



INSERTO

lab

Giovanni Abramo

L'importanza dei metodi rapidi 54

Redazione

labNews 61

L'importanza dei metodi rapidi

Intervista ad Antonio Menditto, Elisabetta Delibato e Dario De Medici del Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria dell'Istituto Superiore di Sanità

Giovanni Abramo

Biologo

Ogni operatore del settore alimentare (OSA) è obbligato, per legge, a monitorare costantemente il suo lavoro attraverso l'autocontrollo per garantire l'idoneità degli alimenti prodotti in termini di sicurezza e igiene. Ogni addetto della filiera produttiva è chiamato a svolgere tale adempimento, a prescindere dalla fase di cui si occupa. Al monitoraggio da parte degli operatori si affianca il controllo effettuato

da parte dei laboratori e, nello specifico, del laboratorio microbiologico, per garantire l'idoneità degli alimenti.

Per capire cosa sta avvenendo in termini di metodiche analitiche microbiologiche, abbiamo parlato con Antonio Menditto, Elisabetta Delibato e Dario De Medici del Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria dell'Istituto Superiore di Sanità.



• **Prima di tutto chiariamo il concetto di autocontrollo in un'industria alimentare. Cosa si intende e quali sono le normative che lo regolano?**

Le imprese che producono prodotti alimentari hanno utilizzato procedure di autocontrollo per garantire la sicurezza d'uso e la qualità della propria produzione a partire dagli anni Venti, ma solo a partire dagli anni Novanta le procedure di autocontrollo sono state modificate, al fine di permettere sia il controllo del processo produttivo che del prodotto finito. L'importanza del controllo del processo, nel garantire la sicurezza degli alimenti, viene riaffermata a livello internazionale quando il Comitato sull'Igiene degli Alimenti del "Codex Alimentarius" inserisce nel suo Codice

internazionale, relativo alle Pratiche generali e ai Principi di Igiene alimentare, il Sistema HACCP (*Hazard Analysis and Critical Control Points*), sottolineando che tale sistema deve essere alla base del controllo di tutti gli alimenti. Il Sistema HACCP adottato dal Codex venne ideato negli anni Sessanta negli Stati Uniti, con l'intento di assicurare che gli alimenti forniti agli astronauti della NASA non avessero alcun effetto negativo sulla salute o potessero mettere a rischio missioni nello spazio.

In Europa, la prima codifica normativa che prevedeva l'obbligo di applicare i principi del Sistema HACCP risale al 1993 con la direttiva 43/93/CEE (recepita in Italia con il decreto legislativo 26 maggio 1997, n. 155, ora abrogato). Successivamente, la direttiva di cui sopra è stata abrogata dal regolamento (CE) 852/2004, attualmente vigente.

L'autocontrollo, così come richiamato dal termine, vede come attore principale l'operatore del settore alimentare (OSA) che, per garantire un adeguato livello di sicurezza della sua produzione, deve mettere in atto delle misure di gestione del rischio attraverso l'implementazione dei Programmi di Prerequisito (termine equivalente alle GMP/GHP) e l'applicazione dei principi del Sistema HACCP.

L'autocontrollo vede come attore principale l'operatore del settore alimentare

Nonostante l'HACCP, da tempo, sia stato codificato a livello internazionale in sette principi e in cinque passi preliminari all'applicazione dei principi stessi, fin dall'inizio sono state evidenziate alcune criticità dovute in parte all'esigua disponibilità di risorse o alla carenza di professionalità capaci di effettuare una corretta ed esaustiva analisi dei pericoli e di identificazione dei punti critici di controllo.

In tale contesto, i manuali di corretta prassi operativa, così come definiti nella normativa vigente in materia di controllo della sicurezza degli alimenti ai sensi del regolamento (CE) 852/2004, risultano essere uno strumento utile per l'OSA nell'identificazione dei pericoli e nella gestione del rischio nella propria realtà produttiva, nell'applicazione di strumenti atti a controllare i pericoli



Antonio Menditto è primo ricercatore presso l'Istituto Superiore di Sanità; si occupa, tra l'altro, della valutazione dei manuali di corretta prassi igienica e di formazione nel campo della sicurezza alimentare.



Elisabetta Delibato è ricercatore presso l'Istituto Superiore di Sanità; si occupa, tra l'altro, della valutazione dei manuali di corretta prassi igienica e della ricerca nel settore della microbiologia e dell'igiene degli alimenti, incluso lo sviluppo e l'applicazione dei metodi rapidi per la rapida determinazione dei batteri patogeni in differenti matrici alimentari.



Dario De Medici è primo ricercatore presso l'Istituto Superiore di Sanità; si occupa, tra l'altro, della ricerca nel settore della microbiologia e dell'igiene degli alimenti, incluso lo sviluppo e le applicazioni di metodi rapidi; ha inoltre coordinato il lavoro del Gruppo di Lavoro ISS/ILZZSS riguardante la definizione di criteri microbiologici di cui all'allegato 7 delle "Linee guida per il controllo ufficiale ai sensi del regolamento (CE) 882/2004 e 854/2004".

stessi e nell'osservanza degli obblighi normativi in materia di igiene. I manuali rappresentano un valido riferimento per favorire l'implementazione e l'applicazione dei cosiddetti di Programmi di Prerequisito (PRP) e, nella filiera della produzione post-primaria, la base per elaborare le procedure connesse al Sistema HACCP. Inoltre, è necessario richiamare la comunicazione della Commissione

(2016/C 278/01) relativa all'attuazione dei Sistemi di Gestione per la Sicurezza alimentare, riguardanti i PRP e le procedure basate sui principi del Sistema HACCP. Un rilevante contributo alla verifica della validità dei sistemi di autocontrollo è dato anche dal regolamento (CE) 2073/2005 e successive modifiche e integrazioni, che definisce, oltre ai criteri di sicurezza alimentare applicabili



ai prodotti alimentari, criteri di igiene di processo utili per verificare il corretto funzionamento delle differenti filiere alimentari. Tale approccio è stato perseguito anche attraverso l'emanazione di Linee guida per il controllo ufficiale ai sensi del regolamento (CE) 882/2004 e 854/2004" (Repertorio Atti 212/CSR del 10 novembre 2016), che forniscono "valori guida" (criteri di processo) anche per quelle filiere produttive non previste dal regolamento (CE) 2073/2005. Infine, è necessario sottolineare che l'EFSA ha pubblicato due opinioni in cui sono stati proposti Sistemi HACCP semplificati per diverse tipologie di imprese alimentari (ad esempio, macellerie, negozi di generi alimentari, panetterie, pescherie, gelaterie, supermercati). La semplificazione del sistema si basa sull'assunto che i rivenditori, pur non essendo tenuti ad avere una conoscenza dettagliata di pericoli specifici, devono essere consapevoli della presenza dei pericoli e dell'osservanza delle attività di controllo essenziali, come la corretta refrigerazione o la separazione dei prodotti crudi da quelli cotti, per impedire, eliminare o ridurre a livelli accettabili l'esposizione dei consumatori a questi pericoli.

• Per la verifica della conformità delle derrate alimentari al fine di garantire la salute del consumatore, i laboratori devono utilizzare metodi di analisi microbiologici validati...

Tutti i metodi analitici utilizzati per valutare la conformità degli alimenti devono essere sottoposti ad una fase di validazione che ne comprovi l'affidabilità.

Fanno parte dei metodi standard quelli riportati nei criteri microbiologici (regolamento (CE) 2073/2005), nei documenti emanati da organizzazioni sovranazionali che rappresentano gli Stati membri e nelle Gazzette Ufficiali (metodi ufficiali); tutti questi metodi possono essere definiti come metodi normati.

In mancanza di metodi standard adatti allo scopo, è possibile ricorrere a metodi alternativi, sviluppati sulla base della letteratura scientifica disponibile, oppure creati in laboratorio, quindi metodi interni, o infine realizzati commercialmente, purché validati in accordo alle norme della serie ISO 16140. La validazione del metodo permette di confermare con esame e apporto di evidenze oggettive che i requisiti per l'utilizzazione prevista siano soddisfatti (EN ISO/IEC 17025), ovvero una serie di

prove di laboratorio condotte al fine di stabilire se le prestazioni del metodo soddisfino le richieste analitiche per le quali lo stesso viene applicato. Nella norma ISO 16140 vengono definiti, in base allo specifico uso del metodo, i principi generali ed il protocollo tecnico per la validazione dei metodi alternativi, nel campo della microbiologia degli alimenti, permettendo di dimostrare, con un adeguato grado di confidenza, l'equivalenza tra il metodo alternativo e il metodo di riferimento.

Tutti i metodi analitici utilizzati per valutare la conformità degli alimenti devono essere sottoposti ad una fase di validazione che ne comprovi l'affidabilità

I metodi microbiologici, nel loro insieme, possono essere classificati come metodi di screening e metodi di conferma. I primi si basano sulla capacità di fornire indicazioni presuntive sulla presenza/assenza di un microrganismo e/o tossina; i secondi, invece, conducono ad un'inequivocabile identificazione del microrganismo. È importante, nella selezione dei metodi, considerare l'orientamento attuale verso metodi orizzontali, cioè metodi nel cui campo di applicazione rientri il maggior numero possibile di matrici alimentari.

• Parliamo dei metodi rapidi. Perché vi è la necessità di svilupparli e quali sono i vantaggi rispetto ai metodi tradizionali?

Nel settore della sicurezza alimentare e con riferimento ai pericoli microbiologici, il regolamento (CE) 2073/2005 e successive modifiche e integrazioni, che definisce i criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari, riporta i metodi di analisi di riferimento da utilizzare per verificare la conformità ai criteri microbiologici di sicurezza e di igiene di processo per alcuni microrganismi/tossine. Inoltre, all'articolo 5, fa riferimento alla possibilità per i produttori di avvalersi di metodi alternativi, purché validati in base al protocollo definito dalla norma EN/ISO 16140. La necessità

dell'adozione dei metodi rapidi scaturisce dal fatto che, nonostante i metodi tradizionali per la determinazione dei microrganismi negli alimenti siano affidabili, in taluni casi richiedono diversi giorni per l'identificazione presuntiva e la caratterizzazione dell'eventuale bio-sierotipo. In genere, si articolano in una serie di fasi successive che consistono essenzialmente in: pre-arricchimento, arricchimento selettivo, isolamento, l'identificazione (presuntiva) e conferma biochimica/sierologica. L'esecuzione di queste fasi, quando tutte presenti, comporta in alcuni casi tempi di analisi relativamente lunghi (4-6 e più giorni).

Per tale motivo è generalmente sentita la necessità di disporre di metodiche rapide, che possano condurre ad una risposta qualitativa (presenza/assenza) sull'eventuale contaminazione nell'arco delle 24 ore. La disponibilità di tali metodi, nell'ambito di un Sistema di Autocontrollo, può consentire di prendere decisioni tempestive riguardanti il rilascio di lotti di prodotto o la possibilità del loro ritiro dal commercio, contribuendo così all'aumento della sicurezza e della fiducia del consumatore.

A tale scopo, negli ultimi anni, la comunità scientifica ha focalizzato la sua attenzione sullo sviluppo di metodi alternativi, che fossero corredati di maggiore sensibilità ed efficienza, automazione di più fasi e costi più contenuti e capaci di dare risposte rapide in relazione alle contaminazioni dei prodotti circolanti nell'UE. Spesso le metodiche rapide, al fine di aumentare la concentrazione del bersaglio/patogeno e quindi la sensibilità, hanno in comune con il metodo colturale classico, una fase di arricchimento. L'aumentata sensibilità di tali metodiche consente di ridurre le fasi di pre-arricchimento/arricchimento, normalmente presenti nei metodi colturali, riducendo ulteriormente il tempo di risposta dei metodi alternativi.

• Quali sono i metodi rapidi utilizzati e su cosa si basano?

I metodi rapidi possono essere classificati in tre categorie: metodi molecolari, che impiegando la *Polymerase Chain Reaction* (PCR) mirano all'amplificazione di specifiche sequenze geniche del DNA del patogeno target; metodi immunologici; metodi microbiologici che, sfruttando le proprietà tipiche dei terreni cromogeni, ossia di identificazione presunta in base alle differenti colorazioni assunte dalle colonie, sono in grado di dare risultati in tempi visivamente più ridotti rispetto ai metodi colturali classici.

Le metodiche oggi maggiormente utilizzate e che assicurano le performance migliori sono

58

I metodi rapidi possono fornire una risposta qualitativa sull'eventuale contaminazione nell'arco di 24 ore





certamente quelle molecolari ed in particolar modo la Real-Time PCR. L'uso di questa metodica si è affermato sempre più negli ultimi anni in quanto, oltre ai vantaggi di una PCR classica, quali sensibilità, specificità e rapidità di risposta, permette la determinazione presuntiva del numero di microrganismi presenti in campioni alimentari potenzialmente contaminati.

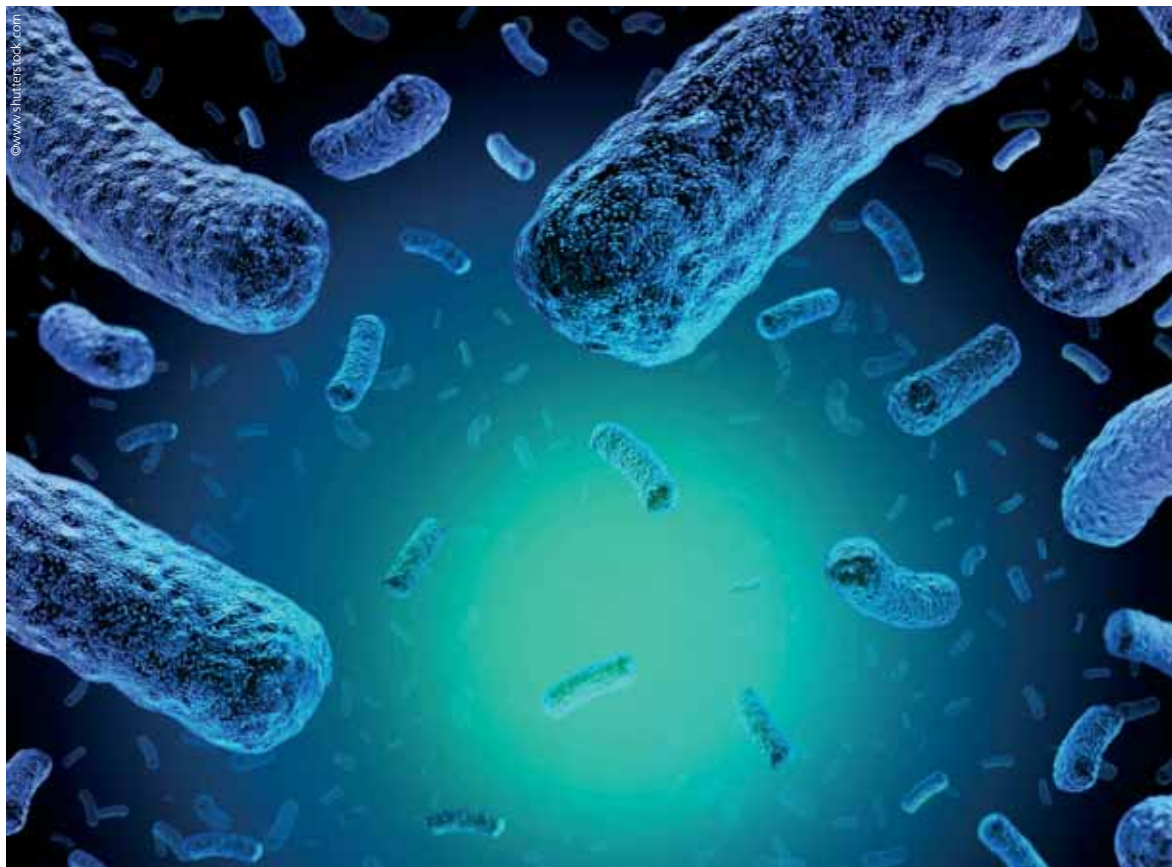
I metodi rapidi possono essere molecolari, immunologici o microbiologici

La Real-time PCR permette di misurare in tempo reale, "step by step", la fluorescenza che si genera durante la reazione a catena per effetto di diverse reazioni biochimiche, utilizzando, in alternativa, due sistemi di rilevamento dell'accumulo dei prodotti amplificati: coloranti che si legano

specificamente ai doppi filamenti di DNA e sonde legate a molecole fluorescenti.

• Ci sono metodiche rapide di particolare interesse per i laboratori che effettuano l'autocontrollo?

Indubbiamente, le metodiche molecolari per la rilevazione dei microrganismi patogeni hanno incontrato il favore della maggior parte dei laboratori deputati sia al controllo ufficiale che all'autocontrollo. L'applicazione delle metodiche di biologia molecolare nei laboratori di autocontrollo incontra però alcune difficoltà nel costo ancora relativamente elevato della strumentazione e dalla complessità del suo utilizzo. Tali criticità possono essere superate dall'utilizzo di metodiche di amplificazione a temperatura costante quali principalmente la *Loop-Mediated Isothermal Amplification* (LAMP). La reazione della Lamp avviene, in meno di 40 minuti, ponendo la provetta con tutti i suoi componenti in un economico bagno termostato da laboratorio in grado di mantenere la temperatura costante (55-65 °C), durante tutta la



fase di amplificazione; dopo tale fase la rilevazione dell'avvenuta reazione può semplicemente essere effettuata grazie al cambiamento di colore della soluzione.

Il successo della tecnologia LAMP risiede nelle sue caratteristiche di sensibilità, specificità e robustezza, coniugate al basso costo della strumentazione

Recentemente sono stati pubblicati diversi lavori scientifici che sfruttano tale tecnologia per la determinazione di *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter* ed *Escherichia coli*; inoltre, la commercializzazione di alcuni kit ne ha diffuso la sua applicazione. Il successo della LAMP, che risiede nelle sue

caratteristiche di sensibilità, specificità e robustezza coniugate al basso costo della strumentazione, la rendono duttile a tutte le strutture laboratoristiche, comprese quelle piccole demandate all'autocontrollo aziendale.

Infine, Il Ministero della Salute ha finanziato un progetto di ricerca finalizzata, dal titolo "*Innovative one-day molecular methods to evaluate the compliance of European Regulation (Acronym One Day)*", coordinato dall'Istituto Superiore di Sanità con la collaborazione dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e Emilia Romagna e della Facoltà di Scienze Agrarie, Alimentari e Ambientali dell'Università Cattolica del Sacro Cuore di Piacenza, che in una prima fase prevede lo sviluppo di metodi rapidi per la determinazione di microrganismi patogeni utilizzando questa tecnologia.

Tutto ciò al fine di sviluppare una strategia analitica con un tempo totale di analisi, dalla preparazione del campione al risultato finale, di circa 8-12 ore, che permetterebbe ai produttori di rilasciare la partita/lotto prodotto nella medesima giornata di produzione.

**► RICERCA, nasce CREA futuro,
la testata giornalistica del CREA**

Il Consiglio per la Ricerca in Agricoltura e l'Analisi dell'Economia agraria (CREA) ha lanciato la testata giornalistica on line CREA Futuro¹, ideata, progettata e realizzata per raccontare con un linguaggio semplice e chiaro, ma al tempo stesso autorevole, l'ambiente che ci circonda, il suolo che coltiviamo, il cibo che mangiamo. L'attenzione sarà focalizzata su come l'agroalimentare e l'ambiente stanno cambiando per far fronte alle sfide che ci attendono: dal cambiamento climatico alla sostenibilità ambientale, economica e sociale, dalle nuove tecnologie alle fonti energetiche rinnovabili, dalla difesa della biodiversità a quella della dieta mediterranea fino a quella del patrimonio enogastronomico del nostro Paese. Con un nucleo centrale a cadenza quadrimestrale, che potrà essere arricchito con aggiornamenti e approfondimenti fra un numero e l'altro, CREA Futuro vuole rispondere alla domanda "Cosa aspettarsi dal futuro?", con articoli, video e podcast. Il primo numero è dedicato ad un tema molto dibattuto: le biotecnologie di ultima generazione.

Il CREA coordina BIOTECH, progetto di ricerca pubblica sul miglioramento genetico vegetale, che si propone di selezionare nuove piante per i nuovi tempi in cui stiamo vivendo. Si partirà, quindi, dal progetto nel suo insieme, per poi approfondire i diversi sottoprogetti (dalla vite all'olivo, dagli agrumi agli alberi da frutta, dai cereali alle ortive), fino a raccontare la lunga storia del miglioramento genetico vegetale, per arrivare infine agli scaffali dei supermercati.

La rubrica delle video-interviste "CREA incontra..." è stata inaugurata dai presidenti della Commissione Agricoltura della Camera, Filippo Gallinella, e della Commissione Agricoltura del Senato, Gianpaolo Vallardi, che hanno espresso la loro visione dell'agricoltura del futuro, inclusa la posizione sulle biotecnologie di ultima generazione, e sul contributo del CREA in questo ambito.

E dal 16 giugno il CREA è anche su Instagram², con foto, video e approfondimenti, "perché – si legge in una nota dell'ente – *scienza e innovazione possono essere anche un viaggio alla scoperta di temi e argomenti di attualità, oltre che a ricerche e progetti consolidati*".

(Fonte: CREA)



¹ Visita il sito web della testata: www.creatfuturo.eu/it/

² Per iscriverti vai su www.instagram.com/crearicerca/