

ANALISI DI LABORATORIO

Identificazione e classificazione dei patogeni alimentari



Lo scorso novembre, la Direzione generale per l'Igiene e la Sicurezza degli alimenti e la Nutrizione del Ministero della Salute ha pubblicato la relazione sul Rapporto 2017 del Sistema di allerta rapido per alimenti e mangimi dell'Unione europea (Rasff).

"Nel 2017 – si legge nella relazione – sono state trasmesse, attraverso il Rasff, 3.759 notifiche, con un aumento del 28% rispetto al 2016".

E l'Italia è il primo Paese membro per numero di segnalazioni inviate alla Commissione europea, come già avviene da molti anni, con un totale di 548 notifiche, pari al 14,6%.

Tra i contaminanti microbiologici, un elevato numero di notifiche riguarda il riscontro di *Salmonella* (781 contro le 455, 507, 476, 482 segnalazioni dei quattro precedenti anni).

Per saperne di più su questo patogeno, abbiamo rivolto alcune domande ad Antonia Ricci, responsabile del Centro di riferimento nazionale e laboratorio di riferimento Oie per le salmonellosi presso l'Istituto zooprofilattico sperimentale delle Venezie (vedi le pagine 65-66).

Mentre alle pagine 70-74 troverete un approfondimento, curato dall'Istituto zooprofilattico sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale", sui metodi di analisi a disposizione per rilevare *Listeria monocytogenes*, un altro dei patogeni più segnalati nel Rapporto Rasff 2017.

E in apertura (vedi le pagine 56-60), l'avvocato Ingrid Riz fa il punto sulle norme che regolano il campionamento di matrici alimentari da parte dei controlli ufficiali e sulle garanzie di controllo e di difesa, di cui l'operatore del settore alimentare deve pretendere il rispetto.

56

PRELIEVO E ANALISI COME GARANZIA DEI DIRITTI DI DIFESA – Ingrid Riz

65

SALMONELLA. MISURE PER ARGINARLA, ANALISI E RICERCA – Emanuela Giorgi

70

LISTERIA. METODI DI ANALISI INNOVATIVI E TRADIZIONALI

Cristina Marfoggia, Marina Torresi, Vicdalia Aniela Acciari, Gabriella Centorotola, Francesco Pomilio

Prelievo e analisi come garanzia dei diritti di difesa

Breve ricognizione dello stato di fatto e di diritto

di Ingrid Riz

Avvocato ed Esperta di Legislazione degli Alimenti

56

L'operatore del settore alimentare che si trovi ad affrontare un campionamento deve conoscere la corretta procedura che le autorità devono seguire e pretendere il rispetto delle garanzie di controllo e difesa

L'analisi dei prodotti alimentari costituisce il segmento cardine dei controlli atti a garantire igiene e salubrità degli alimenti e delle bevande, inserendosi nel più ampio alveo della sicurezza alimentare e delle relative corpose disposizioni, tutte indirizzate a prevenire i rischi per la salute pubblica, a tutelare i consumatori e, sotto aspetto parzialmente diverso, a salvaguardare la lealtà commerciale.

La normativa che governa il vasto ambito della sicurezza alimentare è oggi di respiro comunitario, altamente armonizzata, improntata al principio della collaborazione dell'operatore del settore alimentare, ma altresì alla sistematica e programmata verifica del rispetto delle condizioni di sicurezza degli ali-

menti "dalla terra alla tavola", al fine di individuare, monitorare, gestire i rischi e, se necessario, reprimere le violazioni.

Va da sé che il controllo di sicurezza si effettua lungo l'intera filiera produttiva, investe tutti i prodotti ed additivi alimentari (oltre ai materiali che possono entrare a contatto con gli alimenti) e si articola secondo accertamenti diversificati che comprendono ispezioni, campionamenti, analisi e sopralluoghi che possono sfociare in sanzioni di natura amministrativa o penale.

Il punto focale dell'attività di controllo, per le sue peculiarità tecniche, per le modalità proceduralizzate, per le conseguenze potenziali che le caratterizzano, è sicuramente l'analisi dei campioni.

Autorità e uffici competenti

L'attività di campionamento è riservata a soggetti competenti e professionalmente investiti di questo compito. In Italia il ruolo di tutela della sicurezza alimentare è affidato principalmente al Ministero della Salute, a livello centrale attraverso la Direzione generale per l'Igiene e la Sicurezza degli alimenti e la Nutrizione e a livello territoriale attraverso Uffici di Sanità marittima, aerea e di frontiera (Usmaf), Posti di Ispezione frontaliere (Pif) e Uffici Veterinari per gli Adempimenti comunitari (Uvac). A livello analitico il Ministero si avvale dell'Istituto superiore

di Sanità, riferimento nazionale per le analisi di seconda istanza.

Sul piano dei controlli sono operativi, a livello nazionale e con articolazioni territoriali, i Nuclei Anti Soffisticazioni (Nas) dei Carabinieri che, come tali, possono intervenire ovunque si producano, somministrino, depositino o vendano prodotti alimentari. Competenze ispettive e sanzionatorie settoriali sono attribuite anche a Guardia di Finanza, Corpo Forestale dello Stato e Polizia municipale.

A livello territoriale operano poi le Regioni e Province autonome, che si avvalgono per gli accertamenti analitici dell'Agenzia regionale per la Protezione dell'Ambiente (Arpa) e dell'Istituto zooprofilattico sperimentale (Izs) di riferimento.

Le Asl, a loro volta, si strutturano in Servizi di Igiene degli Alimenti e della Nutrizione (Sian) per il controllo della qualità, salubrità e sicurezza degli alimenti, e Servizi Veterinari per l'aspetto igienico-sanitario degli alimenti di origine animale.

Competenze centralizzate anche per il Ministero delle Politiche agricole alimentari, forestali e del turismo, che opera attraverso il proprio Dipartimento dell'Ispettorato centrale della Tutela della qualità e Repressione frodi dei prodotti agroalimentari (Icqr), con 29 uffici sul territorio e 6 laboratori per indagini analitiche soprattutto di natura merceologica. Infine, competenze di verifica spettano ad Agecontrol circa il rispetto delle norme di commercializzazione degli ortofrutticoli freschi.

Il quadro normativo

Nonostante l'armonizzazione comunitaria, la normativa dedicata al segmento analitico è ancora farraginoso. Le regole di gestione del prelievo e dell'analisi si diversificano in base alla tipologia di campione, alla matrice di riferimento, al segmento commerciale di prelevamento, alla tipologia di indagine in corso (amministrativa o penale), con problemi trasversali successivi di interazione delle precedenti opzioni.

Il "Pacchetto Igiene" si è occupato direttamente dei controlli ufficiali, in particolare con i regolamenti 854/2004 e 882/2004, il cui articolo 2 definisce "campionamento per l'analisi" «il prelievo di un mangime o di un alimento oppure di una qualsiasi altra sostanza (anche proveniente dall'ambiente) necessaria alla loro produzione, trasformazione e

distribuzione o che interessa la salute degli animali, per verificare, mediante analisi, la conformità alla normativa in materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute degli animali».

Senza addentrarsi nelle regole tecniche di campionamento specifiche per categorie particolari di alimenti, il punto di riferimento nazionale per le analisi su matrici alimentari è dato ancora dalla legge 30 aprile 1962, n. 283 e dal decreto legislativo 6 novembre 1993, n. 193 (abrogato dal decreto legislativo 193/2007 che, in attuazione della direttiva 2004/41/CE, ha adeguato l'assetto normativo interno alle abrogazioni delle direttive comunitarie superate dal Pacchetto Igiene, con le uniche eccezioni dell'articolo 2, comma 3, e dell'articolo 4, entrambi dedicati ai prelievi ed alle analisi).

La prima normativa è il testo di riferimento per la regolamentazione della disciplina igienica delle produzioni alimentari, che ha superato indenne la stagione della comunitarizzazione della disciplina dell'igiene alimentare, sfuggita alle depenalizzazioni nazionali (nonostante qualche pronuncia di merito che costituisce più nota di folklore che di diritto, infatti, l'articolo 5 della legge è ancora penalmente sanzionato dal successivo articolo 6), e che, ancora prima, ha dato origine alla disciplina specifica per le analisi microbiologiche sui prodotti alimentari deteriorabili, nata sulla scorta della declaratoria di illegittimità costituzionale dell'articolo 1 (sentenza della Corte Costituzionale del 10 ottobre 1990, n. 434). Secondo l'articolo 1 della legge 283/62, l'autorità sanitaria può procedere in qualunque momento ad ispezione e prelievo di campioni, rimettendo le relative analisi ai laboratori autorizzati.

Quale regola generale, in ipotesi di non conformità, l'esito analitico deve essere comunicato all'esercente ove è stato fatto il prelievo e al produttore se trattasi di prodotti in confezioni originali, al fine di consentire ai predetti interessati di richiedere, entro 15 giorni dal ricevimento della raccomandata che avvisa della non conformità, la revisione di analisi. La revisione, da presentarsi in bollo all'autorità competente, verrà effettuata presso l'Istituto superiore di Sanità entro due mesi, termine che pare francamente ordinatorio e non perentorio.

Le regole tecniche di attuazione della legge 283/62 sono contenute nel regolamento di attuazione (decreto del Presidente della Repubblica 327/1980), dal quale si evincono le specifiche procedure di redazione del verbale di prelievo e

di formazione dei campioni. L'organo prelevatore dovrà formare un campione rappresentativo della merce prelevata, differenziandolo in base alla matrice prelevata: il campione deve essere costituito da 5 aliquote equivalenti, ognuna posta in busta chiusa e sigillata, contrassegnata dalle indicazioni relative a ufficio prelevatore, data del prelievo, natura della merce prelevata, numero del verbale e sottoscrizione del prelevatore e del responsabile dell'esercizio ove il prelievo avviene o suo rappresentante.

Il verbale va redatto in 4 esemplari, tre dei quali seguiranno la merce al laboratorio per l'analisi, mentre il quarto verrà rilasciato all'interessato o suo rappresentante. Una quinta copia del verbale verrà redatta e spedita al produttore in caso di prelievo di prodotti preconfezionati. A sua volta, il laboratorio trattiene una copia del verbale ritrasmettendo i restanti esemplari all'organo che ha richiesto l'analisi. Oltre ad una copia del verbale, l'interessato ha diritto di ricevere altresì un'aliquota del campione prelevato, al fine di destinarlo autonomamente ad analisi, se lo ritiene opportuno, mentre le restanti aliquote seguono il verbale di prelevamento verso il laboratorio designato.

Ripartizione delle aliquote e analisi garantite

Una volta effettuato il campionamento e redatto il verbale seguendo le citate regole procedurali, una delle aliquote prelevate viene utilizzata per l'analisi di prima istanza (in caso di prodotti preconfezionati una aliquota sarà a disposizione del produttore presso il laboratorio per 60 giorni), una seconda è destinata all'eventuale analisi di seconda istanza o di revisione e l'ultima è a disposizione dell'autorità giudiziaria per eventuali perizie che dovessero essere disposte sul prodotto. Il rispetto delle corrette modalità di gestione del prelievo e dell'analisi rileva in sé, ma soprattutto per le conseguenze che questi possono avere nella ipotesi di riscontrata non conformità del campione.

Come confermato dal già citato regolamento 882/04, all'articolo 11, «le autorità competenti fissano procedure adeguate atte a garantire il diritto degli operatori del settore dei mangimi e degli alimenti i cui prodotti sono oggetto di campionamento e di analisi di chiedere un ulteriore pare-

re di esperti, fatto salvo l'obbligo delle autorità competenti di intervenire rapidamente in caso di emergenza.

In particolare, esse vigilano affinché gli operatori del settore dei mangimi e degli alimenti possano ottenere un numero sufficiente di campioni per un ulteriore parere di esperti, a meno che ciò sia impossibile nel caso di prodotti altamente deperibili o dello scarsissimo quantitativo di substrato disponibile»: diritto irrinunciabile dell'operatore del settore che subisca un prelievo con esito non conforme è infatti quello di poter replicare l'analisi in contraddittorio, avvalendosi eventualmente di un tecnico esperto. In quest'ottica, ben si comprende come le analisi di seconda istanza siano la garanzia prima dell'operatore che, pertanto, attivando la procedura di revisione, può far riesaminare in contraddittorio una seconda aliquota campionata.

Già qui emerge la fondamentale rilevanza della rappresentatività di un campione: l'operatore dovrà avere una particolare attenzione al rispetto delle regole di prelievo soprattutto per prodotti "difficili" o ricerche delicate. Esempio tipico della delicatezza della fase di campionamento, che ovviamente si ripercuote nella successiva fase analitica, è la ricerca delle micotossine nelle granaglie o nei semi. Partendo dal noto dato della dislocazione disomogenea (cosiddetta "a macchia di leopardo") delle muffe nelle matrici, è essenziale in primo luogo che il campionamento consenta di creare una rappresentatività reale dello stato di fatto della merce con tecniche di prelievo adeguate; il problema si pone, ad esempio, per granaglie insilate, ove è necessario prelevare un campione omogeneo di prodotto costituente una massa, caratterizzato da condizioni diversificate di umidità, temperatura e simili presenti nei silos, effettuando il prelievo a diverse profondità per poter ragguagliare ufficialmente sullo stato dell'alimento e garantire l'operatore sulla correttezza del campionamento. L'operatore che individui un'irregolare campionatura della matrice potrà avvalersene in sede processuale per inficiare la rilevanza probatoria dell'esito analitico.

Normativa ad hoc, infine, per i prelievi e le analisi di alimenti deperibili destinati ad analisi microbiologiche: l'articolo 4 del decreto legislativo 123/93 regola le ipotesi in cui non esiste la possibilità, per la ristretta durabilità del campione e la deteriorabilità dello stesso o degradazione dell'eventuale parametro ricercato, di procedere ad una pri-

ma analisi e ad una eventuale revisione. Per questa ragione, per una gamma predeterminata di alimenti (decreto ministeriale del 16 dicembre 1993), qualora il laboratorio riscontri la non conformità di un parametro ne dà avviso all'interessato specificando la non conformità riscontrata, la metodica seguita e la data ove l'analisi verrà ripetuta. Anche in tal caso, va accantonata una aliquota per eventuali perizie dell'autorità giudiziaria. In questo modo, attraverso una ripetizione di analisi, si è tentato di garantire un contraddittorio alla parte. Questa forma di partecipazione, sebbene più ristretta della vera e propria revisione di analisi, ha sollevato molte critiche soprattutto per la disparità del trattamento rispetto a parametri chimici di indagine, dal momento che i tempi ristretti e l'assenza di previsione della nomina di un difensore di fiducia limano i confini della piena esplicazione della difesa. Sul punto, la Suprema Corte ha tuttavia precisato che la mera deperibilità del campione non è di per sé sufficiente per omettere la revisione di analisi ed optare per la ripetizione laddove il parametro di ricerca sia di natura chimica e pertanto revisionabile avanti all'Istituto superiore di Sanità (Cassazione penale, Sezione III, sentenza del 20 novembre 2002, n. 1068 in materia di ortofrutti-coli freschi sui quali ricercare parametri chimici).

La rilevanza processuale dell'analisi

L'aspetto probabilmente più delicato connesso al rispetto delle procedure di prelevamento ed analisi si evidenzia quando dalle analisi emergono non conformità di rilievo penalistico e non solo amministrativo. Traendo le conseguenze logiche ancora prima che giuridiche di quanto sopra detto, va da sé che l'analisi di prima istanza non conforme non dovrebbe essere oggetto di segnalazione all'autorità giudiziaria (con l'unica eccezione normativamente determinata dall'articolo 1 della legge 283/62 in caso di frode tossica dannosa alla salute), alla quale va trasmessa solamente l'analisi di revisione che confermi la non conformità, mentre in ipotesi di revisione regolamentare la pratica dovrebbe essere archiviata senza interessamento delle Procure.

In ipotesi di imputazione penale, l'esito analitico di revisione fornisce la massima garanzia all'imputato ed entra di diritto nel fascicolo dibattimentale, es-

sendo caratterizzata da garanzie di difesa, quali la possibile nomina già in tale sede di un consulente tecnico e/o un difensore di fiducia. È pertanto scorretto consentire l'ingresso nel processo di un'analisi non conforme di prima istanza, anche se confermata in revisione.

Trattasi pur sempre, peraltro, di procedura amministrativa che filtra nel processo penale.

Per l'ipotesi in cui gli accertamenti, anche sugli alimenti, siano effettuati dal giudice in corso di procedimento, esistono le regole specifiche dell'articolo 220 delle disposizioni attuative del codice di procedura penale: «Quando nel corso di attività ispettive o di vigilanza previste da leggi o decreti emergono indizi di reato, gli atti necessari per assicurare le fonti di prova e raccogliere quant'altro possa servire per l'applicazione della legge penale sono compiuti con l'osservanza delle disposizioni del codice».

Sul punto la giurisprudenza si è espressa anche di recente distinguendo le due aree di garanzia amministrativa con le regole dell'articolo 223 e penale con il riferimento all'articolo 220 disposizioni attuative del codice di procedura penale: «In tema di prelievi di campioni finalizzati all'espletamento di analisi, occorre distinguere tra prelievo inerente ad attività di polizia giudiziaria nell'ambito di un'indagine preliminare ex articolo 220 delle disposizioni attuative del codice di procedura penale, per il quale operano in via genetica le norme di garanzia della difesa previste dal codice di rito, e prelievo inerente ad attività amministrativa ex articolo 223 delle disposizioni attuative del codice di procedura penale, per il quale, invece, i diritti della difesa devono essere assicurati solo ove emergano indizi di reato, giacché in tal caso l'attività amministrativa non può più definirsi *"extra-processum"* (Cassazione penale, Sezione II, sentenza del 24 novembre 2016, n. 52793 e altre).

Un ultimo accenno all'ipotesi del "campione unico" ovvero il campione che viene di regola acquisito su consegna di un consumatore e che si caratterizza per non essere stato oggetto di prelevamento secondo le regole del campionamento ufficiale. Sebbene non manchino ipotesi di procedimenti penali instaurati e proseguiti su campioni aperti, va da sé che difettano le garanzie difensive e che per poter dare rilevanza probatoria al campione difforme sarebbe necessario effettuare un campionamento ufficiale sul medesimo prodotto e, possibilmente, sul medesimo lotto incriminato.

Salmonella

Misure per arginarla, analisi e ricerca

Nell'UE è la prima causa di episodi di tossinfezione alimentare

di *Emanuela Giorgi*

Coordinatrice redazionale

Intervista ad Antonia Ricci, responsabile del Centro di riferimento nazionale Oie per le salmonellosi

Lo scorso novembre, la Direzione generale per l'Igiene e la Sicurezza degli alimenti e la Nutrizione del Ministero della Salute ha pubblicato la relazione sul Rapporto 2017 del Sistema di allerta rapido per alimenti e mangimi dell'Unione europea (Rasff).

Nel 2017 sono state trasmesse, attraverso il Rasff, 3.759 notifiche, con un aumento del 28% rispetto al 2016, e l'Italia è il primo Paese membro per numero di segnalazioni inviate alla Commissione europea, come già avviene da molti anni, con un totale di 548 notifiche, pari al 14,6%.

Tra i contaminanti microbiologici, un elevato numero di notifiche riguarda il riscontro di *Salmonella* (781 contro le 455, 507, 476, 482 segnalazioni dei quattro precedenti anni).

Per saperne di più su questo patogeno, sulle misure da attuare per ridurre la presenza e le tecniche analitiche più performanti per rilevarlo, abbiamo rivolto alcune domande ad Antonia Ricci, responsabile del Centro di riferimento

nazionale e laboratorio di riferimento OIE per le salmonellosi presso l'Istituto zooprofilattico sperimentale delle Venezie.

• **Secondo il Rapporto Rasff 2017, *Salmonella* è il patogeno più frequentemente riportato nelle notifiche di allerta. Come si spiega questo dato?**

Salmonella in Europa è la prima causa di episodi di tossinfezione alimentare, mentre *Campylobacter* è il primo microrganismo per quanto riguarda il numero di casi, essendo più frequentemente implicato in episodi singoli, sporadici, più che in epidemie che coinvolgono più persone. *Salmonella* è quindi un patogeno che si isola frequentemente in alimenti di diverso tipo, sia di origine animale che di origine vegetale, ed è quindi normale che sia spesso oggetto di allerta nel Sistema Rasff.

• **Quali azioni dovrebbero essere attuate a livello europeo per ridurre la presenza di *Salmonella* nei prodotti alimentari?**

Il controllo delle *Salmonelle* dev'essere attuato a livello di produzione primaria, quindi negli allevamenti, attraverso l'applicazione di rigide misure di biosicurezza, controllo dei mangimi e dell'acqua di abbeverata, pulizia e

disinfezione pre-accasamento, utilizzo di vaccini.

Negli avicoli (polli e tacchini) in Europa vengono attuati rigorosi piani di controllo, che riguardano tutte le fasi della produzione, partendo dai riproduttori per arrivare agli allevamenti destinati alla produzione di uova e di carne. In conseguenza di queste efficaci misure di controllo, il numero di casi di salmonellosi umana correlati al consumo di prodotti avicoli (uova o carne) è drasticamente diminuito ed in proporzione sono aumentati i casi correlati al consumo di prodotti a base di carne suina. Risulta quindi indispensabile, oggi, applicare misure di controllo anche alla filiera suinicola, ma purtroppo non esiste una normativa che, analogamente a quanto accade negli avicoli, le renda obbligatorie.



Antonia Ricci, responsabile del Centro di riferimento nazionale e laboratorio di riferimento Oie per le salmonellosi.

torio di riferimento Oie per le salmonellosi sta mettendo a punto nuove tecniche di analisi?

Stiamo lavorando sulla messa a punto di una metodica quantitativa estremamente sensibile, utilizzando la tecnologia *Digital Droplet PCR* (ddPCR). Si tratta di un metodo di PCR digitale basato su una tecnologia di produzione di gocce (*droplet*) in un'emulsione acqua-olio. Il campione viene frazionato in 20.000 goccioline, e l'amplificazione avviene in ogni goccia. Un'elaborazione basata sulla statistica di Poisson considera le *droplet* positive e quelle negative, e fornisce una quantificazione assoluta del target, in questo caso *Salmonella*. Si tratta di una

tecnica estremamente promettente sia per gli aspetti di elevata sensibilità, senza dover ricorrere all'arricchimento, che di possibilità di quantificazione delle *Salmonelle* nei campioni alimentari.

• Quali sono le tecniche di analisi più performanti?

In questo momento, direi quelle basate sulla PCR, ma ricordiamoci che i metodi tradizionali sono tutt'ora estremamente affidabili e sensibili.

• Quali sono i filoni di ricerca su cui sta lavorando Il Centro di riferimento nazionale e laboratorio di riferimento Oie per le salmonellosi?

Stiamo lavorando molto sulle metodiche di sequenziamento di nuova generazione (*Whole Genome Sequencing*, WGS), che permettono attraverso un'unica analisi di ottenere diversi tipi di informazioni, quali l'appartenenza ad un sierotipo, il grado di correlazione con altri ceppi, la presenza di geni di virulenza, la presenza di determinanti genetici di resistenza agli antibiotici e ai disinfettanti. Queste tecniche stanno rapidamente sostituendo le metodiche di tipizzazione tradizionale, quali la sierotipizzazione, la PFGE e l'antibiogramma.

• Quali azioni, invece, dovrebbero essere attuate a livello nazionale?

In Italia, ancor più che nel resto di Europa, i prodotti di origine suina hanno un ruolo determinante nel causare infezioni da *Salmonella* e quindi le misure di controllo dovrebbero essere applicate rigorosamente anche in questo settore.

• Quali sono le tecniche di analisi più innovative per rilevare *Salmonella* nei prodotti alimentari?

Sono sempre più diffusi nei laboratori che effettuano analisi sugli alimenti i metodi basati sulla *Real Time PCR*, che permettono di eseguire una diagnosi rapida e caratterizzata da ottimi livelli di sensibilità. L'utilizzo della *Real Time* consente di escludere nel giro di 24-48 ore la presenza di *Salmonella*, mentre per confermare i campioni positivi è sempre opportuno proseguire l'analisi con il metodo tradizionale, basato sulla ISO 6579.

• Il Centro di riferimento nazionale e labora-

Listeria

Metodi di analisi innovativi e tradizionali

Caratteristiche, pro e contro delle tecniche principali

di Cristina Marfoggia, Marina Torresi, Vicdalia Aniela Acciari, Gabriella Centorotola, Francesco Pomilio¹

Istituto zooprofilattico sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale"

Negli ultimi anni i ricercatori hanno segnalato diverse criticità relative alle prestazioni dei metodi di laboratorio attualmente in uso per ricercare *Listeria* spp. e *L. monocytogenes*. L'obiettivo dei prossimi anni? Migliorare le prestazioni dei metodi attualmente in uso, anche mediante il ricorso alle nuove tecnologie basate sul sequenziamento del genoma

Listeria *monocytogenes* (di seguito, *L. monocytogenes*) è un batterio ubiquitario in grado di causare malattia nell'uomo e negli animali, determinata dall'assunzione di alimenti contaminati (Efsa, 2017).

Al fine di garantire la sicurezza del consumatore, sono stati stabiliti dei criteri microbiologici di sicurezza alimentare nel regolamento (CE) 2073/2005, relativi al contenuto massimo di *L. monocytogenes* negli alimenti pronti al consumo destinati all'uomo. In tale provvedimento sono stati indicati anche i metodi di laboratorio di riferimento utilizzabili per la ricerca e la conta di *L. monocytogenes*, descritti nelle due norme ISO 11290-1:2017 (ISO, 2017a) e ISO 11290-2:2017 (ISO, 2017b), di recente modificate; è in corso l'emendamento del regolamento.

Nel caso in cui si preferisse utilizzare metodi diversi (ad esempio, AFNOR o AOAC), gli stessi devono aver subito un processo di validazione in conformità alle norme della serie ISO 16140 (ISO, 2016). I metodi di laboratorio sono utilizzati, come già detto, per la ricerca o la conta di *Listeria* spp e *L. monocytogenes* in una determinata quantità di alimento, campione ambientale o materiale patologico conferito al laboratorio. Altri metodi consentono la caratterizzazione fenotipica, immunologica o molecolare dei batteri e permettono di confermare l'appartenenza dei batteri isolati alla specie *L. monocytogenes* e a un sottogruppo della specie stessa (ad esempio, sierotipo, sierogruppo

¹ L'articolo è stato redatto con il contributo del personale operante presso il Laboratorio nazionale di riferimento per *Listeria monocytogenes*.

mediante PCR, pulsotipo, *Clonal Complex*). Questi ultimi metodi consentono di identificare i sottotipi della specie batterica correlati con focolai di malattia nell'uomo e negli animali.

Al fine di rendere l'analisi più rapida, negli ultimi 15 anni sono stati messi a punto metodi di analisi che prevedono una prima fase di arricchimento del campione da esaminare in brodo di coltura, seguita da una prova di PCR, che permette di individuare la presenza di acido nucleico appartenente alle specie del genere *Listeria* spp e a *L. monocytogenes*. In caso di risultato positivo, viene effettuato l'isolamento delle colonie su piastra.

Il sequenziamento dell'intero genoma è un metodo di analisi introdotto di recente nei laboratori al fine di confermare l'appartenenza alla specie ed effettuare la caratterizzazione di *L. monocytogenes*, mediante l'identificazione di tutti i nucleotidi del genoma batterico.

Una lista dei metodi che sono stati validati per i più comuni patogeni alimentari (*Foodborne Pathogen Test Kits Validated by Independent Organizations*), inclusi *Listeria* spp. e *L. monocytogenes*, è stata pubblicata da Usda Fsis, ossia il *Food Safety and Inspection Service*, un'agenzia del Dipartimento dell'Agricoltura statunitense. Di recente, Chen et al. (2017) hanno pubblicato un lavoro scientifico con i metodi di laboratorio utilizzati per la ricerca, la conferma e la caratterizzazione di batteri del genere *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* con un'ampia descrizione degli stessi. Una descrizione dei metodi di caratterizzazione di *L. monocytogenes* e dei relativi pro e contro è riportata anche nei documenti pubblicati dall'Autorità europea per la Sicurezza alimentare (Efsa) nel 2013 e nel 2014 (Efsa, 2013; Efsa, 2014).

Ricerca e numerazione mediante coltura in piastra o metodi misti

I metodi di ricerca e di conta di *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* mediante la coltura in piastra prevedono fasi di arricchimento in terreni liquidi selettivi e, successivamente, una fase di isolamento in piastra (ad esempio, ISO11290-1 e ISO11290-2). Nel caso di campioni biologici provenienti da soggetti (animali o uomo) ammalati, si può utilizzare anche l'isolamento diretto su piastra, eseguito parallelamente alle fasi di arricchimento (metodi de-

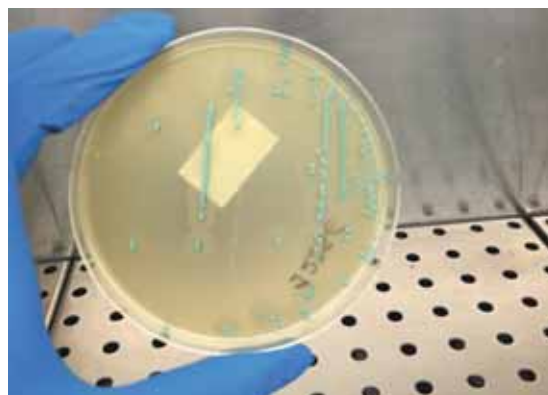


Figura 1 – Colonie di *Listeria monocytogenes* su terreno solido ALOA (foto Izsam).

scritti nel manuale Oie) (Oie, 2014).

Nella legislazione in vigore nell'Unione europea in tema di sicurezza alimentare (regolamento (CE) 2073/2005 e successive modifiche e integrazioni) sono riportate le norme della serie ISO 11290 quali metodi di riferimento per la ricerca e la numerazione di *Listeria* spp e *L. monocytogenes* sia in campioni di alimenti sia in tamponi ambientali.

Le norme in vigore permettono l'uso di altri metodi validati, come quello elaborato dall'ente governativo Usa Fsis: "*Isolation and Identification of Listeria monocytogenes from Red Meat, Poultry, Ready-To-Eat Siluriformes (Fish) and Egg Products, and Environmental Samples*" (Usda Fsis MLG 8.10, 2017). Questo metodo deve essere utilizzato dai laboratori che analizzano alimenti e campioni ambientali prelevati in aziende autorizzate all'export verso gli Usa.

Altri metodi di analisi che sono meno utilizzati in Italia sono pubblicati su manuali, ad esempio il metodo dell'*Association of Official Analytical Chemists International Official Standard* (Aoac) sul *Bacteriological Analytical Manual* (Bam) sviluppato dalla Food and Drug Administration statunitense (U.S. Fda) o in rete (ad esempio, quelli inclusi nel *Laboratory Procedures for the Microbiological Analysis of Foods*, elaborato da Health Canada, l'agenzia canadese che si occupa della tutela della salute pubblica).

Molti laboratori utilizzano metodi misti, che prevedono una prima fase di arricchimento del materiale da esaminare in un brodo nutritivo e selettivo, ad esempio conforme alla norma ISO 11290-1, seguito da una prova di PCR specifica per *L. monocytogenes*. In caso di risultato negativo, detto

metodo permette di refertare la prova rapidamente e liberare le merci o spedirle. In alternativa alla PCR, sia essa classica o *Real Time*, dopo l'arricchimento in brodo possono essere utilizzati altri metodi di analisi (ad esempio, quello immunoenzimatico, detto ELFA, che fornisce il risultato nel giro di 70 minuti o con PCR isoterma, detta LAMP). In caso di risultato positivo delle prove di PCR o ELFA, è necessario proseguire con l'isolamento in piastra dei batteri.

Prove di conferma di specie e di caratterizzazione mediante metodi chimico-fisici, immunologici e molecolari

Dopo aver ottenuto le colonie su terreni di coltura solidi, bisogna sottoporle a prove di conferma di specie e di caratterizzazione di *L. monocytogenes* al fine di completare l'iter analitico e fornire il giudizio di conformità dell'alimento rispetto alla legislazione in vigore. In questo caso, possono essere utilizzati metodi che sono riconducibili essenzialmente a 3 tipologie: chimico-fisica, immunologica e molecolare.

I metodi chimico-fisici sono stati introdotti alcune decine di anni fa e, nel corso degli ultimi anni, hanno avuto un'evoluzione elevata. Tali metodi consentono in genere di confermare l'appartenenza di un isolato alla specie *L. monocytogenes* o a una delle altre specie del genere *Listeria* spp., permettono di evidenziare caratteristiche dei batteri (ad esempio, utilizzo di zuccheri, mobilità) e sono di utilizzo routinario in laboratorio. In commercio sono disponibili kit o gallerie idonei allo scopo. Metodi simili, essendo stati industrializzati, permettono di eseguire le prove di identificazione con strumenti complessi.

Di recente, al fine di migliorare i metodi per la conferma di specie, sono state messe a punto apparecchiature che utilizzano la tecnologia MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionisation - Time Of Flight*). I costi relativi all'acquisto delle apparecchiature per eseguire le prove sono elevati, ma la qualità dei dati ottenuti è superiore rispetto agli altri metodi di laboratorio; inoltre, il numero dei batteri che possono essere identificati in una singola sessione di lavoro è alto.

Il metodo immunologico di sierotipizzazione è sta-

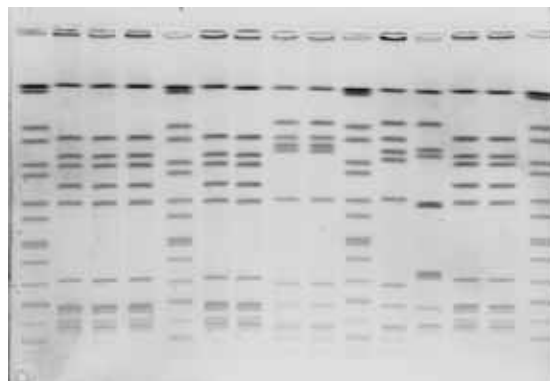


Figura 2 – Corsa elettroforetica di ceppi di *Listeria monocytogenes* caratterizzati con PFGE, enzima di restrizione *Ascl* (foto Izsam).

to utilizzato per circa 20 anni e ha rappresentato un inizio di caratterizzazione dei ceppi di *L. monocytogenes* nel caso di studi epidemiologici e di epidemie. Più di recente, sono stati introdotti diversi metodi molecolari basati sull'identificazione di sequenze di DNA presenti nel genoma batterico, quali la PCR per la determinazione del sierogruppo, alcuni dei quali sono superati.

Alla fine del XX secolo è stato messo a punto il metodo di *Pulsed Field Gel Electrophoresis* (PFGE), che permette di ottenere un'immagine dell'intero genoma batterico: tale metodo ha rappresentato il *gold standard* della caratterizzazione dei ceppi di *L. monocytogenes* ed è ancora oggi utilizzato nel corso delle indagini epidemiologiche e per studi di sorveglianza in quanto validato e accreditato in molti laboratori di analisi microbiologica.

Il sequenziamento del genoma

Negli ultimi anni è avvenuta una vera svolta in laboratorio; infatti, sono stati messi a punto metodi di sequenziamento genico (*Multi Locus Sequence Typing*, MLST) e, successivamente, genomico di *L. monocytogenes*.

Le tecniche di sequenziamento dell'intero genoma hanno soppiantato, nel giro degli ultimi 5-6 anni, quasi tutte le altre tecniche di caratterizzazione molecolare di *L. monocytogenes*. Citiamo, in particolare, il metodo *Next Generation Sequencing* (NGS), che oggi consente ai laboratori di ottenere in pochi giorni di lavoro (3-4) e a costi relativamente conte-

nuti (inferiori a 100 euro per determinazione) l'intera sequenza genomica dei ceppi di *L. monocytogenes* isolati nei campioni esaminati.

Il sequenziamento dell'intero genoma permette di reperire informazioni che 10 anni fa rappresentavano un obiettivo irraggiungibile per tutti gli operatori del settore sanitario e costituisce, oggi, un enorme passo in avanti per lo studio e il controllo della circolazione di ceppi di *L. monocytogenes*. In Italia molti laboratori dispongono delle apparecchiature e sono oggi in grado di effettuare le prove di sequenziamento.

Un'applicazione delle tecniche di sequenziamento dell'intero genoma è la metagenomica "*shot-gun*", che consente di identificare la presenza del genoma di una comunità di batteri e in particolare di *L. monocytogenes* nel campione esaminato. Ad oggi, questo metodo è ancora in fase sperimentale e non è utilizzato routinariamente per la ricerca di *Listeria* spp. e *L. monocytogenes* negli alimenti e nei campioni ambientali.

La caratterizzazione di *L. monocytogenes* mediante NGS permette di fornire dati nel corso di indagini di tossinfezioni alimentari, di monitorare in maniera semplice la circolazione dei vari ceppi batterici nel territorio di interesse. Naturalmente, al fine di eseguire in maniera corretta un'indagine in corso di tossinfezione alimentare, è necessario che gli studi epidemiologici condotti confermino il legame tra l'alimento contaminato e il paziente colpito dalla malattia.

I dati genomici sono di primaria importanza nello studio dell'antibiotico-resistenza da parte dei batteri, che oggi costituisce un problema di interesse mondiale per la salvaguardia della salute umana. Altre apparecchiature in grado di eseguire il sequenziamento dell'intero genoma sono portatili e in grado di svolgere le attività in campo.

Conclusioni

Al fine di definire quali metodi debbano essere utilizzati in laboratorio, bisogna conoscere le esigenze del richiedente della prova, per poi scegliere il metodo o i metodi che meglio soddisfano le richieste. Alcuni pro e contro relativi ai metodi descritti nel presente lavoro sono stati riportati nella *Tabella 1*, pubblicata a pagina 74.

Negli ultimi anni i ricercatori hanno segnalato diverse criticità relative alle prestazioni dei metodi di laboratorio attualmente in uso per la ricerca di *Listeria* spp. e *L. monocytogenes*, che si riassumono in un dubbio: "I metodi in uso sono in grado di rilevare tutti i ceppi circolanti di *L. monocytogenes*?".

L'obiettivo dei prossimi anni è quindi migliorare le prestazioni dei metodi di analisi attualmente in uso, anche mediante il ricorso alle nuove tecnologie basate sul sequenziamento del genoma.

Sarà quindi necessario un investimento finanziario per le attrezzature e, soprattutto, per il miglioramento delle competenze del personale addetto all'esecuzione delle prove e all'elaborazione dei dati ottenuti con il sequenziamento.

In ambito epidemiologico, bisogna segnalare, infine, che negli alimenti vengono rinvenuti di frequente più cloni di *L. monocytogenes*. È quindi consigliabile, nel caso di campioni positivi, sottoporre a caratterizzazione molecolare più di una colonia isolata dall'alimento, al fine di ottenere risultati utili in tema di sorveglianza della listeriosi nell'uomo.

Bibliografia

- Efsa (*European Food Safety Authority*) e Ecdc (*European Centre for Disease Prevention and Control*), 2017. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. EFSA Journal 2017;15(12):5077, 228 - <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2017.5077>.
- ISO (*International Organization for Standardization*), 2017. Microbiology of food chain – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and *Listeria* spp.– Part 1: Detection method. ISO 11290-1:2017.
- ISO (*International Organization for Standardization*), 2017. Microbiology of food chain – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and *Listeria* spp. – Part 2: Enumeration method. ISO 11290-2:2017.
- ISO (*International Organization for Standardi-*

Tabella 1
Vantaggi e svantaggi dei metodi di analisi utilizzati in laboratorio

METODO DI ANALISI	VANTAGGI	SVANTAGGI
Coltura in piastra	<ul style="list-style-type: none"> • Possibilità di caratterizzazione successiva di <i>L. monocytogenes</i> • Esecuzione dell'antibiogramma • Conservazione del ceppo 	<ul style="list-style-type: none"> • Se il batterio non è coltivabile non cresce • Richiede tempi di lavoro
PCR e metodi molecolari	<ul style="list-style-type: none"> • Affidabile • Rapida • Relativamente facile da eseguire • Sensibile • Specifica 	<ul style="list-style-type: none"> • Contaminazione e possibilità di reazioni crociate (falsi positivi) • Sensibilità bassa (falsi negativi) • Necessità di arricchimento in brodo dei campioni contaminati • Amplificazione non specifica
Sequenziamento dell'intero genoma (NGS)	<ul style="list-style-type: none"> • Costo del sequenziamento di un genoma completo inferiore a 100 dollari Usa • Risultati in pochi giorni • Esecuzione di analisi complesse • Assemblaggio de novo (senza un ceppo di riferimento) • Identificazione delle varianti • Diminuzione dei tempi di lavoro • Assenza di interferenze • Identifica i batteri non coltivabili, fastidiosi e specie o sottospecie non ancora descritte 	<ul style="list-style-type: none"> • Bisogna ottenere i ceppi in purezza per eseguire un sequenziamento che fornisca risultati idonei • L'ottenimento di un ceppo in purezza a volte è complicato • Validazione del metodo

zation), 2016. Microbiology of the food chain - Method validation – Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method. ISO 16140-2:2016.

- World Organization for Animal Health (Oie), 2014. *Listeria monocytogenes*. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals (Terrestrial Manual). Chapter 2.9.6, 2014.
- Usda Food Safety Inspection Service, 2017. Isolation and Identification of *Listeria monocytogenes* from Red Meat, Poultry, Ready-To-Eat Siluriformes (Fish) and Egg Products, and Environmental Samples. MLG 8.10.
- Cheng Jin-Qiang, Regan Patrick, Laksanalamai Pongpan, Healey Stephanie, Hua Zonglin. 2017. Prevalence and methodologies for detection, characterization and subtyping of *Listeria monocytogenes* and *L. ivanovii* in foods

and environmental sources. Food Science and Human Wellness 6 (2017) 97-120.

- Efsa Biohaz Panel (Efsa Panel on Biological Hazards), 2013. Scientific Opinion on the evaluation of molecular typing methods for major food-borne microbiological hazards and their use for attribution modelling, outbreak investigation and scanning surveillance: Part 1 (evaluation of methods and applications). Efsa Journal 2013; 11(12):3502, 84 - doi:10.2903/j.efsa.2013.3502.
- Efsa Biohaz Panel (Efsa Panel on Biological Hazards), 2014. Scientific Opinion on the evaluation of molecular typing methods for major food-borne microbiological hazards and their use for attribution modelling, outbreak investigation and scanning surveillance: Part 2 (surveillance and data management activities). Efsa Journal 2014; 12(7):3784, 46 - doi:10.2903/j.efsa.2014.3784.