IZSAM G.CAPORALE
TERAMO

Cross-contaminazioni sperimentali da *Listeria monocytogenes* finalizzate allo studio dei meccanismi di trasferimento nelle contaminazioni domestiche

Anna Franca Sperandii

IZS AM 02/11 RC

Ricerca corrente condotta dall'IZSAM "G. Caporale". Anno 2015 Teramo 15 giugno 2016

Progetto

Area tematica: Sicurezza alimentare

Titolo: 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

IZS AM 02/11 RC

Argometi trattati

- Premessa
- Definizioni
- Fattori condizionanti
- Sperimentazione
- Fasi preliminari
  - Contaminazione
  - Valutazione dell’assorbimento
  - Distribuzione omogenea
  - Modalità operative simulazioni domestiche
- Risultati

Premessa

- La sicurezza degli alimenti è il risultato dell'azione sinergica di tutte le figure coinvolte nella filiera alimentare, dal produttore al consumatore.

- Il luogo in cui si verificano il maggior numero di episodi tossinfettivi in **Italia** è rappresentato dall'abitazione privata (67% dei casi)

- Anche a livello europeo ed internazionale più dell'87% dei focolai epidemici notificati sono associati ad alimenti preparati o consumati in ambito domestico (Redmond EC et al., 2003).

Premessa

Diversi studi (EFSA) hanno segnalato che una parte significativa delle patologie di origine alimentare sono conseguenti a **scorrette abitudini domestiche di manipolazione e conservazione degli alimenti .**

Le contaminazioni di prodotti ready to eat (RTE) con *Listeria monocytogenes,* spesso associate a **cross-contaminazioni ,**tra utensili e prodotti alimentari, sono un importante rischio per la salute pubblica

Definizioni

Contaminazione crociata o Cross contaminazione

- Contaminazione indiretta , ovvero la contaminazione di un alimento che può avvenire se questo entra in contatto con germi trasportati da **un veicolo o un vettore**, senza l'intermediazione di un altro alimento
- Trasferimento di batteri patogeni da un alimento ad un altro attraverso una matrice diversa da quella alimentare (utensili, attrezzature, le mani)

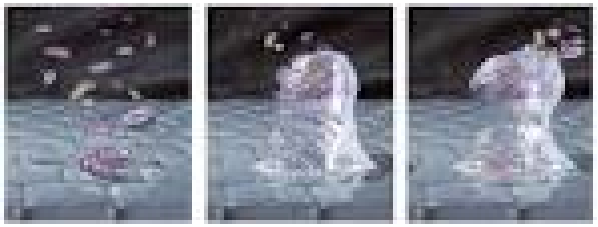
- La contaminazione crociata è un concetto molto importante per la sicurezza alimentare, può essere controllata rispettando buone pratiche di manipolazione degli alimenti

Principali vie di “Contaminazione crociata”

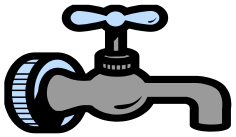
- Alimenti crudi e cotti **conservati insieme**
- Impiego delle stesse superfici di lavoro sia per alimenti crudi che cotti
- Uso di lame, taglieri, strumenti, utensili sia per alimenti crudi che cotti
- Mancato lavaggio delle mani
- Abiti e asciugamani sporchi

Studio Kennedy et al (2005), gli strofinacci contengono una conta totale più elevata di qualsiasi altra superficie esaminata e sono anche una fonte di E. coli, L. monocytogenes e S. aureus.

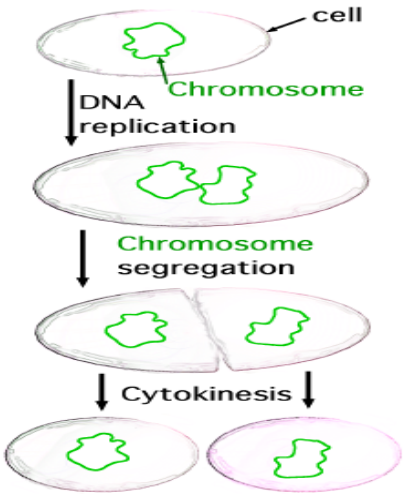
Fattori che condizionano lo sviluppo batterico



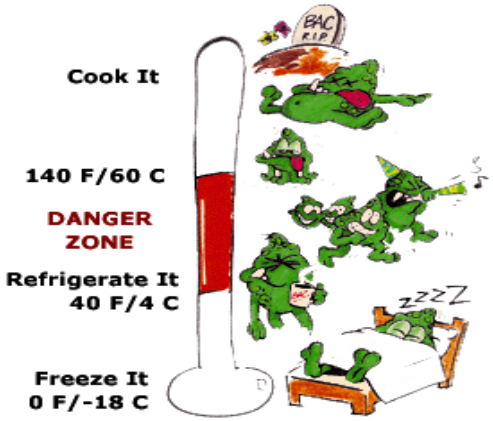
- *Stress batterico e la formazione di biofilm possono influenzare notevolmente la capacità di trasferimento*



- Umidità (< 15% hanno grande difficoltà a riprodursi)



- *Tempo (in circa 20' una cellula origina due cellule figlie….in poche ore miliardi di cellule)*



- **Temperatura** (*moltiplicano* tra 5 e 63°C)

***Nutrimento - (proteine, zuccheri, acqua, sali e vitamine) Ossigeno (aerobi, anaerobi)-pH (Ph*

Letteratura scientifica

- Sono disponibili diversi studi che utilizzano metodologie per la creazione di modelli il trasferimento di batteri tra le superfici.

- Valutazione importante di questi modelli è il fatto che spesso non tengono conto dello **stato fisiologico dei batteri** coinvolti.

- Stress batterico e la formazione di biofilm possono influenzare notevolmente la capacità di contaminazione.

Sperimentazione

- Lo studio si colloca all'interno del progetto che prevede **la stima del rischio** per il consumatore di sviluppare listeriosi attraverso il consumo di alimenti contaminati.

- L'obbiettivo del lavoro è stato quello di documentare **attraverso simulazioni di cross-contaminazione domestica**, con diversi operatori, i meccanismi alla base delle contaminazioni e chiarirne le modalità di trasferimento.

- Le sperimentazioni sono state effettuate presso Laboratorio Trasformazioni Sperimentali dell'IZSAM "Giuseppe Caporale" di Teramo.

Sperimentazione

Lo studio di cross-contaminazione è stato effettuato su prodotti (alimento –tagliere)artificialmente contaminati, sottoposti ai più frequenti comportamenti a rischio.

- **Alimento**: per la valutazione di cross-contaminazione da *Listeria monocytogenes,* a contatto con taglieri, finalizzata allo studio dei meccanismi di trasferimento **dall'alimento alla superfice di taglio (tagliere)**
- **Superfici di lavorazione**: per la valutazione di cross-contaminazione da *Listeria monocytogenes*, a contatto con alimenti ,finalizzata ai meccanismi di trasferimento dalla **superfice di taglio (tagliere) all'alimento**

Sperimentazione

Protocollo

Articolato in fasi **preliminari**

Sviluppate procedure per definire :

- ✓ MODALITA' DI CONTAMINAZIONE
- ✓ **valutazione dell'assorbimento** del contaminante
- ✓ **distribuzione omogenea** di *L. monocytogenes*

- ❑ Taglieri
- ❑ Alimento

- ✓ Modalità operative **standard** con diversi operatori (**verifica variabile**) per simulazioni domestiche

Materiali e metodi

- *Porzioni di 500 g di prosciutto cotto*
- *Taglieri in polietilene*
- *Coltelli*

Materiali e metodi

48 Taglieri

16 prove da tagliere
4 per operatore
A B C D

16 controlli operatori
A B C D

16 prove da prodotto
4 per operatore
A B C D

48 porzioni di Prodotto

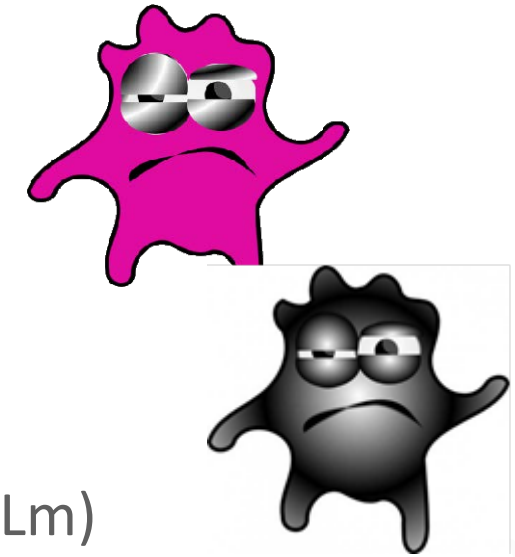
16 prove da tagliere
4 per operatore
A B C D

16 controlli operatori
A B C D

16 prove da prodotto
4 per operatore
A B C D

Materiali e metodi

Ceppi batterici per preparazione inoculo

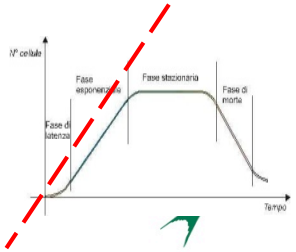


- ❑ *2 ceppi di L.monocytogenes*

- ✓ ceppo di riferimento (ATCC)

- ✓ ceppo isolato da matrice simile (EURL Lm)

L. monocytogenes
ATCC7644 (ceppo di riferimento)
EU-RL 12M0B046LM



L'Inoculo costituito dalla mix dei 2 batteri all'inizio della fase stazionaria (t°/t.) *(rif. procedura* EURL Lm *)*

Livelli di contaminazione

- ✓ **Alimento:**

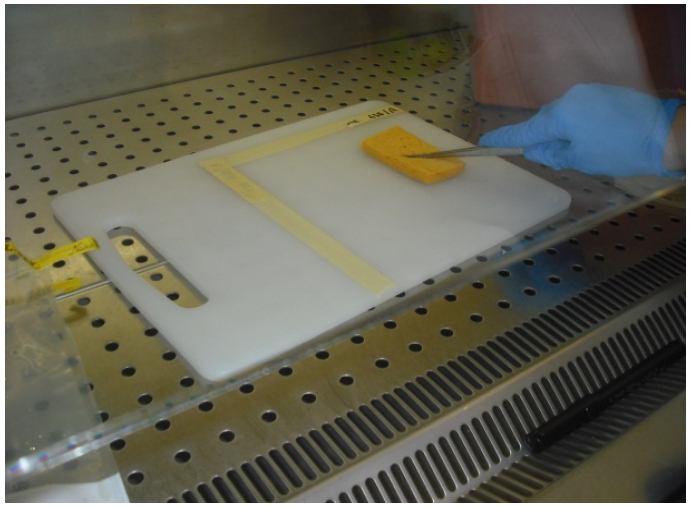
  mix Lm 6 log_{10} UFC/ml adesione dei microrganismi log 4 log10/cm2

- ✓ **Taglieri:**

  mix Lm 7 log10 UFC/ml adesione dei microrganismi log 3 log10/cm2

Fasi preliminari

Verifica



- Livelli di contaminazione
- aW

- Taglieri 20x20cm²
  5 sponge bags

- Prodotto: superficie(10x10cm2)

Modalità di contaminazione Taglieri

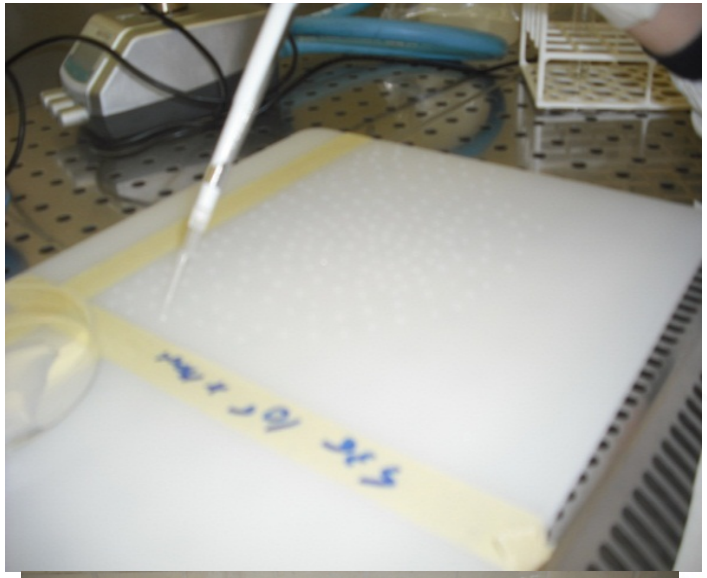
I taglieri sono stati contaminati con il metodo diretto

Superfice del tagliere
20x20 cm2

Contaminazione
con 10 ml di mix*(Sf. CC)

Dispensazione in
microgoccioline a spirale

Asciugatura per 3 ore in cappa a
flusso laminare



Modalità di contaminazione

Alimento

4 porzioni

Contaminazione contatto indiretto

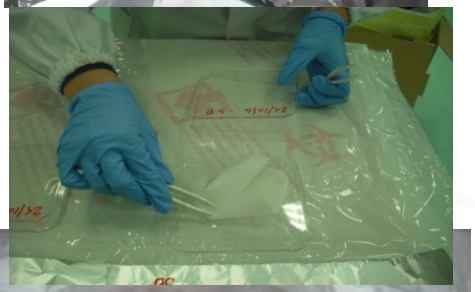
4 forme di carta assorbente(10x10cm$^{2)}$

Poste all'interno di Petri Microglass

Imbibite con 1,8 ml di mix*(Sf.CC)

Poste con una pinzetta su ogni quadrante della porzione di alimento

Copertura con carta stagnola



Modalità di contaminazione

Alimento

- Leggera pressione con un rullino adesione dei microrganismi
- Contatto di 7 minuti
- Rimozione del foglio
- asciugatura in cappa a flusso* laminare per 5 minuti
- Conservazione a 8 ± 2 °C per 24 ore

Ripristinare i valori di aw iniziali *

Simulazioni manuali

Con **4 operatori : A, B, C, D**

Ogni operatore ha:

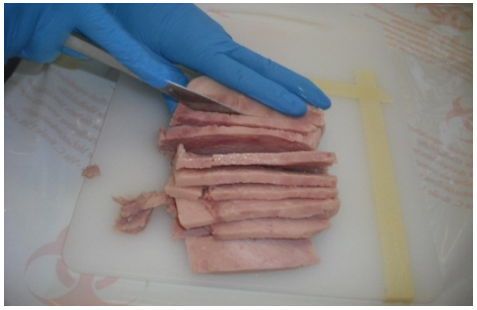
Posizionato la porzione di prosciutto sul tagliere(20x20cm2)

Roteato in senso orario e anti orario per 10 volte esercitando una pressione media

Con un coltello ha tagliato 10/12 sottili fettine

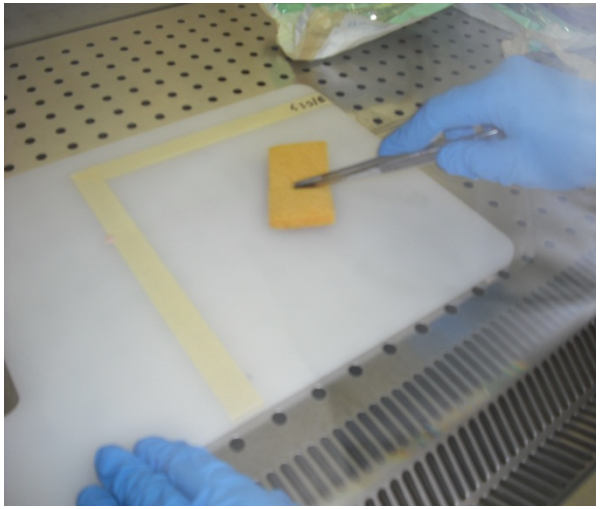
Suddiviso in piccoli tocchettini

Al termine (5 minuti T impiegato) effettuati i campionamenti



Campionamento
Alimento contaminato

- Tutti i ritagli di prosciutto cotto sono stai rimossi
- **Il tagliere è stato campionato** mediante 5 tamponi (sponge bag)
- Le sponge sono state addizionate a 90 ml di brodo UVM1
- Analizzate per verificare il recupero del contaminante



Campionamento

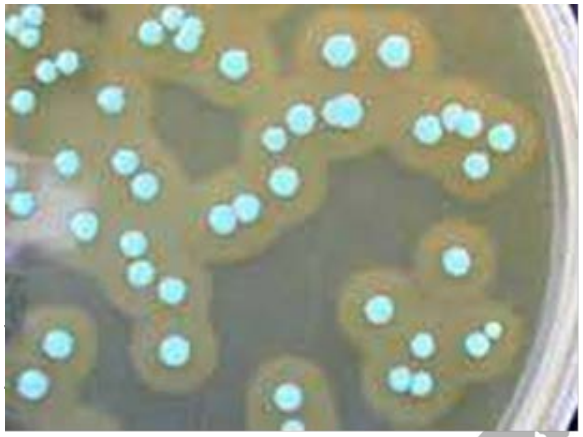
Tagliere contaminato

- Il campionamento, al termine delle manipolazioni è stato effettuato **sull'alimento**
  - I tocchetti di campione sono stati mescolati in maniera accurata
  - Prelevate 5 campionature di 20g ciascuna
  - Analizzate per verificare il recupero del contaminante

- Anche sulla lama dei coltelli utilizzati sono stati eseguiti campionamenti (spongebag)

Esami effettuati

- L'aliquota da sottoporre a prova, la sospensione iniziale e le diluizioni decimali sono state preparate secondo la norma ISO 6887-1:1999
- Analisi microbiologiche *L.monocytogenes*
  - qualitativo EN ISO 11290-1
  - quantitativo EN ISO 11290-2
  - MPN USDA/FSIS.
- Analisi chimico-fisiche (p. preliminari
  - Aw ISO 21807:2004



Risultati

Campioni di controllo		0,9734
Campioni contaminati		0,9736

Risultati preliminari valori medi di aW

Taglieri log 10^3 cm²
Alimento log 10^4 cm²

Verifica preliminare contaminazione

L.monocytogenes

Lama coltelli
<0,03MPN/ml
Ricerca PRESENTE

Risultati

Da tagliere a prosciutto

Operatore	Media log10 UFC/g	SD	Min	Max
A	2,31	0,11	2,11	2,54
B	2,32	0,17	2,04	2,54
C	2,53	0,13	2,26	2,65
D	2,41	0,19	2,08	2,62
Operatore	**Media log10 MPN/g**	**SD**	**Min**	**Max**
A	2,41	0,10	2,38	2,66
B	2,47	0,14	2,38	2,66
C	2,59	0,13	2,38	2,66
D	2,50	0,17	2,18	2,66

Da prosciutto a tagliere

Operatore	Media log10 UFC/cm²	SD	Min	Max
A	1,86	0,14	1,66	1,98
B	1,68	0,11	1,54	1,80
C	1,89	0,10	1,75	1,99
D	1,72	0,17	1,54	1,91
Operatore	**Media log10 MPN/cm²**	**SD**	**Min**	**Max**
A	2,08	0,15	1,87	2,16
B	2,01	0,10	1,87	2,08
C	2,21	0,16	2,08	2,36
D	2,08	0,00	2,08	2,08

Discussioni

Con questo studio è stato dimostrato che, **utilizzando operatori diversi,** il trasferimento della contaminazione di *L.monocytogenes,* per cross contaminazione crociata, avviene sia dal tagliere all'alimento che dall'alimento al tagliere .

Contaminazioni di 3 log UFC/cm² del tagliere hanno generato contaminazioni nell'alimento di circa 2,4 log UFC/g-2,5log MPN/g

Mentre contaminazioni di 4 log UFC/cm² dell'alimento hanno generato contaminazioni sul tagliere di circa 1,8 log UFC/cm²-2,1log MPN/cm².

Conclusioni

- Ulteriori studi saranno necessari per chiarire i meccanismi di contaminazione a livello domestico e definire il loro ruolo nel determinare infezioni alimentari
- Le contaminazioni crociate domestiche pertanto sono fattori importanti che devono essere incluse nelle valutazioni del rischio microbiologico
- **Rimane comunque di fondamentale importanza l'educazione dei consumatori sulla gestione in ambito domestico degli alimenti, intesa sia come modalità di conservazione sia come gestione igienica**

IZSAM G.CAPORALE
TERAMO

Grazie