



UNIVERSITÀ DI PARMA

Dipartimento di Scienze Medico-Veterinarie

**Corso di Laurea Magistrale a Ciclo Unico in Medicina
Veterinaria**

**IMPIEGO DI BIOSENSORI PER LA RICERCA DI
SALMONELLA IN SUINI MACELLATI**

**USE OF BIOSENSORS FOR THE DETECTION OF SALMONELLA IN
SLAUGHTERED PIGS**

Relatore:

Chiar.ma Prof.ssa Silvia Bonardi

Correlatore:

Prof. Mauro Conter

Laureanda:

Roberta Quarini

ANNO ACCADEMICO 2021/2022

INDICE

ABSTRACT	iii
ABSTRACT IN INGLESE	iv
INTRODUZIONE	1
1. SALMONELLOSI: caratteri generali	4
1.1 Il genere <i>Salmonella</i>	4
1.2 Resistenza nell'ambiente	5
1.3 Caratteri dell'infezione	6
1.4 Patogenesi	8
2. MANIFESTAZIONI CLINICHE NEL SUINO.....	11
3. MANIFESTAZIONI CLINICHE NELL'UOMO	14
3.1 Febbre tifoide	14
3.2 Gastroenterite febbrile.....	15
3.3 Sierotipi coinvolti nei casi di tossinfezione alimentare	16
4. CONTROLLI NELLA FILIERA DI PRODUZIONE DEL SUINO.....	20
4.1 Fasi a rischio	20
4.1.1 Allevamento	20
4.1.2 Trasporto.....	22
4.1.3 Permanenza nelle stalle di sosta.....	22
4.1.4 Linea di macellazione.....	23
4.2 Riferimenti legislativi.....	26
5. METODICHE PER L'IDENTIFICAZIONE DI <i>SALMONELLA</i>	29
5.1 I metodi tradizionali	29
5.1.1 Metodo colturale.....	29
5.1.2 Polymerase Chain Reaction.....	30
5.1.3 Metodiche immunoenzimatiche.....	31
5.2 Nuove metodiche: I biosensori	31

5.2.1 I biorecettori	32
5.2.2 I sistemi di trasduzione del segnale	40
6. CONCLUSIONI.....	53
BIBLIOGRAFIA.....	i
SITOGRAFIA.....	xi
INDICE DELLE IMMAGINI E DELLE TABELLE	xii

ABSTRACT

Le malattie a trasmissione alimentare si identificano come un problema sanitario importante, e fra queste, la salmonellosi si classifica al secondo posto in Europa per numero di casi all'anno. Secondo i dati pubblicati da EFSA ed ECDC, il suino riveste un ruolo rilevante nella trasmissione all'uomo di *Salmonella*, la quale può entrare nella filiera della carne suina di produzione in qualsiasi fase, dall'allevamento degli animali, alla macellazione, la trasformazione e la commercializzazione. Per le carni fresche, la macellazione si identifica come step finale che precede l'immissione in commercio e, come tale, rappresenta l'ultima fase in cui è possibile abbattere il rischio sanitario per il consumatore.

I regolamenti comunitari impongono determinati criteri microbiologici da rispettare e identificano la norma ISO 6579 come "gold standard" per la ricerca di *Salmonella* sulle carcasse suine. Questa metodica, tuttavia, è dotata di limitazioni rilevanti, fra cui soprattutto il lungo tempo di risposta, che impedisce di fatto la possibilità di un controllo efficace nei confronti del batterio da parte dell'OSA. Sussiste quindi una forte necessità di sviluppo di metodiche rapide, affidabili e semplici per la rilevazione di *Salmonella*. Le alternative proposte negli anni sono state diverse, fra cui la PCR e la metodica ELISA, ma le più promettenti per sensibilità e velocità di risposta sono i biosensori, strumenti formati da un elemento di riconoscimento biologico in contatto con un trasduttore del segnale, in grado di fornire specifiche quantità (o informazioni semi-quantitative) del target analitico.

Nel presente elaborato vengono quindi trattate singolarmente le tre tipologie di biosensori maggiormente utilizzate per l'isolamento di *Salmonella*, mettendone in evidenza, per ciascuna di esse, i vantaggi e gli svantaggi al fine di identificare la metodica più consona ad ottenere una risposta rapida, affidabile e adatta all'utilizzo in campo.

ABSTRACT

Food-borne illnesses are a serious public health issue, and salmonellosis is the second most commonly reported foodborne disease for number of cases in Europe. EFSA and ECDC data show that pork has a significant role in the spread of this bacteria to humans. Although *Salmonella* could reach the pork production chain at any point of the pork chain, slaughtering was investigated in this study since it is the final step before the pig meat commercialization, thus representing the stage where the consumer's health risk can be reduced.

European regulations set microbiological criteria for *Salmonella* on pig carcasses. The samples should be tested following the ISO 6579 method, which is considered as “gold standard” method for the detection of *Salmonella* in food matrixes. However, this approach shows many limitations, the main one being the length of time it takes to give a response. Unfortunately, this factor hinders the Food Business Operator's ability to control spread and contamination by this pathogen at slaughterhouses. Therefore, there is a pressing need to develop quick, reliable, and simple technologies for the detection of *Salmonella* along the pork chain. Many alternatives have been suggested over the years, including PCR and ELISA tests, but biosensors appear to be the most promising alternatives due to their sensitivity and rapidity of response. Biosensors are tools made up by a biological element of recognition in close proximity to a signal transducer. They can provide quantitative or semi-quantitative data on a target substance or molecule.

The three main types of biosensors used for the identification of *Salmonella* will be treated in this work individually, highlighting the benefits and drawbacks of each one of them, in order to determine the best approach for a quick, reliable and practical use by Food Business Operators.

INTRODUZIONE

Da molti anni viene rivolta un'altissima attenzione alla sorveglianza e al controllo delle zoonosi. Le zoonosi sono definite come "qualsiasi malattia e/o infezione che possa essere trasmessa naturalmente, direttamente o indirettamente, tra gli animali e l'uomo" (Dir. 2003/99/CE). La veicolazione di un agente zoonosico all'uomo può avvenire tramite diverse vie, tra cui l'assunzione di alimenti di origine animale, determinando la comparsa delle cosiddette malattie a trasmissione alimentare (MTA). Quest'ultime possono essere determinate da batteri, virus, parassiti e prioni, e incidono particolarmente non solo sull'economia mondiale, ma anche e soprattutto sulla salute pubblica: ogni anno, infatti, circa 1 persona su 10 viene colpita da un'infezione di origine alimentare, facendo registrare all'incirca 600 milioni di casi e 420.000 decessi in tutto il mondo. Di questi, circa 23 milioni di casi si registrano in Europa, con 5.000 morti ogni anno (World Health Organization, 2015).

Le MTA possono suddividersi in diverse tipologie: si parla di infezione alimentare quando, in un alimento, sono presenti microrganismi vivi che, una volta penetrati nell'apparato digerente dell'ospite, si moltiplicano dando origine ad un'infezione locale o ad un danno extra-intestinale. Un'intossicazione alimentare invece si verifica quando, all'interno dell'alimento, sono presenti tossine prodotte da microrganismi che vi si sono moltiplicati prima del consumo: in questo caso, a provocare la sintomatologia, non è quindi il microrganismo, quanto la presenza della tossina preformata. Infine, si parla di tossinfezione alimentare quando nell'alimento sono presenti microrganismi vivi che, una volta colonizzato l'apparato gastro-intestinale dell'ospite, danno inizio alla sintesi di tossine (www.epicentro.iss.it).

Fra i diversi agenti di MTA, *Salmonella* spp. risulta essere, in Europa, uno dei più comuni responsabili di gastroenterite (Pires et al., 2011) classificandosi al secondo posto dopo *Campylobacter*, e facendo registrare 52.702 casi confermati nel 2020, di cui 6.149 ospedalizzati e 57 decessi. I tre veicoli più comunemente coinvolti nei focolai di salmonellosi sono: uova e derivati, carne di suino e derivati, e prodotti da forno. (EFSA & ECDC, 2021)

Fra tutte le matrici alimentari di origine animale, quindi, la carne suina è considerata come la seconda fonte di infezione per i casi umani di salmonellosi in Europa (Bonardi, 2017). Di conseguenza, risulta facile comprendere come il controllo, la sorveglianza e la ricerca di questo patogeno nei prodotti di origine animale, in particolare nella carne suina, sia di estrema importanza al fine di tutelare la salute pubblica.

Attualmente, secondo il Regolamento CE 2073/2005, la metodica in uso per l'isolamento di *Salmonella* spp. dalle matrici di origine animale è quella elaborata dalla International Organization of Standardization (ISO) in associazione con la European Committee for Standardization (CEN), denominata EN/ISO 6579-1:2017, che richiede almeno cinque giorni per fornire un risultato positivo (Bonardi et al., 2012).

Si comprende quindi che le tradizionali metodiche colturali risultano essere particolarmente dispendiose dal punto di vista temporale (Perry et al. 2007). Proprio a causa di questo limite, negli anni sono state proposte diverse procedure analitiche alternative in grado di abbreviare le tempistiche, cercando al contempo di non incidere sulla sensibilità e specificità del risultato. In particolare, è stato proposto l'utilizzo della Polymerase Chain Reaction (PCR) per ottimizzare ulteriormente i tempi di risposta (Zheng et al. 2014). Inoltre, sono state sperimentate anche metodiche immunoenzimatiche come l'Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA), fluorimetriche e di chemiluminescenza (Silva et al. 2011).

Si tratta di metodi abbastanza promettenti, ma comunque dotati di alcune forti limitazioni, fra cui la necessità di avere a disposizione strumenti dedicati e particolarmente costosi, ed un personale altamente specializzato. Tra l'altro, alcuni studi hanno evidenziato una ridotta sensibilità e, talvolta, un tempo di risposta tutt'altro che breve (Ansari et al., 2017).

E' chiaro quindi che esiste una forte necessità di sviluppo di metodiche rapide, specifiche e sensibili per l'identificazione di *Salmonella* da matrici alimentari. Fra queste nuove frontiere, i biosensori sembrano essere molto promettenti. Con il termine "biosensori" si intendono strumenti analitici in grado di identificare e quantificare un target specifico tramite la trasformazione del riconoscimento in un segnale fisicamente misurabile, come un segnale elettrico, magnetico o ottico (Ansari et al. 2017). I vantaggi che sembrano offrire sono tanti, fra cui un'elevata sensibilità, specificità e accuratezza, nonché una certa superiorità per quanto riguarda la rapidità dei risultati, il costo ridotto, e il loro possibile utilizzo in campo e *in situ*. Di conseguenza, soprattutto negli ultimi anni, i biosensori sono stati riconosciuti come alternative attendibili per la ricerca di *Salmonella* negli alimenti (Shen, Xu, e Li, 2021).

La loro versatilità e rapidità di risposta potrebbero risultare utili non solo nell'ambito dei controlli ufficiali, ma anche e soprattutto agli Operatori del Settore Alimentare (OSA) nei campionamenti eseguiti in autocontrollo: conoscere, in tempi rapidi, la presenza di

un'eventuale non conformità potrebbe garantire un maggiore controllo sulla linea di produzione e permettere di implementare azioni correttive immediate.

Il seguente elaborato di tesi ha quindi lo scopo di presentare, in maniera esplicita, l'utilizzo dei biosensori quali nuova frontiera per la ricerca di *Salmonella* spp., in particolare nella carne suina, proprio in virtù dell'importanza che questa matrice riveste nei casi di tossinfezione alimentare.

1. SALMONELLOSI: caratteri generali

1.1 Il genere *Salmonella*

Il genere *Salmonella* è composto da microrganismi patogeni di origine zoonosica, di forma bastoncellare (0.7-1.5 x 2.0-5.0 µm), Gram negativi, asporigeni, aerobi-anaerobi facoltativi, catalasi-positivi, ossidasi-negativi, non fermentanti il lattosio, saccarosio, salicina, indolo e ureasi-negativi e appartenenti alla famiglia delle *Enterobacteriaceae*. Dal punto di vista morfologico, la maggior parte dei sierotipi possiede dei flagelli peritrichi (eccezion fatta per *S. Gallinarum* e *S. Pullorum*, che risultano di conseguenza immobili) e fimbrie di adesione; ad eccezione di alcuni stipiti di *S. Choleraesuis* e molti di *S. Paratyphi*, questi microrganismi producono H₂S (Farina e Scatozza, 2002).

La cellula batterica di *Salmonella* possiede diversi antigeni:

- Antigene O = (somatico) presente sulla membrana esterna della cellula, associato alle molecole di lipopolisaccaride (LPS) e formato da due parti: la prima, più interna, e comune a tutti gli enterobatteri, è composta da cinque carboidrati; la seconda, più esterna, è formata da catene saccaridiche, ciascuna contenente una sequenza di alcuni oligosaccaridi. La diversità degli antigeni somatici dipende dal differente posizionamento degli oligosaccaridi nelle catene. Attualmente si conoscono 47 antigeni O identificati con numeri arabi (Seif et al., 2019; Liu et al., 2014).
- Antigene H = (flagellare) di natura proteica, sensibile al calore, presente nelle sierovarianti mobili di *Salmonella*. Vengono indicati con lettere minuscole dell'alfabeto o numeri. Possono presentarsi in due fasi, chiamate fase 1 e fase 2, e quando sono presenti entrambe si parla di salmonelle "bifasiche", mentre quando è presente solo una delle due fasi, si parla di salmonelle "monofasiche" (Farina, Scatozza, 2002).
- Antigene Vi = alcune salmonelle presentano anche un terzo tipo di antigene, chiamato Vi (da virulenza), che corrisponde all'antigene K (capsulare) degli altri enterobatteri. Gli stipiti che lo possiedono risultano essere più virulenti ed ha la caratteristica di mascherare gli antigeni O, rendendoli inagglutinabili dai sieri somatici (Graziani et al., 2005).

Il genere *Salmonella* è distinto in due specie, *S. enterica* e *S. bongori*. La specie *enterica* è a sua volta suddivisa in sei sottospecie: *enterica*, *salamae*, *arizonae*,

diarizonae, *houtenae*, *indica*. Ad oggi i sierotipi conosciuti della specie *enterica* sono più di 2400, suddivisi in base alla diversa composizione degli antigeni somatici e flagellari, talvolta anche in base ad alcuni caratteri biochimici.

Fra le numerose classificazioni esistenti per questo batterio, quelle più conosciute e utilizzate sono quella di Kauffmann-White, per quanto riguarda la tipizzazione in base al sierotipo, e quella di Le Minor per quanto riguarda la suddivisione in sottospecie (Graziani et al., 2005).

I diversi sierotipi di *Salmonella* spp. riconoscono o un ospite specifico (sierotipo specie-specifico), oppure ospiti differenti (sierotipo adattato o ubiquitario), e in base a questo si differenzia la loro capacità di causare malattia: i sierotipi specie-specifici, in genere, causano forme sistemiche di malattia tifoide nella specie bersaglio (es. *S. Typhi* e *S. Paratyphi* nell'uomo, ma anche *S. Typhisuis* nel suino), mentre i sierotipi ospiti adattati sono associati ad una particolare specie, ma possono causare malattia anche in altre specie animali compreso l'uomo. Infine, i sierotipi ubiquitari sono in grado di provocare una malattia sistemica in una grande varietà di specie animali, ma più frequentemente causano gastroenterite in diverse specie compreso l'uomo (es. *S. Typhimurium* e *S. Enteritidis*) (Bonardi, 2017).

1.2 Resistenza nell'ambiente

Salmonella spp. è un batterio ubiquitario in grado di crescere a temperature comprese fra i 7°C e i 46°C, con un optimum di temperatura intorno ai 37°C. L'ambiente si identifica come un ottimo serbatoio di mantenimento per questo patogeno, soprattutto tramite la contaminazione fecale di acque, suolo e, di conseguenza, anche di alimenti di origine vegetale (Graziani et al., 2005). Anche l'utilizzo di acque reflue come strumento per irrigazione rappresenta una fonte diretta di contaminazione, favorita soprattutto da vegetali con denso fogliame in grado di fornire ai microrganismi protezione nei confronti dell'esposizione a fattori ambientali, quali essiccamento, radiazioni solari e temperature elevate (Lemarchand e Lebaron, 2002).

Il serbatoio comune di *Salmonella* è però rappresentato dal tratto intestinale di numerosi animali domestici e selvatici, fra cui i volatili e le specie di allevamento (come, ad esempio, bovini e suini); un ruolo di importanza minore è invece rivestito dagli animali da compagnia, mentre per le specie selvatiche le informazioni relative sono piuttosto scarse. Infine, particolarmente frequente è anche la colonizzazione nei rettili (come, ad esempio, nelle tartarughe), spesso con sierotipi rari (Graziani et al., 2005).

L'elevata capacità di resistenza nell'ambiente è anche legata alla capacità di questo batterio di creare dei biofilm (Lamas et al., 2018). Con il termine biofilm si intende aggregati di cellule batteriche adesi alle superfici, circondati da una sostanza extracellulare polimerica (EPSs), prodotta dai microrganismi stessi, formata da polisaccaridi, lipidi e DNA extracellulare (Flemming, 2016; Harrell et al., 2021). La formazione di queste strutture avviene solitamente in risposta a stimoli ambientali percepiti come avversi per la sopravvivenza del patogeno, quali una variazione di pH, di temperatura, dei livelli di ossigeno e dei nutrienti disponibili (Harrell et al., 2021).

Grazie ad interazioni intercellulari e alle proprietà della sostanza extracellulare, che conferisce integrità e stabilità al biofilm stesso, i batteri in esso contenuti acquisiscono proprietà di cui singolarmente non erano dotati, quali: accumulo di enzimi nella EPSs che fornisce proprietà digestive esterne, interazioni sociali fra le cellule microbiche grazie ad una forma particolare di comunicazione (quorum-sensing), e l'abilità (grazie all'acquisizione di tolleranza e/o resistenza) di sopravvivere all'esposizione di antibiotici, raggi ultravioletti e disinfettanti (Flemming et al., 2016; Beshiru et al., 2018).

1.3 Caratteri dell'infezione

La salmonellosi, negli animali, ha una patogenesi particolarmente complessa e multifattoriale. È una malattia a decorso acuto, subacuto o cronico, caratterizzata principalmente da processi infiammatori dell'apparato digerente (enterocolite) ma anche quadri clinici a carico di altri distretti (es. forme settiche, aborto, broncopolmoniti, mastiti, meningoencefaliti ecc...) (Farina e Scatozza, 2022).

La via di trasmissione più importate è quella orofecale tramite il contatto con il soggetto infetto o tramite l'assunzione di alimenti e acqua contaminati, ma all'interno degli allevamenti l'infezione può anche avvenire attraverso la contaminazione ambientale da parte di portatori-eliminanti che costituiscono dei veri e propri serbatoi di disseminazione. (Farina e Scatozza, 2002). Alcuni studi hanno anche dimostrato la possibilità dell'entrata del batterio tramite la via aerea, in particolare attraverso i polmoni (Bonardi, 2017). Un ruolo fondamentale è rivestito dai fattori predisponenti all'infezione: carenze igieniche, fattori meteorologici, sovraffollamento, stress vari, parto, parassitosi e infezioni virali concomitanti (Farina, Scatozza, 2002).

A seguito dell'entrata nel corpo dell'ospite, *Salmonella* incontra un certo numero di barriere fisiche, quali il basso pH gastrico, la mucosa intestinale e la barriera costituita dalle cellule epiteliali della mucosa. Il patogeno però, in determinate circostanze, è in

grado di sopravvivere e causare infezione in maniera efficiente (Pradhan e Devi Negi, 2019). Dopo essere stato ingerito ed aver superato la barriera gastrica, *Salmonella* colonizza l'intestino, invade la mucosa e stimola la migrazione transepiteliale di leucociti polimorfonucleati scatenando il fenomeno diarroico (Pradhan e Devi Negi, 2019).

Salmonella spp., inoltre, è in grado di elaborare tossine, tra cui:

- Tossina termolabile (STN o Salmonella Toxin) = tossina di natura proteica, simile alla enterotossina CT del colera e alla tossina termolabile LT di *E. coli*, che, una volta internalizzata, determina un aumento dell'adenosina monofosfato ciclico (AMPc) intracellulare a cui segue un'elevata liberazione di ioni sodio e cloro nel lume intestinale e conseguente richiamo di fluidi, con comparsa di diarrea di tipo osmotico (Bassi e Bonardi, 2008)
- Citotossina = rilasciata all'interno della cellula invasa dal patogeno, questa tossina inibisce la sintesi proteica, portando a lisi la cellula ospite e favorendo la disseminazione del batterio. Tuttavia, non è ancora stato chiarito di preciso il ruolo di questa tossina: è verosimile pensare che si tratti di facilitare l'invasione della mucosa intestinale grazie alla lisi delle cellule epiteliali (Bassi e Bonardi, 2008)
- Lipopolisaccaride (LPS) = costituente della membrana batterica, è dotato di proprietà endotossiche e di resistenza alla lisi.

Nell'uomo, lo sviluppo di un'infezione sintomatica dipende dal numero di batteri ingeriti: la dose minima infettante varia molto in base alle caratteristiche del sierotipo, in base alle condizioni dell'ospite e in base alle caratteristiche dell'alimento veicolo del patogeno. La dose minima infettante è ipotizzata tra 10^6 e 10^9 UFC, ma risulta essere più bassa (10^3) per *S. Typhi*, trattandosi di un sierotipo ospite-adattato per l'uomo. Altri sierotipi possiedono una dose infettante più elevata (Kothary e Babu, 2001). Anche le caratteristiche degli alimenti influenzano la quantità di batteri necessari a scatenare la comparsa di Salmonellosi: in alimenti ricchi di grassi, nonché nell'acqua bevuta fuori pasto in cui il transito verso l'intestino è molto rapido, la dose infettante per le salmonelle non tifoidi può arrivare anche solo a 100 cellule (Kothary e Babu, 2001). Ad esempio, prendendo in considerazione episodi di tossinfezione alimentare che vedevano come alimento coinvolto il cioccolato, la dose infettante era molto più bassa rispetto a quella normalmente associata all'infezione da *Salmonella*. Questa differenza può essere spiegata dall'effetto protettivo che l'alimento, particolarmente ricco in sostanze lipidiche, esercita nei confronti dell'acidità gastrica (Graziani et al., 2005).

Sono più colpiti da salmonellosi gli individui molto giovani (neonati, bambini in età prescolare) o molto anziani e quelli con ridotte difese immunologiche (Graziani et al., 2005).

1.4 Patogenesi

A seguito della penetrazione tramite la via orale, dopo il superamento della barriera gastrica, *Salmonella* attraversa lo strato di muco e aderisce alle cellule della mucosa intestinale e alle cellule M localizzate sulle placche del Peyer nel tratto terminale dell'intestino tenue (Figura 1). La presenza di fimbrie di adesione sulla superficie batterica rappresenta un fattore determinante al fine dell'insediamento del patogeno (Graziani et al., 2005).

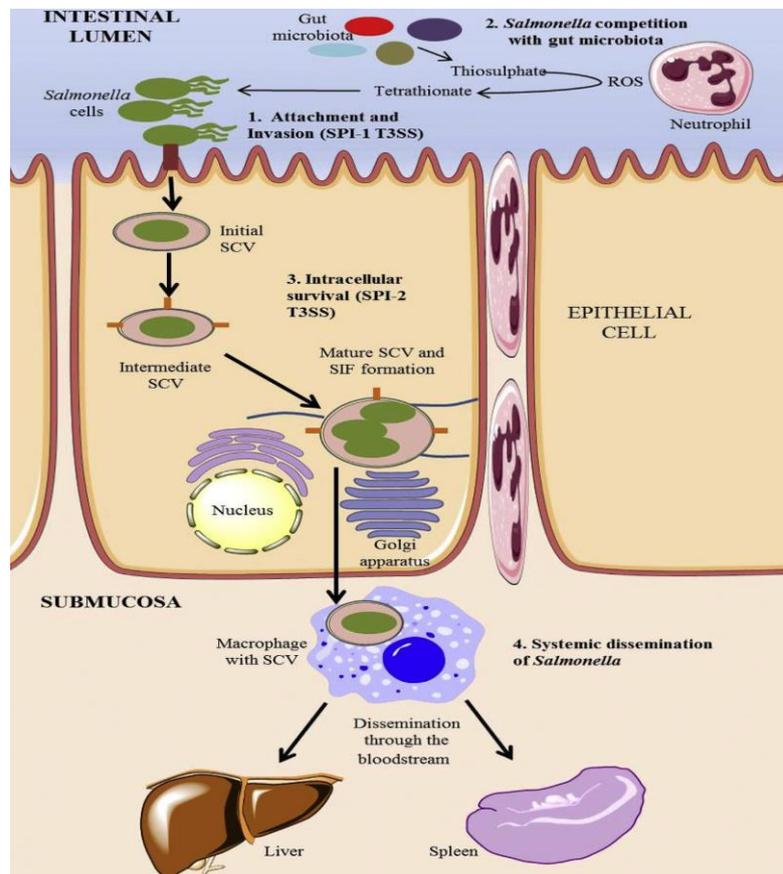


Figura 1 Patogenesi della salmonellosi negli esseri umani (Lamas et al., 2018)

Il microrganismo è in grado di indurre la sua stessa fagocitosi da parte degli epatociti intestinali in modo da potervi penetrare all'interno (Hansen-Wester, Stecher, e Hensel, 2002; Eng et al., 2015). Alla base di questo meccanismo vi è una particolare struttura propria di molti batteri Gram negativi, definita Type III Secretion System (TTSS), una

struttura ad ago assemblata al contatto cellula-batterio codificata da un cluster di geni localizzati nelle isole di patogenicità di *Salmonella* (SPIs) che permette al batterio di iniettare molecole effettrici all'interno del citoplasma dell'epatocita. *Salmonella* possiede due sistemi di nano-iniezione: TTSS-1 e TTSS-2. I due sistemi di secrezione hanno mostrato ruoli differenti durante il processo patogenetico; nello specifico TTSS-1 è requisito essenziale per l'invasività della mucosa intestinale, mentre TTSS-2 influenza la virulenza sistemica, favorisce la crescita intracellulare del germe e la sua sopravvivenza nei macrofagi (Graziani et al., 2005).

Una volta che il batterio ha preso contatto con la cellula eucariota dell'ospite tramite le fimbrie, viene prodotta una struttura tubulare cava «ad ago» (TTSS1) che ha la base nella membrana del batterio e la parte apicale che attraversa la membrana della cellula dell'epitelio intestinale. Attraverso questa struttura vengono trasferite alla cellula bersaglio delle proteine che andranno ad alterare la cellula epiteliale, permettendo l'ingresso del patogeno. Queste proteine sono dette «proteine effettrici» e, una volta penetrate nella cellula intestinale, sono in grado di attivare la trasduzione di un segnale che attiva la trasformazione del citoscheletro della cellula ospite, provocando la polimerizzazione dell'actina che dalla forma globulare passa alla forma filamentosa. La membrana della cellula, in questo modo, viene stimolata a produrre delle protrusioni (il fenomeno è detto «*membrane ruffling*») che progressivamente inglobano il batterio in un processo che assomiglia molto a quello della fagocitosi (Eng et al., 2015).

Le proteine effettrici che vengono iniettate nel citosol degli enterociti sono denominate *Salmonella* outer proteins (Sop). La proteina effettrice più importante è SopB, una tossina batterica enterotossica. Si tratta di una inositolo-fosfato fosfatasi che induce infiammazione intestinale e secrezione di fluidi tramite l'innalzamento dei livelli cellulari di inositolo 1,4,5,6-tetrafosfato. Questa molecola determina la perdita di ioni cloro e conseguente secrezione di fluidi nel lume intestinale (Graziani et al., 2005).

A seguito dell'entrata nella cellula ospite, *Salmonella* si trova incapsulata in un vacuolo formato dalla membrana cellulare dell'enterocita. Normalmente, la presenza di un corpo estraneo batterico all'interno di una cellula comporterebbe l'attivazione della risposta immunitaria, determinando la fusione del lisosoma con conseguente liberazione di enzimi digestivi nel vacuolo che degraderebbero il batterio contenutovi. *Salmonella* però è in grado di resistere e bloccare la fusione del lisosoma grazie alla presenza del TTSS-2, con cui inietta ulteriori proteine effettrici in grado di alterare la struttura del vacuolo. La nuova parete impedisce quindi la fusione del lisosoma, permette la sopravvivenza

intracellulare del patogeno e ne garantisce la replicazione all'interno della cellula ospite. La capacità del batterio di resistere anche all'interno dei macrofagi delle placche del Peyer ne permette il suo trasporto per mezzo del sistema reticoloendoteliale ai linfonodi mesenterici e, successivamente, nel torrente circolatorio cui può seguire la diffusione sistemica, in particolare a fegato e milza (Monack et al., 2004; Eng et al. 2015).

L'insediamento di batteri a livello intestinale viene normalmente ostacolato dalla flora saprofitica che occupa i recettori intestinali oppure libera sostanze protettive, come il tiosolfato (Farina e Scatozza, 2002). La risposta infiammatoria che ne consegue, però, stimola la migrazione di neutrofili all'interno del lume intestinale; questi sono in grado di convertire il tiosolfato in tetratiato, una molecola che viene utilizzata da *Salmonella* come accettore di elettroni e gli conferisce la capacità di crescere più facilmente rispetto ai batteri competitori della flora batterica commensale e, di conseguenza, operare al meglio il suo meccanismo patogenetico (Lamas et al. 2018).

Al meccanismo patogenetico di questo batterio partecipano anche le tossine precedentemente riportate: importante risulta essere STN, che determina un aumento della concentrazione di AMPc, responsabile della secrezione di ioni sodio e cloro nel lume intestinale, con conseguente elevata perdita di fluidi ed elettroliti nel piccolo intestino (diarrea osmotica) (Bonardi e Bassi, 2008). Infine, viene liberata anche una citotossina che, rilasciata all'interno della cellula invasa, porta ad inibizione della sintesi proteica dell'enterocita, a cui segue lisi e morte cellulare (Bonardi e Bassi, 2008).

2. MANIFESTAZIONI CLINICHE NEL SUINO

I sierotipi che più frequentemente vengono isolati nel suino sono: *S. Typhisuis*, *S. Choleraesuis*, *S. Typhimurium*, *S. Typhimurium* variante monofasica, *S. Derby* e *S. Infantis* (Bonardi, 2017). In particolare, per quanto riguarda *S. Choleraesuis*, merita di essere nominata la variante Kunzendorf, responsabile della gran parte dei focolai di questo sierotipo nei suini fino agli anni '90 e inizi anni 2000, che dopo anni di apparente scomparsa è stata registrata come responsabile di focolai di salmonellosi in Danimarca nel 2012-2013, e successivamente in altri paesi europei (Pederson et al., 2014).

La salmonellosi in questa specie si presenta in due forme differenti: la forma setticemica e la forma enterocolitica. La prima (anche definita forma paratifoide) provoca morte improvvisa nei suinetti svezzati e nel periodo post-svezzamento. Si manifesta principalmente in animali con età inferiore a 4 mesi, raramente negli adulti (Farina e Scatozza, 2002). Compaiono zone rosso porpora a livello del padiglione auricolare e nella regione addominale, febbre elevata, anoressia, distress respiratorio e morte in 1-2 giorni (Figura 2). Questa forma è sostenuta da *S. Choleraesuis*, *S. Typhisuis* e *S. Typhimurium*. Fonti di contagio sono rappresentate da roditori, volatili, acqua e alimenti contaminati, suini portatori ed eliminatori (Farina e Scatozza, 2002).



(a) Zone porpora a livello di padiglione auricolare

(b) Emorragie sottocutanee a livello addominale

Figura 2 Fotografie di quadri sintomatologici di paratifoide suina (www.3tre3.it)

La forma enterocolitica si manifesta fra lo svezzamento e il 4° mese di vita, ed è caratterizzata dall'emissione di feci liquide giallastre, talvolta emorragiche, febbre, anoressia e disidratazione (Farina e Scatozza, 2002). Può determinare enterocolite e

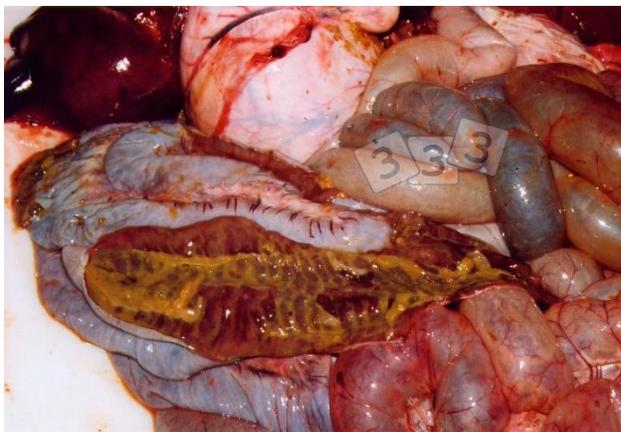
tiflite necrotica, splenomegalia, meningite, encefalite, polmonite e linfadenite emorragica (Figura 3). E' sostenuta da *S. Choleraesuis*, *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis*, *S. Dublin*. Frequente anche l'infezione con *S. Derby*, che ha in genere decorso asintomatico. Negli animali adulti, le infezioni sostenute da questi sierotipi si manifestano in forma subclinica, di conseguenza questi soggetti rivestono un importante ruolo di portatori asintomatici (Farina, Scatozza, 2002). In particolare, *Salmonella* viene isolata, oltre che nelle feci, anche a livello di tonsille, linfonodi mesenterici e colecisti di suini apparentemente sani (EFSA, 2007).



(a) Diarrea giallastra nei suini all'ingrasso



(b) Linfadenite emorragica



(c) Enterocolite emorragica necrotica



(d) Splenomegalia

Figura 3 Fotografie di quadri sintomatologici della forma enterocolitica di salmonellosi nel suino (www.3tre3.it)

Confrontando la prevalenza di infezione nei suini presenti in allevamento e in quelli macellati si osserva spesso una discrepanza: la prevalenza in allevamento può risultare più bassa rispetto a quella osservata in macello, probabilmente per l'esistenza di

portatori latenti di *Salmonella*. Questi soggetti potrebbero eliminare il patogeno per l'intervento di fattori stressanti, quali il trasporto e lo spostamento in stalle di sosta pre-macellazione, in grado di compromettere il sistema immunitario e determinare la recrudescenza dell'escrezione (Bonardi, 2017).

3. MANIFESTAZIONI CLINICHE NELL'UOMO

Le malattie da *Salmonella* spp. nell'uomo sono legate all'azione di:

- Salmonelle tifoide = (sierotipi ospiti-adattati all'uomo, come *S. Typhi* e *S. Paratyphi*) causano la febbre tifoide nell'uomo, che è la forma più grave dell'infezione
- Salmonelle non tifoide = (sierotipi ubiquitari come *S. Typhimurium*, *S. Enteritidis* e numerosi altri) causano tossinfezione alimentare che si manifesta con lo sviluppo di una gastroenterite (Graziani et al., 2005).

La via di trasmissione per entrambe le forme cliniche di salmonellosi è quella oro-fecale tramite l'ingestione di alimenti contaminati. In particolare, risultano a rischio gli alimenti particolarmente esposti a contaminazione fecale (come carne, latte, acqua e vegetali) (<https://www.epicentro.iss.it/tifoide/>). La malattia causata da salmonelle tifoide e non tifoide, però, risulta molto differente dal punto di vista clinico in virtù della differente risposta infiammatoria che viene ad instaurarsi (Raffatellu et al., 2008).

3.1 Febbre tifoide

La febbre tifoide (o tifo) è una patologia sistemica caratterizzata da un periodo di incubazione di circa 1-3 settimane (in media 5-9 giorni) e caratterizzata da febbre alta, debolezza, tosse, esantemi maculari sul tronco ("roseole tifiche"), epato e splenomegalia, dolori addominali, cefalea e anoressia; raramente, a differenza della patologia causata dai sierotipi ubiquitari, si osserva diarrea. L'uomo risulta essere l'unico vettore di trasmissione della patologia in quanto *S. Typhi* è un sierotipo ospite-adattato. La febbre tifoide, se non trattata, ha un tasso di mortalità superiore al 10% (<https://www.epicentro.iss.it/tifoide/>).

In particolare, questa patologia si manifesta con un tipico quadro clinico che viene suddiviso in 4 settimane o settenari (Barbone, 2010). Durante la prima settimana (o periodo di invasione), i sintomi caratteristici sono rappresentati da malessere, cefalea, febbre con un andamento tipico di salita "a gradini" e stitichezza. Il secondo settenario (o periodo di stato) è caratterizzato da uno stato stuporoso del paziente (o stato "tifoso", da cui prende il nome la malattia), accompagnato da febbre alta (39-40°C), comparsa di roseole tifiche sull'addome e sul torace, ed epato-splenomegalia. Durante la terza settimana (o periodo anfibolico), la febbre subisce ampie oscillazioni e possono verificarsi complicazioni gravi quali emorragie intestinali o perforazione intestinale con

conseguente peritonite. Infine, durante la quarta settimana (o periodo di risoluzione), la febbre tende a calare lentamente e lo stato generale del paziente migliora fino alla guarigione (Barbone, 2010).

La trasmissione di *S. Typhi* può avvenire per via diretta tramite le feci o, più frequentemente, per via indiretta, attraverso l'ingestione di cibi maneggiati da persone infette o tramite la contaminazione, attraverso gli scarichi fognari, dell'acqua da bere o utilizzata per lavare gli alimenti: questa forma di salmonellosi è infatti più diffusa nelle aree a basso livello igienico (<https://www.epicentro.iss.it/tifoide/>).

Il tifo non ha come sintomo tipico la diarrea e i rilievi istologici a carico dell'intestino mostrano una risposta infiammatoria caratterizzata principalmente da infiltrato di mononucleati (macrofagi soprattutto) e non neutrofili che, al contrario, appaiono scarsi (Raffatellu et al., 2008). Grazie alla presenza di TTS-2, *S. Typhi* è in grado di resistere alla fagocitosi e "utilizzare" i macrofagi come carriers in grado di veicolare il batterio in diversi distretti dell'organismo tra cui milza, fegato e cistifellea (Graziani et al., 2005).

Rilievi istologici hanno permesso di evidenziare che questa patologia, nonostante l'elevato carattere invasivo che la contraddistingue, non è accompagnata dalla tipica risposta infiammatoria caratterizzata dall'accumulo di neutrofili in situ. Numerosi studi hanno dimostrato la presenza di un particolare locus nel DNA del batterio, denominato *viaB*, localizzato nella settima isola di patogenicità di *Salmonella* (*Salmonella* Pathogenicity Island 7, o SPI7) che permette a *S. Typhi* di ridurre la produzione di interleuchina 8 (IL-8) nell'epitelio intestinale, ridurre la produzione del Tumor Necrosis Factor α (TNF α) da parte dei macrofagi e ridurre di conseguenza la chemiotassi di neutrofili a livello dell'intestino (Winter et al., 2008).

Durante l'infezione, nei soggetti affetti da febbre tifoide i batteri vengono trasportati nel sangue e nell'intestino. La maggior parte dei pazienti è infettante fino alla fine della prima settimana di convalescenza, ma il 10% degli individui non trattati elimina i batteri fino a tre mesi dopo la guarigione. Il 2-5% delle persone non trattate può anche diventare portatore cronico convalescente continuando a disperdere batteri tramite le feci (<https://www.epicentro.iss.it/tifoide/>).

3.2 Gastroenterite febbrile

La gastroenterite da *Salmonella* spp. è un'infezione localizzata al tratto gastrointestinale, causata da sierotipi ubiquitari quali ad esempio, per citarne alcuni, *S. Typhimurium* variante monofasica e bifasica, *S. Enteritidis* e *S. Infantis* (EFSA & ECDC,

2021). Questa forma di salmonellosi è caratterizzata da un breve periodo di incubazione (12-72 ore) e una breve durata dei sintomi nei soggetti sani (in genere 4-7 giorni). La breve durata del decorso clinico suggerisce che il sistema immunitario dell'ospite interviene rapidamente per debellare l'infezione, dando origine ad una malattia autolimitante (Raffatellu et al., 2008).

I sierotipi non tifoidi (o Non-Typhoidal *Salmonella* serovars, o NTS), infatti, non sono in grado di sconfiggere i meccanismi di difesa che limitano la disseminazione batterica al circolo sistemico, rimanendo quindi localizzati a livello della mucosa intestinale e nei linfonodi mesenterici dei soggetti immunocompetenti (Raffatellu et al., 2008).

Tuttavia, in soggetti immunodepressi o dotati di un sistema immunitario non del tutto competente, come nei neonati, nei bambini in età prescolare e negli anziani, possono svilupparsi batteriemie e setticemie da sierotipi ubiquitari come conseguenza di gastroenteriti acute (Graziani et al., 2005).

La gastroenterite da *Salmonella* spp. è una tipica patologia diarroica caratterizzata da un'infiammazione catarrale del tratto terminale dell'ileo e del colon, con forte infiltrazione di neutrofili nella mucosa, che in questo caso risultano essere la linea cellulare maggiormente coinvolta nella clearance batterica (McGovern e Slavutin, 1979; Raffatellu et al., 2008). L'invasione della mucosa intestinale da NTS, infatti, viene registrata dalla componente innata del sistema immunitario che mette in atto una risposta non specifica per *Salmonella* ma valida per qualsiasi batterio di natura enteroinvasiva (come ad esempio *Shigella* spp. o *Campylobacter* spp.), caratterizzata dal reclutamento di neutrofili nel sito di infezione e, di conseguenza, la comparsa di una diarrea infiammatoria (Tukel et al., 2006).

I sintomi di questa forma di salmonellosi sono febbre, nausea, vomito (alimentare, acquoso o biliare), dolori addominali e diarrea che compare dopo circa 10-20 ore dalla comparsa dei primi sintomi. Le feci, inizialmente molli e acquose, possono in seguito contenere tracce ematiche e di muco nel secondo o nel terzo giorno di malattia (Graziani et al., 2005).

3.3 Sierotipi coinvolti nei casi di tossinfezione alimentare

Secondo il report EFSA-ECDC più recente, il numero di casi confermati di gastroenterite da *Salmonella* spp. in Europa nel 2020 è pari a 52.702, con un tasso di 13.7 notifiche ogni 100.000 abitanti. Rispetto all'anno precedente, vi è stata una diminuzione dei casi registrati che deve essere imputata sia alle restrizioni dovute

all'epidemia di SARS-CoV2, sia all'esclusione dei dati del Regno Unito, non più appartenente all'Unione Europea (EFSA & ECDC, 2021). I 5 sierotipi più frequentemente coinvolti nelle infezioni umane sono i seguenti: *S. Enteritidis* (48.7%), *S. Typhimurium* (12.4%), *S. Typhimurium* variante monofasica (1,4,[5],12:i:-) (11.1%), *S. Infantis* (2.5%) e *S. Derby* (1.2%) (Figura 4). Altri sierotipi meno diffusi sono rappresentati da *S. Dublin*, *S. Brandenburg*, *S. Muenchen*, *S. Panama*, *S. London*, *S. Kottbus*, *S. Bovismorbificans* ed *S. Napoli*, per citarne alcuni (EFSA & ECDC, 2021).

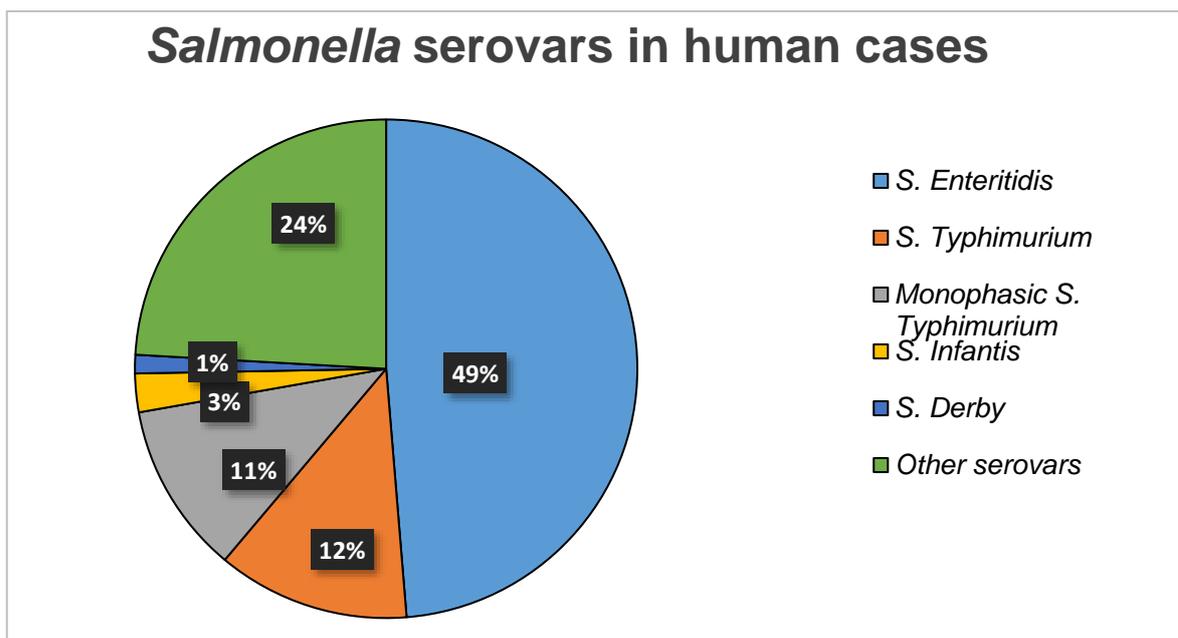


Figura 4 "Top Five" sierotipi di *Salmonella* spp. (EFSA & ECDC, 2021)

Secondo i dati analizzati dall'European Food Safety Authority e illustrati nel diagramma di Sankey allegato (Figura 5), le principali fonti di trasmissione dei cinque sierotipi più comuni sono le seguenti:

- *S. Enteritidis* è stata primariamente riscontrata nei broiler (il 59.3% dei ceppi sono stati isolati da gruppi di broilers e dalla carne di pollo), ma anche nelle galline ovaiole (34.8%);
- *S. Typhimurium* è stata primariamente correlata a broiler e suini (37% e 33.5% rispettivamente) ma anche galline ovaiole (19.8%);
- *S. Typhimurium* variante monofasica (1,4,[5],12:i:-) è correlata primariamente ai suini (45.1%) e secondariamente ai broiler (30.4%);
- *S. Infantis* deriva specificamente dai broiler (94%);

- *S. Derby* invece è primariamente correlata ai suini (68.8%) e secondariamente ai tacchini (18.3%) (EFSA & ECDC, 2021).

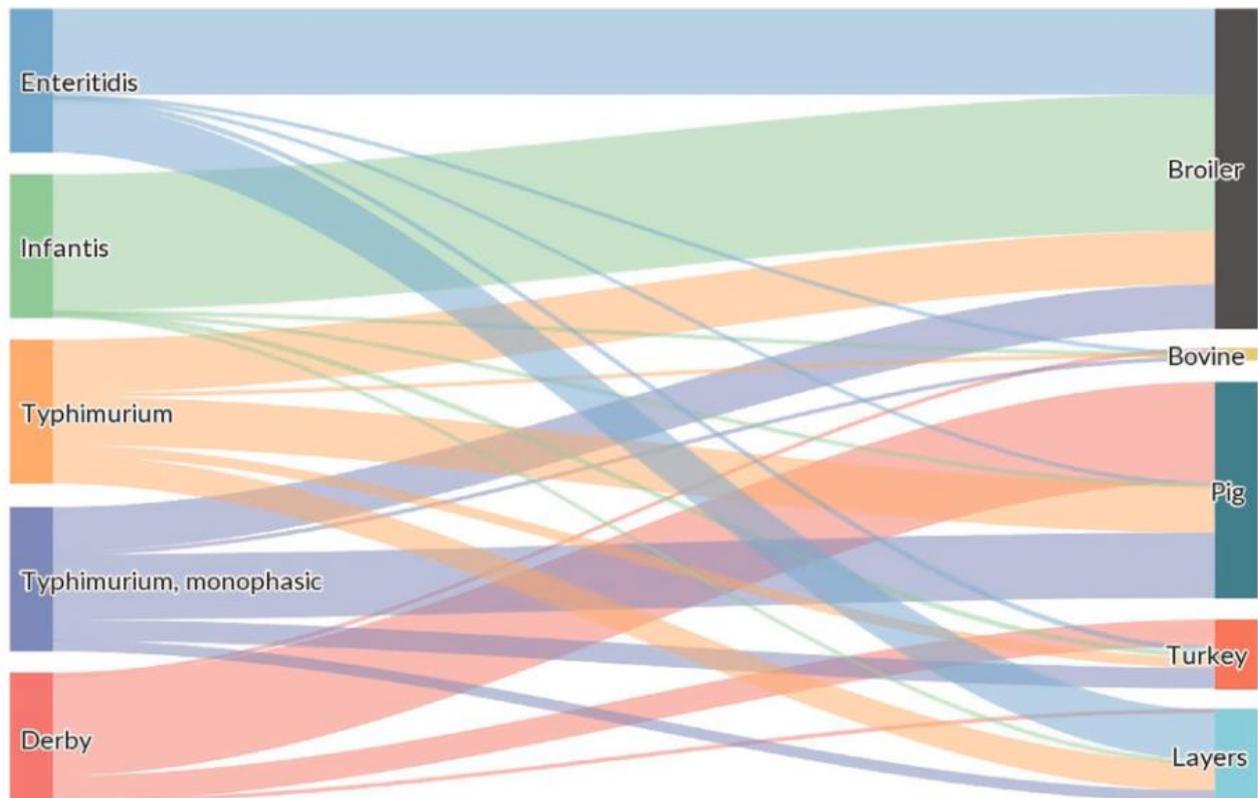


Figura 5 Distribuzione dei principali serovar di *Salmonella* spp. nelle specie animali serbatoio (EFSA & ECDC, 2021)

Fra tutte le matrici alimentari, quindi, si evince come la carne suina sia effettivamente la seconda più comune causa di trasmissione di ceppi responsabili di salmonellosi umana (EFSA & ECDC, 2021). La frazione di casi di salmonellosi umana attribuiti ai suini e alla carne suina cambia notevolmente nei diversi Paesi membri dell'UE e dipende principalmente da:

- 1) la prevalenza di *Salmonella* spp. nella carne e nei suini del paese membro;
- 2) le abitudini alimentari e le preferenze dei consumatori;
- 3) la relativa importanza di altre fonti di trasmissione di *Salmonella* (EFSA, 2010).

Una valutazione dell'EFSA del 2010 suggerisce che, in media, i suini e la carne suina possono essere responsabili di circa il 10-20% di tutti i casi di salmonellosi umana nella UE, con qualche differenza fra i diversi Stati Membri. In particolare, sono stati ricondotti

alla carne suina circa il 12.2% di casi umani causati da *S. Typhimurium* e il 2.2% di casi sostenuti da *S. Enteritidis* (EFSA, 2010).

Si evince quindi come sia fondamentale la corretta implementazione di controlli durante le fasi di macellazione e di trasformazione della carne suina.

4. CONTROLLI NELLA FILIERA DI PRODUZIONE DEL SUINO

4.1 Fasi a rischio

All'interno della filiera di produzione di carne suina, *Salmonella* spp. può essere riscontrata in diverse fasi, a partire dall'allevamento fino al prodotto finale (Figura 6).

Ciascuna fase presenta punti critici per la contaminazione da *Salmonella*, che saranno esaminati in dettaglio nei paragrafi successivi.

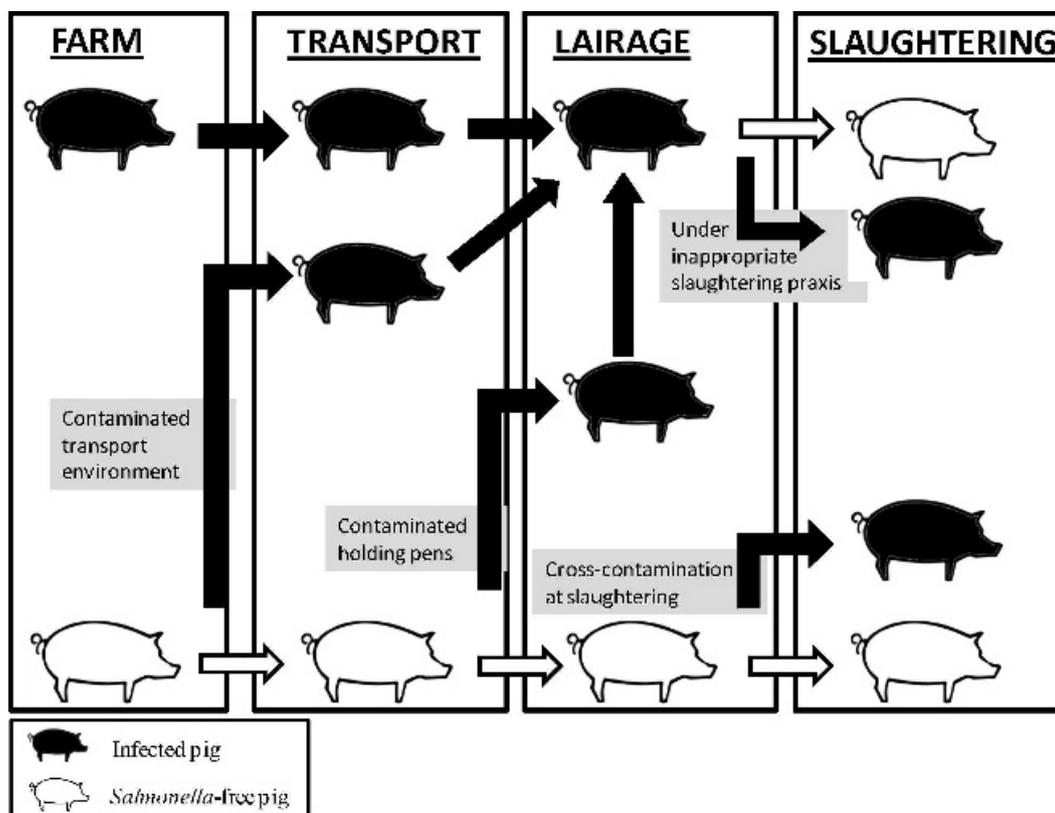


Figura 6 Fasi a rischio durante la macellazione del suino per la trasmissione di *Salmonella* spp. (Arguello et al., 2012)

4.1.1 Allevamento

Durante la permanenza in allevamento, nelle fasi di svezzamento e ingrasso, i suini possono incontrare *Salmonella* spp. e infettarsi mostrando segni clinici evidenti, eventualità più frequente nei suinetti allo svezzamento o nel post-svezzamento, oppure possono diventare portatori asintomatici in grado di conservare il patogeno in diversi tessuti, fra cui i linfonodi afferenti al tratto digerente e le tonsille, e diffonderlo

nell'ambiente tramite l'emissione di feci, eventualità più frequente nei suini all'ingrasso (Bonardi, 2017).

I fattori di rischio che comportano una maggiore probabilità di infezione in questo contesto sono diversi, fra cui:

- Alimentazione = in primo luogo, per garantire una migliore salubrità della filiera, il mangime dovrebbe essere *Salmonella*-free. L'alimento bagnato si è dimostrato più sicuro rispetto al mangime pellettato, probabilmente a causa delle fermentazioni subite durante il processo di produzione, in grado di abbassarne il pH tramite la formazione di acidi organici. Un pH intorno a valori di 4-5 è infatti in grado di inibire la crescita di *Salmonella* spp. sia nell'alimento che nel tratto gastrointestinale dell'animale (Bonardi, 2017).
- Gestione dell'allevamento = implementazione di certi sistemi di produzione come, ad esempio, il sistema "All In- All Out" permette di attuare misure di pulizia e sanificazione dei capannoni migliori rispetto ad altri sistemi produttivi. Anche il contatto stretto fra diversi gruppi di suini dovrebbe essere considerato come un fattore di rischio per la trasmissione del patogeno, nonché il contatto con animali di specie differente (Bonardi, 2017)
- Livello igienico = le corrette misure di pulizia e disinfezione unite ad un rispetto rigoroso delle misure di biosicurezza, sono in grado di garantire un buon controllo sulla diffusione del patogeno (Bonardi, 2017).
- Stato di salute generale del lotto di suini= l'analisi di campioni di feci ottenuti tramite l'utilizzo di tamponi rettali permette di conoscere lo stato sanitario del gruppo, per verificare l'effettiva efficacia di eventuali piani di controllo implementati in azienda. E' bene ricordare però che l'escrezione di *Salmonella* spp. tramite le feci è intermittente e questo interferisce con il monitoraggio della prevalenza del patogeno in allevamento (Bonardi, 2017).

In generale, diversi studi hanno comunque accertato che lo stato dei suini che giungono al macello dipende da molti fattori, oltre allo stato sanitario posseduto in allevamento. Infatti, suini infettati in allevamento possono fungere da veicolo di trasmissione di *Salmonella* ad animali precedentemente sani in fasi successive alla permanenza in azienda (Arguello et al., 2012).

4.1.2 Trasporto

Durante il trasporto dall'allevamento al macello, diversi fattori che favoriscono la diffusione di *Salmonella* spp. convergono rendendo questa fase particolarmente critica (Arguello et al., 2012).

Primariamente, le operazioni di carico sul mezzo di trasporto, l'unione di gruppi di animali con poca familiarità fra di loro, le alte densità di carico, e il cambio repentino di ambiente determinano forte stress nei suini. Lo stress è responsabile della recrudescenza dell'infezione di *Salmonella* spp. che viene quindi eliminata per via fecale sul mezzo di trasporto e nelle stalle di sosta al momento dello scarico (Arguello et al., 2012). Anche la durata del viaggio, le abilità di guida del conducente e le condizioni climatiche avverse, come ad esempio temperature troppo elevate, incidono fortemente sui livelli di stress dei suini (Bonardi, 2017).

Durante questa fase, inoltre, gli animali sono tenuti a digiuno, dato che l'alimentazione viene interrotta almeno 12-18 ore prima del trasporto. Un'interruzione dell'assunzione di cibo così prolungata porta a cambiamenti a carico del microbiota intestinale, determinando un aumento dei livelli di *Salmonella* nelle feci (Arguello et al., 2012; Bonardi, 2017).

Proprio a causa della possibilità di contaminazione del mezzo di trasporto, per evitare la cross-contaminazione di altri gruppi di animali presenti nello stesso veicolo, sono previsti obbligatoriamente il lavaggio e la disinfezione del mezzo prima che lasci il macello (Arguello et al., 2012). Diversi studi dimostrano però l'inefficacia dei protocolli di pulizia e disinfezione attualmente in uso: molti mezzi di trasporto, a seguito di analisi sulle superfici, sono risultati comunque positivi per *Salmonella* spp. anche dopo gli interventi di sanificazione (Arguello et al., 2012).

4.1.3 Permanenza nelle stalle di sosta

Una volta al macello, i suini vengono scaricati dal veicolo e condotti nelle cosiddette "stalle di sosta" per un periodo variabile, necessario per permettere agli animali di riprendersi dallo stress del trasporto e per preservare le qualità organolettiche della carne (Arguello et al., 2012). In questa fase sussistono gran parte degli stessi fattori stressanti presenti durante la fase precedente, quali l'elevata densità di soggetti, variazioni di temperatura, cambiamento dell'ambiente, contatto con suini non appartenenti al gruppo originario, nonché la presenza di rumori forti e persone estranee. Di conseguenza, elevati livelli di stress possono riscontrarsi anche durante questa fase,

determinando ancora una volta la disseminazione di *Salmonella* nell'ambiente (Arguello et al., 2012).

Il tempo di permanenza in queste strutture è variabile, e talvolta si protrae fino a 24 ore e oltre per gli animali arrivati nel fine settimana. La durata della permanenza dipende dalla routine di macellazione, dalle logistiche del macello e dalle frequenze dei trasporti. Periodi più brevi di circa 2-6 ore sono i più frequenti, sebbene siano di durata sufficiente a permettere la colonizzazione dell'intestino da parte di *Salmonella* (Arguello et al., 2012). E' stata infatti verificata una correlazione positiva fra le ore trascorse nelle stalle di sosta e la frequenza di rilevamento del patogeno nei linfonodi, probabilmente a causa dell'opportunità di invasione dei linfonodi mesenterici durante la permanenza in questi ambienti (Bonardi, 2017). Di conseguenza, la contaminazione delle aree di sosta tramite le feci di soggetti escretori permette la diffusione del microrganismo, favorendo la trasmissione di *Salmonella* a soggetti precedentemente sani sia per via orale, sia contaminandone la cute. La contaminazione della cute è stata correlata positivamente alla contaminazione della carcassa dello stesso animale (Bonardi, 2017).

Un altro importante fattore che influisce sulla contaminazione delle stalle di sosta è rappresentato dai protocolli igienici. Spesso, per questi ambienti, la pulizia si limita alla rimozione, tramite lavaggi con acqua fredda ad alta pressione, del materiale fecale presente sulla pavimentazione e sulle pareti; tale pratica si è tuttavia dimostrata poco efficace nell'eliminazione del patogeno (Arguello et al., 2012). Alla persistenza ambientale di *Salmonella* contribuiscono due fattori:

- Le superfici dei pavimenti e delle pareti delle stalle di sosta spesso sono molto ruvide, contengono imperfezioni e fessure in grado di ridurre l'efficacia dei prodotti di pulizia, e permettono l'accumulo di materia organica dentro la quale *Salmonella* può sopravvivere;
- Il patogeno ha la capacità di formare, annidandosi nel materiale organico, dei biofilm in grado di assicurarne la sopravvivenza e la resistenza alle soluzioni disinfettanti (Arguello et al., 2012).

4.1.4 Linea di macellazione

La contaminazione delle carcasse con *Salmonella* spp. rappresenta un problema serio nella filiera di produzione della carne suina. In particolare, all'interno del macello, sono state identificate due fonti principali di contaminazione: da una parte vi sono gli stipiti di *Salmonella* già presenti nella linea di macellazione, sopravvissuti tramite la creazione di

biofilm in particolari nicchie ambientali, che entrano a far parte della flora batterica residente e che costituiscono una fonte di contaminazione per le carcasse che procedono lungo la linea; dall'altra vi sono gli stipiti introdotti da suini escretori, che rappresentano i maggiori responsabili della contaminazione delle carcasse (Arguello et al., 2012).

Per meglio comprendere le fasi maggiormente a rischio (Figura 7), è bene ricordare che la linea di macellazione può essere divisa in due zone: la zona sporca e la zona pulita. La prima è un'area meccanizzata dove vengono svolte le azioni di stordimento, dissanguamento, scottatura, depilazione, flambatura, spazzolatura e lavaggio della carcassa. La zona pulita invece è quella dove la carcassa viene eviscerata e toelettata, e queste operazioni vengono svolte parzialmente a mano dagli operatori (Arguello et al., 2012).

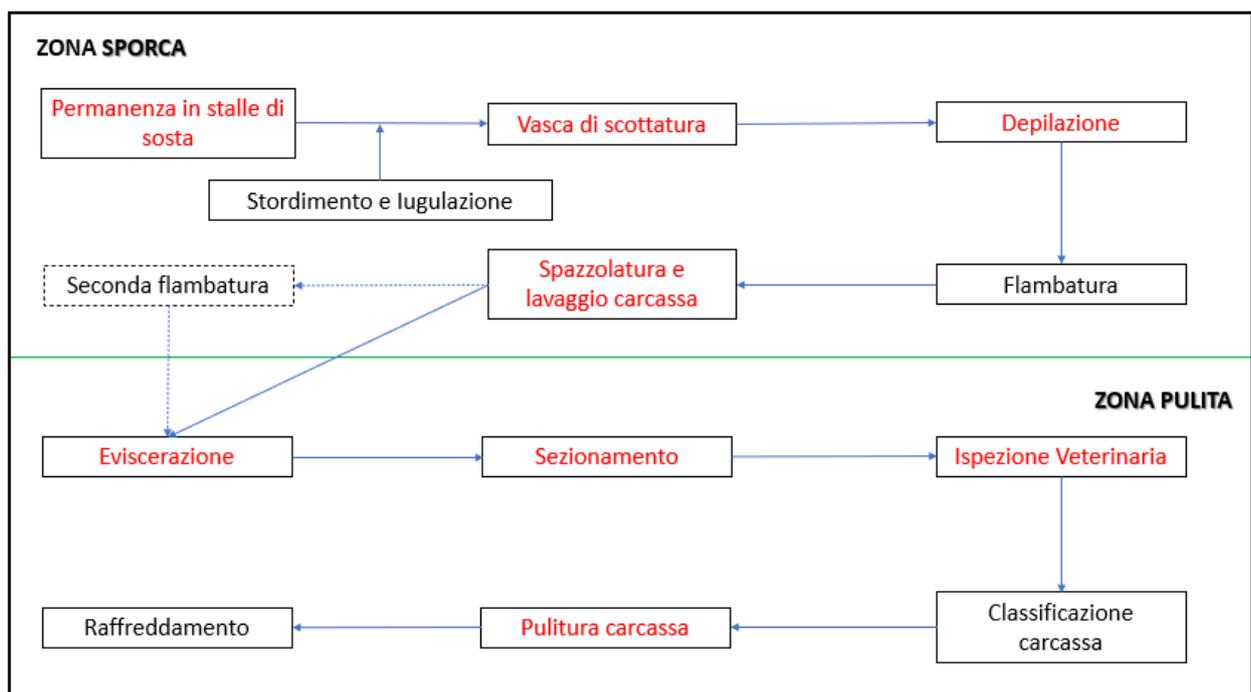


Figura 7 Linea di macellazione del suino, con i punti critici per la contaminazione da *Salmonella* evidenziati in rosso (De Busser, 2013)

All'entrata della linea di macellazione, gli animali sono immobilizzati, storditi utilizzando il metodo più adeguato (che, nel caso dei suini, è rappresentato dall'elettronarcosi o dall'impiego di miscele gassose) e dissanguati nel più breve tempo possibile (Reg. CE

1099/2009). Già in questa fase, alcuni studi hanno dimostrato un elevato livello di contaminazione delle carcasse, soprattutto per la presenza di suini infetti nelle stalle di sosta (Pearce et al., 2004; Arguello et al., 2012).

La carcassa, successivamente, viene immessa in una vasca di scottatura con una temperatura variabile dai 55 ai 62°C. L'acqua utilizzata nella vasca inevitabilmente viene contaminata da materiale organico, feci e, di conseguenza, microrganismi (Bolton et al, 2003; Arguello et al., 2012). Qualora la temperatura dovesse abbassarsi al di sotto dei 61°C, o qualora essa dovesse contenere un'elevata quantità di materiale organico in grado di proteggere il microrganismo, *Salmonella* potrebbe facilmente essere veicolata da una carcassa all'altra tramite il passaggio in vasca (De Busser et al., 2013). A questo punto, la carcassa viene convogliata nella macchina depilatrice che opera una prima grossolana rimozione delle setole. Le "spazzole" sono formate da una serie di dita di gomma e possono facilmente accumulare materiale organico che, ancora una volta, può essere veicolato ad altre carcasse (Arguello et al., 2012). Di conseguenza, la contaminazione e la cross-contaminazione avvengono facilmente durante questa fase per le comprensibili difficoltà di pulizia dell'apparecchiatura (De Busser et al., 2013).

Secondo alcuni studi, la successiva flambatura a cui viene sottoposta la carcassa sembra essere l'unico passaggio in grado di eliminare la contaminazione da *Salmonella* dalle carcasse (Arguello et al., 2012). Infine, una macchina spazzolatrice termina l'asportazione delle setole: anche in questo caso, se la flambatura non dovesse essere eseguita in maniera corretta e la carica microbica superficiale non fosse stata abbattuta, le spazzole potrebbero contaminarsi e quindi permettere la diffusione del patogeno (Arguello et al., 2012). Di conseguenza, l'eventuale aggiunta di una seconda flambatura poco prima dell'eviscerazione potrebbe evitare che carcasse contaminate entrino nella zona pulita della linea di macellazione (De Busser et al., 2013).

Secondo alcuni studi, circa il 55-90% della contaminazione delle carcasse avviene durante l'eviscerazione (De Busser et al. 2013). In questa fase, la fonte di diffusione è rappresentata dai tessuti infetti dei soggetti portatori. Le tonsille, il tratto gastrointestinale con il suo contenuto (in particolare il tratto ciecale), i linfonodi mesenterici e ileociecali, nonché quelli retrofaringei e sottomandibolari sono sedi da cui frequentemente viene isolata *Salmonella* (EFSA & ECDC, 2007). Per questo motivo, manovre errate di eviscerazione, con perforazione del pacchetto intestinale e liberazione del contenuto fecale, potrebbero risultare in una diffusione del patogeno non solo sulla carcassa ma anche sulle superfici ambientali, responsabili di cross-

contaminazione (Arguello et al., 2012). Il digiuno dei suini al momento del trasporto, le tecniche corrette di eviscerazione e la formazione del personale che si occupa delle operazioni di macellazione sono misure efficaci al fine di ridurre l'accidentale perforazione del pacchetto intestinale. Anche la chiusura del tratto ano-rettale con sacchetti di plastica dovrebbe impedire la fuoriuscita di materiale fecale dal retto (De Busser, 2013).

Lo strumento utilizzato per separare le carcasse in due mezzene, così come le mani e gli strumenti degli operatori al macello e dei veterinari ispettori possono allo stesso modo rappresentare veicoli di cross-contaminazione. La pulizia e la disinfezione della sega taglia mezzene, così come l'immersione dei coltelli in acqua a 82°C nell'impiego fra una carcassa e l'altra, e l'utilizzo di guanti sembrano essere strumenti efficaci per ridurre la contaminazione da *Salmonella* (De Busser, 2013).

Anche la refrigerazione (temperatura massima ammessa: 7°C) a cui viene successivamente sottoposta la carcassa è fondamentale: alcuni studi riportano una riduzione dei livelli di carica batterica superficiale, a seguito dell'esposizione a basse temperature (Chiesa e Civera, 2007). Nonostante le temperature di refrigerazione non abbiano effetto battericida per la gran parte dei batteri Gram negativi, la prevalenza di *Salmonella* è stata dimostrata diminuire a seguito delle procedure di raffreddamento (Arguello et al., 2012).

4.2 Riferimenti legislativi

Data l'importanza del suino come agente di trasmissione di agenti responsabili di MTA, in particolare di *Salmonella*, a livello europeo sono stati indotti regolamenti specifici atti a implementare un sistema di controllo lungo la catena di macellazione e trasformazione della carne di questa specie.

Gli atti legislativi più importanti per il controllo di *Salmonella* sono:

- Regolamento CE n. 2073/2005 che stabilisce i criteri microbiologici di igiene di processo (sulle carcasse al macello) e di sicurezza alimentare (per gli alimenti carnei in commercio);
- Regolamento CE n. 1441/2007 che modifica il regolamento CE n. 2073/2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari, introducendo un criterio di sicurezza alimentare per *Salmonella* negli alimenti di proseguimento in polvere per l'infanzia;

- Regolamento CE n. 217/2014 che modifica il regolamento (CE) n. 2073/2005 per quanto riguarda *Salmonella* nelle carcasse di suini, riducendo il numero di carcasse che possono essere positive per *Salmonella* a seguito dei controlli di igiene di processo;
- Regolamento CE n. 2160/2003 che si occupa più specificamente del controllo di *Salmonella* spp. e di altri agenti zoonosici presenti negli alimenti.

Quest'ultimo regolamento è stato stilato in modo da assicurare che vengano prese misure efficaci per identificare e controllare *Salmonella* e altri patogeni zoonosici in tutti gli stadi di produzione, processazione e distribuzione, in particolare della produzione primaria, in modo da ridurre la prevalenza di questi microrganismi e nel contempo ridurre il rischio per la salute pubblica (Reg. CE 2160/2003).

Per quanto riguarda i controlli in fase di macellazione, invece, la base legislativa è stata stilata nel Regolamento CE n. 2073/2005, che inserisce la ricerca di *Salmonella* al macello tra i cosiddetti criteri di igiene di processo. Secondo questo regolamento, la ricerca di *Salmonella* deve essere eseguita su 50 carcasse dopo la macellazione prima del raffreddamento (Reg. CE n. 2073/2005).

I metodi di campionamento e la scelta dei siti di prelievo sono inseriti nella norma ISO 17604: per questo microrganismo, nel suino, si utilizza un metodo di campionamento non distruttivo tramite spugna abrasiva e vengono selezionate le aree a più alta probabilità di contaminazione, che in questa specie sono a livello di lombo, guancia, faccia mediale della coscia (prosciutto) e pancetta (IZSve, 2021). L'area campione totale deve essere di almeno 400 cm², circa 100 cm² per singola parte della carcassa sottoposta a campionamento. Secondo questo criterio, *Salmonella* spp. deve essere "assente nell'area esaminata per carcassa" (Reg. CE n. 2073/2005; Reg. CE n 1441/2007).

L'OSA deve prelevare 50 campioni in 10 sessioni consecutive, e i regolamenti europei fissano un numero massimo di campioni che possono non rispettare i limiti fissati. Secondo il Regolamento CE n. 217/2014, che modifica i precedenti regolamenti riguardo *Salmonella* nelle carcasse di suino, il numero di carcasse contaminate da cinque è stato abbassato a tre (Reg. CE n. 217/2014). Di conseguenza, i risultati si possono definire soddisfacenti quando la presenza del patogeno si rileva in massimo 3 carcasse su 50 (6%), mentre sono insoddisfacenti se il numero di campioni che non rispettano i limiti risulta superiore a 3 (Reg. CE n. 2073/2005; Reg. CE n 1441/2007; Reg. CE n. 217/2014).

In caso di risultati insoddisfacenti, l'OSA è tenuto ad attuare delle misure correttive, che sono rappresentate da: "miglioramento delle condizioni igieniche della macellazione e revisione dei controlli del processo, dell'origine degli animali e delle misure di biosicurezza nelle aziende di origine" (Reg. CE n. 2073/2005).

5. METODICHE PER L'IDENTIFICAZIONE DI *SALMONELLA*

Le metodiche attualmente in uso per l'identificazione di *Salmonella* da matrici di origine animale possono essere suddivise in:

- metodiche tradizionali, fra cui la norma EN/ISO 6579-1:2017, che viene identificata come metodo di riferimento secondo normativa, la PCR e l'ELISA;
- nuove metodiche come i biosensori, che rappresentano strumenti estremamente promettenti dal punto di vista della rapidità, della specificità e della sensibilità.

5.1 I metodi tradizionali

La metodica colturale è indicata nei regolamenti comunitari come il “gold standard per l'identificazione” di *Salmonella* nei campioni prelevati al macello. Tuttavia, è dotata di forti limitazioni, prima fra tutte il tempo di risposta (Perry et al., 2007).

Nel corso degli anni sono stati proposti strumenti alternativi in grado di fornire un esito analitico con maggiore rapidità. D'altro canto, essi si sono spesso dimostrati inadatti all'utilizzo nei laboratori industriali a causa di molteplici fattori: scarsa sensibilità, elevato costo, necessità di personale altamente specializzato e attrezzature dedicate (Umesha e Manakumar, 2018).

5.1.1 Metodo colturale

La metodica EN/ISO 6579-1:2017 è indicata come “gold standard” per l'isolamento di *Salmonella* dai campioni prelevati in macello. Questa metodica prevede quattro step successivi: un pre-arricchimento in brodo non selettivo, un arricchimento su terreni selettivi, la semina su piastre di terreni selettivi ed infine la conferma tramite appropriati test biochimici e sierologici (Mooijman, 2018).

Tra le limitazioni di questa metodica, è compreso purtroppo il tempo di risposta. E' infatti necessario attendere 3 giorni se il campione risulta negativo, e 5-7 giorni per la conferma di un esito positivo (Bonardi et al., 2012). E' inoltre riconosciuto che la sensibilità delle metodiche colturali varia in base ad alcuni fattori, quali:

- la natura del campione analizzato (feci, linfonodi o tonsille)
- il tipo di campione (singolo o combinato)
- la quantità di substrato che viene processato
- la combinazione di terreni utilizzati per l'isolamento del batterio (Mainar-Jamie et al., 2013).

Ad esempio, in uno studio condotto nel 2007 da Eriksson e Aspan, nel quale diverse metodiche di identificazione di *Salmonella* spp. sono state confrontate applicandole a campioni di feci di diverse specie animali contaminate artificialmente, il metodo colturale si è dimostrato quello dotato di maggiore sensibilità e specificità rispetto a metodiche come la PCR o l'ELISA (Eriksson e Aspan, 2007). Tuttavia, in un altro studio condotto nel 2013 da Mainar-Jamie et al., lo stesso metodo dimostrava una sensibilità meno marcata quando eseguito su linfonodi mesenterici (Mainar-Jamie et al., 2013).

5.1.2 Polymerase Chain Reaction

Una delle possibili alternative risulta essere l'applicazione della PCR. Si tratta di una tecnica ciclica di biologia molecolare costituita da circa 30-40 cicli, utilizzata al fine di amplificare in maniera selettiva un tratto preciso di DNA del quale si conoscano le sequenze di nucleotidi iniziali e terminali. Ciascuno dei singoli cicli è costituito da step successivi: prima la denaturazione del DNA e poi la polimerizzazione tramite DNA polimerasi (Polymerase Chain Reaction Fact Sheet, genome.gov).

In numerosi studi, è stata dimostrata l'ottima sensibilità di questa metodica, da paragonarsi a quella del metodo colturale e in alcuni casi addirittura superiore (Eriksson e Aspan, 2007; Mainar-Jamie et al., 2018). A questa caratteristica, vanno unite la velocità di ottenimento dei risultati e la riduzione dei costi rispetto alla metodica colturale (Mainar-Jamie et al., 2018).

Dall'altra parte, è sempre richiesto un personale specializzato, degli strumenti finalizzati, un pre-arricchimento di 24-48 ore pre-analisi in modo da permettere alle cellule di *Salmonella* di crescere mentre viene ostacolata la crescita di batteri competitivi (Eriksson e Aspan, 2007), e non può essere utilizzata come unica metodica: in caso di risultato positivo, il campione necessita di una verifica aggiuntiva tramite esecuzione di prove colturali, per giungere all'isolamento del ceppo batterico (Mainar-Jamie et al., 2018; Eriksson e Aspan, 2007).

Un altro svantaggio di questa tecnica è l'impossibilità di distinguere un microrganismo vivo e replicante da uno morto, in quanto viene semplicemente rilevata la presenza del DNA. Al contrario, con la metodica colturale, vengono isolati solo ed esclusivamente microrganismi vivi e replicanti, e di conseguenza più probabilmente responsabili di MTA (Umesha e Manakumar, 2018).

Infine, per l'identificazione di eventuali microrganismi è necessaria la creazione di particolari sonde di DNA, che risultano essere particolarmente costose (Umesha e Manakumar, 2018).

5.1.3 Metodiche immunoenzimatiche

Altre metodiche molto utilizzate sono quelle immunoenzimatiche, come l'ELISA. Il principio di funzionamento di questa tecnica è basato sul legame di anticorpi specifici ad una molecola target, seguito dalla valutazione della presenza dei complessi antigene-anticorpo (Umesha e Manakumar, 2018). Si tratta di un metodo particolarmente utilizzato nel campo della sicurezza alimentare, in virtù della sua rapidità di risposta, della buona sensibilità e dei ridotti costi di applicazione (Umesha e Manakumar, 2018). Tuttavia, la sensibilità del metodo varia notevolmente a seconda del microrganismo da rilevare a causa della differente affinità degli anticorpi che vengono utilizzati: ad esempio, nell'esperimento condotto da Eriksson e Aspan nel 2007, S. Livingston e S. Worthington non sono state correttamente identificate dalla metodica ELISA probabilmente a causa della scarsa affinità degli anticorpi utilizzati verso quei determinati sierotipi (Eriksson e Aspan, 2007). Si evince quindi come i risultati di questa metodica dipendano principalmente dall'affinità degli anticorpi utilizzati verso il microrganismo target. Possono esistere, anche in questo caso, molecole inibitrici in grado di dare origine a risultati falsi negativi in quanto in grado di ostacolare il legame degli anticorpi con l'antigene target (Umesha e Manakumar, 2018).

5.2 Nuove metodiche: I biosensori

Negli ultimi anni sono state esplorate nuove frontiere nel campo dell'identificazione di agenti responsabili di MTA. Secondo gli ultimi standard di legge, i nuovi metodi dovrebbero soddisfare alcuni parametri:

- dovrebbero essere in grado di identificare una singola Unità Formante Colonia (UFC) di *Salmonella* spp. in 25 grammi di alimento;
- dovrebbero avere una sensibilità e una specificità pari ad almeno il 99%;
- non dovrebbero essere richieste particolari conoscenze da parte del personale che li utilizza, ma al contrario dovrebbe essere fruibile da chiunque (Eijkelkamp et al., 2009; Silva et al., 2018);

- il tempo di ottenimento di un risultato dovrebbe essere rapido: da poche ore, fino ad un massimo di 24 (Silva et al., 2018).

In quest'ottica, i biosensori rappresentano una nuova era nella rilevazione di agenti responsabili di MTA, soprattutto grazie agli enormi passi avanti compiuti nell'ambito delle moderne biotecnologie: i nanomateriali, infatti, si sono dimostrati fondamentali per l'amplificazione del segnale, permettendo anche l'identificazione di una singola UFC in determinati substrati (Umesha e Manakumar, 2018).

Con il termine biosensore si intende uno strumento integrato in grado di fornire specifiche quantità (o informazioni semi-quantitative) della determinata sostanza o cellula target, grazie ad un elemento di riconoscimento biologico, in diretto contatto con un trasduttore del segnale, in grado di rendere interpretabile il risultato (Shen, Xu e Li, 2021).

5.2.1 I biorecettori

L'elemento di riconoscimento biologico (o biorecettore) è la parte più importante del biosensore, responsabile della sensibilità e della specificità dello strumento. Qualsiasi molecola in grado di legarsi e riconoscere un target può essere utilizzata come recettore. I più comuni utilizzati per il riconoscimento di *Salmonella* sono: anticorpi, aptameri, batteriofagi, peptidi antimicrobici (AMPs) e sonde di acidi nucleici (Shen, Xu e Li, 2021).

Ciascuno di questi possiede vantaggi e svantaggi che verranno meglio elencati nei paragrafi successivi (Tabella 1).

BIORECETTORE	VANTAGGI	SVANTAGGI
Anticorpi	Elevata affinità e specificità	Scarsa stabilità, elevato costo, produzione difficoltosa
Aptameri	Elevata stabilità, affinità e specificità; facilità di sintesi e modifiche; basso costo	Sensibili all'attacco di nucleasi
Batteriofagi	Possibile differenziazione di cellule batteriche vive da cellule batteriche morte; basso costo	Bassa efficienza di cattura in fase di asciugatura; potenziale lisi di cellule batteriche durante il riconoscimento
AMPs	Elevata affinità e stabilità; facilità di sintesi; basso costo	Bassa specificità
Sonde acidi nucleici	Elevata stabilità; facilità di sintesi e modificazioni	Limitate a genosensori

Tabella 1 Vantaggi e svantaggi dei diversi biorecettori per *Salmonella* spp.
(Shen, Xu e Li, 2021)

5.2.1.1 Gli anticorpi

I biorecettori in uso per l'assemblaggio di biosensori adatti al riconoscimento di *Salmonella* sono di diversi tipi, fra cui molto utilizzati sono gli anticorpi. Gli anticorpi sono glicoproteine di circa 50 kDa, appartenenti alla famiglia delle immunoglobuline, prodotte dal sistema immunitario con funzione difensiva, in grado di riconoscere e legarsi a molecole target (dette antigeni) con estrema affinità e specificità, qualità che li rendono strumenti ottimali al fine dell'isolamento di cellule batteriche (Sadava et al., 2010). Esistono cinque classi di anticorpi: IgG, IgM, IgE, IgD e IgA (Figura 8). La classe maggiormente utilizzata per la produzione di biosensori è IgG, che è tipicamente formata da quattro catene polipeptidiche (due catene pesanti e due catene leggere), unite ad Y (Shen, Xu e Li, 2021). Ciascuna catena contiene due regioni: una regione costante (Fc), simile in tutte le immunoglobuline e sulla base della quale viene determinata la classe dell'anticorpo, e una regione variabile, responsabile del riconoscimento di un determinato antigene (Sadava et al., 2010).

Una grande limitazione nell'utilizzo di queste glicoproteine è il metodo di produzione: per ottenere anticorpi in elevate quantità, è necessario separarli dal siero di mammiferi precedentemente sensibilizzati attraverso un processo particolarmente lungo, costoso e complicato (Shen, Xu e Li, 2021; Bruce & McNaughton, 2017). Altri svantaggi correlati all'utilizzo di anticorpi sono: instabilità ambientale, costi elevati di produzione di anticorpi

monoclonali, sensibilità all'azione di protesi e rischio di cross-reazione (Kulagina et al., 2005).

Sono state quindi proposte soluzioni alternative, come la produzione di “nanocorpi”, proteine molto più piccole rispetto agli anticorpi (circa 15 kDa) costituite da una singola catena pesante, in grado di essere prodotte in massa attraverso sistemi standard di espressione microbica (Shen, Xu e Li, 2021). Nonostante non sia presente una catena leggera, l'affinità nei confronti degli antigeni rimane identica a quella di un normale anticorpo. Inoltre, sono molecole che hanno dimostrato una maggiore flessibilità a livello di sito di legame, permettendone il riconoscimento di molecole inaccessibili agli anticorpi (Jayan, Pu e Sun, 2020). Tuttavia, si tratta di una tipologia di biorecettori che necessitano ulteriori studi al fine di comprenderne meglio il potenziale di utilizzo.

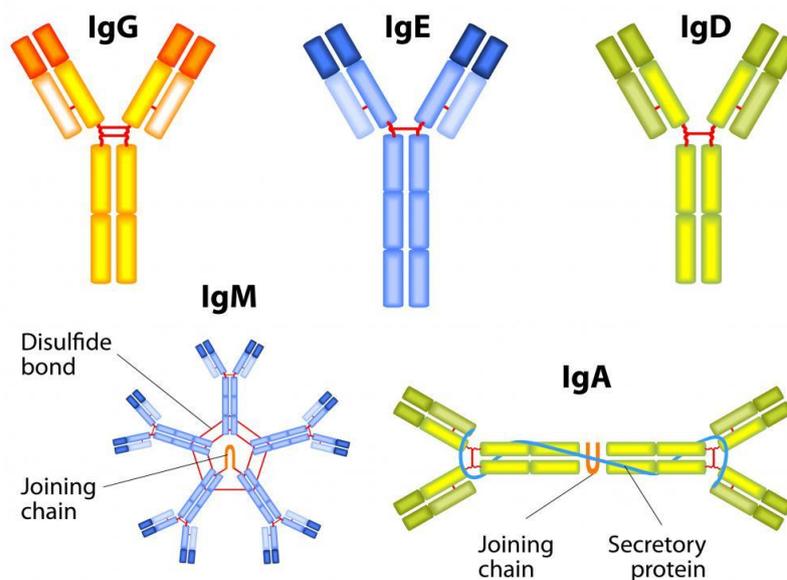


Figura 8 Le cinque classi anticorpali (www.allthescience.org)

5.2.1.2 Le sonde di acidi nucleici

Le sonde nucleiche sono tratti sintetici di DNA o RNA con sequenze appositamente selezionate al fine di riconoscere una determinata molecola. Il meccanismo di funzionamento si basa sulla naturale affinità esistente fra un single stranded DNA o RNA (ssDNA/RNA) nei confronti del suo filamento complementare (Juskowiak, 2011). Esistono due tipologie principali di sonde nucleotidiche:

- sonde di ibridazione = il meccanismo di riconoscimento si basa sulla complementarità del filamento target con quello della sonda (Figura 9);
- aptameri = le caratteristiche di questo gruppo verranno trattate successivamente; si tratta di acidi nucleici in grado di fungere da recettori tridimensionali di molecole non-nucleotidiche (Juskowiak, 2011).

Per quanto riguarda le sonde di ibridazione, nella maggior parte dei casi, il DNA estratto da *Salmonella* viene denaturato ed esposto alle sonde nucleiche (Shen, Xu e Li, 2021). A questo punto avviene un processo di ibridazione sulla superficie del sensore, responsabile dell'emissione di un segnale misurabile, spesso grazie al legame di più gruppi fluorescenti alla sonda oligonucleotidica (Juskowiak, 2011).

Si tratta di biorecettori particolarmente semplici da produrre, termicamente stabili e dotati di particolare flessibilità di utilizzo. Il loro impiego risulta però limitato alla creazione di genosensori, che a loro volta sono caratterizzati da alcuni inconvenienti, fra cui i laboriosi processi di estrazione e frammentazione necessari per ottenere il DNA, nonché la necessità di amplificazione del segnale tramite PCR (Shen, Xu e LI, 2021).

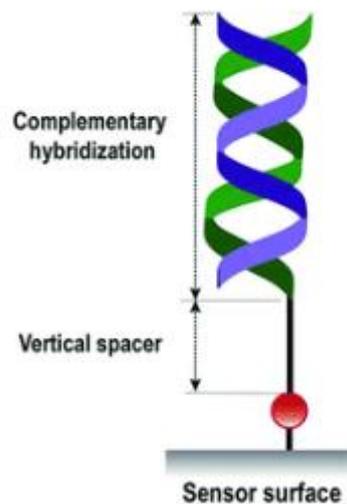


Figura 9 Rappresentazione di una sonda di acidi nucleici (in verde) impegnata nel legame con il filamento target (in blu) (Sánchez, Lechuga e Mitchell, 2019)

5.2.1.3 Gli aptameri

Gli aptameri sono acidi nucleici a singolo filamento (di acido desossiribonucleico, o DNA, oppure di acido ribonucleico, o RNA) con elevata affinità ad un determinato target, e in grado di assumere, in seguito ad un legame, diverse conformazioni (Ansari

et al., 2017). Essi, infatti, a seguito del riconoscimento, assumono una struttura tridimensionale generata dall'instaurarsi di interazioni intramolecolari, e si legano alla molecola target grazie alla formazione di legami ad idrogeno e interazioni idrofobiche (Figura 10) (Saito, 2021).

Nonostante la diversità di sequenze nucleotidiche e le interazioni chimiche possibili fra gli aptameri e i loro target siano meno numerose rispetto a quelle possibili con gli anticorpi, la fattibilità in termini di sintesi, stabilità chimica e termica, e maneggevolezza dal punto di vista sperimentale rendono queste molecole degli strumenti estremamente utili (Saito, 2021). Gli aptameri possono essere migliorati tramite l'utilizzo di diversi marker, in grado o di aumentarne ulteriormente la stabilità, o di rendere più semplice la rilevazione dei risultati (ad esempio, utilizzando molecole fluorescenti) (Ansari et al., 2017).

Gli aptameri sono ottenuti tramite l'esecuzione di una "*Systematic Evolution of Ligands by EXponential enrichment*" (SELEX) in vitro: questa metodica permette di selezionare le sequenze nucleotidiche in grado di legarsi alla molecola desiderata tramite una fase di incubazione e successiva separazione dei complessi target-acido nucleico dai singoli filamenti non impegnati in un legame. Una volta selezionati, i tratti di DNA o RNA desiderati vengono amplificati mediante PCR (Ansari et al., 2017; Saito, 2021).

Queste molecole offrono quindi una serie di vantaggi, fra cui la facilità di sintesi, la non tossicità, la memoria strutturale e una lunga emivita, rendendoli di conseguenza ottimi strumenti per l'assemblamento di biosensori per il riconoscimento di *Salmonella* (Shen, Xu e Li, 2021). Tuttavia, in alcuni casi anche queste molecole hanno mostrato diverse limitazioni, quali la sensibilità alla presenza di nucleasi, e la forte influenza che alcune condizioni, quali il pH, la viscosità e la forza ionica, hanno sulla loro azione. Oltretutto, gli aptameri possono talvolta interagire con la matrice del campione in maniera non selettiva, determinando risultati imprecisi o falsi-positivi (Ansari et al., 2017).

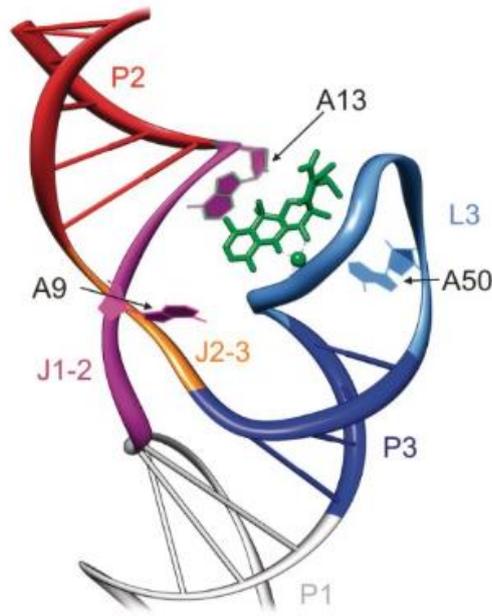


Figura 10 Struttura tridimensionale di un aptamero a seguito del legame con il suo target (Förster et al., 2011)

5.2.1.4 I batteriofagi

I batteriofagi sono virus in grado di infettare cellule batteriche, delle quali sfruttano il meccanismo della sintesi proteica per replicarsi. Sono ubiquitari nell'ambiente e costituiscono uno dei più abbondanti agenti biologici attualmente conosciuti (Kasman e Porter, 2021). La loro struttura consiste in un capsid proteico poliedrico che racchiude il materiale genetico (DNA o RNA), e una coda che utilizzano per aderire alla cellula ospite (Kasman e Porter, 2021). Una volta avvenuta l'adesione, il genoma del virus viene trasferito all'interno della cellula batterica, dove avviene la replicazione (Singh et al., 2020). Questa moltiplicazione del genoma virale può seguire due diverse vie (Figura 11):

- ciclo litico = le risorse della cellula ospite vengono rapidamente convertite in genoma virale e proteine del capsid, prodotte dai ribosomi batterici. Questi componenti si assemblano rapidamente a formare copie di virioni maturi (Kasman e Porter, 2021). Una delle proteine codificate dal genoma virale è un'endolisina, in grado di attaccare il peptidoglicano della parete batterica, causandone la lisi e la conseguente morte del batterio ospite, e rilascio nell'ambiente circostante dei virioni maturi (Jayan, Pu e Sun, 2020; Singh et al., 2020);

- ciclo lisogenico = il materiale genetico del virus viene integrato nel genoma del batterio stesso. Il materiale genetico viene replicato e passato alle cellule batteriche figlie senza provocarne la morte. Il genoma virale integrato viene definito “profago”, mentre il batterio infetto viene definito “temperato”. Batterii temperati possono fungere da agenti trasportatori, attraverso un processo definito “di trasduzione”, di determinati geni virali da un batterio all’altro. I profagi, in risposta a variazioni ambientali, possono riconvertirsi ad un ciclo litico di replicazione, portando a morte la cellula ospite (Figura 11) (Kasman e Porter, 2021).

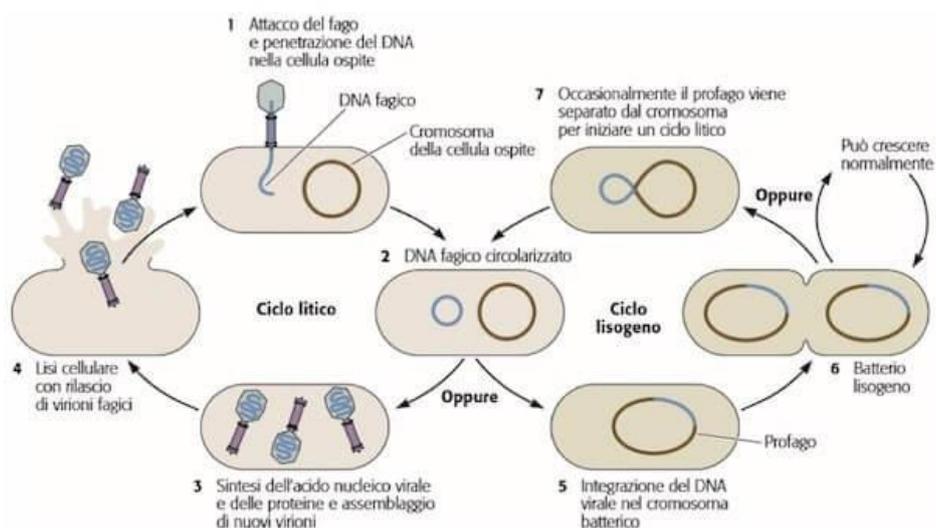


Figura 11 Ciclo litico e ciclo lisogenico dei batteriofagi (www.chimica-online.it)

Recentemente, i batteriofagi hanno suscitato particolare interesse scientifico grazie alla loro elevata specificità e sensibilità nei confronti di batteri target, nei confronti dei quali possiedono l'abilità di un rapido riconoscimento, e grazie alla loro capacità di resistere a diverse condizioni di temperatura e pH (Singh et al., 2020). A questi vantaggi, si unisce soprattutto la possibilità di replicazione a titoli elevati, che semplifica in maniera significativa il processo produttivo (Singh et al., 2020). Inoltre, vista la loro capacità di replicare solo in batteri vitali, i biosensori basati su questi virus hanno la potenziale capacità di distinguere fra cellule morte e cellule vive, caratteristica che li rende unici rispetto ad altri biosensori utilizzati per l'identificazione di *Salmonella* (Shen, Xu e Li, 2021).

Gli svantaggi maggiori di questa tipologia di biorecettore sono due: la possibile riduzione dell'efficienza di adesione alle cellule batteriche a seguito del processo di immobilizzazione sulla superficie del biosensore, e la possibile lisi del batterio target dovuta a sovraesposizione (Jayan, Pu e Sun, 2020).

5.2.1.5 I peptidi antimicrobici (AMPs)

I peptidi antimicrobici (*antimicrobial peptides*, AMPs) sono corti frammenti proteici (da 12 a 50 residui aminoacidici), presenti in tutte le forme di vita, che possiedono un ruolo fondamentale nella difesa dell'organismo (Figura 12). Essi, infatti, fanno parte del sistema immunitario innato, intervenendo in prima linea contro potenziali patogeni, ma sono anche utilizzati come segnali intercellulari, nonché sono coinvolti nei processi intracellulari di angiogenesi e di infiammazione (Annunziato e Costantino, 2020). In generale, queste molecole si legano a cellule target (fra cui cellule batteriche), ed esercitano un effetto antimicrobico. In base al meccanismo d'azione, gli AMPs possono essere suddivisi in due gruppi:

- il primo gruppo, quello maggiormente rappresentato, è costituito da peptidi in grado di agire attraverso la permeabilizzazione e conseguente rottura della membrana batterica, a cui consegue morte cellulare;
- il secondo gruppo è invece formato da AMPs che necessitano di legarsi a target intracellulari per poter esplicare il loro potere battericida, provocando comunque morte cellulare (Annunziato e Costantino, 2020).

Data la loro abilità di legarsi a diversi batteri, uno strumento costituito da diversi peptidi antimicrobici possiede il potenziale di riconoscere un numero maggiore di target specifici rispetto ad uno strumento costituito con lo stesso numero di anticorpi (Kulagina et al., 2005). Inoltre, la facilità di sintesi, il basso costo e la loro forte stabilità a diverse condizioni di temperatura e pH rendono queste molecole ottimi candidati come recettori per il rilevamento di *Salmonella* (Shen, Xu e Li, 2021). La grande affinità che possiedono nei confronti della loro cellula batterica li rendono fortemente performanti: sono infatti in grado di fornire buoni risultati anche a basse concentrazioni batteriche. Il più grosso svantaggio è la loro semiselettività, che spesso impedisce il differenziamento di *Salmonella* da altri batteri patogeni (Shen, Xu e Li, 2021).

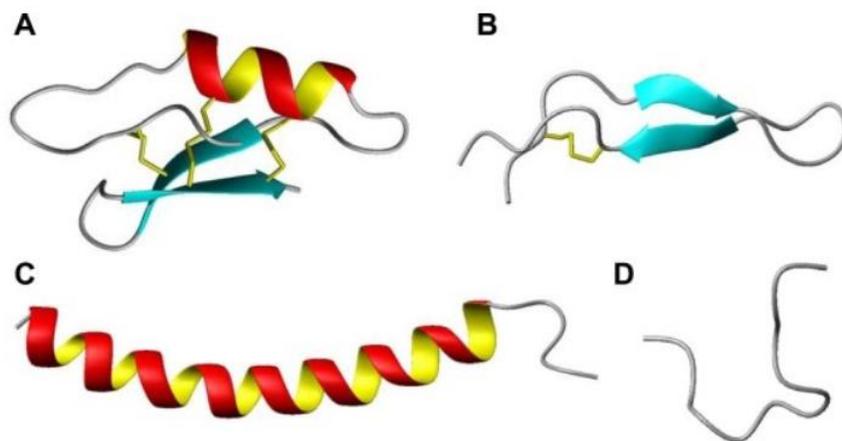


Figura 12 Diverse tipologie di AMPs (Jenssen, 2009)

5.2.2 I sistemi di trasduzione del segnale

Il sistema di trasduzione è un elemento in grado di captare il riconoscimento del biorecettore e trasformarlo in un segnale interpretabile. Ne esistono diverse tipologie nell'ambito della ricerca di patogeni responsabili di MTA, tra cui: elettrochimici, ottici, colorimetrici, magnetici, piezoelettrici e di massa (Pourakbari et al., 2019). Per quanto riguarda *Salmonella*, quelli più utilizzati sono gli elettrochimici, gli ottici e i piezoelettrici (Figura 13) (Shen, Xu e Li, 2021).

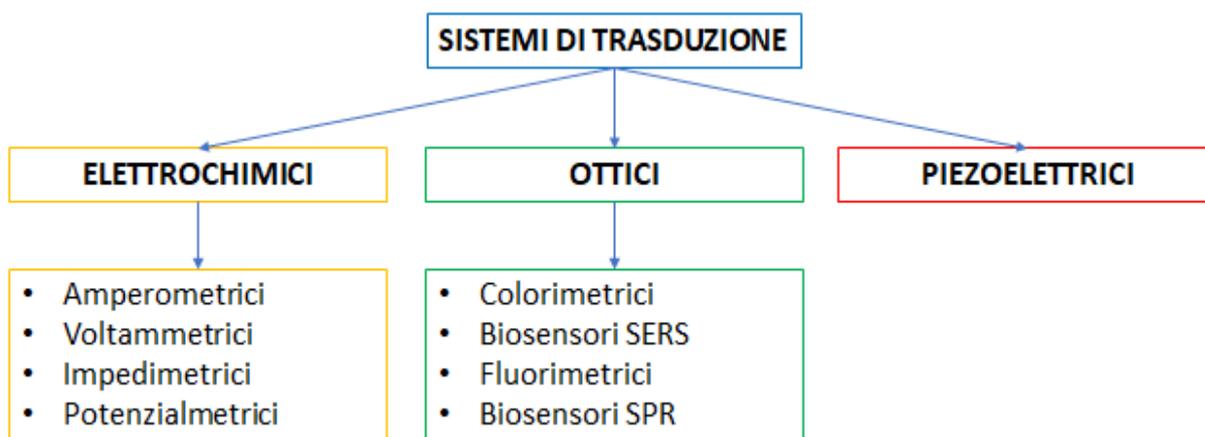


Figura 13 Diversi sistemi di trasduzione utilizzati per il riconoscimento di *Salmonella* spp. (Shen, Xu e Li, 2021)

5.2.2.1 Biosensori elettrochimici

I biosensori elettrochimici sono basati su dispositivi in cui le reazioni di legame fra biorecettore e target avvengono sulla superficie di un trasduttore in grado di emettere un

segnale elettrochimico (Cinti et al., 2017). Questi strumenti presentano la stessa struttura di celle elettrochimiche standard, formate da due elettrodi (Figura 14), definiti “*working electrode*” (o elettrodo attivo) e “*reference electrode*” (o elettrodo di riferimento), oppure da tre elettrodi. In questo caso, il terzo viene definito “*counter electrode*” (o elettrodo controlaterale) (Silva et al., 2018).

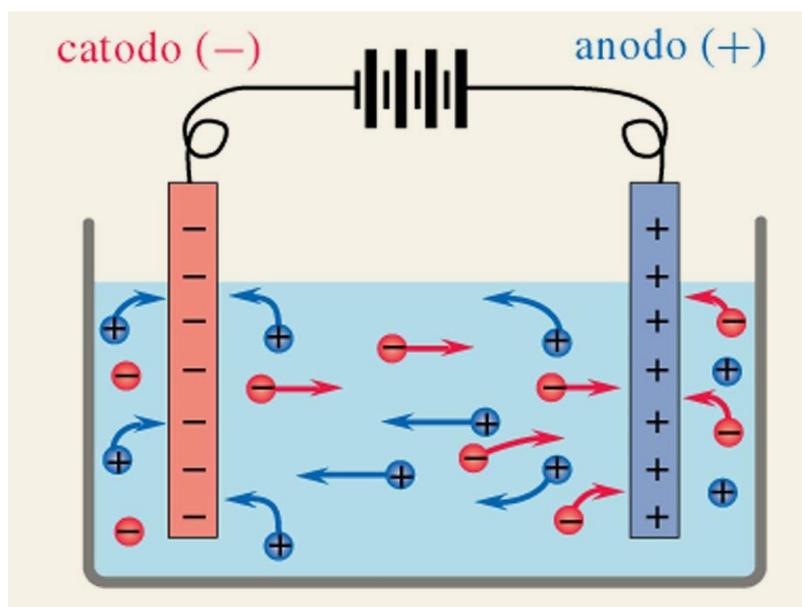


Figura 14 Schema generale di una cella elettrolitica (www.chimicavolta.com)

Sono considerati sensori molto promettenti in quanto possiedono caratteristiche fondamentali, fra cui l'elevata sensibilità, la versatilità, la facilità di utilizzo e la possibilità di miniaturizzazione (Silva et al., 2018). Per migliorare i limiti di rilevazione è possibile incorporare, nell'architettura dello strumento, nanomateriali come nanoparticelle d'oro (AuNPs), nanotubi di carbonio (CNTs), grafene (GR), particelle magnetiche (MBs), punti quantici (QDs) e polimeri conduttivi (Cinti et al., 2017). Inoltre, grazie alle proprietà chimico-fisiche dei nanomateriali (ad esempio, conduttività e rapporto superficie/volume), questi strumenti risultano particolarmente semplici da utilizzare e dotati di ottime performance analitiche (Cinti et al., 2017). Nella maggior parte dei casi, per questa tipologia di trasduzione del segnale, come recettore vengono utilizzati gli anticorpi (Silva et al., 2018). Il meccanismo di funzionamento è simile a quello di un convenzionale test ELISA, ma la determinazione dei complessi antigene-anticorpo viene registrata in maniera differente (Cinti et al., 2017).

Sulla base della tecnica di trasduzione del segnale, i biosensori elettrochimici possono essere suddivisi in:

- **amperometrici** (Figura 15): misurano le variazioni di corrente tramite l'applicazione di una differenza di potenziale costante durante un periodo di tempo determinato (Riu e Giussani, 2020). Questa tensione induce una reazione di ossido-riduzione sulla superficie dell'elettrodo tra il biorecettore utilizzato e il target, determinando un cambiamento nell'intensità di corrente elettrica rilevata. Questa variazione viene correlata, con opportuna calibrazione, alla concentrazione dell'analita ricercato (Silva et al., 2018). Si tratta di una strategia molto sensibile per la rilevazione di *Salmonella*, tuttavia è dotata di alcune limitazioni, fra cui la necessità di processi di preparazione lunghi e complicati, che limita la loro possibilità di utilizzo in campo (Shen, Xu e Li, 2021).

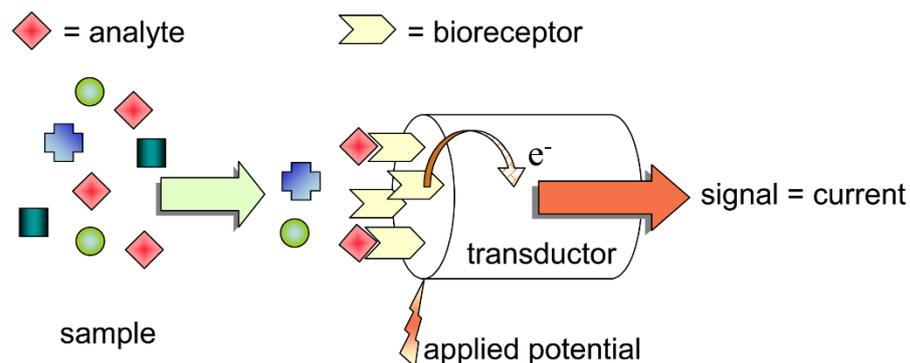


Figura 15 Rappresentazione schematica di biosensore amperometrico
(<https://biologyease.com>)

- **potenzialmetrici**: misurano la differenza di potenziale esistente tra l'elettrodo di riferimento e l'elettrodo attivo, tra i quali la corrente è trascurabile (Silva et al., 2018). Ne esistono varie tipologie, ma il più utilizzato risulta essere il "*Ion Selective Electrode*" (ISE) (Figura 16): consiste in una membrana a permeabilità selettiva, dotata di un'elevata affinità nei confronti di determinate specie ioniche, e un materiale bioattivo, solitamente un enzima. Quest'ultimo, quando si lega ad un target specifico, catalizza una reazione in grado di consumare o generare la specie ionica affine alla membrana, permettendone la rilevazione da parte dell'elettrodo (Leonard et al., 2003). Secondo diversi studi, questi biosensori

sono dotati di elevata sensibilità per *Salmonella*, riuscendo a individuare anche poche cellule batteriche per millilitro di soluzione campione in meno di un'ora. Tuttavia, a causa delle difficoltose operazioni di ottimizzazione e stabilizzazione dell'elettrodo di riferimento, si tratta di biosensori ancora troppo poco studiati (Shen, Xu e Li, 2021).

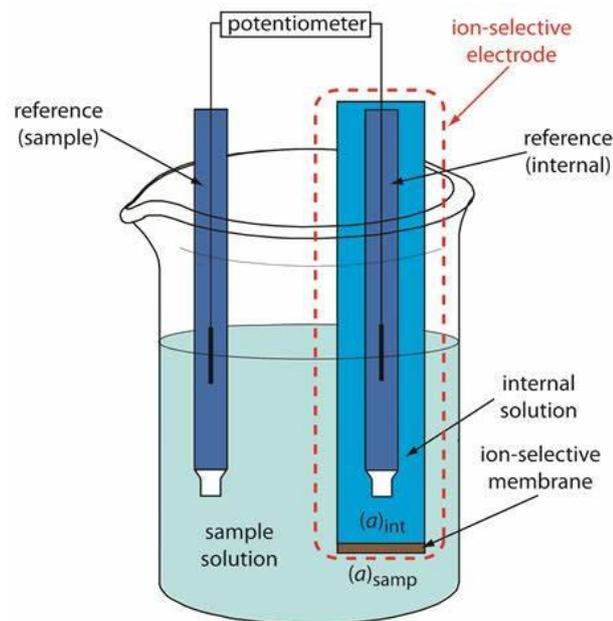


Figura 16 Rappresentazione schematica di un sensore a ISE
(<https://chem.libretexts.org>)

- **voltammetrici** (Figura 17): misurano i cambiamenti di intensità di corrente utilizzando diverse tecniche, quali ad esempio la “*cyclic voltammetry*” o ciclovoltammetria (Elgrishi et al., 2017). In questa tecnica, il potenziale dell'elettrodo attivo viene variato linearmente nel tempo. Quando viene raggiunto il valore precedentemente settato, la tensione viene variata in senso opposto tornando al valore iniziale, completando un ciclo. Questi cicli possono essere ripetuti a seconda delle necessità. Tramite questo processo, per ciascun valore di potenziale raggiunto, viene riportata la corrispondente corrente che viene rilevata (Elgrishi et al., 2017).

In questo contesto, la rilevazione di *Salmonella* può essere ottenuta mediante anticorpi immobilizzati sulla superficie dell'elettrodo. Il legame selettivo tra il biorecettore e il batterio determina una diminuzione o un aumento del segnale

voltammetrico, correlati alla concentrazione di cellule batteriche nel campione analizzato. Altri recettori utilizzati possono essere sonde di acidi nucleici o enzimi, immobilizzati sulla superficie dell'elettrodo (Khalid et al., 2022). Attualmente, questa tipologia di sensori risulta essere molto promettente per quanto riguarda la ricerca di *Salmonella*: in alcuni studi, questi dispositivi si sono dimostrati in grado di registrare fino ad un minimo di 13 cellule/mL di soluzione campione, fornendo risultati in meno di un'ora (Freitas et al., 2014). Sono strumenti di estrema semplicità e con ottima sensibilità; gli unici fattori in grado di influire sulle capacità di rilevazione sono le proprietà elettrochimiche dell'elettrodo e l'immobilizzazione efficace del biorecettore sulla sua superficie. In ogni caso, potrebbero essere migliorati in futuro dall'incorporazione di nanomateriali, in grado di aumentarne ulteriormente la sensibilità (Shen, Xu e Li, 2021).

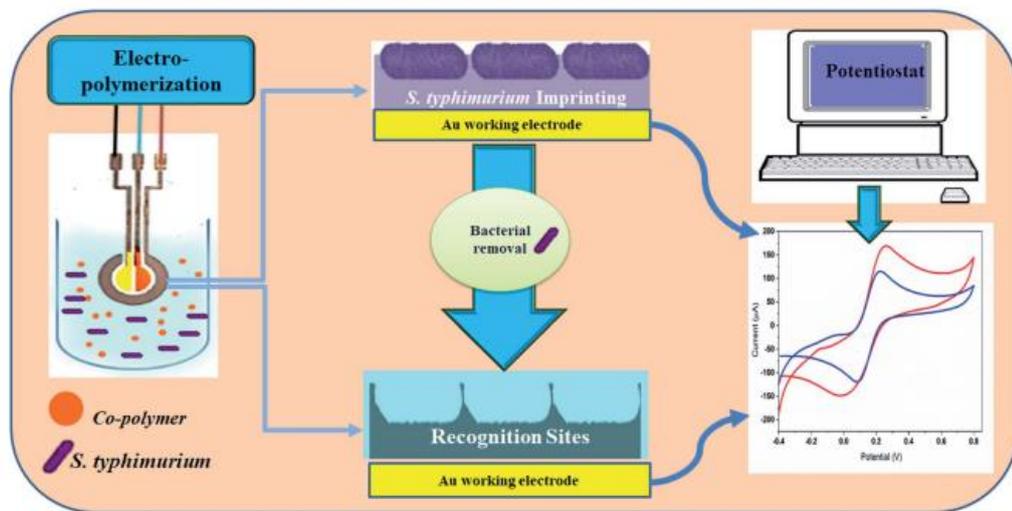


Figura 17 Rappresentazione schematica di un biosensore voltammetrico (Khalid et al., 2022)

- **impedimetrici** (Figura 18): misurano le variazioni di impedenza dovute alle variazioni di capacità e di resistenza al passaggio di elettroni nell'elettrodo attivo, causate dal legame di *Salmonella* al biorecettore utilizzato (Silva et al., 2018). Per ottenere questo valore viene utilizzata la “*Electrochemical Impedance Spectroscopy*” (EIS), una tecnica elettrochimica in cui viene applicato un potenziale alternato a diverse frequenze e viene misurata l'impedenza del

sistema (Silva et al., 2018). Conoscendo il contributo all'impedenza totale di ciascuna cellula (una membrana cellulare di 5-10 nm possiede una capacità pari a 0.5-1.3 $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ e una resistenza di 10^2 - $10^5 \Omega\text{cm}^2$) è possibile monitorare il legame batterio-recettore sulla superficie dell'elettrodo e determinarne la concentrazione in soluzione (Wang, Ye, & Ying, 2012).

A loro volta, questi biosensori possono essere suddivisi in due tipologie: i sensori a capacità, in cui il legame batterio-recettore determina una riduzione della capacità misurata dallo strumento, e i sensori di Faraday, in cui il legame provoca un aumento della resistenza misurata dallo strumento. In genere, questi ultimi mostrano una sensibilità più elevata rispetto ai sensori a capacità (Silva et al., 2018).

Si tratta di strumenti molto promettenti, con ottima sensibilità e maneggevolezza, legata soprattutto allo sviluppo negli ultimi anni di elettrodi interdigitati, o elettrodi stampati, che possono rendere il processo di fabbricazione meno costoso e il loro utilizzo più semplice. La rilevazione è in assoluto la più rapida: in alcuni studi, i risultati sono stati ottenuti in soli 6 minuti. Tuttavia, un grave limite è rappresentato dall'instabilità del segnale dovuto alle variazioni esistenti fra diverse tipologie di elettrodi e di sonde (Shen, Xu e Li, 2021).

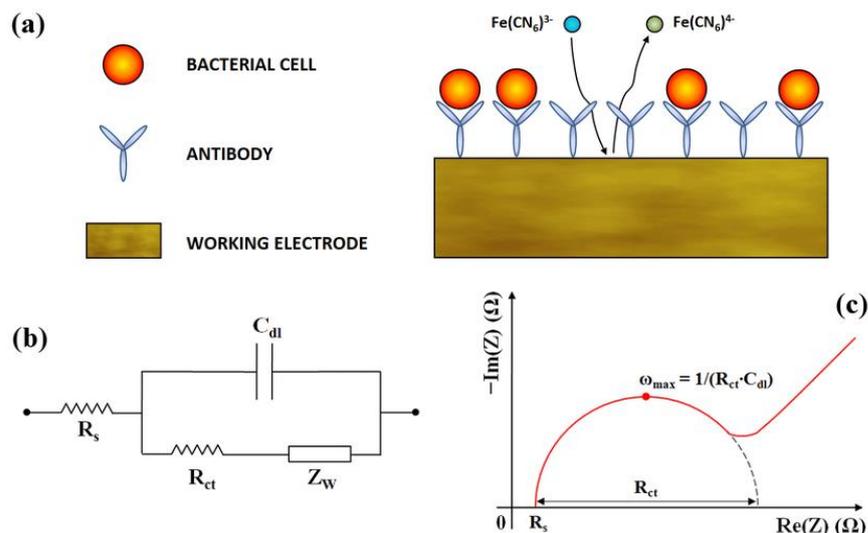


Figura 18 Rappresentazione schematica di un biosensore impedimetrico (Grossi e Riccò, 2017)

5.2.2.2 Biosensori ottici

I biosensori ottici sono strumenti in grado di convertire l'interazione fra biorecettore e target in segnali ottici misurabili, grazie all'implementazione di particolari trasduttori (Khansili, Rattu e Krishna, 2018). Rispetto ai metodi tradizionali, si sono dimostrati non solo più semplici nella configurazione e nell'utilizzo, ma anche meno costosi e più rapidi nell'acquisizione dei dati. I biorecettori più utilizzati per questa tipologia di strumenti sono gli anticorpi e le sonde nucleotidiche, ma è possibile anche l'utilizzo di altri biorecettori (Khansili, Rattu e Krishna, 2018).

I biosensori ottici per la rilevazione di *Salmonella* possono essere classificati in quattro tipologie:

- **colorimetrici**: questa particolare tipologia di biosensore ha riscosso particolare interesse negli ultimi anni grazie alla possibilità di trasformare il riconoscimento della molecola/batterio target in un segnale rilevabile ad occhio nudo, quale la variazione di colore della soluzione o del substrato (Ding et al., 2016). Questi sensori possono essere suddivisi in due gruppi a seconda del meccanismo alla base del viraggio del colore: una tipologia è basata sull'utilizzo di nanoparticelle d'oro (AuNPs), che possiedono la proprietà ottica particolare di cambiare colore a seconda del loro stato di aggregazione: in soluzione, quando sono separate, si presentano di colore rosso, mentre quando si associano fra loro virano al blu (Figura 19). Questo particolare fenomeno avviene perché, quando le AuNPs si associano, viene modificata la distribuzione dei livelli energetici, e, di conseguenza, cambia la loro capacità di assorbire la luce: allo stato aggregato, quindi, assorbono una lunghezza d'onda differente rispetto a quando si trovavano allo stato disperso (Liu e Lu, 2004). Il meccanismo di funzionamento è basato sul legame di biorecettori (quali, ad esempio, gli aptameri) sulla superficie delle nanoparticelle. Questi permettono di mantenere le AuNPs ben separate fra loro in soluzione grazie al fenomeno della repulsione elettrostatica; in presenza di *Salmonella*, il legame aptameri-cellula batterica determina il distacco dei recettori dalla superficie delle particelle, che tendono naturalmente ad aggregarsi, determinando quindi il viraggio di colore della soluzione (Wu et al., 2012).

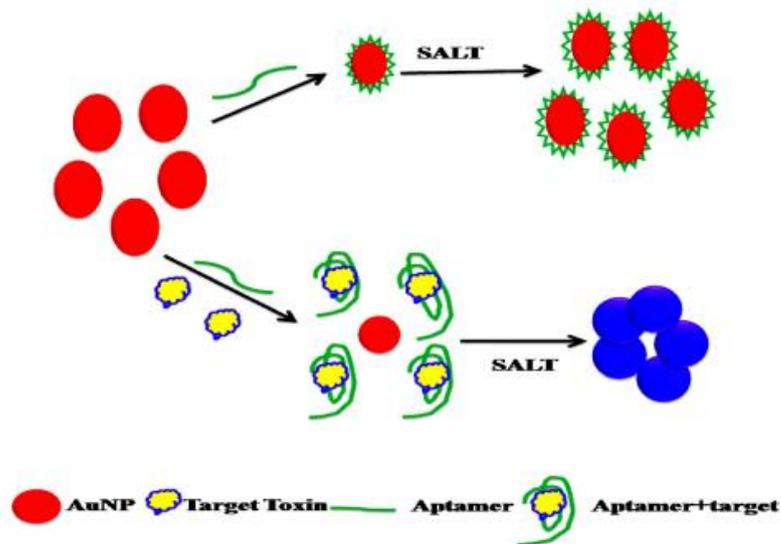


Figura 19 Meccanismo di funzionamento di un biosensore colorimetrico con AuNPs (Mondal et al., 2018)

Un'altra tipologia di biosensori colorimetrici si basa su reazioni catalizzate da enzimi che permettono il cambiamento del colore del substrato. Uno dei catalizzatori più utilizzato è HRP (*Horseradish Peroxidase*), un comune enzima in grado di degradare il perossido di idrogeno (H_2O_2), dotato di buona stabilità, facilmente reperibile in commercio e relativamente poco costoso (Xu et al., 2018). L'utilizzo di HRP permette il viraggio della soluzione da trasparente a blu. Anche questa metodica è stata utilizzata di frequente per l'identificazione di *Salmonella* (Chen e Xie, 2015).

In generale, si tratta di strumenti abbastanza promettenti per la ricerca di *Salmonella* lungo la catena alimentare, soprattutto in virtù del recente sviluppo di metodiche di acquisizione dell'immagine correlate all'utilizzo di smartphones, che renderebbero l'utilizzo di questi biosensori molto più semplice anche in campo. Necessitano comunque di ulteriore sperimentazione, soprattutto considerando l'instabilità degli enzimi a condizioni ambientali avverse e la possibile interferenza esercitata del colore di alcuni alimenti, che renderebbe difficile l'interpretazione dei risultati (Shen, Xu e Li, 2021).

- **fluorescenti:** questa tipologia di biosensori si basa sull'utilizzo di fluorofori, molecole che, a seguito di eccitazione, sono in grado di tornare al più basso livello energetico rilasciando energia sotto forma di un fotone. Sono quindi in grado di emettere luce a seguito della formazione di legami fra recettore,

presente sulla loro superficie, e il suo target. I biorecettori più utilizzati per questi strumenti sono anticorpi, acidi nucleici, enzimi e batteriofagi (Bhardwaj et al., 2017). In passato venivano utilizzati i fluorofori organici; negli ultimi anni, grazie allo sviluppo di nanomateriali, si è preferito utilizzare altre molecole fluorescenti, come ad esempio i “*Carbon Quantum Dots*” (CQD), ossido di grafite e altre nanoparticelle, dotati di maggiore fotostabilità, facilità di sintesi e migliore biocompatibilità rispetto alle molecole fluorescenti organiche. Inoltre, grazie alla più ampia superficie rispetto ai fluorofori organici, permettono il legame di un maggior numero di recettori e, di conseguenza, una migliore amplificazione del segnale (Bhardwaj et al., 2017)

Si tratta di strumenti particolarmente utili per la ricerca di *Salmonella*, soprattutto per l'utilizzo in campo visto il recente sviluppo di strumentazioni portatili. Tuttavia, necessitano di ulteriore sperimentazione a causa dell'instabilità dei fluorofori in matrici complesse e alla loro rapida degradazione fotochimica. L'utilizzo dei nanomateriali potrebbe permettere di ottenere biosensori con maggiore stabilità, sensibilità e accuratezza (Shen, Xu e Li, 2021).

- **basati su un processo definito “*Surface Enhanced Raman Scattering*” (SERS)** (Figura 20): si tratta di una tecnica di spettroscopia Raman che sfrutta l'amplificazione della diffusione della luce da parte di molecole adsorbite su una superficie irregolare di particelle metalliche (Pilot et al., 2019). Una luce laser ad alta intensità, quando colpisce una determinata molecola, è in grado di interagire con i suoi elettroni inducendo dipoli elettrici oscillanti responsabili della diffusione della luce in tutte le direzioni (Yaraki e Tan, 2020). La maggior parte della luce diffusa possiede la stessa lunghezza d'onda del laser iniziale. Tuttavia, in piccola parte, la frequenza viene variata a causa delle transizioni fra livelli energetici: i fotoni possono o perdere energia in favore di una molecola, che viene promossa dal più basso livello energetico (o stato fondamentale, o “*ground state*”) a uno stato vibrazionale eccitato, oppure possono acquistare energia da una molecola che subisce un processo opposto. Di conseguenza, questa diffusione inelastica di fotoni contiene informazioni fondamentali riguardo la molecola di interesse, fra cui la struttura, le interazioni molecolari e la cristallinità della stessa. Queste variazioni di lunghezza d'onda, infatti, sono caratteristiche della geometria e dei tipi di legami presenti nella molecola (Pilot et al., 2019). La tecnica SERS, quindi, è un fenomeno fisico nel quale l'intensità del segnale precedentemente illustrato

viene aumentata dalla presenza di nanoparticelle metalliche (come, ad esempio, oro e argento) (Kant e Abalde-Cela, 2018). Queste particelle sono in grado di amplificare il segnale fino a 10^4 - 10^8 volte, rendendo possibile la rilevazione di analiti biologici anche a concentrazioni molto basse con un'altissima sensibilità (Yaraki e Tan, 2020).

I biosensori basati su questa metodica sono principalmente a struttura planare: le nanoparticelle metalliche sono adese a superfici vetrose, scelte soprattutto per la loro semplicità e potenzialità di produzione su larga scala. A loro volta, sulla superficie delle nanoparticelle metalliche, sono adsorbiti i sistemi di rilevazione del batterio, come ad esempio anticorpi o aptameri (Wei et al., 2022).

Al giorno d'oggi, questi sensori possiedono una sensibilità molto elevata, paragonabile ad altre metodiche come la PCR, e sono stati riconosciuti come strumenti molto promettenti (Kant e Abalde-Cela, 2018). Tuttavia, la loro applicazione è ancora lontano dall'essere utilizzata di routine per l'identificazione di *Salmonella* in campo, sia a causa della loro instabilità a condizioni avverse, sia per la necessità di affiancarvi tecniche di pretrattamento del campione (Shen, Xu e Li, 2021).

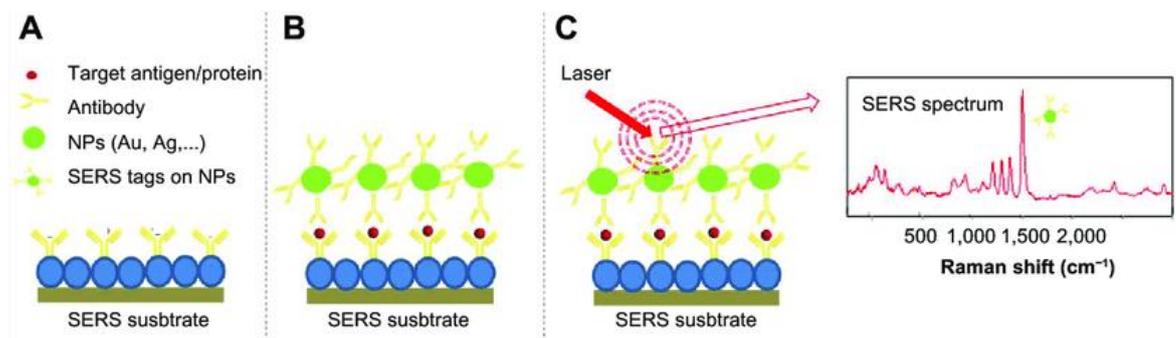


Figura 20 Rappresentazione schematica di un biosensore a SERS (Kizek et al., 2015)

- **basati su una tecnica definita “Surface Plasmon Resonance” (SPR)** (Figura 21): questa metodica è in grado di misurare, in maniera indiretta, i cambiamenti dell'indice di rifrazione in vicinanza ad un materiale metallico, in risposta a interazioni biomolecolari. Fin da quando è stata introdotta negli anni '90, si è sempre dimostrata molto efficace nel determinare specificità e affinità di un

legame fra una macromolecola e il suo recettore (Nguyen et al., 2015). Il nome deriva dall'omonimo fenomeno fisico che riguarda un'oscillazione elettronica di insieme, definita plasmonone di superficie, che può avvenire a livello di interfaccia fra due materiali con una costante dielettrica di segno opposto: un metallo (ad esempio, l'oro) e un materiale dielettrico (in questo caso, la soluzione campione). Su questa superficie sono presenti biorecettori quali, ad esempio, anticorpi, AMPs e sonde a DNA, in grado di legarsi al target di interesse (Nguyen et al., 2015). Il metallo viene illuminato con un fascio di luce polarizzata a una determinata frequenza, variando l'angolo di incidenza e misurando l'intensità della luce riflessa. In questo modo è possibile determinare il cosiddetto "angolo di minima riflessione", in corrispondenza del quale si ha la massima riduzione dell'intensità della luce riflessa a causa della formazione di plasmoni di superficie. A seconda della quantità di legami fra biorecettore e il suo target, l'indice di rifrazione del medium di rilevazione si modifica e, di conseguenza, la condizione per ottenere plasmoni viene alterata. L'angolo di minima riflessione, quindi, non sarà più lo stesso di partenza. Monitorandone la variazione è quindi possibile risalire alla quantità di molecola o batterio target presente nella soluzione campione (Khansili, Rattu e Krishna, 2018).

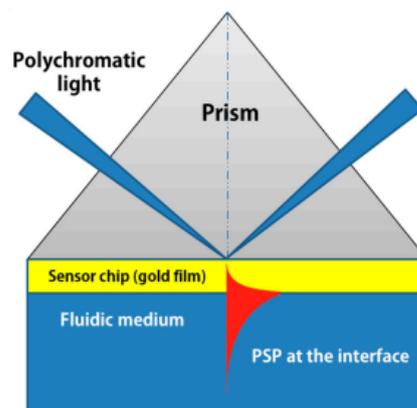


Figura 21 Rappresentazione schematica di un biosensore a SPR
(Nguyen et al., 2015)

Se paragonati ad altre tipologie di sensori, questi strumenti permettono di ottenere un monitoraggio in tempo reale a fronte di un minor consumo di reagente. Tuttavia, si tratta di biosensori ancora poco utilizzati al di fuori del laboratorio, nonostante il recente sviluppo di strumenti portatili per l'esecuzione della SPR. Infine, sono necessari ulteriori test per quanto riguarda la sensibilità e il limite di detezione per *Salmonella* (Shen, Xu e Li, 2021).

5.2.2.3 Biosensori piezoelettrici

I biosensori piezoelettrici sono rilevatori sensibili alla massa, che utilizzano come trasduttori degli oscillatori piezoelettrici (come, ad esempio, i “*Quartz Crystal Microbalance*”, o QCM), sulla cui superficie vengono fatti aderire recettori biologici ad elevata affinità per il microrganismo target, come ad esempio anticorpi, aptameri o sonde a DNA. I segnali vengono solitamente registrati misurando la variazione di oscillazione dello strumento, che cambia a seconda della massa connessa ad esso (Figura 22) (Su et al., 2013). I QCM sono i più utilizzati; si tratta di cristalli di quarzo estremamente sensibili alle variazioni di frequenza che possono verificarsi a seguito di un aumento della massa, dovuto al legame recettore-target (Zhu et al., 2015). Variazioni evidenti della frequenza registrata da questa tipologia di biosensori (1 Hz) sono dovute a cambiamenti di massa pari a circa 10^{-9} g (Shen et al., 2011). Considerando che una singola cellula di *Salmonella* possiede una massa di circa 10^{-12} g, è verosimile pensare che il legame di una singola cellula batterica non sia in grado di produrre un segnale rilevabile (Zhu, Shih e Shih, 2007). Tuttavia, per ovviare al problema, è stata proposta l'introduzione di nanoparticelle che possono aumentarne la sensibilità, in quanto possono fungere da amplificatori del segnale (Zhu et al., 2015).

I biosensori piezoelettrici offrono diversi vantaggi, quali la rilevazione in tempo reale, procedure operative semplificate, potenziale maneggevolezza e bassi costi di produzione. Nonostante ciò, è abbastanza improbabile il loro utilizzo al di fuori del laboratorio a causa della loro estrema vulnerabilità a fattori di disturbo provenienti dall'ambiente esterno (Shen, Xu e Li, 2021). Inoltre, rispetto alle altre due tipologie di biosensori, ottici ed elettrochimici, questi strumenti possiedono un limite di rilevazione di circa 10^3 UFC/ml, e pertanto decisamente più elevato, rendendo questi strumenti ancora inadatti all'utilizzo in campo (Wang et al., 2017; Makneva et al., 2018).

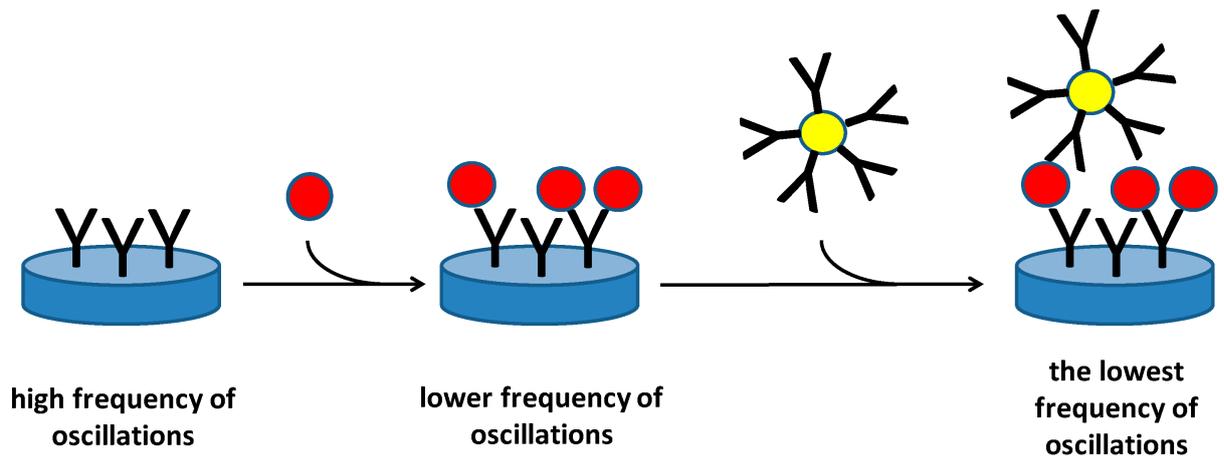


Figura 22 Rappresentazione schematica di un biosensore piezoelettrico
(Pohanka, 2018)

6. CONCLUSIONI

Le malattie a trasmissione alimentare rappresentano un problema sanitario particolarmente rilevante, e fra queste, la salmonellosi risulta una delle più rilevanti, classificandosi al secondo posto in Europa per numero di casi all'anno. Secondo i dati raccolti da EFSA ed ECDC, il suino riveste un ruolo importantissimo nella trasmissione di *Salmonella* all'uomo.

Salmonella può entrare nella filiera di produzione della carne suina in qualsiasi fase, ma nel presente lavoro di tesi si è preferito concentrare l'attenzione verso la macellazione in quanto step finale che precede l'immissione in commercio, e, di conseguenza, ultima fase in cui, per l'OSA e per le Autorità Competenti, è possibile attuare misure correttive in grado di abbattere il rischio della trasmissione del batterio al consumatore. Per queste ragioni, la corretta implementazione dei controlli durante le fasi di macellazione risulta fondamentale per prevenire la trasmissione di *Salmonella* all'uomo. A questo proposito, i regolamenti comunitari impongono criteri microbiologici e metodiche di verifica del rispetto di questi ultimi. I campioni raccolti al macello vengono inviati al laboratorio ed analizzati secondo la norma ISO 6579, che viene indicata come "gold standard". Questa metodica risulta però dotata di forti limitazioni, fra cui la necessità di inviare i campioni a laboratori esterni e un tempo di risposta di tre-cinque giorni. Questi fattori, nell'ottica di un piano di autocontrollo da parte dell'OSA, implicano l'impossibilità di applicazione di azioni correttive tempestive, di fatto impedendo un efficace controllo nei confronti del patogeno. E' chiaro quindi che sussiste una forte necessità di sviluppo di metodiche rapide, affidabili e semplici per l'identificazione di *Salmonella*.

Negli anni sono state proposte diverse alternative al metodo colturale, fra cui la PCR e la metodica ELISA: si tratta di metodiche rapide e dotate di elevata sensibilità, ma ancora una volta caratterizzate da alcuni difetti, fra cui la necessità di un processo di preparazione del campione di circa 24-48 ore, l'instabilità di alcuni componenti, l'esigenza di attrezzature specifiche e costose e di personale specializzato che rendono difficile una loro eventuale applicazione *in situ*.

Lo strumento ideale per l'utilizzo in campo dovrebbe essere dotato di alcune caratteristiche fondamentali, fra cui la semplicità di utilizzo, la rapidità di risposta, il basso costo e un ridotto processo di preparazione del campione (Silva et al., 2018). In quest'ottica, la messa a punto dei biosensori si è dimostrata essere molto promettente: si tratta di mezzi che uniscono una sensibilità simile a quella dimostrata da altre metodiche, come la PCR, a rapidi tempi di risposta.

In base a numerosi studi, le tre tipologie di biosensori più utilizzati per l'identificazione di *Salmonella* sono gli elettrochimici, gli ottici e i piezoelettrici.

I biosensori elettrochimici risultano i più affidabili e sono dotati di maggiore sensibilità. In particolare, i biosensori impedimetrici e voltammetrici possiedono entrambe queste caratteristiche, unite ad una maggiore stabilità rispetto a quelli amperometrici e potenzialmetrici che, al contrario, necessitano di processi di stabilizzazione dello strumento e preparazione del campione troppo complicati e laboriosi. Tuttavia, il loro utilizzo da parte dell'OSA non è ancora attuabile a causa della necessità di una strumentazione dedicata.

Per quanto riguarda la facilità di interpretazione dei risultati, la rapidità e il potenziale utilizzo in campo, sicuramente i candidati più promettenti sono i biosensori ottici, specificamente i colorimetrici: grazie alla capacità delle AuNPs di determinare una variazione di colore macroscopicamente rilevabile in base al loro diverso stato di aggregazione, l'interpretazione dei risultati risulta molto rapida ed intuitiva. D'altro canto, presentano una sensibilità minore rispetto ad altre metodiche e l'informazione che restituiscono è solo qualitativa, senza indicazioni precise circa la concentrazione del patogeno. I biosensori fluorescenti, SPR e SERS, consentono di superare queste limitazioni, ma trovano scarso utilizzo in campo in quanto necessitano di processi di preparazione e stabilizzazione del sensore ancora troppo complessi, sono soggetti ad interferenze esterne che ne compromettono l'affidabilità e richiedono la presenza di personale adeguatamente specializzato.

Infine, i biosensori piezoelettrici si identificano come metodiche ancora troppo poco specifiche, dotate di una sensibilità ridotta e i cui risultati appaiono fin troppo influenzabili dalle condizioni ambientali, rendendo il loro utilizzo *in situ* ancora non attuabile.

Da queste considerazioni, appare chiaro che i biosensori sono strumenti sicuramente promettenti per permettere di abbreviare i tempi di risposta necessari ad individuare un'eventuale non conformità, permettendo all'OSA di implementare azioni correttive più immediate. Tuttavia, presentano ancora diverse limitazioni che richiedono studi ulteriori al fine di incrementarne l'affidabilità e semplificarne l'utilizzo, consentendone la standardizzazione. A tal proposito, potrebbe essere utile, ad esempio, eseguire ricerche approfondite e mirate al fine di migliorare la stabilità dei biorecettori al di fuori del laboratorio. Infatti, gli anticorpi (i biorecettori più utilizzati) sono estremamente sensibili alla presenza di proteasi e alle variazioni di pH e temperatura. Una soluzione possibile

potrebbe essere l'implementazione degli aptameri, elementi di riconoscimento biologico che hanno dimostrato una grandissima resistenza e stabilità alle condizioni esterne, ma che, essendo di scoperta relativamente recente, necessitano di ulteriori studi.

BIBLIOGRAFIA

- Annunziato G. e G. Costantino, 2020 «Antimicrobial peptides (AMPs): a patent review (2015–2020)» *Taylor & Francis - Expert Opinion on Therapeutic Patents Vol 30 Issue 12* <https://doi.org/10.1080/13543776.2020.1851679>
- Ansari Najmeh, Rezvan Yazdian-Robati, Mahin Shahdordizadeh, Zhouping Wang e Kiarash Ghazvini, 2017. «Aptasensors for Quantitative Detection of *Salmonella* Typhimurium». *Analytical Biochemistry* 533 (settembre): 18-25. <https://doi.org/10.1016/j.ab.2017.06.008>.
- Arguello H., Álvarez-Ordoñez A., Carvajal A., Rubio P and Prieto M., 2012 «Role of Slaughtering in *Salmonella* Spreading and Control in Pork Production» *Journal of Food Protection, Vol. 76, No. 5, 2013, Pages 899–911* <https://doi.org/10.4315/0362-028X.JFP-12-404>
- Barbone S., 2010 «Biologia umana». *Franco Lucisano Editore – Zanichelli*, 2010
- Bassi L., Bonardi S., 2008 «*Salmonella* enterica virulence factors: mechanisms of interaction with the host organism» *Ann. Fac. Medic. Vet. di Parma (Vol. XXVIII, 2008)* pag 137-154
- Bernard Juskowiak, 2011 «Nucleic acid-based fluorescent probes and their analytical potential» *Analytical Bioanal Chem (2011)* 399:3157–3176 DOI 10.1007/s00216-010-4304-5
- Beshiru A., Igbinosa I. H., Igbinosa E. O., 2018 «Biofilm formation and potential virulence factors of *Salmonella* strains isolated from ready-to-eat shrimps» *PLoS ONE 13(9): e0204345* <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0204345>
- Bhardwaj N., S. K. Bhardwaj, M. K. Nayak, J. Mehta, K. H. Kim, A. Deep, 2017 «Fluorescent nanobiosensors for the targeted detection of foodborne bacteria» *Trends in Analytical Chemistry* 97 (2017) 120e135 <http://doi.org/10.1016/j.trac.2017.09.010>
- Bolton, D. J., R. Pearce, J. J. Sheridan, D. A. McDowell, and I. S. Blair, 2003. «Decontamination of pork carcasses during scalding and the prevention of *Salmonella* cross-contamination» *J. Appl. Microbiol.*94:1036–1042 DOI: 10.1046/j.1365-2672.2003.01938.x
- Bonardi S., 2017. «*Salmonella* in the Pork Production Chain and Its Impact on Human Health in the European Union». *Epidemiology and Infection* 145 (8): 1513–26. <https://doi.org/10.1017/S095026881700036X>.

- Bonardi S., Alpighiani I., Bacci C., Brindani F., Pongolini S., 2012 «Comparison of an Isothermal Amplification and Bioluminescence Detection of DNA Method and ISO 6579:2002 for the Detection of *Salmonella enterica* Serovars in Retail Meat Samples» *Journal of Food Protection*, Vol. 76, No. 4, 2013, Pages 657-661, doi:10.4315/0362-028X.JFP-12-313
- Bruce, V. J., McNaughton, B. R., 2017. «Evaluation of nanobody conjugates and protein fusions as bioanalytical reagents» *Analytical Chemistry*, 89(7), 3819–3823. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.7b00470>
- Chen Y. e M. Xie, 2015 «A colorimetric and ultrasensitive immunosensor for one-step pathogen detection via the combination of nanoparticle-triggered signal amplification and magnetic separation» *RSC Adv.*, 2015, 5, 100633 DOI: 10.1039/c5ra21727j
- Chiesa F., Civera T., 2007 «Gestione dei pericoli legati alla contaminazione fecale nella macellazione dei suini» *Industrie Alimentari – XLVI anno 46 n. 474*
- Cinti S., G. Volpe, S. Piermarini, E. Delibato, G. Palleschi «Electrochemical Biosensors for Rapid Detection of Foodborne *Salmonella*: A Critical Overview» *MDPI Sensors* 2017, 17, 1910; doi: 10.3390/s17081910
- De Busser E. V., L. De Zutter, J. Dewulf, K. Houf, D. Maes, 2013 «*Salmonella* control in live pigs and at slaughter» Elsevier Ltd. *The Veterinary Journal* 196 (2013) 20–27 <http://dx.doi.org/10.1016/j.tvjl.2013.01.002>
- Ding Y., S. Wang, J. Li, L. Chen, 2016 «Nanomaterial-based optical sensors for mercury ions» *Trends in Analytical Chemistry* 82 (2016) 175–190 <http://doi.org/10.1016/j.trac.2016.05.015>
- Direttiva 2003/99/CE del Parlamento europeo e del Consiglio del 17 novembre 2003, relativa al monitoraggio delle zoonosi e degli agenti zoonotici, che modifica la Decisione 90/424/CEE del Consiglio e abroga la Direttiva 92/117/CEE del Consiglio (GU L 325, 12.12.2003, pag. 31)
- EFSA Panel on Biological Hazards, 2010 «Scientific Opinion on a Quantitative Microbiological Risk: Assessment of *Salmonella* in slaughter and breeder pigs» *EFSA Journal* 2010;8(4):1547. [90 pp.]. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2010.1547>
- Eijkelkamp J. M., H. J. M. Aarts, H. J. Van Der Fels-Klerx, 2009 «Suitability of Rapid Detection Methods for *Salmonella* in Poultry Slaughterhouses» *Food Anal. Methods* (2009) 2:1–13 DOI 10.1007/s12161-008-9040-5

- Elgrishi N., K. J. Rountree, B. D. McCarthy, E. S. Rountree, T. T. Eisenhart, J. L. Dempsey, 2017 «A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry» *American Chemical Society and Division of Chemical Education, Inc, J. of Chem. Educ.* 2018, 95, 197–206 DOI: 10.1021/acs.jchemed.7b00361
- Eng S. K., Pusparajah P., N. S. A. Mutalib, H. L. Ser, K. G. Chan, e L. H. Lee, 2015. «*Salmonella*: A Review on Pathogenesis, Epidemiology and Antibiotic Resistance». *Frontiers in Life Science* 8 (3): 284–93. <https://doi.org/10.1080/21553769.2015.1051243>.
- Eriksson E. and A. Aspan, 2007 «Comparison of culture, ELISA and PCR techniques for *Salmonella* detection in faecal samples for cattle, pig and poultry» BioMed Central, *BMC Veterinary Research* 2007, 3:21 DOI: 10.1186/1746-6148-3-21
- European Food Safety Authority & European Centre for Disease Prevention and Control, 2021. «The European Union One Health 2020 Zoonoses Report». *EFSA Journal* 19 (12): e06971. <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2021.6971>
- European Food Safety Authority, 2007 «Report of the Task Force on Zoonoses. Data Collection on the analysis of the baseline survey on the prevalence of *Salmonella* in slaughter pigs - Part A» *The EFSA Journal* (2008) 135, 1-111
- Farina R., Scatozza F., Andreani E., Buonavoglia C., Compagnucci M., Contini A., Flammini C., Gentile G., Gualandi G., Mandelli G., Panina G., Papparella V., Pascucci S., Poli G., Redaelli G., Ruffo G., Sidoli L., 2002. «Trattato di malattie infettive degli animali» *UTET – seconda edizione*
- Flemming H.C., Wingender J., Szewzyk U., Steinberg P., Rice S. A. and Kjelleberg S., 2016 «Biofilms: an emergent form of bacterial life». *Nature reviews – microbiology*; *Macmillan Publishers Limited, part of Springer Nature*. Volume 14 | september 2016. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.94>
- Förster U., Weigand J., Trojanowski P., Suess B., Wachtveitl J., 2011 «Conformational dynamics of the tetracycline-binding aptamer» *Nucleic acids research*. 40. 1807-17 doi: 10.1093/nar/gkr835.
- Freitas, M., Viswanathan, S., Nouws, H. P. A., Oliveira, M. B. P. P., & Delerue-Matos, C., 2014 «Iron oxide/gold core/shell nanomagnetic probes and CdS biolabels for amplified electrochemical immunosensing of *Salmonella Typhimurium*» *Biosensors and Bioelectronics*, 51, 195–200. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2013.07.048>

- Graziani C., Galetta P., Busani L., Dionisi A.M., Filetici E., Ricci A., Caprioli A., Luzzi I. 2005. «Le infezioni da *Salmonella*: diagnostica, epidemiologia e sorveglianza». Roma: Istituto Superiore di Sanità (*Rapporti ISTISAN 05/27*).
- Grossi M., Riccò B., 2017 «Electrical impedance spectroscopy (EIS) for biological analysis and food characterization: A review» *Journal of Sensors and Sensor Systems*. 6. 303-325. doi:10.5194/jsss-6-303-2017.
- Hansen-Wester I., Stecher B, e Hensel M., 2002 «Type III Secretion of *Salmonella* Enterica Serovar Typhimurium Translocated Effectors and SseFG». *Infection and Immunity* 70 (3): 1403–9. <https://doi.org/10.1128/IAI.70.3.1403-1409.2002>.
- Harrell J. E., Hahn M. M., D'Souza S. J., Vasicek E. M., Sandala J. L., Gunn J. S. and McLachlan J. B., 2021 «*Salmonella* Biofilm Formation, Chronic Infection, and Immunity Within the Intestine and Hepatobiliary Tract» *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, febbraio 2021 volume 10. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.624622>
- Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, 2021 «Linee guida campionamento superfici - analisi microbiologiche» *IZS IDD 184 (PR 01) - rev 02*
- Jayan H., H. Pu, D.W. Sun, 2020 «Recent development in rapid detection techniques for microorganism activities in food matrices using bio-recognition: A review» Elsevier Ltd. *Trends in Food Science & Technology* 95 (2020) 233-246 <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.11.007>
- Jenssen H., 2009 «Therapeutic Approaches Using Host Defence Peptides to Tackle Herpes Virus Infections» *Viruses*. 1. 939-64 doi:10.3390/v1030939.
- Kant K., S. Abalde-Cela, 2018 «Surface-Enhanced Raman Scattering Spectroscopy and Microfluidics: Towards Ultrasensitive Label-Free Sensing» *MDPI Biosensors* 2018, 8, 62; doi:10.3390/bios8030062
- Kasman L. M.; La Donna Porter, 2021 «Bacteriophages» *StatPearls - NCBI Bookshelf* (nih.gov)
- Khalid S. A., Hassan R. Y. A., El Nashar R. M., El-Sherbiny I. M, 2022 «Voltammetric determination of *Salmonella* typhimurium in minced beef meat using a chip-based imprinted sensor» *RSC Adv. Jan 25;12(6):3445-3453*. doi: 10.1039/d1ra08526c.
- Khansili N., G. Rattu, P. M. Krishna, 2018 «Label-free optical biosensors for food and biological sensor applications» *Sensors and Actuators B* 265 (2018) 35-49 <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.03.004>

- Kizek R., Krejcová L., Michálek P., Rodrigo M. M., Heger Z., Krizkova S., Vaculovicova, M., Hynek D., Vojtech A. 2015 «Nanoscale virus biosensors: state of the art» *Nanobiosensors in Disease Diagnosis*. 47. 10.2147/NDD.S56771.
- Kothary M. H. e Babu U. S., 2001 «Infective dose of foodborne pathogens in volunteers: a review» *Journal of Food Safety* 21 (2001) 49-73 <https://doi.org/10.1111/j.1745-4565.2001.tb00307.x>
- Kulagina N. V., M. E. Lassman, F. S. Ligler, C. R. Taitt, 2005 «Antimicrobial Peptides for Detection of Bacteria in Biosensor Assays» *Anal. Chem.* 2005, 77, 19, 6504–6508, <https://doi.org/10.1021/ac050639r>
- Lamas A., J. M. Miranda, P. Regal, B. Vázquez, C. M. Franco, e A. Cepeda, 2018. «A Comprehensive Review of Non-Enterica Subspecies of *Salmonella* Enterica». *Microbiological Research* 206 (gennaio): 60–73. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2017.09.010>.
- Lemarchand K, Lebaron P, 2002 «Influence of mutation frequency on the persistence of *Salmonella* enterica serotypes in natural waters» *FEMS Microbiol Ecol* 2002;41:125-31 <https://doi.org/10.1111/j.1574-6941.2002.tb00973.x>
- Leonard, P., Hearty, S., Brennan, J., Dunne, L., Quinn, J., Chakraborty, T., O’Kennedy, R., 2003 «Advances in biosensors for detection of pathogens in food and water» *Enzym. Microb. Technol.* 32 (1), 3–13 [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(02\)00232-6](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(02)00232-6)
- Liu B., Knirel A. Y., Feng L., Perepelov A. V., Senchenkova S. N, Reeves P. R. and Wang L., 2014. «Structural diversity in *Salmonella* O antigens and its genetic basis» Federation of European Microbiological Societies - Published by John Wiley & Sons Ltd. *FEMS Microbiol Rev* 38 (2014) 56–89 DOI: 10.1111/1574-6976.12034
- Liu J. e Y. Lu, 2004 «Accelerated Color Change of Gold Nanoparticles Assembled by DNAzymes for Simple and Fast Colorimetric Pb²⁺ Detection» *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 12298-12305 doi: 10.1021/ja046628h
- Mainar-Jaime R. C., S. Andrés, J. P. Vico, B. San Román, V. Garrido, M. J. Grilló, 2013 «Sensitivity of the ISO 6579:2002/Amd 1:2007 Standard Method for Detection of *Salmonella* spp. on Mesenteric Lymph Nodes from Slaughter Pigs» *Journal of Clinical Microbiology* Vol. 51 No. 1 DOI: 10.1128/JCM.02099-12
- Makhneva E., Z. Farka, P. Skládal, L. Zajíčková, 2018 «Cyclopropylamine plasma polymer surfaces for label-free SPR and QCM immunosensing of *Salmonella*»

<https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.08.055>

- Mc Govern V. J., Slavutin L. J., 1979 «Pathology of *Salmonella colitis*». *The American Journal of Surgical Pathology* 3:483-490 -1979 DOI: 10.1097/00000478-197912000-00001
- Monack D. M., Bouley D. M., e Falkow S., 2004. «*Salmonella typhimurium* Persists within Macrophages in the Mesenteric Lymph Nodes of Chronically Infected Nramp1 + / + Mice and Can Be Reactivated by IFN γ Neutralization». *The Journal of Experimental Medicine* 199 (2): 231–41. <https://doi.org/10.1084/jem.20031319>.
- Mondal B., S. Ramlal, P. S. Lavu, Bhavanashri N. and J. Kingston, 2018 «Highly Sensitive Colorimetric Biosensor for Staphylococcal Enterotoxin B by a Label-free Aptamer and Gold Nanoparticles» *Frontiers in Microbiology Febr. 2018, Vol. 9 Art. 179* doi: 10.3389/fmicb.2018.00179
- Mooijman K. A., 2018 «The new ISO 6579-1: A real horizontal standard for detection of *Salmonella*, at last!» Elsevier Ltd. *Food Microbiology* 71 (2018) 2-7 <http://doi.org/10.1016/j.fm.2017.03.001>
- Nguyen H. H., J. Park, S. Kang, M. Kim, 2015 «Surface Plasmon Resonance: A Versatile Technique for Biosensor Applications» *Sensors* 2015, 15, 10481-10510; doi:10.3390/s150510481
- Pearce R. A., D. J. Bolton, J. J. Sheridan, D. A. McDowell, I. S. Blair, and D. Harrington, 2004. «Studies to determine the critical control points in pork slaughter hazard analysis and critical control point systems» *Int. J. Food Microbiol.* 90:331–339 DOI: 10.1016/s0168-1605(03)00333-7
- Pedersen K., G. Sørensen, C. Lofstrom, P. Leekitcharoenphon, B. Nielsen, A. Wingstrand, F. M. Aarestrup, R. S. Hendriksen, D. Lau Baggesen, 2014 «Reappearance of *Salmonella* serovar Choleraesuis var. *Kunzendorf* in Danish pig herds» *Elsevier Ltd. Veterinary Microbiology* 176 (2015) 282-291 <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.01.004>
- Perry L., P. Heard, M. Kane, K. Hanyoup, S. Savikhin, W. Domínguez e B. Applegate. 2007. «Application of multiplex polymerase chain reaction to the detection of pathogens in food». *Journal of Rapid Methods and Automation in Microbiology* 15 (2): 176–98. <https://doi.org/10.1111/j.1745-4581.2007.00083.x>.

- Pilot R., R. Signorini, C. Durante, L. Orian, M. Bhamidipati, L. Fabris, 2019 «A Review on Surface-Enhanced Raman Scattering» *MDPI Biosensors* 2019, 9, 57; doi:10.3390/bios9020057
- Pires S. M., L. Knecht e T. Hald. 2011. «Estimation of the Relative Contribution of Different Food and Animal Sources to Human *Salmonella* Infections in the European Union». *EFSA Supporting Publications* 8 (8): 184E. <https://doi.org/10.2903/sp.efsa.2011.EN-184>.
- Pohanka M., 2018 «Overview of Piezoelectric Biosensors, Immunosensors and DNA Sensors and Their Applications» *Materials* 11, no. 3: 448. <https://doi.org/10.3390/ma11030448>
- Pradhan D., e V. Devi Negi. 2019. «Stress-Induced Adaptations in *Salmonella*: A Ground for Shaping Its Pathogenesis». *Microbiological Research* 229 (dicembre): 126311. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2019.126311>.
- Raffatellu M., Wilson R. P., Winter S. E., Bäuml A. J., 2008. «Clinical pathogenesis of typhoid fever». *J Infect Developing Countries* 2008; 2(4): 260-266. <https://doi.org/10.3855/jidc.219>
- Regolamento (CE) N. 1099/2009 del Consiglio del 24 settembre 2009 relativo alla protezione degli animali durante l'abbattimento
- Regolamento (CE) N. 1441/2007 della commissione del 5 dicembre 2007 che modifica il Regolamento (CE) n. 2073/2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari
- Regolamento (CE) n. 2073/2005 della Commissione del 15 novembre 2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari
- Regolamento (CE) N. 2160/2003 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 17 novembre 2003 sul controllo della salmonella e di altri agenti zoonotici specifici presenti negli alimenti
- Regolamento (UE) N. 217/2014 della Commissione del 7 marzo 2014 che modifica il Regolamento (CE) n. 2073/2005 per quanto riguarda la salmonella nelle carcasse di suini
- Riu J., B. Giussani, 2020 «Electrochemical biosensors for the detection of pathogenic bacteria in food» *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, 126, 115863. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2020.115863>
- Sadava D., H. C. Heller, G. H. Orians, W. K. Purves, D. M. Hillis, 2010 «Biologia. La scienza della vita» *Zanichelli Editore*

- Saito S., 2021 «SELEX-based DNA Aptamer Selection: A perspective from the Advancement of Separation Techniques» *Analytical Sciences Jan 2021, Vol 37*; The Japan Society for Analytical Chemistry doi:10.2116/analsci.20SAR18
- Sánchez C., Lechuga L. e Mitchell A., 2019 «Advanced Evanescent-Wave Optical Biosensors for the Detection of Nucleic Acids: An Analytic Perspective» *Frontiers in Chemistry. 7* doi:10.3389/fchem.2019.00724.
- Seif Y., Monk J. M., Machado M., Kavvas E., Palssona B. O, 2019. «Systems Biology and Pangenome of *Salmonella* O-Antigens» *American Society for Microbiology, mBIO. Volume 10 Issue 4. e01247-19* DOI: 10.1128/mBio.01247-19
- Shen Y., Xu L., e Li Y., 2021. «Biosensors for Rapid Detection of *Salmonella* in Food: A Review». *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety 20 (1): 149–97.* <https://doi.org/10.1111/1541-4337.12662>.
- Shen, Z. Q., Wang, J. F., Qiu, Z. G., Jin, M., Wang, X. W., Chen, Z. L., Cao, F. H., 2011 «QCM immunosensor detection of *Escherichia coli* O157:H7 based on beacon immunomagnetic nanoparticles and catalytic growth of colloidal gold» *Biosensors and Bioelectronics, 26(7), 3376–3381.* <https://doi.org/10.1016/j.bios.2010.12.035>
- Silva D. S. P., T. Canato, M. Magnani, J. Alves, E. Y. Hirooka, e T. C. Rocha Moreira de Oliveira. 2011. «Multiplex PCR for the Simultaneous Detection of *Salmonella* Spp. and *Salmonella* Enteritidis in Food: Multiplex PCR for *Salmonella* Spp.» *International Journal of Food Science & Technology 46 (7): 1502–7.* <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2011.02646.x>.
- Silva N. F. D., J. M. C. S. Magalhães, C. Freire, C. Delerue-Matos, 2018 «Electrochemical biosensors for *Salmonella*: State of the art and challenges in food safety assessment». *Biosensors and Bioelectronics, 99, 667–682.* <https://doi.org/10.1016/j.bios.2017.08.019>
- Singh S., D. S. Dhanjal, S. S. Thotapalli, Vijay Kumar, S. Datta, Vineet Kumar, M. Kumar, J. Singh «An insight in bacteriophage-based biosensors with focus on their detection methods and recent advancements» Elsevier Ltd. *Environmental Technology & Innovation 20 (2020)* <https://doi.org/10.1016/j.eti.2020.101081>
- Su L., Lan Zou, Chi-Chun Fong, Wing-Leung Wong, Fan Wei, Kwok-Yin Wong, Rudolf S.S. Wu, Mengsu Yang, 2013 «Detection of cancer biomarkers by piezoelectric biosensor using PZT ceramic resonator as the transducer» *Biosensors and Bioelectronics 46 (2013) 155–161* <http://doi.org/10.1016/j.bios.2013.01.074>

- Tükel C., Raffatellu M., Chessa D., Wilson R. P., Akçelik M. & Bäumlér A. J., 2006 «Neutrophil influx during non-typhoidal salmonellosis: who is in the driver seat?» *Federation of European Microbiological Societies* 46(2006) 320-329. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2006.00051.x>
- Umesha S., H. M. Manukumar, 2018 «Advanced molecular diagnostic techniques for detection of food-borne pathogens: Current applications and future challenges» *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 58:1, 84-104, DOI: 10.1080/10408398.2015.1126701
- Wang L., Wang R., Chen F., Jiang T., Wang H., Slavik M., Li Y., 2017 «QCM-based aptamer selection and detection of *Salmonella* Typhimurium» *Food Chemistry*, 221, 776–782. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.104>
- Wang, Y., Ye, Z., & Ying, Y., 2012 «New trends in impedimetric biosensors for the detection of foodborne pathogenic bacteria» *Sensors*, 12(3), 3449–3471. <https://doi.org/10.3390/s120303449>
- Wei W., S. A. Haruna, Y. Zhao, H. Li, Q. Chen, 2022 «Surface-enhanced Raman scattering biosensor-based sandwich-type for facile and sensitive detection of *Staphylococcus aureus*» *Elsevier Ltd. Sensors & Actuators: B. Chemical* 364 (2022) 131929 <https://doi.org/10.1016/j.snb.2022.131929>
- Winter S. E., Raffatellu M., Wilson R. P., Russmann H., Bäumlér A. J., 2008 «The *Salmonella* enterica serotype Typhi regulator TviA reduces interleukin-8 production in intestinal epithelial cells by repressing flagellin secretion» *Cell Microbiology* 10:247-261 DOI: 10.1111/j.1462-5822.2007.01037.x
- Wu W. H., Li M., Wang Y., Ouyang H. X., Wang L., Li C. X., Lu J. X., 2012 «Aptasensors for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium» *Nanoscale Research Letters*, 7, 658. <https://doi.org/10.1186/1556-276X-7-658>
- Xu F., S. Ren, J. Li, X. Bi e Y. Gu, 2018 «Molecular Assembly of a Durable HRP-AuNPs/PEDOT:BSA/Pt Biosensor with Detailed Characterizations» *MDPI Sensors* 2018, 18, 1823; doi:10.3390/s18061823
- Yaraki M. T., Y. N. Tan, 2020 «Metal Nanoparticles-Enhanced Biosensors: Synthesis, Design and Applications in Fluorescence Enhancement and Surface-enhanced Raman Scattering» *Wiley Online Library, Chem Asian J.* 2020, 15, 3180–3208 <https://doi.org/10.1002/asia.202000847>

- Zheng G., M. Mikš-Krajnik, Y. Yang, W. Xu, e H. G. Yuk, 2014. «Real-Time PCR Method Combined with Immunomagnetic Separation for Detecting Healthy and Heat-Injured *Salmonella* Typhimurium on Raw Duck Wings». *International Journal of Food Microbiology* 186 (settembre): 6–13. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.06.005>.
- Zhu X., J. Li, H. He, M. Huang, X. Zhang, S. Wang, 2015 «Application of nanomaterials in the bioanalytical detection of disease-related genes» *Biosensors and Bioelectronics* 74 (2015) 113–133 <http://doi.org/10.1016/j.bios.2015.04.069>
- Zhu, Q., Shih, W. Y., e Shih, W. H., 2007 «In situ, in-liquid, all-electrical detection of *Salmonella* Typhimurium using lead titanate zirconate/gold-coated glass cantilevers at any dipping depth» *Biosensors and Bioelectronics*, 22(12), 3132–3138. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2007.02.005>

SITOGRAFIA

- ciclo-litico-e-lisogeno-dei-batteriofagi.jpg (650×404) (chimica-online.it)
- <http://www.chimicavolta.com/2018/02/01/elettrolisi/>
- <https://biologyease.com/biosensors/>
- https://chem.libretexts.org/Courses/Northeastern_University/11:_Electrochemical_Methods/11.2:_Potentiometric_Methods
- https://www.3tre3.it/malattie/salmonellosi_105
- <https://www.allthescience.org/what-is-antibody-binding.htm>
- <https://www.epicentro.iss.it/tossinfezioni/>
- <https://www.genome.gov/about-genomics/fact-sheets/Polymerase-Chain-Reaction-Fact-Sheet>
- Istituto Superiore di Sanità - *L'epidemiologia per la sanità pubblica: febbre tifoide*.
<https://www.epicentro.iss.it/tifoide/>
- World Health Organization (WHO), Foodborne Disease Burden Epidemiology Reference Group, 2007-2015. «WHO estimates of the global burden of foodborne diseases».
https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/199350/9789241565165_eng.pdf;sequence=1.

INDICE DELLE IMMAGINI

Figura 1 Patogenesi della salmonellosi negli esseri umani (Lamas et al., 2018)	8
Figura 2 Fotografie di quadri sintomatologici di paratifosi suina (www.3tre3.it)	11
Figura 3 Fotografie di quadri sintomatologici della forma enterocolitica di salmonellosi nel suino (www.3tre3.it)	12
Figura 4 "Top Five" sierotipi di <i>Salmonella</i> spp. (EFSA & ECDC, 2021).....	17
Figura 5 Distribuzione dei principali serovar di <i>Salmonella</i> spp. nelle specie animali serbatoio (EFSA & ECDC, 2021).....	18
Figura 6 Fasi a rischio durante la macellazione del suino per la trasmissione di <i>Salmonella</i> spp. (Arguello et al., 2012).....	20
Figura 7 Linea di macellazione del suino, con i punti critici per la contaminazione da <i>Salmonella</i> evidenziati in rosso (De Busser, 2013)	24
Figura 8 Le cinque classi anticorpali (www.allthescience.org)	34
Figura 9 Rappresentazione di una sonda di acidi nucleici (in verde) impegnata nel legame con il filamento target (in blu) (Sánchez, Lechuga e Mitchell, 2019)	35
Figura 10 Struttura tridimensionale di un aptamero a seguito del legame con il suo target (Förster et al., 2011)	37
Figura 11 Ciclo litico e ciclo lisogenico dei batteriofagi (www.chimica-online.it)	38
Figura 12 Diverse tipologie di AMPs (Jenssen, 2009)	40
Figura 13 Diversi sistemi di trasduzione utilizzati per il riconoscimento di <i>Salmonella</i> spp. (Shen, Xu e Li, 2021)	40
Figura 14 Schema generale di una cella elettrolitica (www.chimicavolta.com)	41
Figura 15 Rappresentazione schematica di biosensore amperometrico (https://biologyease.com).....	42
Figura 16 Rappresentazione schematica di un sensore a ISE (https://chem.libretexts.org)	43
Figura 17 Rappresentazione schematica di un biosensore voltammetrico	44
Figura 18 Rappresentazione schematica di un biosensore impedimetrico	45
Figura 19 Meccanismo di funzionamento di un biosensore colorimetrico con AuNPs (Mondal et al., 2018).....	47
Figura 20 Rappresentazione schematica di un biosensore a SERS.....	49
Figura 21 Rappresentazione schematica di un biosensore a SPR	50

Figura 22 Rappresentazione schematica di un biosensore piezoelettrico (Pohanka, 2018)52

INDICE DELLE TABELLE

Tabella 1 Vantaggi e svantaggi dei diversi biorecettori per *Salmonella* spp. (Shen, Xu e Li, 2021)..... 33