- 65 Rosen I., Rishpon J.: Alkaline phosphatase as a label for heterogenous immunoelectrochemical sensor. *J. Electroanal. Chem.* 1989, 258: 27.
- 66 Cardosi M., Birch S., Talbot J.: An electrochemical immunoassay for *Clostridium perfringens* phospholipase C. *Electroanalysis* 1991, 3: 169
- 67 Doyle M.J., Halsall H.B., Heineman W.R.: Enzyme-linked immunoadsorbent assay with electrochemical detection for an acid glycoprotein. *Anal. Chem.* 1984, 56: 2355.
- 68 Brooks J., Mihabibollahi B., Kroll R.G.: Experimental enzyme-linked amperometric immunosensor for the detection of salmonellas in foods. *J. Appl. Bacteriol.* 1992, 73: 189.
- 69 Tang H.T., Lunte C.E., Halsall H.B., Heineman W.R.: p-Aminophenylphosphate: an improved substrate for electrochemical enzyme immunoassay. *Anal. Chim. Acta*, 1988, 214: 187.
- 70 Gil E.P., Tang H.T., Halsall H.B., Heineman W.R., Misiego A.S.: Competitive heterogenous enzyme immunoassay for theophylline by Flow Injection Analysis with electrochemical detection. *Clin Chem.* 1990, 36: 662.
- 71 Cousino M.A., Heineman W.R., Halsall H.B.: Electrochemical immunoassay: zeptomole detection limits. *Ann. Chim.* 1997, 87: 93.
- 72 Trau D., Theuerl T., Wilmer M., Meusel M., Spener F.: Development of an amperometric flow injection immunoanalysis system for the determination of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid in water. *Biosensors Bioelectron.* 1997, 12: 499.
- 73 Laschi S., Franek M., Mascini M.: Screen-printed electrochemical immunosensors for PCB detection. *Electroanalysis*, 2000, 12 (16): 1293.

- 74 Kalab T., Skladal P.: A disposable amperometric immunosensor for 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Anal Chim. Acta*, 1995, 304: 361.
- 75 Krishnam R., Ghindilis A.L., Atanasov P., Wilkins E.: Fast amperometric immunoassay utilizing highly dispersed electrode material. *Anal Lett.* 1995, 28: 2459
- 76 Epton R., Hobson M.E. Marr G.: Oxidation of ferrocene and some substituted ferrocenes in the presence of horseradish peroxidase. *J. Organomet Chem.* 1978, 149: 231.
- 77 Volpe G., Compagnone D., Draisci R., Palleschi G.: 3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine as electrochemical substrate for horseradish peroxidase based enzyme immunoassays. A comparative study. *Analyst* 1998, 123: 1303.
- 78 Ye Ye J., Letcher S.V., Rand A.G.: Piezoelectric biosensor for detection of *Salmonella typhimurium*. *J. Food Sci.* 1997, 62 (5): 1067.
- 79 Gehring A.G., Brewster J.D., Irwin P.L., Tu S.-I., Van Houten L.J.V.: 1-Naphthyl phosphate as an enzymatic substrate for enzyme-linked immunomagnetic electrochemistry. *J. Electroanal. Chem.* 1999, 469: 27.
- 80 Gehring A.G., Crawford C.G., Mazenko R.S., Van Houten L.J., Brewster J.D., Enzyme-linked immunomagnetic electrochemical detection of *Salmonella typhimurium*. *J. Immunol. Methods* 1996, 195: 15.
- 81 Safarik I., Safarikova M.: Use of magnetic techniques for the isolation of cells. *J. Chromatogr. B* 1999, 722: 33 – 53.
- 82 Safarik I., Safarikova M., Forsythe S.J.: The application of magnetic separations in applied microbiology. *J. Appl. Bacteriol.* 1995, 78: 575.
- 83 RiRishpon J., Invitski D.: An amperometric enzyme-channeling immunosensors', *Biosensors Bioelectron.* 1997, 12 (3): 195.
- 84 Le Le D., He F., Jiang T.J., Nie L., Yao S.: A goat-anti-human IgG modified piezoimmunosensor for *Staphylococcus aureus* detection, *J. Microbiol. Meth.* 1995, 23: 229.
- 85 Perez F. G., Mascini M., Turner A. P. F.: Immunomagnetic separation with mediated flow injection analysis amperometric detection of viable *E. coli* 0157. *Anal. Chem.* 1998, 70: 2380.
- 86 Gau J., Lan E. H., Dunn B., Ho C., Woo J.C.S.: A MEMS based amperometric detector for *E. coli* bacteria using self-assembled monolayers. *Biosensors Bioelectron.* 2001, 16: 745.
- 87 Pless P., Futschik K., Schopf E.: Rapid detection of salmonellae by means of a new impedance-splitting method. *J. Food Prot.* 1994, 57 (5): 369.
- 88 Chang Y.H., Chang T. C., Kao E. F., Chou C.: Detection of protein A produced by *Staphylococcus aureus* with a fibre-optic-based biosensor. *Biosci. Biotech. Biochem.* 1996, 60 (10): 1571.
- 89 Buchanan R.L., Doly M. P.: Foodborne disease significance of *E. coli* 0157:H7 and other enterohemorrhagic *E. coli*. *Food Technol.* 1997, 51: 69.

- 90 Mikkelsen S. R.: Electrochemical biosensors for DNA sequence detection, *Electroanal.* 1996, 8: 15.
- 91 Tietjen M., Fung D.Y.C.: Salmonellae and food safety. *Critical Rev. Microbiol.*1995, 21 (1): 53.
- 92 Jones D.D., Law R., Bej A.K.: Detection of Salmonella spp in Oysters using polymerase chain reactions (PCR) and gene probes. *J. Food Sci.* 1993. 58: 1191.
- 93 De Lumley-Woodyear, Campbell C.N., Freeman E., Freeman A., Georgiou G., Heller A.: Rapid amperometric verification of PCR amplification of DNA. *Anal. Chem.* 1999 71: 535.
- 94 Wang J., Rivas G., Parrado C., Xiaohua C., Flair M.: Electrochemical biosensor for detecting DNA sequences from pathogenic protozoan *Cryptosporidium parvum*. *Talanta* 1997, 44: 2003.
- 95 Wang J., Rivas G., Cai X. H.: Screen-printed electrochemical hybridisation biosensor for the detection of DNA sequences from the *Escherichia coli* pathogen. *Electroanal.*1997, 9: 395.
- 96 Marrazza G., Chianella I., Mascini M.: Disposable DNA electrochemical biosensors for environmental monitoring. *Anal. Chim. Acta* 1999, 387: 297.
- 97 Wang J.: Towards genelectronics: electrochemical biosensing of DNA hybridization. *Chem. Eur. J.* 1999, 51: 681.
- 98 Lucarelli F., Palchetti I., Marrazza G., Mascini M.: Electrochemical DNA biosensor as a screening tool for the detection of toxicants in water and wastewater samples. *Talanta* 2002, 56: 949.
- 99 Wang J., Rivas G., Fernandes J.R., Paz J.L.L., Jiang M., Waymire R.: Indicator-free electrochemical DANN hybridization biosensor. *Anal. Chi. Acta* 1998, 375: 197.

Indice

Editoriale	pag. 3
Capitolo 1 - Tossinfezioni alimentari	» 5
Capitolo 2 - Batteri patogeni responsabili di tossinfezioni alimentari ..	» 11
Capitolo 3 - Metodiche rapide e innovative	» 23
Conclusioni	» 51
Bibliografia	» 52
Indice	» 59

Caleidoscopio

Italiano

... il futuro ha il cuore antico  MEDICAL SYSTEMS SpA

1. Rassu S.: *Principi generali di endocrinologia*. Gennaio '83
2. Rassu S.: *L'ipotalamo endocrino*. Giugno '83
3. Rassu S.: *L'ipofisi*. Dicembre '83
4. Alagna., Masala A.: *La prolattina*. Aprile '84
5. Rassu S.: *Il pancreas endocrino*. Giugno '84
6. Fiorini I., Nardini A.: *Citomegalovirus, Herpes virus, Rubella virus (in gravidanza)*. Luglio '84.
7. Rassu S.: *L'obesita'*. Settembre '84
8. Franceschetti F., Ferraretti A.P., Bolelli G.F., Bulletti C.: *Aspetti morfofunzionali dell'ovaio*. Novembre '84.
9. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (1)*. Dicembre '84.
10. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (2) parte prima*. Gennaio '85.
11. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (2) parte seconda*. Febbraio '85.
12. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (3) parte prima*. Aprile '85.
13. Nacamulli D., Girelli M.E., Zanatta G.P., Busnardo B.: *Il TSH*. Giugno '85.
14. Facchinetti F. e Petraglia F.: *La β -endorfina plasmatica e liquorale*. Agosto '85.
15. Baccini C.: *Le droghe d'abuso (1)*. Ottobre '85.
16. Kubasik N.P.: *Il dosaggio radioimmunologico (3) parte seconda*. Dicembre '85.
17. Nuti R.: *Fisiologia della vitamina D: Trattamento dell'osteoporosi post-menopausale*. Febbraio '86
18. Cavallaro E.: *Ipnosi: una introduzione psicofisiologica*. Marzo '86.
19. Fanetti G.: *AIDS: trasfusione di sangue emoderivati ed emocomponenti*. Maggio '86.
20. Fiorini I., Nardini A.: *Toxoplasmosi, immunologia e clinica*. Luglio '86.
21. Limone P.: *Il feocromocitoma*. Settembre '86.
22. Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Flamigni C.: *Il Testicolo. Aspetti morfo-funzionali e clinici*. Novembre '86.
23. Bolcato A.: *Allergia*. Gennaio '87.
24. Kubasik N.P.: *Il dosaggio enzimologico e fluorimmunologico*. Febbraio '87.
25. Carani C.: *Patologie sessuali endocrino-metaboliche*. Marzo '87.
26. Sanna M., Carcassi R., Rassu S.: *Le banche dati in medicina*. Maggio '87.
27. Bulletti C., Filicori M., Bolelli G.F., Jasonni V.M., Flamigni C.: *L'amenorrea*. Giugno '87.
28. Zilli A., Pagni E., Piazza M.: *Il paziente terminale*. Luglio '87.
29. Pisani E., Montanari E., Patelli E., Trinchieri A., Mandressi A.: *Patologie prostatiche*. Settembre '87.
30. Cingolani M.: *Manuale di ematologia e citologia ematologica*. Novembre '87.
31. Kubasik N.P.: *Ibridomi ed anticorpi monoclonali*. Gennaio '88.

32. Andreoli C., Costa A., Di Maggio C.: *Diagnostica del carcinoma mammario*. Febbraio '88.
33. Jannini E.A., Moretti C., Fabbri A., Gnessi L., Isidori A.: *Neuroendocrinologia dello stress*. Marzo '88.
34. Guastella G., Cefalù E., Carmina M.: *La fecondazione in vitro*. Maggio '88.
35. Runello F., Garofalo M.R., Sicurella C., Filetti S., Vigneri R.: *Il gozzo nodulare*. Giugno '88.
36. Baccini C.: *Le droghe d'abuso (2)*. Luglio '88.
37. Piantino P., Pecchio F.: *Markers tumorali in gastroenterologia*. Novembre '88.
38. Biddau P.F., Fiori G.M., Murgia G.: *Le leucemie acute infantili*. Gennaio '89.
39. Sommariva D., Branchi A.: *Le dislipidemie*. Febbraio '89.
40. Butturini U., Butturini A.: *Aspetti medici delle radiazioni*. Marzo '89.
41. Cafiero F., Gipponi M., Paganuzzi M.: *Diagnostica delle neoplasie colo-rettali*. Aprile '89.
42. Palleschi G.: *Biosensori in Medicina*. Maggio '89.
43. Franciotta D.M., Melzi D'Eril G.V. e Martino G.V.: *HTLV-I*. Giugno '89.
44. Fanetti G.: *Emostasi: fisiopatologia e diagnostica*. Luglio '89.
45. Contu L., Arras M.: *Le popolazioni e le sottopopolazioni linfocitarie*. Settembre '89.
46. Santini G.F., De Paoli P., Basaglia G.: *Immunologia dell'occhio*. Ottobre '89.
47. Gargani G., Signorini L.F., Mandler F., Genchi C., Rigoli E., Faggi E.: *Infezioni opportunistiche in corso di AIDS*. Gennaio '90.
48. Banfi G., Casari E., Murone M., Bonini P.: *La coriogonadotropina umana*. Febbraio '90.
49. Pozzilli P., Buzzetti R., Procaccini E., Signore E.: *L'immunologia del diabete mellito*. Marzo '90.
50. Cappi F.: *La trasfusione di sangue: terapia a rischio*. Aprile '90.
51. Tortoli E., Simonetti M.T.: *I micobatteri*. Maggio '90.
52. Montecucco C.M., Caporali R., De Gennaro F.: *Anticorpi antinucleo*. Giugno '90.
53. Manni C., Magalini S.I. e Proietti R.: *Le macchine in terapia intensiva*. Luglio '90.
54. Goracci E., Goracci G.: *Gli allergo-acari*. Agosto '90.
55. Rizzetto M.: *L'epatite non A non B (tipo C)*. Settembre '90.
56. Filice G., Orsolini P., Soldini L., Razzini E. e Gulminetti R.: *Infezione da HIV-1: patogenesi ed allestimento di modelli animali*. Ottobre '90.
57. La Vecchia C. *Epidemiologia e prevenzione del cancro (I)*. Gennaio '91.
58. La Vecchia C. *Epidemiologia e prevenzione del cancro (II)*. Febbraio '91.
59. Santini G.F., De Paoli P., Mucignat G., e Basaglia G., Gennari D.: *Le molecole dell'adesività nelle cellule immunocompetenti*. Marzo '91.
60. Bedarida G., Lizioli A.: *La neopterina nella pratica clinica*. Aprile '91.
61. Romano L.: *Valutazione dei kit immunochimici*. Maggio '91.
62. Dondero F. e Lenzi A.: *L'infertilità immunologica*. Giugno '91.
63. Bologna M. Biordi L. Martinotti S.: *Gli Oncogeni*. Luglio '91.
64. Filice G., Orsolini P., Soldini L., Gulminetti R., Razzini E., Zambelli A. e Scevola D.: *Infezione-malattia da HIV in Africa*. Agosto '91.
65. Signore A., Chianelli M., Fiore V., Pozzilli P., Andreani D.: *L'immunoscintigrafia nella diagnosi delle endocrinopatie autoimmuni*. Settembre '91.
66. Gentilomi G.A.: *Sonde genetiche in microbiologia*. Ottobre '91.
67. Santini G.F., Fornasiero S., Mucignat G., Besaglia G., Tarabini-Castellani G. L., Pascoli L.: *Le sonde di DNA e la virulenza batterica*. Gennaio '92.
68. Zilli A., Biondi T.: *Il piede diabetico*. Febbraio '92.
69. Rizzetto M.: *L'epatite Delta*. Marzo '92.

70. Bracco G., Dotti G., Pagliardini S., Fiorucci G.C.: *Gli screening neonatali*. Aprile '92.
71. Tavani A., La Vecchia C.: *Epidemiologia delle patologie cardio e cerebrovascolari*. Luglio '92.
72. Cordido F., Peñalva A., De la Cruz L. F., Casanueva F. F., Dieguez C.: *L'ormone della crescita*. Agosto '92.
73. Contu L., Arras M.: *Molecole di membrana e funzione immunologica (I)*. Settembre '92.
74. Ferrara S.: *Manuale di laboratorio I*. Ottobre '92.
75. Gori S.: *Diagnosi di laboratorio dei patogeni opportunisti*. Novembre '92.
76. Ferrara S.: *Manuale di laboratorio II*. Gennaio '93.
77. Pinna G., Veglio F., Melchio R.: *Ipertensione Arteriosa*. Febbraio '93.
78. Alberti M., Fiori G.M., Biddau P.: *I linfomi non Hodgkin*. Marzo '93.
79. Arras M., Contu L.: *Molecole di membrana e funzione immunologica (II)*. Aprile '93.
80. Amin R.M., Wells K.H., Poiesz B.J.: *Terapia antiretrovirale*. Maggio '93.
81. Rizzetto M.: *L'epatite C*. Settembre '93.
82. Andreoni S.: *Diagnostica di laboratorio delle infezioni da lieviti*. Ottobre '93.
83. Tarolo G.L., Bestetti A., Maioli C., Giovanella L.C., Castellani M.: *Diagnostica con radio-nuclidi del Morbo di Graves-Basedow*. Novembre '93.
84. Pinzani P., Messeri G., Pazzagli M.: *Chemiluminescenza*. Dicembre '93.
85. Hernandez L.R., Osorio A.V.: *Applicazioni degli esami immunologici*. Gennaio 94.
86. Arras M., Contu L.: *Molecole di Membrana e funzione immunologica. Parte terza: I Infociti B*. Febbraio '94.
87. Rossetti R.: *Gli streptococchi beta emolitici di gruppo B (SGB)*. Marzo '94.
88. Rosa F., Lanfranco E., Balleari E., Massa G., Ghio R.: *Marcatori biochimici del rimodellamento osseo*. Aprile '94.
89. Fanetti G.: *Il sistema ABO: dalla sierologia alla genetica molecolare*. Settembre '94.
90. Buzzetti R., Cavallo M.G., Giovannini C.: *Citochine ed ormoni: Interazioni tra sistema endocrino e sistema immunitario*. Ottobre '94.
91. Negrini R., Ghielmi S., Savio A., Vaira D., Miglioli M.: *Helicobacter pylori*. Novembre '94.
92. Parazzini F.: *L'epidemiologia della patologia ostetrica*. Febbraio '95.
93. Proietti A., Lanzafame P.: *Il virus di Epstein-Barr*. Marzo '95.
94. Mazzarella G., Calabrese C., Mezzogiorno A., Peluso G.F., Micheli P, Romano L.: *Immunoflogosi nell'asma bronchiale*. Maggio '95.
95. Manduchi I.: *Steroidi*. Giugno '95.
96. Magalini S.I., Macaluso S., Sandroni C., Addario C.: *Sindromi tossiche sostenute da principi di origine vegetale*. Luglio '95.
97. Marin M.G., Bresciani S., Mazza C., Albertini A., Cariani E.: *Le biotecnologie nella diagnosi delle infezioni da retrovirus umani*. Ottobre '95.
98. La Vecchia C., D'Avanzo B., Parazzini F., Valsecchi M.G.: *Metodologia epidemiologica e sperimentazione clinica*. Dicembre '95.
99. Zilli A., Biondi T., Conte M.: *Diabete mellito e disfunzioni conoscitive*. Gennaio '96.
100. Zazzeroni F., Muzi P., Bologna M.: *Il gene oncosoppressore p53: un guardiano del genoma*. Marzo '96.
101. Cogato I. Montanari E.: *La Sclerosi Multipla*. Aprile '96.
102. Carosi G., Li Vigni R., Bergamasco A., Caligaris S., Casari S., Matteelli A., Tebaldi A.: *Malattie a trasmissione sessuale*. Maggio '96.
103. Fiori G. M., Alberti M., Murtas M. G., Casula L., Biddau P.: *Il linfoma di Hodgkin*. Giugno '96.

104. Marcante R., Dalla Via L.: *Il virus respiratorio sinciziale*. Luglio '96.
105. Giovanella L., Ceriani L., Roncari G.: *Immunodosaggio dell'antigene polipeptidico tissutale specifico (TPS) in oncologia clinica: metodologie applicative*. Ottobre '96.
106. Aiello V., Palazzi P., Calzolari E.: *Tecniche per la visualizzazione degli scambi cromatici (SCE): significato biologico e sperimentale*. Novembre '96.
107. Morganti R.: *Diagnostica molecolare rapida delle infezioni virali*. Dicembre '96.
108. Andreoni S.: *Patogenicità di Candida albicans e di altri lieviti*. Gennaio '97.
109. Salemi A., Zoni R.: *Il controllo di gestione nel laboratorio di analisi*. Febbraio '97.
110. Meisner M.: *Procalcitonina*. Marzo '97.
111. Carosi A., Li Vigni R., Bergamasco A.: *Malattie a trasmissione sessuale (2)*. Aprile '97.
112. Palleschi G., Moscone D., Compagnone D.: *Biosensori elettrochimici in Biomedicina*. Maggio '97.
113. Valtriani C., Hurle C.: *Citofluorimetria a flusso*. Giugno '97.
114. Ruggenini Moiraghi A., Gerbi V., Ceccanti M., Barcucci P.: *Alcol e problemi correlati*. Settembre '97.
115. Piccinelli M.: *Depressione Maggiore Unipolare*. Ottobre '97.
116. Pepe M., Di Gregorio A.: *Le Tiroiditi*. Novembre '97.
117. Cairo G.: *La Ferritina*. Dicembre '97.
118. Bartoli E.: *Le glomerulonefriti acute*. Gennaio '98.
119. Bufi C., Tracanna M.: *Computerizzazione della gara di Laboratorio*. Febbraio '98.
120. National Academy of Clinical Biochemistry: *Il supporto del laboratorio per la diagnosi ed il monitoraggio delle malattie della tiroide*. Marzo '98.
121. Fava G., Rafanelli C., Savron G.: *L'ansia*. Aprile '98.
122. Cinco M.: *La Borreliosi di Lyme*. Maggio '98.
123. Giudice G.C.: *Agopuntura Cinese*. Giugno '98.
124. Baccini C.: *Allucinogeni e nuove droghe (I)*. Luglio '98.
125. Rossi R.E., Monasterolo G.: *Basofili*. Settembre '98.
126. Arcari R., Grosso N., Lezo A., Boscolo D., Cavallo Perin P.: *Eziopatogenesi del diabete mellito di tipo I*. Novembre '98.
127. Baccini C.: *Allucinogeni e nuove droghe (II)*. Dicembre '98.
128. Muzi P., Bologna M.: *Tecniche di immunoistochimica*. Gennaio '99.
129. Morganti R., Pistello M., Vatteroni M.L.: *Monitoraggio dell'efficacia dei farmaci antivirali*. Febbraio '99.
130. Castello G., Silvestri I.: *Il linfocita quale dosimetro biologico*. Marzo '99.
131. Aiello V., Caselli M., Chiamenti C.M.: *Tumorigenesi gastrica Helicobacter pylori - correlata*. Aprile '99.
132. Messina B., Tirri G., Fraioli A., Grassi M., De Bernardi Di Valserra M.: *Medicina Termale e Malattie Reumatiche*. Maggio '99.
133. Rossi R.E., Monasterolo G.: *Eosinofili*. Giugno '99.
134. Fusco A., Somma M.C.: *NSE (Enolasi Neurono-Specifica)*. Luglio '99.
135. Chieffi O., Bonferraro G., Fimiani R.: *La menopausa*. Settembre '99.
136. Giglio G., Aprea E., Romano A.: *Il Sistema Qualità nel Laboratorio di Analisi*. Ottobre '99.
137. Crotti D., Luzzi I., Piersimoni C.: *Infezioni intestinali da Campylobacter e microrganismi correlati*. Novembre '99.
138. Giovanella L.: *Tumori Neuroendocrini: Diagnosi e fisiopatologia clinica*. Dicembre '99.

139. Paladino M., Cerizza Tosoni T.: *Umanizzazione dei Servizi Sanitari: il Case Management*. Gennaio 2000.
140. La Vecchia C.: *Come evitare la malattia*. Febbraio 2000.
141. Rossi R.E., Monasterolo G.: *Cellule dendritiche*. Marzo 2000.
142. Dammacco F.: *Il trattamento integrato del Diabete tipo 1 nel bambino e adolescente (I)*. Aprile 2000.
143. Dammacco F.: *Il trattamento integrato del Diabete tipo 1 nel bambino e adolescente (II)*. Maggio 2000.
144. Croce E., Olmi S.: *Videolaparoscopia*. Giugno 2000.
145. Martelli M., Ferraguti M.: *AllergoGest*. Settembre 2000.
146. Giannini G., De Luigi M.C., Bo A., Valbonesi M.: *TTP e sindromi correlate: nuovi orizzonti diagnostici e terapeutici*. Gennaio 2001.
147. Rassu S., Manca M.G., Pintus S., Cigni A.: *L'umanizzazione dei servizi sanitari*. Febbraio 2001.
148. Giovannella L.: *I tumori della tiroide*. Marzo 2001.
149. Dessì-Fulgheri P., Rappelli A.: *L'ipertensione arteriosa*. Aprile 2001.
150. The National Academy of Clinical Biochemistry: *Linee guida di laboratorio per lo screening, la diagnosi e il monitoraggio del danno epatico*. Settembre 2001.
151. Dominici R.: *Riflessioni su Scienza ed Etica*. Ottobre 2001.
152. Lenziardi M., Fiorini I.: *Linee guida per le malattie della tiroide*. Novembre 2001.
153. Fazii P.: *Dermatofiti e dermatofitosi*. Gennaio 2002.
154. Suriani R., Zanella D., Orso Giacone G., Ceretta M., Caruso M.: *Le malattie infiammatorie intestinali (IBD) Eziopatogenesi e Diagnostica Sierologica*. Febbraio 2002.
155. Trombetta C.: *Il Varicocele*. Marzo 2002.
156. Bologna M., Colorizio V., Meccia A., Paponetti B.: *Ambiente e polmone*. Aprile 2002.
157. Correale M., Paradiso A., Quaranta M.: *I Markers tumorali*. Maggio 2002.
158. Loviselli A., Mariotti S.: *La Sindrome da bassa T3*. Giugno 2002.
159. Suriani R., Mazzucco D., Venturini I., Mazzarello G., Zanella D., Orso Giacone G.: *Helicobacter Pylori: stato dell'arte*. Ottobre 2002.
160. Canini S.: *Gli screening prenatali: marcatori biochimici, screening nel 1° e 2° trimestre di gravidanza e test integrato*. Novembre 2002.
161. Atzeni M.M., Masala A.: *La β -talassemia omozigote*. Dicembre 2002.
162. Di Serio F.: *Sindromi coronariche acute*. Gennaio 2003.
163. Muzi P., Bologna M.: *Il rischio di contaminazione biologica nel laboratorio biosanitario*. Febbraio 2003.
164. Magni P., Ruscica M., Verna R., Corsi M.M.: *Obesità: fisiopatologia e nuove prospettive diagnostiche*. Marzo 2003.
165. Magri G.: *Aspetti biochimici e legali nell'abuso alcolico*. Aprile 2003.
166. Rapporto dello Hastings Center: *Gli scopi della medicina: nuove priorità*. Maggio 2003.
167. Beelke M., Canovaro P., Ferrillo F.: *Il sonno e le sue alterazioni*. Giugno 2003.
168. Macchia V., Mariano A.: *Marcatori tumorali nel cancro della vescica*. Luglio 2003.
169. Miragliotta G., Barra Parisi G., De Sanctis A., Vinci E.: *La Tuberculosi Polmonare: Diagnostica di Laboratorio*. Agosto 2003.
170. Aebischer T.: *Il Comitato Internazionale della Croce Rossa ed il Diritto Internazionale Umanitario*. Settembre 2003.
171. Martino R., Frallicciardi A., Tortoriello R.: *Il manuale della sicurezza*. Ottobre 2003.

172. Canigiani S. e Volpini M.: *Infarto acuto del miocardio: biochimica del danno cellulare e marcatori di lesione*. Novembre 2003.
173. La Brocca A., Orso Giacone G., Zanella D., Ceretta M.: *Laboratorio e clinica delle principali affezioni tiroidee*. Dicembre 2003.
174. Savron G.: *Le Fobie*. Gennaio 2004.
175. Paganetto G.: *Evoluzione storica del rischio di patologie umane per contaminazione chimica ambientale*. Febbraio 2004.
176. Giovannella L.: *Iperparatiroidismo e tumori paratiroidi*. Marzo 2004.
177. Severino G., Del Zompo M.: *Farmacogenomica: realtà e prospettive per una "Medicina Personalizzata"*. Aprile 2004.
178. Arigliano P.L.: *Strategie di prevenzione dell'allergia al lattice nelle strutture sanitarie*. Maggio 2004.
179. Bruni A.: *Malattia di Alzheimer e Demenza Frontotemporale*. Giugno 2004.
180. Perdelli F., Mazzarello G., Bassi A.M., Perfumo M., Dalleria M.: *Eziopatogenesi e diagnostica allergologica*. Luglio 2004.
181. Franzoni E., Gualandi P., Pellegrini G.: *I disturbi del comportamento alimentare*. Agosto 2004.
182. Grandi G., Peyron F.: *La toxoplasmosi congenita*. Settembre 2004.
183. Rocca D.L., Repetto B., Marchese A., Debbia E.A.: *Patogeni emergenti e resistenze batteriche*. Ottobre 2004.
184. Tosello F., Marsano H.: *Scientific English Handout*. Novembre 2004.
185. La Brocca A., Orso Giacone G., Zanella D.: *Ipertensione arteriosa secondaria: clinica e laboratorio*. Dicembre 2004.
186. Paganetto G.: *Malattie Neoplastiche: dalla Paleopatologia alle Fonti Storiche*. Gennaio 2005.
187. Savron G.: *La sindrome dai mille tic: il disturbo di Gilles de la Tourette*. Febbraio 2005.
188. Magrì G., Baghino E., Florida M., Ghiara F.: *Leishmania*. Marzo 2005.
189. Lucca U., Forloni G., Tiraboschi P., Quadri P., Tettamanti M., Pasina L.: *Invecchiamento, deterioramento cognitivo e malattia di Alzheimer*. Aprile 2005.
190. Volpe G., Delibato E., Orefice L., Palleschi G.: *Tossinfezioni alimentari e metodiche recenti ed innovative per la ricerca dei batteri patogeni responsabili*. Maggio 2005.



I volumi disponibili su Internet nel sito www.medicalsystems.it sono riportati in nero mentre in grigio quelli non ancora disponibili su Internet.

Inoltre sono disponibili un limitato numero di copie di alcuni numeri del Caleidoscopio che ormai sono "storiche". Qualora mancassero per completare la collana potete farne richiesta al collaboratore Medical Systems della Vostra zona. I numeri sono: Caleidoscopio 14, 18, 33, 40, 48, 49, 50, 54, 65, 68, 84, 100, 106, 118, 121, 126, 129, 130, 131, 132, 133, 134. I volumi verranno distribuiti sino ad esaurimento e non verranno ristampati se non in nuove edizioni.

Caleidoscopio
Rivista mensile di Medicina
anno 23, numero 190

Direttore Responsabile

Sergio Rassu
Tel. mobile 338 2202502
E-mail: sergiorassu@libero.it

Progettazione e Realizzazione



Restless Architect
of Human Possibilities s.a.s.

Consulenti di Redazione

Giancarlo Mazzocchi ed
Angelo Maggio

Responsabile Ufficio Acquisti

Giusti Cunietti

Segretaria di Direzione

Maria Speranza Giola
Giovanna Nieddu

Servizio Abbonamenti

Maria Grazia Papalia
Flavio Damarciassi

EDITORE

... il futuro ha il cuore antico  **MEDICAL SYSTEMS SpA**

Via Rio Torbido, 40
16165 Genova (Italy)

Tel. 010 83401 Numero Verde 800 801005 (senza prefisso);
Telefax 010/8340310- 809070.

Internet URL: <http://www.medicalsystems.it>

La Medical Systems pubblica anche le seguenti riviste: Caleidoscopio Illustrato, Caleidoscopio Letterario, Giornale della Associazione per l'Automazione del Laboratorio, Guida Pratica Immulite[®], Journal of Clinical Ligand Assay, Pandora, Tribuna Biologica e Medica.

Stampa

Tipolitografia Nuova ATA
Via Giovanni Torti, 32c/r - Genova
Tel. 010 513120 - Fax 010 503320

Registrazione Tribunale di Genova n. 34 del 31/7/1996
Iscrizione al Registro Nazionale della Stampa n° 2661 del 2 Settembre 1989
Iscrizione al Registro degli Operatori di Comunicazione (ROC) n° 1188

Finito di stampare: Maggio 2005
Sped. in Abb. Post. 45%

Publicazione protetta a norma di legge dall'Ufficio proprietà letteraria, artistica e scientifica della Presidenza del Consiglio dei Ministri, dedicata all'aggiornamento professionale continuo e riservata ai medici.

Caleidoscopio viene anche letto e rilanciato da:
"L'ECO DELLA STAMPA"
Via Compagnoni, 28 - Milano