

Programma coordinato di monitoraggio della prevalenza di *Listeria monocytogenes* in alimenti RTE: risultati e caratterizzazione dei ceppi isolati


*IZS dell'Abruzzo e del Molise «G. Caporale»
Laboratorio Nazionale di Riferimento per *Listeria
monocytogenes**

Luigi Iannetti – Vicdalia Acciari



Seminario LNR per *Listeria monocytogenes*, 12-13 dicembre 2013, Teramo

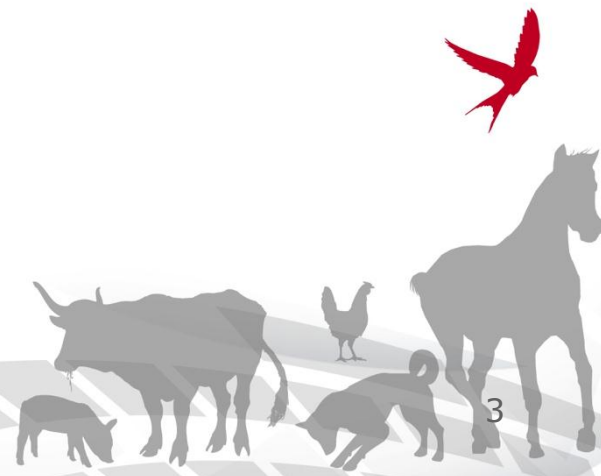
Programma coordinato di monitoraggio

- 
- Decisione 2010/678/EU relativa ad un programma coordinato di monitoraggio sulla prevalenza di *Listeria monocytogenes* in alcuni alimenti RTE
 - Italia (59 milioni di abitanti) = 12% della popolazione europea
 - 3 categorie RTE (prodotti a base di carne, formaggi molli e semi-molli, pesce affumicato)
 - 400 campioni per categoria, 800 per il pesce affumicato (2 campioni per ciascun prelievo, appartenenti allo stesso lotto, uno analizzato all'arrivo in laboratorio, l'altro a fine shelf life)
 - Il programma è stato progettato per avere risultati statisticamente significativi a livello europeo, ma almeno per il pesce affumicato, date le alte percentuali di positività rilevate, è stato possibile avere informazioni interessanti anche a livello nazionale



Enti coinvolti nelle attività

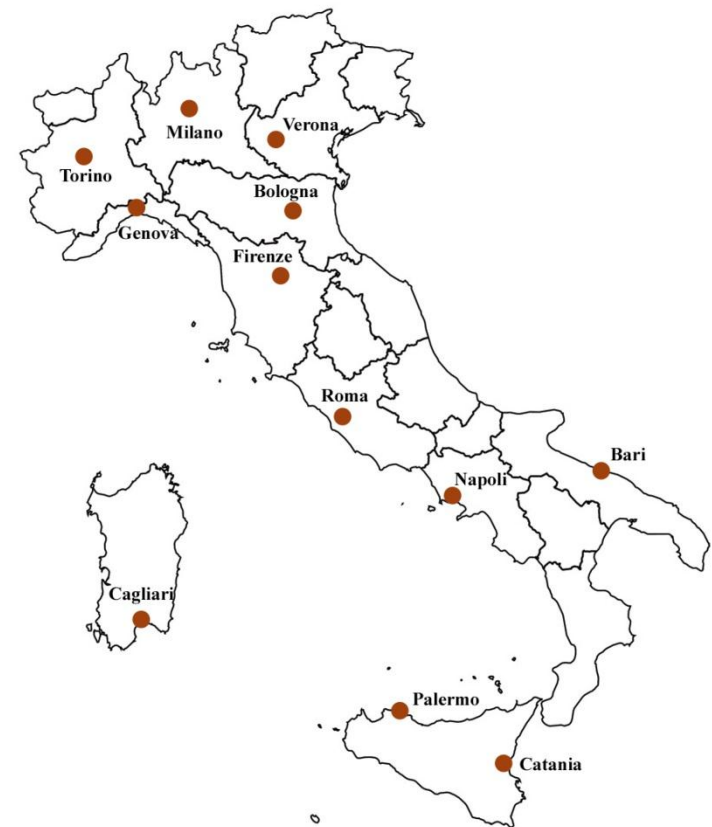
- 16 aziende AA.SS.LL. hanno effettuato i prelievi
- 8 II.ZZ.SS. Hanno effettuato le analisi microbiologiche ed inviato i ceppi isolati al LNRLm
- Il Ministero della Salute ed 11 Regioni hanno svolto attività di coordinamento
- Il LNRLm ha svolto attività di coordinamento/raccolta dati ed ha eseguito le analisi di caratterizzazione dei ceppi (sierotipizzazione e PFGE)



Piano di campionamento

Il piano di campionamento è stato progettato coinvolgendo le 8 maggiori città italiane. Altre 4 città sono state aggiunte al fine di rappresentare tutte le macro-aree geografiche macro-areas (Nord-ovest, Nord-est, Centro + Sardegna, Sud + Sicilia).

In tutto: 12 città = 15% della popolazione italiana



Risultati UE-Italia

Categoria	UE positivi	ITA positivi	UE > 100 UFC/g	ITA > 100 UFC/g
Formaggi	2,07%	1,0%	0,06%	0
Prodotti a base di carne	2,47%	2,0%	0,43%	0,5%

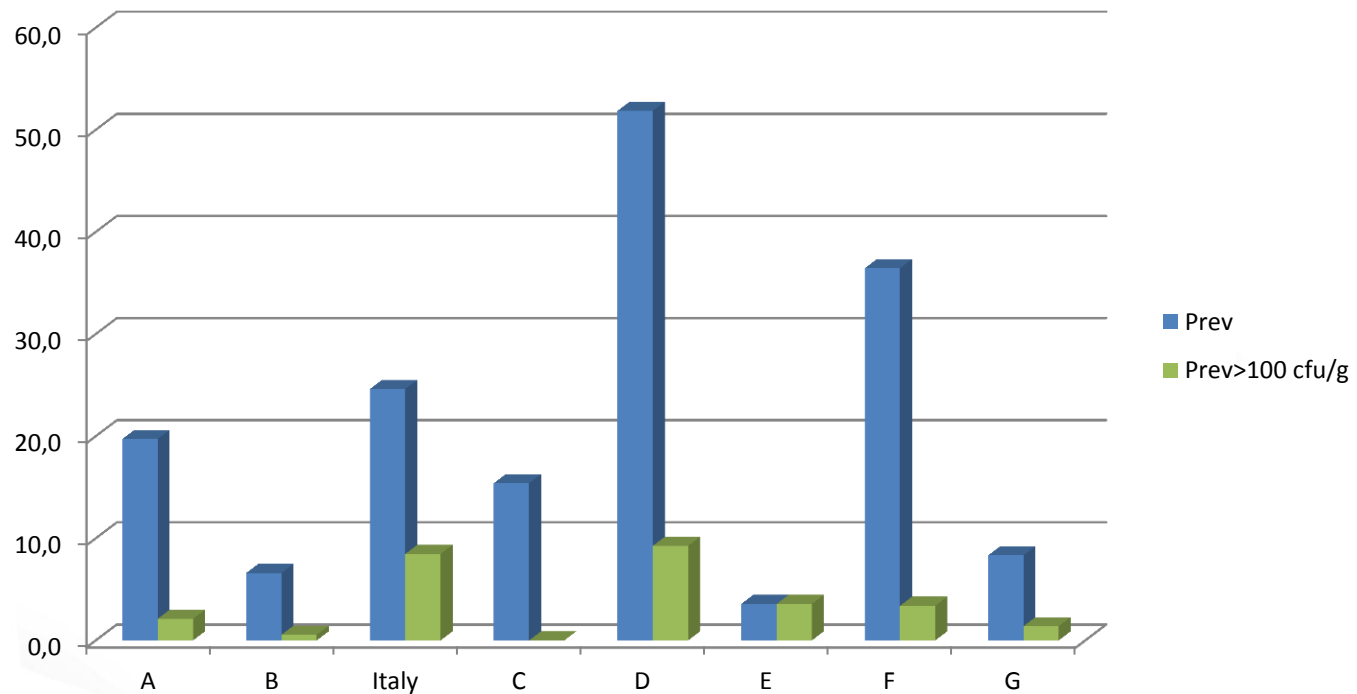
Categoria	UE positivi	ITA positivi	UE > 100 UFC/g	ITA > 100 UFC/g
Pesce aff arrivo in lab	10,2%	18,5%	0,9%	2,3%
Pesce aff fine shelf life	10,1%	21,8%	1,8%	4,4%

Dati UE tratti dallo Scientific Report sui risultati del baseline study (EFSA Journal 2013;11(6):3241). Dai dati UE sul pesce affumicato/gravad lax è stato escluso il gravad lax, non campionato in Italia.

- Mentre per la carne e i formaggi i risultati in Italia sono stati simili a quelli registrati in Europa, per il pesce affumicato è stata registrata una frequenza di contaminazione molto maggiore rispetto alla prevalenza media europea
- I campioni positivi di pesce affumicato in Italia erano quasi tutti (99,3%) salmone affumicato, tranne un campione di pesce spada affumicato



Pesce affumicato: prevalenza di contaminazione secondo il Paese dove è stata effettuata l'ultima lavorazione (solo campioni prelevati in Italia)



Ma più che il Paese, lo STABILIMENTO influisce molto sulla prevalenza



Stabilimento di origine diverso, diversa prevalenza di contaminazione!

Plant	Country	Presence	Absence	Prevalence (%)	>100 cfu/g	≤100 cfu/g	Prevalence >100 cfu/g (%)	Samples
1	A	12	50	19,4	1	61	1,6	62
2	A	8	14	36,4	1	21	4,5	22
3	B	10	72	12,2	1	81	1,2	82
4	B	0	24	0,0	0	24	0,0	24
5	B	2	68	2,9	0	70	0,0	70
6	C	0	16	0,0	0	16	0,0	16
7	C	8	36	18,2	2	42	4,5	44
8	C	17	17	50,0	6	28	17,6	34
9	D	25	15	62,5	5	35	12,5	40
10	E	4	20	16,7	0	24	0,0	24
11	F	1	19	5,0	1	19	5,0	20
12	G	1	55	1,8	0	56	0,0	56
13	G	40	12	76,9	4	48	7,7	52
14	I	1	17	5,6	0	18	0,0	18
15	I	4	12	25,0	1	15	6,3	16
TOTAL								580

Campioni di pesce affumicato campionati alla vendita al dettaglio

E' stata rilevata **differenza statisticamente significativa** tra campioni provenienti da stabilimenti diversi: $\chi^2=193,22$; $P<0,05$ (presenza di Lm); $\chi^2=39,30$; $P<0,05$ (livelli > 100 UFC/g)

Effetti della durata della shelf life sul pesce affumicato?

Il numero di campioni statisticamente significativo a livello europeo ha permesso di definire una prevalenza dell'1,8% per il pesce analizzato a fine shelf-life rispetto allo 0,9% all'arrivo in laboratorio.

A livello italiano non sono state rilevate differenze statisticamente significative tra campioni analizzati all'arrivo in laboratorio e campioni analizzati alla data di scadenza:

$\chi^2=1,364$, $P>0,05$ (presenza di Lm)

$\chi^2=2,546$, $P>0,05$ (livelli > 100 UFC/g)


Ma considerando solo i campioni analizzati all'arrivo in laboratorio a più di mese prima dalla scadenza:

$\chi^2=4,992$, $P<0,05$ (presenza di livelli >100 CFU/g)

Sarebbero necessari studi più approfonditi per verificare se l'imposizione di una shelf life di minore durata potrebbe avere un effetto significativo sul rischio a carico del consumatore di pesce affumicato



Tipizzazione biomolecolare (PFGE)



Sono state effettuate analisi biomolecolari per verificare la presenza di correlazione genetica tra i ceppi isolati da carne, formaggi e pesce provenienti dagli stessi stabilimenti (o da stabilimenti diversi)

Sono stati analizzati 338 ceppi:

- 22 ceppi isolati da carne
- 10 ceppi isolati da formaggi
- 306 ceppi isolati da pesce affumicato



Caratterizzazione ceppi isolati dalla carne (22 ceppi)

I sierotipi di *Listeria monocytogenes* isolati sono stati:

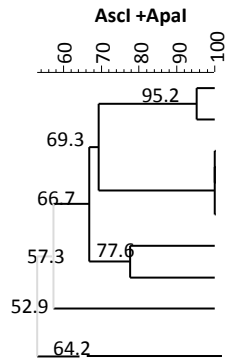
- 1/2a (77,8%)
- 1/2b (11,1%)
- 1/2c (11,1%)

L'analisi PFGE ha permesso di ottenere

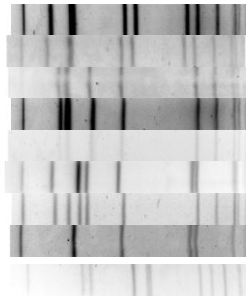
- 6 profili di macrorestrizione per l'enzima *AscI*
- 7 profili di macrorestrizione per l'enzima *Apal*.
- l'analisi combinata dei due enzimi ha prodotto 7 differenti pattern.



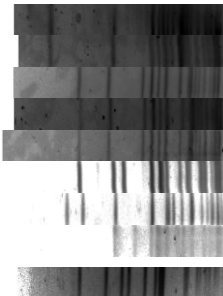
Distribuzione dei pulsotipi PFGE



PFGE Ascl

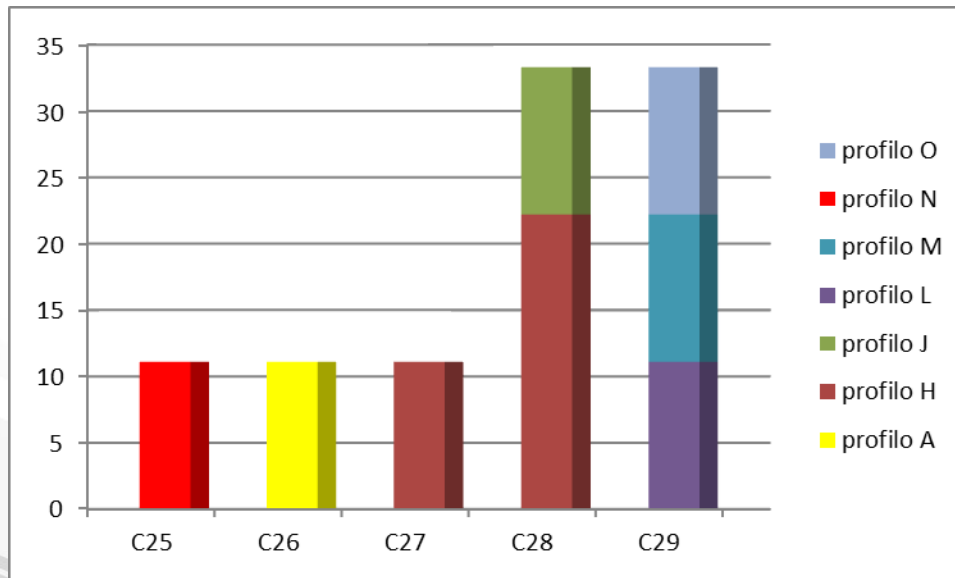


PFGE Apal



Meat and products 1/2 a
Meat and products 1/2 a
Meat and products 1/2 a
Meat and products 1/2 a
Meat and products 1/2 a
Meat and products 1/2 a
Meat and products 1/2 c
Meat and products 1/2 a
Meat and products 1/2 b

GX6A16.0104	GX6A12.0057	PROFILO I	C28
GX6A16.0104	GX6A12.0063	PROFILO N	C25
GX6A16.0048	GX6A12.0062	PROFILO H	C27
GX6A16.0048	GX6A12.0062	PROFILO H	C28
GX6A16.0048	GX6A12.0062	PROFILO H	C28
GX6A16.0120	GX6A12.0123	PROFILO M	C29
GX6A16.0007	GX6A12.0050	PROFILO O	C29
GX6A16.0002	GX6A12.0048	PROFILO A	C26
GX6A16.0115	GX6A12.0129	PROFILO L	C29




Caratterizzazione ceppi isolati dai formaggi (10 ceppi)



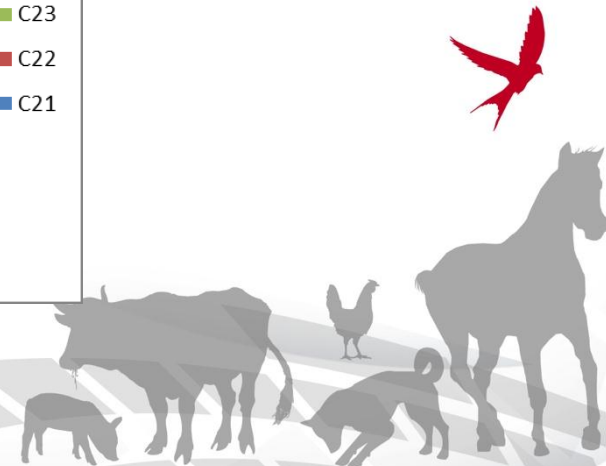
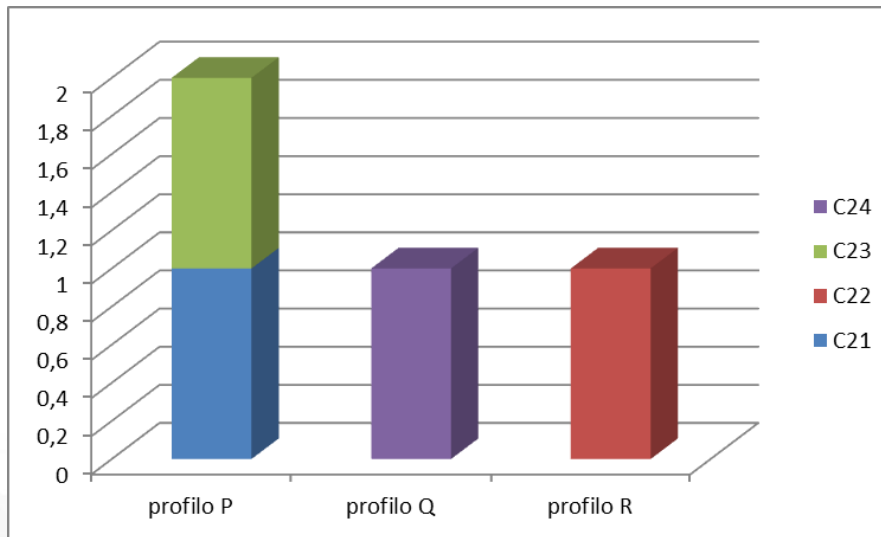
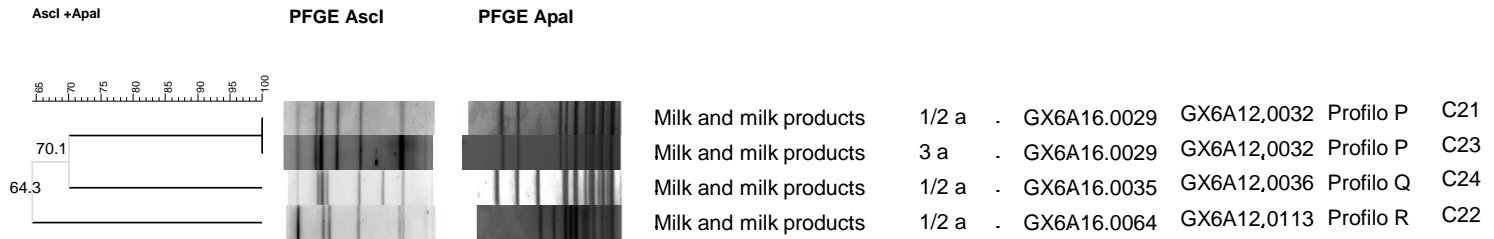
I sierotipi di *Listeria monocytogenes* isolati sono stati:

- 1/2a (75%)
- 3a (25%)

- 
- L'analisi PFGE ha permesso di ottenere
- 3 profili di macrorestrizione per l'enzima *Ascl*
 - 3 profili di macrorestrizione per l'enzima *Apal*.
 - l'analisi combinata dei due enzimi ha prodotto 3 differenti pattern



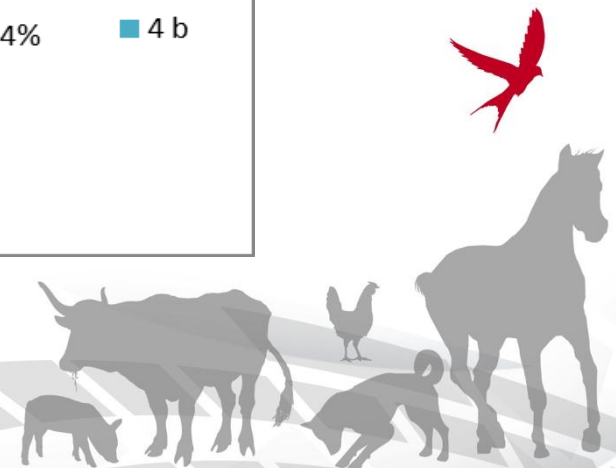
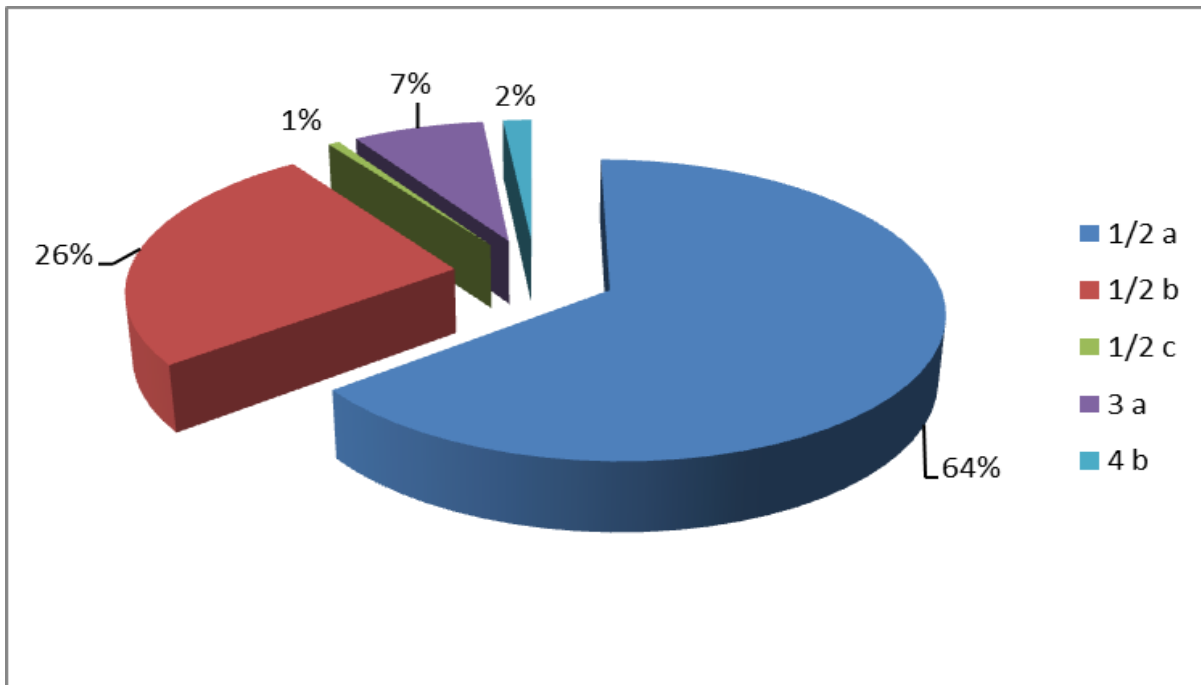
Distribuzione dei pulsotipi PFGE



Caratterizzazione ceppi isolati dal salmone (306 ceppi)



I sierotipi di *Listeria monocytogenes* isolati sono stati:

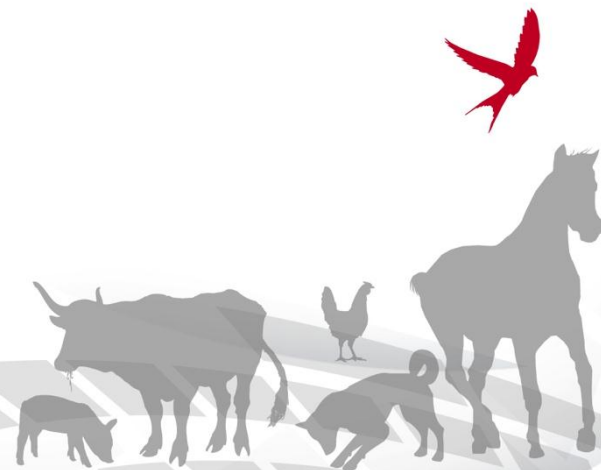


Caratterizzazione ceppi isolati dal salmone (306 ceppi)

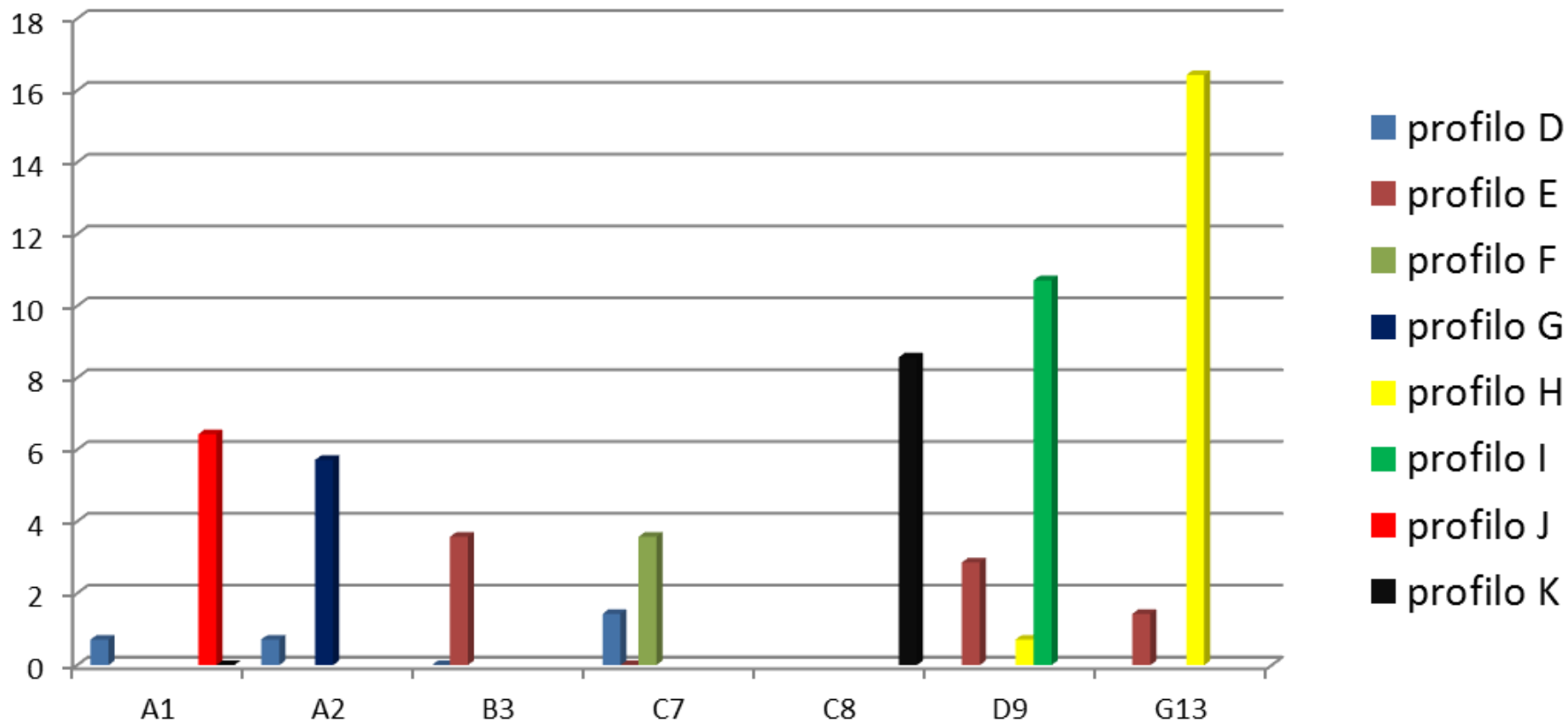


L'analisi PFGE ha permesso di ottenere

- 26 profili di macrorestrizione per l'enzima *Ascl*
- 27 profili di macrorestrizione per l'enzima *Apal*.
- l'analisi combinata dei due enzimi ha prodotto 35 differenti pattern
- con 8 profili prevalenti che raggruppano il 71% dei ceppi



Distribuzione dei principali pulsotipi in funzione dello stabilimento di produzione

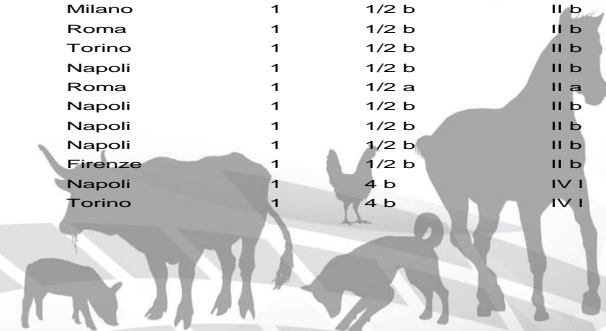
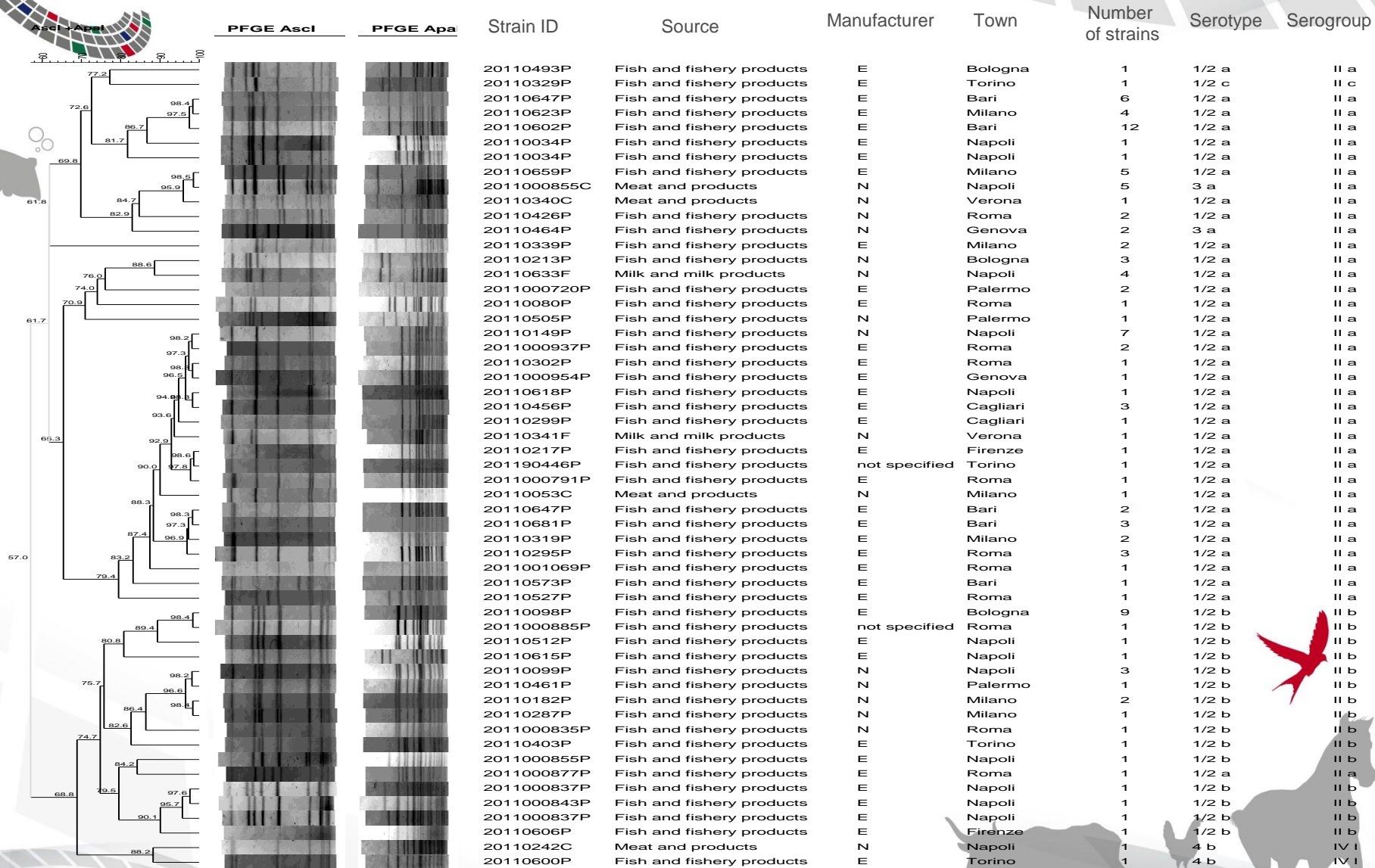


Risultati PFGE ceppi di salmone

- ✓ L'analisi di PFGE ha mostrato una correlazione tra pulsotipi e il paese dei produttori, inoltre, due dei principali profili erano strettamente connessi con lo stabilimento di origine.
- ✓ Negli impianti in cui non c'era omogeneità genetica, comunque una pulsotipo era spesso prevalente rispetto agli altri.
- ✓ L'isolamento di ceppi di *Listeria monocytogenes* con lo stesso pulsotipo in diversi impianti di produzione suggerisce:
 - la materia prima quale possibile fonte comune di contaminazione
- ✓ In ogni caso, la presenza di pulsotipi prevalenti o esclusivi di singoli stabilimenti suggerisce:
 - la presenza di ceppi di *Listeria monocytogenes* persistenti negli impianti di lavorazione
 - l'ambiente di lavorazione quale principale fonte di contaminazione



Dendrogramma generale programma coordinato UE



Pulsotipi di ceppi di Lm di origine umana (circolanti in Italia nel 2011) e alimentare (programma UE) – progetto Elite



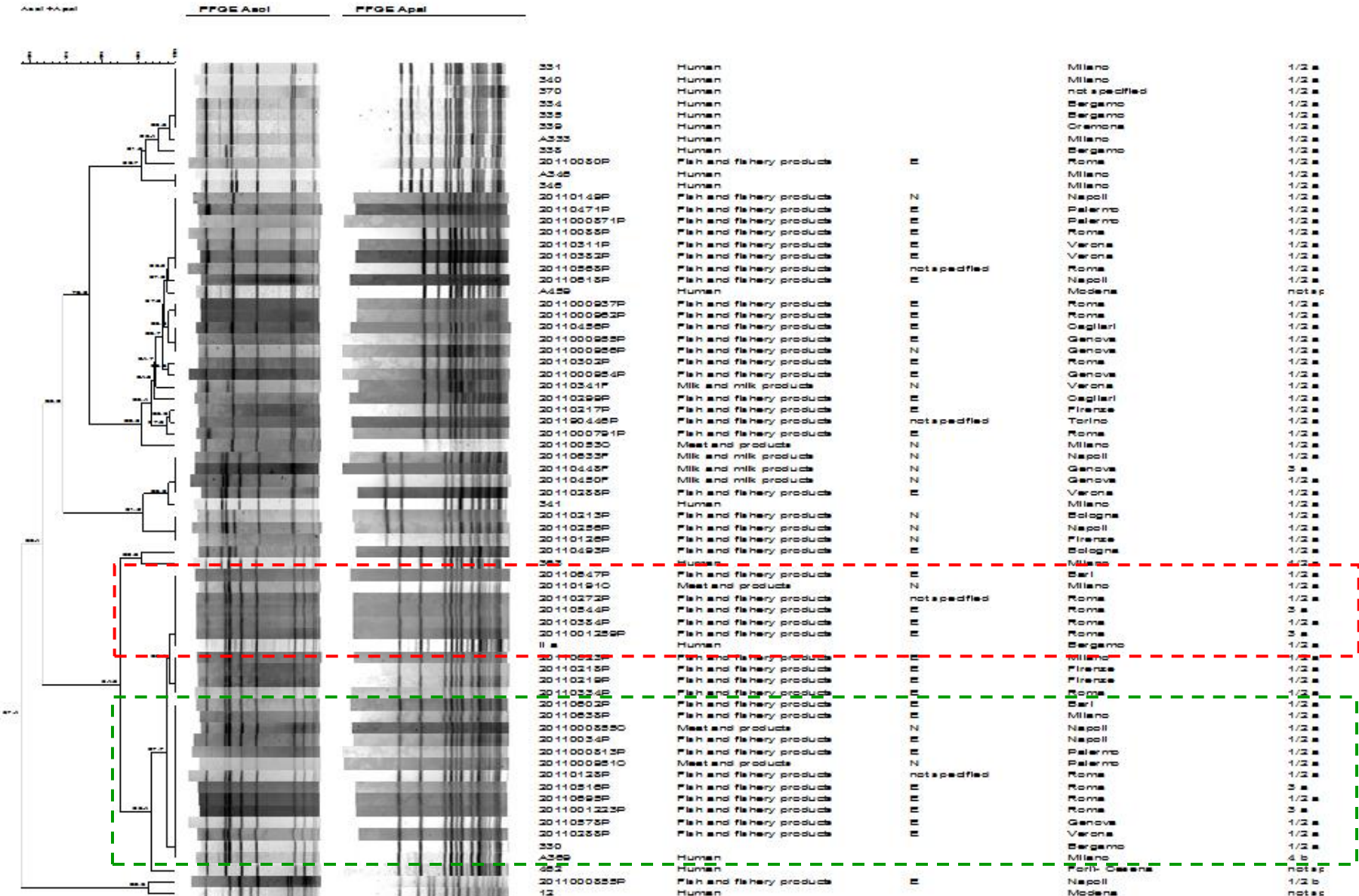
Strain ID

Source

Strain

Town

Serotype



- ✓ Il pesce affumicato ha presentato livelli di contaminazione molto elevati, particolarmente sul mercato italiano
- ✓ Alta frequenza di livelli > 100 UFC/g
- ✓ Campioni analizzati a fine shelf-life più frequentemente contaminati con livelli > 100 UFC/g
- ✓ Grandi differenze tra campioni lavorati in stabilimenti diversi e, conseguentemente, possibili evidenti differenze tra paesi diversi in relazione alle prevalenti tipologie di approvvigionamento
- ✓ La PFGE ha confermato che esistono ceppi specifici per singoli stabilimenti (persistenza ceppi e igiene dello stabilimento)
- ✓ L'origine delle contaminazioni sarebbe pertanto da riferire essenzialmente all'igiene degli stabilimenti di origine, per quanto non si esclude che la materia prima possa essere una fonte comune di contaminazione tra stabilimenti diversi
- ✓ Il confronto con profili PFGE di origine umana ha dimostrato omologia con ceppi di origine alimentare isolati da pesce affumicato nel corso del programma UE



Grazie per
l'attenzione!

