

INSERTO

lab



Giovanni Abramo

**Metodi molecolari: presente e futuro
della ricerca alimentare**

50

Redazione

labNews

57

Metodi molecolari: presente e futuro della ricerca alimentare

Intervista a Vincenzina Fusco, primo ricercatore presso l'Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari del Consiglio Nazionale delle Ricerche

Giovanni Abramo
Biologo

Proteggere la salute delle persone, degli animali e delle piante in ogni singola fase del processo di produzione alimentare è una delle principali priorità per la "public health" e l'economia. Per capire perché in questo contesto è fondamentale determinare i contaminanti biologici e individuare le corrette metodiche per rilevarli, abbiamo parlato con Vincenzina Fusco, primo ricercatore presso l'Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari del Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR-ISPA).

Fra i contaminanti degli alimenti vanno annoverati quelli chimici, quelli fisici e quelli biologici. Riguardo a questi ultimi, quali sono i più pericolosi e i più frequenti?

Per contaminanti biologici intendiamo microognismi, quali batteri, virus, funghi, parassiti e talvolta anche i loro metaboliti ad azione tossica, che possono causare malattie di varia gravità nell'uomo a seguito dell'ingestione di alimenti. L'Autorità europea per la Sicurezza alimentare (EFSA) e il Centro europeo per



la Prevenzione e il Controllo delle Malattie (ECDC) cooperano per pubblicare annualmente report sulle malattie di origine alimentare e anche sulle infezioni che possono essere trasmesse all'uomo dagli animali, in particolare da quelli coinvolti nel ciclo di produzione degli alimenti, raccogliendo i dati forniti dai Paesi membri – e anche da alcuni non membri – dell'Unione Europea.

Nei contaminanti biologici sono compresi batteri, virus, funghi, parassiti e talvolta anche i loro metaboliti ad azione tossica

Nell'ultimo report, pubblicato a dicembre 2021, i cinque microorganismi che più frequentemente hanno causato malattie nell'uomo sono stati *Campylobacter*, *Salmonella*, *Yersinia*, *Escherichia coli* produttori della tossina Shiga (STEC) e *Listeria monocytogenes*. Sono tutti batteri e per fortuna determinano prevalentemente sintomatologie gastroenteriche che si risolvono nell'arco di 3-7 giorni, però in alcuni casi il quadro clinico può essere più complesso. In particolare, tra i cinque succitati, gli STEC e *Listeria monocytogenes* possono essere annoverati tra i più pericolosi in quanto in grado di determinare in alcuni soggetti più fragili o predisposti sintomi molto gravi, addirittura mortali, come la sindrome emolitico-uremica e l'insufficienza renale, nel caso degli STEC, e aborto e malattie del sistema nervoso, nel caso di *Listeria monocytogenes*. Tra



Vincenzina Fusco è primo ricercatore presso l'Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari del Consiglio Nazionale delle Ricerche (CNR-ISPA). Ha conseguito la laurea con lode in Scienze e Tecnologie dell'Alimentazione, l'abilitazione all'esercizio della professione di tecnologo alimentare e il dottorato di ricerca in Scienze e Tecnologie delle Produzioni agro-alimentari presso l'Università degli Studi di Napoli Federico II.

È segretaria generale dell'International Association for Monitoring and Quality Assurance in the Total Food Supply Chain (MoniQA Association) e referente ISPA presso l'Autorità europea per la Sicurezza alimentare (EFSA) per la tematica "biological hazards".

È stata ed è responsabile/WP/task/subtask leader e principale investigatore in numerosi progetti nazionali e internazionali, ha partecipato come invited speaker a numerose conferenze nazionali e internazionali ed è stata membro di comitati scientifici e comitati organizzativi per conferenze internazionali.

È inoltre editor associato per "Frontiers in Microbiology" (2019-in corso) e membro dell'editorial board di "Applied and Environmental Microbiology", "Microbiology Spectrum", "Dairy" e "International Journal of Agricultural Science and Food Technology". Premiata come top reviewer in Cross Field (2019) and top reviewer in Agricultural Science (2019), è referee per numerose riviste scientifiche internazionali.

Con esperienza pluridecennale nel campo della microbiologia degli alimenti e della biologia molecolare a essa applicata, ha all'attivo oltre 100 pubblicazioni.

quelli annoverati, è proprio *Listeria monocytogenes* il microorganismo che più frequentemente determina mortalità nei soggetti colpiti.

Cosa dice la normativa a riguardo?

Affinché la salute dei consumatori venga tutelata è importante che ci sia un quadro normativo che permetta di garantire l'igiene e la sicurezza, anche microbiologica, degli alimenti che arrivano sulla nostra tavola. L'Unione Europea è molto attenta a questo aspetto ed ha elaborato una serie di norme che abbracciano tutta la filiera alimentare, includendo quindi la produzione, la trasformazione, la distribuzione e l'immissione sul mercato degli alimenti. L'aspetto cruciale di questa legislazione alimentare è che il responsabile dell'igiene e della sicurezza degli alimenti è identificato proprio nell'operatore del settore alimentare, che grazie all'autocontrollo deve garantire che gli alimenti prodotti rispettino le disposizioni delle normative vigenti, attuando in particolare le cosiddette procedure HACCP (*Hazard Analysis and Critical Control Points*), basate sui principi dell'analisi dei rischi lungo la filiera produttiva e sull'individuazione dei punti critici di controllo, e avvalendosi anche di guide alle buone pratiche in materia di igiene.

Nello specifico, alcune delle norme più importanti sono racchiuse nel cosiddetto "Pacchetto Igiene", che comprende una serie di regolamenti sull'igiene degli alimenti e sui controlli ufficiali che devono essere effettuati per garantire l'applicazione della legislazione alimentare (i regolamenti di riferimento

sono i seguenti: (CE) 852/2004, (CE) 853/2004 e (UE) 2017/625). In riferimento a quanto detto prima sui contaminanti biologici, non possiamo non citare il regolamento (CE) 2073/2005, che definisce i livelli di particolari microorganismi (tra cui anche i succitati *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* ed *Escherichia coli*) e anche di alcuni metaboliti tossici di origine microbica che possono essere presenti in determinate categorie alimentari, al fine di valutare non solo l'accettabilità di tali alimenti in termini di sicurezza microbiologica per il consumatore, ma anche l'igiene durante il processo della loro produzione, in modo da poter così adottare misure correttive prima della loro immissione sul mercato.

Come sono stati fino ad ora determinati i microrganismi contaminanti?

Le tecniche di riferimento per il rilevamento dei microorganismi contaminanti negli alimenti, per esempio quelle previste in molti protocolli sviluppati dall'International Organization for Standardization (ISO), consistono essenzialmente nella coltura dei microorganismi su specifici substrati selettivi al fine di ottenere delle colonie batteriche visibili che permettono di rilevare la presenza del microorganismo nel campione alimentare e che possono anche essere enumerate al fine di conoscere la concentrazione del microorganismo all'interno dell'alimento analizzato. Tali colonie possono poi essere prelevate e purificate per poter effettuare ulteriori analisi, ad esempio quelle microscopiche, quelle biochimiche e anche quelle molecolari. Queste ultime, analizzando

essenzialmente l'informazione genetica contenuta nel DNA, permettono di confermare l'identità dei microorganismi a livello di genere e specie e di conoscerne anche altre caratteristiche, magari specifiche di un determinato ceppo.

Con l'avvento delle tecniche di biologia molecolare cos'è cambiato?

Come si può evincere dalla risposta precedente, la coltivazione di un microrganismo in laboratorio richiede diversi giorni al fine di poter ottenere le colonie visibili. Inoltre, il metodo cultura-dipendente ha un difetto intrinseco, cioè non permette la crescita di quei microrganismi cosiddetti "vitali, ma non coltivabili", ossia vivi e presenti nell'alimento, ma che a seguito di un determinato evento che si è verificato durante la produzione o la conservazione del prodotto possono essere stati danneggiati o stressati e quindi non in grado di crescere sui substrati utilizzati in laboratorio. Questo potrebbe portare a una sottostima del numero dei microorganismi patogeni presenti nell'alimento, che potrebbero ancora conservare la loro pericolosità nei confronti dell'uomo.

La metagenomica e la metatrascrittomica consentono di studiare il DNA e l'RNA di intere popolazioni batteriche presenti in un alimento

Le tecniche di biologia molecolare, che hanno rivoluzionato la microbiologia e che permettono di analizzare le caratteristiche genetiche dei microorganismi, sono più rapide di quelle classiche perché non prevedono necessariamente la coltivazione del batterio, ma direttamente l'estrazione del suo DNA o RNA dal campione alimentare in modo tale che possa essere analizzato tramite l'amplificazione di specifiche regioni, attraverso un'importante tecnica nota come PCR (*Polymerase Chain Reaction*). Questa tecnica permette di identificare – ed eventualmente quantificare – il microorganismo senza risentire così del difetto intrinseco delle tecniche classiche, descritto pocanzi. Inoltre, tecniche di biologia molecolare note come metagenomica e metatrascrittomica permettono di poter studiare

53



©www.shutterstock.com

il DNA e l'RNA di intere popolazioni batteriche presenti in un alimento, cosa non possibile fino a poco tempo fa.

Bisogna però sottolineare che le tecniche classiche di coltivazione rimangono comunque di grande importanza perché l'isolamento del microorganismo e la sua conservazione in ceppoteche dedicate permettono di studiarne nel dettaglio alcune caratteristiche, ad esempio correlate alla patogenicità e alla resistenza agli antibiotici, tramite ulteriori analisi molecolari, ma anche fenotipiche e biochimiche.

Tutti i metodi utilizzati per la determinazione dei microrganismi contaminanti vengono convalidati? Se sì, da chi?

Dobbiamo innanzitutto premettere che i metodi per la determinazione dei microorganismi negli alimenti possono essere ufficiali o normalizzati. I primi sono riportati in documenti normativi cogenti o pubblicati sulla Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana o dell'Unione Europea o ancora in documenti emessi da un'autorità competente (come, ad esempio, un Ministero,

una Regione o una Provincia). I secondi sono invece metodi approvati da organismi di normazione nazionali, europei o internazionali (come, ad esempio, l'Ente Italiano di Normazione (UNI), il Comitato Elettrotecnico Italiano (CEI), l'International Organization for Standardization (ISO), l'Association of Official Analytical Collaboration International (AOAC)) o da organismi pubblici autorevoli (come, ad esempio, l'Istituto superiore per la Protezione e la Ricerca ambientale (ISPRa), la World Health Organization (WHO), l'Office International des Epizooties (OIE), l'U.S. Department of Agriculture (USDA), l'U.S. Food and Drug Administration (FDA)). Entrambi questi metodi sono considerati validati dall'ente che li ha emessi.

I metodi alternativi devono essere invece validati dal laboratorio di prova al fine di dimostrare che i risultati ottenuti con il nuovo metodo siano equivalenti a quelli ricavati con il metodo di riferimento normato e, ai fini della validazione, devono essere seguiti specifici protocolli accettati a livello internazionale, come quelli riportati nella norma ISO 16140, che prevedono una validazione condotta sia nel singolo laboratorio sia a livello inter-laboratoriale.



©www.shutterstock.com



I metodi alternativi devono essere validati da un laboratorio di prova

In questo contesto, un aspetto molto importante è l'accreditamento dei laboratori di prova, che ne attestano la loro competenza, indipendenza e imparzialità nello svolgere tali attività di valutazione di conformità. Come previsto dal regolamento (CE) 765/2008, ogni Stato membro dell'Unione Europea nomina il proprio ente unico nazionale di accreditamento; per l'Italia, ad esempio, questo ente è Accredia.

Quali sono i laboratori di riferimento?

I Laboratori Nazionali di Riferimento (LNR) per alimenti, mangimi e sanità animale, che a loro volta collaborano con i corrispondenti Laboratori di Riferimento dell'Unione Europea (EURL), vengono designati dal Ministero della Salute sulla base di quanto previsto dal regolamento (UE) 2017/625, a cui abbiamo accennato precedentemente in riferimento al "Pacchetto Igiene". Gli LNR per gli alimenti e i mangimi, sparsi sul territorio nazionale, sono numerosi

e sono specializzati, ad esempio, per il controllo e l'analisi di specifici microorganismi come l'LNR per *Listeria monocytogenes* e l'LNR per *Campylobacter* spp. (situati entrambi presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale (IZS) di Abruzzo e Molise) o l'LNR per *Escherichia coli* (situato presso l'Istituto Superiore di Sanità (ISS)), ma sono anche specializzati nell'analisi di determinati prodotti, come l'LNR per il latte e i prodotti a base di latte (presso l'ISS), l'LNR per il controllo delle contaminazioni batteriche dei molluschi bivalvi (presso l'IZS di Umbria e Marche) e l'LNR per l'analisi degli organismi geneticamente modificati (presso l'IZS di Lazio e Toscana). Inoltre, esiste l'LNR per l'antibiotico resistenza (presso l'IZS di Lazio e Toscana), un aspetto di salute pubblica sempre più importante da monitorare in quanto i microrganismi trasmessi con gli alimenti e resistenti agli antibiotici sono più difficili da sconfiggere quando causano infezioni nell'uomo (per i più interessati, l'elenco completo degli LNR presenti sul territorio nazionale è disponibile sul sito internet del Ministero della Salute). La qualità dei risultati delle analisi eseguite dagli LNR è garantita dall'accreditamento ottenuto da Accredia e dall'impiego di metodi di prova normati o, eventualmente, di metodi interni opportunamente validati.



©www.shutterstock.com

Quali sono le sfide future, considerando un mondo sempre più globalizzato?

La commercializzazione di prodotti provenienti da tutto il mondo, i cambiamenti climatici, l'aumento di fasce di popolazione composte da individui fragili, nuovi alimenti, nuove abitudini alimentari e nuove modalità di consumo, unitamente alle nuove conoscenze acquisite grazie ai progressi della scienza, rendono i quadri epidemiologici delle malattie trasmesse con gli alimenti sempre più complessi e mutevoli nel tempo. Basti pensare a patogeni emergenti che fino a poco tempo fa erano sconosciuti, come ad esempio i batteri del genere *Arcobacter*, verso cui la nostra ricerca è stata recentemente rivolta e che sono strettamente imparentati con i batteri del più noto genere *Campylobacter*, oppure a patogeni ri-emergenti che possono destare

preoccupazione a seguito dell'acquisizione di nuove caratteristiche di virulenza. Inoltre, l'aumento della popolazione mondiale rende sempre più necessaria la riduzione degli sprechi alimentari lungo la filiera produttiva, fermo restando che il cibo immesso sul mercato e che arriva sulle nostre tavole deve sempre mantenere un alto livello di sicurezza per i consumatori. In questo scenario, lo sviluppo e l'applicazione di metodi molecolari in grado di identificare e quantificare in maniera sempre più accurata i patogeni alimentari e che forniscono rapidamente i risultati, permettendo di attuare tutte le misure correttive sul prodotto alimentare al fine di garantirne sempre la sicurezza al momento dell'utilizzo da parte del consumatore, costituiscono i punti focali verso cui la ricerca in ambito alimentare sta attualmente guardando e continuerà a guardare nel prossimo futuro.



©www.shutterstock.com