

INSERTO

lab

- **Acqua di lavaggio dei prodotti pronti al consumo, un dispositivo microfluidico per monitorare la contaminazione batterica** 78
- **labNews** 82



**Acqua di lavaggio
dei prodotti pronti
al consumo, un dispositivo
microfluidico
per monitorare
la contaminazione
batterica**

Le malattie di origine alimentare rappresentano una minaccia globale per la salute pubblica e i focolai che si registrano in ogni parte del mondo vedono spesso implicati i prodotti freschi e le verdure a foglia verde. È quindi fondamentale sviluppare nuovi metodi o migliorare quelli già esistenti, al fine di affinare la capacità di depistare eventuali contaminazioni alimentari. Interessanti sono i risultati ottenuti con un dispositivo microfluidico messo a punto per il rivelamento di *Salmonella Typhimurium* nell'acqua di lavaggio di lattuga tagliata pronta al consumo.

Gabriella Carcassola

DMV, PhD

Le malattie di origine alimentare rappresentano un grave problema di salute pubblica in tutto il mondo e, secondo l'Organizzazione mondiale della Sanità, nel 2010, i casi registrati sono stati circa 2 miliardi, con oltre 1 milione di decessi, mentre i Centers for Disease Control and Prevention (CDC) stimano che negli Stati Uniti, ogni anno, i casi siano circa 48 milioni, molti dei quali imputabili a *Salmonella enterica* non tifoidea.

Le industrie alimentari che producono prodotti pronti al consumo, come le verdure, sono particolarmente esposte al rischio di contaminazione da parte di agenti patogeni lungo tutto il percorso *farm-to-consumer*, per diversi motivi: minima lavorazione, danni ai tessuti vegetali che favoriscono la proliferazione microbica e natura deperibile dei prodotti. Quindi, data la minaccia continua di contaminazioni, l'industria alimentare deve controllare co-

79

Schema del flusso di lavoro che evidenzia gli input, l'output, la preparazione dei campioni e la procedura di fluorescenza

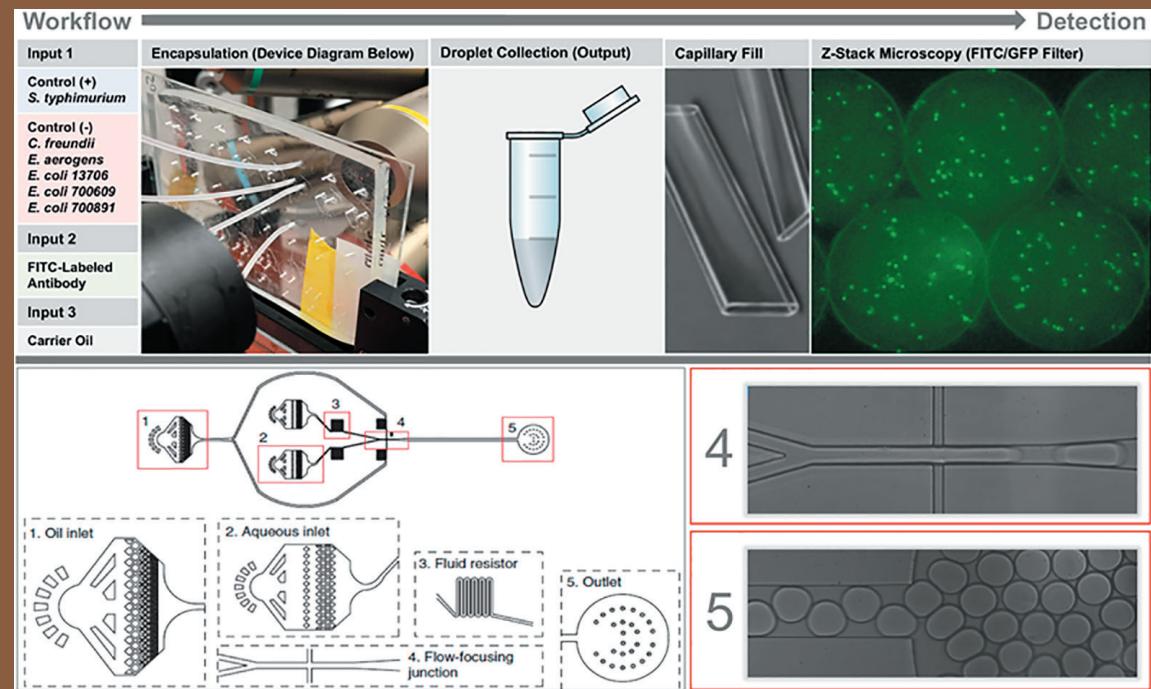


Tabella 1								
Fasi log e lag delle specie batteriche testate in differenti brodi di coltura e a diverse temperature								
Ceppo batterico	TSB 37 °C		BPW 37 °C		RV 37 °C		RV 41,5 °C	
	Fase log (min)	Fase lag (h)	Fase log (min)	Fase lag (h)	Fase log (min)	Fase lag (h)	Fase log (min)	Fase lag (h)
<i>S. Typhimurium</i>	37,5	4	51,4	5,5	39,8	6	91,2	< 1
<i>C. freundii</i>	39,6	6	66,7	6,5	103,5	9,5	Nessuna crescita	
<i>E. aerogenes</i>	23,1	3,75	35,2	3,5	49,2	7,5	Nessuna crescita	
<i>E. coli</i> 700609	28,7	5,5	60,8	5,5	Nessuna crescita		Nessuna crescita	
<i>E. coli</i> 13706	28,8	5	42,5	6	Nessuna crescita		Nessuna crescita	
<i>E. coli</i> 700891	24,8	4	38,7	4,25	Nessuna crescita		Nessuna crescita	

Fase log: fase di crescita esponenziale (raddoppio della popolazione); **fase lag:** fase di latenza; **TSB:** Tryptic Soy Broth; **BPW:** Buffered Peptone Water; **RV:** Rappaport-Vassiliadis broth; **PBS:** Phosphate Buffered Saline.

stantemente i *Critical Control Point* (CCP), che sono particolarmente numerosi per i prodotti agricoli da sottoporre a taglio e che comprendono l'irrigazione, il lavaggio, la manipolazione e la durata di conservazione. Più in particolare, le acque di lavaggio delle verdure fresche e a foglia verde svolgono un importante ruolo nelle fasi di lavorazione, dalla rimozione dei detriti dalla superficie dei vegetali alla disinfezione. E proprio l'acqua di lavaggio ha un elevato potenziale di contaminazione crociata. Per questo, numerosi ricercatori stanno esplorando metodi efficaci e rapidi per ridurre tale rischio. Un recente studio¹ ha dimostrato la potenziale utilità di un sistema microfluidico come strumento di rilevazione rapida e descrive il suo impiego per l'identificazione di *Salmonella Typhimurium* nell'acqua fornita da un'industria alimentare e utilizzata per il lavaggio di lattuga tagliata.

SELEZIONE DELLE CONDIZIONI DI ANALISI

La microfluidica è la scienza che si occupa della processazione e della manipolazione di gocce di fluidi (o bolle), attraverso canali con dimensioni di pochi micrometri. Tale tecnologia amplia notevolmente la capacità di esplorare sistemi chimici e biologici, aumentando la velocità di analisi e la sensibilità rispetto ai metodi convenzionali, il tutto riducendo i costi. Infatti, la microfluidica consente la generazione e la valutazione di milioni di cellule in poche ore e le sue possibili applicazioni includono l'identificazione di metaboliti e lo studio di singole popolazioni cellulari. Nello studio descritto, sono state sottoposte a test cinque specie batteriche (un controllo positivo

e cinque negativi) (figura 1 e tabella 1) e, a prima vista, la temperatura ideale per inibire la crescita di tutti i ceppi batterici diversi da *S. Typhimurium* risulterebbe 41,5 °C (brodo RV). Tuttavia, a tale temperatura, il tasso di crescita di *S. Typhimurium* è risultato decisamente ridotto e, di conseguenza, per i test successivi in "goccioline microfluidiche" è stato selezionato il brodo RV e una temperatura di incubazione di 37 °C, nonostante tali condizioni non inibiscano la crescita di *C. freundii* ed *E. aerogenes*. Quindi, per aumentare la specificità del test è stato utilizzato un anticorpo specifico per *S. Typhimurium*, marcato con isotiocianato di fluoresceina (*Fluorescein isothiocyanate*, FITC).

CRESCITA BATTERICA "IN GOCCIA"

I ricercatori, nel corso della sperimentazione, hanno confrontato anche la crescita di *S. Typhimurium* "in goccia" con quella che normalmente si ottiene in colture convenzionali, giungendo alla conclusione che, in queste ultime, i tempi di generazione sono più rapidi e i tempi di latenza più brevi. Tuttavia, in studi precedenti, sono stati riportati tempi di crescita "in goccia" più rapidi (fase log compresa tra 1 e 2 ore) e tempi di latenza inferiori, probabilmente per diversi accorgimenti adottati durante il trattamento dei campioni, come miscelazione rapida, riduzione di contaminanti e volumi estremamente ridotti. Di conseguenza, la tecnologia microfluidica ha già saputo dimostrare il suo potenziale nella rivelazione batterica. È bene tuttavia sottolineare che i tassi di crescita in mezzi convenzionali sono stati calcolati

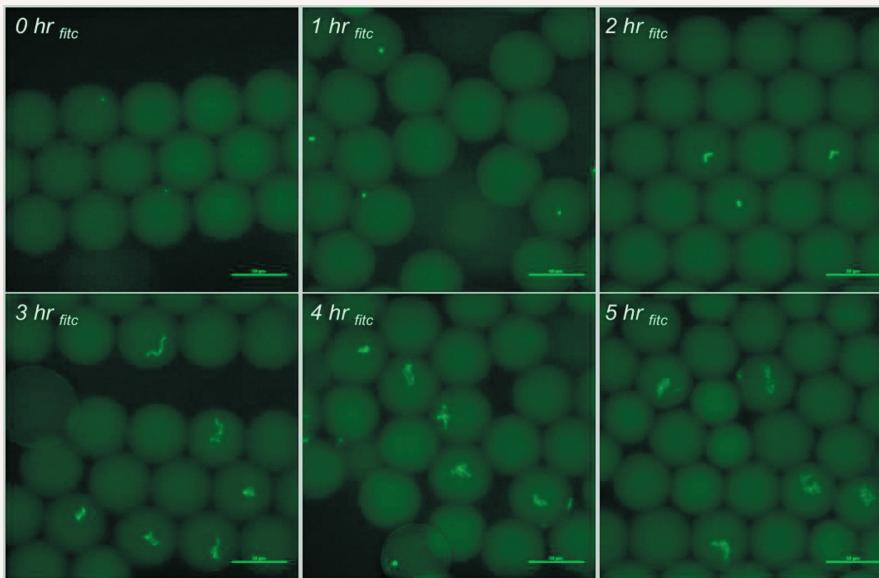


Foto 1.
Immagini fluorescenti ottenute dopo incubazione di *S. Typhimurium* con acqua di lavaggio di lattuga tagliata.

con la misura della torbidità delle colture batteriche e che i terreni utilizzati non contenevano l'anticorpo marcato FITC.

TEST SULL'ACQUA DI LAVAGGIO DI LATTUGA TAGLIATA

I test condotti seguendo il protocollo messo a punto e aggiungendo l'acqua di lavaggio di lattuga tagliata hanno fornito risultati interessanti. Tali esperimenti sono stati condotti per simulare l'analisi di un campione altamente contaminato e monitorare la cinematica di crescita in goccia nell'arco di 5 ore (foto 1). I risultati hanno rivelato che l'acqua di lavaggio è in grado di ridurre il segnale fluorescente di *S. Typhimurium* rispetto a quello ottenuto in sua assenza. Tale osservazione, considerando che l'intensità della fluorescenza di FITC si riduce man mano che il pH si abbassa, suggerisce che il pH dell'acqua di lavaggio è un fattore da prendere in considerazione.

IN CONCLUSIONE

I risultati ottenuti dai ricercatori del Department of Environmental Health and Engineering, della

Johns Hopkins Bloomberg School of Public Health (Baltimore, Maryland), sottolineano la necessità di condurre ulteriori test per aumentare le capacità di rivelamento rapido della tecnica microfluidica messa a punto. E la soluzione potrebbe risiedere nell'accoppiare la microfluidica con tecniche di concentrazione batterica, molte delle quali sono potenzialmente compatibili con i dispositivi microfluidici, come la centrifugazione a flusso continuo e l'ultrafiltrazione.

È infatti fondamentale sottolineare l'assoluta necessità di sviluppare e migliorare i metodi di sorveglianza, al fine di individuare rapidamente ed efficacemente le contaminazioni alimentari, in quanto il miglioramento delle strategie HACCP è la strada più efficace per garantire forniture alimentari più sicure. Inoltre, lo sviluppo di nuove metodologie per isolare, individuare e prevenire i focolai di malattie di origine alimentare è essenziale per ridurre la mortalità, i ricoveri e i costi ad essi inevitabilmente associati. Se implementate sistematicamente con tecnologie ingegneristiche emergenti, le applicazioni basate sulla tecnologia microfluidica mostrano grandi potenzialità per il rivelamento rapido (stesso giorno) dei batteri nei CCP, come le acque utilizzate per il lavaggio delle verdure tagliate e pronte al consumo.



1. Harmon J.B., Gray H.K., Young C.C., Schwab K.J. Microfluidic droplet application for bacterial surveillance in fresh-cut produce wash waters. *PLoS One*, 2020. doi: 10.1371/journal.pone.0233239. (©Authors, <https://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>).

► Alimenti e contaminazioni, le possibili **APPLICAZIONI** degli **APTAMERI**

L'uso di singoli filamenti di DNA o RNA, detti aptameri, rappresenta uno dei metodi alternativi per la rivelazione di contaminanti "indesiderati" presenti negli alimenti. La tecnica, nota come evoluzione sistematica di ligandi per arricchimento esponenziale (*Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment, SELEX*), nata negli anni '90, consente la selezione di specifici oligonucleotidi sintetizzabili chimicamente ed è stata oggetto di numerosi studi, tanto che oggi è indicata per diverse applicazioni¹. Gli aptameri sono oligonucleotidi a singolo filamento, caratterizzati da un'elevata specificità e affinità per le molecole bersaglio. Grazie alla loro capacità di assumere diverse configurazioni tridimensionali, sono in grado di legarsi a diversi bersagli, tra cui amminoacidi, vitamine, nucleotidi, proteine, pesticidi, principi attivi, batteri, composti organici e inorganici. Un'evoluzione della SELEX è la tecnica cell-SELEX che, per la selezione degli oligonucleotidi, non parte da un bersaglio purificato (molecola), ma da cellule intere. Infatti, negli ultimi anni, questa tecnica è stata impiegata per la selezione di aptameri specifici per diversi microrganismi, tra cui *Salmonella Typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* O157:H7 ecc. Inoltre, per ampliare le loro possibili applicazioni, gli aptameri possono essere coniugati a nanostrutture, come nanoparticelle, idrogel e nanostrutture di carbonio, nonché a fluorofori e cromofori, per il rilevamento visivo. Tuttavia, pur essendo economici e selettivi, gli aptameri non trovano ancora applicazioni nell'industria agroalimentare, in quanto, per essere applicati su scala industriale, alcuni aspetti devono essere migliorati (preparazione del campione, concentrazioni della molecola/organismo target, presenza di contaminanti). Ma, in un momento in cui il mercato si sta orientando verso biosensori sempre più rapidi e selettivi per prevenire le contaminazioni degli alimenti, i ricercatori considerano gli aptameri un'ottima alternativa alle tecniche tradizionali.

1. Schmitz F.R.W., Valério A., de Oliveira D., Hotza D. An overview and future prospects on aptamers for food safety. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 2020. doi: 10.1007/s00253-020-10747-0.



Linfonodi bovini come possibile fonte di **CONTAMINAZIONE** della **CARNE** da *E. coli*

La contaminazione della carne macinata da *Escherichia coli*, in genere, è dovuta alla contaminazione fecale della carcassa durante il processo di macellazione. Ma un'ipotesi più recente e convincente è che anche i linfonodi possono essere una potenziale fonte di contaminazione da *Enterobacteriaceae*. Un recente studio¹ ha indagato la presenza di *E. coli* nei linfonodi di carcasse di manzo utilizzate per la produzione di carne macinata, in sei impianti di macellazione dell'Italia centrale. Un totale di 597 linfonodi precrurali sono stati ottenuti da 597 carcasse di bovini. I ceppi di *E. coli* isolati sono stati testati per i geni stx1, stx2, eaeA e hlyA, comunemente impiegati per identificare *E. coli* STEC (*Shiga Toxin-Producing Escherichia coli*), e valutati per la suscettibilità agli antibiotici. I risultati hanno evidenziato che il 34,2% delle carcasse è positivo per *E. coli* e che il 29% dei ceppi isolati possiede stx1 o stx2 (pari al 9,9% delle carcasse sottoposte a campionamento). Oltre il 95% degli isolati è risultato sensibile a gentamicina, ceftriaxone, ciprofloxacina e cefotaxima, mentre sono stati registrati alti tassi di resistenza a cefalotina, ampicillina, tetraciclina, triple sulfa e streptomicina. L'analisi multivariata ha identificato "l'età" come il fattore più strettamente correlato alla positività per *E. coli* (generico o STEC) nei linfonodi bovini. In conclusione, i linfonodi precrurali rappresentano una fonte di contaminazione da *E. coli* per la carne macinata. Questi risultati sono di grande importanza per la valutazione del rischio e il miglioramento delle buone pratiche di macellazione e produzione di carne macinata.

1. Grispoldi L., Karama M., Hadjicharalambous C., de Stefani F., Ventura G., Ceccarelli M., Revoltella M., Sechi P. et al. Bovine lymph nodes as a source of *Escherichia coli* contamination of the meat. *Int. J. Food. Microbiol.*, 2020. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108715.

