

# **UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA**

## **DOTTORATO DI RICERCA**

Disciplina Nazionale ed Europea sulla produzione e il  
controllo e degli alimenti

**Coordinatore: Prof. Franco Brindani**

**Ciclo XXV**

Monitoraggio ambientale di *Listeria*  
nell'industria alimentare: confronto di  
metodiche tradizionali e metodi rapidi

**e Tutor:  
Chiar.mo Prof. Franco Brindani**

**Dottorando: Romolo Botrugno**

## **INDICE**

<i>Premessa</i>	<i>Pag. 3</i>
<b>PARTE GENERALE</b>	<i>Pag. 5</i>
<i>Listeria - aspetti eziologici</i>	<i>Pag. 5</i>
<i>Contaminazione degli alimenti</i>	<i>Pag. 8</i>
<i>Patogenesi dell'infezione</i>	<i>Pag. 10</i>
<i>Regolamenti Comunitari e Sicurezza Alimentare</i>	<i>Pag. 13</i>
<i>Regolamenti attuativi del pacchetto igiene</i>	<i>Pag. 19</i>
<i>Il Regolamento CE n. 2073/2005</i>	<i>Pag. 20</i>
<i>Autocontrollo e HACCP</i>	<i>Pag. 23</i>
<b>PARTE SPERIMENTALE</b>	<i>Pag. 26</i>
<i>Metodo tradizionale</i>	<i>Pag. 28</i>
<i>Metodo alternativo</i>	<i>Pag. 34</i>
<i>Risultati e conclusioni</i>	<i>Pag. 41</i>
<i>Bibliografia</i>	<i>Pag. 45</i>

## **Premessa**

A partire dagli anni '90 il settore alimentare è stato coinvolto in diverse crisi e ciò ha portato il tema della sicurezza alimentare al centro dell'attenzione del Legislatore e dell'opinione pubblica. In particolare le grandi crisi alimentari di quegli anni (l'epidemia di Encefalopatia Spongiforme Bovina, le contaminazioni da diossine e bifenili policlorurati) hanno dimostrato la debolezza dell'organizzazione della Comunità Europea nell'ambito della sicurezza alimentare, portando drammaticamente alla luce i seguenti punti critici:

- ❖ Inefficacia legislativa (eccessivamente frammentata, puntava al controllo del prodotto finito e forniva dettagli inutili ai fini della sicurezza alimentare);
- ❖ Disorganizzazione e disomogeneità dei controlli ufficiali, con differenze organizzative tra Paesi Membri;
- ❖ Importanza strategica dell'alimentazione degli animali (le grandi crisi hanno avuto origine da problemi a essa connessi);
- ❖ Difficoltà nella previsione e gestione delle crisi, sfiducia del consumatore (necessità di un sistema efficace di allerta e ritiro dei prodotti);

Come dimostrato dalle successive problematiche emerse (*Sudan Red*, micotossine, *endocrine disruptors*, influenza aviaria, *Isopropyl-ThioXanthone*), la sicurezza alimentare è un'emergenza permanente, dal momento che i fattori di rischio e le occasioni di contaminazione sono molteplici. Tutte le materie prime, sia di origine vegetale che animale, possono infatti veicolare microrganismi patogeni, tossine vegetali o fungine, residui di prodotti fitosanitari, farmaci, additivi, contaminanti ambientali come i metalli pesanti, radionuclidi e sostanze chimiche persistenti.

Le innovazioni introdotte prima dal Regolamento CE 178/2002 e poi dal cosiddetto "pacchetto igiene" nel 2004 che ne costituisce la naturale attuazione

tengono conto di questi punti e attraverso un processo di sensibilizzazione e responsabilizzazione coinvolgono tutti gli attori della filiera agro-alimentare, che assumono un ruolo attivo a partire dai produttori primari per arrivare fino ai consumatori.

I principi informativi della nuova legislazione comportano infatti un radicale mutamento dell'approccio al problema della sicurezza alimentare da parte dei cosiddetti *stakeholders* (in primis i produttori, ma anche i consumatori) che dovrebbe tradursi in una maggior consapevolezza e in una presa di coscienza delle responsabilità individuali oltre che aziendali.

La nuova politica europea in campo alimentare è stata sicuramente indotta dalle importanti crisi ed emergenze sanitarie reali o presunte verificatesi in breve tempo, e ha fatto propri i principi fondamentali espressi dall'Organizzazione Mondiale della Sanità e dall'OIE (*Office International des Epizooties*) che asseriscono che la legislazione alimentare, intesa a ridurre, eliminare o evitare un rischio per la salute, deve basarsi sull'analisi del rischio, intendendo con questa il metodo scientifico che si articola nelle tre fasi della valutazione, gestione e comunicazione del rischio.

E' obiettivo, pertanto, di questa ricerca la valutazione di metodi alternativi rapidi nella valutazione del rischio associato alla presenza a livello ambientale di *L. monocytogenes*, lungo tutto il processo produttivo, al fine di conoscere la distribuzione e offrire quindi uno strumento su cui eseguire un'analisi del rischio basata su basi oggettive e documentate.

## **PARTE GENERALE**

### ***Listeria* - aspetti eziologici**

Il genere *Listeria* comprende microrganismi di forma bacillare, Gram positivi, asporigeni, non capsulati, di dimensione 0,4-0,5 x 0,5-2  $\mu\text{m}$ , mobili grazie a pochi (1-5) flagelli peritrichi. Sono catalasi positivi, ossidasi negativi, anaerobi facoltativi, nettamente psicrofili (intervallo di T° tra 0 e 45°C) e aloresistenti (15% NaCl). Questi batteri possono essere disposti a V o a palizzata; per tale ragione sono assimilati ai corinebatteri, dai quali però oggi sono distinti.

Si distinguono 6 specie di *Listeria*: *monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*, *L. innocua*, *L. welshimeri* e *L. grayi*.

Il genere *Listeria* presenta antigeni flagellari e somatici che hanno permesso di identificare 16 sierovarianti; tranne la sierovariante 5 (*L. ivanovii*), le altre non sono specie specifiche. Le specie di *Listeria* di interesse medico-veterinario sono *Listeria monocytogenes* e *Listeria ivanovii* (Robinson *et al.*, 2000).

*Listeria monocytogenes* è un patogeno intracellulare, i cui ceppi vengono divisi in due principali linee genetiche (lineage), a loro volta comprendenti diversi sierotipi:

- 1- lineage I: comprende i sierotipi 1/2b, 3b, 3c e 4b;
- 2- lineage II: comprende i sierotipi 1/2a, 1/2c e 3a.

Esiste poi un terzo gruppo, tassonomicamente distinto, detto lineage III, che include i sierotipi 4a e 4c (Gray *et al.*, 2004). Gli isolati dei casi di listeriosi umana appartengono soprattutto ai sierotipi 1/2b e 4b, raggruppati, come appena indicato, nel lineage I (Wiedmann, 2003; Wiedmann *et al.*, 2001). Questi sierotipi sono stati riscontrati sia nell'uomo sia negli alimenti, quindi potrebbero

essere correlati direttamente all'infezione e sono da ritenersi i più pericolosi per l'uomo. Infatti è stato dimostrato da studi condotti su casi di listeriosi che gli isolati appartenevano raramente ad un diverso sierotipo (Gray *et al.*, 2004).

*Listeria* spp. è ampiamente distribuita nell'ambiente, e può essere isolata dal suolo, dai vegetali anche in decomposizione e dagli insilati. Può contaminare facilmente ortaggi, verdure, e foraggi, che rappresentano l'anello di congiunzione tra animali malati e portatori sani. Inoltre, *Listeria* è un patogeno enterico presente quale batterio opportunisto in molti animali (mammiferi, uccelli, artropodi e varie specie di pesci e crostacei) e nell'uomo. Alcune specie patogene sono escrete con il latte e perciò possono contaminare gli alimenti da esso derivati (come formaggi molli e prodotti a base di latte crudo); altri cibi coinvolti nella diffusione della listeriosi sono ad esempio i vegetali, con particolare riferimento a quelli di IV° gamma, le carni bianche e quelle fredde, hamburger e hot dog, salumi, burro e cibi crudi in generale.

Le listeriosi sono patologie che riguardano non solo l'uomo ma anche gli animali che vengono infettati da ceppi di *L. monocytogenes* appartenenti al lineage III in modo molto più significativo rispetto a quelli del lineage I, tipico nell'uomo (Gray *et al.*, 2004).

Poichè la *Listeria* è un microrganismo che risiede negli alimenti ed è patogeno per l'uomo, la sua individuazione assume una certa importanza nell'ambito della salute pubblica. L'infezione di *L. monocytogenes* nell'uomo non si presenta molto frequentemente ma, quando presente, può indurre fenomeni clinici anche gravi, ed è caratterizzata da un tasso di mortalità del 30% circa.

Rispetto ad altri patogeni alimentari, *L. monocytogenes* ha la caratteristica di essere molto resistente a condizioni ambientali sfavorevoli, ad esempio valori di T° e pH molto bassi o concentrazioni saline elevate. Infatti, la temperatura

ottimale di crescita del microrganismo è compresa tra i 30° e i 37°C, ma è comunque in grado di sopravvivere in un ampio range di T° (2-45°C).

*L. monocytogenes*, oltre ad essere particolarmente resistente a condizioni ambientali avverse, possiede la capacità di costruire biofilm, che si legano saldamente alla superficie di molti oggetti e strumenti, come rulli, nastri trasportatori, piani di lavoro, utensili, macchinari, ecc. Strutturandosi in questi biofilm, *L. monocytogenes* cresce più protetta e aumenta la sua resistenza agli agenti disinfettanti e antimicrobici utilizzati per la pulizia delle attrezzature (Robbins et al., 2005). I biofilm quindi diventano un fattore molto importante da valutare nell'industria della carne perché la microflora resistente è in grado di contaminare le superfici e i prodotti posti a contatto con essa (Gandhi e Chikindas, 2006).

Le caratteristiche sopra elencate mostrano come *L.monocytogenes* sia un batterio difficile da eliminare perché dispone di mezzi d'adattamento per affrontare le più diverse situazioni. E' quindi molto importante prevenire qualsiasi contaminazione ad ogni livello della catena alimentare, evitando che il microrganismo si annidi nell'ambiente di preparazione e raggiunga, in fasi successive, il consumatore.

## ***Contaminazione degli alimenti***

Gli alimenti in cui è possibile riscontrare la presenza di *L. monocytogenes* sono i più svariati: alimenti sia di origine animale sia vegetale rappresentano perfetti serbatoi per il microrganismo. La contaminazione riguarda tutti i tipi di carne, in particolare quella suina e di pollame cruda, latte e latticini come formaggi molli, verdure varie, uova, pesce e frutti di mare (Ramaswamy *et al.*, 2007).

Il Regolamento (CE) n. 2073/2005 della Commissione del 15/11/2005, relativo ai criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari, che si occupa di tutelare la salute pubblica, riconosce che i rischi microbiologici dei prodotti alimentari costituiscono una delle principali fonti di malattia causata da alimenti. Secondo questo regolamento gli alimenti non devono contenere microrganismi, né loro tossine o metaboliti, in quantità tali da rappresentare un rischio per la salute umana.

Dalla tabella 1, che riporta i limiti definiti da tale normativa per *L. monocytogenes*, risulta come per differenti categorie di alimenti siano previsti limiti differenti, ma non specifica se per i soggetti più a rischio i valori debbano essere diversi.



<b>Categoria alimentare</b>	<b>Limiti</b>	<b>Metodo d'analisi di riferimento</b>	<b>Fase in cui si applica il criterio</b>
1.1. Alimenti pronti per lattanti e alimenti pronti a fini medici speciali	Assente in 25g	EN/ISO 11290-1	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
1.2. Alimenti pronti che costituiscono terreno favorevole alla crescita di <i>Listeria monocytogenes</i> diversi da quelli destinati ai lattanti e a fini medici speciali	100 CFU/g  Assente in 25g	EN/ISO 11290-2  EN/ISO 11290-1	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità  Prodotti prima che non siano sotto il controllo dell'operatore del settore alimentare che li produce
1.3. Alimenti pronti che non costituiscono terreno favorevole alla crescita di <i>Listeria monocytogenes</i> , diversi da quelli destinati ai lattanti e a fini medici speciali	100 CFU/g	EN/ISO 11290-2	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità

**Tabella 1: Limiti relativi a *L. monocytogenes* definiti dal regolamento (CE) n. 2073/2005.**

## ***Patogenesi dell'infezione***

Si distinguono generalmente due forme di infezione da parte di *L. monocytogenes*:

- 1) diarroica, più tipica delle tossinfezioni alimentari, che si manifesta poche ore dopo l'ingestione dell'alimento contaminato;
- 2) invasiva o sistemica, la quale attraverso i tessuti intestinali e il flusso sanguigno si diffonde sviluppando forme più acute; in genere l'incubazione varia dai 30 ai 90 giorni.

Le listeriosi si possono manifestare con sepsi, meningite ed encefalite nei casi più gravi, con un tasso di mortalità del 20-30%; questo avviene solitamente in persone immunocompromesse, ovvero soggetti il cui sistema immunitario è poco efficiente. Se invece si fa riferimento alle persone sane, le listeriosi si manifestano con gastroenteriti, precedute da sintomi simil-influenzali (Liu *et al.*, 2006).

I casi di listeriosi non sono molto frequenti ma possono essere dannosi per la salute e, in alcuni casi anche letali.

L'incidenza della malattia dipende da vari fattori, tra cui la virulenza del patogeno, il dosaggio, lo stato di salute del soggetto, il suo stato immunitario e le caratteristiche della matrice che altera lo stato microbiologico dell'ospite.

I soggetti più a rischio di contrarre gravi infezioni di *L. monocytogenes* sono gli anziani, i soggetti immunocompromessi, gli affetti da AIDS e le gestanti, che rischiano, contraendo listeriosi, di abortire o di partorire feti gravemente malati o senza vita (Ramaswamy *et al.*, 2007).

Clinicamente la listeriosi viene chiaramente definita quando la *L. monocytogenes* è isolata dal sangue, dal liquido cerebrospinale o altri liquidi sterili del paziente. Infatti la patogenicità di questo microrganismo è data soprattutto dalla sua capacità di moltiplicarsi all'interno dei fagociti dell'ospite. Generalmente l'organo bersaglio è il fegato, ma è possibile riscontrare il batterio anche nei reni e nel cervello. Infatti, le infezioni umane più comuni (60%) sono caratterizzate dal coinvolgimento del SNC, i cui sintomi sono spesso rappresentati da emicranie, confusione, perdita equilibrio, convulsioni; altre forme invece sono rappresentate da infezioni fecali e sepsi perinatale, diarrea e encefaliti (Ramaswamy *et al.*, 2007). La terapia si basa sulla somministrazione di antibiotici, in particolare penicillina e gentamicina, essenziale per prevenire infezioni più gravi come meningite e setticemia (Liu *et al.*, 2006). Analogamente ad altri patogeni di natura batterica *L. monocytogenes* può manifestare fenomeni di resistenza a questi farmaci, come dimostrato da studi precedenti (Prazak e *et al.* 2002).

La causa principale di listeriosi umana è rappresentata dal consumo di alimenti contaminati (carne cruda o poco cotta, pesce, frutti da mare, latticini, ecc.) (Ramaswamy *et al.*, 2007). In Italia, così come negli USA, la fonte di maggiore contaminazione è rappresentata dai cibi cosiddetti *ready-to-eat* (RTE), pronti per essere consumati, che non vengono ulteriormente lavati. Variando le abitudini alimentari è possibile ridurre notevolmente il rischio d'infezione.

Una maggiore attenzione al problema, sia da parte del mondo scientifico che del consumatore, potrebbe aiutare nel prevenire i casi di listeriosi. La popolazione dovrebbe essere più informata e si potrebbero promuovere semplici ma efficaci gesti da svolgere quotidianamente, come lavare bene gli alimenti prima di consumarli, lavare gli utensili da cucina e i piani di lavoro, cuocere in modo opportuno carne e pesce. Tutti questi accorgimenti dovrebbero contribuire ad evitare il pericolo della contaminazione da *Listeria* in quanto sono azioni che

vengono effettuate per contrastare la capacità del microrganismo di sopravvivere in condizioni ambientali estreme (caldo, freddo, essiccamento, ecc.).

Dal punto di vista istituzionale esistono in Europa reti di sorveglianza, per quanto riguarda *L. monocytogenes*, con obbligo di denuncia delle eventuali infezioni, anche se i casi effettivamente dichiarati probabilmente non raggiungono il 50% di tutti quelli presenti sul territorio. Queste reti sono volte ad individuare focolai d'infezione e a determinarne la causa e permettono di agire sia ritirando i prodotti dal mercato sia adottando le necessarie misure nei confronti degli impianti di produzione. Inoltre, rappresentano la fonte di informazione per la popolazione a rischio.

Considerata l'elevata ubiquitarità di questo microrganismo si ritiene che un utile contributo possa essere dato dalla rapida identificazione dello stesso e dall'individuazione delle nicchie di conservazione di questo patogeno negli ambienti di trasformazione e lungo tutta la catena produttiva, sviluppando tecniche in grado di monitorare e "tracciare" in modo reale la sua diffusione sino al prodotto finito.

E' obiettivo pertanto di questa ricerca la valutazione di metodi alternativi rapidi e della possibilità di applicare uno strumento di tracciabilità molecolare (Riboprinter) nella valutazione del rischio associato alla presenza a livello ambientale di *L. monocytogenes* lungo tutto il processo produttivo al fine di conoscere la distribuzione e offrire quindi uno strumento su cui eseguire un'analisi del rischio basata su basi oggettive e documentate.

## ***Regolamenti Comunitari e Sicurezza Alimentare***

Nel corso del 2004 l'Unione Europea ha emanato un gruppo di Regolamenti, che facendo seguito al Regolamento CE n.178/2002, vera Legge Quadro della materia, rinnovano completamente la normativa preesistente (comunitaria e dei singoli Stati) riguardante la sicurezza alimentare, identificando e separando la responsabilità dei soggetti coinvolti, a partire dalla produzione primaria alla distribuzione e infine alla somministrazione.

Il processo di cambiamento inizia nel gennaio 2000, quando la Commissione Europea emana "Il Libro Bianco sulla sicurezza alimentare " nel quale si delinea una nuova strategia: la salubrità degli alimenti si può assicurare solo ricorrendo a sistemi integrati di controlli di filiera, dalla produzione delle materie prime al consumo degli alimenti. Viene stabilita la necessità di creare un sistema, applicabile in modo omogeneo in tutta Europa, che poggi su solide basi scientifiche e su un moderno contesto legislativo e che individui gli obiettivi, le azioni necessarie per il loro raggiungimento e chi deve agire ai diversi livelli. Si introduce inoltre il concetto che la legislazione mangimistica, intesa in senso lato come alimentazione animale, rientra in quella alimentare (Libro Bianco, capitolo 5: "la sicurezza dei prodotti di origine animale inizia con la sicurezza degli alimenti destinati agli animali").

Sulla scorta del Libro Bianco, il primo atto normativo che ha ridisegnato l'intero quadro giuridico comunitario è il Regolamento del Parlamento Europeo e del Consiglio n. 178/2002/CE, che ha definito i principi ed i requisiti generali della legislazione alimentare, istituito l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA) e sancito una serie di requisiti (primo fra tutti quello della rintracciabilità di filiera obbligatoria) per garantire la sicurezza alimentare dei consumatori. Obiettivo prioritario è garantire un elevato livello di protezione della salute dei

cittadini e degli interessi dei consumatori, senza peraltro dimenticare il mercato interno, che ha comunque bisogno della libera circolazione di prodotti alimentari sicuri e sani per raggiungere un buon funzionamento.

Il corpus normativo che ha avuto inizio col Regolamento CE 178/2002 costituisce una vera e propria rivoluzione culturale nell'ambito alimentare, definendo nuove regole sia per gli operatori del settore sia per quanto riguarda le azioni di controllo e verifica svolte dalle autorità competenti, e coinvolgendo anche il settore dell'alimentazione animale, con l'obiettivo di aumentare il grado di salubrità dei mangimi (alimenti per animali) e, quindi, dei prodotti di origine animale. I Regolamenti successivi al 178/2002, entrati in vigore dal 1° gennaio 2006 e costituenti il cosiddetto "pacchetto igiene" (così chiamato perché si tratta di una serie di norme orizzontali organiche tra loro e strettamente correlate), derivante dai principi già enunciati nel "Libro Bianco".

Il "pacchetto igiene" è la logica prosecuzione del percorso legislativo già delineato nel Regolamento CE 178/2002, con le norme sull'igiene degli alimenti riviste e unificate. I punti nevralgici della nuova politica comunitaria, che punta al raggiungimento di elevati standard di sicurezza alimentare, sono i seguenti:

- ❖ l'applicazione del nuovo quadro giuridico all'intera filiera alimentare e l'esecuzione di appropriati controlli ufficiali ("dalla fattoria alla tavola");
- ❖ una strategia di intervento basata su criteri scientifici e univoci (valutazione e analisi del rischi; *Hazard Analysis Critical Control Point* o HACCP), applicati adeguatamente sia da parte dell'operatore alimentare che degli organi legislativi e di controllo;
- ❖ l'attribuzione della responsabilità della sicurezza alimentare a ogni OSA per i prodotti che importa, trasforma, elabora, commercializza o somministra;

- ❖ la rintracciabilità dei prodotti come elemento essenziale per garantire la sicurezza alimentare, rendendo possibile l'attuazione di rapide ed efficaci misure di intervento in qualsiasi punto della catena alimentare;
- ❖ la comunicazione ai consumatori che devono essere adeguatamente informati sull'attività degli organismi istituzionalmente preposti all'assicurazione della salubrità degli alimenti.

Con l'entrata in vigore del "pacchetto igiene" in tutti i Paesi dell'Unione Europea si assiste a un'accelerazione e a un superamento del processo cominciato con il D.Lgs. 155/97 e poi proseguito con il Regolamento CE 178/2002.

Il "pacchetto igiene" è composto dai seguenti Regolamenti (Figura 1):

**Regolamento n. 852/2004** ("Igiene 1") sull'igiene dei prodotti alimentari

**Regolamento n. 853/2004** ("Igiene 2") che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale

**Regolamento n. 854/2004** ("Igiene 3") che stabilisce norme specifiche per l'organizzazione di controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano

**Regolamento n. 882/2004** ("feed and food") relativo ai controlli ufficiali intesi a verificare la conformità alla normativa in materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali

**Regolamento n. 183/2005** che stabilisce requisiti per l'igiene dei mangimi

Il nuovo corpus normativo si prefigge due obiettivi:

- ❖ Obiettivo prioritario: tutela del consumatore (immissione sul mercato di alimenti sicuri, attraverso norme comportamentali, obblighi strutturali, di manipolazione e conservazione degli alimenti, nonché di etichettatura e di rintracciabilità)
- ❖ Obiettivo secondario: libera circolazione degli alimenti tra gli Stati Membri

La tutela della salute delle popolazioni, primo obiettivo della nuova legislazione, viene basata sui principi dell'analisi del rischio e sul principio di precauzione. Il secondo obiettivo, la libera circolazione del mercato entro l'Unione Europea, viene assicurato mediante la standardizzazione dei requisiti di sicurezza tra gli stati Membri.

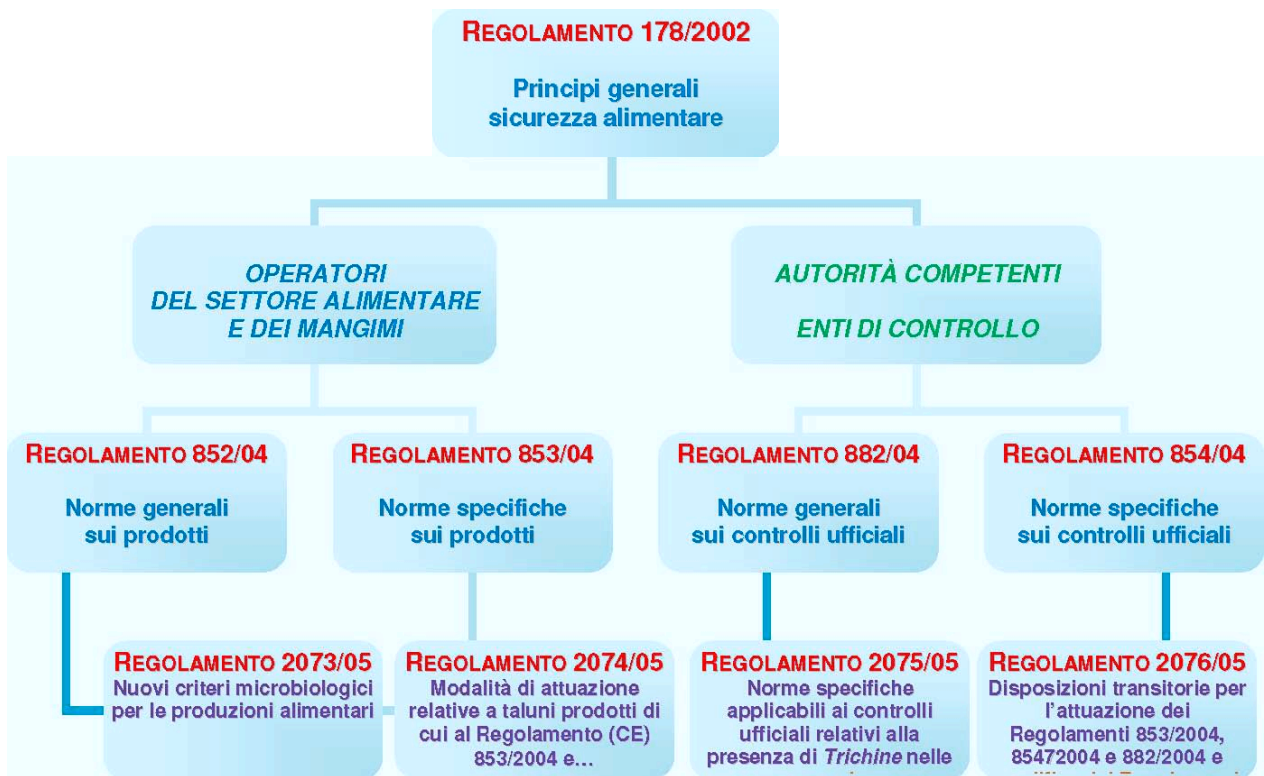


Figura 1: I regolamenti che compongono il “Pacchetto Igiene”.

I principi informativi del “pacchetto igiene” sono riassumibili in questi tre punti:

- 1) Attuazione di una politica igienica “dai campi alla tavola”, che copra tutti gli alimenti in tutti i settori, comprendendo i mangimi;
- 2) Responsabilità primaria del produttore, che userà programmi di autocontrollo secondo il sistema HACCP e tecniche preventive di controllo dei pericoli mediante applicazione delle cosiddette buone prassi di igiene.



- 3) Responsabilità del Paese Membro che deve garantire il controllo di tutti gli OSA (i servizi del controllo pubblico rappresentano i garanti della puntuale applicazione della normativa comunitaria e degli eventuali accordi stipulati con Paesi Terzi).

Il “pacchetto igiene” ha introdotto elementi decisamente innovativi nel quadro giuridico della legislazione alimentare europea:

- ❖ la responsabilità della sicurezza alimentare grava principalmente sulle aziende produttrici, non sugli enti pubblici preposti ai controlli ufficiali: il legislatore attribuisce chiaramente la responsabilità legale primaria per la sicurezza alimentare a tutti gli OSA e dei mangimi coinvolti ognuno relativamente alla parte di propria competenza.
- ❖ la legislazione alimentare si applica alla filiera dei prodotti di origine animale e vegetale e degli alimenti destinati agli animali, compresa la produzione primaria, intesa come “tutte le fasi della produzione, dell’allevamento o della coltivazione dei prodotti primari, compresi il raccolto (fieno), la mungitura e la produzione zootecnica precedente la macellazione”;
- ❖ la legislazione alimentare non si applica alla produzione primaria per uso domestico privato, alla preparazione, alla conservazione e alla manipolazione domestica di alimenti destinati al consumo domestico privato, alle forniture di piccoli quantitativi di prodotti primari dal produttore al consumatore;
- ❖ il controllo ufficiale igienico-sanitario degli alimenti, fino a ieri concentrato principalmente sul prodotto finito, ora è distribuito lungo tutta la filiera e le garanzie date dal produttore sono parte determinante del sistema sicurezza; esso verifica il raggiungimento degli obiettivi, non garantisce la qualità dei prodotti ed è basato su attività di *audit* (ascolto) e sull’analisi del rischio;
- ❖ l’estensione di procedure di analisi del rischio al settore della produzione primaria, non basate sui principi dell’HACCP bensì sull’applicazione di corrette prassi igieniche;

- ❖ deve esistere un sistema di registrazione (anagrafe) o riconoscimento, laddove previsto, di tutte le imprese della filiera da parte dell'autorità sanitaria, che sostituisce quello dell'autorizzazione sanitaria

Il “pacchetto igiene” introduce inoltre degli obblighi:

- ❖ protezione da contaminazioni chimiche, fisiche, biologiche, da parassiti, animali ed insetti;
- ❖ misure di pulizia e disinfezione dei locali, contenitori, animali al macello e in produzione;
- ❖ buona salute e formazione del personale addetto alla manipolazione;
- ❖ controllo delle zoonosi o malattie trasmissibili all'uomo anche con i prodotti di origine animale;
- ❖ applicazione dell'autocontrollo basato sui principi dell'HACCP a tutti gli operatori con l'esclusione di quelli che operano a livello di produzione primaria e attività correlate;
- ❖ tenuta di registrazioni relative a: misure adottate per il controllo dei pericoli; natura, quantità e origine degli alimenti somministrati agli animali (mangimi, fieno); fonte e quantità di ogni alimento per animali in entrata e destinazione e quantità in uscita,; uso di prodotti fitosanitari, medicinali veterinari, biocidi; uso di sementi transgeniche (OGM); insorgenza di malattie infettive e parassitarie; risultati di campionamenti, analisi e controlli sugli animali e prodotti primari.

## ***Regolamenti attuativi del “Pacchetto IGIENE”***

Il “pacchetto igiene” è completato, per la parte attuativa, dai seguenti Regolamenti contenenti norme specifiche:

- ❖ **Regolamento CE n. 2073/2005** (30): criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari
- ❖ **Regolamento CE n. 2074/2005** (31): modalità di attuazione relative a taluni prodotti di cui al Regolamento (CE) 853/2004 e all'organizzazione dei controlli ufficiali a norma dei Regolamenti 854/2004 e 882/2004, deroga al Regolamento 852/2004 e modifica dei Regolamenti 853/2004 e 854/2004
- ❖ **Regolamento CE n. 2075/2005** (32): norme specifiche applicabili ai controlli ufficiali relativi alla presenza di *Trichine* nelle carni
- ❖ **Regolamento CE n. 2076/2005** (33): disposizioni transitorie per l'attuazione dei Regolamenti 853/2004, 854/2004 e 882/2004 e modifica dei Regolamenti 853/2004 e 854/2004

## ***Il Regolamento CE 2073/2005***

Il Regolamento CE 2073/2005 (15 novembre 2005) è complementare al Regolamento 852/2004, è in vigore dal 1° gennaio 2006 e sostituisce i criteri contenuti in norme antecedenti. Come affermato dalle Linee guida dell'Agenzia di Sicurezza Alimentare britannica (FSA), esso “non introduce nuovi obblighi né nuovi requisiti per le aziende e non dovrebbe essere causa di costi aggiuntivi per le imprese”.

I principi fondamentali sono i seguenti:

- ❖ I prodotti alimentari non devono contenere microorganismi, né loro tossine o metaboliti, in quantità tali da costituire un rischio inaccettabile per la salute umana;
- ❖ I criteri microbiologici indicano come orientarsi nello stabilire l'accettabilità di un prodotto alimentare e dei relativi processi di lavorazione, manipolazione e distribuzione. L'applicazione dei criteri microbiologici deve costituire parte integrante dell'attuazione delle procedure HACCP e di altre misure di controllo dell'igiene.

Un criterio microbiologico è definito dallo stesso Regolamento CE 2073/2005 all'Art. 2 come “un criterio che definisce l'accettabilità di un prodotto, di una partita di prodotti alimentari o di un processo, in base all'assenza, alla presenza o al numero di microrganismi e/o in base alla quantità delle relative tossine/metaboliti, per unità di massa, volume, area o partita”.

Un'analisi preliminare della Commissione Europea ha evidenziato che i criteri microbiologici in uso nei diversi Paesi Membri dell'Unione presentavano un'enorme difformità e/o criticità: mancanza di fondamenti scientifici, elenco dei microrganismi considerati, numero e tipo di derrate oggetto di campionatura, mancanza di correlazione con livelli di protezione della salute, mancanza di

aggiornamento, carenza di metodi standardizzati e confrontabili, difformità giuridiche nelle azioni correttive per mancata conformità.

Il Regolamento attuativo CE 2073/2005 stabilisce i criteri microbiologici “per taluni microrganismi” (Art. 1): esso contiene una prima lista di criteri stabiliti su base scientifica (analisi del rischio microbiologico) seguendo gli orientamenti del “*Codex alimentarius*”. I criteri microbiologici fissati nel Regolamento devono poter essere riveduti e modificati, se necessario, per tenere conto dell'evoluzione nei settori della sicurezza alimentare e della microbiologia degli alimenti, ossia dei progressi scientifici, tecnologici e metodologici, dei cambiamenti nei livelli di prevalenza e contaminazione e nella percentuale di consumatori sensibili, nonché degli eventuali risultati che emergono dalla valutazione dei rischi.

Lo stabilire dei criteri di sicurezza alimentare per i microrganismi patogeni ha indubbiamente il vantaggio che vengono forniti degli standard di accettabilità per gli alimenti che sono armonizzati (sia per le autorità che per l'industria all'interno dell'UE, oltre che per i prodotti importati dai Paesi Terzi). Il rischio di richiami e la perdita economica così come la perdita di fiducia del consumatore costituiscono una motivazione forte per rispettare i criteri. Di conseguenza i criteri di sicurezza alimentare hanno un indubbio effetto sulla sicurezza alimentare e sulla sanità pubblica dove c'è un rischio reale o percepito.

Occorre sempre ricordare che la sicurezza alimentare è un risultato di parecchi fattori: pertanto i criteri microbiologici non dovrebbero essere considerati svincolati da altri aspetti della legislazione UE sugli alimenti, in particolare i principi dell'HACCP e i controlli ufficiali per verificare la conformità degli operatori.

I parametri da monitorare all'interno dei criteri di sicurezza alimentare (Regolamento CE 2073/2005) sono i seguenti:

- ❖ *Listeria monocytogenes*
- ❖ *Salmonella spp.*
- ❖ Enterotossine stafilococciche
- ❖ *Enterobacter sakazakii*
- ❖ *Escherichia coli*
- ❖ Istamina

Il Regolamento descrive dettagliatamente nell'Allegato I come ciascuno di questi parametri va rapportato alle diverse matrici alimentari ove è presumibilmente presente (e quindi da ricercare) e i requisiti del piano di campionamento da attivare, facendo riferimento alle norme pertinenti dell'ISO (*International Organisation for Standardization*) e agli orientamenti del "*Codex alimentarius*".

Secondo il Regolamento, i produttori devono garantire il rispetto dei criteri di igiene dei processi di produzione e dei criteri di sicurezza alimentari applicabili per l'intera durata del periodo di conservabilità dei prodotti (Art. 3).

A norma dell'articolo 4 del Regolamento CE n. 852/2004, gli OSA sono tenuti a rispettare i criteri microbiologici; a questo scopo, attraverso il prelievo di campioni, essi devono procedere a controlli per accertare il rispetto dei valori fissati per i criteri, eseguire analisi e prendere provvedimenti correttivi.

## ***Autocontrollo e HACCP***

Autocontrollo e sistema HACCP non sono termini sinonimi. Il concetto di autocontrollo ha una valenza più ampia che discende dalla responsabilizzazione dell'Operatore del settore alimentare (OSA) in materia di igiene e sicurezza degli alimenti e corrisponde all'obbligo di tenuta sotto controllo delle proprie produzioni.

L'autocontrollo è obbligatorio per tutti gli operatori che a qualunque livello siano coinvolti nella filiera della produzione alimentare.

L'HACCP (Hazard analysis and critical control points) è invece un sistema che consente di applicare l'autocontrollo in maniera razionale e organizzata. È obbligatorio solo per gli Operatori dei settori post-primari.

Il sistema HACCP è quindi uno strumento teso ad aiutare gli OSA a conseguire un livello più elevato di sicurezza alimentare.

I principi su cui si basa l'elaborazione di un piano HACCP sono 7:

1. Identificare ogni pericolo da prevenire, eliminare o ridurre;
2. Identificare i punti critici di controllo (CCP - Critical Control Points) nelle fasi in cui è possibile prevenire, eliminare o ridurre un rischio:
3. Stabilire, per questi punti critici di controllo, i limiti critici che differenziano l'accettabilità dalla inaccettabilità:
4. Stabilire e applicare procedure di sorveglianza efficaci nei punti critici di controllo;
5. Stabilire azioni correttive se un punto critico non risulta sotto controllo (superamento dei limiti critici stabiliti);
6. Stabilire le procedure da applicare regolarmente per verificare l'effettivo funzionamento delle misure adottate;

7. Predisporre documenti e registrazioni adeguati alla natura e alle dimensioni dell'impresa alimentare.

La prima codifica normativa in Europa risale al 1993 con la Direttiva 43/93/CEE (recepita in Italia con il D. Lgs 26 maggio 1997 n. 155, ora abrogato). Questa normativa è stata sostituita dal Regolamento CE 178/2002 e dal Regolamento CE 852/2004.

Data l'ampia gamma di imprese alimentari prese in considerazione dal Regolamento CE 852/2004 e la grande varietà di prodotti alimentari e di procedure di produzione applicate agli alimenti, sono state redatte dalla Commissione Europea delle Linee guida generali sullo sviluppo e sull'applicazione delle procedure basate sui principi del sistema HACCP come documento diretto ad aiutare tutti coloro che intervengono nella catena della produzione alimentare.

Tali linee-guida si ispirano principalmente ai principi enunciati nel "Codex Alimentarius" e forniscono indicazioni su un'applicazione semplificata delle prescrizioni in materia di HACCP in particolare nelle piccole imprese alimentari.

Considerando un'impresa alimentare, il responsabile del piano di autocontrollo deve predisporre e attuare il piano con l'attiva partecipazione della dirigenza e del personale avvalendosi, se del caso, di un supporto tecnico-scientifico esterno.

Il piano deve essere applicabile e applicato, finalizzato a prevenire le cause di insorgenza di non conformità prima che si verifichino e deve prevedere le opportune azioni correttive per minimizzare i rischi quando, nonostante l'applicazione delle misure preventive, si verifichi una non-conformità.



L'obiettivo principale è istituire un sistema documentato con cui l'impresa sia in grado di dimostrare di aver operato in modo da minimizzare il rischio. Tuttavia, in alcuni casi come nelle piccole imprese, l'applicazione del sistema HACCP può risultare complessa.

E' necessario comunque che la corretta predisposizione e applicazione di procedure, se pure semplificate, consenta nell'ambito del processo produttivo, il controllo e la gestione dei pericoli.

Per facilitare l'adozione di piani di autocontrollo adeguati vengono resi disponibili Manuali di Corretta Prassi Igienica (Good Hygiene Practices o GHP) , che costituiscono documenti orientativi voluti dalla normativa comunitaria ed utilizzabili come guida all'applicazione dei sistemi di autocontrollo.

Il Regolamento (CE) n. 853/2004 promuove l'elaborazione dei manuali di corretta prassi operativa in materia di igiene e di applicazione dei principi del sistema HACCP e ne incoraggia la divulgazione e l'uso. Nonostante l'adozione sia ad oggi una scelta volontaria.

Allo stesso tempo il Regolamento (CE) n. 853/2004 prevede che gli Stati Membri valutino i manuali di corretta prassi operativa al fine di verificarne la conformità alle disposizioni ivi previste. In proposito il Ministero della Salute valuta i manuali di corretta prassi operativa con il supporto tecnico dell'Istituto Superiore di Sanità coinvolgendo nel contempo anche le Regioni, le Associazioni di categoria e dei consumatori interessate alla materia oggetto del manuale.

## ***PARTE SPERIMENTALE***

L'indagine ha riguardato 33 stabilimenti di media produzione afferenti alle Lombardia ed Emilia Romagna, operanti nel settore di trasformazione delle carni e del latte.

E' stata considerata una selezione di 906 campionamenti ambientali direttamente rivolti alla ricerca di *L. monocytogenes*, nel periodo compreso tra Gennaio 2009 e Dicembre 2012.

I campioni sono stati raccolti grazie ai piani autocontrollo nelle regioni Lombardia ed Emilia Romagna, per valutare e monitorare la salubrità degli ambienti di produzione. I campioni sono stati effettuati tramite sia tamponi ambientali sia spugnette su tutte le superfici di lavoro (superfici d'appoggio, nastri di scorrimento, banconi di lavoro, strumenti di lavorazione, ecc.), ponendo particolare attenzione ai locali destinati alla trasformazione e trattamento dei prodotti e alle attrezzature utilizzate per il trasporto degli stessi, che potrebbero essere responsabili di una diffusa contaminazione. Le spugnette utilizzate (3,5 x 3,5 cm) coprono una superficie di 1 m<sup>2</sup> in modo tale da garantire un significativo contatto tra tampone e punto di campionamento.

Al fine di identificare e caratterizzare *L. monocytogenes* sono stati effettuati, dopo opportuno pretrattamento dei campioni, due tipi di analisi: un'applicazione microbiologica classica e una tecnica molecolare di PCR Real-Time.

Lo scopo della presente tesi è stato una comparazione fra la metodica tradizionale di ricerca della *Listeria*, come indicato dalla ISO 11290-1:1996/Amd 1 2004 (qualitativa) e ISO 11290-2: 1998/Amd 1 2004 (quantitativa), e un

metodo molecolare alternativo, l'utilizzo di Real-Time PCR, per evidenziarne vantaggi e svantaggi.

Le analisi sono state eseguite presso il Reparto di Tecnologia Acidi Nucleici Applicata agli Alimenti e il Reparto di Microbiologia degli Alimenti di Brescia dell'IZS della Lombardia e dell'Emilia Romagna.

## ***Metodo microbiologico tradizionale***

### ***Materiali e metodi***

#### Terreni colturali

- Half Fraser Broth: Terreno selettivo per primo arricchimento con ridotta concentrazione di agenti selettivi;
- Fraser Broth: Terreno selettivo per secondo arricchimento con normale concentrazione di agenti selettivi;
- ALOA: Agar *Listeria* in accordo con la formulazione Ottaviani and Agosti. Primo terreno selettivo solido;
- Oxford agar: Secondo terreno selettivo solido;
- TSYEA;
- TSYEB distribuito in provette di opportuna capacità;
- Terreno Agar sangue di Montone distribuito in piastre;
- Terreno per la mobilità (utilizzo facoltativo);
- PBS (Phosphate-buffered saline);
- Soluzione fisiologica;
- Kits diagnostici: Test biochimici miniaturizzati necessari per l'identificazione di *Listeria* completi dei relativi reagenti e schemi interpretativi.

#### Sistemi di saggio

- CAMP test effettuato con i seguenti ceppi:
  - *S.aureus* beta emolitico (NCTC 1803 o ATCC 25923)
  - *Rodhococcus equi* (NCTC 1621 o ATCC 6939)
  - *L.monocytogenes* (ATCC19115)
  - *L.innocua* (ATCC 33090)
  - *L.ivanovii* (ATCC 700402)

### ***Fasi della prova***

1. Primo arricchimento in Half Fraser broth, terreno liquido selettivo con una ridotta concentrazione di agenti selettivi, ed incubazione a 30°C per 24 ore.
2. Secondo arricchimento in Fraser broth, terreno liquido selettivo con una normale concentrazione di agenti selettivi ed incubazione a 37°C per 24 ore.
3. Piastratura ed identificazione delle colonie: dalle colture del secondo arricchimento inoculare una piastra di ALOA ed una piastra di Oxford agar; incubare a 37°C per 24 ore, se necessario prolungare l'incubazione per complessive 48 ore per evidenziare la presenza di colonie caratteristiche riferibili a *Listeria monocytogenes*.
4. Identificazione biochimica delle colonie tipiche isolate.

#### Caso tamponi ambientali

Trasferire il tampone in una provetta con 10 ml di Brodo Half Fraser.

Agitare accuratamente evitando la formazione di schiuma ed incubare a 30°C  $\pm 1$  per 24  $\pm 2$  ore (si può sviluppare una colorazione nerastra durante l'incubazione).

#### Caso spugnette ambientali

Trasferire la spugna in 100 ml di Brodo Half Fraser.

Agitare accuratamente evitando la formazione di schiuma ed incubare a 30°C  $\pm 1$  per 24  $\pm 2$  ore (si può sviluppare una colorazione nerastra durante l'incubazione).

Per procedere con il secondo arricchimento, trasferire 0,1 ml della coltura ottenuta dal primo arricchimento (indipendentemente dalla presenza o meno della colorazione nera) in una provetta da 10 ml di Fraser broth (secondo brodo di arricchimento). Incubare a 37°C per 48  $\pm 2$  ore.

### **Conferma di *Listeria spp.***

Dal brodo di secondo arricchimento seminare un'ansata di coltura su una piastra di terreno selettivo agar ALOA e su Oxford agar in modo da ottenere colonie isolate. Incubare le piastre capovolte a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1$  ed eventualmente altre 18-24 ore (nel caso in cui la crescita dopo 24 ore di incubazione delle colonie sia scarsa o nulla dopo 24 ore) osservare le piastre rilevando le colonie sospette di *Listeria spp.*:

- ALOA agar: colonie verdi-blu circondate da alone opaco sono riferibili a *L.monocytogenes*; alcuni ceppi di *L.monocytogenes*, se stressati, mostrano un alone molto ristretto (anche assente); alcuni ceppi sono caratterizzati da una attività fosfolipasica molto lenta, che consente di rilevarli solo dopo 4 giorni di incubazione, e potrebbero essere patogeni.
- Oxford agar: colonie piccole (1 mm) grigie, circondate da un alone nero; dopo 48 h le colonie diventano nere con possibili riflessi verdi di circa 2mm di diametro con alone nero con cratere centrale.

Selezionare da ciascuna piastra di terreno selettivo 5 colonie sospette di *Listeria spp.* (Se una piastra contiene meno di 5 colonie, prelevarle tutte).

Trapiantarle su piastre di TSYEA precedentemente asciugate, in modo da ottenere colonie isolate. Incubare le piastre a  $37 \pm 1^{\circ}\text{C}$  per 18-24 h fino ad una crescita soddisfacente.

Le colonie si presentano di 1-2 mm di diametro, convesse opache e incolore a bordi netti. Dalle colonie ottenute in purezza da TSYEA eseguire le conferme descritte di seguito.

### ***Prova della catalasi***

Prelevare dalle colonie isolate una colonia e stemperarla in una goccia di soluzione di perossido di idrogeno posta su un vetrino. L'immediato sviluppo di bolle di gas indica che la reazione è positiva.

### ***Colorazione di Gram***

Eeguire la colorazione di Gram: per *Listeria* spp. si intendono microrganismi gram-positivi di forma bastoncellare piccoli e sottili.

### ***Test della mobilità***

Prelevare una colonia ottenuta su TSYEA e trapiantarla in una provetta di TSYEB. Incubare a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  per 8 - 24 ore sino a quando il brodo è torbido. Deposare una goccia della brodo coltura su un vetrino porta oggetto, coprirlo con un vetrino copri oggetto ed osservarla al microscopio: *Listeria* spp. è caratterizzata da rapidi movimenti a capriola.

Un test per la mobilità alternativo a quello ora descritto prevede il prelievo di una colonia da TSYEA con un'ago per batteriologia e l'infissione in un terreno per mobilità; incubare a  $25 \pm 1^\circ\text{C}$  ed osservare la formazione di un alone di crescita ad ombrello.

## **Conferma di *Listeria monocytogenes***

### ***Test dell'emolisi***

Se le caratteristiche morfologiche, fisiologiche e la catalasi sono indicative di *Listeria* spp., seminare una piastra di agar sangue per verificare la reazione di emolisi. Prelevare una colonia isolata da una piastra di TSYEA ed inoculare con un ago da batteriologia una piastra di Agar sangue parallelamente ad un controllo positivo (*Listeria monocytogenes*) e ad uno negativo (*L. innocua*). Incubare 37°C per 24 ± 2 ore ed interpretare i risultati secondo il seguente schema:

*Listeria monocytogenes*: banda di β-emolisi chiara e stretta

*Listeria innocua*: assenza di emolisi

*Listeria seeligeri*: debole area di emolisi

*Listeria ivanovii*: normalmente mostra un'area di emolisi molto larga e chiara

### ***Fermentazione degli zuccheri***

Eseguire il test per la fermentazione degli zuccheri inoculando i brodi ramnosio e xilosio con una coltura da TSYEB; incubare 37 ± 1°C per al massimo 5 giorni; la reazione positiva compare tra le 24-48 h ed è indicata dall'acidificazione del terreno, il cui indicatore vira al giallo.

### ***CAMP test***

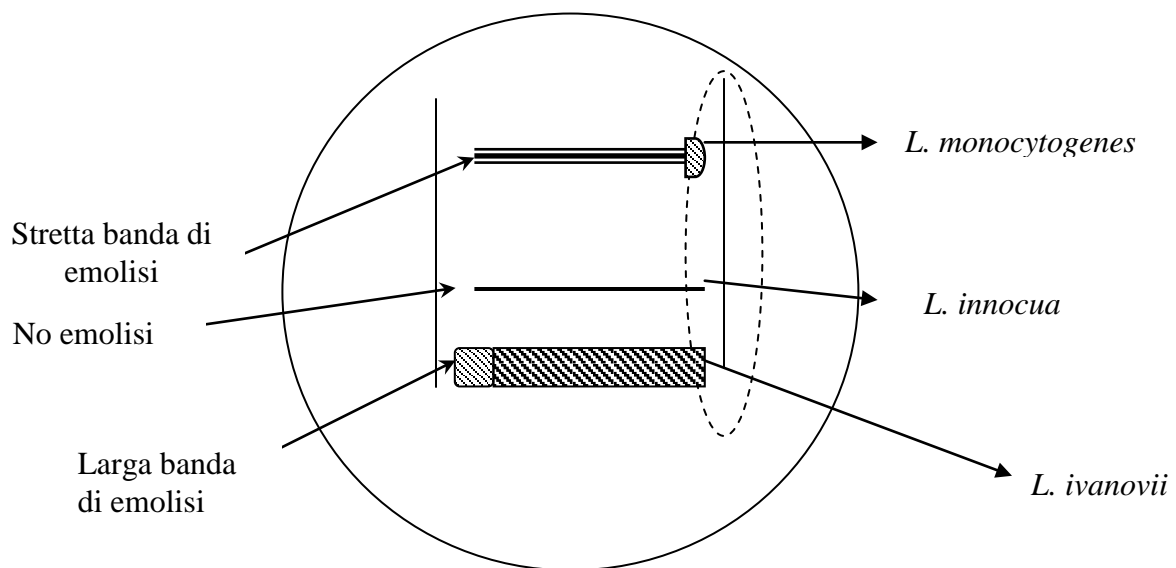
Per eseguire il CAMP test inoculare una piastra di agar sangue con *Staphylococcus aureus* e *Rodococcus equi*, utilizzando un ago da batteriologia; effettuare l'inoculo in modo da ottenere due linee parallele (figura 2); seminare i campioni da testare (partendo dalle colonie ottenute da TSYEA) perpendicolarmente alle due linee di *S. aureus* e *R. equi* e senza toccarle; seminare sulla piastra un controllo per *Listeria monocytogenes*, *L. innocua*, *L.*



*ivanovii*. Incubare la piastra a 37°C per 18 - 24 ore. La reazione tra i campioni testati ed i ceppi di *S. aureus* e *R. equi* è considerata positiva quando in prossimità dell'intersezione tra le linee di semina compare una banda di  $\beta$ -emolisi:

- ❖ *Rodococcus equi*: l'emolisi è rappresentata da una banda larga (da 5 a 10 mm) a forma di freccia; la reazione è considerata negativa se l'emolisi ha uno spessore inferiore al mm;
- ❖ *Staphylococcus aureus*: la reazione positiva è caratterizzata dalla comparsa di un'area di  $\beta$ -emolisi di soli 2 mm e che compare all'interno dell'area di emolisi parziale determinata dal ceppo di *S. aureus*; la presenza di una larga banda di emolisi non è caratteristica di *Listeria monocytogenes*.

**Figura 2. Interpretazione dell'emolisi su piastra e del CAMP test**



## ***Metodo microbiologico alternativo***

### ***Materiali e metodi***

#### Terreno colturale

Half Fraser Broth: Terreno selettivo per primo arricchimento con ridotta concentrazione di agenti selettivi.

#### Reagenti per estrazione

GeneElute™ Bacterial Genomic DNA kit (SIGMA)

Etanolo assoluto (ACS grade)

Lisozima (50 unità/mg)

#### Reagenti per PCR Real time

Taqman® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystem)

EXO IPC MIX (Applied Biosystem)

EXO IPC DNA (Applied Biosystem)

BLOCK-EXP-IPC (Applied Biosystem)

Acqua ultrapura

SEQUENZA OLIGONUCLEOTIDICA PRIMER *Listeria monocytogenes*

LM Forward

LM Reverse

(le sequenze dei primers sono depositate presso Applied Biosystems, fornitrice degli stessi)

SEQUENZA OLIGONUCLEOTIDICA PROBE *Listeria monocytogenes*

LM probe

(La sequenza della sonda è depositata presso Applied Biosystems, fornitrice della stessa)

#### Controlli:

1 controllo negativo di estrazione costituito da tutti i reagenti di estrazione

2 controlli negativi di amplificazione costituiti da acqua ultrapura

1 controllo positivo di estrazione costituito da 100 µl di una sospensione batterica del ceppo di controllo di *Listeria monocytogenes*

- 1 controllo positivo di amplificazione costituito da DNA ottenuto da estrazioni precedenti
- 2 controlli negativi di arricchimento costituito dal terreno selettivo per primo arricchimento (inizio e fine arricchimento).

### ***Fasi della prova***

#### Tamponi ambientali

Trasferire il tampone in una provetta con 10 ml di Brodo Half Fraser.

Agitare accuratamente evitando la formazione di schiuma ed incubare a 30°C ±1 per 24 ± 2 ore (si può sviluppare una colorazione nerastra durante l'incubazione).

#### Spugnette ambientali

Trasferire la spugna in 100 ml di Brodo Half Fraser.

Agitare accuratamente evitando la formazione di schiuma ed incubare a 30°C ±1 per 24± 2 ore (si può sviluppare una colorazione nerastra durante l'incubazione).

Controlli negativi di arricchimento: costituiti dal terreno selettivo per primo arricchimento, vengono posizionati rispettivamente all'inizio ed alla fine di ciascun batch di arricchimento ed incubati a 30°C ±1 per 24 ± 2 ore.

Controlli positivi di processo: costituiti da due campioni negativi per *Listeria* spp., contaminati con una sospensione di *Listeria monocytogenes* alla concentrazione di 10<sup>6</sup> UFC/ml, posto successivamente in terreno selettivo per primo arricchimento ed incubati a 30°C ±1 per 24 ± 2 ore.

### ***Estrazione del DNA - Preparazione campioni***

Prelevare 1 ml di campione dal sacchetto dell'arricchimento o dalla provetta dei tamponi e trasferire in microprovetta da 1,5 o 2 ml.

Centrifugare i campioni a 2000 rpm e 24°C per 2 minuti .

Prelevare il surnatante e trasferirlo in altre microprovette.

Centrifugare a 12000 rpm e 24 °C per 5 minuti.

Eliminare il surnatante e aggiungere nella microprovetta 1 ml di PBS lavaggi.

Vortexare fino al completo distacco del pellet dal fondo della microprovetta.

Centrifugare a 16000 giri e 24°C per 2 minuti.

Preparare una microprovetta vuota come controllo negativo e scongelare il controllo positivo.

Eliminare il surnatante dai campioni e procedere all'aggiunta dei reagenti in tutti i campioni e controlli come da istruzioni del kit di estrazione (KIT SIGMA BACTERIAL)

### ***Estrazione del DNA***

Controlli d'estrazione: il controllo negativo e quello positivo d'estrazione vengono processati a partire dall'aggiunta di 200 µl di soluzione d'uso di lisozima.

Estrarre il pellet usando il kit GenElute™ Bacterial Genomic DNA Mini Kit SIGMA:

#### **Preparazione Batteri gram positivi**

- Aggiungere 200 µl di soluzione d'uso di lisozima ed incubare per 45 minuti a 37 C° in termomixer (in agitazione a 350 rpm)

- Terminata l'incubazione eseguire uno spin dei campioni

- Aggiungere 20 µl di soluzione d'uso di proteinasi k, seguita da 200 µl di Lysis solution C. Vortexare ed incubare a 55 C° per 10 minuti in termomixer (in agitazione a 350 rpm)

#### **Isolamento del DNA da batteri**

- Preparare le colonnine di raccolta del DNA: aggiungere 500 µl di Column Preparation Solution direttamente al centro della colonna. Centrifugare a 12.000 g per 1 minuto. Svotare il tubo di raccolta

- Terminata l'incubazione nel termomixer, eseguire uno spin dei campioni ed aggiungere 200 µl di etanolo assoluto. Miscelare e trasferire la sospensione nelle colonne precedentemente preparate
- Centrifugare a 6.600 g per 1 minuto. Eliminare il tubo di raccolta e riporre le colonnine in un nuovo tubo
- Aggiungere 500 µl di Wash Solution 1
- Centrifugare a 6.600 g per 1 minuto. Eliminare il tubo di raccolta e riporre le colonnine in un nuovo tubo
- Aggiungere 500 µl di Wash Solution pronta all'uso (diluita in etanolo assoluto secondo le indicazioni del kit)
- Centrifugare a 12.000 g per 3 minuti. Eliminare il tubo di raccolta e riporre le colonnine in nuovi tubi di raccolta
- Aggiungere 200 µl di Elute Solution
- Incubare a temperatura ambiente per 1 minuto
- Centrifugare a 6.600 g per 1 minuto. Eliminare la colonnina

PCR Real-Time (Polymerase Chain Reaction Real-Time) per ricerca di *Listeria monocytogenes*

La reazione di PCR Real-Time viene eseguita secondo le indicazioni contenute nella tabella 1:

REAGENTI	CONC. USO	QUANTITA' (X)
H <sub>2</sub> O milliQ		6.53
Master mix (2x)	1x	12.5
LM F (50 µM)	0.9 µM	0.45
LM R (50 µM)	0.9 µM	0.45
LM Probe (100 µM)	0.25 µM	0.0625
EXO IPC mix (10x)	1x	2.5
EXO IPC DNA (50x)	1x	0.5

**Tabella 1: Concentrazioni di utilizzo dei reagenti per la preparazione della reazione PCR-Real Time per ricerca di *L. monocytogenes*.**

I campioni, i controlli di arricchimento ed i controlli di processo se presenti, vengono eseguiti in doppia replica, mentre tutti gli altri controlli (NAC, NTC,

bianco di estrazione, controllo positivo (C+) di estrazione e C+ di PCR) vengono eseguiti in singola replica. L'aggiunta di DNA e la scelta del profilo termico vengono effettuati secondo le seguenti indicazioni:

Volume totale: 23 µl MIX per provetta

Per campioni: aggiungere 2 µl di DNA

Per NAC: aggiungere 2 µl di Exo IPC Block

Per NTC: aggiungere 2 µl di acqua

DISTRIBUIRE 25 µl DI SOSPENSIONE FINALE IN OGNI POZZETTO

Profilo termico utilizzato:

50°C x 2'

95°C x 10'

95°C x 15"

60°C x 1'

| x 40 cicli

Letture dei risultati

L'esecuzione di PCR Real-Time permette di consultare l'esito direttamente su computer (grafici di fluorescenza) o mediante report stampato. Il campione viene considerato positivo nel caso in cui la curva di fluorescenza ad esso associata interseca la retta parallela all'asse delle ascisse, che taglia tutte le curve di fluorescenza nel punto in cui sono fra loro parallele (*threshold*).

Per valutare la corretta interpretazione dei risultati da parte dello strumento il posizionamento della *threshold* può essere effettuato anche manualmente; a seguito del riposizionamento della linea va verificato che le deviazioni standard associate al Ct siano le più basse possibili per tutti i campioni all'interno della corsa in esame.

## Espressione del risultato e modalità di calcolo

L'analisi dei risultati viene eseguita valutando l'andamento delle curve di fluorescenza associate ai campioni e a tutti i controlli, prodotte dalla lettura di un detector associato alla sonda specifica per la porzione del genoma di *Listeria* ricercato. Il controllo negativo NAC non deve presentare alcun valore di Ct determinato dall'associazione della sonda con il genoma target (neppure IPC), in quanto contiene un bloccante che impedisce lo svolgimento della reazione.

- 1) Il controllo negativo di PCR (NTC), costituito da acqua, impiegato per la verifica di un eventuale contaminazione ambientale o dei reagenti, non deve presentare alcun valore di Ct determinato dall'associazione della sonda con il genoma target ; devono invece presentare curve di fluorescenza relative all'introduzione del DNA di controllo (EXO IPC DNA), rilevato mediante un "detector" differente da quello utilizzato per identificare il microrganismo in esame. La presenza del valore del Ct relativo al DNA di controllo indica che la reazione è avvenuta correttamente.
- 2) I controlli positivi, costituiti da ceppi batterici di riferimento, vengono individuati tramite la comparsa dei valori di Ct determinati dall'associazione della sonda con il genoma target. In questo caso, poiché i reagenti presenti nella mix di reazione vengono sequestrati per l'amplificazione della quantità maggiore di DNA associata al controllo positivo e viene di conseguenza ridotta l'amplificazione del DNA di controllo (Ct elevato), si possono verificare due situazioni che riguardano il controllo interno: 1) Ct negativo 2) Ct positivo (valore elevato). In entrambe le situazioni la reazione viene considerata valida.
- 3) I campioni in esame vengono considerati positivi quando vengono individuati tramite la comparsa dei valori di Ct determinati dall'associazione della sonda con il genoma target. Il DNA di controllo, in base alla quantità di DNA

amplificabile nel campione, potrebbe presentare o non presentare valore di Ct. In particolare, in una reazione Real-Time i campioni vengono eseguiti sempre in doppia replica, di conseguenza esiste la possibilità che una replica si presenti positiva ed una negativa. In questo caso per quel particolare campione viene ripetuta la reazione e se si ripresenta la situazione iniziale, oppure entrambe le repliche sono positive, il campione viene considerato positivo in PCR e viene sottoposto alla conferma microbiologica. Nel caso in cui nella ripetizione della corsa il campione risulti negativo in entrambe le repliche, esso viene considerato negativo.

- 4) Nel caso in cui non venga rilevata né la fluorescenza associata alla sonda target né quella del controllo interno, è necessario diluire il DNA del campione (diluizione 1:50) e ripetere la reazione di PCR per escludere l'eventuale presenza di inibitori della reazione di amplificazione. Se nella seconda reazione di amplificazione la fluorescenza del controllo interno risulta positiva e quella associata al campione invece è negativa, il campione viene considerato negativo.
- 5) I campioni in esame vengono considerati negativi quando non presentano alcun valore di Ct ad essi associato, determinato dall'unione della sonda al genoma target; un valore di Ct deve essere associato al DNA di controllo, in caso contrario la reazione potrebbe non essere avvenuta correttamente e va ripetuta.

In caso di esito negativo (assenza di *Listeria monocytogenes*) si conclude la prova.

In caso di esito positivo (presenza di *Listeria monocytogenes*) procedere con la conferma mediante metodo microbiologico tradizionale.



## **Risultati e conclusioni**

Tra il 2009 e il 2012, sono stati analizzati 906 campioni ambientali, rivolti alla ricerca di *L. monocytogenes*, provenienti da 37 stabilimenti di media produzione afferenti alle regioni Lombardia ed Emilia Romagna (tabella 4). I campionamenti sono stati eseguiti mediante piani di autocontrollo regionali ed è stata fatta una comparazione tra il metodo microbiologico tradizionale e il metodo molecolare relativamente all'identificazione e il monitoraggio di *Listeria monocytogenes*.

Con il metodo microbiologico tradizionale (come da ISO 11290) è stato possibile identificare 118 campioni positivi per *L. monocytogenes*, pari al 13% del totale (tabella 2).

<b>Coltura</b>	2009	2010	2011	2012	Totale	%
Negativi	373	158	229	28	788	87%
Positivi	61	31	14	12	118	13%
Totale	434	189	243	40	906	

**Tabella 2: Risultati ottenuti con metodo microbiologico tradizionale**

Con il metodo molecolare il numero di campioni positivi per *L. monocytogenes* sale a 196, pari al 22% del totale (tabella 3).

<b>PCR Real-Time</b>	2009	2010	2011	2012	Totale	%
Negativi	337	148	205	20	710	78%
Positivi	97	41	38	20	196	22%
Totale	434	189	243	40	906	

**Tabella 3: Risultati ottenuti con metodo PCR-Real Time**

<b>Id</b>	<b>Categoria</b>	<b>Provincia</b>	<b>2009</b>	<b>2010</b>	<b>2011</b>	<b>2012</b>	<b>Totale</b>
ST 1	Carne	MI	15	0	0	0	15
ST 2	Carne	BS	3	3	5	8	19
ST 3	Carne	PC	21	0	0	0	21
ST 4	Latte	VI	18	0	0	0	18
ST 5	Latte	VI	11	0	0	0	11
ST 6	Carne	SO	84	0	0	0	84
ST 7	Latte	MO	22	0	0	0	22
ST 8	Carne	MO	25	0	0	0	25
ST 9	Carne	PR	35	0	0	0	35
ST 10	Carne	BS	27	2	4	0	33
ST 11	Latte	MN	16	0	0	0	16
ST 12	Carne	MN	40	50	50	10	150
ST 13	Latte	BS	30	0	0	0	30
ST 14	Carne	BS	46	0	0	0	46
ST 15	Latte	PR	41	0	0	0	41
ST 16	Carne	PV	0	36	0	0	36
ST 17	Carne	VI	0	27	0	0	27
ST 18	Latte	PV	0	38	0	0	38
ST 19	Latte	BS	0	5	0	0	5
ST 20	Carne	BS	0	10	10	0	20
ST 21	Latte	BG	0	4	5	0	9
ST 22	Latte	BS	0	3	3	0	6
ST 23	Latte	BS	0	3	3	0	6
ST 24	Latte	BS	0	3	9	0	12
ST 25	Latte	BS	0	0	2	0	2
ST 26	Carne	RE	0	0	30	0	30
ST 27	Latte	BG	0	0	91	0	91
ST 28	Latte	BS	0	0	1	0	1
ST 29	Latte	BS	0	0	11	2	13
ST 30	Latte	BS	0	0	3	3	6
ST 31	Latte	SO	0	0	4	0	4
ST 32	Latte	BS	0	0	2	0	2
ST 33	Latte	BS	0	0	5	0	5
ST 34	Latte	BS	0	0	2	0	2
ST 35	Latte	LC	0	5	3	0	8
ST 36	Carne	CO	0	0	0	14	14
ST 37	Latte	BS	0	0	0	3	3
<b>Totale</b>			<b>434</b>	<b>189</b>	<b>243</b>	<b>40</b>	<b>906</b>

**Tabella 4: Elenco e classificazione in codice degli stabilimenti; categoria di alimento coinvolta; provincia di provenienza; distribuzione del numero di campioni nei vari stabilimenti per anno.**

La percentuale di campioni positivi con il metodo molecolare risulta maggiore per via dell'amplificazione del dna specifica per *L. monocytogenes* che lo rende molto più sensibile e accurato rispetto al metodo microbiologico.

I campioni positivi alla PCR-Real Time, che non sono stati confermati dal metodo microbiologico, possono indicare la presenza del solo dna di *L. monocytogenes* ma non del batterio vitale. Le situazioni in cui si può verificare questa evenienza possono essere molteplici, tra cui campionamenti eseguiti dopo la pulizia o dopo processi di sterilizzazione.

Questi risultati tuttavia dovrebbero essere utilizzati come soglia di allarme. In questo contesto il risultato della PCR dà un'indicazione del fatto che il patogeno è o era presente nel luogo del campionamento.

Questa informazione va ad arricchire l'analisi dei rischi e a fornire le basi per un eventuale miglioramento del piano HACCP e in generale dell'igiene degli ambienti produttivi.

Oltre alla differenza di sensibilità dei due metodi è stato possibile valutare come il metodo molecolare abbia consentito di dimezzare i tempi di analisi, portando a dare la risposta in appena due giorni, a fronte di 5 giorni richiesti dal metodo tradizionale (dal primo arricchimento all'identificazione biochimica).

La disponibilità di test diagnostici rapidi, specifici e sensibili per identificare e caratterizzare *L. monocytogenes* è essenziale per il controllo dei fenomeni di listeriosi animale e umana. La possibilità di determinare accuratamente e rapidamente la presenza di un battere dovrebbe essere una delle caratteristiche principali dei metodi utilizzati per individuare il ceppo potenzialmente patogeno presente nella materia prima, che può giungere al prodotto finito e all'uomo, di

modo da consentire risposte rapide e mirate degli enti preposti al controllo e ridurre al minimo il rischio per il consumatore.

## ***Bibliografia***

Notermans S., Food Poisonings Outbreaks, 1999, in Encyclopaedia of Food Microbiology, edited by R.K. Robinson, C.A. Batt, P.D. Patel, Academic Press, 2000, Vol. 2, 835-840.

Gray M.J., Zadoks R.N., Fortes E.D., Dogan B., Cai S., Chen Yuhuan, Scoot V.N., Gombas D.E., Boor K., Wiedmann M. 2004. *Listeria monocytogenes* isolated from foods and humans form distinct but overlapping population. Applied and Environmental Microbiology. 70: 5833-5841.

Sauders B.D., Fortes E.D., Morse D.L., Dumas N., Kiehlbauch J.A., Ynteschukken, Hibbs J.R., Wiedmann M. 2003. Molecular subtyping to detect human listeriosis clusters. Emerging Infectious disease.

Nandon C.A. Woodward D.C., Young C., Rodgers C, Wiedmann M.. 2001. Correlation between molecular subtyping and serotyping of *Listeria monocytogenes*. Journal of Clinical Microbiology. 39: 2704-2707.

Norton D.M., McCamey M.A., Gall K.L., Scarlett J.M., Boor K.J., Wiedmann M. 2001. molecular studies on the ecology of *Listeria monocytogenes* in the smoked fish processing industry. Applied and Environmental Microbiology. 67: 198-205.

Norton D.M., Scarlett J.M., Horton K., Sue D., Thimothe J., Boor K.J., Wiedmann M. 2001. Characterization and pathogenic potential of *Listeria monocytogenes* isolated from the smoked fish industry. Applied and Environmental Microbiology. 67: 646-653.

Robbins J.B., Fisher C.W., Moltz A.G., Martin S.E. 2005. Elimination of *Listeria monocytogenes* biofilms by ozone, chlorine and hydrogen peroxide. Journal Food Prot. 68: 494-498.

Gandhi Megha, Chikindas Michael L. 2006. *Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive. International Journal of Food Microbiology.

Gandhi M., Chikindas M.L., *Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive, International Journal of Food Microbiology, 2007, 113, 1, 1-15.

Ramaswamy Vindhya, Crescence V.M, Rejitha J.S., Lekshimi Mohandos U., Dharsana K.S., Prasad Suryaprasad P., Vijile H.M. 2007. *Listeria* – a review of epidemiology and pathogenesis. Journal of Microbiology, Immunology and Infection. 40: 4-13.

Liu Dongyou. 2006. Identification, subtyping and virulence determination of *Listeria monocytogenes*, an important foodborne pathogen. Journal of Medical Microbiology. 55: 645-659.

Prazak M.A., Duffy G., Sheridan J.J., Blair L.S., McDowell D.A. 2001. Antimicrobial resistance of *Listeria monocytogenes* isolated from various cabbage farms and packaging sheds in Texas. Journal Food Prot. 65: 1796-1799.

LIBRO BIANCO SULLA SICUREZZA ALIMENTARE della COMMISSIONE del 1 dicembre 2000

Regolamento (CE) N. 178/2002 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 28 gennaio 2002

Regolamento (CE) N. 852/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004

Regolamento (CE) N. 853/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004

Regolamento (CE) N. 854/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004

Regolamento (CE) N. 882/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004

Regolamento (CE) N. 183/2005 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 12 gennaio 2005

Regolamento (CE) N. 2073/2005 della Commissione del 15 novembre 2005

Regolamento (CE) N. 2074/2005 della Commissione del 5 dicembre 2005

Regolamento (CE) N. 2075/2005 della Commissione del 5 dicembre 2005

Regolamento (CE) N. 2076/2005 della Commissione del 5 dicembre 2005

Regolamento (CE) N. 1441/2007 della Commissione del 5 dicembre 2007

Regolamento (UE) N. 1086/2011 della Commissione del 27 ottobre 2011

Direttiva CEE 43/93 del Consiglio del 14 giugno 1993

Decreto legislativo N. 155 del 26 maggio 1997

International Standard - ISO 11290-1, Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 1: Detection method, First edition 15-12-1996.

International Standard - ISO 11290-2, Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* – Part 1: Enumeration method, First edition 01-07-1998 58.