



INSERTO

lab

Giovanni Abramo

I microrganismi si identificano così.....

40

Redazione

labNews

50

I microrganismi si identificano così

40

**Intervista
a Annalisa Serio e
Antonello Paparella,
rispettivamente
professore associato e
professore ordinario di
Microbiologia alimentare
dell'Università degli Studi
di Teramo**

di Giovanni Abramo

Biologo

41



©www.shutterstock.com

I settore Food richiede un livello di controllo e qualità elevato. Per questo chi opera in questo ambito deve dotarsi di strumenti di analisi alimentare molto accurati.

L'identificazione delle potenziali fonti di contaminazione microbica è l'elemento chiave per prevenirne la diffusione nell'ambiente di trasformazione di un prodotto alimentare di eventuali microrganismi patogeni. Identificare una specie microbica permette non solo di capire le attività di contenimento da intraprendere all'interno dello stabilimento, ma anche di compensare le perdite economiche.

Nell'industria alimentare i controlli microbiologici vengono effettuati sia nella fase di produzione, sia sul prodotto finito. Su quest'ultimo viene analizzata la conservazione e si valuta la presenza di tossine e altri organismi patogeni nei limiti regolamentati dalla legge. Per approfondire l'argomento, abbiamo parlato con Annalisa Serio e Antonello Paparella, rispettivamente professore associato e professore ordinario di Microbiologia alimentare dell'Università degli Studi di Teramo.

• Professoressa Serio, può dirci quali sono le tecniche utilizzate per l'analisi microbiologica degli alimenti?

Nelle industrie alimentari, il metodo maggiormente utilizzato per l'analisi microbiologica degli alimenti è la conta vitale su piastra. Partendo dall'alimento, mediante opportune diluizioni, i microrganismi vengono coltivati su piastre contenenti terreni nutritivi che possono essere anche specifici per un determinato gruppo microbico (come i terreni selettivi) o che consentono l'individuazione di particolari specie microbiche (terreni differenziali). Le piastre vengono incubate a temperature diverse, a seconda del microrganismo ricercato, per un tempo variabile tra 24 e 72 ore circa, tale da consentire lo sviluppo di colonie che verranno poi enumerate. Il metodo è versatile e l'impiego

Nelle industrie alimentari il metodo più utilizzato per l'analisi microbiologica degli alimenti è la conta vitale su piastra



La prof.ssa Annalisa Serio

di terreni di coltura differenti permette di ottenere un quadro ampio della comunità microbica del prodotto in breve tempo.

In alcuni casi, i metodi ufficiali o quelli di riferimento prevedono l'impiego di metodiche diverse, come la filtrazione o il cosiddetto MPN (*Most Probable Number*). Entrambi i metodi sono adatti alla ricerca di microrganismi in



Il prof. Antonello Paparella



campioni scarsamente contaminati; il primo prevede la filtrazione di un alimento liquido su membrana, mentre il secondo è una tecnica di enumerazione in tubi multipli. La ricerca di alcuni microrganismi patogeni, invece, prevede passaggi ulteriori di pre-arricchimento e arricchimento in brodo, prima dell'ultimo passaggio in piastra.

- **Professoressa, qualsiasi microrganismo che cresce dando origine a colonie visibili su un substrato, sia selettivo che non, prima di essere identificato (speciazione) deve essere isolato in coltura pura. In natura, i batteri raramente esistono come colture pure. Può dirci perché e come si esegue l'isolamento dei microrganismi?**

Esattamente: in natura, così come negli alimenti, i microrganismi spesso si trovano associati tra loro, mentre a livello analitico è indispensabile

Tecniche come il *Next Generation Sequencing* consentono di sequenziare geni mirati o persino l'intero genoma, rendendo l'identificazione certa

ottenere delle colture pure, in particolare quando il microrganismo va identificato o quando va confermata la sua presunta identità, ad esempio nel caso di colonie sviluppate su substrati differenziali al termine del protocollo di ricerca di batteri patogeni.

L'isolamento dei microrganismi prevede il trasferimento della colonia di interesse su una piastra di terreno specifico mediante un'ansa sterile. Le

cellule verranno diluite sulla piastra mediante il movimento caratteristico dell'ansa (lo striscio), che distribuirà progressivamente le cellule fino ad ottenere nuove colonie separate dalle altre. In questo modo, le cellule, incluse quelle contaminanti, si andranno a separare sulla piastra e si otterranno colonie pure. Il passaggio può essere ripetuto anche più volte fino al raggiungimento del risultato.

- **Professoressa, sappiamo che il microrganismo una volta isolato va identificato. Possiamo riassumere l'evoluzione delle tecniche identificative "dal fenotipo al genotipo"? Può dirci e farci qualche esempio?**

Negli ultimi decenni, l'evoluzione delle tecniche molecolari ha permesso di ridurre notevolmente i tempi richiesti per l'identificazione dei microrganismi. Tradizionalmente venivano utilizzate le tecniche fenotipiche, ovvero basate sulla manifestazione dei caratteri del microrganismo, le quali richiedevano diversi giorni o settimane di

lavoro per la valutazione di caratteristiche fisiologiche, metaboliche e sierologiche. A partire dagli anni Settanta, l'avvento di kit rapidi o di sistemi automatizzati ha notevolmente ridotto i tempi di analisi, ma talvolta i risultati erano dubbi o l'identificazione risultava incompleta (ad esempio, era possibile identificare il genere, ma non la specie). I metodi molecolari si fondono sull'analisi del genotipo, ovvero del corredo genetico, che rimane stabile nel tempo e non è soggetto a variazioni come il fenotipo.

Dalla ricerca di geni specie-specifici, condotta mediante termociclatore, spesso abbinata ad una caratterizzazione fenotipica preliminare, si è passati poi al sequenziamento del gene 16S rDNA o di altri geni conservati, pratica che ha consentito anche la valutazione di relazioni filogenetiche tra isolati della stessa specie. Ora tecniche come il *Next Generation Sequencing* (NGS) consentono di sequenziare geni mirati o persino l'intero genoma, rendendo quindi l'identificazione assolutamente certa. Chiaramente queste sono solo alcune delle tecniche molecolari attualmente disponibili poiché a oggi è





possibile anche caratterizzare intere comunità microbiche di matrici complesse, come gli alimenti, o analizzare il trascrittoma.

• **Professor Paparella, l'automatizzazione quanto ha aiutato e migliorato il processo identificativo?**

Nella diagnostica microbiologica, in ambito alimentare come già era accaduto nella microbiologia clinica, l'automazione è diventata un elemento fondamentale delle strategie analitiche. Se un tempo, fino agli anni Novanta, le soluzioni automatizzate per la microbiologia alimentare erano principalmente indirizzate all'utilizzatore industriale, oggi che l'industria alimentare ha consolidato la tendenza ad affidare all'esterno le indagini microbiologiche più complesse, il principale campo di applicazione dei sistemi automatizzati diventa quello dei laboratori di controllo ufficiale e dei grandi laboratori privati. In questa direzione, l'industria farmaceutica ha avuto un ruolo trainante perché è in questo settore che sono state sviluppate le prime piattaforme per la manipolazione automatica dei campioni e per la diagnostica molecolare. Attualmente questi sistemi sono presenti nella

Il principale campo di applicazione dei sistemi automatizzati è quello dei laboratori di controllo ufficiale e dei grandi laboratori privati

maggior parte dei laboratori che analizzano alimenti, perlomeno in quelli nei quali si richiede l'analisi di una quantità significativa di campioni. L'automazione ha interessato ampie aree della diagnostica nel settore della microbiologia degli alimenti, dal campionamento all'identificazione del microrganismo. In particolare, l'automazione ha consentito di migliorare notevolmente tempi e riproducibilità nelle diverse soluzioni adottate per l'amplificazione e il sequenziamento degli acidi nucleici, come PCR (*Polymerase Chain Reaction*), LCR (*Ligase Chain Reaction*), MLST (*Multi-Locus Sequence Typing*) e NGS. Sono oggi disponibili diverse piattaforme di sequenziamento di nuova generazione che consentono di approfondire l'analisi del genoma, del trascrittoma e dell'interazione tra DNA e

proteine, con un unico ciclo di sequenziamento.

• **Professore, quali sono le normative a cui fare riferimento e quali i limiti microbiologici?**

L'Unione europea ha adottato nel 2005 un regolamento – il n. 2073/2005 – in materia di criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari. Tale norma è stato oggetto di modifiche e altre ne subirà nel futuro, perché si tratta di una norma che, nelle premesse (considerandum 26) e nelle conclusioni (articolo 10), prevede un riesame periodico, «tenendo conto dei progressi della scienza, della tecnologia e della metodologia, dell'emergenza di microrganismi patogeni nei prodotti alimentari e delle informazioni ottenute in base alla valutazione dei rischi». Il regolamento e le sue successive modificazioni distinguono criteri di sicurezza alimentare, che definiscono l'accettabilità di un prodotto alimentare e si applicano ai prodotti immessi sul mercato, e criteri di igiene del processo, che misurano il funzionamento del sistema di produzione e non si applicano ai prodotti immessi sul mercato.

Altre norme europee hanno fissato requisiti in materia di controllo microbiologico dei prodotti

Potrebbero essere messi presto a disposizione del consumatore strumenti per poter verificare le caratteristiche microbiologiche di un alimento venduto in un supermercato

alimentari, per esempio il regolamento (CE) 2074/2005, che indica le condizioni per eseguire il test di stabilità nel latte UHT e in quello sterile, oltre ai metodi per la conta a 30 °C nel latte crudo.

La normativa UE prevede la coesistenza di norme nazionali, purché non in contrasto con la disciplina europea in materia di criteri microbiologici. Per esempio, risulta ancora vigente in Italia l'ordinanza ministeriale 7 dicembre 1993, che definisce i criteri per *Listeria monocytogenes* negli alimenti da consumarsi previa cottura, non considerati nel regolamento europeo, che





invece fissa i criteri per questo microrganismo negli alimenti pronti.

Altri criteri microbiologici, infine, possono essere contenuti in circolari e in norme regionali. Benché la circolare ministeriale sia all'ultimo posto nella gerarchia delle fonti del diritto, il criterio di igiene del processo riguardante *Staphylococcus aureus*, indicato nella circolare del Ministero della Sanità n. 32 del 3 agosto 1985, risulta ancora applicato per le paste alimentari.

• Come evolverà, secondo lei, questo settore?

Indubbiamente, l'esperienza acquisita durante la pandemia da SARS-CoV-2 ha evidenziato quanto sia importante poter assicurare costantemente una riserva sufficiente di alimenti sicuri. Per questo motivo, è prevedibile che alle tecnologie per la diagnostica microbiologica sia dato un nuovo impulso, sia nei laboratori di analisi sia nel

circuito distributivo. Infatti, i progressi raggiunti nel campo della sensoristica e in particolare nei biosensori e negli immunosensori potrebbero mettere presto a disposizione del consumatore strumenti per poter verificare le caratteristiche microbiologiche dell'alimento venduto nel supermercato, per esempio la presenza di microrganismi patogeni. Inoltre, sono già disponibili tecnologie avanzate per l'identificazione di microrganismi patogeni nell'aria confinata, per esempio mediante dispositivi fotonici o microfluidici, che, opportunamente progettati e validati, potrebbero svelare la presenza di un virus o batterio in uno stabilimento alimentare o in un supermercato.

Una caratteristica comune a queste tecnologie dell'immediato futuro è la generazione di una grande mole di dati – i cosiddetti *big data* – per analizzare i quali sarà necessario sviluppare nuovi algoritmi capaci di fornire un'interpretazione biologica.

Gli strumenti per semplificare il controllo di componenti e contaminanti negli alimenti

La qualità e la sicurezza nell'industria alimentare può essere garantita mediante il controllo analitico **chimico e microbiologico**. L'automazione dell'analisi consente di ridurre al minimo l'attività manuale e rappresenta, pertanto, la soluzione ideale per migliorare la gestione dei flussi di lavoro, la tracciabilità dei campioni, l'accuratezza e l'elaborazione dei dati analitici, semplificando tutte le procedure operative. R-Biopharm arricchisce e completa la sua proposta di strumenti per il controllo di alimenti e mangimi lungo l'intera filiera produttiva, dalle materie prime al prodotto finito.

Analizzatori enzimatici per il dosaggio di costituenti alimentari

iMagic M9: strumento multi-parametrico, testa in modo simultaneo più campioni (80-100 test/ora) e più parametri sullo stesso campione, riducendo di molto il costo per singola analisi. Campioni e reagenti vengono caricati dall'operatore su appositi carrelli, termostatati a temperatura di refrigerazione, in posizioni stabilite via software di gestione. Il sistema provvede al prelievo di reagenti e campioni, alla diluizione (qualora previsto dalla metodica) e alla dispensazione in cuvetta. Al termine dell'incubazione, il prodotto di reazione viene letto alla lunghezza d'onda programmata e l'assorbanza registrata viene espressa in concentrazione, previa calibrazione. È la soluzione ideale per aziende e laboratori interessati a gestire più tipologie di dosaggio: nel settore lattiero-caseario, ad esempio, non solo analisi di lattosio, ma anche di zuccheri semplici quali glucosio/fruttosio (per ottenere informazioni nutrizionali), acidi organici (acido L-lattico e acetico), urea, ammoniaca, colesterolo, nitrati. Per un laboratorio di servizio, l'analisi di tali parametri può essere estesa a tutto il comparto alimenti e bevande (carni e

derivati, uova e ovoidotti, prodotti da forno, succhi e conserve vegetali, pesce e crostacei, vino, birra).

RIDA®CUBE SCAN: strumento portatile mono-parametrico, fornisce risultati accurati in meno di 15 minuti. Utilizza cuvette di reazione dedicate che contengono reagenti liquidi e stabili già dosati per la reazione; l'operatore deve pipettare soltanto il campione nella cuvetta e lo strumento gestisce e completa tutte le operazioni fino al risultato. I reagenti pre-dispensati sono stabili fino alla scadenza indicata per il lotto di riferimento. Ciò ne consente un utilizzo razionale che ben si adatta alle diverse necessità di analisi, anche di piccole realtà produttive. La misura spettrofotometrica è realizzata mediante LED e un fotodiodo ed i dati di assorbanza sono elaborati contro una curva di calibrazione, valida per ogni specifico lotto, contenuta nella RFID card inclusa in ogni kit, per cui il sistema non va calibrato volta per volta ed è pronto a lavorare appena acceso.



RIDA®CUBE SCAN, strumento portatile mono-parametrico, fornisce risultati accurati in meno di 15 minuti

Strumenti per test ELISA per il dosaggio di micotossine, allergeni, OGM e antibiotici

Bolt: strumento automatico aperto per una micropiastra da 96 pozzi. Dopo avere caricato il campione, esegue in autonomia tutte le fasi dell'analisi immunoenzimatica, compresa la lettura ed il calcolo dei risultati. Compatto e facile da configurare.

ThunderBolt: strumento automatico aperto per due micropiastre da 96 pozzi. Compatto come il Bolt, con una maggiore flessibilità nella gestione di più parametri contemporaneamente. Il software intuitivo e flessibile è in grado di programmare un'ampia gamma di protocolli.

RIDA® ABSORBANCE 96: lettore di micropiastra ultracompatto, dotato di 4 LEDs a 4 diverse lunghezze d'onda (405, 450, 540 and 630 nm). In pochi secondi legge la micropiastra da 96 pozzi. Collegato al RIDASOFT® Win.NET, dispone di tutti i protocolli dei kit della serie RIDASCREEN®.



Il lettore di micropiastra RIDA® ABSORBANCE 96 in pochi secondi legge la micropiastra da 96 pozzi

Strumenti RT-PCR per l'analisi molecolare di allergeni, patogeni, OGM, identificazione di specie animale

Estrattore M8/4800: unico protocollo di lavoro per l'estrazione e la purificazione degli acidi nucleici (da 8 fino a 48 campioni). Lavora in associazione alle cartucce SureFast®Mag PREP

Food o Pathogens, capaci di estrarre DNA/RNA a partire da materie prime, prodotti alimentari finiti o terreni di pre-aricchimento con eccellenti rese estrattive. Lo strumento si presenta estremamente compatto, semplice da programmare ed utilizzare grazie ad un software integrato. Queste caratteristiche lo rendono ideale per qualsiasi routine di laboratorio, anche medio/bassa.

RIDA®CYCLER: termociclato, si caratterizza per le dimensioni ultracompatte, l'utilizzo dell'induzione magnetica per il controllo delle temperature e la lettura a LED della fluorescenza. Grazie al suo software integrato, in pochi e semplici passaggi, dopo aver caricato il campione nei tubi di reazione, si avvia l'analisi e si ottiene il risultato finale. Con la tecnologia Multiplex è possibile rilevare più parametri in un'unica analisi in meno di 3 ore.



Con il termociclato RIDA®CYCLER in pochi e semplici passaggi si avvia l'analisi e si ottiene il risultato finale

r-biopharm®



R-Biopharm Italia S.r.l.

Via Morandi, 10
20077 Melegnano (MI)
Tel. 02 98233330
Fax 02 9834100
info@r-biopharm.it
www.r-biopharm.com

> Un INDICE per produrre un FORMAGGIO migliore

L'Istituto interregionale per il miglioramento del patrimonio zootecnico (Intermizoo), in collaborazione con l'Università di Padova, ha brevettato Pro Caseus, un indice per misurare la qualità del latte partendo dai tori riproduttori. Nello specifico, Pro Caseus misura la capacità del toro di generare figlie in grado di produrre un latte che può essere trasformato in maniera più efficiente in formaggio. Un latte destinato ad essere trasformato in formaggio di alta qualità dovrebbe infatti coagulare entro un determinato range di minuti, correlati alla tipologia di formaggi che si stanno producendo, e formare rapidamente una cagliata con una consistenza idonea alle successive lavorazioni, mentre un latte con

un'attitudine casearia non ottimale, oltre ad avere una resa in formaggio inferiore, può influire sulla qualità finale del formaggio, sulla sua composizione, sull'incidenza di difetti e scarti, sul tempo e costo di trasformazione.

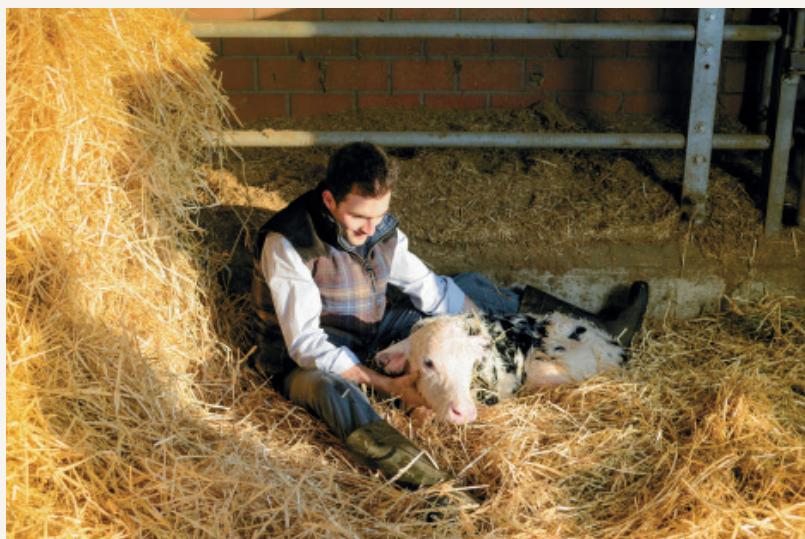
“Nel mondo, il 70% del latte viene trasformato in formaggio e l'Italia è tra i primi 10 Paesi produttori. Da qui la necessità di uscire dalle logiche che abbiamo seguito fino ad oggi. E Pro Caseus rappresenta un cambio di prospettiva. Con questo metodo innovativo il produttore, cioè l'allevatore, può finalmente pensare alla destinazione del latte: il formaggio”, ha spiegato Francesco Cobalchini, direttore generale di Intermizoo.

“Questo risultato – ha continuato Cobalchini – è il frutto di un grande lavoro di squadra

tra il mondo della ricerca, Intermizoo e le organizzazioni degli allevatori, iniziato nel 2007 con il primo progetto di lavoro denominato “BullAbility”, condotto in collaborazione con il Dipartimento DAFNAE dell'Università di Padova, per migliorare l'efficienza dell'intera filiera lattiero-casearia».

“L'indice Pro Caseus – ha aggiunto il professor Martino Cassandro, del Dipartimento DAFNAE dell'Università di Padova – rappresenta un prodotto della collaborazione tra Università di Padova e Intermizoo, a favore degli allevatori italiani. La genetica italiana dispone, oggi più di ieri, di uno strumento innovativo e di eccellenza, rivolto al miglioramento della caseificazione del latte vaccino, in grado di mantenere quella posizione di leadership casearia indiscussa e riconosciuta nel mondo al nostro Paese”. Per maggiori informazioni, www.procaserus.com

(Fonte: Intermizoo)





➤ Un PROGETTO per semplificare il processo di utilizzo di COZZE di provenienza comunitaria

"Valutazione delle modifiche chimico-nutrizionali e microbiotiche dei mitili di taglia commerciale trasferiti in zone di stabulazione diverse da quelle di allevamento": questo il titolo del progetto promosso dall'Associazione nazionale delle Aziende Ittiche (ASSOITTICA), in collaborazione con l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise, e finalizzato ad individuare parametri oggettivi per l'identificazione delle caratteristiche organolettiche delle cozze, prodotte in Italia con diversi gradi di mantenimento presso le acque nazionali. Le attività programmate sono inserite all'interno di un rapporto convenzionale condiviso tra i due partner di progetto da circa un anno.

Il regolamento (UE) 1379/2013, relativo all'organizzazione comune dei mercati nel settore dei prodotti della pesca e dell'acquacoltura, all'articolo 38, fornisce indicazioni precise sulla zona di cattura o produzione di prodotti di acquacoltura e individua un lasso di tempo pari a 6 mesi per l'origine dei molluschi bivalvi. Il Sistema Italia, senza le cozze spagnole o greche, non riesce ad oggi a soddisfare le richieste del mercato. Da qui la richiesta di ASSOITTICA agli esperti dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise per confrontare, nel tempo, lo stato di cozze importate e stabulate in acque italiane, con mitili autoctoni. Prevista una serie di attività nell'arco della durata complessiva del progetto (circa 18/24 mesi), in cui verranno indagati i possibili

effetti determinati dalla permanenza di mitili di provenienza extra-nazionale, in diversi luoghi/impianti di mitilicoltura nazionali. L'obiettivo è quello di porre in correlazione il fattore tempo di permanenza in acque nazionali, con un atteso adeguamento dei parametri chimico-nutrizionali e microbiotici tra i mitili di provenienza estera con quelli normalmente stabulati in acque nazionali. La complessità delle attività previste dal progetto ha comportato l'inserimento, nella compagine originale, dell'Università degli Studi di Teramo, con le Facoltà di Medicina Veterinaria e Bioscienze e Tecnologie agroalimentari e ambientali.

Il progetto prevede anche la creazione di un gruppo di esperti (Panel test) in grado di valutare le caratteristiche organolettiche del prodotto ittico "cozza", le sole "caratteristiche" che il consumatore è in grado e può verificare direttamente, giudicandole secondo i suoi gusti personali. Il Panel test avrà il compito di effettuare un'analisi sensoriale che si focalizzi sull'individuazione e la percezione di odori o sapori, in modo da garantire la qualità del mollusco.

"Uno studio – afferma il direttore generale dell'Istituto, Nicola D'Alterio – che, nel rispetto delle esigenze e della sicurezza del consumatore, tende a fornire agli imprenditori del settore strumenti utili a migliorare l'offerta produttiva e a garantire la continuità della disponibilità sul mercato".

(Fonte: IZS Abruzzo e Molise)