



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Valutazione della qualità igienico – sanitaria e commerciale dei prodotti ittici destinati alla ristorazione scolastica, ospedaliera ed etnica

IZS LT 13/12 RC

Francesca Susini - Laura Gasperetti

**L'ATTIVITÀ DI RICERCA CORRENTE PRESSO L'IZS LAZIO E TOSCANA:
PRINCIPALI RISULTATI E LORO TRASFERIBILITÀ OPERATIVA**

Roma – 20-6-2017





Chi ha partecipato

Unità operativa n. 1: Sezione di Pisa
analisi microbiologiche

Unità operativa n. 2: Università di Pisa - Dipartimento di Scienze Veterinarie
campionamenti e analisi molecolari per identificazione di specie

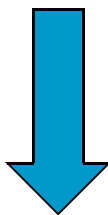
Unità operativa n. 3: D.O. Microbiologia degli alimenti - Roma
analisi microbiologiche

Unità operativa n. 4: U.S. Biotecnologie - Roma
*analisi molecolari per identificazione di specie
(sequenziamento)*

Francesca Susini - Laura Gasperetti



Nuove abitudini alimentari



Nuovi rischi



Scelta del target

- Attività di ristorazione
- Grande Distribuzione Organizzata (GDO)
- Mense



Questione di standard

La produzione di sushi richiede materie prime di altissima qualità, conoscenza delle pratiche di lavorazione, produttori responsabili ed elevati standard igienici

In Italia la maggior parte dei ristoranti “giapponesi” è gestita da personale cinese che spesso non riesce a garantire gli standard igienici necessari



Francesca Susini - Laura Gasperetti



Alla portata di tutti nella GDO

La cucina orientale conquista note catene commerciali che allestiscono chioschi per la preparazione estemporanea di sushi preconfezionato e *Ready to Eat*



Francesca Susini - Laura Gasperetti



Scelta del territorio:

Provincia di Pisa, Livorno, Lucca, Firenze, Roma

Programmazione attività:

- Individuazione dei punti vendita (somministrazione/asporto)

Anagrafica AASSLL

Ricerca su WEB

Conoscenza diretta

- Selezione dei prodotti da campionare

- Scelta del periodo di campionamento



Campionamento (PI-LI-FI-LU)

Aprile – Ottobre 2014

17 ristoranti

→ **88 campioni**

4 supermercati

Marzo – Settembre 2015

19 ristoranti

→ **97 campioni**

4 supermercati

I campioni sono stati trasportati a temperatura di refrigerazione

con verifica in fase di accettazione

Francesca Susini - Laura Gasperetti





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Campionamento (Roma)

23 campioni sono stati prelevati nel corso dell'attività di controllo ufficiale presso:

- Attività di ristorazione
- Commercio al dettaglio
- Stabilimenti di produzione
- Autocontrollo

6 campioni sono stati prelevati nel corso di un evento epidemico

Francesca Susini - Laura Gasperetti



aw (chimico-fisica)	128
pH (potenziometrica)	119
Istamina (ELISA)	28
Larve di <i>Anisakis</i> (esame ispettivo)	127
<i>Salmonella</i> spp. (esame colturale-ELFA)	219
<i>Listeria monocytogenes</i> (esame colturale-ufc)	288
<i>E. Coli</i> β glucoronidasi positivi (esame colturale-ufc)	225
Stafilococchi coagulasi positivi (esame colturale-ufc)	210
<i>Bacillus cereus</i> (esame colturale-ufc)	214
<i>Vibrio cholerae</i> e <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (esame colturale e ricerca toxR, tdh, trh sui positivi)	215
<i>Vibrio vulnificus</i> (esame colturale e ricerca vvha sui positivi)	173
<i>Aeromonas</i> spp. (esame colturale e ricerca geni di virulenza sui positivi)	173
Identificazione di specie su uova di pesce e muscolo	185



Campionamento (Mense)

Mensa universitaria di Pisa:

12 campioni (in 5 aliquote) di prodotti ittici congelati



solo identificazione di specie



analisi microbiologiche

Campioni analizzati = 214

Analisi microbiologiche = 2334

In tutti i campioni

Istamina: inferiore ai limiti di legge

Larve di parassiti: assenti

Germi patogeni (prove qualitative): assenti

Germi patogeni (prove quantitative): inferiori ai limiti di legge

Francesca Susini - Laura Gasperetti



Coinvolte 30 persone dopo consumo di prodotti della cucina giapponese allo stand gastronomico di impianto fieristico

Prelievo di **5 campioni di sushi e sashimi** presso lo stand e nello stabilimento di produzione

Le analisi microbiologiche di routine evidenziano presenza di:

Stafilococchi coagulasi positivi $> 10^3$ ufc/g (2 campioni) e $> 10^8$ ufc/g (2 campioni)

Enterotossine stafilococciche (riferite ai 2 campioni $> 10^8$ ufc/g)



Sui ceppi isolati dagli alimenti e su 5 ceppi isolati da un operatore della ditta e da 4 pazienti è stata effettuata una PCR multiplex per la presenza dei geni tossigeni

I ceppi sono poi stati inviati al LNR per gli Stafilococchi coagulasi positivi (IZSPLV) per l'accertamento dei pulsotipi mediante pulsed-field gel electrophoresis (PFGE)



La PFGE ha evidenziato omologie tra i ceppi dell'operatore, dei pazienti e gli isolati alimentari.



Ristorazione e GDO

Campioni analizzati = 185 campioni di DNA estratti

Sono stati ottenuti:

- ✓ 168 prodotti di PCR relativi al gene mitocondriale *COI*
- ✓ 18 prodotti di PCR relativi al gene nucleare *PEPCK*
- ✓ 2 prodotti di PCR relativi al gene *16S rRNA*



Mense

Campioni analizzati = 36 campioni di DNA estratti

Sono stati ottenuti 45 prodotti di PCR:

- ✓ 36 prodotti di PCR relativi al gene mitocondriale *COI*
- ✓ 3 prodotti di PCR relativi al gene nucleare *PEPCK*
- ✓ 6 prodotti di PCR relativi al gene *16S rRNA*



SEQUENZIAMENTO

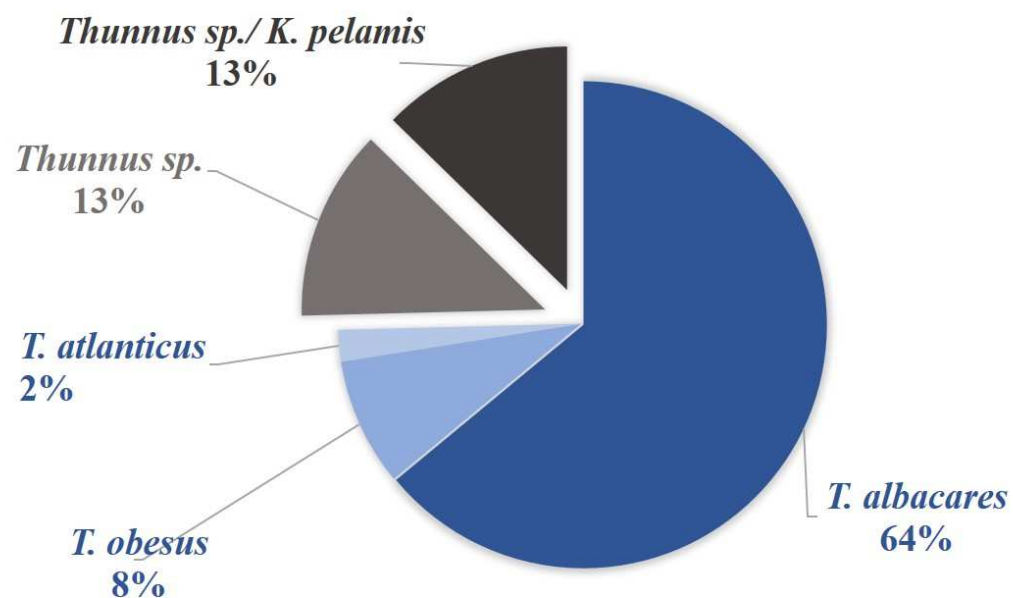
- Identificazione di specie per 103/185 (55,6%) dei campioni analizzati
- Identificazione di genere per la totalità dei campioni analizzati, eccetto 6 campioni di tonno per i quali l'ottenimento di un valore d'identità max (98-100%) con tutte le specie *Thunnus* sp. e con *K.pelamis* (tonnetto striato), non ha permesso di confermare l'appartenenza univoca al genere *Thunnus* ma solo l'appartenenza alla famiglia Scombridae.

(mancanza di sequenze di riferimento o elevato grado di conservazione inter-specie per il target selezionato).



Risultati

analisi molecolari



Risultati dell'analisi d'identificazione per i prodotti indicati con la denominazione "tonno" e "tonno in scatola" al momento dell'acquisto.

Tasso di identificazione specie specifica del 75% per la specie Tonno (35/47)



analisi molecolari

Per i 10 campioni di “Anguilla affumicata” l’**identificazione specie specifica** è stata raggiunta nel 60% (6/10) dei prodotti, per il restante 40%, ottenuto con il protocollo Armani *et al.*, 2015a, è stata raggiunta comunque l’**identificazione a livello di al genere**.

Per i campioni di pesce venduti come “Salmone”, “Orata”, Branzino”, “Pesce Spada”, i molluschi “Polpo”, “Calamaro”, “Seppia”, “Cappasanta”, e i crostacei “Gambero/Mazzancolla” è stata ottenuta in modo univoco **un’identificazione specie specifica**.

I risultati ottenuti sono stati confrontati con le informazioni raccolte al momento del campionamento o direttamente riportate sulle etichette dei prodotti preconfezionati sulla base delle indicazioni normative del Reg (UE) 1379/2013 e del Reg (UE) 1169/2011.

Francesca Susini - Laura Gasperetti



analisi molecolari

- Per il “**tonno**” la norma richiede che sia indicata la specie, *Thunnus albacares* - Tonno a pinne gialle, *Thunnus obesus* - Tonno obeso, *Thunnus thynnus* - Tonno rosso, ecc..**nessun prodotto sarebbe stato dichiarato in modo corretto.**
- Per la dichiarazione “**anguilla**” solo un campione risulterebbe correttamente denominato.
- Una non conformità è stata riscontrata già in fase di acquisto su un prodotto dichiarato "pesce bianco" (non soddisfa i requisiti di chiarezza nei confronti del consumatore stabiliti dal regolamento (Art 2, par2).

Infatti nonostante i ristoratori non siano tenuti agli obblighi di etichettatura (denominazione commerciale e scientifica) previsti dal Reg UE 1379/2013 (Capo IV-Art.35) **i prodotti posti in vendita al consumatore finale devono essere accompagnati da una descrizione generale che individui almeno la categoria del prodotto (Gambero, Tonno) in modo chiaro ed inequivocabile** (Reg UE 1169/2011).



Dal confronto dell'analisi molecolare con le informazioni raccolte in fase di campionamento sono emerse inoltre diverse **non conformità** relative a **sostituzione di specie**:

- 2 campioni di branzino identificati come appartenenti alla specie *Sparus aurata* (orata)
- 1 campione di anguilla affumicata identificato come appartenente al genere *Conger*;
- 2 campioni venduti come a base di uova di lombo ed un campione a base di uova di pesce volante tutti identificati appartenere alla specie *Mallotus villosus* (Mallotto).
- I crostacei, indicati come “gambero” o “mazzancolla” sono stati identificati come appartenenti alla specie *Litopenaeus vannamei* ovvero alla denominazione commerciale di Mazzancolla tropicale.



Per i campioni prelevati alla mensa universitaria si sono rilevate **3 non conformità di etichettatura:**

Un campione di Salmone (*Salmo salar*) corrispondeva in realtà alla specie *Oncorhynchus keta* (*Salmone keta*)

Un campione di gambero sgusciato (*Solenocera melantho*) apparteneva in realtà ad una specie diversa (*Solenocera crassicornis*)

Stessa differenza per un campione di seppia e per uno di merluzzo



Denominazione vendita (menu/etichetta)	Numero campioni	Corrispondenza con Denominazione vendita	Corrispondenza con denominazioni MIPAAF e da Reg CEE 1536/92
Pesci			
Orata	13(13-13)	100%	100%
Branzino	16(14-14)	86%	86%
"Pesce bianco"	1(1-1)	0%	0%
Salmone	57(57-57)	100%	100%
Tonno	44(44-35)	100%	0%
Tonno in scatola	3(3-2+1*)	100%	100%
Anguilla	10 (10-6)	100%	17%
Pesce spada	1 (1)	100%	100%
Sub-totale	145 (143-128)		
Molluschi			
Polpo	10 (7)	100%	100%
Calamaro	1 (1)	100%	100%
Seppia	1 (1)	100%	100%
Cappasanta	2 (2)	100%	0%
Sub-totale	14 (11-11)		
Crostacei			
Gambero	16 (16)	0%	0%
Mazzancolla	2 (2)	100%	0%
Sub-totale	18 (18-18)		
Uova di pesce			
Uova di Lompo	3 (2)	0%	0%
Uova di Pesce	3 (2)	50%	0%
Uova di Salmone	2 (2)	100%	100%
Sub-totale	8 (6-6)		
Totale	185(178-163)		

Numero di campioni per i quali è stata ottenuta una sequenza.

Prospetto percentuale della non corretta etichettatura secondo decreto o in relazione alla dicitura dichiarata.



Analisi Microbiologiche

Il prodotto è complessivamente sicuro da un punto di vista microbiologico grazie ad una particolare attenzione degli operatori del settore sia nella **selezione delle materie prime** che nell'applicazione di **buone pratiche igieniche nelle fasi di preparazione**.

(eccetto un solo caso di tossinfezione alimentare)

Analisi Molecolari

I casi di sostituzione sono stati limitati e riconducibili a fenomeni di sostituzione involontaria legata ad **errori nella preparazione, scarsa formazione** del personale al **riconoscimento di specie** e alla **mancanza di un sistema di tracciabilità** efficiente e coordinato soprattutto per i prodotti provenienti dal mercato internazionale (extraeuropeo).





Istituto Zooprofilattico Sperimentale
del Lazio e della Toscana *M. Aleandri*

Grazie per l'attenzione

Francesca Susini - Laura Gasperetti

