



SOCIETÀ ITALIANA DI DIAGNOSTICA
DI LABORATORIO VETERINARIA

XXII Congresso Nazionale SIDILV

11-13 OTTOBRE 2023

Brescia, Centro Congressi Paolo VI

ABSTRACT BOOK

Con il patrocinio di



INDICE

RELAZIONI A INVITO

COMUNICAZIONI ORALI Pag. 1

ATTI DEL CONGRESSO Pag. 117

INDICE AUTORI Pag. 602

APPLICAZIONE DELL'ENTOMOLOGIA FORENSE ALLA DATAZIONE DELLE INFESTAZIONI ALIMENTARI: CALCOLO DEI TEMPI DI SVILUPPO DI PLOPHILA CASEIA. Grisendi³, M. Scremin³, M. Dottori³, A. Serraino¹, F. Giacometti¹, P. Bonilauri²¹Department of Veterinary Medical Sciences, University of Bologna, Via Tolara di Sopra 50, 40126 Ozzano dell'Emilia, Italy²Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e Emilia Romagna, Via Bianchi 7/9, 25124 Brescia, Italy³Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e Emilia Romagna, Via Pitagora 2, 42124 Reggio Emilia, Italy**SUMMARY**

The cheese (ham) skipper, *Plophila casei* (Linnaeus), is a member of the "skipper fly" family (Plophilidae) and it is detritivore feeding on decaying matter. Larvae are typically found on high-protein substrates such as cheese, ham and carcasses. Life cycle is strictly influenced by temperature and food. In this work, we tested development time and larval length of *P. casei* on ham (Prosciutto di Parma) at five constant different temperatures and we calculated ADD (Accumulated Degree Days) and Isomegalen diagram in order to estimate the infestation time of this product. The minimum development temperature obtained by extrapolation of the development rates measured among 28°C and 20°C was 10.7 °C, and the ADD 28°C (egg-pupa) resulted to be 129.8. Finally, the larvae developed considerably faster on the ham than those fed with the standard diet.

INTRODUZIONE

La famiglia dei Plophilidi comprende la specie *Plophila casei*, un piccolo dittero in grado di colonizzare diversi tipi di substrato ad alto contenuto proteico, come formaggi, pesce, prosciutti e anche cadaveri. Una volta individuato il substrato, la femmina vi depone fino a 500 uova, dalle quali emergono piccole larve che scavano e si infossano nell'alimento nutrendosene. La loro attività trofica può essere desiderata come nella produzione di alcuni formaggi come il "Casu marzu", oppure indesiderata ad esempio nell'infestazione di un prosciutto, nel quale la presenza di larve determina l'insudiciamento del prodotto, oltre che, se ingerita viva, può causare miasi. Soprattutto in quest'ultimo caso è importante capire quando è avvenuta la colonizzazione, per capire a che livello della catena produttiva (produzione, trasporto, stoccaggio presso il magazzino o consumatore finale) è avvenuta l'infestazione e eventualmente porvi rimedio. L'entomologia forense è la scienza che, attraverso lo studio del ciclo vitale dell'insetto permette di stimare i tempi di colonizzazione (dell'alimento o più classicamente della carcassa) conoscendo alcuni parametri tra cui la temperatura a cui si è sviluppato l'insetto e il substrato (1), dato che la stessa specie di insetti se allevata su substrati diversi, impiega tempi diversi a svilupparsi. I due metodi principali che permettono la datazione dell'infestazione entomica sono l'uso degli ADD e l'uso della lunghezza larvale (ISOMEGALEN/ISOMORPHEN). La letteratura riguarda soprattutto le specie più strettamente coinvolte nella colonizzazione dei cadaveri, mentre quella delle specie che infestano gli alimenti è piuttosto scarsa. Lo scopo di questo lavoro è stato calcolare i tempi di sviluppo calcolando ADD e ISOMEGALEN di *P. casei* allevata su prosciutto conservato a diverse temperature.

MATERIALI E METODI

Pupe e larve di *P. casei* naturalmente infestanti una partita di Prosciutto di Parma, sono state fornite dall'Università di Bologna per costituire una colonia stabile mantenuta con dieta artificiale standard (2) e allevate in camera climatica a 25°C, 70% RH e fotoperiodo 12:12(L:D).

Per le prove, un pezzo di Prosciutto di Parma da 50g è stato messo nei box di allevamento degli adulti per la deposizione delle uova e controllato ogni ora. Quando circa 200 uova erano state deposte, la carne è stata tolta e trasferita in un contenitore di plastica (27x17x15 cm) contenente segatura, al quale sono stati aggiunti 50g di prosciutto ogni 2 giorni. Le larve sono state poste in camera climatica a 70% RH con fotoperiodo 12:12(L:D), e sono state testate 5 diverse temperature (20, 22, 24, 26, 28 °C). Ogni giorno, 10 larve sono state uccise per immersione in acqua calda (80°C) per 30 secondi, in accordo con le linee guida delle buone pratiche in entomologia forense (3) e fotografate e misurate con software ImageJ 1.46r. Gli ADD sono stati calcolati dall'uovo alla pupa, e dall'uovo alla schiusa per ogni replica (n=6) in accordo con la seguente formula $ADD=d(t-t_L)$, dove d= giorni di sviluppo, t= temperatura costante e t_L = limite inferiore di temperatura.

RISULTATI E DISCUSSIONE

I tempi di sviluppo osservati alle 5 temperature testate (in giorni) di *P. casei* alimentate con Prosciutto di Parma sono riportati in Tabella 1.

Il grafico isomegalen è riportato nel Grafico 1. Il limite inferiore di sviluppo è stato stimato dalla regressione lineare dei tassi di sviluppo tra 28 e 20°C ed è descritto dalla formula: $y = 0,0049x - 0,0526$, $R^2 = 0,9898$ ed è risultato essere 10,7°C. Questo valore ha permesso il calcolo degli ADD per le 5 temperature testate (Tabella 2).

Conoscere i tempi di sviluppo degli insetti che infestano le derrate alimentari può permettere di stimare l'origine dell'infestazione. I tempi di sviluppo dipendono da diversi fattori, di cui i più significativi sono temperatura e substrato di allevamento: confrontando i risultati ottenuti alimentando gli insetti con prosciutto (Tabella 1) con quelli presenti in letteratura relativi a insetti alimentati su dieta standard (2) è possibile vedere che, quelli alimentati su prosciutto si sviluppano più velocemente (ad esempio, quelle allevate su dieta standard a 28°C impiegano 19,7 giorni a completare il ciclo, mentre su prosciutto 12,1 giorni). Per avere una stima della datazione dell'infestazione più precisa possibile è quindi importante conoscere il substrato su cui si è sviluppato l'insetto. In caso di reclami da parte di clienti, stimare la data dell'infestazione può aiutare a determinare le responsabilità e i punti deboli della catena alimentare.

BIBLIOGRAFIA

- (1) VCAMMACK JA, TOMBERLIN JK. The Impact of Diet Protein and Carbohydrate on Select Life-History Traits of The Black Soldier Fly *Hermetia illucens* (L.) (Diptera: Stratiomyidae). *Insects*. 2017 May 31;8(2):56. doi: 10.3390/insects8020056. PMID: 28561763; PMCID: PMC5492070.
- (2) RUSSO, A, MASSIMINO COCUZZA, GE; VASTA, M. C.; SIMOLA, M; VIRONE, G.. Life fertility tables of *Piophilidae* reared at five different temperatures. *Environmental Entomology*, 2006, 35.2: 194-200.
- (3) AMENDT, J., CAMPOBASSO, C. P., GAUDRY, E., REITER, C., LEBLANC, H. N., & JR HALL, M. Best practice in forensic entomology—standards and guidelines. *International journal of legal medicine*, 2007, 121: 90-104.

TIPIZZAZIONE DI CEPPI DI CAMPYLOBACTER JEJUNI: CONFRONTO TRA DUE PROTOCOLLI RFLPI. Floris ², A. Romano ², D.M. Bianchi ², F. Giacometti ¹, V. Indio ¹, L. Prandini ¹, L. Decastelli ²¹*Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna, Via Tolara di Sopra 50, 40064, Ozzano dell'Emilia, Bologna, Italy*²*Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte Liguria e Valle d'Aosta (IZSPLV) -S.C. Sicurezza e Qualità degli Alimenti, Torino, Italy***SUMMARY**

Campylobacter is the second leading cause of foodborne infections in Italy in 2021(1). It is a foodborne zoonosis mainly transmitted by consuming raw or undercooked chicken meat. The common symptoms are fever, abdominal pain and diarrhea.

Classical typing methods such as PFGE and MLST are time-consuming, expensive and require specialized staff. Restriction fragment length polymorphism (RFLP) PCR is a rapid and inexpensive method that allows comparison of large numbers of Campylobacter jejuni strains.

Two approaches were used in this work: the first is based on the digestion of the flaA gene with the enzyme DdeI, and the second is a simultaneous digestion of the gyrA and pflA genes with the enzymes HindIII, HinfI, HhaI and DdeI. The two approaches were evaluated separately and then in combination. The method with the highest discriminatory power is the one based on the combined approach (99%) followed by gyrA/pflA (98%) and flaA (92%) approaches.

INTRODUZIONE

Secondo il report EFSA 2021 Campylobacter è la seconda causa di infezione alimentare in Italia, dopo la Salmonella. Inoltre, nel 2021, in UE sono stati registrati quasi 250 focolai e oltre 1.000 casi umani di cui 134 ospedalizzazioni e 6 morti. Dal punto di vista economico, la campilobatteriosi causa una perdita di produttività di circa 2,4 miliardi di euro l'anno in UE. (1).

Campylobacter è un batterio Gram-negativo a forma di spirale che si trova principalmente nell'intestino di mammiferi e uccelli. Le principali vie di trasmissione sono la carne di pollo cruda o poco cotta, l'acqua o il latte contaminati; la campilobatteriosi si manifesta con i sintomi gastrointestinali, quali dolori addominali e diarrea accompagnati da febbre.

Numerosi studi hanno valutato diversi metodi per la tipizzazione genotipica dei ceppi di Campylobacter come la multilocus sequence typing (MLST), l'elettroforesi in campo pulsato (PFGE) e il sequenziamento di nuova generazione (NGS) (2). Tali tecniche sono caratterizzate da tempi di esecuzione piuttosto lunghi, costi elevati e dalla necessità di personale altamente specializzato.

La PCR restriction fragment length polymorphism (RFLP) è una metodica economica che permette di differenziare i ceppi di Campylobacter in tempi relativamente brevi. In questo lavoro è descritto come il protocollo RFLP messo a punto da C. Ragimbeau (3) possa essere impiegato su ceppi di Campylobacter jejuni per verificare la presenza di correlazioni tra i ceppi isolati da matrici differenti. In particolare, sono stati confrontati due sistemi di tipizzazione: il sistema flaA e il sistema gyrA/pflA, che sono stati valutati singolarmente e poi in modo combinato.

MATERIALI E METODI

In totale, sono stati presi sottoposti a tipizzazione 125 ceppi identificati con il sistema MALDI-TOF (Bruker, Billerica, Massachusetts, Stati Uniti), isolati da matrici diverse: 34 ceppi da fluidi biologici umani, 61 dal comparto avicolo (47 pelle, 8 intestino, 3 feci, 3 carne), 11 da latte crudo, 14 da feci di bovino, 1 da carne di suino, 2 da feci di cane, 2 da organi di piccione.

L'estrazione del DNA è stata eseguita con il kit Extractme RNA & DNA (BLIRT S.A., Gda#sk, Poland) seguendo le istruzioni del fornitore.

L'amplificazione del gene flaA è stata eseguita in simplex, mentre i geni gyrA e pflA sono stati amplificati con una PCR di tipo multiplex. Il profilo termico e i relativi primer sono descritti in bibliografia (3). L'amplificato del gene flaA è stato digerito con l'enzima di DdeI mentre l'amplificato contenente i geni gyrA e pflA con gli enzimi HindIII, HinfI, HhaI e DdeI. In entrambi i casi i campioni sono stati incubati per 3h a 37 °C per favorire l'azione enzimatica.

Gli amplificati prima e dopo la digestione sono stati analizzati con lo strumento QIAxcel Advanced Instrument. I pattern elettroforetici di ogni campione sono stati poi confrontati utilizzando il software BioNumerics (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Francia). Le similarità tra i profili sono state calcolate utilizzando il coefficiente di correlazione Dice, impostando il parametro di tolleranza e il parametro di ottimizzazione a 0,5%. La matrice di distanza calcolata è stata utilizzata per la costruzione del dendrogramma con metodo UPGMA (Unweighted Pair Group Method using Arithmetic averages). Sono stati quindi confrontati il dendrogramma derivante dalla digestione del gene flaA, quello derivante dalla digestione simultanea dei geni gyrA e pflA e la combinazione dei due sistemi. I cluster sono stati determinati in modo che i profili con coefficiente di similarità superiore all'80% fossero considerati geneticamente correlati e il potere discriminatorio è stato calcolato con la formula proposta da PR Hunter (4).

RISULTATI E DISCUSSIONE

In tutti gli isolati è stato possibile verificare la presenza delle bande di amplificazione sia relative al gene flaA che quelle relative ai geni gyrA e pflA. Inoltre, in tutti è stato osservato un pattern di digestione apprezzabile con bande da circa 15 a 3000 kbp.

Con il sistema di tipizzazione flaA (potere discriminatorio del 92%) 17 cluster contengono almeno due isolati con coefficiente superiore all'80%, 10 cluster con coefficiente del 100% e 16 isolati non rientrano in nessun cluster. Con il sistema di tipizzazione gyrA e pflA (potere discriminatorio del 98%), 22 cluster contengono almeno due isolati con coefficiente superiore all'80%, 10 cluster con coefficiente del 100% e 48 isolati non rientrano in nessun cluster. Combinando i due sistemi (potere discriminatorio del 99%), 6 cluster

contengono almeno due isolati con coefficiente superiore all'80%, 2 cluster con coefficiente del 100% e 108 isolati non rientrano in nessun cluster.

L'applicazione di un protocollo RFLP a basso potere discriminatorio (*flaA*) su un elevato numero di campioni può essere intesa come approccio preliminare per verificare le eventuali correlazioni filogenetiche e per selezionare gli isolati da sottoporre a metodiche più discriminatorie, come PFGE e/o Whole-genome sequencing (WGS). Al contrario, in caso isolati provenienti da una nicchia ben definita (ad esempio focolai epidemici), l'uso di protocolli con potere discriminatorio maggiore permette di identificare i ceppi con maggiore similarità. In conclusione, tale metodo risulta economico, veloce e di facile applicazione per tutti laboratori.

BIBLIOGRAFIA

1. EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control) (2022). The European Union One Health 2021 Zoonoses Report. *EFSA Journal* 2022; 20 (12):7666, 273 pp.
2. Eberle, K. N., & Kiess, A. S. (2012). Phenotypic and genotypic methods for typing *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in poultry. *Poultry science*, 91(1), 255–264.
3. Ragimbeau, C., Salvat, G., Colin, P., & Ermel, G. (1998). Development of a multiplex PCR gene fingerprinting method using *gyrA* and *pflA* polymorphisms to identify genotypic relatedness within *Campylobacter jejuni* species. *Journal of applied microbiology*, 85(5), 829–838.
4. Hunter, P. R., & Gaston, M. A. (1988). Numerical index of the discriminatory ability of typing systems: an application of Simpson's index of diversity. *Journal of clinical microbiology*, 26(11), 2465–2466.

Gallocchio F.	195,115	Guida M.	391
Galluzzo P.	417	Guolo A.	594
Galuppo L.	417	Gustinelli A.	517
Gamba V.	491		
Gambi L.	521,525	H	
Garbarino C.	29,120,302	Hattab J.	166
Garbarino C.a.	268,279	Hauber T.	505
Gargano F.	215	Hisgen L.	366
Garofalo F.	514	Hochscheid S.	323
Garofalo L.	226,189	Hoffmann B.	331
Garofolo G.	485,400,46		
Gasparini M.	503	I	
Gasti T.	64	Iaccarino D.	323,555
Gattuso A.	457	Iafusco M.	264
Gavoci G.	49	Ianiro G.	264
Gazzola A.	124,168,131,464	Iannetti L.	162
Gemmato A.	501	Iannucci A.	226
Geobaldo F.	49	Ianzano A.	39
Ghelardi A.	385,430	Iapaolo F.	571
Giaccio N.	448	Iatarola M.	272
Giacometti F.	459,173	Indio V.	459
Giacomi A.	397	Ingravalle F.	305
Giacomini E.	319	Interisano M.	507
Gialletti R.	430	Iorio M.	247,251
Giammarioli M.	359,8,71,232	Ippoliti D.	443
Giannetti L.	505	Iscaro C.	8,232,6,1
Giannico A.	562	Iulietto M.f.	44
Giantin S.	24	Iulini B.	400
Gianviti A.	88	Iurescia M.	141,39,238
Gibelli L.	430	Izzillo D.	187,108
Gibelli L.	22		
Giorda F.	538,400	J	
Giovannantonio P.	160	Janowicz A.	485,400
Girardi S.	470		
Giraud A.	49	K	
Giua L.	590	Karaman I.	22,15
Giuliani M.	15	Knauf S.	366
Giuliato I.	221	Knijn A.	88
Giusepponi D.	144	Krasteva I.	355
Gobbi P.	71		
Gobbo F.	13	L	
Gogliettino M.	468	La Bella G.	499,106,141
Goria M.	400,430	La Brasca R.	553
Gradassi M.	464,202	La Rosa G.	413
Gradoni F.	594	La Russa F.	582
Gradoni F.	13,195	La Salandra G.	141,106,499
Granato A.	353	Lai J.	305,577
Grassi A.	126,62,464	Lambiase S.	340
Grassi C.	71,242,309	Lamcja F.	359
Grattarola C.	538,400	Lamontanara A.	92
Grazioli S.	370,331,338	Lanave G.	106
Greco G.	597	Lanteri G.	178
Griffioen F.	319	Lanzoni L.	162
Griglione A.	535	Laricchiuta P.	18
Grilli G.	131	Lasia M.	423
Grisendi A.	544,173,588	Latrofa M.s.	298
Guadagnini G.	57	Lavatelli F.	64
Guadagno F.	131,464,433	Lavazza A.	427,77,366,349,359
Guadagnuolo G.	505	Leccese A.	144
Guaita A.	521,525	Lelli D.	99,349,427,566,359,22,319
Guarneri F.	333,312,131,319,126	Lelli Mami F.	521,525
Gucciardi F.	571		
Guercio A.	571		
Guerrini F.	443		
Guerritore F.	316		
Guglielmetti C.	64		