

VALIDAZIONE DI UNA METODICA PER LA RICERCA E L'IDENTIFICAZIONE DI LARVE DI *TRICHINELLA* SPP. IN CAMPIONI DI MUSCOLO UTILIZZANDO IL SISTEMA "TRICHINEASY"

Gallina S., Pivetta E., Chiavacci L., Barzanti P., Vitale N., Ingravallo F., Giovannini T., Zoppi S., Decastelli L.
Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta

Key word: *Trichinella* spp., sicurezza alimentare, validazione

SUMMARY

The aim of this study was to validate a new artificial digestion method (TrichinEasy) for the detection of *Trichinella* genus parasites (nematodes) in the muscle tissues of animals slaughtered for human consumption.

INTRODUZIONE

L'infestazione delle carni da parte di parassiti nematodi del genere *Trichinella* può rappresentare un importante rischio per la salute del consumatore; *Trichinella* spp, infatti, può essere responsabile di gravi forme morbose nell'uomo legate al consumo di carne contaminata. Per tale motivo la Commissione Europea già da anni lavora e si occupa, direttamente o tramite il gruppo di esperti sui rischi biologici dell'Autorità Europea sulla sicurezza alimentare (EFSA), del problema trichinellosi.

Con l'emanazione del Regolamento CE 2075/2005 del 5 dicembre 2005 sul controllo della trichinellosi, applicabile negli Stati Membri dal 1° gennaio 2006, vengono definite norme specifiche applicabili ai controlli ufficiali relativi alla presenza di *Trichinella* nelle carni.

Il metodo di riferimento indicato dal Regolamento prevede l'utilizzo dell'agitatore magnetico con digestione artificiale di campioni aggregati. Il Regolamento, inoltre, prevede la possibilità di utilizzare altri metodi considerati equivalenti.

Tra le novità degne di nota di questa nuova legislazione, in merito ai vari metodi di laboratorio per l'individuazione delle Trichine nelle carni fresche, vi è la considerazione che l'esame trichinoscopico non sia più idoneo come metodo di individuazione di uso corrente.

Non essendovi segnalazioni da diversi anni, inoltre, la Regione Piemonte risulta indenne da trichinellosi, ma la messa a punto di metodiche con una sensibilità e una specificità prossime al 100% potrebbe permettere una maggiore garanzia del consumatore là dove i metodi tradizionali potrebbero fornire falsi negativi in presenza di contaminazione molto bassa.

MATERIALI E METODI

Al fine di validare un nuovo metodo di digestione artificiale per la ricerca di parassiti del genere *Trichinella* nei tessuti muscolari di animali destinati al consumo alimentare umano si è voluto valutare le performances del metodo, ovvero l'accuratezza e la precisione, analizzando due specie animali, suina ed equina

Per quanto riguarda l'accuratezza sono state stimate la sensibilità diagnostica, rilevata come numero di esiti positivi sul totale dei campioni infestati, e la specificità diagnostica, rilevata come numero di esiti negativi sul totale dei campioni non infestati; in particolare, per ciascun parametro, sono state analizzate 50 unità di tessuto muscolare, per un totale di 200 determinazioni.

Come gold standard negativo è stato utilizzato del tessuto muscolare libero da larve; il tessuto è stato preliminarmente sottoposto a verifica, utilizzando il metodo

di riferimento indicato dal Regolamento CE 2075/2005, per confermarne la negatività.

Come gold standard positivo si è utilizzato un campione, ottenuto attraverso le stesse modalità previste per il gold standard negativo, artificialmente infestato, nella misura di 3-5 larve per grammo, con una sospensione di larve derivante da muscolo di topo infestato (materiale di riferimento fornito dal Community Reference Laboratory for Parasites, Istituto Superiore di Sanità).

Per valutare la precisione (ripetibilità e riproducibilità), invece, è stata stimata la concordanza esistente tra i risultati ottenuti dal medesimo operatore in due letture diverse (ripetibilità) e tra quelli ottenuti da due operatori diversi (riproducibilità). A tal fine è stato esaminato un totale di 40 campioni, 30 campioni di muscolo suino e 10 di muscolo equino così suddivisi: 5 debolmente positivi (contaminati con 3-4 larve), 5 fortemente positivi (contaminati con 20-24 larve) e 30 negativi.

I campioni positivamente sono stati preparati procedendo ad una prima fase di estrazione delle larve mediante digestione di 10 g di muscolo murino contaminato. Le larve così ottenute sono state purificate mediante passaggi successivi di sedimentazione e lavaggio in modo tale da ottenere una sospensione (sospensione madre) utilizzate per contaminare i campioni.

Per eseguire la contaminazione dei campioni sono stati valutati differenti metodi; tra questi è stato scelto il metodo dell'inoculo che prevede, in via preliminare, la digestione di un campione di muscolo negativo. Al campione digerito vengono aggiunte, prima della filtrazione, le larve seguendo la seguente procedura: le larve vengono prelevate con una pipetta dalla sospensione e poste in capsula Petri allo scopo di effettuarne il conteggio. In tal modo le larve utilizzate per la contaminazione del campione sono in quantità nota e non vengono sottoposte a doppia digestione che potrebbe danneggiarle, rendendole irricognoscibili.

La metodica utilizzata prevede l'analisi di campioni costituiti da 100 g di muscolo secondo la seguente procedura:

- il campione viene posto nel digestore del TrichinEasy (figura 1) dove, dopo la triturazione, viene aggiunta acqua;
- si avvia il programma di digestione: premendo il tasto START l'apparecchiatura scalda (segnalando HEATING sullo schermo) e avverte, con un segnale di tipo sonoro accompagnato dalla scritta HOT, che è stata raggiunta la temperatura di 42°C, necessaria per procedere con la digestione. Si versa quindi il contenuto del flacone A (50 ml di HCl 10%) e si aziona il comando START per avviare la pala; si aggiunge quindi il contenuto del flacone B (15 g di pepsina 1:10000 NF). La digestione procede mantenendo il liquido riscaldato ed in agitazione;
- terminata la digestione l'apparecchio automaticamente va in stand by e avvisa l'operatore con un segnale acustico;
- si è qui provveduto all'aggiunta dell'inoculo con un numero noto di larve di *Trichinella*;
- l'ultima fase analitica prevede il trasferimento del contenuto presente nel digestore nel cilindro di filtraggio.

La filtrazione, della durata di 3-5 minuti, consente di recuperare le larve presenti su un filtro di cellulosa; i filtri consigliati sono da 30 µm, ma risulta possibile utilizzare anche i consueti filtri con pori fino a 12 µm. Il parassita, infatti, sia quando è fortemente spiralizzato sia quando risulta completamente srotolato, non è in grado di oltrepassare i pori poiché il suo diametro minimo è di 50 µm.

Figura 1: apparecchiatura TrichinEasy



Le prove hanno previsto una doppia lettura dei campioni in campo chiaro, con lo stereo microscopio e, dopo fissazione e colorazione (figura 1), con il microscopio a fluorescenza.

Figura 1: larve di *Trichinella* spp. dopo colorazione



RISULTATI E CONCLUSIONI

Nella tabella 1 sono riportati, separatamente per le due specie considerate e per il tipo di lettura eseguita (in campo chiaro vs. su campioni colorati), i risultati ottenuti per i parametri relativi all'accuratezza del metodo (sensibilità e specificità). In questo caso gli intervalli di confidenza al 95% sono stati calcolati secondo il metodo esatto per una distribuzione binomiale.

Tabella 1: accuratezza

Specie	Parametro	Tipo di lettura	esito	%	IC95%
Equino	Sensibilità	in chiaro	49/50	98%	89.4% – 99.9%
	Specificità		50/50	100%	92.9% – 100.0%
	Sensibilità	in colorato	50/50	100%	92.9% – 100.0%
	Specificità		50/50	100%	92.9% – 100.0%
Suino	Sensibilità	in chiaro	46/50	92%	80.8% – 97.8%
	Specificità		50/50	100%	92.9% – 100.0%
	Sensibilità	in colorato	50/50	100%	92.9% – 100.0%
	Specificità		50/50	100%	92.9% – 100.0%

I risultati ottenuti attraverso l'elaborazione statistica dei dati dimostrano le buone capacità diagnostiche dell'apparecchiatura. In particolare, la specificità è sempre risultata del 100%, così come la sensibilità con lettura al

microscopio a fluorescenza. È interessante osservare che la lettura in campo chiaro ha fornito 5 esiti falsi negativi, ma gli stessi campioni colorati e letti col microscopio a fluorescenza sono invece correttamente risultati positivi. Per quanto attiene la precisione si può affermare che i dati relativi alla concordanza sono altrettanto buoni: i valori relativi alla concordanza intraoperatore e interoperatore sono riportati nella tabella 2.

Tabella 2: precisione

Concordanza	Operatore	k	IC95%
intraoperatore	Operatore 1	1	0.69 – 1.00
	Operatore 2	1	0.69 – 1.00
interoperatore	Operatore 1	1	0.69 – 1.00
	Operatore 2	1	0.69 – 1.00

I due differenti parametri valutati si riferiscono alla doppia lettura dello stesso campione da parte del medesimo operatore (concordanza intraoperatore) e alla lettura del medesimo campione da parte di due operatori diversi (concordanza interoperatore).

Si osserva come nel caso in oggetto tutte le letture siano risultate concordanti e che quindi il limite inferiore dell'IC95% per k sia sempre stato pari a 0,69, ad indicare la bontà delle performances dell'apparecchiatura in termini di precisione.

In conclusione si può affermare che l'apparecchiatura si è dimostrata di facile utilizzo e adatta all'attività del laboratorio; l'analisi, inoltre, può essere eseguita agevolmente con il notevole vantaggio di poter processare numerosi campioni contemporaneamente, avendo la portata massima di 100 g.

Le performances, inoltre, si sono dimostrate di alto livello, consentendo di ottenere risultati attendibili, garantendo, comunque, la rapidità nell'emissione del risultato.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- Altman, D.G. (1991) Practical Statistics for Medical Research. Chapman & Hall, London.
- Forbes L.B., Rajic A., Gajadhar A.A., (1998) Proficiency samples for quality assurance in Trichinella digestion test. Journal of Food Protection, 61(10);1396-1399.
- Fleiss J.L., B. Levin., M. Cho Paik. (3rd ed. 2003) Statistical methods for rates and proportions. John Wiley & Sons, New York.
- Gamble H.R., Bessonov A.S., Cuperlovic K., Gajadhar A.A., van Knapen F., Noeckler K., Schenone H., Zhu X. (2000) Raccomandazioni sui metodi per il controllo di *Trichinella* negli animali domestici e selvatici destinati al consumo umano. Veterinari Parasitology, 93: 33-408
- Regolamento (CE) n. 2075/2005 della Commissione del 5 dicembre 2005 che definisce norme specifiche applicabili ai controlli ufficiali relativi alla presenza di Trichine nelle carni
- Shoukri M.M. 2004. Measures of inter observer agreement. Chapman & Hall/CRC, New York.

Si ringrazia il Dott. Edoardo Pozio - Community Reference Laboratory for Parasites, Istituto Superiore di Sanità