



UNIVERSITÀ
CATTOLICA
del Sacro Cuore

Food security e food safety tra innovazione agro-alimentare e tradizioni culturali

II parte

Daniela Bassi

Istituto di Microbiologia, Centro Ricerche Biotecnologiche,
Facoltà di Agraria, UCSC Piacenza e Cremona

daniela.bassi@unicatt.it



Microorganismi: rischio principale per l'igiene e la qualità degli alimenti

- **microorganismi**, i batteri, i virus, i lieviti, le muffe, le alghe, i protozoi parassiti, gli elminti parassiti microscopici, le loro tossine e i loro metaboliti;

Acc.V |—————| 2 μ m
30.0 kV



UNIVERSITÀ
CATTOLICA
del Sacro Cuore

Le principali fonti di contaminazione degli alimenti sono di origine biologica o chimica: **microrganismi patogeni, micotossine e composti chimici.**

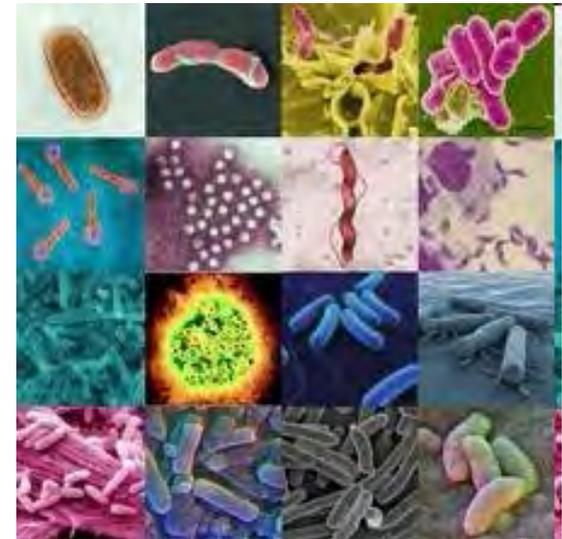
La maggior parte degli episodi di infezioni alimentari è di origine microbica e la contaminazione può avvenire in qualsiasi punto del processo produttivo

PATOGENI ALIMENTARI

Lo sviluppo dei microrganismi dipende dalle caratteristiche dell'alimento quali acqua libera, pH, potenziale di ossido-riduzione, quantità di nutrienti, dai trattamenti ai quali è stato sottoposto, dalle condizioni di conservazione.

I principali patogeni alimentari includono:

- *Salmonella*
- *Campylobacter*
- *Listeria monocytogenes*
- Variante patogena di *Escherichia coli*
- *Yersinia*
- *Shigella*
- *Enterobacter*
- *Citrobacter*
- Virus



A questi si aggiungono i batteri produttori di tossine quali *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum* e *Bacillus cereus*.



I microrganismi patogeni

Quelli che..... sono inattivati dai trattamenti termici

B. cereus
Camp. Jejuni
Cl. perfringens
E. coli
L. monocytogenes
Shigella
Salmonella
Staphylococcus aureus
Y. enterocolitica

Quelli che..... producono tossine

Staphylococcus aureus
B. cereus
(tossine termostabili)
Cl. botulinum
(tossine termosensibili)
Cl. perfringens
B. cereus
(se ingeriti in levate quantità provocano diarrea)

Quelli che.....producono spore e resistono alla bollitura

B. cereus
Cl. botulinum
Cl. perfringens

Quelli che.... possono crescere a basse temperature

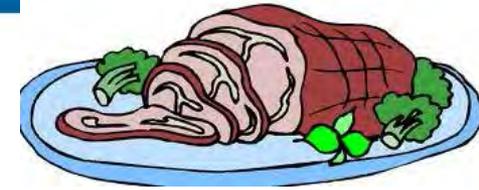
L. monocytogenes
B. cereus





PATOGENI ALIMENTARI

Alimenti veicolo di infezione:



➤ Alimenti deperibili: carne, pesce, molluschi, latte, uova, ortaggi

- Ricchi in proteine, carboidrati, grassi, vitamine e sali minerali
- pH vicino alla neutralità
- Elevato contenuto di acqua



➤ Alimenti potenzialmente a rischio: frutta, salumi, formaggi, yogurt, creme pastorizzate, vino, aceto

- pH relativamente acido
- Presenza di sale e antimicrobici (ex. nitriti, nitrati)
- Pastorizzazione



➤ Alimenti non-deperibili: conserve, cereali, zucchero, cacao, caffè, spezie

- Ridotta acqua libera
- Ottimo terreno di crescita per *B. cereus*, *C. botulinum*, *Aspergillus*





UNIVERSITÀ
CATTOLICA
del Sacro Cuore

IL RUOLO DELLA RICERCA IN MICROBIOLOGIA e SICUREZZA ALIMENTARE

La scienza deve poter fornire:

- nuove conoscenze scientifiche per prevenire i rischi microbiologici negli alimenti
 - conoscenze sui microrganismi patogeni possibile fonte di contaminazione e sui batteri responsabili di alterazioni degli alimenti (“spoilage”)
 - conoscenze sui microrganismi con particolari proprietà tecnologiche e funzionali (probiotici, proprietà antimuffa, *starters* per salumi e formaggi, etc)
- metodi analitici rapidi e sensibili

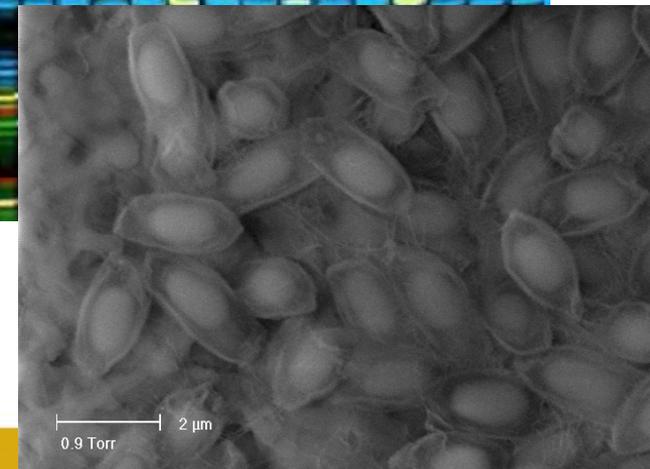
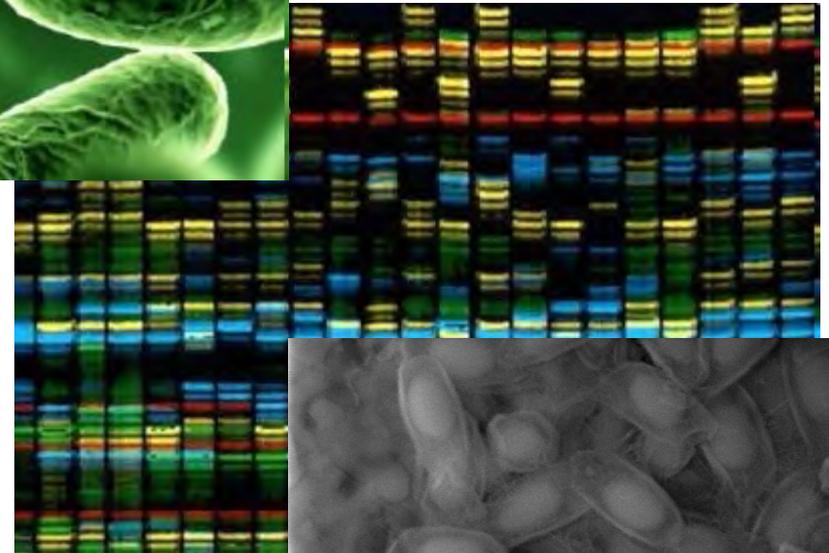
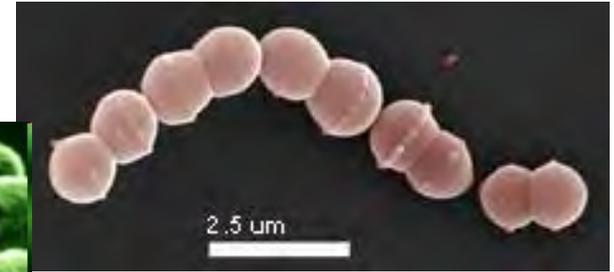




Nuovi metodi di studio

- ⊙ Biologia Molecolare
- ⊙ Scienze Omiche
- ⊙ Genomica
- ⊙ Trascrittomica
- ⊙ Proteomica
- ⊙ Metabolomica
- ⊙ Analisi high-throughput

Interconnessione tra differenti
discipline scientifiche



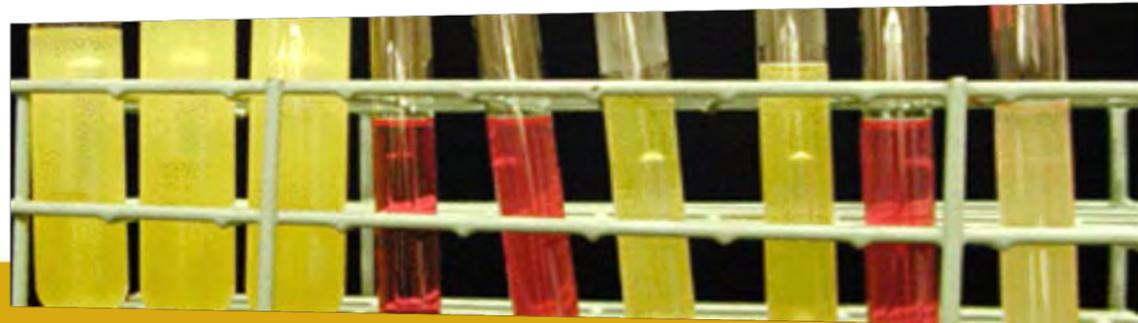


UNIVERSITÀ
CATTOLICA
del Sacro Cuore

Metodi tradizionali coltivazione-dipendente

Enumerazione delle UFC in piastra e MPN

- ⊙ Basati sulla crescita (UFC)
 - ⊙ Quantitativi
 - ⊙ Presenza/Assenza
- ⊙ Limiti
 - ⊙ **tempi**
 - ⊙ fenotipo
 - ⊙ specificità
 - ⊙ Cellule vitali ma non coltivabili (VNC)
 - ⊙ virus





UNIVERSITÀ
CATTOLICA
del Sacro Cuore

Metodiche molecolari coltivazione-indipendenti

Basate sullo studio del DNA/RNA batterico

ESTRAZIONE DNA/RNA BATTERICO TOTALE da alimento

DNA

- Ricerca di geni
 - Specie-specifici (geni strutturali, tossine)
 - Universali (16S-18S)
- Identificazione Tassonomica
- Strain typing

RNA

- Espressione genica
- Geni specifici: tossine, fattori di virulenza
- Vitalità cellulare (per la sua corta vita media l'mRNA è un buon indicatore di vitalità delle cellule)

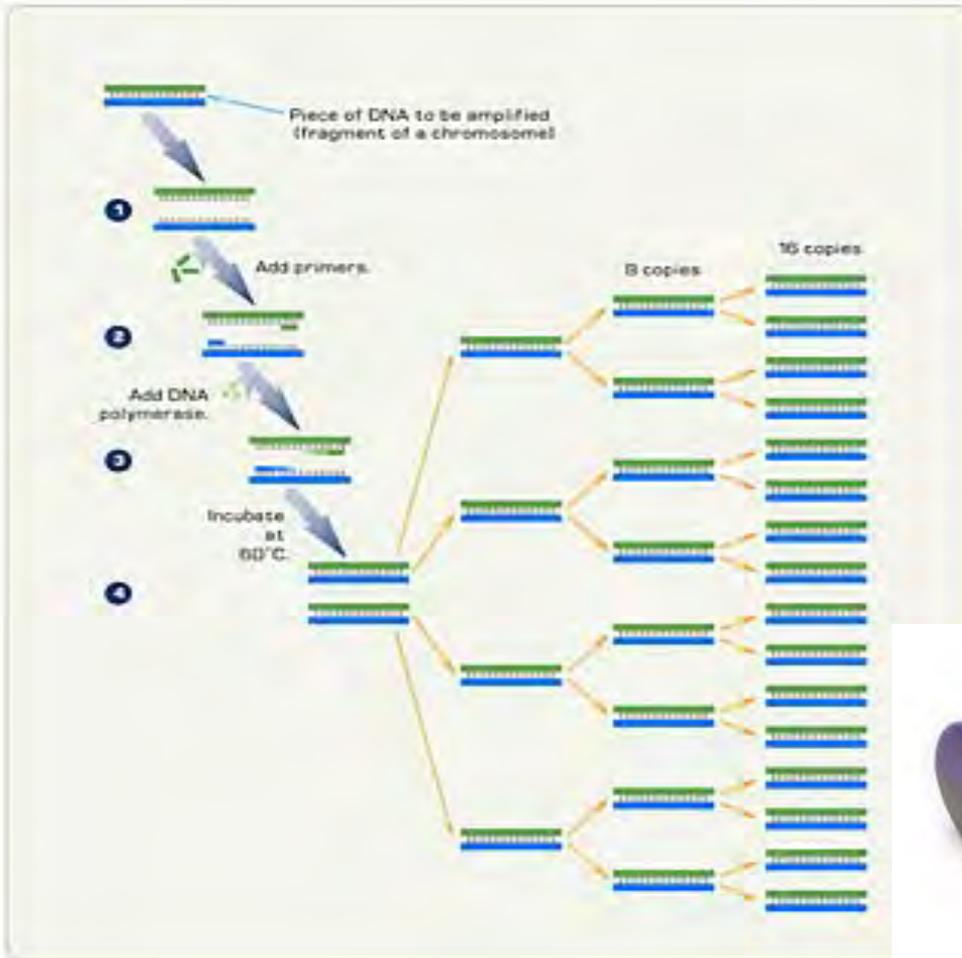


Punti di forza: rapidità (24-48h), elevata specificità, metodi qualitativi e quantitativi

Metodiche molecolari

1^a generazione dei saggi molecolari

Reazione a catena della polimerasi (PCR) classica



Amplificazione selettiva in vitro di una sequenza di DNA target nota sul genoma del microrganismo patogeno

Reazione multi-ciclica suddivisa in 3 fasi:

1) DENATURAZIONE (94-96°C)

2) ANNEALING (50-65°C)

3) ESTENSIONE (72°C)

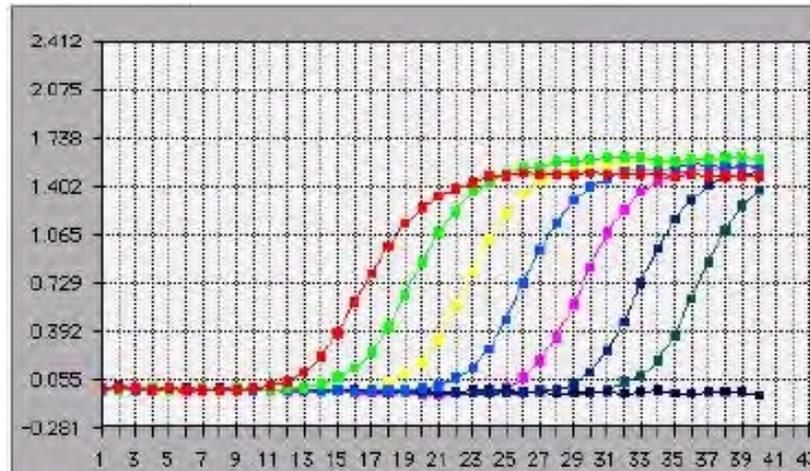


REAL-TIME PCR

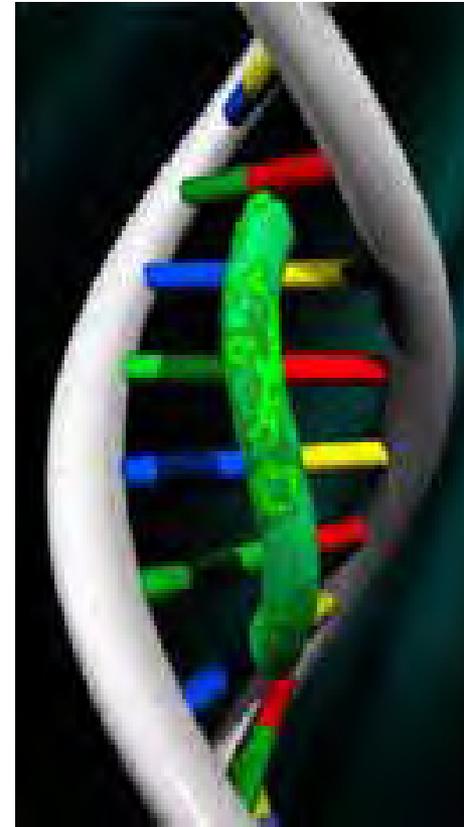
La **Real-Time PCR** consente l'analisi in tempo reale ad ogni ciclo dell'amplificazione e la quantificazione del DNA amplificato mediante la misura continua del segnale di fluorescenza emesso dalla Sonda/fluoroforo impiegati.

- **Elevata sensibilità**
- **Elevata specificità**
- **Rapidità di esecuzione (<2h)**

Fluorescenza



Cicli di amplificazione



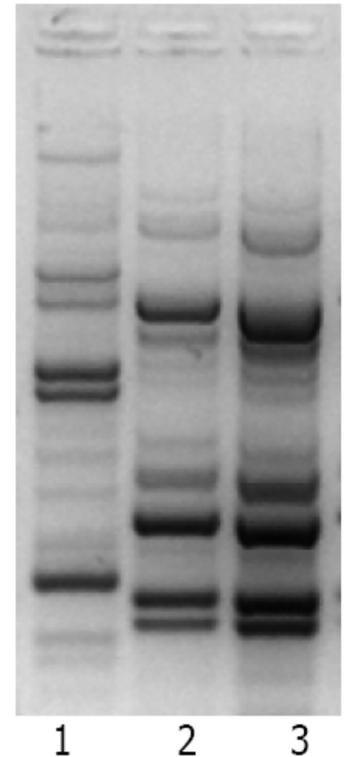
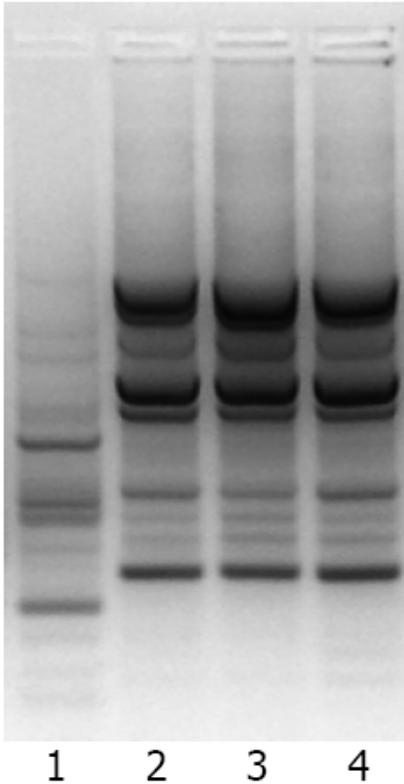
PCR per tipizzazione (strain typing) IMPRONTA MOLECOLARE



Basate sull'uso di primer che permettono l'amplificazione selettiva di sequenze ripetute e disperse nel genoma batterico

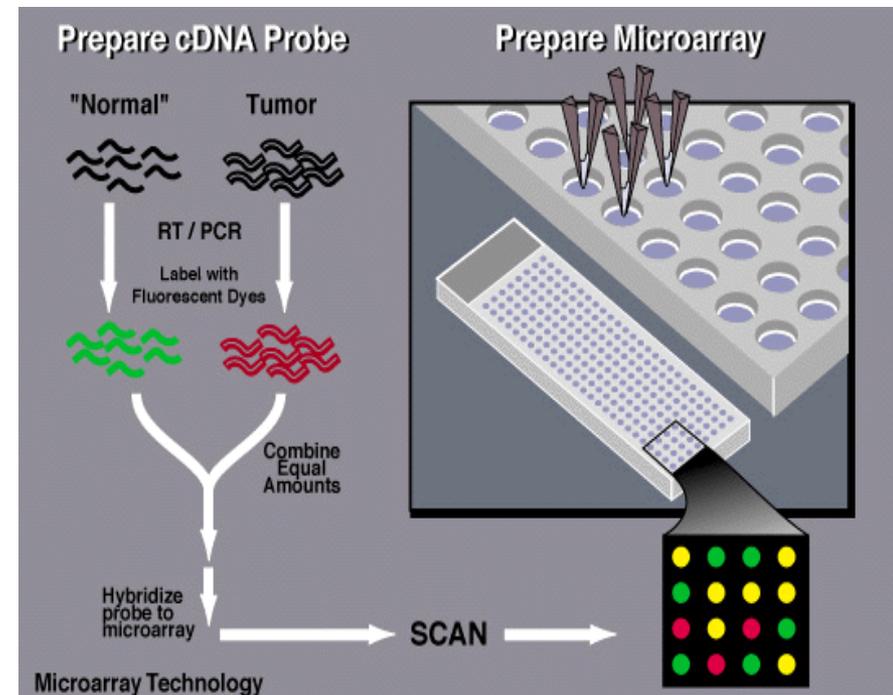
- ⊙ **REP-PCR** (repetitive extragenic palindromic)
- ⊙ **ERIC-PCR** (enterobacterial repetitive intergenic consensus)

In questo caso non si ottiene una singola banda di amplificazione, ma una serie di frammenti di DNA di numero e lunghezza diversi a seconda del ceppo analizzato ("impronta molecolare")



DNA MicroArrays: I sistemi di analisi ad alto flusso

- Micro chip con sonde a DNA per l'analisi dell'espressione genica (normale/trattato)
- Presenza sullo stesso array di sonde per un numero elevato di microrganismi
- Coltivazione non necessaria
- Analisi di comunità microbiche complesse
- Analisi rapida (High Throughput processes)

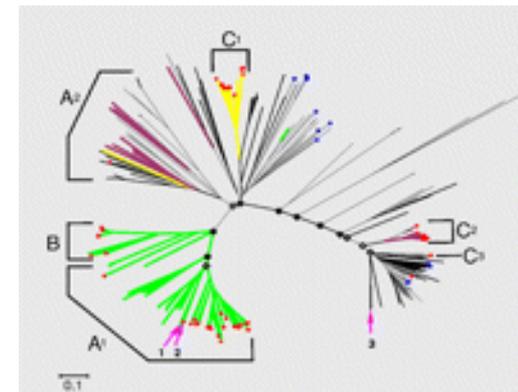
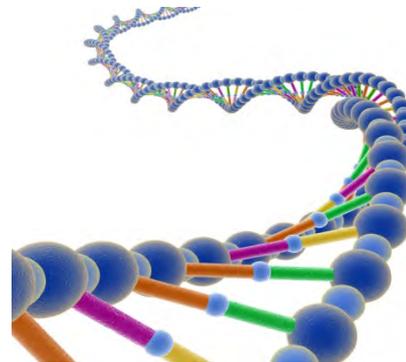
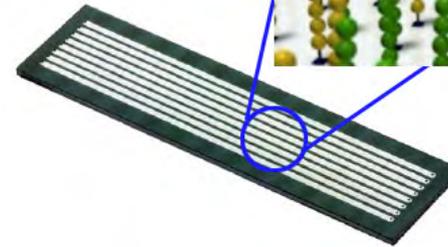
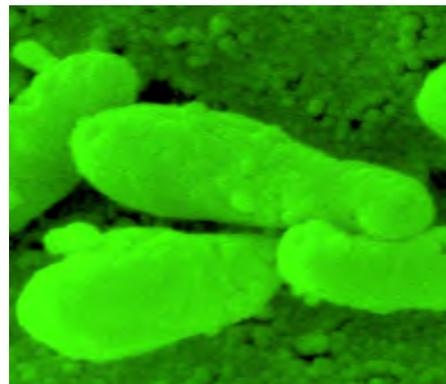
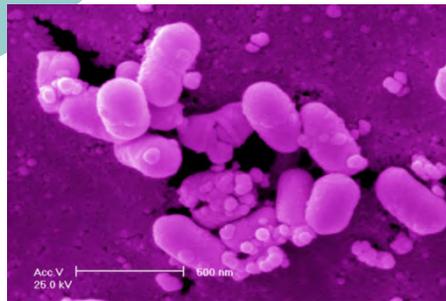
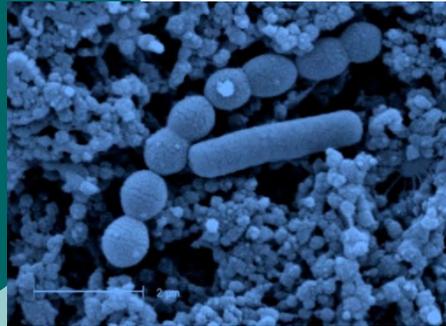


Metagenomica

Studio di popolazioni
microbiche complesse

NEXT GENERATION SEQUENCING

Analisi basata sul
sequenziamento
rapido del genoma di
microrganismi di uno
stesso ambiente senza
bisogno di coltivarli

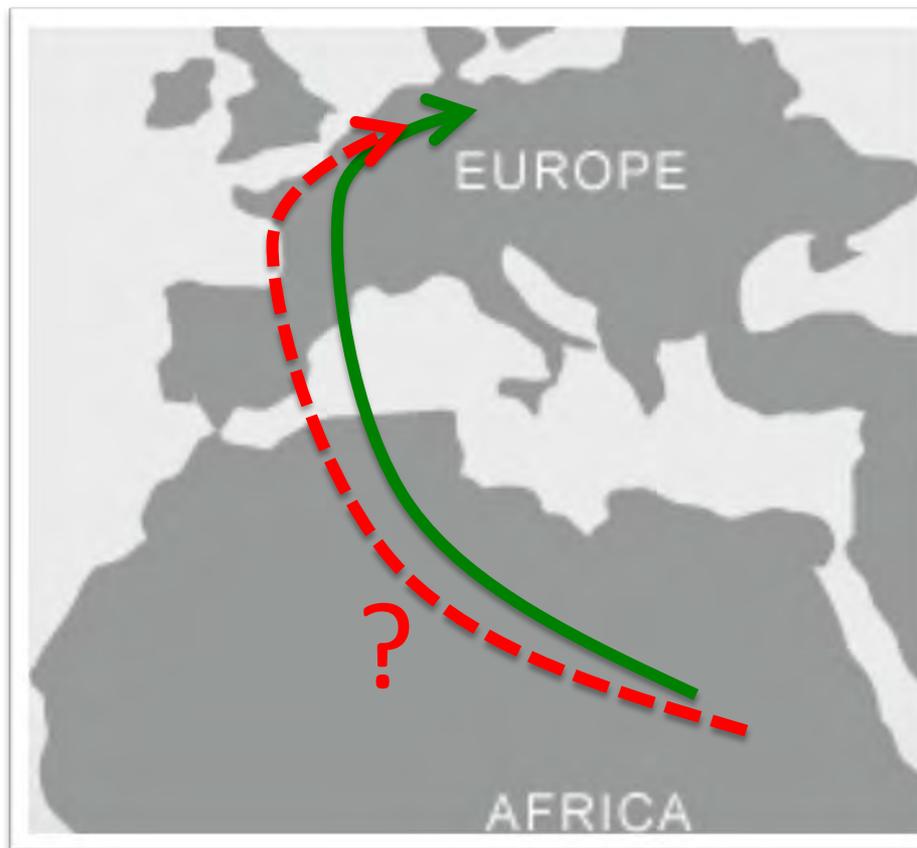


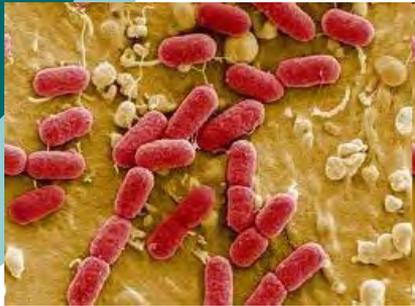
Epidemia di *E. coli* enteroemorragico in Germania The Worst Case Scenario



Tracing seeds, in particular fenugreek (*Trigonella foenum-graecum*) seeds, in relation to the Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) O104:H4 2011 Outbreaks in Germany and France¹

European Food Safety Authority^{2,3}





Identification and development response timeline

Day 01 May 30	Day 02 May 31	Day 03 June 01	Day 04 June 02	Day 05 June 03
O104:H4 and HUSC41 sample (reference) strain libraries prepared	O104:H4 amplified and sequenced, 2 x 2 runs (Ion™ 314)	O104:H4 sequenced, 3 x 2 runs (Ion™ 314) <u>2 ore!!</u>	Draft genome identified, assembled, submitted, and released from NCBI	TaqMan® Assays designed



E. Coli O104:H4

- Shigatoxin 1: - (negativo)
- Shigatoxin 2 (vtx2a) : + (positivo)
- Intimina, fattore di adesione (eae) : - (negativo)
- Geni *aggR*, *aatA*, *aaiC*, *aap*: markers of typical Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAggEC)





UNIVERSITÀ
CATTOLICA
del Sacro Cuore

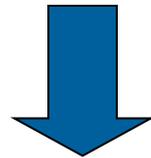
DETERMINAZIONE QUANTITATIVA DI *Clostridium tyrobutyricum* IN LATTE MEDIANTE PCR REAL-TIME

Spore di *Clostridium* → elevata resistenza alle condizioni ambientali, contaminazione del latte prima della produzione di formaggio

Gonfiore tardivo → grandi perdite economiche nella produzione di formaggio a pasta dura

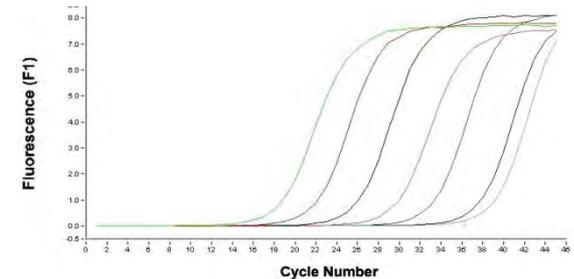
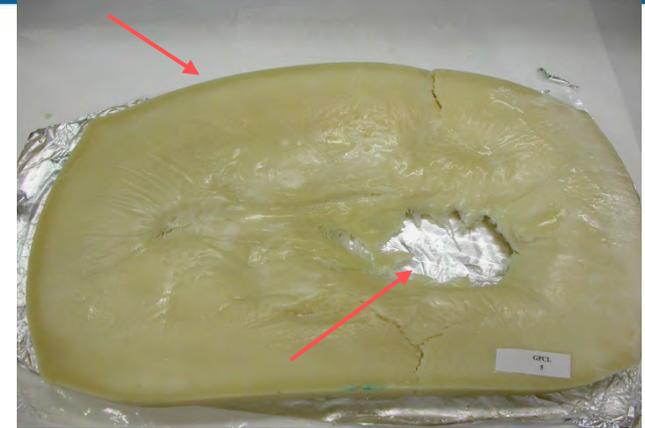
50 spore/l sufficienti per produrre gonfiore

Metodi microbiologici classici (MPN, conta in piastra, gas-cromatografia) → tempi lunghi



**MESSA A PUNTO DI UN METODO MOLECOLARE
DI PCR REAL-TIME**

per la determinazione e la quantizzazione
spore di *C. tyrobutyricum* in latte



ALTERAZIONE DEGLI ALIMENTI E CONTROLLO DEI PATOGENI

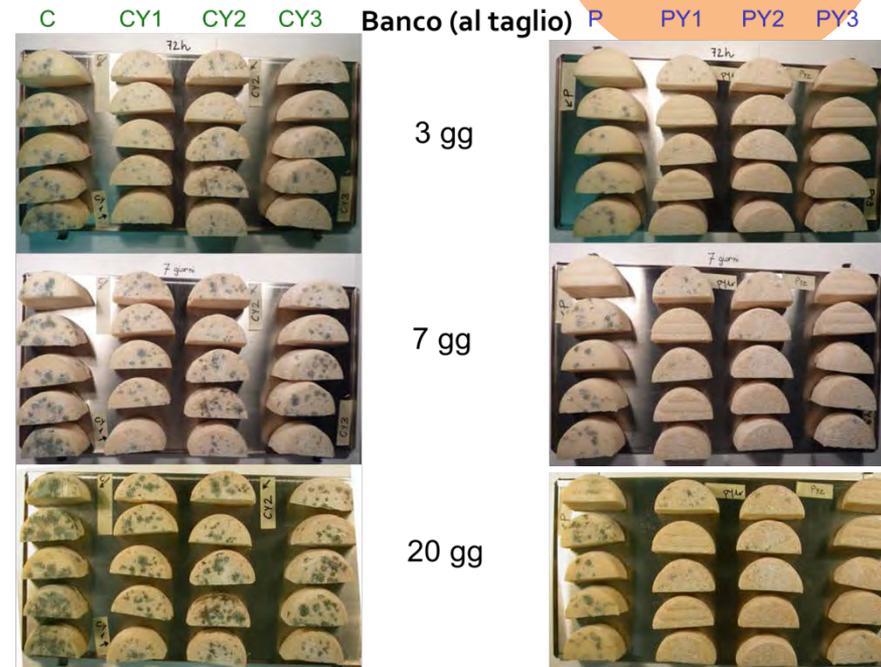
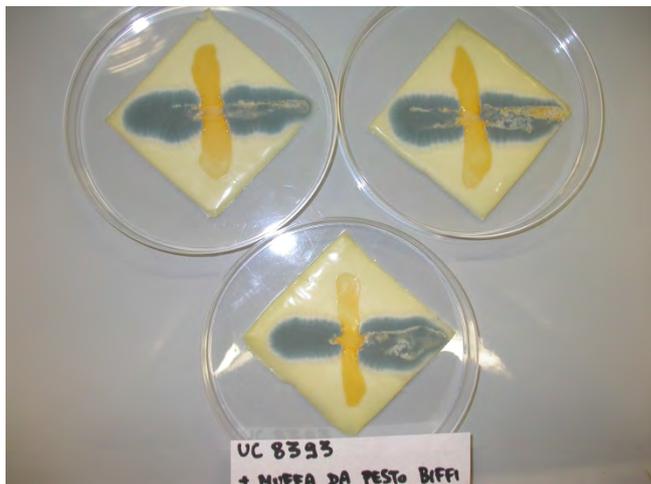
Food spoilage
and pathogens
control

COLTURE DI PROTEZIONE

- ✓ Colture di *Lactobacillus* isolate dalle croste dei formaggi (Taleggio, Casera, Gorgonzola) protettive contro muffe e patogeni nella caciotta di Urbino

MODELLI ALIMENTARI

- ✓ Per simulare le dinamiche microbiche (*Bacillus cereus* in crema di verdure; LABs anti-muffa in modelli di formaggio)



PRODOTTI CASEARI CON MIGLIORATE CARATTERISTICHE NUTRACEUTICHE



- Utilizzo di batteri lattici con proprietà funzionali
 - Produzione di acido folico
 - Riduzione colesterolo



2 μm

	folE	folK	folB	folP	folC2/folC	folA	xtp2
	GTP cyclohydrolase I	2-amino-4-hydroxy-6-hydroxymethyl-dihydropteridine pyrophosphokinase	dihydroneopterin aldolase	dihydropteroylate synthase	folylpolyglutamate synthase/Dihydrofolate synthase	Dihydrofolate reductase	xanthosine triphosphate pyrophosphatase
<i>L. plantarum</i>	Yellow	Magenta	Green	Cyan	Pink	Orange	Yellow
<i>L. reuteri</i>	Yellow	Magenta	Green	Cyan	Pink	Orange	Yellow
<i>L. rhamnosus</i>	Yellow	Magenta	Green	Cyan	Pink	Orange	Yellow
<i>L. fermentum</i>	Yellow	Magenta	Green	Cyan	Pink	Orange	Yellow
<i>L. delbruecki</i>	Yellow	Magenta	Green	Cyan	Pink	Orange	Yellow
<i>L. acidophilus</i>	Yellow	Magenta	Green	Cyan	Pink	Orange	Yellow
<i>L. brevis</i>	Yellow	Magenta	Green	Cyan	Pink	Orange	Yellow
<i>L. casei</i>	Yellow	Magenta	Green	Cyan	Pink	Orange	Yellow
<i>L. paracasei</i>	Yellow	Magenta	Green	Cyan	Pink	Orange	Yellow
<i>L. crispatus</i>	Yellow	Magenta	Green	Cyan	Pink	Orange	Yellow
<i>L. gasseri</i>	Yellow	Magenta	Green	Cyan	Pink	Orange	Yellow
<i>L. hilgardii</i>	Yellow	Magenta	Green	Cyan	Pink	Orange	Yellow
<i>L. jensenii</i>	Yellow	Magenta	Green	Cyan	Pink	Orange	Yellow
<i>L. ruminis</i>	Yellow	Magenta	Green	Cyan	Pink	Orange	Yellow
<i>L. salivarius</i>	Yellow	Magenta	Green	Cyan	Pink	Orange	Yellow
<i>L. johnsonii</i>	Yellow	Magenta	Green	Cyan	Pink	Orange	Yellow
<i>Lactococcus lactis</i>	Yellow	Magenta	Green	Cyan	Pink	Orange	Yellow
<i>St. thermophilus</i>	Yellow	Magenta	Green	Cyan	Pink	Orange	Yellow



UNIVERSITÀ
CATTOLICA
del Sacro Cuore

μ-Andes

Microbiota of Andean Foods: tradition for healthy products

International Research Staff Exchange Scheme

Call identifier FP7-PEOPLE-2010-IRSES

2010-2013



PRODOTTI TIPICI DELLE ANDE

- Chicha (fermented maize beverage) (Argentina)
- Pseudo-cereals (quinoa and amaranth grains) (Argentina)
- Llama sausages (fermented meat) (Argentina)
- Tocosh (fermented potato product) (Peru)
- Atole Agrio (fermented maize beverage) (Mexico)

BIODIVERSITA' MICROBICA



MAIS

- Gli ambienti estremi caratterizzati da particolari caratteristiche climatiche consentono un'ampia diversificazione agricola



LAMA

- Studiare il microbiota presente in questi alimenti con metodiche di microbiologia molecolare ha permesso di caratterizzare ceppi batterici con particolari proprietà funzionali (per la salute) e di interesse tecnologico



QUINOA

- Preservare l'eredità culturale e le ancestrali tecniche di produzione degli alimenti fermentati può aiutarci a ritornare ad un approccio più sostenibile



AMARANTO



I benefici che possono derivare al sistema agro-alimentare dalla ricerca in ambito microbiologico sono molteplici

Conoscere i microrganismi per ...

- MIGLIORARE LA QUALITA' DEI PRODOTTI
- INCREMENTARE LA SICUREZZA DEI PRODOTTI
- INCREMENTARE LA PRODUZIONE
- RIDURRE GLI SPRECHI
- MANTENERE LA BIODIVERSITA'





UNIVERSITÀ
CATTOLICA
del Sacro Cuore

La sicurezza alimentare:



La fanno **le istituzioni**, che lavorano per ridurre i rischi alimentari sin dall'origine, fissando norme e vigilando sulla produzione, sulla distribuzione e sulla vendita dei prodotti alimentari

- La fanno **i produttori** rispettando queste norme
- La fa il **mondo scientifico** fornendo gli strumenti per attuarla
- La fanno **i consumatori** controllando una «porzione» della vita dell'alimento (dal negozio al piatto)





- <http://www.expo2015.org/it> EXPO
- http://www.salute.gov.it/portale/temi/p2_4.jsp?lingua=italiano&tema=Alimenti&area=sicurezzaAlimentare Ministero Salute
- <http://www.ilfattoalimentare.it/argomenti/sicurezza> Il fatto alimentare
- <http://www.efsa.europa.eu/it/> EFSA