



ISTITUTO G. CAPORALE
TERAMO

Prevalenza, livelli di contaminazione e caratterizzazione dei ceppi di *Listeria monocytogenes* isolati nella filiera di produzione del Prosciutto di Parma

Luigi Iannetti

Teramo
9 luglio 2012



- *Listeria monocytogenes* è un batterio in grado di produrre grave malattia nell'essere umano
- Nelle categorie a rischio (bambini, anziani, persone immunocompromesse) la letalità è pari al 20% dei casi. Nelle donne gravide è frequente l'aborto (oltre 30% dei casi)



La gestione di *Listeria monocytogenes* negli alimenti è particolarmente difficile, essendo in grado di sopravvivere e proliferare in condizioni avverse per altri batteri, quali:

- temperatura di refrigerazione (2-4°C)
- pH acido (4-5)
- Alte concentrazioni saline (aw 0,90-0,92; 11,5% NaCl)



Background

Il Prosciutto di Parma è un prodotto DOP di grande importanza per l'economia dell'Emilia-Romagna e di numerose altre Regioni italiane



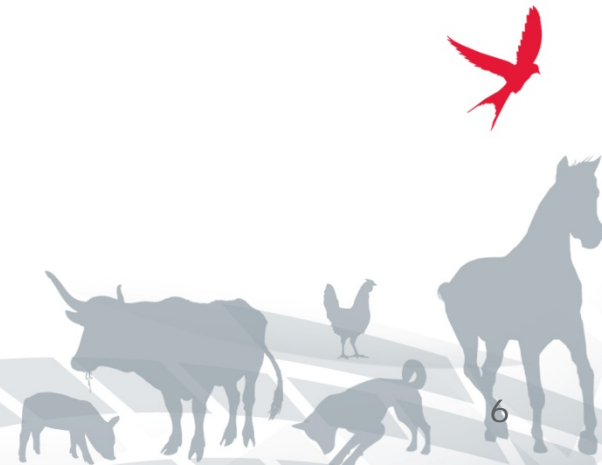
- In **rosso** la zona di produzione del prosciutto
- In **azzurro** la zona ammessa per l'allevamento, la macellazione e il sezionamento dei suini



Ogni anno sono esportate negli USA 200.000 tonnellate di prosciutto di Parma, per un volume di affari intorno ai 20 milioni di euro



- L'Unione Europea (reg. 2073/05) prevede, sulla base di studi di analisi del rischio, un limite di 100 ufc/g per *Listeria monocytogenes* nei prodotti pronti al consumo (RTE)
- Gli USA applicano tolleranza zero alla presenza di *Listeria monocytogenes* negli RTE
- Al momento gli USA non considerano ancora equivalente al loro il sistema di controllo UE
- Pertanto i singoli stabilimenti UE che esportano negli USA devono fornire garanzie equivalenti (assenza di *Listeria monocytogenes* in 25 g), pena la cessazione delle esportazioni





ELSEVIER

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Food Control

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodcont



Listeria monocytogenes prevalence, contamination levels and strains characterization throughout the Parma ham processing chain

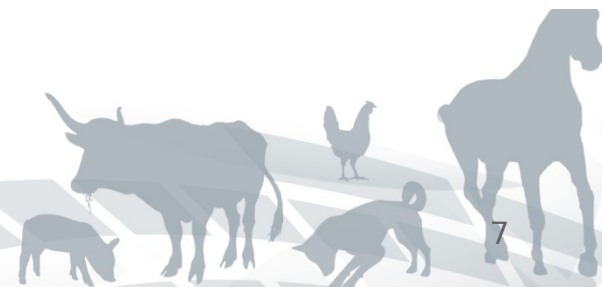
Vincenza Annunziata Prencipe^{a,*}, Valentina Rizzi^a, Vicdalia Acciari^a, Luigi Iannetti^a, Armando Giovannini^a, Andrea Serraino^b, Davide Calderone^c, Andrea Rossi^d, Daniela Morelli^a, Lucio Marino^a, Giacomo Migliorati^a, Vincenzo Caporale^a


^a Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale", Via Campo Boario, 64100 Teramo, Italy

^b Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria e Patologia Animale, Facoltà di Medicina Veterinaria, Via Tolara di Sopra 50, 40064 Ozzano dell'Emilia, Bologna, Italy

^c Consorzio del Prosciutto di Parma, Via Marco dell'Arpa 8/b, 43100 Parma, Italy

^d Centro Ricerche Produzioni Animali – C.R.P.A. S.p.A., C.so Garibaldi, 42 42121 Reggio Emilia, Italy



- 
- Determinare la prevalenza di contaminazione di *Listeria monocytogenes* ai diversi livelli della filiera del Prosciutto di Parma
 - Determinare i livelli di contaminazione
 - Caratterizzare i ceppi isolati
 - Confrontare i ceppi tra loro per capire le dinamiche di contaminazione e
 - Identificare l'origine delle contaminazione e i punti dove applicare misure di controllo efficaci

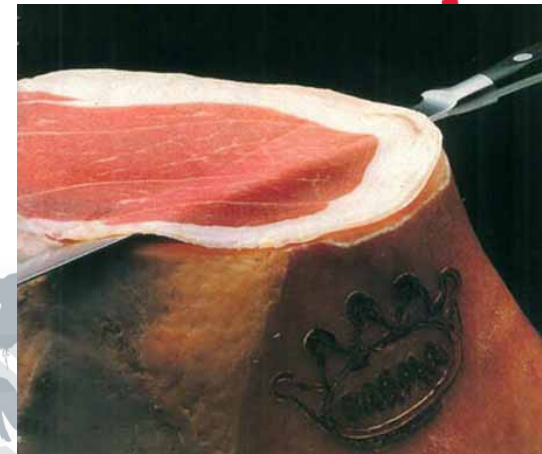


- Diversi studi hanno cercato di definire l'origine delle contaminazioni da *Listeria monocytogenes* nella filiera di produzione dei prodotti a base di carne
- Risultati spesso contrastanti
- Due le principali ipotesi, entrambe solo parzialmente confermate
- l'origine va ricercata nella produzione primaria (suini portatori asintomatici: Beloeil et al. 2003, Hellstro et al. 2010)
- L'origine è essenzialmente legata alla persistenza negli ambienti di lavorazione (Tompkin 2002, EFSA 2008)



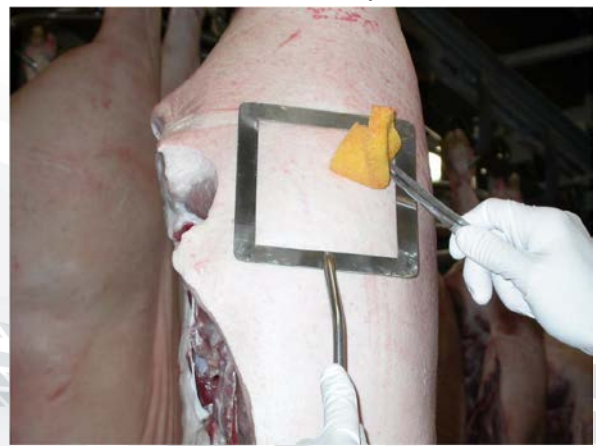
Materiali e metodi

- 774 carcasse suine scelte casualmente in 13 macelli diversi, tutti aderenti al consorzio di produzione del Prosciutto di Parma
- Gli operatori che effettuavano i prelievi dovevano seguire specifiche procedure
- Prelievi effettuati in 3 punti della filiera (carcasse/feci, cosce fresche e prosciutti stagionati)



PUNTO DI CAMPIONAMENTO 1 (carcassa/feci)

- Campionamento con spugnette sulla superficie cutanea di tutte le carcasse prima del raffreddamento
- Prelievo di un campione di feci dal retto (66% delle carcasse)



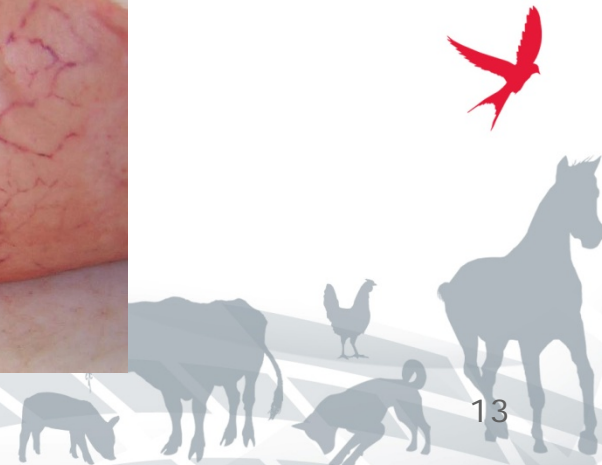
Materiali e metodi

A ciascuna carcassa prelevata veniva applicato un marchio identificativo univoco a livello dello zampetto, che avrebbe permesso poi di ritrovare la coscia fresca/prosciutto corrispondente alle fasi successive (post-sezionamento e post-stagionatura)



PUNTO DI CAMPIONAMENTO 2 (Coscia fresca)

Dopo il sezionamento la coscia veniva rintracciata e sottoposta al prelievo di fette dello spessore di 5 mm per un totale di 100 grammi



Materiali e metodi

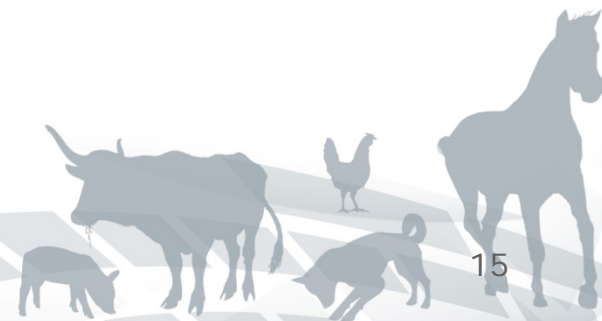
PUNTO DI CAMPIONAMENTO 3 (Prosciutto stagionato)

In prosciuttificio, alla fine della stagionatura e dopo disosso e confezionamento, il prodotto veniva nuovamente sottoposto a prelievo. I prosciuttifici coinvolti sono stati 21.

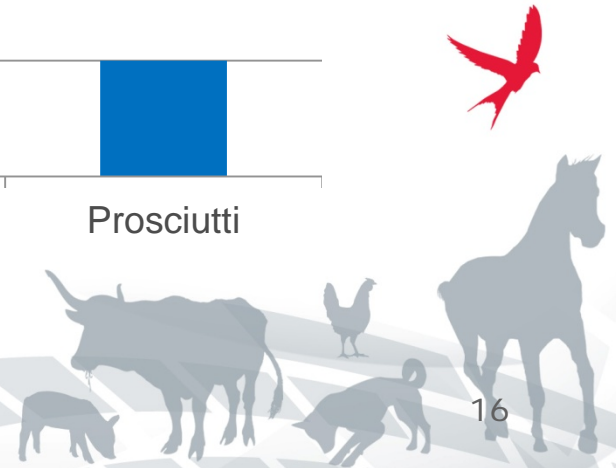
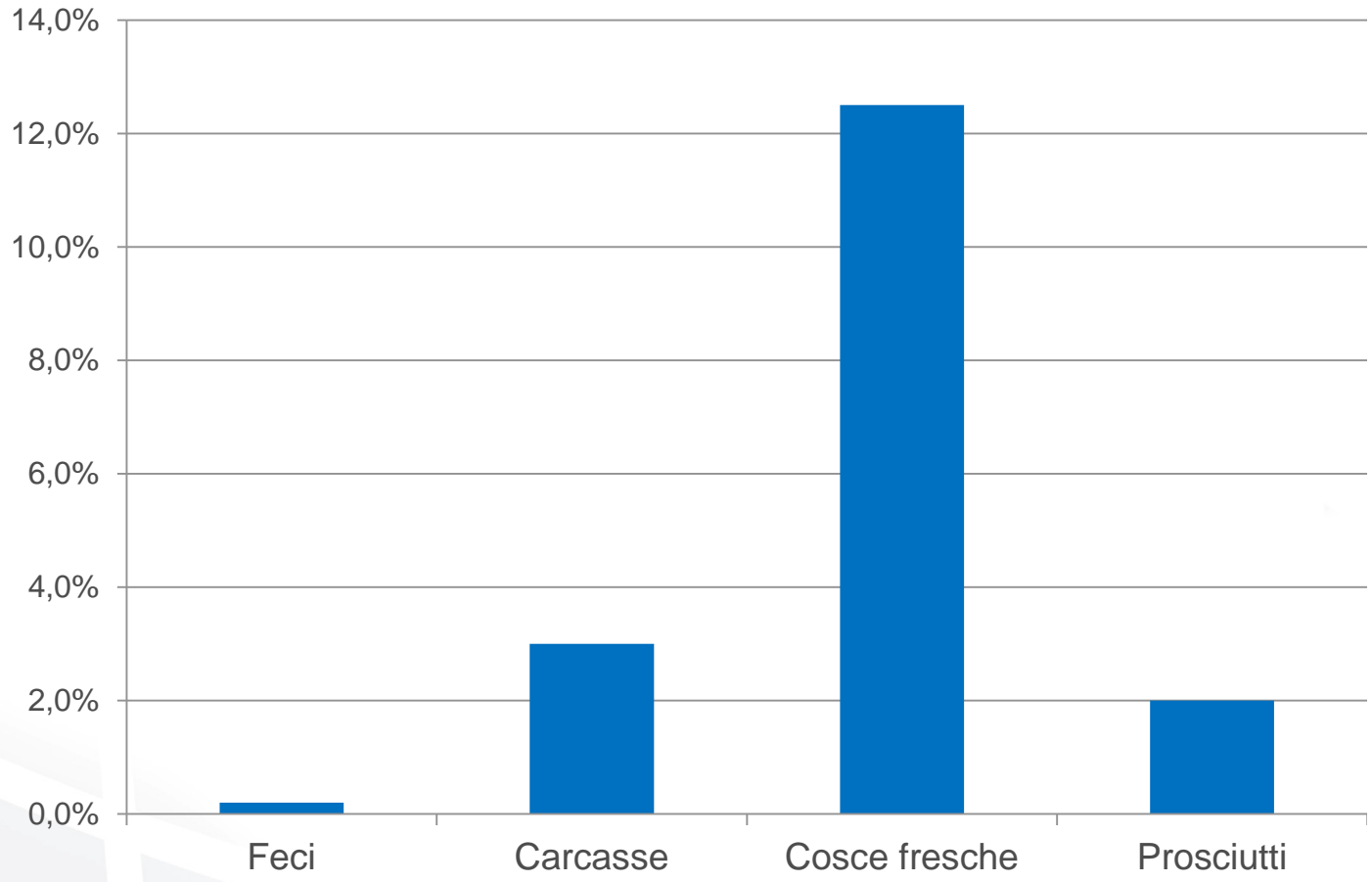


Esami di laboratorio:

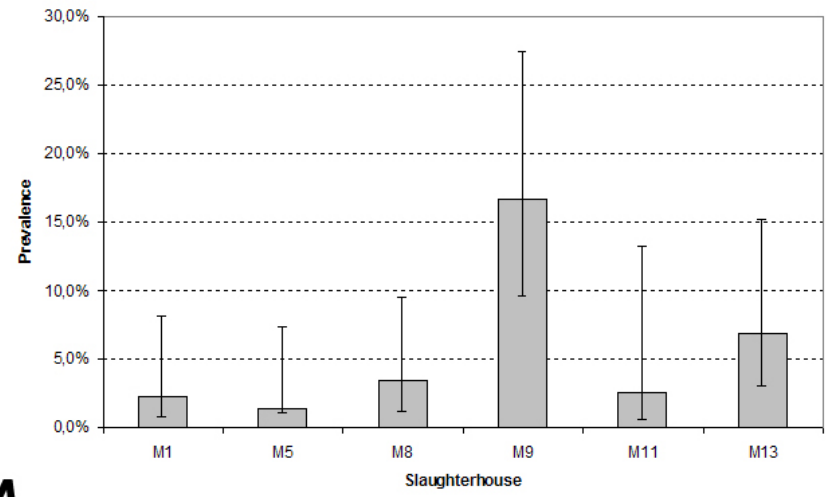
- Ricerca e numerazione *Listeria monocytogenes* (metodi ISO e FSIS/USDA)
- Attività dell'acqua (metodo ISO)
- Caratterizzazione dei ceppi:
 - Sierotipizzazione (metodo BAM-FDA/CFSAN)
 - PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis) (protocollo Pulsenet; profili analizzati col software Bionumerics 4.0)



Risultati: prevalenza

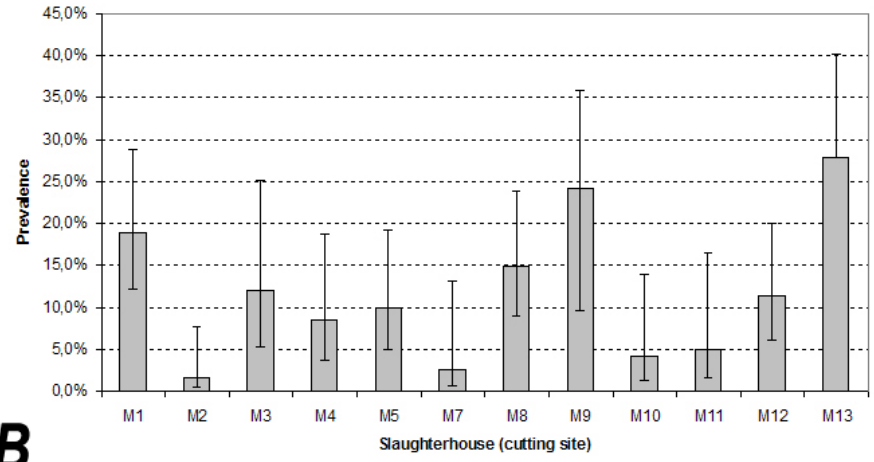


Prevalence in carcasses by slaughterhouse



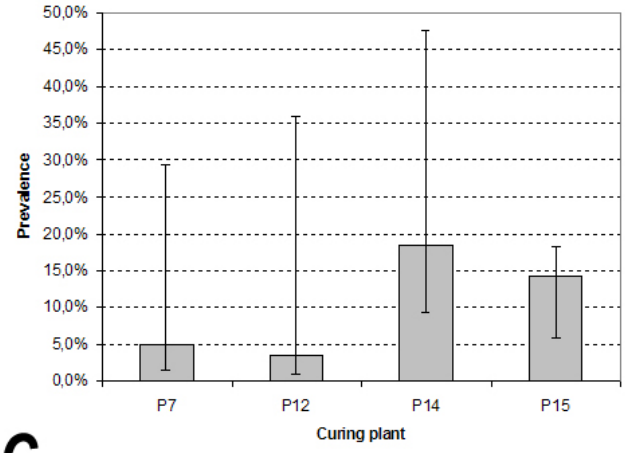
A

Prevalence in fresh hams by cutting site



B

Prevalence in dry-cured hams by curing plant

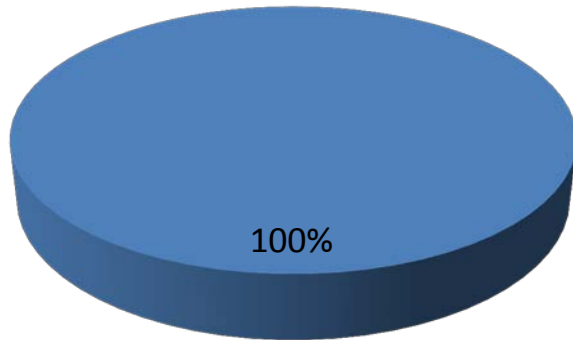


C



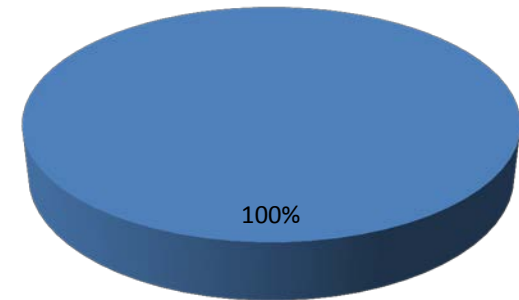
Risultati: livelli di contaminazione (ufc/g)

Carcasse



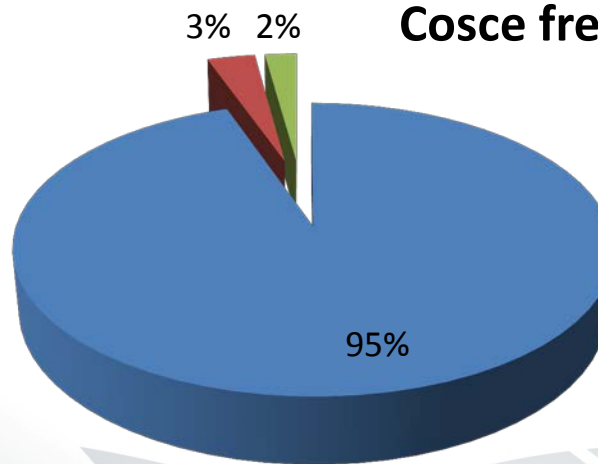
Carcasse e prosciutti non hanno mai superato le 100 ufc/g

Prosciutti



■ <100 ■ 100-1000 ■ >1000

Cosce fresche

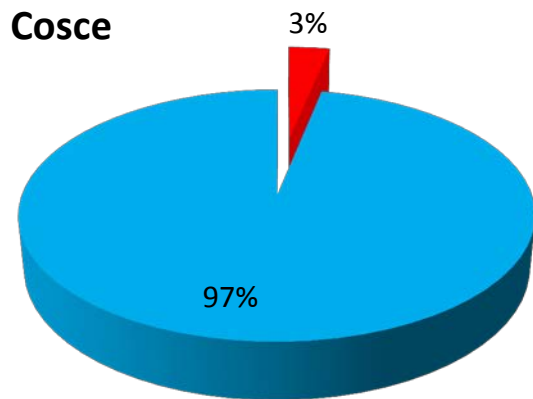


Livello massimo di contaminazione: 2640 ufc/g in una coscia fresca

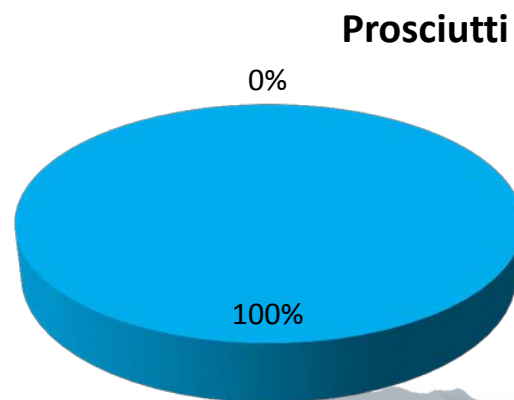


Risultati: trasferimento della contaminazione

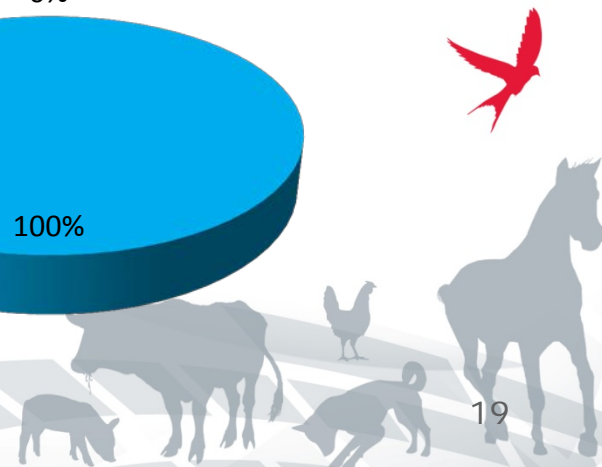
Origine cosce e prosciutti contaminati (da carcasse o cosce positive/negative)



■ da positive ■ da negative



Solo il 3% delle cosce contaminate proveniva da carcasse positive e nessun prosciutto contaminato proveniva da cosce positive



Risultati: trasferimento della contaminazione

In relazione alla persistenza delle contaminazioni da una fase di lavorazione alla successiva, l'applicazione del test di McNemar ha rivelato la presenza di discordanza statisticamente significativa tra:

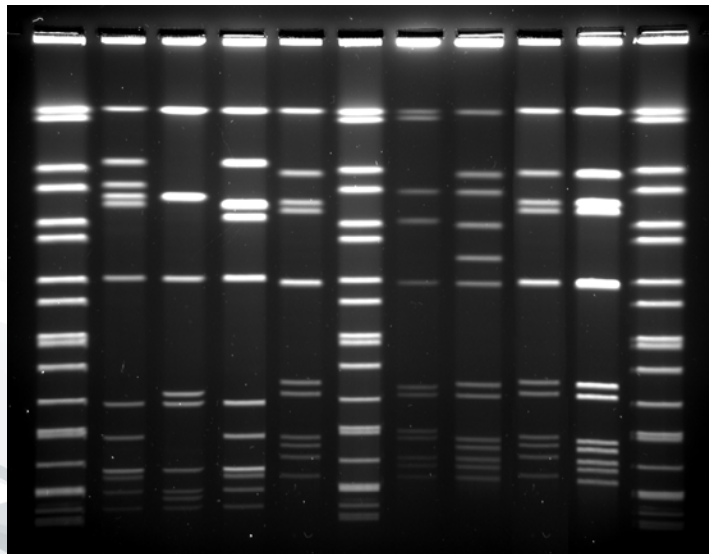
- la presenza di contaminazione nelle cosce fresche e nelle carcasse da cui provenivano (McNemar's $\chi^2 = 47,56$; $p < 0,00001$)
- la presenza di contaminazione nei prosciutti contaminati e nelle cosce fresche da cui provenivano (McNemar's $\chi^2 = 48,58$; $p < 0,00001$)



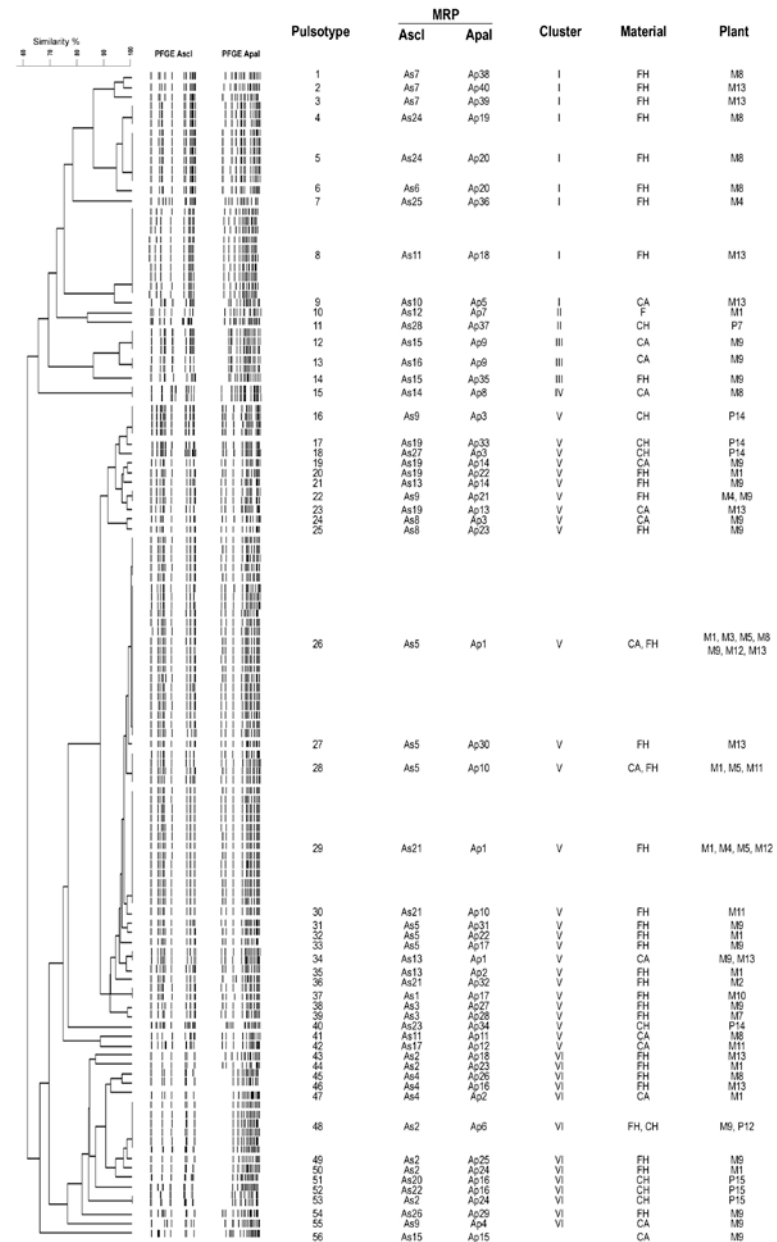
Risultati: caratterizzazione

I 132 ceppi isolati sono stati sierotipizzati e caratterizzati con PFGE (Ascl e ApaI), identificando:

- 6 sierotipi. Il sierotipo più frequente è stato l'1/2c (54,8% dei ceppi): è il più difficile da eliminare dalla catena di lavorazione (Kalmokoff et al. 2001)
- 40 profili (MRP) con l'enzima Ascl
- 28 profili (MRP) con l'enzima ApaI
- 56 pulsotipi (combinazione Ascl e ApaI)



Il dendrogramma prodotto in seguito all'analisi dei profili PFGE con software Bionumerics ha permesso di verificare il grado di similitudine tra i 56 pulsotipi, suddividendoli in 6 cluster



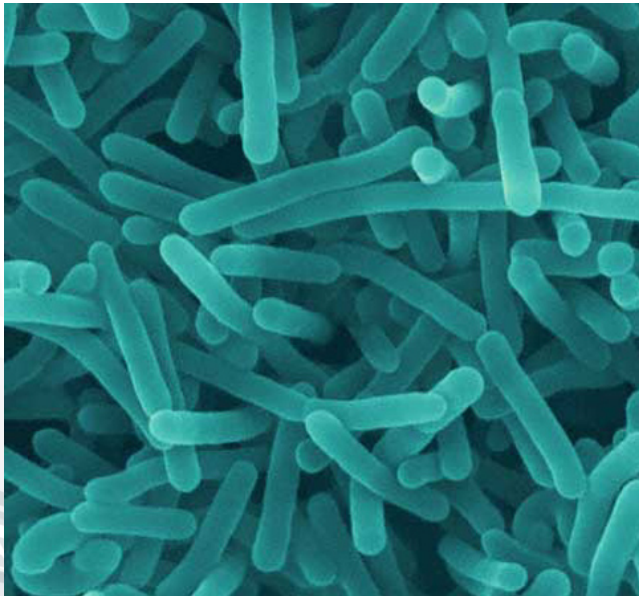
Risultati: pulsotipi e trasferimento della contaminazione

Le analisi biomolecolari hanno permesso di confermare l'assenza del trasferimento diretto delle contaminazioni da una fase all'altra della filiera, in quanto:

- Uno stesso pulsotipo non è mai stato trovato in tutte le tre fasi di lavorazione
- 53 dei 56 pulsotipi (94,6%) sono risultati esclusivi di una sola fase
- I ceppi delle tre cosce fresche «sospette» di trasferimento di contaminazione (provenivano da carcasse contaminate) appartenevano a pulsotipi diversi rispetto a quelli delle carcasse di origine



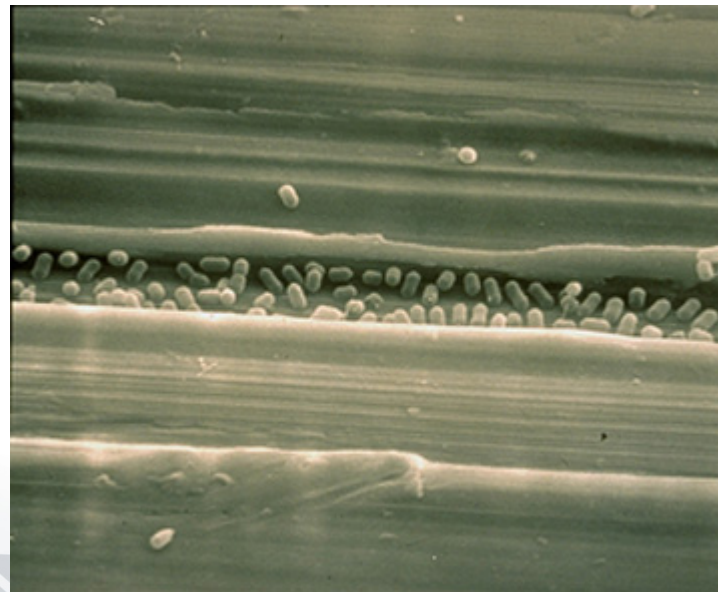
- L'unico pulsotipo isolato nelle feci non è mai stato trovato in alcuna delle fasi successive
- Solo in tre casi uno stesso pulsotipo è stato trovato in due fasi, ma non è mai stato possibile dimostrare una corrispondenza diretta carcassa/pulsotipo-coscia/pulsotipo o carcassa/pulsotipo-prosciutto/pulsotipo



Risultati: ricorrenza dei ceppi

La conferma della **persistenza ambientale** delle contaminazioni, alcuni pulsotipi sono stati ritrovati negli stessi stabilimenti anche dopo molti mesi. In particolare:

- Il 30,4% dei pulsotipi isolati nei mattatoi è stato ricorrente
- Il 50% dei pulsotipi isolati al sezionamento è stato ricorrente
- Un pulsotipo è stato ritrovato in uno stesso impianto di sezionamento dopo 15 mesi dal primo isolamento




Listeria monocytogenes formanti un biofilm
su una superficie di acciaio inossidabile
(Wong 2012)



- L'origine delle contaminazioni va ricercata essenzialmente nella persistenza di *Listeria monocytogenes* ambienti di lavorazione, stagionatura e confezionamento
- Il ruolo della produzione primaria sembra secondario (feci tutte negative)
- E' probabile che sporadicamente *Listeria monocytogenes* possa essere trasferita da una fase all'altra (rari pulsotipi comuni tra fasi diverse)
- La stagionatura riesce a ridurre drasticamente i livelli di contaminazione ma non ad eliminare del tutto *Listeria monocytogenes*
- Il prosciuttificio è il punto critico dove applicare misure preventive efficaci





Grazie per l'attenzione!