



INSERTO

lab

- Processo agroalimentare, le certificazioni alla base dello sviluppo del settore 70
- Antibioticoresistenza e incubatoi, rischi per la salute e la sicurezza alimentare? 72



Processo agroalimentare, le certificazioni alla base dello sviluppo del settore

70

Le certificazioni di processo e di prodotto sono fondamentali per promuovere e garantire lo sviluppo tecnologico del settore agroalimentare. lab ha approfondito l'argomento intervistando Ettore Capri, Direttore dell'Osservatorio europeo per l'agricoltura sostenibile (OPERA), del Dipartimento di Scienze e Tecnologie alimentari per una Filiera agro-alimentare sostenibile presso l'Università Cattolica del Sacro Cuore (Piacenza).

a cura di Giovanni Abramo

Biologo

lab: Prima di tutto, cosa si intende per filiera agroalimentare?

Ettore Capri: È l'insieme degli attori e dei processi che prendono parte al ciclo di vita di un prodotto alimentare. Quindi, la "filiera", se organizzata, presuppone la presenza di una comunità i cui membri hanno un legame di interessi interdipendente e di varia natura. È la forma più avanzata di organizzazione alimentare che conosciamo e la cui strategia gestionale può permettere di raggiungere livelli di

efficienza economica, ambientale e sociale anche molto elevati.

lab: Una filiera agroalimentare può essere caratterizzata da lunghezza, località ecc. Può farci qualche esempio? E soprattutto, quali sono le sue considerazioni in merito?

EC: In passato, la filiera alimentare aveva una forma lineare, anche corta. Quelle moderne, soprattutto se concepite su principi di bioeconomia ed economia cir-

colare, sono molto lunghe e flessibili, grazie alla loro capacità di rispondere alle domande e ai bisogni di mercato. All'estremo inferiore, quindi, troviamo una filiera corta con solo due nodi: la produzione primaria, come ad esempio la coltivazione di un prodotto vegetale e la sua trasformazione come il prodotto vegetale in scatola. All'estremo superiore, le filiere lunghe possono avere diverse decine di nodi: ad esempio, l'allevamento di un bovino, la cui produzione primaria parte dalla coltivazione dei foraggi e dalla produzione di mangimi e a seguire tutti i suoi prodotti alimentari dalla tradizionale carne al latte, dai formaggi ai cosmetici, dai prodotti biomedici a quelli nutrizionali ed energetici, dai fertilizzanti ai farmaci veterinari, dai prodotti chimici a quelli fisici e tanti altri. Man mano che aumenta l'innovazione tecnologica e la capacità gestionale della filiera aumentano i nodi e, quindi, i prodotti e sottoprodotti, ma anche la sostenibilità economica, ambientale e sociale della filiera.

lab: A questo punto parliamo di certificazione. Quali sono le norme da seguire e soprattutto, allo stato attuale, quello che è stato normato è esaustivo?

EC: In Italia, le certificazioni di processo e di prodotto sia di carattere volontario che normativo hanno contribuito in questi anni allo sviluppo tecnologico del settore agroalimentare. La qualità e la sicurezza degli alimenti è aumentata in modo significativo, permettendo ai consumatori di disporre di una scelta alimentare a un prezzo accessibile. Inoltre, da non sottovalutare il ruolo degli enti di certificazione come guida di crescita e ammodernamento del settore, aiutando la trasposizione dei bisogni in regole.

lab: Lasciamo l'aspetto normativo e diamo uno sguardo alle analisi di laboratorio. Quali sono quelle a supporto e di supporto per certificare una filiera agroalimentare. Può farci degli esempi?



Prof. Ettore Capri,
Direttore dell'Osservatorio europeo per l'agricoltura sostenibile (OPERA), del Dipartimento di Scienze e Tecnologie alimentari per una Filiera agro-alimentare sostenibile, presso l'Università Cattolica del Sacro Cuore (Piacenza).

EC: Tutti gli standard che oggi caratterizzano la qualità degli alimenti sono misure analitiche che richiedono laboratori di analisi chimica. Oggi, la qualità alimentare non è solo nutrizionale e igienico-sanitaria. Abbiamo il nuovo fronte delle analisi sensoriali confermate chimicamente, abbiamo le misure della biodiversità, abbiamo misure biomolecolari, abbiamo la misura della tracciabilità, quelle delle impronte carboniche, idriche ed etiche. Infatti, si parla di una qualità sostenibile degli alimenti che richiede molte analisi; oltre a quelle classiche chimiche, richiede analisi biologiche, sensoriali, di calcolo e di gestione dei dati. Quindi, il laboratorio di analisi deve dotarsi di questi nuovi e moderni servizi.

lab: Certificare e certificato è sempre sinonimo di qualità per il consumatore?

EC: La certificazione è una garanzia che richiede prima di tutto il mercato, ma anche il consumatore, sebbene con modalità diverse. La certificazione è sinonimo di qualità reale, non solo percepita, quando è chiara e trasparente per l'utilizzatore finale. Solo in questo modo la certificazione è funzionale al suo ruolo sociale e tecnologico.

lab: Quali saranno gli scenari futuri a cui dobbiamo prepararci?

EC: I nuovi scenari sono la conseguenza soprattutto delle emergenze relative ai cambiamenti climatici e all'esigenza di promuovere una bioeconomia che si basi sull'economia circolare delle risorse. Le filiere tenderanno ad allungarsi anche quando i prodotti saranno territoriali, perché alcune delle materie necessarie ai processi avranno origini diverse. Questo comporta nuovi rischi alimentari – basti pensare, ad esempio, ai novel food – e alla difficoltà di tracciare i diversi passaggi. Avete mai provato a leggere il numero di ingredienti di un surrogato di olio di palma o di una bistecca di carne artificiale? A questo aggiungo la domanda in crescita degli alimenti e degli integratori per le nuove esigenze dietetiche, culturali e ideologiche che chiedono ai mercati di diventare più smart. Per far fronte al cambiamento, gli scenari futuri della certificazione dovranno arricchirsi e promuovere nuovi standard di riferimento. Prodotti alimentari, organizzazioni e territori certificati per la sostenibilità. Il *Made in Italy* ha già delle buone proposte presenti sui mercati internazionali, che intendono raccogliere le esperienze private e comunicarli. Lo standard pubblico VIVA (www.viticulturasostenibile.org) per il settore del vino e a breve per gli altri prodotti alimentari ne è esempio e apripista. Quindi, cari professionisti, occhi aperti e contribuiamo tutti ad arricchire le filiere.



Antibioticoresistenza e incubatoi, rischi per la salute e la sicurezza alimentare?

Gli incubatoi rivestono un ruolo strategico nel settore avicolo, rappresentando il "trait d'union" tra gli allevamenti di riproduttori e quelli da produzione. Il sistema intensivo e il trasferimento dei pulcini anche per lunghe distanze rendono questi impianti potenziali reservoir di microrganismi patogeni e una possibile fonte di rischi per il consumatore finale.

Francesco Ogliari
Medico veterinario



La prevalenza dei batteri antibioticoresistenti (*AntiMicrobial Resistant*, AMR) e in particolare di alcuni ceppi di *E. coli* è aumentata in modo considerevole, soprattutto nei Paesi a media industrializzazione, fino al punto da minacciare l'efficacia dei trattamenti clinici nella pratica medica e veterinaria. Le cause risiedono verosimilmente in un uso troppo "leggero" di questi farmaci e nell'assenza o scarsità di controlli. La preoccupazione deriva anche dal fatto che microrganismi in grado di sintetizzare molecole di resistenza quali le β -lattamasi ad ampio spettro (*Extended-Spectrum B-Lactamase*, ESBL) e le β -lattamasi AmpC, in genere, risultano caratterizzati da una concomitante bassa sensibilità verso altre classi di antibiotici. Particolare attenzione è stata rivolta verso il pollame, visto che la contaminazione può verificarsi in qualsiasi momento delle fasi di allevamento e produzione, come risultato dell'esposizione a un determinato ambiente, dell'impiego di mangimi o acqua di abbeverata infetti, di condizioni igieniche generali non ottimali, di una scarsa o mancata disinfezione nonché a seguito del contagio diretto tramite

gli animali stessi o gli operatori.

Dato l'incremento registrato negli ultimi decenni a livello mondiale della distribuzione di *E. coli* in grado di sintetizzare β -lattamasi, molte ricerche si sono focalizzate sulla tipizzazione di questi batteri nei broiler, effettuando prelievi in diversi momenti del processo produttivo. Tuttavia, poco si conosce riguardo la prevalenza e variabilità di questi microrganismi all'interno degli incubatoi, nonostante si tratti di un dato di farmacovigilanza essenziale per approfondire la minaccia legata alla pericolosità crescente dei coliformi. Un ambiente di incubazione indenne rivestirebbe un ruolo decisivo in termini di prevenzione per la salute pubblica e di sicurezza alimentare.

INCUBATOI E ANTIBIOTICORESISTENZA

Un recente studio¹ per valutare il possibile collegamento tra incubatoi e antibioticoresistenza è stato condotto in Egitto, un Paese per il quale si dispongono poche informazioni sulla somministrazione di antibiotici negli impianti di incubazione.

Sono stati selezionati 10 incubatoi geograficamente distanti e nel raggio di 40 km dai centri abitati, in una regione con una forte vocazione per le produzioni animali (cosa che può favorire una fonte comune di infezione o una pressione selettiva degli agenti patogeni), mentre le uova provenivano da svariati fornitori. In ogni struttura, sono stati raccolti 45 campioni di meconio dai pulcini di un giorno, per un totale di 450 prelievi e si è proceduto a effettuare anche 3 campionamenti ambientali in 8 punti diversi degli impianti, per un totale di 240 prelievi. L'indagine ha riguardato la ricerca di *E. coli* AMR mediante isolamento su terreno selettivo e differenziale e successiva conferma in PCR. Sono stati così isolati 65 *E. coli* patogeni, 30 dal meconio dei pulcini di 1 giorno e 35 dagli ambienti (condotti di aerazione: 3; incubatrici: 7; macchinari per la schiusa, 5; uova sterili: 7; acqua: 4; mani degli operatori: 3; celle frigorifere per le uova: 3; pavimenti: 3). Trai 10 incubatoi, solo in 3 non è stata evidenziata presenza di *E. coli*. I batteri identificati sono stati sottoposti a prove di laboratorio per valutarne l'attività emolitica, il sierotipo, la capacità di formare biofilm e la resistenza agli antibiotici. Inoltre è stata misurata la prevalenza dei geni ESBL e AmpC.

I risultati mostrano che *E. coli* AMR è ben rappresentato all'interno degli incubatoi egiziani ed è

caratterizzato da un'antibioticoresistenza molto variabile, mentre la trasmissione dell'infezione può avvenire direttamente tra i pulcini oppure tramite le strutture.

TIPIZZAZIONE DEI BATTERI ISOLATI

Per determinarne le caratteristiche fenotipiche, i batteri isolati sono stati esaminati sulla base di: attività emolitica, sierotipo, capacità di formare biofilm e resistenza agli antibiotici.

Sono stati identificati 15 sierotipi di *E. coli* provenienti da diverse fonti all'interno degli incubatoi e il sierotipo O128:K71 ha mostrato la prevalenza maggiore, oltre a essere l'unico identificato in una stessa struttura sia nei campioni ambientali sia in quelli di meconio, a indicare una limitata sovrapposizione tra le due popolazioni batteri-

che. Fortunatamente, in questa indagine non è stata riscontrata la presenza di nessuno dei "big six", i sei sierotipi di *E. coli* produttori di tossina Shiga (STEC), responsabili di gravi epidemie nell'uomo.

La formazione di biofilm è stata studiata in quanto ritenuta fondamentale per definire la capacità dei microrganismi di colonizzare le superfici (principalmente vetro e PVC delle attrezzature), garantendosi così la sopravvivenza e la persistenza in un determinato sito e, di conseguenza, influenzando la pericolosità del ceppo. I biofilm causano seri problemi negli impianti, aumentando la resistenza dei microrganismi ai fattori stressanti e proteggendoli dall'azione delle procedure di lavaggio e sanificazione. In questo caso, si è trattato di una caratteristica molto variabile, ri-

Tabella 1
Antibioticoresistenza dei sierotipi di *E. coli* isolati dai pulcini

Sierotipo	N. incubatoio	Colistina	Cefradina	Fosfomicina	Gentamicina	Cloramfenicolo	Neomicina	Enrofloxacin	Ciprofloxacina	Streptomicina	Norfloxacina	Amoxicillina	Ampicillina	Sulfa-Trimetoprim	Doxiciclina	Flumequin	Spiramicina	Spectinomina	Pefloxacin	Rifampicina	Ceftiofur	Ossitetraciclina	Clindamicina	Eritromicina
O1:K61	4	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R
O1:K61	4	S	S	S	S	S	S	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
O2:K69	6	S	S	S	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
O2:K69	6	S	S	S	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
O8:K60	6	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R
O8:K60	6	S	S	S	S	R	S	S	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R
O8:K60	6	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R
O25:K-	7	S	S	S	S	S	S	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R
O25:K-	7	S	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R
O78:K80	7	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
O78:K80	7	S	S	S	S	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
O78:K80	7	S	S	S	R	R	S	R	S	R	R	S	R	R	R	R	S	R	S	R	R	R	R	R
O86:K61	3	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R
O86:K61	3	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R
O86:K61	4	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R
O86:K61	4	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	R	S	R	R	R
O86:K61	2	S	S	S	S	S	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	S	R
O86:K61	2	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R	R	S
O119:K58	5	S	S	S	S	R	R	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R

S: sensibile; R: resistente.



scontrabile soprattutto tra gli isolati provenienti dall'ambiente rispetto a quelli che contaminano gli animali, come del resto sembra logico potersi attendere.

La sensibilità agli antibiotici dei 65 batteri isolati è stata valutata mediante il confronto con 23 molecole e la tecnica dei dischetti antibiotati. Per tutti i ceppi di *E. coli* è stata riscontrata sensibilità nei confronti della cefradina e della fosfomicina e resistenza alla spectinomina.

Infine, è stata condotta anche un'analisi genetica, mediante PCR, per valutare la distribuzione dei geni per le lattamasi ESBL classe A e ampC, dato che rappresentano l'origine del problema per la salute umana.

E. COLI AMBIENTALI ED E. COLI NEL MECONIO, ANALOGIE E DIFFERENZE

Dai pulcini sono stati isolati 30 *E. coli* appartenenti a 10 differenti sierotipi, tra cui il più rappresentato è risultato O86:K61 (20%), mentre i sierotipi ambien-

tali individuati sono stati 7. La quasi totalità di questi microrganismi è in grado di produrre l'esotossina α -emolisina e una certa percentuale (8,6% tra i batteri ambientali) la β -emolisina: i ceppi emolitici manifestano una virulenza maggiore di quelli non emolitici, come ampiamente dimostrato nei coli aviari.

Come già accennato, la capacità di produrre biofilm è molto eterogenea, variando da debole a molto forte: questa caratteristica è presente in particolare tra i ceppi ambientali, visto che solo il 17% non è risultato un buon produttore di biofilm.

Gli antibiotici β -lattamici sono inattivi nella maggior parte dei casi, a eccezione del ceftiofur, che sembra parzialmente efficace, ed è comune anche la resistenza a diverse altre molecole quali doxiciclina, ossitetraciclina e soprattutto spectinomina. Tra i fluorochinoloni sono poco efficaci la norfloxacina (in assoluto, con il 93% di ceppi resistenti), la flumechina, la pefloxacina e l'enrofloxacin, mentre la ciprofloxacina è abbastanza attiva, con una resistenza limitata al 30% dei ceppi tra i batteri del meconio (tabella 1). In genere, anche la capacità di resistenza

Tabella 2
Classificazione e indice di priorità degli antibiotici in base all'importanza in medicina umana e veterinaria

Antibiotico	Classe antimicrobica	Importanza medica
Colisitina	Polimixine	PM, AEI
Cefradina	Cefalosporine	AMI
Ceftiofur	Cefalosporine	PM, AEI
Fosfomicina	Derivati dell'acido fosforico	PM, AEI
Gentamicina	Aminoglicosidi	PM, AEI
Neomicina	Aminoglicosidi	PM, AEI
Streptomicina	Aminoglicosidi	PM, AEI
Cloramfenicolo	Amfenicoli	AMI
Enrofloxacin	Chinoloni e fluorchinoloni	PM, AEI
Ciprofloxacina	Chinoloni e fluorchinoloni	PM, AEI
Norfloxacina	Chinoloni e fluorchinoloni	PM, AEI
Flumechina	Chinoloni e fluorchinoloni	PM, AEI
Pefloxacina	Chinoloni e fluorchinoloni	PM, AEI
Amoxicillina	Penicilline	PM, AEI
Ampicillina	Penicilline	PM, AEI
Sulfametossazolo/Trimetoprim	Sulfonamidi, in associazione a inibitori della diidrofolato reductasi	AMI
Spiramicina	Macrolidi e chetolidi	PM, AEI
Eritromicina	Macrolidi e chetolidi	PM, AEI
Spectinomina	Aminociclitoli	PM, AEI
Rifampicina	Ansamidine	PM, AEI
Ossitetraciclina	Tetraciclina	AMI
Doxiciclina	Tetraciclina	AMI
Clindamicina	Lincosamidi	AMI

PM: priorità massima; AEI: antibiotico estremamente importante; AMI: antibiotico molto importante

alla gentamicina è bassa, limitandosi a un massimo del 10%. La fosfomicina è attiva verso tutti, la colisitina mostra i risultati migliori con i microrganismi provenienti dagli animali e la cefadina con quelli ambientali.

Questa eterogeneità nelle proprietà di resistenza antibiotica suggerisce come nessuno dei batteri presenti a livello di struttura o nel meconio degli animali sia clonale o appartenente al medesimo ceppo. I numeri confermano il potenziale ruolo di questi impianti come reservoir di patogeni e sorgente di diffusione delle infezioni alimentari da colli.

La presenza dei geni che codificano per β -lattamasi ESBL classe A e tipo ampC, alla base dell'antibiotico-resistenza, è stata indagata mediante analisi PCR, mostrando come la loro prevalenza sia molto variabile: nei batteri del meconio la prevalenza dei geni ESBL oscilla dal 60% al 93%, mentre quelli ambientali sembrano rappresentare un valido reservoir soprattutto per i geni ESBL blaTEM e blaOXA-1, potendo diffonderli lungo tutta la catena di produzione.

Curiosamente, tra gli isolati dal meconio, solo il 6,7% non veicola nessun gene di resistenza, mentre la possibilità di una trasmissione orizzontale mediante plasmidi conferma il reale rischio di un'ampia diffusione di questa deleteria capacità.

Nessuno dei colli identificati è classificabile come PDR (*PanDrug-Resistant*, resistente a tutti gli antibiotici di tutte le classi testate), il 70% circa è MDR (*MultiDrug-Resistant*, resistente a tutti gli antibiotici di almeno 3 classi potenzialmente attive) e il 30% è XDR (*eXtensively Drug-Resistant*, resistente a tutti gli antibiotici tranne 2 o meno classi potenzialmente attive).

La variabilità dei pattern di resistenza indica la presenza di pool di geni o di possibilità differenti di associazione tra essi all'interno degli impianti di incubazione. Inoltre, la classificazione tassonomica dei 65 isolati ottenuti secondo i tratti fenotipici e genotipici evidenzia una distinzione abbastanza netta tra batteri dei pulcini (meconio) e batteri ambientali, suggerendo il ruolo decisivo di questi due re-

servoir nella selezione di determinate caratteristiche microbiche.

I batteri isolati dai pulcini sembrano dunque presentare un'origine diversa da quelli presenti nelle strutture. Le principali differenze fra i due gruppi riflettono verosimilmente il diverso comportamento dei microrganismi nelle due nicchie, per cui i batteri del meconio veicolano più frequentemente i geni *ampC* mentre i batteri ambientali sono migliori produttori di biofilm.

CONSIDERAZIONI

Il continuo ricorso agli antibiotici ha conseguenze dirette sul problema sempre più incombente della resistenza. L'impiego di questi farmaci risulta diffuso soprattutto nel settore agrozootecnico: recentemente è stato stimato che oltre 1.500 decessi all'anno nell'Unione Europea siano direttamente correlati all'uso di antibiotici nel settore avicolo e che il 56% dei geni di resistenza identificati nei microrganismi patogeni per l'uomo siano identici ai geni ottenuti da ceppi di *E. coli* isolati nel pollame. A livello mondiale, bilioni di polli ricevono cefalosporine di terza generazione già nell'uovo o a un giorno di vita al fine di controllare le infezioni da *E. coli*, una pratica che ha favorito la nascita di grandi reservoir di antibioticoresistenza grazie ai meccanismi della pressione selettiva.

Lo studio qui riportato ha dimostrato come la resi-

stenza verso classi di principi attivi di impiego comune nell'allevamento intensivo, quali macrolidi e tetracicline, sia più frequente rispetto alla resistenza verso antibiotici meno utilizzati. Unica eccezione la resistenza alle lincosamidi (clindamicina), che rimane relativamente e inaspettatamente bassa. Un'importante dato emerso è l'efficacia ancora abbastanza buona di "vecchi antibiotici" come la colistina, la fosfomicina e la cefradina, che sono inseriti nella lista dei farmaci essenziali dall'OMS e tra le molecole fondamentali richieste per le attività sanitarie di base (*tabella 2*).

Tra i batteri isolati negli incubatoi egiziani, sono stati individuati alcuni sierogruppi di *E. coli*, quali O1, O2, O8 e O78, spesso coinvolti in focolai di infezione in campo, come ad esempio episodi di mortalità precoce tra i pulcini. Molti di essi mostrano profili fenotipici MDR o XDR.

L'analisi di correlazione ha evidenziato che la contemporanea resistenza verso diversi principi attivi può giustificare le forti preoccupazioni per la salute umana e animale. D'altro canto, è altrettanto vero che la resistenza a certi antimicrobici si accompagna a sensibilità verso altri.

In conclusione, nello studio qui descritto, l'ipotesi che i sierotipi di *E. coli* identificati nel pollame possano fungere da reservoir per i geni che inducono resistenza, favorendone il potenziale trasferimento a microrganismi patogeni per l'uomo, è dunque confermata.

Osman K.M., Kappell A.D., Elhadidy M., ElMougy F., El-Ghany W.A.A., Orabi A., Mubarak A.S., Dawoud T.M., Hemeg H.A., Moussa I.M.I., Hessain A.M., Yousef H.M.Y. Poultry hatcheries as potential reservoirs for antimicrobial-resistant *Escherichia coli*: A risk to public health and food safety. *Sci. Rep.*, 2018; 8(1):5859. doi: 10.1038/s41598-018-23962-7. (©Authors, www.creativecommons.org/licenses/by/4.0).