IZSAM G.CAPORALE TERAMO

CONTAMINAZIONE MICROBIOLOGICA DI PRODOTTI VEGETALI POSTI IN COMMERCIO IN ITALIA

Cristina Marfoglia e Gino Santarelli
Igiene delle Tecnologie Alimentari e dell'Alimentazione Animale

Progetto IZS AM 02/11 RC

Progetto IZS AM 02/11 RC : Valutazione delle dinamiche di contaminazione da agenti patogeni, dell'efficacia dei controlli e del rischio finale per il consumatore per alcune categorie di prodotti alimentari

- Obiettivi
- Introduzione
- Materiali e metodi
- Risultati
- Conclusione

Progetto IZS AM 02/11 RC
Obiettivi

- Determinare i livelli di contaminazione da *Salmonella* spp., *L. monocytogenes*, *Campylobacter* spp., *E. coli* VTEC, *Cyclospora* spp., *Cryptsporidium* e alcuni virus (virus Epatite A, virus Epatite E, Norovirus) in prodotti vegetali freschi non di IV gamma e di IV gamma

Progetto IZS AM 02/11 RC
Introduzione

- La presenza negli alimenti di contaminanti biologici rappresenta una grave minaccia per la salute dei consumatori
- In base al regolamento CE 882/2004, le attività di controllo ufficiale sono finalizzate a “prevenire, eliminare o ridurre a livelli accettabili i rischi per gli esseri umani”.

Progetto MSRCTE0211
Introduzione

- Lo stesso regolamento richiede che le autorità competenti assicurino “l’efficacia e l’appropriatezza dei controlli ufficiali sugli alimenti”, che devono essere effettuati “sulla base di una valutazione dei rischi”.
- A tutt’oggi, per alcuni alimenti di largo consumo non sono disponibili i dati sulla prevalenza dei principali agenti patogeni, necessari per istituire un programma di controllo basati sul rischio.

Progetto IZS AM 02/11 RC
Introduzione

- Le matrici inizialmente selezionate per la realizzazione del progetto erano latte crudo e vegetali freschi di IV gamma

- Il latte crudo è stato sostituito in seguito alla riduzione dei distributori di latte fresco
- Sostituito dai vegetali non di IV gamma

Progetto IZS AM 02/11 RC

Materiali e Metodi

Piano di campionamento

- Sono stati esaminati 602 campioni di vegetali freschi, 301 di IV gamma e 301 non di IV gamma
- Il numero di campioni è stato calcolato considerando una contaminazione con una prevalenza attesa dell'1%
- I campioni sono stati prelevati nel circuito della grande distribuzione organizzata nell'arco di venti mesi

Progetto IZS AM 02/11 RC

Materiali e Metodi

Piano di campionamento

Numero campioni (prevalenza media attesa dell'1%) :		
Area geografica	**Insalata fresca non IV gamma**	**Insalata fresca IV gamma**
Nord Ovest	69	109
Nord Est	70	76
Centro (+Sardegna)	75	87
Sud (+Sicilia)	87	29
Totale	301	301

La stratificazione dei campioni per macro aree geografiche è stata effettuata sulla base dei dati forniti da ISMEA-GFK/EURISKO riguardanti le vendite nell'anno 2011 (espresse in tonnellate) presso la grande distribuzione (Ipermercati, Supermercati, Discount e Self Service).

Progetto IZS AM 02/11 RC

Materiali e Metodi

Piano di campionamento

Regione	Numero abitanti al 31-12-12	Non IV gamma	IV gamma	Totale
Valle d'Aosta	127844	1	1	2
Piemonte	4374052	19	30	49
Liguria	1565127	7	11	18
Lombardia	9794525	42	67	109
Trentino-Alto Adige	1039934	6	7	13
Veneto	4881756	30	32	62
Friuli-Venezia Giulia	1221860	7	8	15
Emilia-Romagna	4377487	27	29	56
Marche	1545155	9	10	19
Toscana	3692828	21	24	45
Umbria	886239	5	6	11
Lazio	5557276	31	36	67
Abruzzo	1312507	6	2	8
Molise	313341	1	0	1
Campania	5769750	26	9	35
Puglia	4050803	19	6	25
Basilicata	576194	3	1	4
Calabria	1958238	9	3	12
Sicilia	4999932	23	8	31
Sardegna	1640379	9	11	20
TOTALE		301	301	602

La stratificazione dei campioni, all'interno delle macro aeree geografiche, è stata effettuata prevedendo il prelievo in ogni provincia di un numero di campioni proporzionale alla popolazione residente nella provincia stessa

Progetto IZS AM 02/11 RC
Materiali e Metodi
Piano di campionamento

Gruppo	Specie	Varietà	Nome comune	IV gamma	non IV gamma	Totale
Lattuga	*Lactuca sativa*	capitata	Lattuga cappuccina e Lattuga iceberg	117	177	294
		crispa	Lattuga rossa e Lattuga da taglio (lattughino)			
		longifolia	Lattuga romana			
Scarola Indivia Cicoria	*Cichorium endiva*		Scarola, Scarola riccia	26	56	82
			Indivia			
	Cichorium intybus		Cicoria pan di zucchero, cicoria selvatica			
Radicchio	*Cichorium intybus*		Radicchio	5	68	73
Rucola	*Eruca vesicaria*		Rucola (sinonimi rucola gentile e rucola a foglia larga)	22	0	22
	Diplotaxis tenuifolia		Rucola selvatica (sinonimi rucola rustica e rucola a foglia stretta)			
Songino	*Valerianella locusta*		Songino (sinonimi: soncino, valeriana, valerianella, gallinella)	8	0	8
Insalate miste	Varie (oltre a quelle già elencate: carota, cavolo cappuccio, barbabietola rossa)			123	0	123
Totale				**301**	**301**	**602**

Progetto IZS AM 02/11 RC

Materiali e Metodi

Isolamento dei batteri

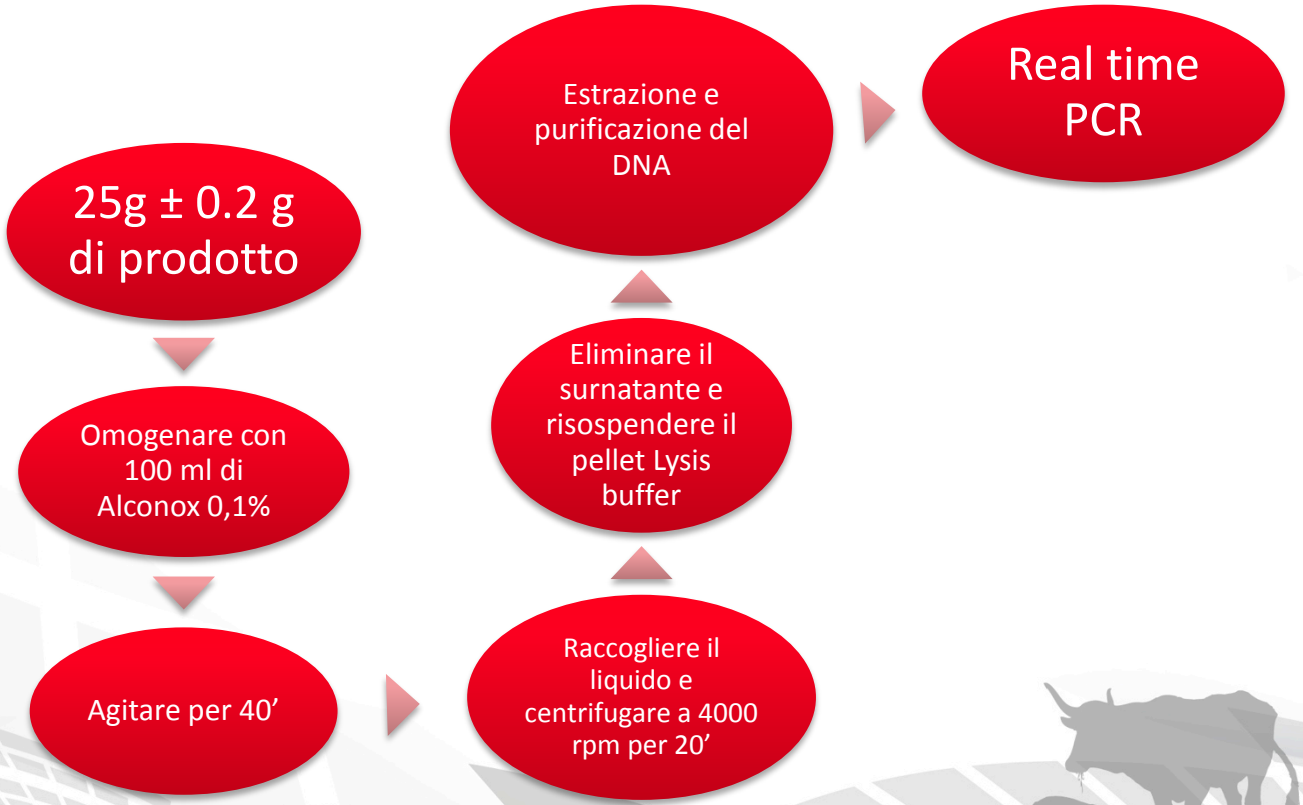
Agente Patogeno	Peso Campione (g)	Metodo molecolare di Screening	Metodo di conferma	Determinazione dei livelli di contaminazione
Listeria monocytogenes	25	DUPONT™ BAX® SYSTEM PCR ASSAY FOR LISTERIA MONOCYTOGENES	ISO 11290-1:1996/Amd2004	UNI EN ISO 11290-2:1998/ Amd 1:2004
Campylobacter termotolleranti	25	DUPONT™ BAX® SYSTEM REAL-TIME PCR ASSAY FOR CAMPYLOBACTER JEJUNI/COLI/LARI	UNI EN ISO 10272-1:2006	UNI EN ISO 10272-2:2006
Salmonella spp	325	DUPONT™ BAX® SYSTEM PCR ASSAY FOR SALMONELLA	ISO 6579:2002, Amd 2004	FDA BAM 8a Ed Rev A 1998 (MPN)
E. Coli VTEC/STEC	325	Applied biosystems life technologies TaqMan®STEC Screening Assay, ISO	ISO/TS 13136:2012	

Progetto IZS AM 02/11 RC

Materiali e Metodi

Isolamento agenti protozoari

Ricerca ed identificazione di *Cyclospora cayetanensis* e *Cryptosporidium parvum* mediante Real Time PCR



Progetto IZS AM 02/11 RC

Materiali e Metodi

Isolamento agenti protozoari

- Per l'analisi in PCR Real-time per *Cyclospora cayetanensis* sono stati utilizzati Oligonucleotidi e sonde TaqMan specifici per la regione del gene ribosomiale 18S rRNA

- Per l'analisi in PCR Real-time per *Cryptosporidium parvum* sono stati utilizzati Oligonucleotidi e sonde TaqMan specifici per la regione del gene COWP, gene di che codifica per una proteina dell'oocisti.

Varma M, Hester JD, Schaefer FW 3rd, Ware MW, Lindquist HD. (2003). Detection of Cyclospora cayetanensis using a quantitative real-time PCR assay. J Microbiol Methods 53(1):27-36.

Progetto IZS AM 02/11 RC

Materiali e Metodi

Isolamento agenti virali

- ISO/TS 15216-2:2013 “Microbiology of food and animal feed - Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real time RT-PCR”
- EU FP VII Project “VITAL” SOP VITAL 020 “Detection and quantification of hepatitis E virus by real-time reverse transcriptase PCR”

Progetto IZS AM 02/11 RC

Risultati

- Tutti i campioni, sia di IV gamma che non di IV gamma sono risultati negativi per *Campylobacter* sp., *Listeria monocytogenes* , *E. coli* VTEC/STEC, *Cryptosporidium parvum* e *Cyclospora cayetanensis*
- 1 campione positivo per *Salmonella yellowknife* per prodotti IV gamma
- 1 campione positivo per *Salmonella kasenyi* per prodotti non IV gamma

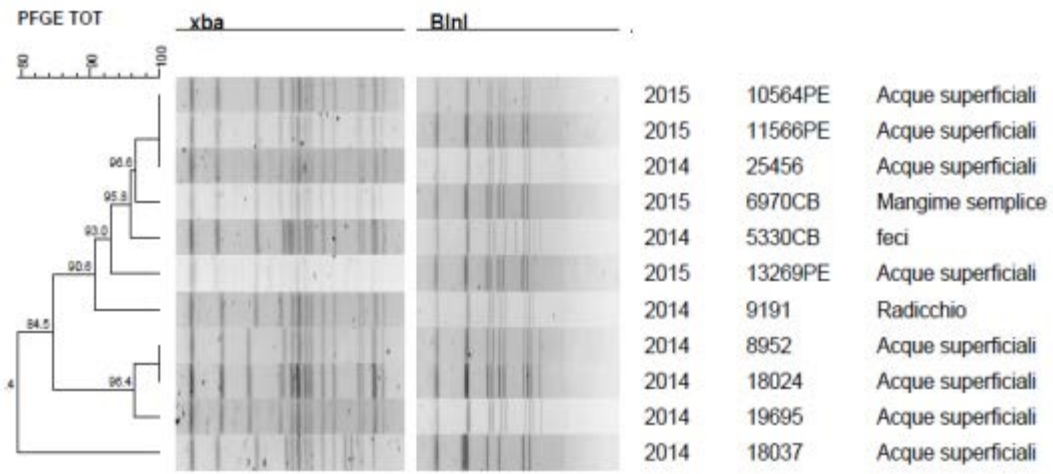
Per entrambi i campioni positivi per Salmonella il livello di contaminazione è risultato sotto il limite di rilevabilità del metodo di conta (<0,3MPN/g)

Progetto IZS AM 02/11 RC

Risultati

- PFGE Salmonella:

Solo il ceppo di *Salmonella kasenyi* ha mostrato una similarità del 90,6% con ceppi isolati da acque superficiali, feci bovine e mangime



2015	10564PE	Acque superficiali
2015	11566PE	Acque superficiali
2014	25456	Acque superficiali
2015	6970CB	Mangime semplice
2014	5330CB	feci
2015	13269PE	Acque superficiali
2014	9191	Radicchio
2014	8952	Acque superficiali
2014	18024	Acque superficiali
2014	19695	Acque superficiali
2014	18037	Acque superficiali

PFGE (XbaI+ BlnI) di *Salmonella* Kasenyi

Progetto IZS AM 02/11 RC

Risultati

Altri batteri potenzialmente patogeni o indicatori di igiene sono stati isolati dai campioni prelevati

Batteri Gram negativi	**Batteri Gram positivi**
Kluyvera intermedia	*Staphylococcus lentus*
Aeromonas hydrophila - caviae	*Staphylococcus cohnii cohnii*
Vibrio fluvialis	*Staphylococcus sciuri*
Citrobacter freundii , Citrobacter braakii	*Staphylococcus equorum*
Pseudomonas putida; Pseudomonas mendocina	*Streptococcus thoraltensis*
Proteus vulgaris group *-Proteus penneri*	*Staphylococcus vitulinus*
Hafnia alvei	*Streptococcus ovis*
Raoultella planticola	*Kocuria kristinae; Kocuria rosea*
Klebsiella pneumoniae; Klebsiella oxytoca	*Erysipelothrix rhusiopathiae*
Serratia odorifera	*Helcococcus kunzii*
Enterobacter amnigenus; Enterobacter cloacae	*Aerococcus viridans*
Enterobacter aerogenes	*Gardnerella vaginalis*
Acinetobacter baumannii; Acinetobacter lwoffii	*Granulicatella adiacens*
Acinetobacter haemolyticus; Acinetobacter ursingii	*Micrococcus luteus - lylae*
Comamonas testosteroni	*Enterococcus casseliflavus*
Pantoea spp	*Alloiococcus otitis*
Providencia alcalifaciens	*Leuconostoc mesenteroides* ssp *cremoris*

Progetto IZS AM 02/11 RC

Risultati

- Tutti i campioni, sia di IV gamma che non di IV gamma sono risultati negativi per i virus dell'Epatite A e dei Norovirus GI e GII.

- 1 campione, non di IV gamma, è risultato positivo al virus dell'Epatite E (prevalenza 0.16 % sul totale dei campioni).

Progetto IZS AM 02/11 RC

Conclusioni

- **I risultati delle analisi di laboratorio dello studio non hanno evidenziato la presenza di *Campylobacter* spp, *Listeria monocytogenes*, *E. coli* VTEC/STEC, *Cryptosporidium parvum*, *Cyclospora cayetanensis* , i virus dell'Epatite A e dei Norovirus GI e GII**

- I campioni sono risultati contaminati da un gran numero di specie batteriche patogene, opportuniste e indicatori di igiene (*Pseudomonas* spp., *Citrobacter* spp., *Enterococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp.)

Progetto IZS AM 02/11 RC

Conclusioni

- La presenza di microrganismi del genere *Listeria (L. innocua e L. seeligeri),* con una prevalenza nei campioni di IV gamma pari all'1,66% contro una prevalenza totale, sui campioni esaminati, pari a 1,00%.
- La presenza di *E.coli* eae+, potenzialmente patogeni sebbene non produttori di verocitotossine, con una prevalenza nei campioni di IV gamma pari all'0,66% contro una prevalenza totale, sui campioni esaminati, pari a 0,50%.

Progetto IZS AM 02/11 RC

Conclusioni

- La presenza di *Salmonella spp.* riscontrata in due campioni, uno di IV gamma (*Salmonella* Yellowknif*e*) e uno non di IV gamma (*Salmonella* Kasenyi) con una prevalenza pari allo 0,33%.
- La presenza del virus dell'Epatite E in un solo campione non di IV gamma con una prevalenza pari allo 0,166%

Progetto IZS AM 02/11 RC

Conclusioni

- Il basso numero di campioni positivi non permette di fare alcuna valutazione sul trend stagionale e territoriale e sull'influenza della tipologia di confezionamento e di conservazione dei prodotti esaminati.
- Si confermano i dati in letteratura con prevalenze e livelli di contaminazione bassi.

Progetto IZS AM 02/11 RC

Conclusioni

- La presenza di *Salmonella spp* in entrambe le categorie di vegetali e valori di prevalenza di *Listeria spp ed E. coli eae+* in prodotti di IV gamma maggiori rispetto a quelli non di IV gamma
- Ci permette di concludere che questo tipi di alimenti presentano un ambiente favorevole per lo sviluppo di questi batteri oppure che la contaminazione dei vegetali può avvenire in fase di produzione o manipolazione
- La presenza di batteri nei prodotti di IV gamma potrebbe rappresentare un rischio per il consumatore

Ringraziamenti

- I colleghi del Reparto Igiene delle tecnologie alimentari e dell'Alimentazione Animale - LNR *Listeria monocytogenes*
- I colleghi del Reparto di Batteriologia e Igiene delle produzioni lattiero casearie

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Grazie per l'attenzione