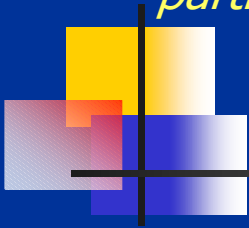


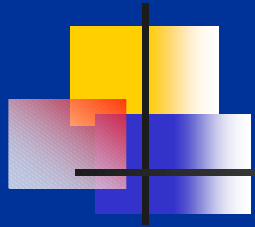
Ricerca finalizzata *"Qualità e sicurezza degli alimenti di origine animale con particolare riferimento a quelli di origine acquatica e degli ambienti relativi alla loro filiera di produzione"*



Listeria monocytogenes in semiconserve ittiche e potenziali rischi per il consumatore

Giuseppe Arcangeli
IZSVe

Roma – 19 aprile 2011



Gruppo microbiologia: Listeria

UO 2: IZS LER, M.N.Losio; P. Daminelli; E. Pavoni

UO 3: IZS VE, G. Arcangeli; P. Gambarin, C. Magnabosco

UO 5: IZS LT, T. Bossù



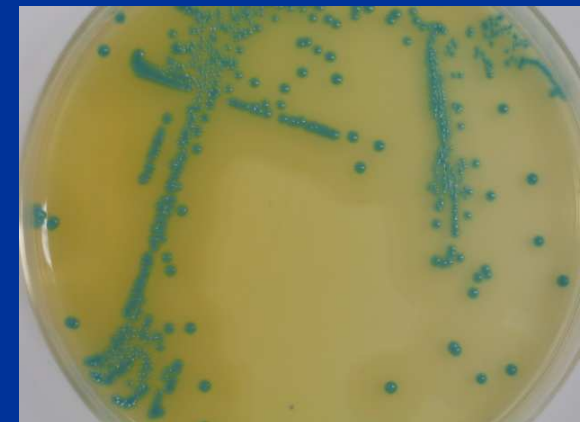
OBIETTIVO DELLA RICERCA

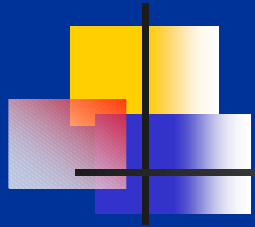
Valutare il rischio di esposizione del consumatore
al pericolo *Listeria monocytogenes* in semiconserve
ittiche

Listeria monocytogenes (1)

Caratteristiche generali

- Gram positivo, ambientale
- Fam. Listeriaceae
- Psicrotrofo, alotollerante, termodurico (72°C x 15'')
- Possibili forme VNC
- Sensibile a competizione microbica
- Formazione biofilm
- Possibilità antibiotico-resistenza





Listeria monocytogenes (2)

La malattia nell'uomo

Categorie più esposte:

BAMBINI,

ANZIANI (>65anni),

DONNE GRAVIDANZA

PERSONE IMMUNO-COMPROMESSE

Yopy (De Cesare et al., 2006)

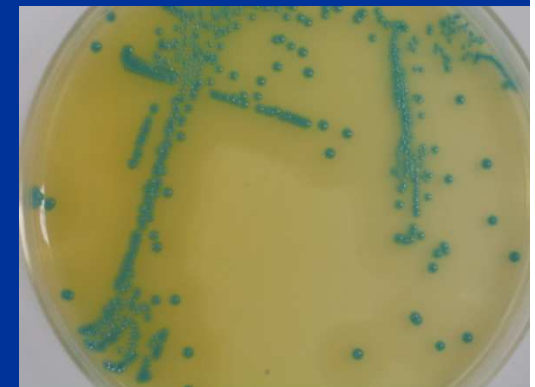
Young, Old, Pregnant, Immune-compromised



***Listeria monocytogenes* (3)**

La malattia nell'uomo

- Specie più patogena: *monocytogenes*
- Altre specie: *ivanovii*, *seeligeri*
- 13 sierotipi, 1 e 4 più frequenti
- Malattia di origine alimentare in EU (95%)
- Più frequente in: formaggi pasta molle, patè, pesce affumicato, vegetali



***Listeria monocytogenes* (4)**

La malattia nell'uomo

- **Immunocompetenti: sintomi simil-influenzali, sintomi enterici**
- **Immunodepressi: meningite, setticemia, endocardite, polmonite, artrite, epatite, osteomielite, inf. cutanee**
- **Elevata letalità (immunodepressi)**
- **Dose infettante : > 1.000 ufc**
- **Periodo incubazione: 3-60 gg**

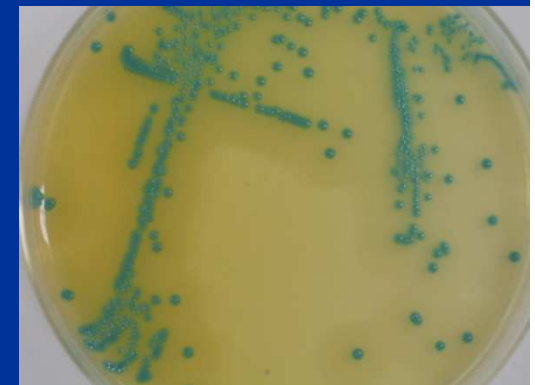


Listeria monocytogenes (5)

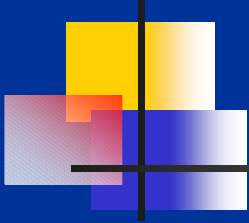
La malattia nell'uomo

- Incidenza in Europa:

3 casi/ milione abitanti (EFSA, 2010)



Reg. 2073/2005



Ready to eat	Limite	Commento
<i>Non favorevoli alla crescita</i>	<i>100 ufc/g</i>	<i>pH ≤ 4,4 o a_w ≤ 0,92</i> <i>pH ≤ 5,0 e a_w ≤ 0,94</i> <i>Shelf-life < 5 giorni</i>
<i>Favorevoli alla crescita</i>	<i>Assente 25 g</i>	<i>Quando <u>non è dimostrato</u> che il limite non verrà superato a fine shelf-life</i>
<i>Favorevoli alla crescita</i>	<i>100ufc/g</i>	<i>Quando <u>è dimostrato</u> che il limite non verrà superato a fine shelf-life</i>



Fasi di lavoro

- 1) Campionamento
- 2) Analisi
- 3) Risultati
- 4) Considerazioni finali



1) Campionamento

n. 1 cp composto da 3 aliquote dello stesso lotto

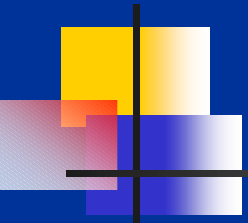
- Prelevato presso esercizi commerciali diversi
- Ditte di produzione diverse
- Prelevato con shelf-life trascorsa non oltre la metà di quella prevista

- 1 cp analizzato subito
- 1 cp analizzato a fine shelf-life dopo mantenimento a 4°C
- 1 cp analizzato a fine shelf life dopo mantenimento a 10 °C per l'ultimo terzo di vita commerciale

Nota MinSal 0030773-P-29-10-2008: Problematica relativa alla *Listeria monocytogenes*:
....è ampiamente nota e dimostrata la possibilità di riscontrare temperature di abuso comprese nel range 8-12 °C.



2) Analisi: PDP utilizzate

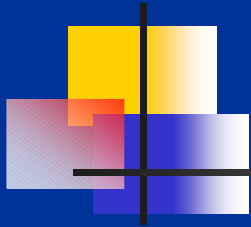
- 
- pH
 - a_w
 - mesofili 30 °C (ISO 4833:2003)
 - psicrofili e psicrofili H₂S prod., 15 °C per 5-7gg (Iron agar- Lyngby)
 - lattici MRS (De Man, Rogosa, Scarpe)
 - muffe e lieviti (Sabouraud)
 - Listeria monocyt. qualitativa (ISO 11290-1:1996/Amd 1 2004)
 - Listeria monocyt. quantitativa (ISO11290-2:1998/Amd 1 2004)
 - diluzione iniziale: 20 g in 80 cc di APTL per avere una sensibilità finale pari a < 5 ufc/g
 - PCR Listeria: end point – nested (L. spp); end point (L. monocyt.)
 - Ribotipizzazione (Riboprinter®: identificazione tassonomica dell'isolato e calcolo dell'indice di similarità rispetto ai ceppi di riferimento presenti nel database DuPont)



2) Analisi: PCR *Listeria monocytogenes*

- Dal brodo di arricchimento per L.m. qualitativa, dopo 24 ore, prelevata aliquota per PCR, congelata a -20 °C ed esaminata in seguito.
- Piastre positive: prelevate colonie e stoccate a – 80 °C per successiva ribotipizzazione

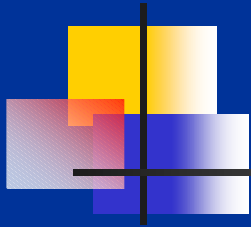
3) Risultati



Risultati verifica valori di pH e aw

- Cp analizzati: 58 ($\times 3 = 174$ uc)
- Cp favorevoli crescita : 34
- Cp non favorevoli crescita : 14

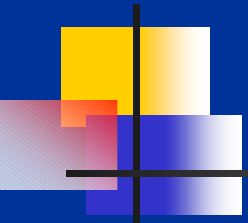
3) Risultati



Risultati metodi colturali

- Cp analizzati: n. 58 ($\times 3 = 174$ uc)
- Cp positivi totali: n. 9
- Cp positivi > 100 ufc/g: n. 3
- Nessun cp non favorevole alla crescita è risultato positivo

3) Risultati



N. cp	Tipologia cp positivi microbiologico (favorevoli crescita di <i>L. monocyt.</i>)	ufc/g
1	Insalata di mare	T 0 < 5
2	Carpaccio di salmone	T 0 4 °C 10 °C < 5 < 5 330 (*)
3	Cocktail mare marinato	4 °C < 5
4	Filetti sgombro grigliati marinati	4 °C <5
5	Filetti sgombro grigliati marinati	T 0 <5
6	Salmone fresco atm protettiva	T 0 4 °C 10 °C <5 <5 <5
7	Salmone affumicato	T 0 4 °C 10 °C <5 <5 140.000
8	Salmone fresco atm protettiva	4 °C 10 °C <5 <5
9	Salmone affumicato	T 0 6.600

(*): confezione con bombatura a fine shelf.life, assenza odori anomali

3) Risultati

Tipologia	T°C	C.B.T ufc/g	Batteri Lattici (ufc/g)	Muffe (ufc/g)	Lieviti (ufc/g)	Psicrofili (ufc/g)	Psicrofili H2S produttori (ufc/g)
Insalata di mare	/	100000000	24000000	<100	<100	660000	<10
Carpaccio Salmone	/	28000	910	400	900	14000	60
	4	650000	640000	200	2400	380000	350
	10	190000000	150000000	900	17000	130000000	47000
Cocktail di mare	4	75000	37000	<100	<100	45000	<10
Filetti di sgombro grigliati	/	4200000	7300000	<100	<100	24000	<10
Filetti di sgombro grigliati	/	41000000	27000000	<100	<100	1200000	<10
Salmone atm. modificata	/	160000	2000	4900	<100	96000	6900
	4	1200000	6100	600	5900	2200000	80000
	10	2700000	9800	<100	3600	2200000	200000
Salmone affumicato	/	290000	<10	<100	<100	340000	27000
	4	76000000	28000000	<100	300	40000000	180000
	10	420000000	73000000	<100	45000	150000000	12000000
Salmone atm. Modificata	4	3600000	5100	<100	3900	2900000	5200
	10	6700000	4100000	<100	300	170000	1400
Salmone norvegese	/	14000000	4300000	<100	<100	14000000	<10

330 ufc/g

140.000 ufc/g

6.600 ufc/g

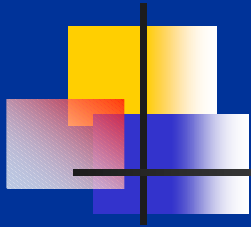


3) Risultati

Risultati PCR

- Le prove hanno confermato *L. monocytogenes* in tutti i casi in cui era stata determinata con esame colturale
- Tutti i cp sono risultati positivi per Listeria genere
- Positivi totali L.m.: n. 12 (positivi microbiol. n. 9)

3) Risultati

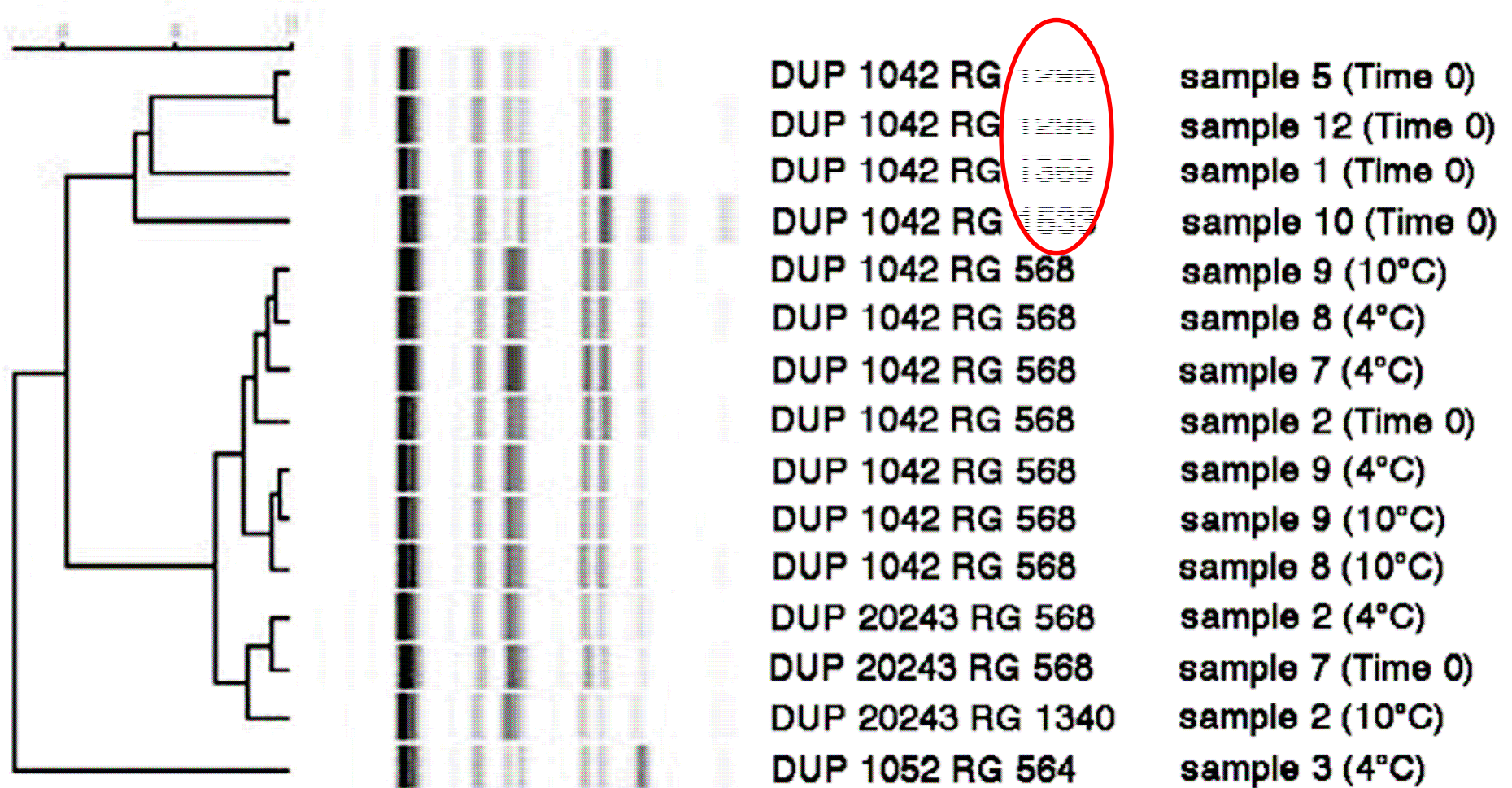


Risultati Ribotipizzazione (Riboprinter®):

- analisi dei polimorfismi dei frammenti di restrizione dei geni codificanti gli RNA ribosomiali,
- ribotipo: identificazione tassonomica dell'isolato e calcolo dell'indice di similarità rispetto ai ceppi di riferimento presenti nel database DuPont,
- ribogruppo: in base alla similarità dei campioni precedentemente analizzati presso il laboratorio.

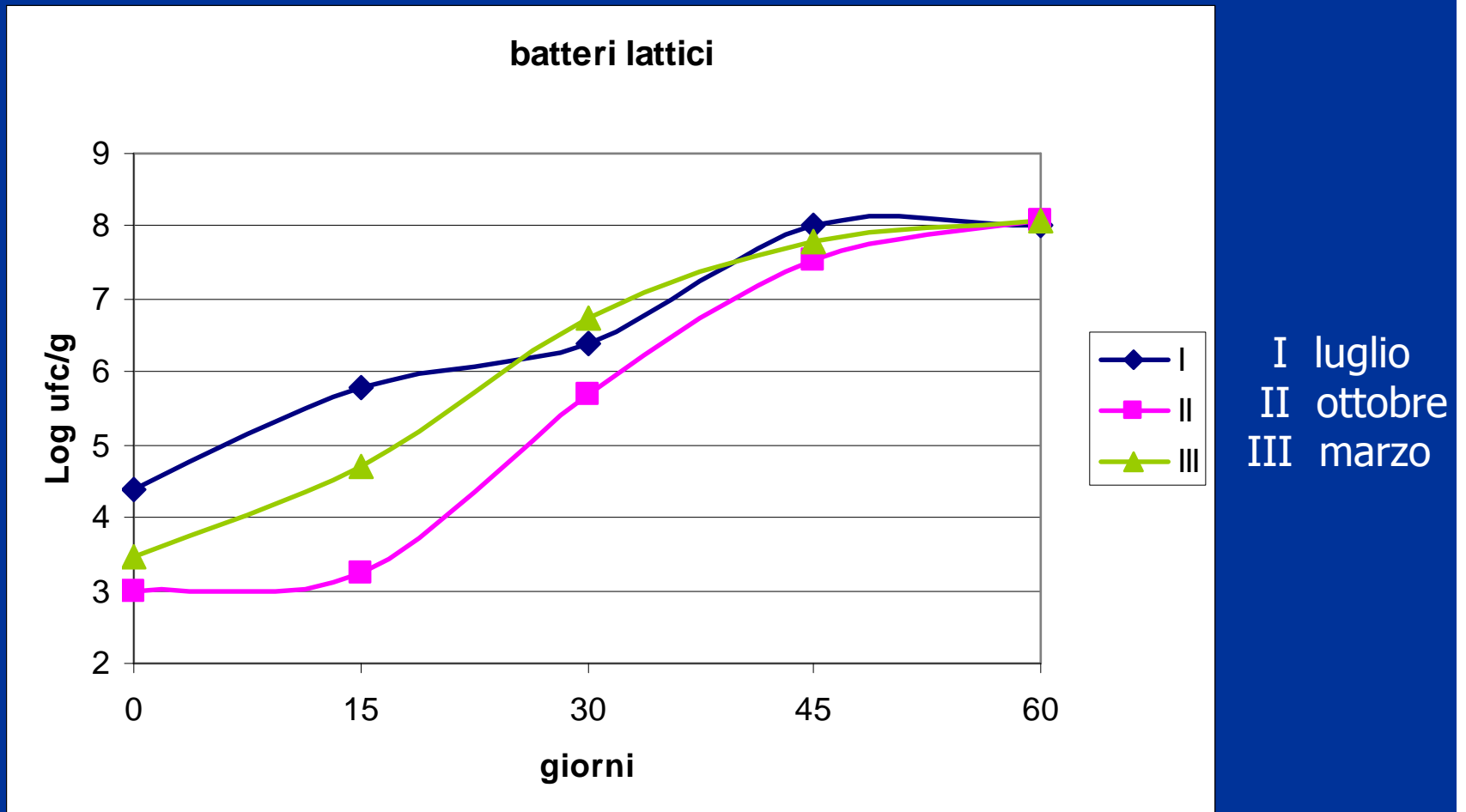
3) Risultati

n. CP	Tipologia prodotto	T di conservazione	L.m. prova qualitativa	L.m. prova quantitativa ufc/g	PCR L.m.	Ribotipo	Ribogruppo
1	Insalata di mare	T0	positivo	< 5	positivo	DUP 1042	1369
2	Carpaccio di salmone	T0	positivo	< 5	positivo	DUP 1043	568
		4	positivo	< 5	positivo	DUP 20243	568
		10	positivo	330	positivo	DUP 20243	1340
3	Cocktail mare marinato	4	positivo	< 5	positivo	DUP 1052	564
		10	neg.	< 5	positivo		
4	Carpaccio di polpo	4	neg.	< 5	positivo		
5	Filetti sgombro cotti marinati	T0	positivo	< 5	positivo	DUP 1042	1296
		10	neg.	< 5	positivo		
6	Salmone affumicato	4	neg.	< 5	positivo		
		10	neg.	< 5	positivo		
7	Salmone fresco atm protettiva	T0	positivo	< 5	positivo	DUP 20243	568
		4	positivo	< 5	positivo	DUP 1042	568
		10	positivo	< 5	positivo	DUP 1042	568
8	Salmone affumicato	T0	positivo	< 5	positivo	-	-
		4	positivo	< 5	positivo	DUP 1042	568
		10	positivo	140.000	positivo	DUP1043	568
9	Salmone fresco atm protettiva	4	positivo	< 5	positivo	DUP 1042	568
		10	positivo	< 5	positivo	DUP 1042	568
10	Salmone affumicato	T0	positivo	6.600	positivo	DUP 1042	1533
11	Carpaccio di salmone	10	neg.	< 5	positivo		
12	Filetti sgombro cotti marinati	T0	positivo	< 5	positivo	DUP 1042	1296

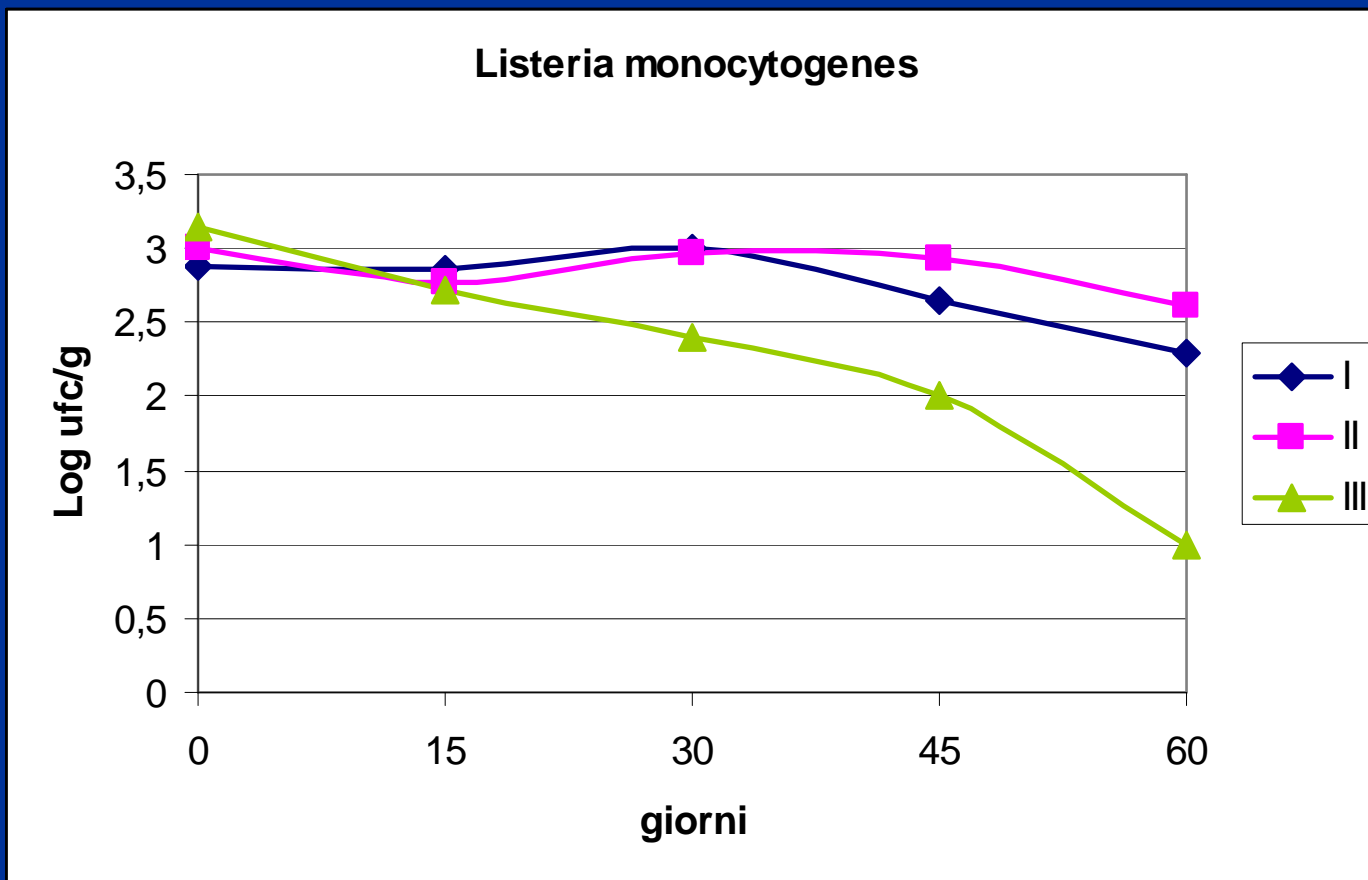


Il dendrogramma elaborato mediante correlazione di Pearson (metodo UPGMA) da programma Bionumerics 6.1.

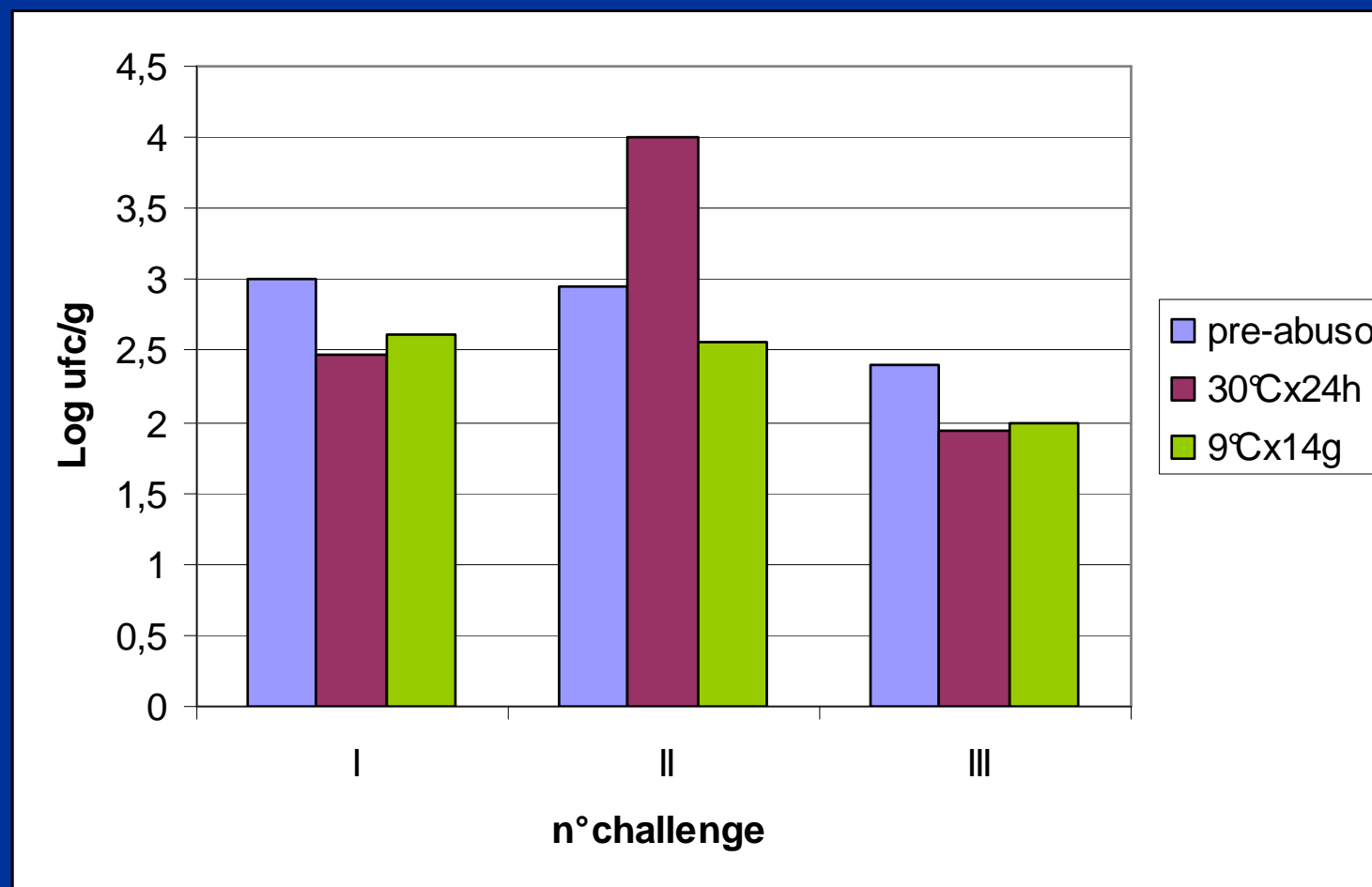
Prove collaterali: challenge *Listeria* in insalata di mare pH 5,00
IZSVe – Veneto Agricoltura



Prove collaterali: challenge *Listeria* in
insalata di mare
IZSve – Veneto Agricoltura



Prove collaterali: challenge *Listeria* in
insalata di mare
IZSVe – Veneto Agricoltura

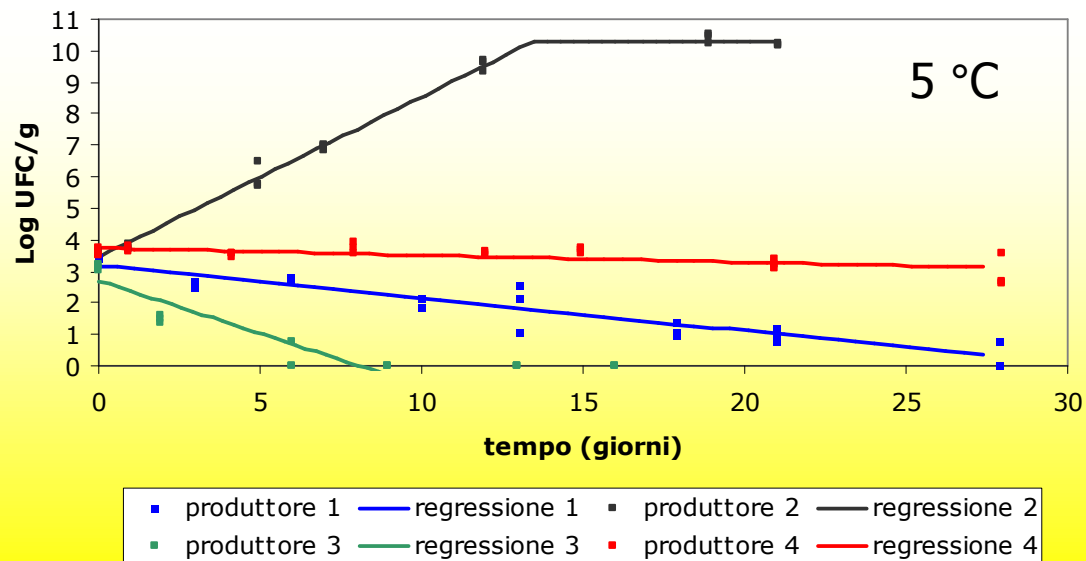


I luglio
II ottobre
III marzo

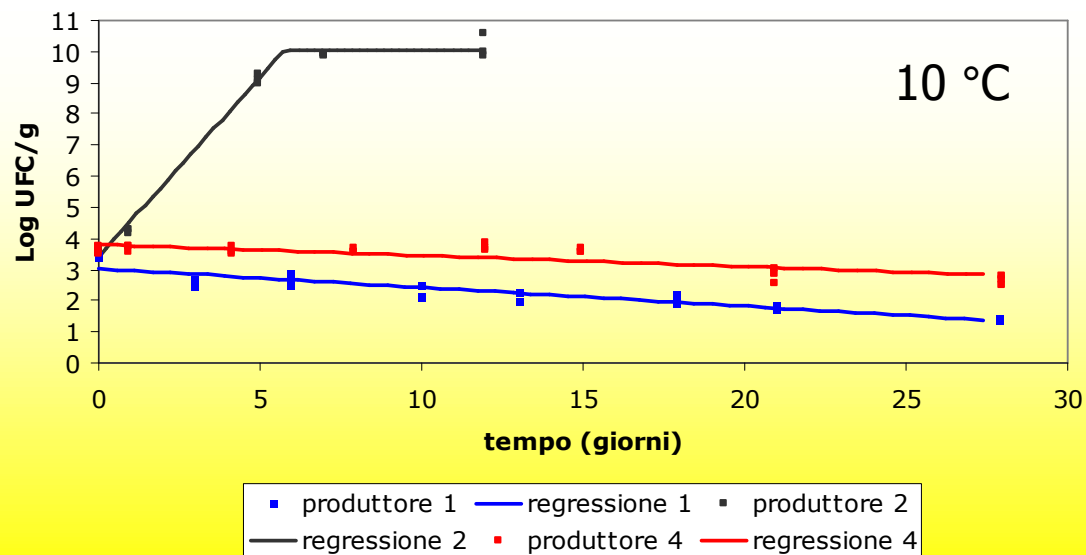
**Prove collaterali: biodiversità lattici in
insalata di mare
IZSve – Veneto Agricoltura**

Specie microbiche	Luglio	Ottobre	Marzo
<i>Lactobacillus curvatus</i>	1	1	18
<i>Lactobacillus malefermentans</i>	10	-	6
<i>Lactobacillus paraplantarum</i>	6	-	-
<i>Lactobacillus sanfranciscensis</i>	15	8	7
<i>Carnobacterium piscicola</i>	-	-	5
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	1	1
<i>Enterococcus</i> spp.	1	3	9
<i>Vagococcus</i> spp.	-	6	-
<i>Lactococcus lactis</i>	-	2	1
<i>Leuconostoc pseudomesenteroides</i>	5	-	-
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	2	-	-
<i>Pediococcus</i> spp.	7	-	-
<i>Streptococcus parauberis</i>	3	3	-
<i>Weissella</i> spp.	1	24	-
Total number of isolates	65	50	56

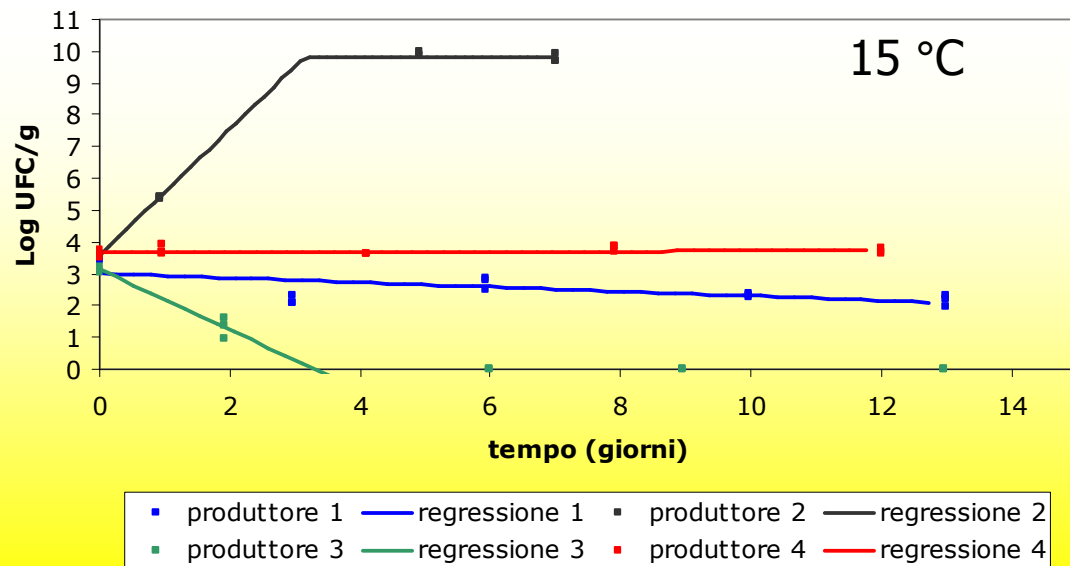
Prove collaterali: challenge *Listeria* in insalata di mare , diversi
valori pH e T, assenza lattici
IZSLER



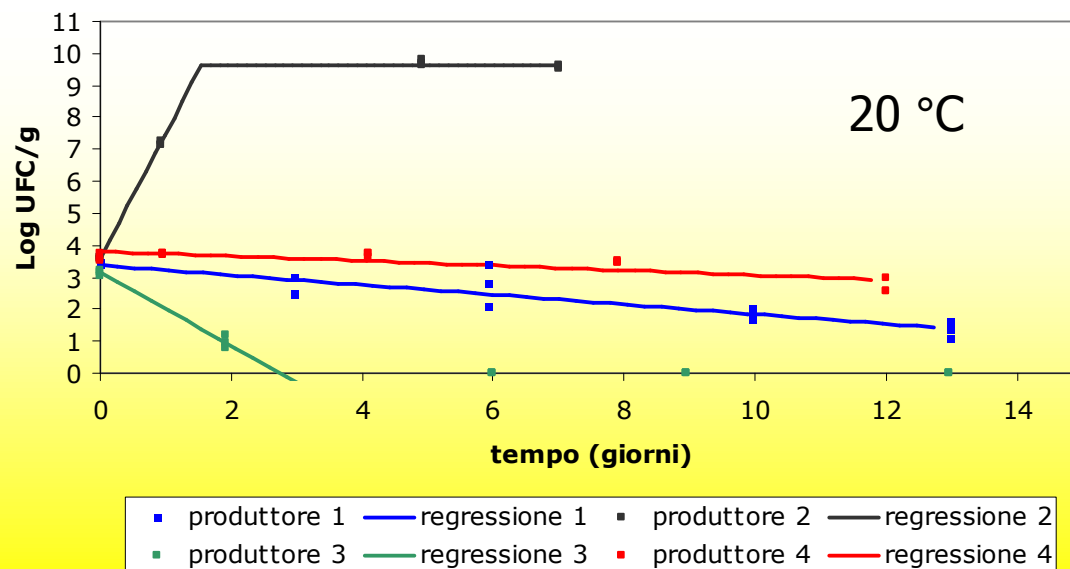
Produttori:
 1 = pH 4,8
 2 = pH 6,0
 3 = pH 4,8
 4 = pH 4,0



Prove collaterali: challenge *Listeria* in insalata di mare ,
diversi valori pH e T, assenza lattici
IZSLER



Produttori:
 1 = pH 4,8
 2 = pH 6,0
 3 = pH 4,8
 4 = pH 4,





4) Conclusioni

- Il genere *Listeria* è costantemente presente nelle semiconserve ittiche (tutti cp positivi PCR genere).
- In prodotti con caratteristiche favorevoli alla crescita, *Listeria monocytogenes* si sviluppa in caso di abuso termico (10 °C) , anche in presenza di competizione lattica.
- La prova PCR si conferma come specifica e più sensibile rispetto alla prova colturale (utilizzo su brodo primo arricchimento, utile nella routine in caso di risultato negativo).
- Caratteristiche genotipiche adattate ad alimenti con diverse caratteristiche.
- Il salmone affumicato si conferma prodotto a rischio.

A photograph of a fish, likely a salmon, leaping out of the water. The fish is captured mid-air, with its body arched and fins spread. Water droplets are visible around the fish's head and tail. The background shows the surface of the water with some ripples and a dark, possibly overcast sky.

**GRAZIE PER
L'ATTENZIONE !**

garcangeli@izsvenezie.it