

INSERTO

lab



Giovanni Abramo

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

50

Redazione

labNews

57

Metodi molecolari: presente e futuro della ricerca alimentare

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

Giovanni Abramo
Biologo

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

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

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



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

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

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



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

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

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

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

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

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

Cosa dice la normativa a riguardo?

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

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

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

Come sono stati fino ad ora determinati i microrganismi contaminanti?

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

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

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

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

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

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

53



©www.shutterstock.com

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

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

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

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

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

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



©www.shutterstock.com



I metodi alternativi devono essere validati da un laboratorio di prova

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

Quali sono i laboratori di riferimento?

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

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



©www.shutterstock.com

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

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

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



©www.shutterstock.com

Rassegna di attualità sul mondo
della ricerca agroalimentare

a cura della **Redazione**

► VIRUS negli INSETTI COMMESTIBILI ALLEVATI, il punto sugli STUDI effettuati

Appartenenti alla categoria dei novel food, gli insetti commestibili sono parte della dieta quotidiana di milioni di persone nel mondo. Attualmente sono 12 le specie segnalate dall'Autorità europea per la Sicurezza alimentare (EFSA) per aver il maggiore potenziale di utilizzo come alimenti e mangimi nell'Unione Europea.

Mentre esiste un'abbondante letteratura sulla presenza di virus negli insetti di valore economico o di importanza per la salute pubblica – come nel caso di bachi

da seta, api e zanzare –, sono ancora pochi gli studi condotti sui virus degli insetti edibili.

Ricercatori del Laboratorio Parassitologia, Micologia ed Entomologia sanitaria (SCS3) e del Centro di referenza nazionale per l'Apicoltura dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie hanno quindi deciso di realizzare una revisione sistematica della letteratura scientifica in materia, successivamente pubblicata sulla rivista "Virus"¹, per fornire una panoramica dei virus presenti negli insetti edibili e considerati promettenti per l'allevamento nell'Unione Europea. Sono state prese in considerazione 15 specie – comprese le 12 selezionate dall'EFSA – coprendo cinque ordini di insetti: coleotteri, ditteri, lepidotteri e ortotteri.

Negli insetti in esame è stata confermata la presenza



©www.shutterstock.com

¹ Vedi <https://www.mdpi.com/1999-4915/13/11/2280>



di più di 70 specie di virus, appartenenti a 22 famiglie diverse. L'ordine degli ortotteri sembra essere quello più colpito: sette le famiglie virali individuate, tra cui le Iridoviridae e le Densoviridae, generalmente considerate le più pericolose.

I virus patogeni per gli insetti costituiscono un rischio per i sistemi di allevamento di massa degli insetti stessi perché capaci di causare elevate perdite economiche provocando sia un drastico calo della crescita negli stadi giovanili sia delle performance riproduttive degli adulti, fino a causare un'elevata e rapida mortalità. *«Inoltre – si legge in una nota pubblicata sul sito dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie – alcuni virus veicolati dagli insetti e patogeni per l'uomo o gli animali potrebbero rappresentare un rischio per la salute pubblica, se non adeguatamente gestiti quando gli insetti vengono utilizzati per produrre alimenti e mangimi».*

Il rischio di trasmettere all'uomo virus di origine alimentare tramite insetti edibili è comunque considerato basso.

Dato il numero limitato di studi presenti finora in letteratura, dalla revisione emerge l'opportunità di condurre indagini sui virus presenti negli insetti edibili allevati per comprenderne meglio l'impatto nei sistemi

di allevamento industrializzati e in termini di sicurezza alimentare.

«Nel frattempo – si legge sul sito dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie –, poiché a oggi non esiste una cura per le infezioni virali negli insetti commestibili allevati, le strategie di allevamento devono concentrarsi sulla definizione e standardizzazione di buone pratiche agricole. Le misure di biosicurezza si confermano ancora una volta una fondamentale e immediata strategia di prevenzione».

(Fonte: Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie)

► Biologico, un SISTEMA DI ANALISI per distinguere i PRODOTTI ORTICOLI BIO da quelli CONVENZIONALI

I ricercatori del CREA hanno messo a punto un sistema di analisi integrato, basato sull'individuazione di nuovi marker per distinguere se le produzioni biologiche certificate siano state ottenute con l'impiego di concimi organici azotati, ammessi dal

metodo bio, oppure con l'utilizzo di concimi azotati di sintesi.

Tre le colture studiate:

- pomodoro datterino (in serra);
- finocchio (in pieno campo);
- cavolfiore (in pieno campo).

La sperimentazione, effettuata nell'ambito del progetto "InnovaBio", ha dimostrato che le differenti pratiche di fertilizzazione tra il metodo biologico e quello convenzionale influenzano la composizione chimica di alcuni elementi presenti nei frutti e nei vegetali. In particolare, l'azoto ha una differente distribuzione degli isotopi (atomi che possiedono nel loro nucleo lo stesso numero di protoni, ma un diverso numero di neutroni) nei fertilizzanti biologici o convenzionali rappresentando, pertanto, un marker per discriminare il metodo di coltivazione. Al tempo stesso, però, esso può essere influenzato anche da alcune pratiche culturali impiegate nei metodi di coltivazione biologico e convenzionale (uso del sovescio, applicazione di fertilizzanti organici nella pratica convenzionale o viceversa), per cui la



determinazione di tale parametro, da sola, può non essere sufficiente per un'affidabile discriminazione tra produzioni biologiche e non.

Il progetto "InnovaBio" è stato coordinato dal Centro di Ricerca Olivicoltura Frutticoltura e Agrumicoltura del CREA (sede di Acireale). *"I suoi risultati – ha commentato*



©www.shutterstock.com

Simona Fabroni, ricercatrice del CREA e responsabile del progetto – *hanno permesso di dimostrare che un modello integrato di analisi multivariata, che includa il rapporto isotopico dell'azoto con altri parametri di qualità (fisico-chimici, nutrizionali, nutraceutici), può contribuire a una distinzione affidabile tra prodotti organici e convenzionali*”.

(Fonte: CREA)

► RICERCA, un'indagine sulle STARTUP AGRIFOOD SOSTENIBILI

L'Osservatorio Food Sustainability della School of Management del Politecnico di Milano ha condotto una ricerca sulle startup che operano nel settore agroalimentare, censendone 7.337 tra il 2017 e il 2021 a livello mondiale. Dall'indagine è emerso che il 34% di loro (2.527) persegue uno o più degli obiettivi di sviluppo sostenibile inclusi nell'Agenda 2030 delle Nazioni Unite, attraverso soluzioni che mirano a:

- ottimizzare l'utilizzo delle risorse (30%);
- promuovere la tutela degli ecosistemi terrestri e d'acqua dolce (21%);
- sensibilizzare e incentivare l'adozione di stili di vita e pratiche sostenibili (17%);
- aumentare la produttività e la capacità di resilienza dei raccolti ai cambiamenti climatici (17%);
- favorire il turismo sostenibile e le produzioni locali (16%);
- tutelare i piccoli produttori (12%);
- ridurre eccedenze e sprechi alimentari lungo la filiera (11%);

- assicurare il lavoro a tutti e una remunerazione equa (8%);
- promuovere l'uso efficiente e l'accesso equo alle risorse idriche (7%).

Guardando alla concentrazione delle startup orientate alla sostenibilità nei diversi Paesi del mondo, la Norvegia risulta al primo posto (25 startup agrifood, di cui il 60% sostenibili), seguita da Israele (119 startup, di cui il 58% sostenibili), Nigeria (64 startup, di cui il 50% sostenibili) e Polonia (20 startup, di cui il 50% sostenibili).

L'Italia si trova al ventitreesimo posto (85 startup agrifood, di cui il 35% sostenibili).

Tra gli studi portati avanti dall'Osservatorio nell'ambito dell'indagine, anche l'analisi di oltre 79 soluzioni innovative introdotte dalle startup censite e orientate a ridurre gli sprechi nella catena del freddo. Tali soluzioni mirano a ottimizzare la produzione in risposta all'andamento della domanda e a diminuire le scorte in magazzino, tramite un migliore allineamento di domanda e offerta (11% del campione) e l'accorciamento della supply chain (6%). Puntano, inoltre, a migliorare la conservazione dei prodotti attraverso l'estensione della shelf life (10%) e il monitoraggio della temperatura e di altri parametri critici (9%). Le startup propongono, infine, piattaforme digitali per la ridistribuzione dei prodotti tramite vendita a prezzo scontato o donazione (28%) o in alternativa varie soluzioni tecnologiche di *upcycling* per trasformare l'eccedenza in un altro prodotto edibile a più lunga vita residuale o per recuperarne parte del valore per fini di alimentazione animale, riciclo o recupero energetico (36%).

(Fonte: Osservatorio Food Sustainability)

