

INSERTO

# Lab



Giovanni Abramo

**Nel mondo dei metodi rapidi** ..... 56

Redazione

**LabNews** ..... 62

# Nel mondo dei metodi rapidi

Differenze con i metodi tradizionali, vantaggi e scenari futuri

di Giovanni Abramo

Biologo

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

56

**L**a disponibilità di metodi rapidi immunochimici, molecolari e di altra natura per la determinazione di patogeni negli alimenti, l'identificazione di composti di interesse tecnologico o nutrizionale, l'individuazione di contaminanti chimici e la rilevazione di allergeni sulle superfici di lavorazione consente alle aziende di condurre l'attività di monitoraggio nell'ambito dell'autocontrollo in modo semplice e veloce. Ne abbiamo parlato con Vincenzina Fusco, primo ricercatore presso l'Istituto di Scienze delle Produzioni alimentari del Consiglio Nazionale delle Ricerche.

- **D.ssa Fusco, cosa si intende per metodo rapido e cosa lo differenzia da un metodo tradizionale?**

L'incidenza di malattie di origine alimentare è aumentata negli anni e costituisce un importante problema per la salute pubblica. I metodi tradizionali per il rilevamento di batteri patogeni presenti negli alimenti sono basati sulla coltura dei

microrganismi in piastra, seguita da identificazione biochimica. Queste metodologie sono generalmente poco costose e relativamente semplici da eseguire, ma possono richiedere tempi lunghi prima della valutazione dei risultati poiché dipendono dall'abilità dei microrganismi di crescere in differenti substrati culturali quali i pre-arricchimenti, gli arricchimenti selettivi e i substrati agarizzati selettivi. Generalmente un metodo convenzionale richiede da due a tre giorni per una preliminare identificazione e più di una settimana per la conferma della specie. Questi metodi sono inoltre laboriosi perché richiedono la preparazione dei substrati culturali, l'inoculo dei substrati ed eventualmente la conta delle colonie. Per di più possono essere limitati dalla loro bassa sensibilità e possono fornire risultati falsi negativi, a causa dei patogeni vitali, ma non coltivabili (VBNC). Recentemente, differenti metodi rapidi con alta sensibilità e specificità sono stati sviluppati per superare i limiti dei metodi tradizionali per il rilevamento e l'identificazione dei patogeni di origine alimentare. Ricercatori stanno ancora sviluppando nuove metodologie con miglioramenti in termini di rapidità, sensibilità, specificità e adattabilità per l'analisi in situ e la rilevazione delle cellule contaminanti vitali.

I metodi rapidi sono importanti soprattutto nell'industria alimentare perché sono capaci di rilevare immediatamente la presenza dei patogeni in alimenti crudi e processati. Sono, inoltre, abbastanza sensibili da individuare batteri presenti in basso numero; la sensibilità è importante perché potenzialmente anche un singolo patogeno può causare

un'infezione. Sono, inoltre, efficienti, rapidi, meno laboriosi e riducono gli errori umani.

• **Quali sono le esigenze che spingono un'azienda a scegliere un metodo rapido, da un punto di vista sia tecnico sia normativo?**

Le aziende alimentari per poter controllare i microrganismi alterativi e patogeni negli alimenti che producono hanno la possibilità di scegliere fra un'ampia gamma di metodiche analitiche. Per ciascun patogeno esiste la metodica di riferimento standard ISO e una serie di metodi alternativi che sono stati messi a punto per accelerare i tempi di risposta o semplificare le procedure di utilizzo. La scelta di un metodo rispetto ad un altro può dipendere da molteplici fattori, quali il bisogno di avere risposte rapide, il numero di campioni da testare, le apparecchiature necessarie, il tipo di matrice da testare, le validazioni e i costi.

I metodi rapidi alternativi hanno tempi di risposta di uno o due giorni, sono validati rispetto alla metodica di riferimento, prevedono protocolli semplificati e un'interpretazione che risente meno della soggettività dell'operatore e consentono la tracciabilità del dato e la riduzione del lavoro, automatizzando le operazioni.

Le metodiche tradizionali, pur essendo selettive e universalmente accettate, richiedono tempi lunghi, apparecchiature ingombranti e costose e mal si prestano alle esigenze di mercato legate alla shelf-life dei prodotti e alle necessità di tempestività di interventi adeguati e di segnalazioni



**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.

di eventuali allarmi sanitari. Proprio quest'ultimi e le crisi alimentari che si sono verificate negli ultimi tempi ci hanno insegnato che per identificare l'agente eziologico che ha causato un'epidemia o una tossinfezione alimentare occorre dimostrarne la patogenicità rispetto alle molteplici varianti di ceppi apatogeni presenti in matrici alimentari e ambientali. In tal senso, solo l'identificazione basata sul genotipo del microrganismo e, in particolare, dei geni che codificano per i fattori di patogenicità del germe, può darci una risposta chiara e univoca, anche per microrganismi quali



©www.shutterstock.com

*Vibrio parahaemoliticus* e *Norwalk-viruses*, attualmente esclusi degli ultimi regolamenti europei del "Pacchetto Igiene" (il regolamento (CE) 2073/2005 e successive modifiche e integrazioni) in materia di criteri microbiologici, proprio per la difficoltà legata allo sviluppo di metodi analitici affidabili, tecnologicamente avanzati e soprattutto rapidi, utilizzabili da tutti i laboratori addetti ai controlli alimentari e ambientali.

Ad oggi, i metodi rapidi sono essenzialmente categorizzabili in:

- metodi basati sugli acidi nucleici;
- metodi immunologici;
- metodi basati sui biosensori.

Il settore per la loro ricerca e sviluppo è in costante evoluzione ed è rivolto verso l'implementazione di tecniche sempre più rapide, sensibili, riproducibili, *user friendly* (cioè tali da non richiedere personale specializzato), in grado di valutare un numero elevato di parametri (*multiplexing*), per un elevato numero di campioni (*high throughput*).

In particolare, per quanto riguarda i metodi basati sugli acidi nucleici, un notevole passo in avanti in questa direzione è stato fatto con la Real Time PCR che, avvalendosi di agenti intercalanti (quali il SYBR Green) o di sonde opportunamente marcate (ad esempio, le sonde TaqMan) targettanti una regione specifica interna al frammento da amplificare, permettono, attraverso il monitoraggio della fluorescenza emessa ad ogni ciclo di amplificazione, la quantificazione in tempo reale del Dna target. In diagnostica microbiologica, però, oltre che identificare e quantificare in tempo reale una determinata specie microbica, sono talvolta indispensabili anche tecniche di tipizzazione e di sub-tipizzazione avanzate (ad esempio, RAPD-, REP-, ERIC-PCR, PCR-RFLP, fAFLP, MLST, REA-PFGE), in grado di discriminare i microrganismi a livello di specie e di ceppo, per rilevare nuovi patogeni o per individuare e ricostruire le epidemie trasmesse dagli alimenti ovvero per percorrere (*tracking*) o ripercorrere (*tracing*) le tappe della contaminazione batterica lungo la filiera agroalimentare. Queste tecniche, però, richiedono tempi e costi piuttosto

alti nonché analisi laboriose, per le quali è richiesto personale qualificato e addestrato. Mediante tali metodi è però possibile individuare marcatori o frammenti polimorfici che possono essere convertiti in SCAR (*Sequence Characterized Amplified Regions*) da utilizzare come primer o sonde specifiche in altre metodiche rapide da sviluppare per il rilevamento dei microrganismi patogeni basato sugli acidi nucleici.

Sempre nell'ambito delle metodiche basate sull'utilizzo degli acidi nucleici, inoltre, il *Next Generation Sequencing* (NGS), che comprende diverse tecnologie correlate che consentono di conoscere, tramite sequenziamento massivo parallelo o sequenziamento profondo, la sequenza nucleotidica di una specifica regione del genoma o dell'intero genoma di un dato organismo, sta emergendo come uno strumento affidabile per l'epidemiologia e la diagnostica alimentare. Esso consente il tracciamento di focolai di una tossinfezione alimentare e le investigazioni epidemiologiche a lungo e breve termine, mediante un'accurata caratterizzazione delle variazioni di sequenza del DNA, sequenziamento *de novo* di numerose specie e ceppi (genomica), sequenziamento del microbioma (metagenomica) e identificazione e quantificazione del trascritto dell'RNA (trascrittomica).

I metodi immunologici, invece, si basano sulla specificità di legame tra un anticorpo (Ab) e l'antigene (Ag) al quale è diretto. Vengono utilizzati per la rilevazione di microrganismi specifici o tossine prodotte dal microrganismo stesso. Generalmente, l'interazione dell'Ag con l'Ab, sia quest'ultimo coniugato con una molecola fluorescente, luminescente, un radioisotopo o con un enzima che catalizza la conversione di un substrato in un prodotto colorato, viene rilevato visivamente o mediante una misurazione spettrofotometrica o fluorimetrica. In particolare, i cosiddetti test a flusso laterale (*Lateral Flow Test*) sono molto semplici da utilizzare e non richiedono particolare strumentazione. La tecnologia prevede l'utilizzo di tre tipologie di anticorpi: l'anticorpo specifico per l'antigene che si vuole individuare, l'anticorpo di cattura e l'anticorpo di controllo. L'estremità in cui si trova l'anticorpo specifico assorbe il campione; se in quel determinato campione c'è l'antigene per quell'anticorpo, tale antigene viene riconosciuto e legato. Il campione sale per capillarità e

quando il complesso antigene-anticorpo incontra l'anticorpo di cattura viene a sua volta riconosciuto. Ciò è visibile con la prima banda colorata. È presente anche una seconda banda colorata che serve a verificare la validità del test. La banda del controllo si colora sia in presenza sia in assenza dell'antigene bersaglio.

Tra i numerosi sistemi attualmente disponibili, anche i biosensori si sono rivelati utili strumenti in grado di fornire elevati livelli di sorveglianza, rapidi e automatizzati. Queste apparecchiature analitiche combinano un elemento biologico sensibile (il recettore) con un trasduttore chimico o fisico per rivelare selettivamente e quantitativamente la presenza di uno specifico composto in un dato ambiente. La selettività del biosensore è determinata dalla componente biologica integrata: anche nelle matrici complesse (come alimenti e tessuti), solo determinate sostanze che sono capaci di interagire con la parte biologica potranno generare il segnale elettrico, chimico, ottico o meccanico del trasduttore, modulando la selettività del biosensore. Ad esempio, le proprietà intrinseche del Dna, quali la sua elevata specificità e la possibilità di operarne il rilevamento ottico, elettrico o meccanico, lo rendono un ottimo candidato per il suo uso in questo tipo di applicazioni. I biosensori per il rilevamento del Dna, infatti, permettono di rilevare rapidamente la presenza, all'interno del campione, di un determinato microrganismo, sfruttando il legame di una porzione specifica del suo Dna con una sonda oligonucleotidica complementare fissata sul supporto solido del biosensore stesso. La rilevazione dell'avvenuto legame avviene quindi grazie alla trasduzione del segnale, che solitamente consiste in una reazione ottica, se si utilizza una sonda fluorescente, o elettrica, se si utilizza una sonda redox-attiva.

La rapida evoluzione delle micro- e nano- tecnologie ha quindi aperto nuovi orizzonti verso l'integrazione e la miniaturizzazione delle piattaforme di rilevamento convenzionali, sfociando nei cosiddetti *lab-on-a-chip*, dispositivi che incorporano svariati processi di laboratorio in un formato miniaturizzato e semi automatizzato. Ovvi vantaggi di queste tecnologie di rilevamento integrate e miniaturizzate risiedono nella riduzione dei volumi dei reagenti utilizzati e quindi i costi associati e la riduzione dei tempi di analisi. La possibilità di rendere portatile

e automatizzato l'intero sistema di rilevamento, inoltre, ne agevola l'utilizzo non solo nel settore agroalimentare, ma anche in altri settori strategici, come quello dei servizi antifrodi o dei laboratori pubblici e privati di controllo, e in situazioni di emergenza ambientale e di bioterrorismo.

• **A quali normative bisognerebbe far riferimento? Per quali metodi?**

Il regolamento (CE) 852/2004 obbliga le imprese alimentari a garantire che «tutte le fasi della produzione, della trasformazione e della distribuzione degli alimenti sottoposte al loro controllo soddisfino i pertinenti requisiti di igiene fissati».

I rischi microbiologici associati ai prodotti alimentari costituiscono, probabilmente, una delle preoccupazioni maggiori legate al commercio e consumo di alimenti. A norma dell'articolo 4 del regolamento (CE) 852/2004, gli operatori del settore alimentare (Osa) sono «tenuti a rispettare i criteri microbiologici e a questo scopo, attraverso il prelievo di campioni, devono procedere a controlli per accettare il rispetto dei valori fissati per i criteri, eseguire analisi e prendere provvedimenti correttivi». A questo riguardo, il regolamento (CE) 2073/2005 – e le sue successive modifiche e integrazioni – non solo specifica i criteri microbiologici da seguire, ma suggerisce anche i compiti dell'Osa a riguardo. L'operatore del settore alimentare dovrà effettuare, nei modi e nei tempi appropriati, analisi per verificare il rispetto dei criteri microbiologici con lo scopo di convalidare o controllare il corretto funzionamento delle procedure basate sui principi dell'Haccp e sulla corretta prassi igienica. Il regolamento specifica, inoltre, che la frequenza dei campionamenti può essere adattata alla natura e alla dimensione dell'azienda, salvo quando la frequenza è specificata direttamente dalla norma (allegato I). Indica, poi, i metodi da utilizzare per le analisi da condurre, in modo da uniformare e armonizzare tutti i criteri di sicurezza relativi all'accettabilità dei prodotti alimentari. L'articolo 5 del regolamento (CE) 2073/2005 specifica, infatti, che i «metodi di analisi e i piani e i metodi di campionamento sono applicati come metodi

di riferimento». L'introduzione del regolamento (CE) 2073/2005 e i suoi successivi emendamenti hanno permesso di fissare e armonizzare criteri di sicurezza relativi all'accettabilità dei prodotti alimentari. Per l'Osa il rispetto dei criteri microbiologici è un obbligo che assicura un controllo efficace delle produzioni alimentari. In questo contesto, i metodi rapidi, oltre a rappresentare un utile strumento in sede di autocontrollo, possono costituire un'opportunità in presenza di un contenzioso, sia per i laboratori ufficiali sia per gli operatori del settore alimentare.

Per ciò che riguarda i controlli ufficiali e l'utilizzo di metodi alternativi, il regolamento (UE) 2017/625, all'articolo 34, paragrafo 3, cita che, «qualora via sia urgenza di eseguire analisi, prove o diagnosi» e non siano disponibili metodi e/o protocolli riconosciuti o pertinenti, si possono utilizzare metodi diversi in attesa della convalida di un metodo appropriato in base ai protocolli scientifici. L'impiego di un metodo alternativo è contemplato, quindi, anche sulla base dell'urgenza dell'analisi e sulla tempistica di esecuzione della prova. Nel caso, invece, degli Osa, l'utilizzo dei metodi rapidi costituisce un importante strumento in ragione del cambiamento normativo introdotto dal decreto legislativo 27/2021, soprattutto a fronte delle ridotte tempistiche dettate dall'articolo 7 dello stesso decreto, che fissa un massimo di 15 giorni dal ricevimento della comunicazione dell'esito sfavorevole per la richiesta dell'esame documentale. L'impiego di un metodo rapido può quindi consentire all'Osa di acquisire numerose informazioni utili sulla partita o sul lotto di interesse, al fine di valutare le azioni più opportune da intraprendere entro i termini stringenti fissati dal decreto 27/2021.

La rilevazione rapida di un patogeno in un alimento è quindi di cruciale importanza per prevenire malattie alimentari e garantire la salute del consumatore e, in tal senso, l'impiego di metodi alternativi rispetto a quelli culturali classici può fornire un importante supporto.

La scelta dei metodi rapidi in microbiologia degli alimenti, come già detto, deve basarsi sui criteri di semplicità di esecuzione, ottimizzazione dei tempi, spazi e personale, facilità di lettura e interpretazione dei risultati, automazione, ridotti tempi di risposta e bassi costi associati all'analisi;

il tutto accompagnato da un'opportuna ricerca bibliografica, al fine di stabilire l'adeguatezza del metodo per il target prescelto nella particolare matrice o categoria di matrici di riferimento. Questi metodi, laddove necessario e appropriato, dovranno poi essere validati oppure verificati. Validazione e verifica effettuate, ad esempio, secondo le norme ISO della serie 16140 sulle matrici proprie e tipiche dell'azienda, sempre nell'ottica di quel *"fit for purpose"* così caro al Codex Alimentarius.

• **Quali sono gli scenari futuri nel campo dei metodi rapidi?**

La possibilità di controllare sul posto e in tempo reale la produzione di un alimento e quindi di poter intervenire tempestivamente costituisce un indubbio vantaggio, sia in termini di costi aziendali (diminuzione di perdite di prodotto) sia di immagine per gli operatori della filiera alimentare, in cui la possibilità di contaminazione da patogeni

e/o dalle tossine da essi rilasciate rappresenta un alto rischio per la salute dei consumatori. L'utilizzo di *lab-on-a-chip devices* per il rilevamento *on time* e *on site* dei patogeni alimentari sta diventando sempre più tangibile. Da questo punto di vista, le piattaforme basate sull'amplificazione e/o il rilevamento degli acidi nucleici sembrano essere tra le più promettenti. Queste apparecchiature potrebbero ridurre il rischio di contaminazione degli alimenti lungo l'intera filiera alimentare, facilitando l'intervento in tempo reale e l'attuazione di misure preventive, perciò riducendo il rischio di perdite economiche e di epidemie alimentari. Le caratteristiche intrinseche di accuratezza e rapidità dei sistemi diagnostici, insieme con quelle di portabilità e automazione delle piattaforme di rilevamento integrate, ne agevolerebbero, inoltre, l'utilizzo in altri settori, come quello dei servizi anti-frodi o dei laboratori pubblici e privati di controllo, e in situazioni di emergenza ambientale, nonché laddove siano richieste decisioni immediate, anche in mancanza di laboratori attrezzati e di personale specializzato per le analisi.

61



## Chitosano, due studi ne dimostrano le virtù conservative

Il chitosano è al centro di due studi dell'Università di Pisa, pubblicati sulle riviste "Foods"<sup>1</sup> e "Scientific Reports"<sup>2</sup>, che indagano le potenzialità di questo biopolimero per conservare gli alimenti freschi e ridurre lo spreco alimentare.

Nel caso dello studio su "Foods", la sperimentazione ha riguardato dei piccoli hamburger di carne bovina che sono stati rivestiti con una soluzione di chitosano commerciale, ricavato da crostacei, alla quale sono stati aggiunti diversi oli essenziali. Dopo sette giorni di conservazione, è emerso che il chitosano arricchito con olio essenziale di pepe nero (*Piper nigrum*) è riuscito meglio degli altri a mantenere le caratteristiche organolettiche della carne e un aspetto brillante e fresco degli hamburger. L'applicazione di un polimero naturale ed edibile quale il chitosano, addizionato con olio essenziale di pepe nero, ha permesso di prolungare la durata di conservazione della carne mantenendo

le sue proprietà organolettiche senza modificarne il colore, ma anzi rendendo l'alimento più attraente per i consumatori", ha detto la professoressa Annamaria Ranieri dell'Ateneo pisano. Per lo studio su "Scientific Reports", il team dell'Ateneo pisano ha utilizzato per la prima volta chitosano ricavato da insetti, per rivestire mediante immersione o spray dei pomodori poi conservati per trenta giorni a temperatura ambiente o a 4 °C. Il chitosano estratto dagli insetti ha dimostrato di avere le stesse prestazioni di quello commerciale ricavato dai crostacei, anzi, in alcuni casi, addirittura superiori, preservando più efficacemente i principi nutritivi dei pomodori in termini di antiossidanti come fenoli e flavonoidi.

L'estrazione del chitosano a partire da insetti rappresenta una promettente alternativa a quello tradizionalmente estratto dai crostacei grazie alla crescente disponibilità di biomassa proveniente dagli allevamenti di insetti che si stanno sviluppando a livello mondiale – ha affermato la professoressa Antonella Castagna dell'Università di Pisa – Questo tipo di allevamento, soprattutto

rivolto alla produzione di proteine per il settore mangimistico, genera scarti che possono essere recuperati per la produzione sostenibile di chitina e chitosano. Dai risultati ottenuti nel nostro lavoro, il chitosano da insetti sembrerebbe avere prestazioni persino superiori a quello commerciale. Pur trattandosi del primo studio condotto utilizzando questa fonte, i risultati ottenuti sono molto incoraggianti, anche se occorrono ulteriori conferme su altri prodotti freschi".

Gli studi su Foods e su Scientific Reports sono stati realizzati da un team interdisciplinare dei dipartimenti di Scienze agrarie, ambientali e agro-ambientali e di Farmacia dell'Università di Pisa e di Scienze dell'Università degli Studi della Basilicata. Parte delle ricerche sono il frutto del progetto "FrEsh fooD sustainable pacKaging In The circular econOmy" (Fedkito), finanziato nell'ambito di Prima – un programma supportato dall'Unione europea e dal Ministero dell'Università e della Ricerca – e coordinato dalla professoressa Barbara Conti dell'Ateneo pisano.

(Fonte: Cidic)

<sup>1</sup> Vedi [www.mdpi.com/2304-8158/11/24/3994](http://www.mdpi.com/2304-8158/11/24/3994)

<sup>2</sup> Vedi [www.nature.com/articles/s41598-023-33587-0](http://www.nature.com/articles/s41598-023-33587-0)