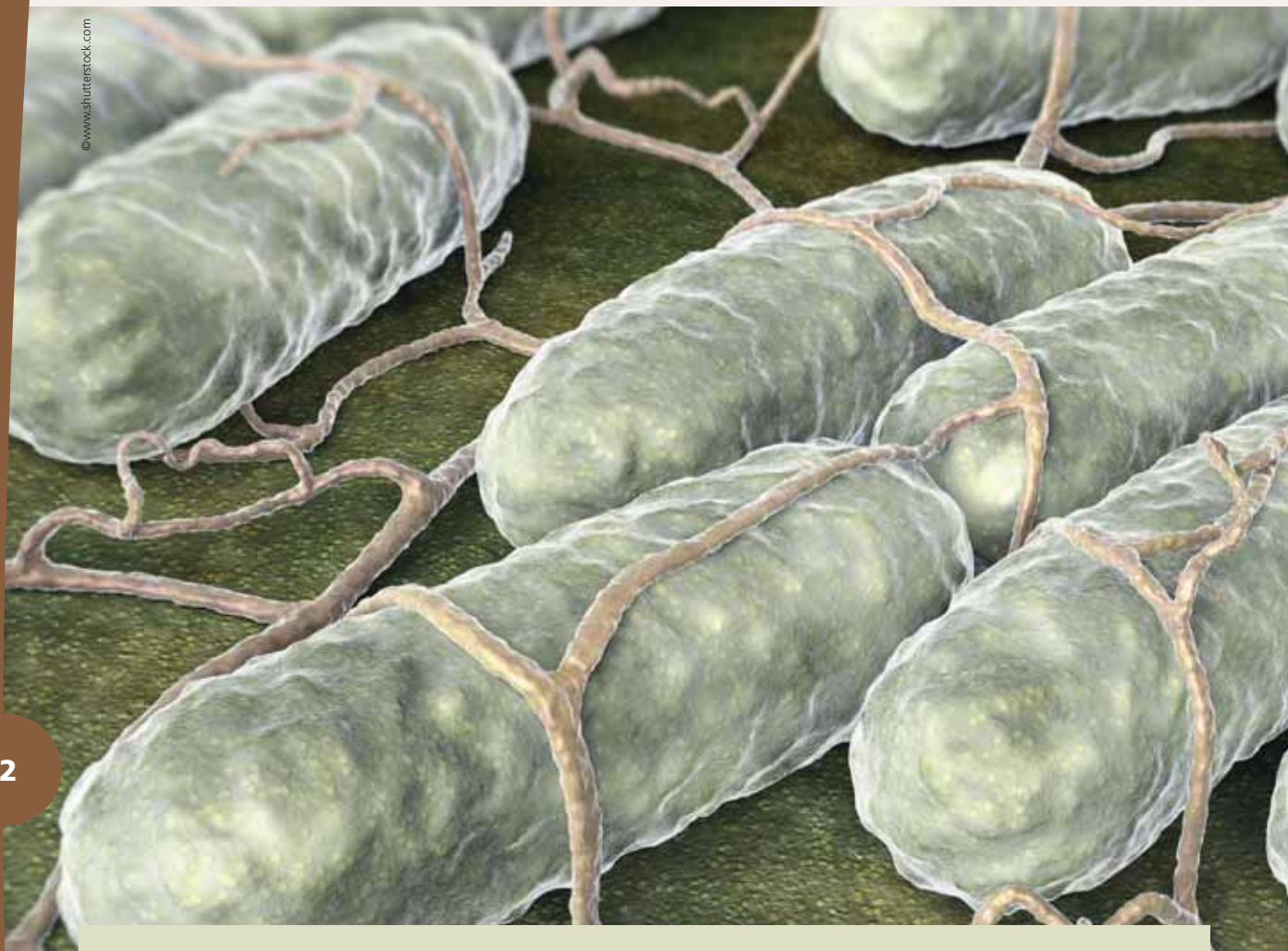


A scanning electron micrograph (SEM) showing numerous rod-shaped bacteria, likely Bacillus subtilis, which are fluorescently labeled. The bacteria are distributed across the frame, with some appearing in clusters and others individually. They have a textured, slightly irregular surface. The background is a dark, granular surface with small, bright spots.

**INSERTO**

**lab**

- **Ceppi batterici fluorescenti come controlli positivi per escludere eventuali cross-contaminazioni** ..... 62
- **Contaminazione microbica degli alimenti e automazione** ..... 68



# Ceppi batterici fluorescenti come controlli positivi per escludere eventuali cross-contaminazioni

**Gabriella Carcassola**  
DMV, PhD





L'uso di ceppi batterici presenti in natura come controlli positivi nei test che i laboratori di analisi alimentari conducono per individuare od escludere una contaminazione batterica di un determinato alimento è una procedura abbastanza temuta, a causa del rischio di cross-contaminazioni dei campioni. Le conseguenze di un esito falsamente positivo, ovviamente, non si limitano all'emissione di una "falsa" allerta alimentare, che comporta il ritiro e/o il richiamo del prodotto incriminato, ma si concretizzano in un "reale" danno per l'azienda produttrice che, nel giro di pochi giorni, si vede additata come "inaffidabile" per la salute dei consumatori, subendo così un grave danno di immagine. E a poco vale, se non a nulla, la revoca dell'allerta, che giunge quando le analisi di ripetizione o il laboratorio di seconda analisi scopre che la contaminazione non sussiste. Il danno è ormai fatto. È quindi evidente l'importanza di poter avere a

*Il rischio di cross-contaminazione in un laboratorio di analisi alimentare con conseguente emissione di risultati falsamenti positivi può essere dovuto, tra le altre possibili cause, all'impossibilità di distinguere il batterio in grado di contaminare un alimento dal "corrispettivo" utilizzato come controllo positivo. Di particolare interesse, quindi, è la creazione di ceppi batterici fluorescenti che potrebbero rappresentare uno strumento efficace per identificare eventuali contaminazioni crociate, all'origine di "false" allerte alimentari.*

disposizione i mezzi per condurre analisi in tutta sicurezza e, soprattutto, in grado di diversificare una contaminazione reale da una contaminazione avvenuta accidentalmente proprio in laboratorio. In tale quadro, interessante è uno studio<sup>1</sup> di recente pubblicazione, in cui si descrive la creazione di ceppi di controllo fluorescenti per diverse *Enterobacteriaceae* particolarmente importanti in termini di sicurezza alimentare.

## **MALATTIE TRASMESSE CON GLI ALIMENTI, LA SITUAZIONE IN UE**

Nella sua relazione relativa all'anno 2017, il RASFF (*Rapid Alert System for Food and Feed*, RASFF) riporta che, in quell'anno, sono state trasmesse in totale 3.832 notifiche originali, di cui 942 notifiche di allarme, vale a dire le notifiche riguardanti un prodotto presente sul mercato che comporta un grave rischio per la salute, con un aumento dell'11% rispetto al 2016. Più in particolare, le notifiche hanno riguardato soprattutto prodotti contaminati da microrganismi patogeni, con 414 segnalazioni da parte dei Paesi europei e 561 da parte dei Paesi extra-europei, per un totale di 975.

Per quanto riguarda le notifiche RASFF per la presenza di microrganismi patogeni in prodotti provenienti dai Paesi Ue ha interessato soprattutto alimenti di origine animale, con un aumento delle segnalazioni

del 18% rispetto al 2016.

I patogeni maggiormente segnalati sono stati i batteri appartenenti al genere *Salmonella*, soprattutto nella carne, con numerose non conformità per il pollame fresco. Non sono tuttavia mancate notifiche riguardanti anche prodotti a base di uova.

Per *Listeria monocytogenes* l'alimento più spesso segnalato è stato il pesce, in particolare il salmone affumicato, mentre in Francia le notifiche più numerose hanno avuto per oggetto i formaggi, in particolare quelli a base di latte crudo. La terza categoria oggetto di notifica è stata quella della carne e dei prodotti a base di carne diversi dal pollame.

I molluschi bivalvi vivi sono stati invece i più frequentemente segnalati per *Escherichia coli*, con in testa la Francia, seguita da vicino dal Regno Unito e dall'Italia.

Per *Norovirus* le segnalazioni sono state in tutto 23 e hanno coinvolto ostriche vive e frutti di bosco.

Infine, per *Campylobacter* spiccano le 10 notifiche registrate dalla Danimarca per la presenza di questo patogeno negli alimenti, soprattutto nel pollo fresco.

## LO STUDIO

Alcuni ricercatori della Divisione di Microbiologia, del Center for Food Safety and Applied Nutrition, della FDA (Food and Drug Administration), negli Stati Uniti, hanno rilevato che, a partire dal 2015, *Salmonella*, *Shigella* ed *Escherichia coli* produttore di Shiga tossina (*Shiga Toxin-producing Escherichia Coli*, STEC), insieme a *Campylobacter*, hanno rappresentato i principali patogeni responsabili di malattie trasmesse dagli alimenti negli Stati Uniti.

La FDA e il Dipartimento dell'Agricoltura degli Stati Uniti (USDA) sono responsabili per il monitoraggio della sicurezza di tutti gli alimenti e mangimi importati e venduti negli Stati Uniti. Le procedure di laboratorio preferite dalla FDA per le analisi microbiologiche degli alimenti sono raccolte nel *Bacteriological Analytical Manual* (BAM), ma sono comunque accettati dalle agenzie di regolamentazione

altri metodi standard, a condizione che siano stati valutati e validati.

Un'accurata interpretazione dei test di rivelamento dei patogeni richiede l'inclusione di campioni di controllo che servono da riferimento per valutare il campione di interesse. La validità di questi test dipende, a sua volta, dagli inequivocabili risultati forniti dal controllo negativo, per il quale non è previsto alcun effetto, e del controllo positivo, che deve fornire in modo affidabile l'effetto atteso. Tuttavia, i test condotti dal 1999 al 2013 dall'American Proficiency Institute per l'analisi dei patogeni di origine alimentare hanno evidenziato che, negli Stati Uniti, le percentuali di risultati falsamente positivi per *Salmonella* variano dal 2,1 al 6,9% nei laboratori testati e sono in media pari al 2,5% per *E. coli*. E sebbene le cause di questi falsi positivi non siano state stabilite, è noto che la cross-contaminazione durante le fasi analitiche è potenzialmente una di esse.

Nel panel di ceppi di controlli positivi usati dalla FDA, un solo ceppo, *S. flexneri* 2457M, può essere differenziato dai ceppi naturali mediante un saggio PCR che rileva la cassetta di resistenza alla kanamicina inserita al posto di un gene associato alla virulenza<sup>2</sup>. Tuttavia, considerando che la resistenza agli antibiotici è sempre più diffusa tra gli isolati clinici e alimentari, questi geni utilizzati in qualità di marcatori stanno diventando sempre meno affidabili per differenziare i ceppi di controllo dagli isolati presenti in natura. Un'alternativa è rappresentata dalla *Green Fluorescent Protein* (GFP), un marker particolarmente interessante, in quanto la semplice irradiazione mediante luce blu o luce ultravioletta (UV) è sufficiente per l'espressione della fluorescenza. E nel corso degli anni, i ceppi di controllo utili ai microbiologi alimentari stanno raggiungendo un livello di espressione della GFP sufficientemente elevato da consentire il rilevamento della fluorescenza mediante strumenti portatili.

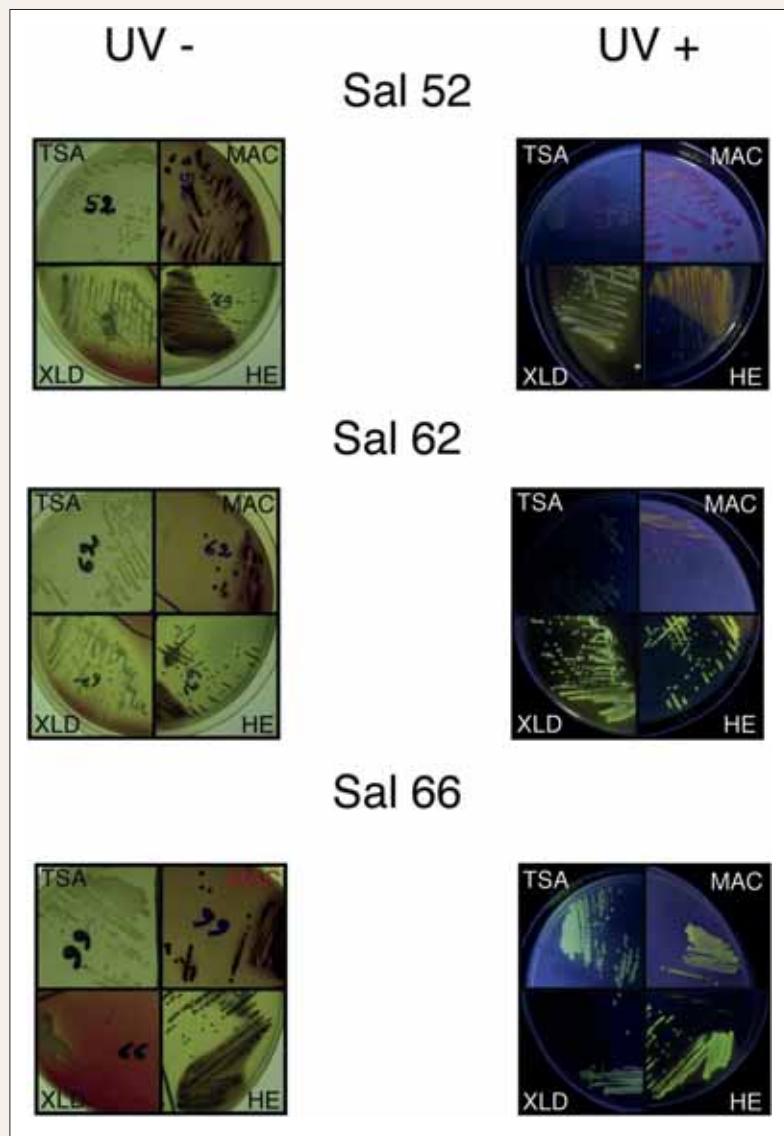
Negli ultimi 20 anni, sono state sviluppate diverse varianti di *green fluorescent protein*. Una di queste proteine, la GFP<sub>UV</sub>, emette una luce verde brillante

Tabella 1

### Ceppi batterici utilizzati nello studio<sup>1</sup>

Batteri	Ceppi
<i>Escherichia coli</i>	DH5α, BL21 (DE3), XL-1 Blue MRF <sup>1</sup> , XL10-Gold Kan <sup>1</sup> , EC27, EC32, EC39, <b>EC43</b>
<i>Shigella</i>	SF3, SF82, SF48, <b>SF84</b> , SS58, F2353-GFP, <b>SS61</b>
<i>Salmonella enterica</i>	Sal32, Sal42, <b>Sal46</b> , Sal48, <b>Sal54</b> , Sal49, <b>Sal57</b> , Sal63, Sal50, <b>Sal58</b> , Sal51, <b>Sal59</b> , Sal53, <b>Sal60</b> , Sal52, Sal61a, Sal62, Sal66

In rosso i ceppi che hanno mostrato intensa fluorescenza.



**Foto 1.** Colture di *S. Tennessee* su TSA, MAC, XLD, HEA. Sal52 è il ceppo genitore, Sal62 è il ricombinante GFP con due operoni del lattosio e Sal66 è il mutante spontaneo che ospita solo un operone del lattosio. Le piastre sono state illuminate con luce bianca (UV-) o lampada UV (UV+).

(massima a 509 nm) se esposta a luce UV standard (360-400 nm)<sup>3</sup>, mentre le varianti GFP<sub>mut2</sub> e GFP<sub>mut3</sub> hanno il picco di emissione a 507 e 511 nm quando eccitate dalla luce blu (450-495 nm)<sup>4</sup>. Tuttavia, a differenza della GFP<sub>UV</sub>, la fluorescenza emessa da queste varianti non può essere vista a occhio nudo, se non utilizzando un filtro giallo<sup>5</sup>.

Per ottenere controlli positivi più efficaci, gli Autori hanno generato nuove cassette di espressione per la GFP pilotate dalla T7RNA polimerasi o poste sotto il controllo del promotore sintetico *trc*. In tal modo,

hanno ottenuto ceppi di controllo per due specie di *Shigella* (*S. sonnei* ed *S. flexneri*), sette diversi isolati di *S. enterica* e uno per STEC O157: H7, ognuno dei quali esprime la GFP a livelli che ne consentono un facile rilevamento con lampade UV portatili e non necessita di selezione antibiotica (tabella 1). Nel corso dello studio, i ricercatori hanno anche ottenuto ulteriori dati sulla capacità di fermare il lattosio da parte dei ceppi di interesse di *S. tennessee* e sui relativi fenotipi.

### Valutazione dei ceppi di *Salmonella*

Per differenziare le salmonelle da altre *Enterobacteriaceae*, i batteriologi sfruttano la loro incapacità di fermentare il lattosio e il saccarosio e, al contempo, la loro capacità di produrre acido solfidrico (H<sub>2</sub>S).

Il panel di ceppi di *Salmonella* utilizzati dai laboratori della FDA<sup>6</sup> include ceppi tipici Lac<sup>-</sup> H<sub>2</sub>S<sup>+</sup> (come *S. Gaminera* 24 N), così come ceppi atipici (come *S. Minnesota* 2938H), che producono solo minime quantità di H<sub>2</sub>S, nonché H<sub>2</sub>S<sup>-</sup> *S. Senftenberg* 2064H, Lac<sup>+</sup> *S. Tennessee* 4083H e Suc<sup>+</sup> *S. Mbandaka* 37 N.

Mentre tutti i ceppi ricombinanti fluorescenti ottenuti nello studio descritto si sono rivelati biochimicamente identici ai loro ceppi parentali, come testimoniato dal colore delle colonie formatesi su

piastre di agar differenziali e selettivi tipicamente utilizzati per le salmonelle (agar HE, XLD, TSI, BS, LIA), sono state osservate interessanti differenze nel fenotipo fermentativo del lattosio negli isolati di *S. Tennessee*.

Durante i passaggi a 42 °C in assenza di ossigeno, sono stati osservati settori bianchi su diverse colonie fucsia formate dal ceppo originario Sal52 su MAC, fattore indicante l'instabilità di Lac<sup>+</sup>. Inoltre, mentre alcuni ceppi ottenuti da Sal52, come Sal62, hanno evidenziato una scarsa fluorescenza



su MAC, alcune colonie Lac<sup>+</sup> a fluorescenza più intensa (incluso Sal66) si sono potute osservare solo dopo due passaggi in anaerobiosi.

I test di stabilità non hanno mostrato alcuna perdita di fenotipo in seguito a monitoraggio su piastre di agar MAC con lampade UV portatili. Tuttavia, sebbene le colonie Sal66 fossero fucsia su MAC e arancione su agar HE, indicando il loro fenotipo fermentante il lattosio, queste colonie erano sorprendentemente rosse invece che gialle su agar XLD, un terreno che contiene 7,5 g/l di lattosio rispetto a 10 e 12 g/l per MAC e HE, rispettivamente (foto 1).

### Creazione di un panel rappresentativo di ceppi di *Salmonella*

I microbiologi alimentari utilizzano tradizionalmente un panel di ceppi di *Salmonella* in grado di rappresentare tutti i possibili fenotipi metabolici osservati per questo patogeno<sup>6</sup>. Attualmente, la maggior parte dei terreni differenziali impiegati per la coltura e l'isolamento delle salmonelle contengono lattosio e saccarosio (agar HE: 12 g/l; agar XLD: 7,5 g/l; agar TSI: 10 g/l), mentre l'agar MAC contiene solo lattosio (10 g/l) e viene considerato anche il terreno più indicato per l'isolamento di *Shigella*.

La presenza di indicatori di pH permette ai terreni acidificati dalla fermentazione degli zuccheri operata dai batteri di sviluppare colori distintivi: ad esempio, fucsia su MAC, giallo su XLD e giallo-arancio su HE. Tuttavia, sebbene considerate ancora atipiche, sono state segnalate varianti Lac<sup>+</sup> o Suc<sup>+</sup>. Inoltre, si deve considerare che sebbene la quasi totalità dei ceppi tipici di *Salmonella* produca abbondanti quantità di H<sub>2</sub>S

su substrati contenenti zolfo in combinazione con sali di ferro (con formazione di colonie color nero), ceppi occasionali di tutti i sierotipi di *Salmonella* potrebbero non produrre H<sub>2</sub>S nei suddetti terreni. Per questo, come accennato in precedenza, il panel di ceppi di controllo impiegati dai laboratori della FDA include salmonelle produttrici e non di H<sub>2</sub>S.

Per quanto riguarda i ceppi fluorescenti, si raccomanda cautela con *S. Tennessee* Sal62 e Sal66. Infatti, Sal62 ha il medesimo fenotipo del ceppo genitore sui terreni selettivi utilizzati per l'isolamento di routine di *Salmonella* da campioni alimentari e clinici, ma la sua fluorescenza, sebbene visibile ai raggi UV, non è così intensa come quella osservata per gli altri ceppi di controllo che ospitano la medesima cassetta. Per quanto riguarda Sal66, la sua fluorescenza è intensa, ma l'analisi genomica ha evidenziato la perdita di uno degli operoni cromosomici del lattosio e tale ceppo appare Lac<sup>+</sup> su HE e Lac<sup>-</sup> su XLD. E per quanto noto agli Autori, tale dicotomia nell'espressione di Lac nello stesso ceppo deve ancora essere osservata nei ceppi naturali atipici di *Salmonella*.

### CONCLUSIONI

Il successo ottenuto nella costruzione di alcuni ceppi di *Enterobacteriaceae* fluorescenti idonei ad essere impiegati come controlli positivi sottolinea la necessità di effettuare ulteriori studi, ma apre la strada alla creazione di nuovi strumenti semplici ed efficaci per accertare che la positività di un campione alimentare sia dovuta a una sua reale contaminazione e non a una cross-contaminazione accidentale avvenuta in laboratorio.

1. Binet R., Pettengill E.A., Hoffmann M., Hammack T.S., Monday S.R. Construction of stable fluorescent laboratory control strains for several food safety relevant *Enterobacteriaceae*. *Food Microbiol.*, 2018; 76:553-563. doi: 10.1016/j.fm.2017.10.014. (©Authors, www.creativecommons.org/licenses/by/4.0).
2. Binet R., Deer D.M., Uhlfelder S.J. Rapid detection of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* in produce enrichments by a conventional multiplex PCR assay. *Food Microbiol.*, 2014; 40:48-54. doi: 10.1016/j.fm.2013.12.001.
3. Cramer A., Whitehorn E.A., Tate E., Stemmer W.P. Improved green fluorescent protein by molecular evolution using DNA shuffling. *Nat. Biotechnol.*, 1996; 14(3):315-9.
4. Cormack B.P., Valdivia R.H., Falkow S. FACS-optimized mutants of the green fluorescent protein (GFP). *Gene*, 1996; 173:33-38.
5. Seville M. A whole new way of looking at things: the use of Dark Reader technology to detect fluorophores. *Electrophoresis*, 2001; 22(5):814-28.
6. Andrews W.H., Wang H., Jacobson A., Hammack T.S. *Salmonella*. *Bacteriological analytical manual*, U.S. Food & Drug Administration, 2016.

# Contaminazione microbica degli alimenti e automazione

lab ha intervistato Laura Franzetti, ricercatore confermato a tempo indeterminato presso il DeFENS (Dipartimento di Scienze per gli Alimenti, la Nutrizione e l'Ambiente) dell'Università di Milano.

a cura di Giovanni Abramo

Biologo

**“L**a contaminazione è, nella maggior parte dei casi, accidentale e avviene durante i vari “passaggi” dell'alimento, dal momento della sua produzione fino al momento in cui viene consumato. Per alcuni alimenti, le sostanze tossiche sono naturalmente presenti nell'alimento (ad esempio, i funghi velenosi), per altri ancora le sostanze tossiche sono state aggiunte volontariamente, in genere

*nell'ambito di una frode commerciale (adulterazione, sofisticazione)”.*

**lab:** Ancora oggi si parla di contaminazione microbiologica degli alimenti. Quali sono le specie batteriche interessate?

**Laura Franzetti:** Quando si parla di contaminazione microbiologica è necessario distinguere il ruolo

che i microrganismi hanno sull'alimento. Abbiamo microrganismi la cui presenza comporta esclusivamente la perdita delle caratteristiche sensoriali/organolettiche di un alimento, riducendo così la *shelf life* dello stesso. Questi microrganismi dipendono dall'alimento e dalla sua composizione. Sicuramente tra i microrganismi più spesso coinvolti, soprattutto nei prodotti freschi, abbiamo i batteri appartenenti al genere *Pseudomonas*. Si tratta di microrganismi aerobi con spiccate attività enzimatiche in grado di attaccare moltissimi substrati. Possiamo ricordare anche i batteri della Famiglia *Enterobacteriaceae* la cui presenza costituisce un importante indicatore di processo ovvero indicano se durante la lavorazione sono state rispettate le GMP o le GHP. Lieviti e muffe, le cui spore sono estremamente volatili, invece crescono formando classici bottoni colorati e rendendo poco gradito l'alimento.

Abbiamo poi i microrganismi patogeni, la cui presenza invece può rappresentare un pericolo per la salute del consumatore. Sicuramente tra questi quelli più importanti e più frequentemente coinvolti possiamo ricordare *Listeria monocytogenes*, tipica dei prodotti carnei, *Salmonella* spp., che indica sostanzialmente una contaminazione crociata, ma anche *Campylobacter*.

**lab:** La massima sicurezza di processo e una qualità del prodotto costantemente alta sono le regole dell'industria alimentare. Quali sono le attività che può elaborare e proporre un laboratorio microbiologico e con quali risultati?

**LF:** La stesura dei manuali di autocontrollo secondo

il sistema HACCP, successivamente all'analisi dei rischi, sono sicuramente gli strumenti più efficaci per garantire un prodotto sicuro ai consumatori. L'analisi dei rischi deve però essere fondata su basi scientifiche e pertanto la preparazione e la competenza degli Operatori del Settore Alimentare (OSA) sono di base. L'OSA deve conoscere a fondo il prodotto e le sue caratteristiche, soprattutto la sua finalità d'uso. L'allestimento di *challenge test* di prodotto e di processo e il ricorso alla microbiologia predittiva sono gli strumenti che l'OSA ha a disposizione per arrivare a stabilire sia la durabilità sia la sicurezza d'uso del prodotto. Proprio il *challenge test* può, ad esempio, fornire una giustificazione scientifica per il corretto posizionamento di prodotti RTE nelle categorie alimentari per *Listeria monocytogenes*, come previste nel Regolamento 2073/2005.

**lab:** Crescendo nei mercati la domanda di tracciabilità dei prodotti e dei lotti di produzione, l'automazione e strumentazione saranno sempre più decisive per la conservazione dei dati. Stesso discorso vale per l'igiene e la sicurezza: solo l'automazione può garantire il rigore dei cicli di lavaggio, il rispetto delle norme ambientali e la documentazione comprovante le caratteristiche dei prodotti. Tutto ciò è vero?

**LF:** L'automazione sicuramente comporta un forte miglioramento delle procedure nel garantire un prodotto sicuro. Tuttavia ciò non basta. È necessario che l'operatore sia formato ovvero deve conoscere quali sono le conseguenze di una operazione non effettuata o condotta in modo superficiale. In genere, questo vale sempre, ma in particolare per le operazioni di pulizia e disinfezione. Formare e informare gli operatori è alla base del sistema di autocontrollo. La stessa normativa europea (Pacchetto Igiene) attribuisce molta importanza a questa attività.

**lab:** A che punto siamo in Italia a livello di controllo della contaminazione e che cosa si deve fare ancora per rendere i prodotti alimentari sempre più sicuri?

**LF:** L'Italia è sicuramente ben messa. I controlli ci sono e sono anche ben condotti; il personale appartenente agli organi ufficiali (NAS, ASL ecc.) è molto preparato. Le aziende dal canto loro svolgono un autocontrollo. Forse qualche lacuna è possibile nelle piccole e medie aziende, ma anche in queste realtà negli ultimi anni si è assistito a un'importante presa di coscienza sulla sicurezza alimentare.



**Laura Franzetti,** laureata in Scienze delle Preparazioni alimentari presso l'Università degli Studi di Milano. Abilitata alla professione di Tecnologo Alimentare nel settembre 1998.

Attualmente è ricercatore confermato presso il DeFENS (Dipartimento di Scienze per gli Alimenti, la Nutrizione e l'Ambiente)

dell'Università di Milano. Docente presso la scuola di specializzazione in "Igiene e tecnologia del latte e derivati" della facoltà di veterinaria. Da anni si occupa delle problematiche relative alla microbiologia dei prodotti alimentari di origine sia animale sia vegetale.