

# XIII Workshop on the Developments in the Italian PhD Research on Food Science, Technology and Biotechnology

## “IL CONTROLLO MICROBIOLOGICO NELLA SICUREZZA ALIMENTARE : STATO DELL'ARTE E SVILUPPI FUTURI”



**Renzo Mioni**

Direttore Struttura Complessa SCS8

Valorizzazione delle produzioni alimentari

**Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie**

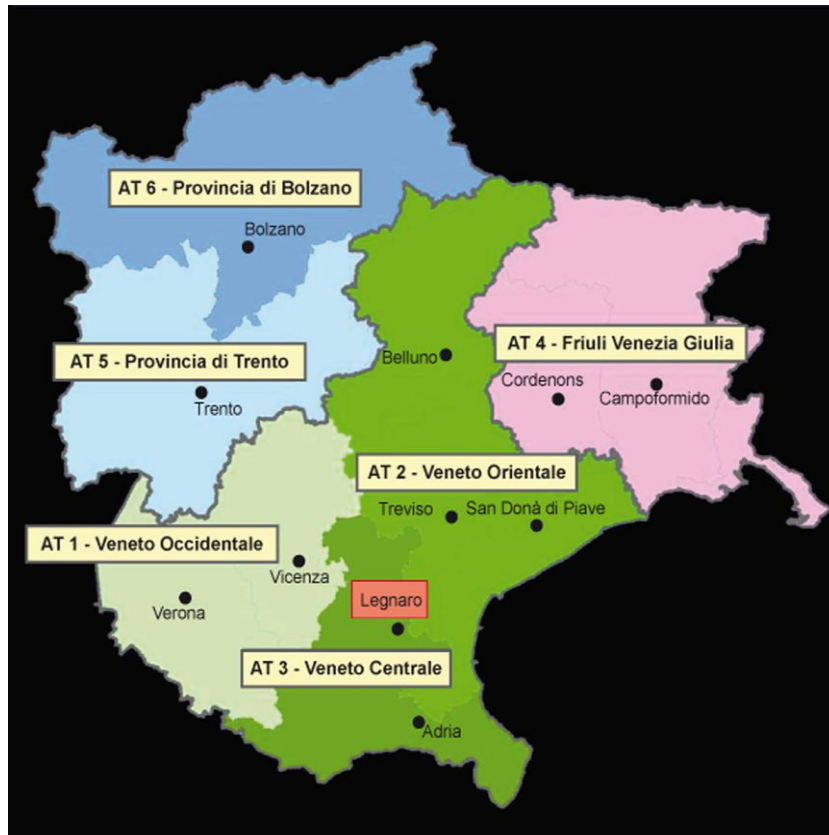
# Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie



L'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSve) è un ente sanitario di diritto pubblico che svolge attività di prevenzione, di controllo e di ricerca nell'ambito della sanità e del benessere animale, della sicurezza alimentare e della tutela ambientale.

**Sede centrale di Legnaro (PD )**

# Istituto Zooprofilattico sperimentale delle Venezie



Le 10 sedi periferiche del Triveneto

L'**IZSVe** ha la sua sede centrale a Legnaro, cui si aggiungono dieci sezioni diagnostiche periferiche (**Adria, Belluno, Bolzano, Pordenone, San Donà di Piave, Trento, Treviso, Udine, Verona, Vicenza**) dislocate in Veneto, Friuli Venezia Giulia e Trentino-Alto Adige per gestire al meglio i contatti con le realtà produttive territoriali.

- **sicurezza alimentare**
- prevenzione delle zoonosi
- benessere animale
- attività tecnico-scientifica
- attività di comunicazione e formazione



# La rete degli Istituti Zooprofilattici nazionale

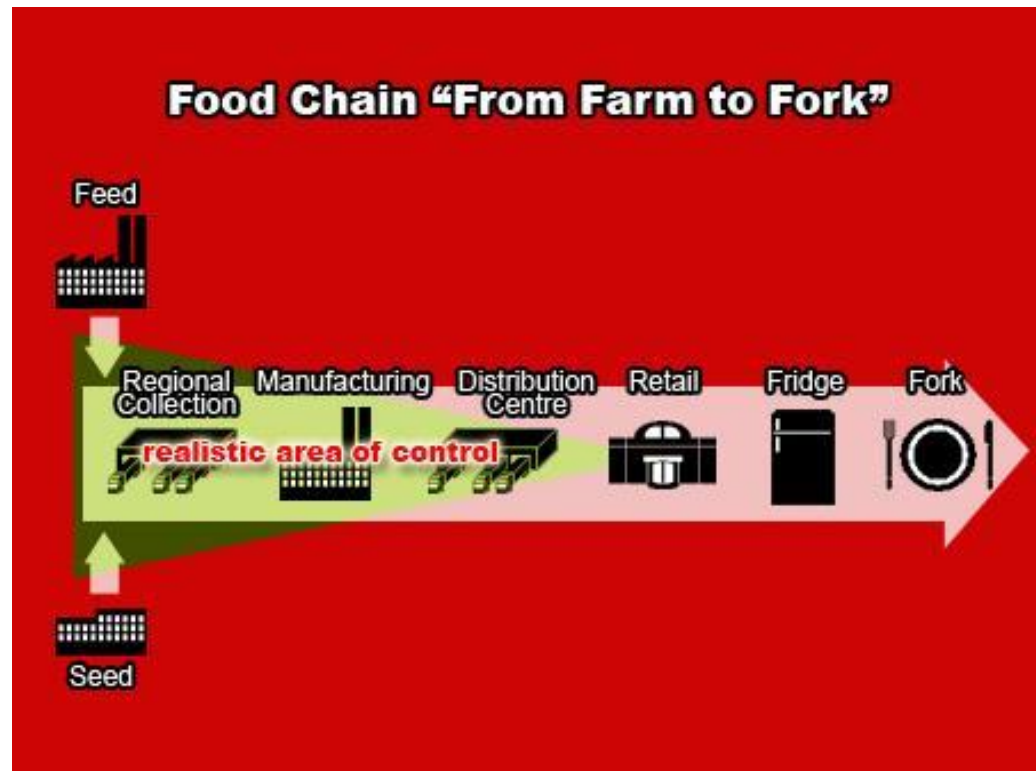


- Enti sanitari di diritto pubblico.
- 10 IIZZSS nazionali che operano nel Servizio Sanitario Nazionale (Ministero della Salute), garantendo ai Servizi veterinari prestazioni e collaborazioni tecnico-scientifiche in materia di igiene e sanità pubblica veterinaria.
- Svolgono attività di prevenzione, di controllo e di ricerca nell'ambito della sanità animale, della **sicurezza alimentare** e della tutela ambientale.

# Il Piano di Sicurezza Alimentare della Regione Veneto

Attivato nel 2002,  
con durata triennale, è  
stata la  
**prima iniziativa in Italia**  
in risposta al principio  
della CE

**“from farm to fork”**  
*(dal campo alla tavola)*



# Obiettivi del nuovo pacchetto normativo

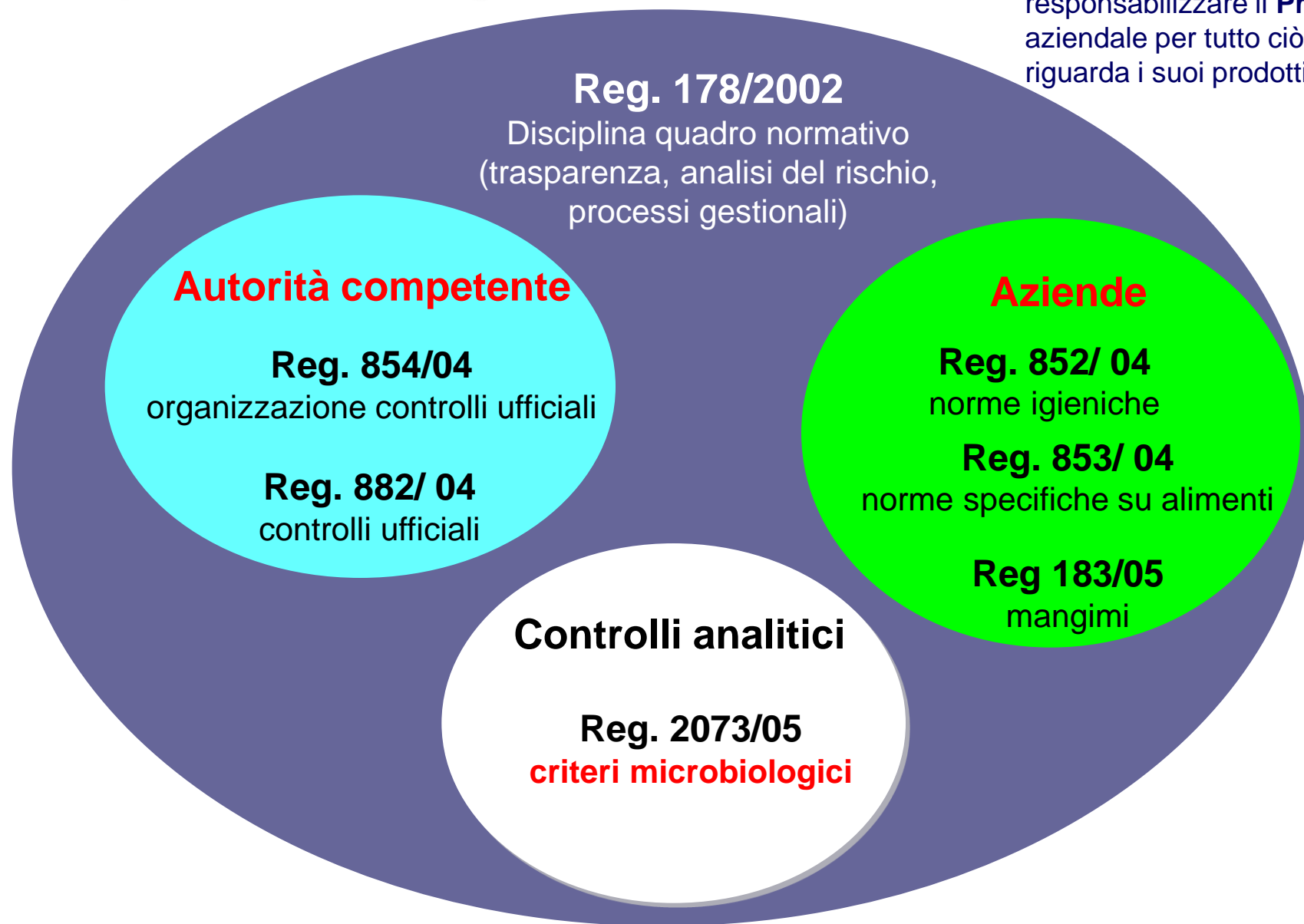
**L'obiettivo fondamentale delle nuove norme d'igiene generali e specifiche è quello di**



**garantire un elevato livello di tutela dei consumatori con riguardo alla sicurezza degli alimenti**

# “Il pacchetto igiene”

I **Regolamenti** comunitari sono sempre più volte a responsabilizzare il **Produttore** aziendale per tutto ciò che riguarda i suoi prodotti.



# La nuova era dei controlli microbiologici

Regolamento (CE) n° **2073/2005** della Commissione  
del 15 novembre 2005

sui **criteri microbiologici** applicabili ai prodotti alimentari



**La sicurezza alimentare passa attraverso  
un sistema integrato di analisi degli alimenti**





# **Reg. (CE) 2073/05** sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari

## **Importanti novità**

Entrato in vigore ufficialmente il giorno **1/01/2006**, introduce:

## **Criteri microbiologici “ armonizzati ”**

**Libera circolazione**: requisiti di sicurezza degli alimenti non presentano differenze significative da uno Stato Membro all'altro

**Dispositivo “ aperto ”**: suscettibile pertanto di aggiornamenti nei riguardi delle analisi microbiologiche :

**Reg. CE 1441/2007,**

**Reg. CE 365/2010,**

**Reg. CE 1086/2011**

**Reg. CE 209/2013**

# Reg. CE 2073/2005

## Ruolo degli O.S.A.



a) La responsabilità principale per la sicurezza alimentare incombe  
all'**Operatore del Settore Alimentare** (Reg.(CE) 852/04 art.1 par.1 lettera a)

Il Regolamento 2073/05 è **indirizzato** e **vincolante** per gli  
**O.S.A.** che lo dovranno utilizzare come riferimento per le  
**verifiche e validazione dei piani di autocontrollo** e per verificare il  
livello di sicurezza delle proprie produzioni previsto dalla legislazione  
comunitaria.

# Reg CE 2073/2005

## Ruolo delle Autorità Competenti



- **Modalità di campionamento ed analisi** - criteri per la stesura dei piani di campionamento regionali
- Azioni conseguenti al riscontro del mancato rispetto dei criteri microbiologici stabiliti dai regolamenti

# Reg.(CE) 2073/2005

## Art.5 – Norme specifiche per le analisi e il campionamento

Il Regolamento (CE) n° 2073/05 **obbliga** gli operatori alimentari a provvedere affinché gli alimenti siano conformi ai criteri di sicurezza e ai criteri igienici di processo ma.....

**O.S.A.**

**Autorità  
competente**

.....stabilisce anche che le autorità preposte al controllo ufficiale ne **verifichino** il rispetto con il **campionamento** e **l'analisi** dei prodotti alimentari nell'ambito dell'attività di vigilanza ( art. 1 )



# Scopo del controllo microbiologico degli alimenti

## OSA (autocontrollo)

- Verifica delle materie prime
- Controllo degli alimenti lungo la catena di produzione con riferimento ai Regolamenti ed ad altri microrganismi di interesse per la produzione stessa
- Controllo igiene di produzione: superfici, attrezzature, mani operatori
- Validazione dei processi produttivi

## Controllo Ufficiale

- Verifica del rispetto dei criteri microbiologici previsti dai Regolamenti
- Gestione casi di emergenza sanitaria (alterazioni, sospette tossinfezioni)
- Verifica presenza irregolarità (sospetto frode)
- Verifica igienicità della filiera di produzione
- Piani straordinari di controllo (Raccomandazioni **CEE**)

# Il campionamento degli alimenti (autocontrollo )

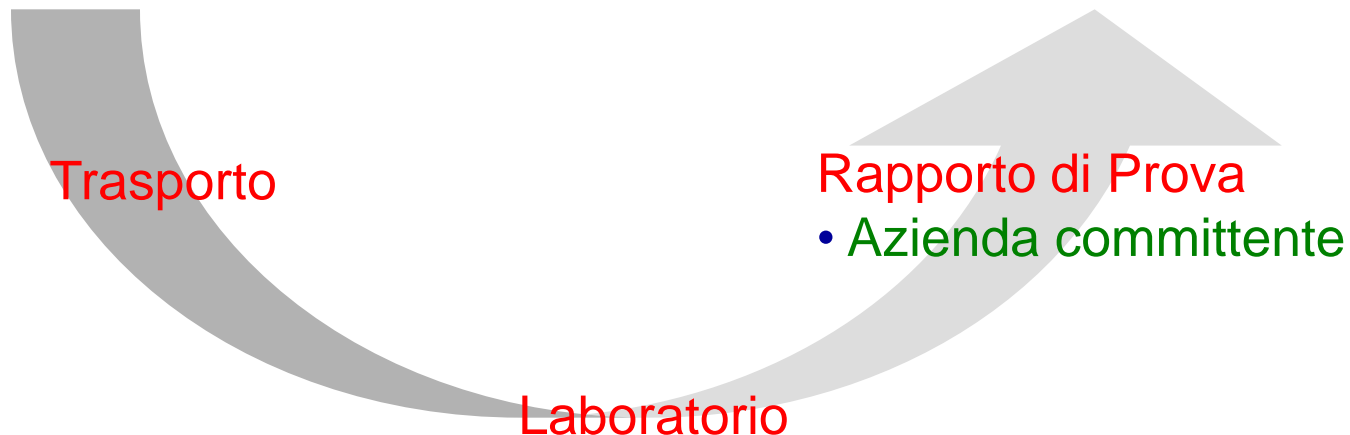
Frazione di un **lotto** di prodotto che viene prelevato e trasportato al laboratorio di prova per lo svolgimento delle analisi per verificarne la conformità alla normativa vigente per la tutela dei consumatori

## Campionamento

- Autocontrollo - piano HACCP

In caso di esito non soddisfacente:

- Ritiro o richiamo dal mercato



# Il campionamento degli alimenti ( ufficiale )

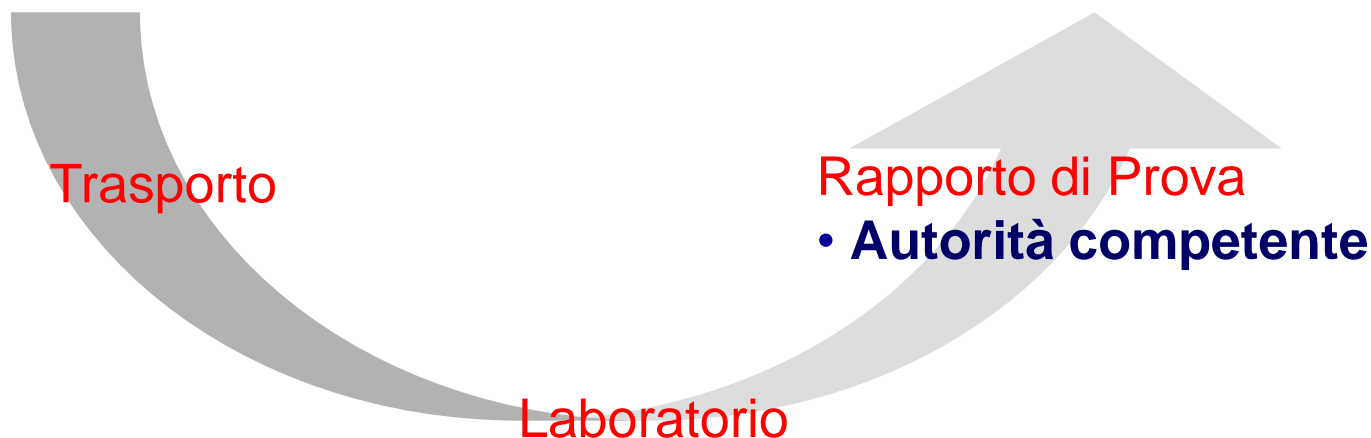
Frazione di un **lotto** di prodotto che viene prelevato e trasportato al laboratorio di prova per lo svolgimento delle analisi per verificarne la conformità alla normativa vigente per la tutela dei consumatori

## Campionamento

- **Ufficiale**

In caso di esito non soddisfacente:

- **Notifica all'autorità competente**



# Organi coinvolti nel Controllo Ufficiale

## SERVIZI VETERINARI

**SIAN** - Servizio Igiene degli Alimenti e della Nutrizione

**NAS** - nuclei antisofisticazioni e sanità dell'Arma dei Carabinieri,

**UVAC** - Uffici Veterinari per gli Adempimenti degli obblighi Comunitari (esercitano il controllo sulle merci di provenienza comunitaria)

**PIF** - Posti di Ispezione Frontaliera (effettuano controlli veterinari su animali vivi e prodotti di origine animale provenienti da Paesi terzi e destinati al mercato comunitario o al transito verso altri Paesi terzi.

**USMAF** - Ufficio di Sanità Marittima ed Aerea di Venezia (effettuano per primi la vigilanza igienico sanitaria su mezzi, merci in arrivo sul territorio italiano)



# Il Piano Regionale Integrato dei Controlli della Regione Veneto ( P.R.I.C. )



Il Piano Regionale Integrato dei controlli sulla sicurezza alimentare, il benessere e la sanità animale, la sanità dei vegetali (PRIC) **è stato redatto** conformemente a quanto disposto dagli art. 41 e 43 del Reg. (CE) 882/2004.

La Regione con tale piano descrive le attività dei **controlli ufficiali** in ambito di sicurezza alimentare, benessere e sanità animale e sanità dei vegetali, i soggetti coinvolti, i relativi flussi informativi e l'attività di verifica svolta dall'Unità di Progetto.

# **Il Piano Regionale Integrato dei Controlli della Regione Veneto ( P.R.I.C. )**



## **Piano campionamento alimenti : Allegato A**

- ▶ **Matrici da campionare**
- ▶ **Numerosità campionaria**
- ▶ **Parametri analitici da campionare**
- ▶ **Punti di campionamento**
- ▶ **Distribuzione dei campioni**
- ▶ **Verbale di campionamento**
- ▶ **Flussi informativi**
- ▶ **Verifiche di attività**

# Controllo microbiologico degli alimenti

Analisi microbiologica qualitativa e quantitativa degli alimenti per:

## Microrganismi patogeni

*Salmonella spp*

- ✓ *Listeria monocytogenes*
- ✓ *Campylobacter termofili*
- ✓ *E.coli enterotossici*
- ✓ *Clostridium perfringens*
- ✓ *Clostridium botulinum e tossina botulinica*
- ✓ *Stafilococchi coagulasi positivi ed enterotossine stafilococciche,*
- ✓ *Vibrio cholerae*
- ✓ *Vibrio parahaemolyticus*

## Microrganismi indicatori di igiene e di processo

- ✓ Carica batterica totale aerobia ed anaerobia
- ✓ *E.coli*
- ✓ Coliformi
- ✓ Enterobatteri
- ✓ Stafilococchi coagulasi +

# In sintesi...

**Controllo Ufficiale e Autocontrollo rappresentano gli strumenti attraverso i quali la normativa intende garantire l'igiene e la sicurezza degli alimenti prodotti e posti in commercio.**

**Nella pratica questa garanzia viene attuata attraverso l'analisi dello status microbiologico/batterologico dei numerosi campioni di alimenti, sia da parte dei produttori (OSA) che degli Organi di Vigilanza**

**...per ottenere alimenti sicuri**

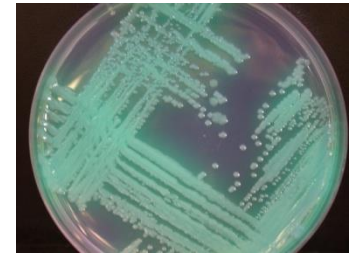


# Esperienze del Laboratorio Controllo microbiologico degli alimenti in materia di:

**Alterazione alimentari**

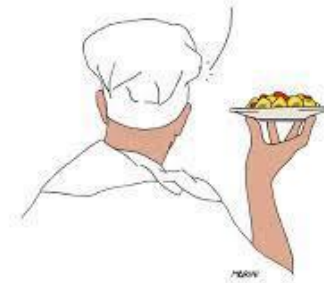


Scandalo ravioli con carne di cavallo



**Frodi alimentari**

TROTTELLINI  
AL RAGU'!



**Ricerca di patogeni  
alimentari**



**Attività innovative per la  
sicurezza alimentare**



Cucina sperimentale

Prodotti più sicuri, aziende più garantite



# Il caso delle mozzarelle blu del 2010

**CORRIERE DELLA SERA**.it

**22 giugno 2010**

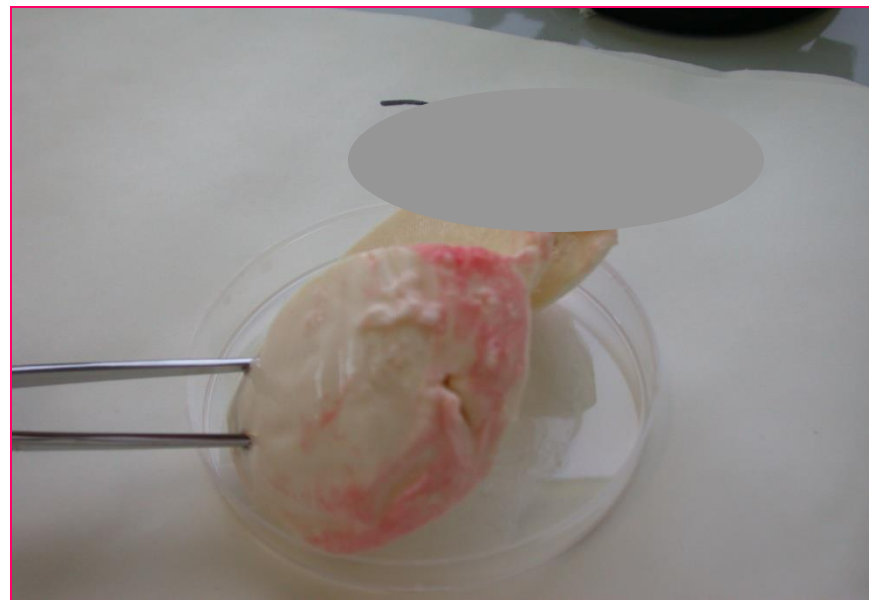
**Sequestrata una tonnellata di mozzarelle  
Sono cinque le marche nel mirino**



**17 giugno 2010**

**Sequestrate dai Nas 70mila mozzarelle tedesche a  
Torino. Diventano blu una volta aperte  
Aperto un fascicolo dal Procuratore Guariniello**

Vediamo quale è stato il ruolo dell'**IZSVe** e in particolare del Laboratorio di microbiologia alimentare nel caso mediatico delle alterazioni **cromatiche** delle mozzarelle.





# Le analisi presso IZSVe

## Lab. chimica



## Lab. microbiologia



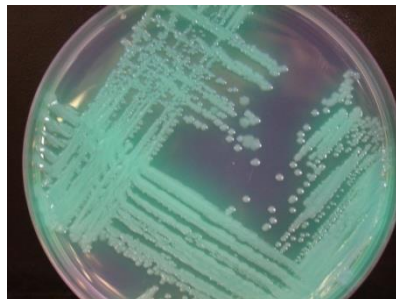
**1°IPOTESI** : contaminazione da sostanze chimiche (es. colorante di stampa), ma non si spiega la colorazione bianca al momento dell'apertura della confezione



Si fa strada la **2°IPOTESI** di qualcosa che cambia colore al contatto con l'aria: es. sostanza prodotta da un batterio aerobio cromogeno ( **ricerca bibliografica** )



***Pseudomonas spp.***



**Isolamento e caratterizzazione dei ceppi di *Pseudomonas* spp.**

***Pseudomonas Fluorescens***



# Le analisi presso IZSVe

## Lab. microbiologia



**Pericoli per la salute** : poiché gran parte delle mozzarelle consegnate dai cittadini ai vari comandi dei carabinieri dei NAS o servizi veterinari erano state parzialmente consumate, con giustificata apprensione degli interessati, abbiamo cominciato ad eseguire sui campioni aperti (reperiti ) anche le **prove di tossicità** per verificare l'eventuale pericolosità del prodotto una volta consumato.

Le prove hanno dimostrato che il consumo dei latticini **non rappresentava in nessun modo un pericolo sanitario per il consumatore**

Queste informazioni sono state prontamente diffuse attraverso gli organi di stampa con l'obiettivo di tranquillizzare i consumatori.

16- 17 giugno 2010

# Le analisi presso IZSVe

## Lab. microbiologia



**Casi di intossicazione segnalate dai consumatori :** inizialmente non ci sono state segnalazioni da parte di consumatori di particolari problemi sanitari collegati con il consumo di mozzarelle colorate ( allarmismo, apprensione, inquietudine, paura )

**Finchè appare un articolo .....**

**“Mattino di Padova”- a Padova il primo intossicato dalla mozzarella blu - sabato 26 Giugno 2010 –**

.....Labbra e gengive infiammate dopo aver mangiato una mozzarella da una confezione diventata, in frigo, sempre più azzurrina: il primo intossicato da mozzarella blu è probabilmente un uomo di 32 anni di Saccolongo, nel Padovano. **Saranno le analisi dell'Istituto zooprofilattico di Legnaro** (Padova) a confermare se c'è relazione tra i sintomi e il cibo consumato.

.....Secondo quanto si è appreso finora, non compaiono elementi di certezza fra i due eventi. L'uomo infatti non avrebbe fatto refertare il disturbo in ospedale e anche in passato aveva sofferto di problemi alle gengive.

**26/06/2010** - Fabio, 32 enne padovano prima vittima della mozzarella blu come riporta il quotidiano "Mattino di Padova", parla al tg di Rete Veneta. **Nessuna intossicazione**, racconta, ma la psicosi c'è. "La mozzarella in frigo era diventata blu in poche ore".

# Le analisi presso IZSVe

## Lab. microbiologia



La causa dell'alterazione cromogena delle mozzarelle era dovuta alla presenza di microrganismi alteranti (*Pseudomonas fluorescens*) e non alla presenza di microrganismi Patogeni.

### Colorazioni anomale

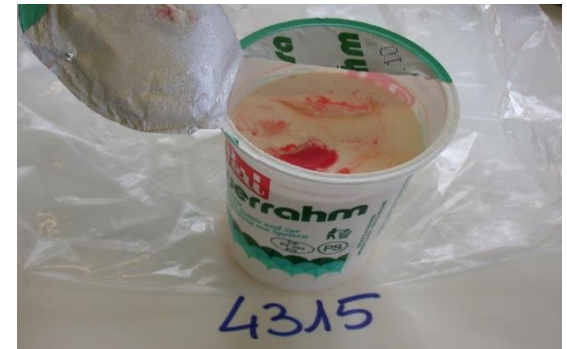
Producono pigmenti idrosolubili:

- Fluoresceina - **giallo**
- Piorubina – **rosso** - **marrone**
- Pioverdina - **verde**
- Piocianina - **blu** **viola**

# Le analisi presso IZSve :

Ancora mozzarelle **colorate** :  
questa volta è di scena il **rosa**

## Lab. microbiologia



***Sporobolomyces  
roseus***  
***ruberrimus***

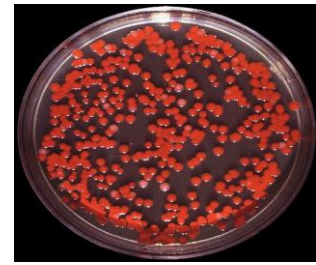
Lievito psicrotrofo

Diffuso in molti habitat ed associato soprattutto  
ai vegetali

Non patogeno



# I microrganismi cromogeni : *Serratia marcescens*



## Arrossamento di pasta alimentare da *S. Marcescens*

Le colorazioni rosse o “sanguigne” su alimenti amidacei sono sorprendenti all'apparenza ma piuttosto rare.

Tipica alterazione da ***S. marcescens*** in campioni di pasta che hanno subito una parziale cottura (5' ad ebollizione dell'acqua) e che vengono mantenuti a temperature di 5-6°C in ambiente saturo di umidità



Come si comporta il **Laboratorio Ufficiale** degli alimenti nei confronti delle alterazioni cromatiche ( es. da *Pseudomonas* spp.)



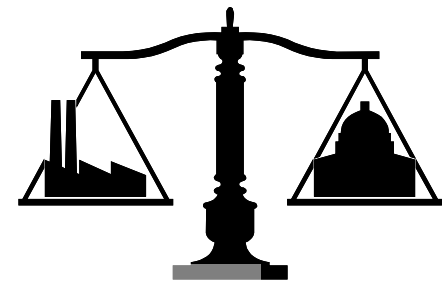
## **NORMATIVA**

Per *Pseudomonas* spp. non esistono **referimenti normativi** e limiti di accettabilità per alimenti

La presenza di colorazione anomala è uno stato di **alterazione** rientra nell' art. 5 legge 30 aprile 1962 n° 283



# Criteri microbiologici



**Legge ordinaria del Parlamento n° 283 del 30.04.1962** - Disciplina igienica della produzione e della vendita delle sostanze alimentari e delle bevande.

**Art. 5** - E' vietato impiegare nella preparazione di alimenti o bevande, vendere, detenere per vendere o somministrare come mercede ai propri dipendenti, o comunque distribuire per il consumo sostanze alimentari:

- a) private anche in parte dei propri elementi nutritivi o mescolate a sostanze di qualità inferiore o comunque trattate in modo da variarne la composizione naturale, salvo quanto disposto da leggi e regolamenti speciali;
- b) in cattivo stato di conservazione;
- c) con cariche microbiche superiori ai limiti che saranno stabiliti dal regolamento di esecuzione o da ordinanze ministeriali;
- d) insudiciate, invase da parassiti, in stato di **alterazione** o comunque nocive, ovvero sottoposte a lavorazioni o trattamenti diretti a mascherare un preesistente stato di alterazione;
- e) *soppressa...*;
- f) *soppressa...*;
- g) con aggiunta di additivi chimici di qualsiasi natura non autorizzati .... ;
- h) che contengano residui di prodotti, usati in agricoltura .....

# Alterazioni chimiche degli alimenti

Segnalazioni da parte di cittadini di colorazioni anomale in campioni di latte **UHT** (Ultra High Temperature )

Colore rosato



Colore marrone chiaro



Colore beige



# Alterazioni chimiche degli alimenti



## Reazione di Maillard ( caramellizzazione )

E' un processo chimico complesso che coinvolge le proteine e gli zuccheri a seguito dell'azione delle alte temperature. I composti che si formano con queste trasformazioni sono bruni e dal caratteristico odore di crosta di pane appena sfornato. Le reazioni sono piuttosto complesse ed eterogenee ma attraverso la formazione di un intermedio (composto di Amadori) si formano diverse sostanze quali le **melanoidine** ( colore giallo- bruno ) e dall'odore e dal colore caratteristico.

Queste trasformazioni nel latte influenzano le proprietà nutritive e organolettiche dell'alimento le cui principali conseguenze sono :

- Aumento delle proprietà aromatiche che possono essere più o meno sgradevoli
- Imbrunimento dell'alimento e comparsa di sapore di cotto

E' il binomio tempo e temperatura a condizionare maggiormente l'aspetto e il gusto del prodotto

# Alterazioni chimiche degli alimenti

## Reazione di Maillard (caramellizzazione)

Per alcuni prodotti la reazione di Maillard è un fenomeno negativo es. latte UHT

Nei prodotti da forno, caffè, cereali tostati, la reazione è auspicabile

Spesso è grazie alle **melanoidine** che preferiamo un prodotto da forno piuttosto che un altro: siamo attratti dal colore marrone bruno ma non tanto dal giallino/bianco che interpretiamo come non abbastanza cotto o dal marrone molto scuro/nero che interpretiamo come bruciato



# Atri esempi di alimenti **alterati** pervenuti al Laboratorio di microbiologia alimentare

## I tuorli verdi





# Atri esempi di alimenti **alterati** pervenuti al Laboratorio di microbiologia alimentare

## La platessa cotta diventata verde



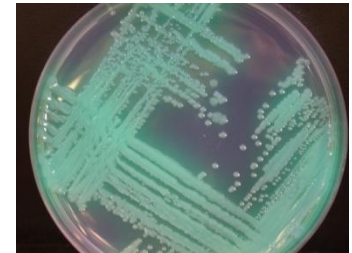


# Esperienze del Laboratorio Controllo microbiologico degli alimenti in materia di:

**Alterazione alimentari**

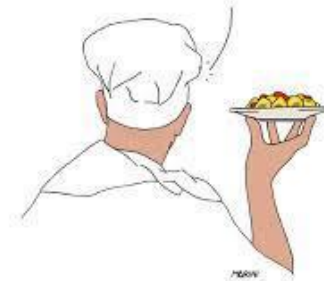


Scandalo ravioli con carne di cavallo



**Frodi alimentari**

TROTTELLINI  
AL RAGU'!



**Ricerca di patogeni  
alimentari**



**Attività innovative per la  
sicurezza alimentare**



Cucina sperimentale

Prodotti più sicuri, aziende più garantite

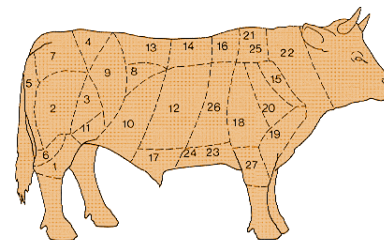


# Sospetta frode alimentare

## Identificazione di specie zoologica

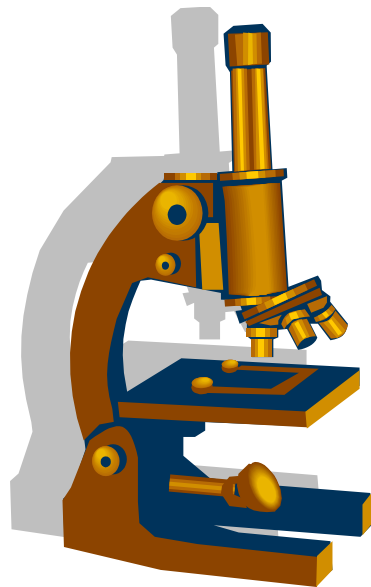
“campioni di kebab contenenti carni di tipo diverso da quello indicato in etichetta.....”

“la frode alimentare sulla carne di cavallo.....”



# Il caso del kebab

## Preparazione di kebab congelato confezionato



Ingredienti dichiarati in etichetta:

**57%** carne di **tacchino**, **30%** carne di **vitello**, acqua, .....

Richiesta di identificazione di specie zoologica da parte dei Servizi Veterinari

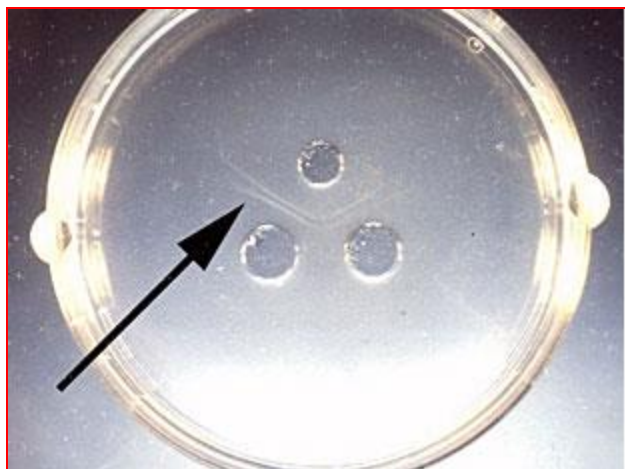
# A.G.I.D.

## Agar Gel ImmunoDiffusione

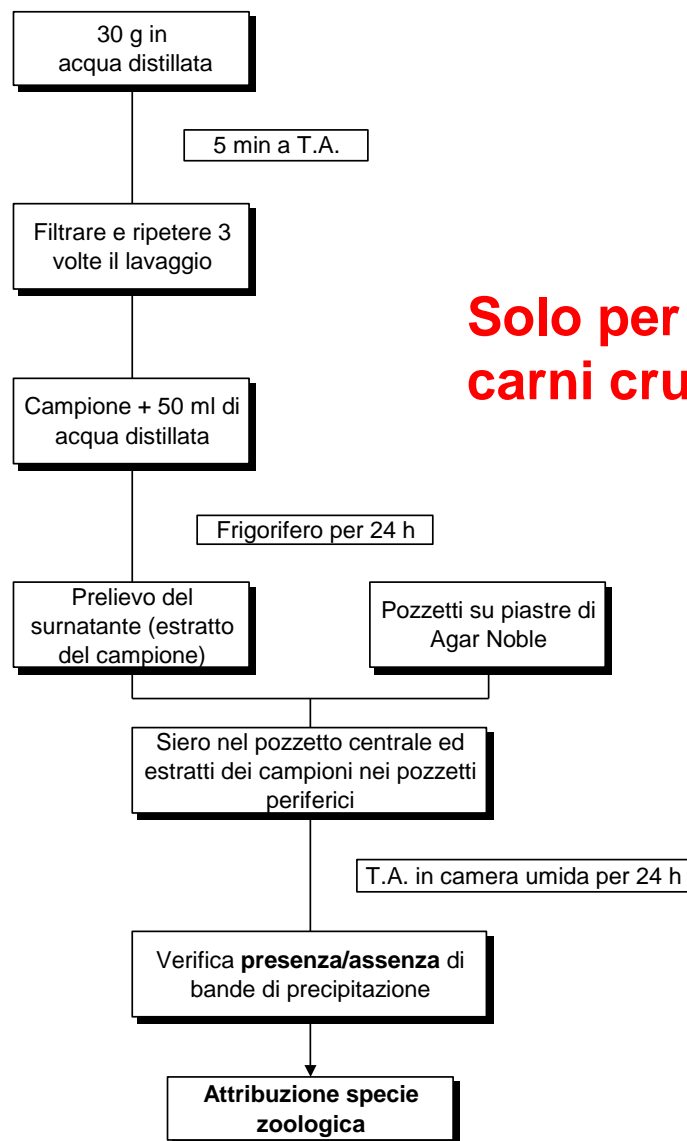
L'analisi immunologica è basata su una reazione sierologica antigene-anticorpo tra l'**estratto dell'alimento crudo** ed una serie di **sieri specie-specifici** per:

Bovino  
Suino  
Pollo  
Equino

Ovino  
Gatto  
Cane  
Uomo



## IDENTIFICAZIONE DELLA SPECIE ZOOLOGICA



# Identificazione di specie zoologica

## *PCR real-time (SYBR green)*

Per la presenza delle specie di pollo, tacchino e bovino nel campione sono state costruite delle **rette di calibrazione** per le diverse specie allestendo **diluizioni seriali** di DNA estratto da muscolo fresco di pollo, tacchino e bovino.

**100% DNA estratto da muscolo**

**50%**

**10%**

**5%**

**3%**

**1%**

**0,1%**

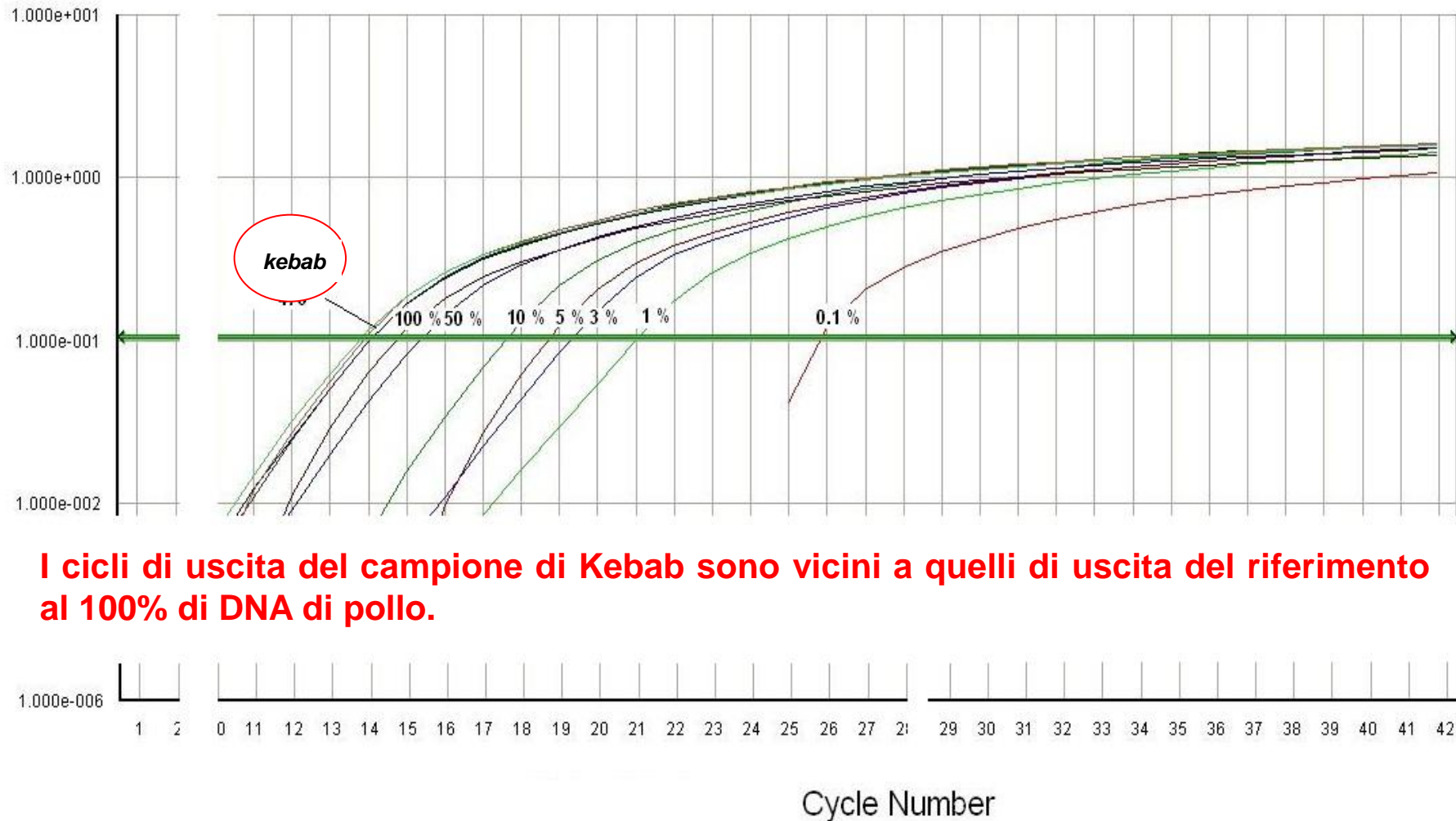
Le diluizioni del DNA della specie target (pollo, tacchino, bovino) sono state allestite con acqua sterile per biologia molecolare.

I **primer** utilizzati per l'amplificazione sono stati selezionati dalla letteratura (Bertasi et al., Industrie Alimentari-XLVI(2007) Aprile; Martin et al. J. Anim. Sci 85:2734-2739. 2007)



# Risultato PCR real time: ricerca pollo

Delta Rn vs Cycle

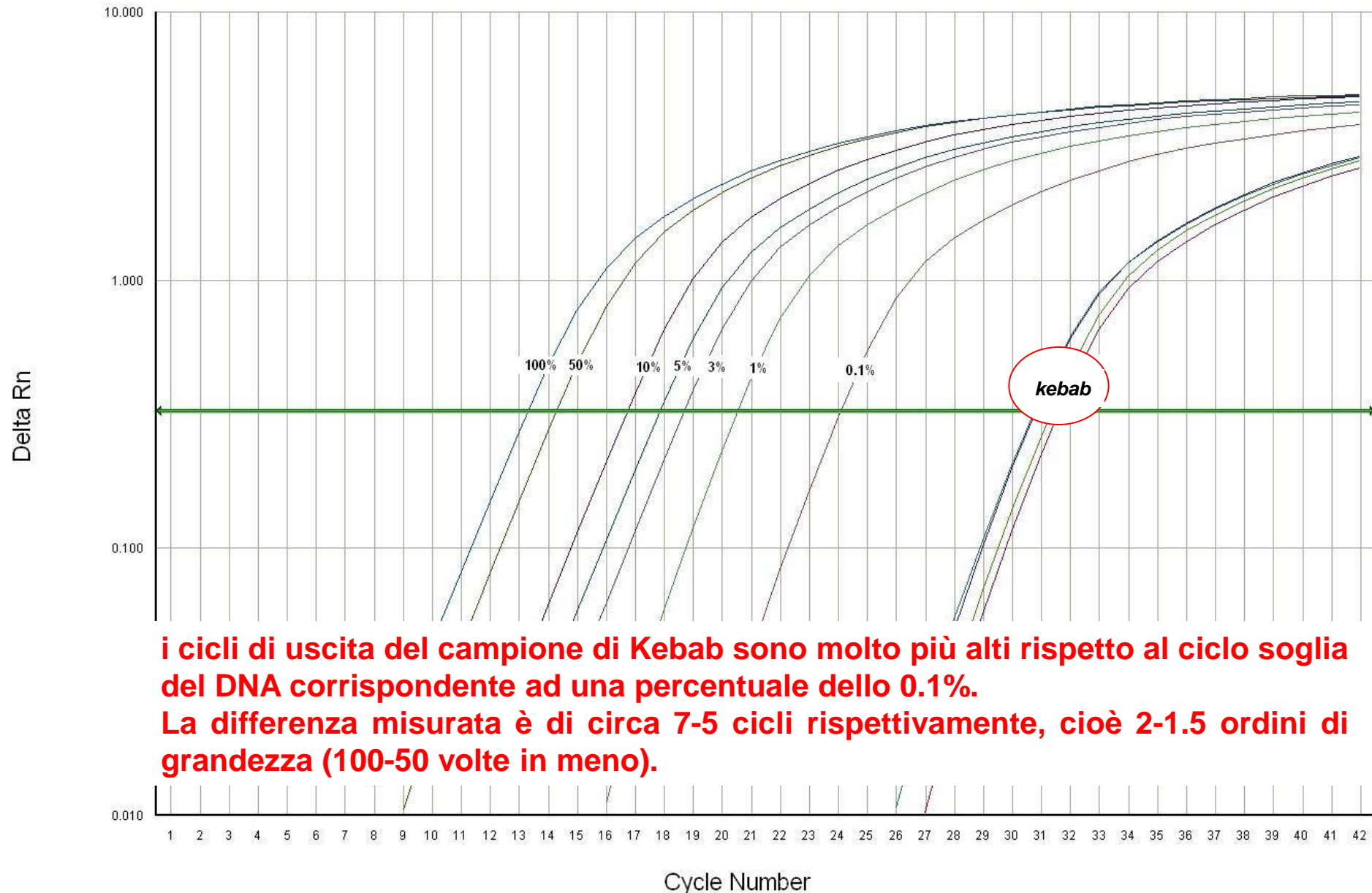


**I cicli di uscita del campione di Kebab sono vicini a quelli di uscita del riferimento al 100% di DNA di pollo.**



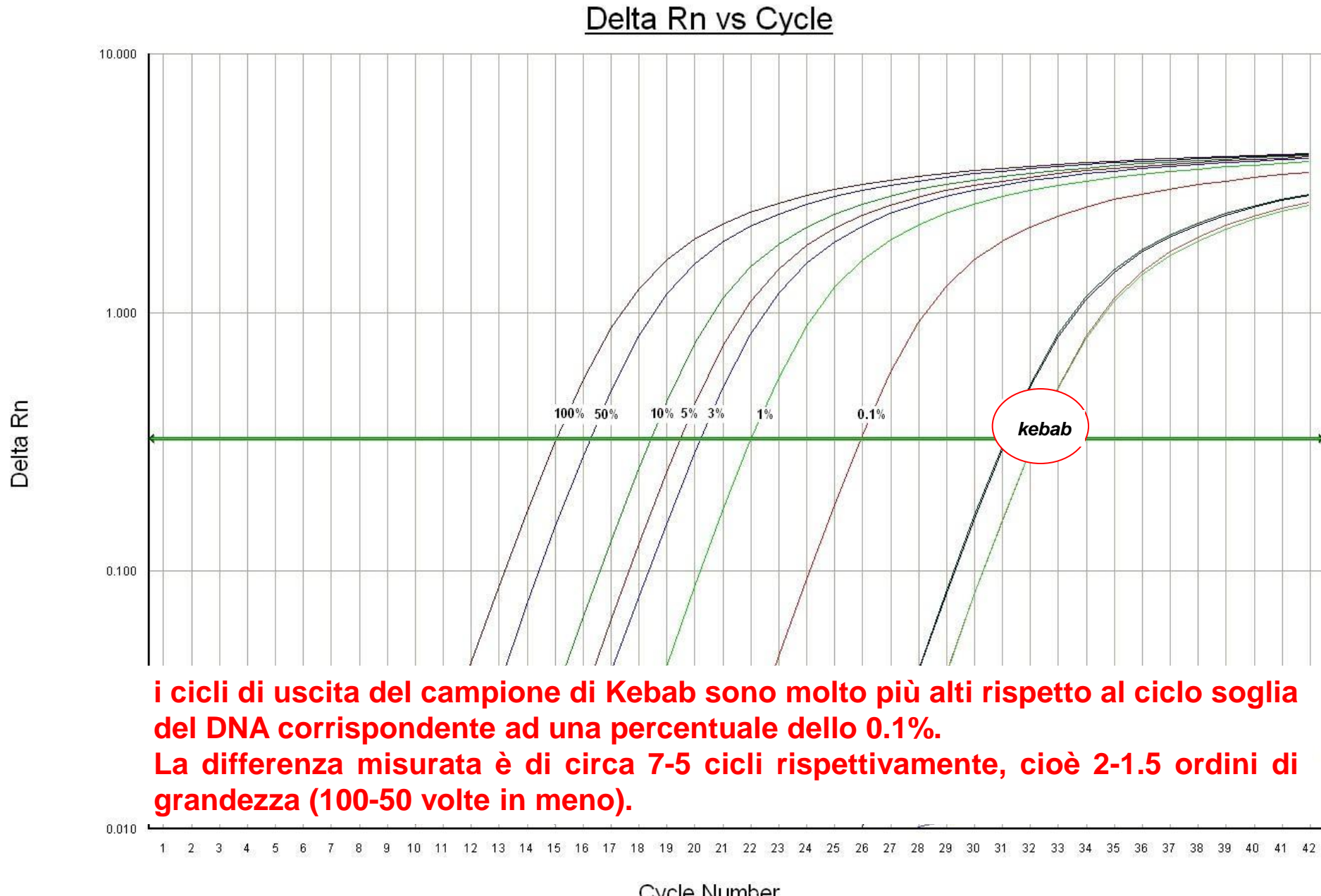
# Risultato PCR real time: ricerca bovino

Delta Rn vs Cycle



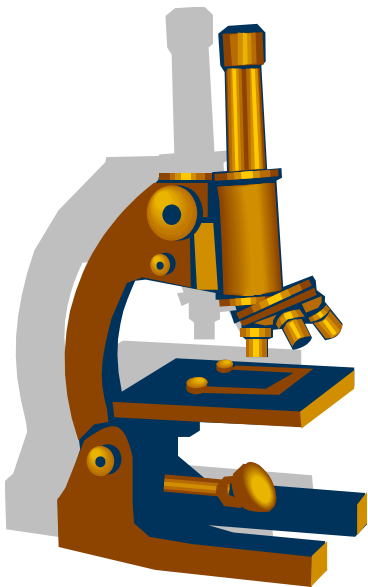
**i cicli di uscita del campione di Kebab sono molto più alti rispetto al ciclo soglia del DNA corrispondente ad una percentuale dello 0.1%.  
La differenza misurata è di circa 7-5 cicli rispettivamente, cioè 2-1.5 ordini di grandezza (100-50 volte in meno).**

# Risultato PCR real time: ricerca tacchino



# Il caso del kebab

## Preparazione di kebab congelato confezionato



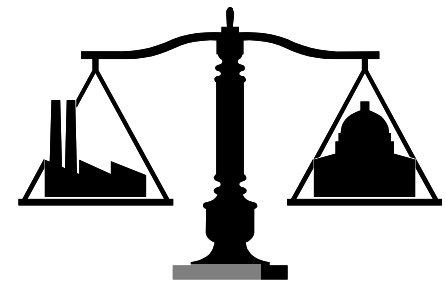
Ingredienti dichiarati in etichetta:

**57%** carne di **tacchino**, **30%**  
carne di **vitello**, acqua, .....

In pratica la preparazione di  
Kebab congelato e confezionato  
è costituito di **sola carne di pollo**

**False dichiarazioni in etichetta**

# Criteri microbiologici



**Legge ordinaria del Parlamento n° 283 del 30.04.1962** - Disciplina igienica della produzione e della vendita delle sostanze alimentari e delle bevande.

**Art. 5** - E' vietato impiegare nella preparazione di alimenti o bevande, vendere, detenere per vendere o somministrare come mercede ai propri dipendenti, o comunque distribuire per il consumo sostanze alimentari:

- a) private anche in parte dei propri elementi nutritivi o **mescolate a sostanze di qualità inferiore** o comunque trattate in modo da variarne la composizione naturale, salvo quanto disposto da leggi e regolamenti speciali;
- b) in cattivo stato di conservazione;
- c) con cariche microbiche superiori ai limiti che saranno stabiliti dal regolamento di esecuzione o da ordinanze ministeriali;
- d) insudiciate, invase da parassiti, in stato di alterazione o comunque nocive, ovvero sottoposte a lavorazioni o trattamenti diretti a mascherare un preesistente stato di alterazione;
- e) *soppressa...*;
- f) *soppressa...*;
- g) con aggiunta di additivi chimici di qualsiasi natura non autorizzati .... ;
- h) che contengano residui di prodotti, usati in agricoltura .....

# Lo scandalo della carne di cavallo

**(Horsegate ) Febbraio 2013**

Scandalo alimentare relativo alla produzione e commercializzazione di prodotti carnei freschi e congelati contenenti carne di cavallo “ marchiata fraudolentemente” come carne bovina



Origine : controlli da parte di una agenzia Irlandese su lasagne e hamburger a marchio Findus commercializzati in Irlanda e Gran Bretagna dalla grande catena commerciale britannica Tesco; emerge la presenza tra il 60 e il 100% di carne di cavallo in lasagne surgelate dichiarate in etichetta di pura carne bovina.



Mangiare carne di cavallo nel Regno Unito è un tabu'.....



# Lo scandalo della carne di cavallo

## (Horsegate ) Febbraio 2013

Lo scandalo ha coinvolto oltre 19 Paesi della Comunità Europea compresa l'Italia dove sono stati ritirati dal commercio ravioli e tortellini dopo che dai test effettuati sono emerse tracce di DNA di cavallo dall'1% al 3%



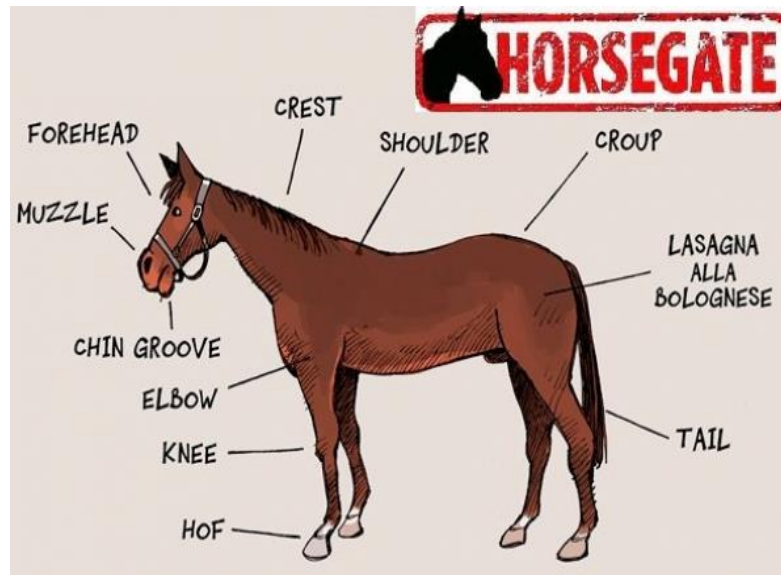
In seguito alla Raccomandazione Comunitaria per l'adozione di un piano straordinario di controllo sono stati eseguiti 200 campioni per specie zoologica e 360 campioni per ricerca di fenilbutazone e cortisonici da ripartirsi tra animali di origine nazionale e di provenienza estera.



# Lo scandalo della carne di cavallo

## (Horsegate ) Febbraio 2013

Si è trattato in conclusione di una sola **frode commerciale** lesiva dei diritti patrimoniali del consumatore e non di una frode sanitaria per l'immissione in commercio di matrici alimentari pericolose per la salute pubblica



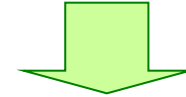
# L'uso della **PCR Real Time** nel caso di identificazione della specie

Dubbi sull'origine della carne.



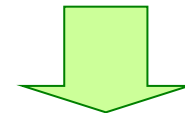
**Tempi di analisi: 4-5 ore**

Estrazione del **DNA** anche se l'alimento è **cotto**



PCR del campione e dei DNA di riferimento estratti dal muscolo delle carni commestibili e non:

<b>Cavallo</b>	Tacchino
Cane	Bufalo
Coniglio	Pecora
Gatto	Topo
Cervo	
Capriolo	
Maiale	
Bovino	
Pollo	



**Confronto** tra la curva di amplificazione del campione e quella delle carni di riferimento

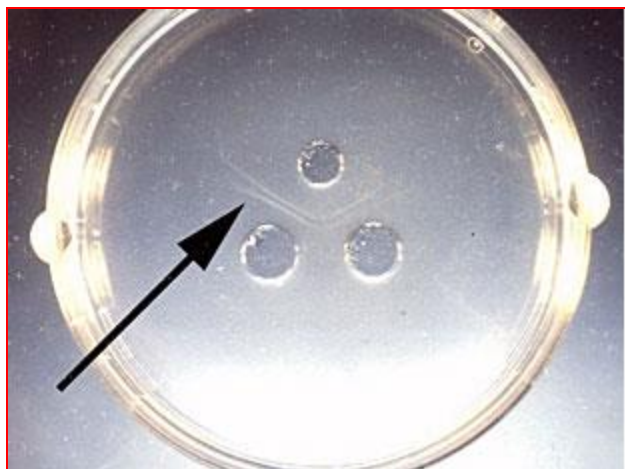
# A.G.I.D.

## Agar Gel ImmunoDiffusione

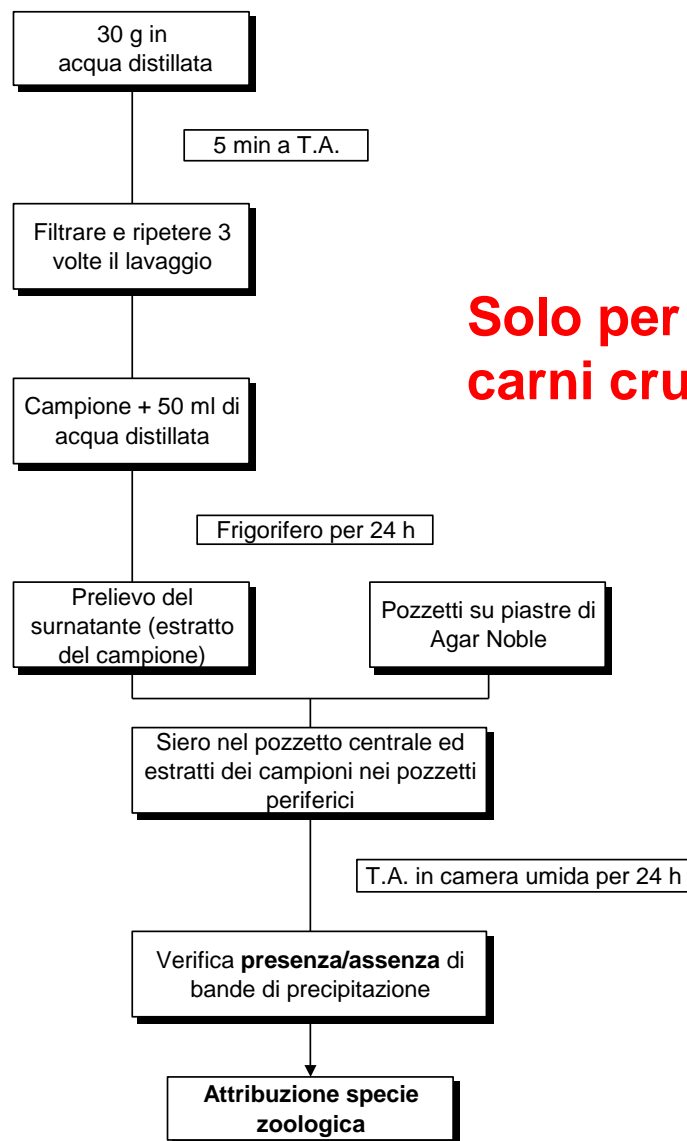
L'analisi immunologica è basata su una reazione sierologica antigene-anticorpo tra l'**estratto dell'alimento crudo** ed una serie di **sieri specie-specifici** per:

Bovino  
Suino  
Pollo  
Equino

Ovino  
Gatto  
Cane  
Uomo



## IDENTIFICAZIONE DELLA SPECIE ZOOLOGICA



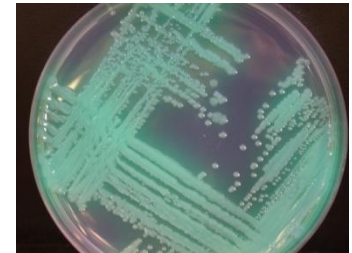


# Esperienze del Laboratorio Controllo microbiologico degli alimenti in materia di:

**Alterazione alimentari**

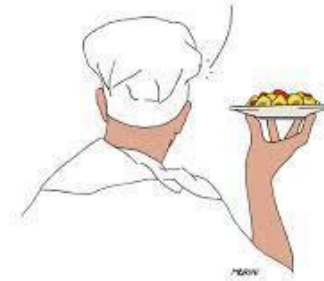


Scandalo ravioli con carne di cavallo



**Frodi alimentari**

TROTTELLINI  
AL RAGU'!



**Sospette tossinfezioni  
alimentari**



**Attività innovative per la  
sicurezza alimentare**



Cucina sperimentale

Prodotti più sicuri, aziende più garantite





# Istituto Superiore di Sanità (ISS)

**Oggetto** : Linee guida sugli accertamenti di patogenicità  
di batteri responsabili di **tossinfezioni alimentari**  
**BOZZA**

## **Scopo e campo di applicazione:**

le presenti linee guida indicano gli accertamenti **minimi** da effettuare per ciascun agente batterico e/o tossina derivata tra i più frequentemente implicati nella genesi di tossinfezioni alimentari che i laboratori pubblici competenti in Microbiologia Alimentare **devono** essere in grado di eseguire su campioni prelevati dell'Autorità Sanitaria a livello di distribuzione e somministrazione.

# Istituto Superiore di Sanità (ISS)

**Oggetto** : Linee guida sugli accertamenti di patogenicità di batteri responsabili di tossinfezioni alimentari **BOZZA**

**Tabella 1**

Agente di intossicazione	Ricerca di tossine nell'alimento (metodiche)	Ricerca del microrganismo tossigeno
<i>Tossine stafilococciche</i>	<b>+</b> (Reg CE 1441/2007 - AFSSA EU CRL for coagulase positive staphylococci, Ver.5:2010 - AOAC Official Method n° 2007.06	-
<i>Tossine botuliniche e clostridi produttori di t.b.<sup>[1]</sup></i>	<b>+</b> (C.D.C. 1998, A.O.A.C. 2001)	<b>+</b> (C.D.C. 1998, A.O.A.C. 2001)
<i>B. cereus prod. di tossina emetica</i>	<i>Singlepath Emetic tox MRK</i> <b>+</b>	-
<p>[1] La ricerca specifica del germe e delle tossine botuliniche deve essere condotta in relazione alle caratteristiche di pH ed acqua libera (Aw) dell'alimento; infatti quando il valore di pH è &lt; a 4.5 e/o l'acqua libera al disotto di 0.930 si considera il substrato come non idoneo per l'attività di tossinogenesi (vedi ad esempio alimenti conservati sottaceto).</p> <p>Pertanto la valutazione di tali parametri deve essere considerata prioritaria nella definizione di rischio di un alimento</p>		

Tabella 2

Agente infettivo	Caratterizzazione biochimica e/o sierologica (metodiche)	Test di patogenicità (metodiche)
<i>Salmonella</i> spp.	<sup>+</sup> (ISO 6579)	—
<i>Campylobacter</i> termofili	<sup>+</sup> (ISO 10272-1)	—
<i>Clostridium</i> perfringens	<sup>+</sup> (ISO 7937)	<sup>+</sup> (ricerca tossine: kit commerciali)
<i>B.cereus</i> enterotossigeno <i>Tossina</i> diarroica	<sup>+</sup> (ISO 7932)	<sup>+</sup> (ricerca tossine: kit commerciali)
<i>E. coli</i> - ceppi VTEC (O157)	<sup>+</sup> (ISO 16654)	<sup>+</sup> (Id. geni di virulenza)
<i>E. coli</i> - ceppi VTEC (O26, O103, O111, O145) <b>O104:H4</b>	<sup>+</sup> (ISO/TS 13136, in pubblicazione)	<sup>+</sup> (Id. geni di virulenza)
<i>Listeria monocytogenes</i>	<sup>+</sup> (ISO 11290 -1 e -2)	—
<i>Yersinia enterocolitica</i>	<sup>+</sup> (ISO 10273)	<sup>+</sup> (ISO 10273 e id. sierotipo)
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	<sup>+</sup> (ISO /TS 21872-1)	<sup>+</sup> (Id. geni di virulenza)
<i>Vibrio cholerae</i>	<sup>+</sup> (ISO /TS 21872-1)*	<sup>+</sup> (Id. geni di virulenza)
<i>Cronobacter</i> spp.	<sup>+</sup> (ISO /TS 22964)	—
<i>Shigella</i> spp.	<sup>+</sup> (ISO 21567)	—

# Epidemia da E. coli O104:H4 in Europa nel corso del 2011

Maggio 2011: oltre 3900 persone coinvolte in 13 paesi con 46 decessi

## Possibili fonti di contagio:

L'**EFSA** ha individuato come fonte molto probabile dei focolai germogli vegetali prodotti da semi di fieno greco contaminato provenienti dall'Egitto



semi



germogli



Insalata mista

La tipologia del veicolo d'infezione ( **germogli vegetali**) e le particolari modalità e circostanze del consumo, talvolta non facilmente identificabili come nel caso di insalate miste, hanno contribuito a complicare ulteriormente il quadro epidemiologico.

# ***Escherichia coli O104:H4***

**Germania del nord, aprile 2011**

**Aumento dei casi di:**

**Sindrome uremica- emolitica ( SEU )  
Diarrea emorragica**

Il 31 maggio 2011 il coinvolgimento dei  **cetrioli**  come fonte di contagio è stato **ufficialmente smentito** dalle stesse autorità tedesche.

Il 15 giugno la Francia denuncia un focolaio a Bordeaux causato dallo stesso ceppo di E. coli riscontrato in Germania. Sia in Germania che in Francia le indagini indicano quale probabile causa dei focolai il consumo di **semi germogliati** provenienti dall'Egitto.

Il 6 luglio 2011 la Commissione Europea dispone il blocco dell'importazione dall'Egitto di semi di fieno greco e altri semi e ortaggi.





# Aggiornamento del Reg. 2073/05 per germogli ( Reg. (UE) n° 209/2013 11 marzo 2013)

## Criteri microbiologici



Germogli  
Fieno greco



Germogli  
Soia verde



Germogli  
Fagioli piselli

**Germogli** : E. coli (VTEC )

0157, 026, 0111, 0103, 0145, 0104:H4

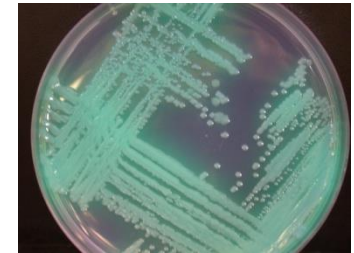
**Assenza in 25 g**

# Esperienze del Laboratorio Controllo microbiologico degli alimenti in materia di:

**Alterazione alimentari**

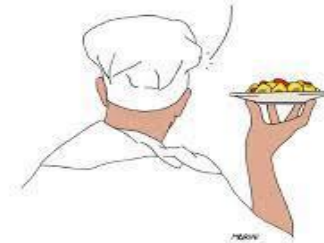


ravioli con carne di cavallo



**Frodi alimentari**

TROTTELLINI  
AL RAGU'!



**Sospette tossinfezioni  
alimentari**



**Attività innovative per la  
sicurezza alimentare**



Cucina sperimentale

Prodotti più sicuri, aziende più garantite



## Gli **sviluppi futuri** dell'IZSVe a tutela della salute del consumatore

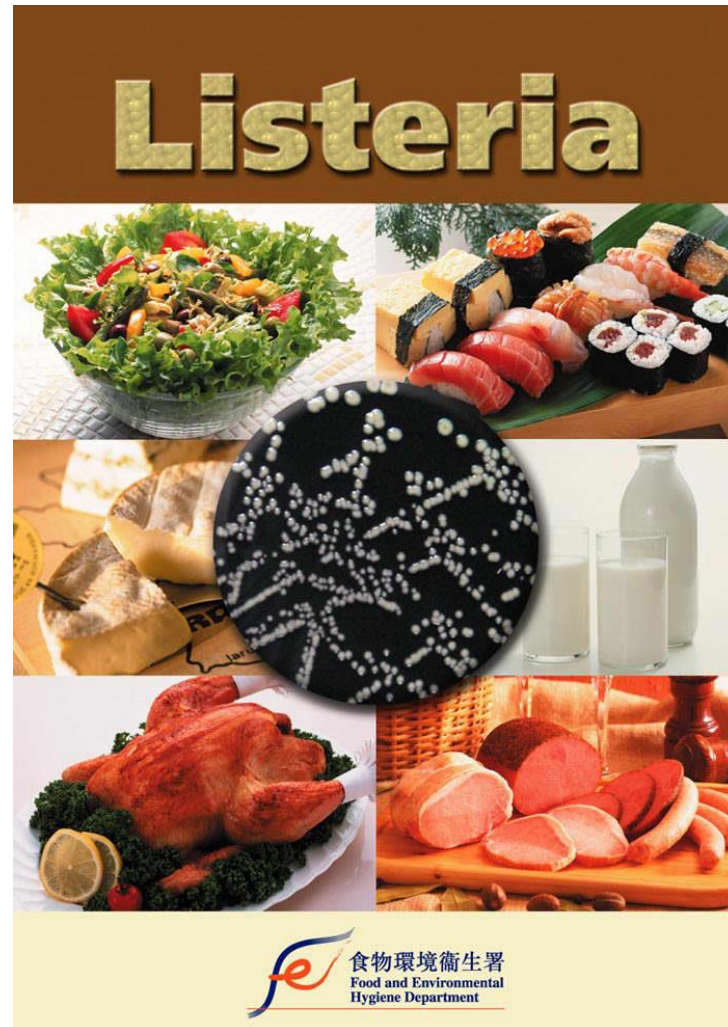


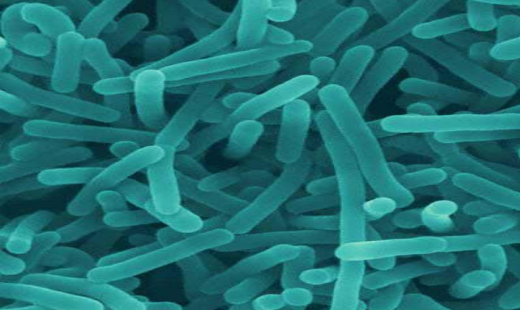
Il Laboratorio al servizio del produttore per garantire la Sicurezza alimentare



Reg. (CE) 2073/05

# Capitolo 1. Criteri di sicurezza alimentare





# Listeriosi

*La patologia può assumere la forma:*

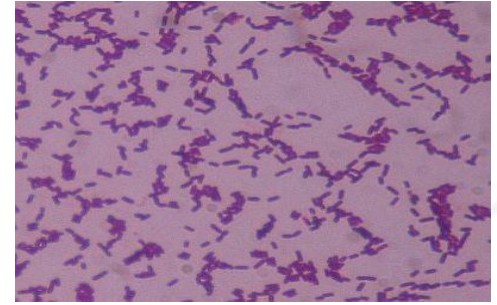
- **Lieve gastroenterica**: nelle persone in salute, la malattia ha incubazione di 24-48 ore e si manifesta con una forte gastroenterite con esito benigno
- **Gravissima** (sepsi, meningite, aborto): nei soggetti con sistema immunitario indebolito *Listeria* colonizza organi e apparati causando forme extraintestinali anche molto gravi).

*Questa forma è caratterizzata da una*

***Incidenza bassa / mortalità alta***



# Listeria monocytogenes



Il Regolamento 2073/05 per quanto riguarda la *Listeria monocytogenes* prende in considerazione, giustamente, gli alimenti più a rischio e cioè:

**“gli alimenti pronti RTE”** destinati al consumo diretto

E questo per un motivo molto semplice .....

# Cambiamento delle abitudini alimentari

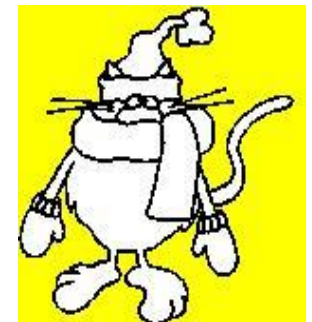
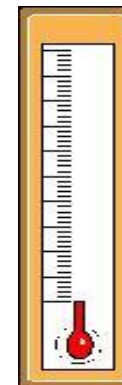


**Alimenti pronti**



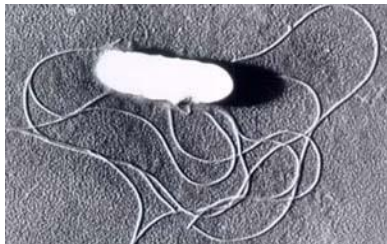
**Consumatore**

**Shelf-life particolarmente lunghe  
in condizione di refrigerazione**



# *Listeria monocytogenes* e gli alimenti

**Listeria** è un batterio  
**psicrotrofo** ed **ubiquitario**



elevata  
diffusione  
in natura

=

elevata possibilità'  
di contaminazione



**DOSE INFETTANTE**

**Shelf - life**



## Nota Comitato Nazionale per la Sicurezza Alimentare **Regolamento (CE) 2073/2005 e la problematica relativa a *L.monocytogenes* (24/04/2008)**

Esiste una grande variabilità di prodotti freschi **RTE** con shelf-life diverse; il rischio del **superamento del limite critico** per *L.monocytogenes*, diventerà assai più probabile per i prodotti a più lunga durabilità soprattutto se la **temperatura** durante la distribuzione e la conservazione domestica dovesse essere **> 4°C**

### Aggravante

E' nota e dimostrata la possibilità di riscontrare temperature di abuso termico nella conservazione e trasporto comprese tra **8°C – 12°C**



# *Indagine condotta dall'Istituto Zooprofilattico delle Venezie sui frigoriferi di 116 famiglie di dipendenti*

*La maggior parte dei frigoriferi domestici non rispetta la catena del freddo.*

*Il valore medio riscontrato all'interno degli elettrodomestici di casa è stato di **+7.2°C***

*Nella parte alta il valore medio è stato di +6.9°C mentre nella parte bassa è stato di +6.6°C*

*Il record negativo si raggiunge nella portiera dove solitamente si tengono latte e uova dove il valore medio è stato di **+8.0°C***





## Nota Comitato Nazionale per la Sicurezza Alimentare **Regolamento (CE) 2073/2005 e la problematica relativa a *L.monocytogenes* (24/04/2008)**

---

**Preoccupazione** per l'immissione in commercio di prodotti che potrebbero rivelarsi particolarmente a rischio :

Shelf-life lunghe in condizioni di refrigerazione  
Abuso termico in fase di commercializzazione  
( aggravante )

- **Senza alcuna verifica** da parte dell'**OSA**  
( Privi di adeguato “ **bollino di garanzia** “ )



## Nota Comitato Nazionale per la Sicurezza Alimentare **Regolamento (CE) 2073/2005 e la problematica relativa a *L.monocytogenes* (19/11/2009)**

---

**Preoccupazione** per l'immissione in commercio di prodotti che potrebbero rivelarsi particolarmente a rischio :

**Invito** ai Servizi veterinari a “**vigilare**” su particolari prodotti a rischio

Istituire appositi **campionamenti** alla fine della shelf-life dei prodotti al fine di prevenire eventuali rischi per la salute pubblica



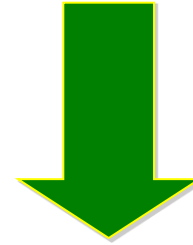
# Reg. (CE) 2073/05 e *Listeria monocytogenes*

In 5 unità campionarie



Misura  
pH ed Aw

**Prodotti stagionati,  
acidificati**



Alimenti **pronti che non**  
**costituiscono terreno favorevole**  
alla crescita di *L.monocytogenes*

$\text{pH} \leq 4,4$  o  $\text{aw} \leq 0,92$

$\text{pH} \leq 5,0$  e  $\text{aw} \leq 0,94$

Conservabilità < 5 giorni

**Max 100 ufc/g**

# Reg. (CE) 2073/05 e *Listeria monocytogenes*

Preparazioni varie di  
gastronomia  
Insaccati crudi e cotti;  
prodotti a base di carne crudi e  
cotti  
Prodotti ittici affumicati,  
gamberetti in  
Salamoia  
Dessert

Alimenti **pronti che costituiscono  
terreno favorevole** alla crescita di  
*L.monocytogenes*

pH > 4,4 o aw > 0,92  
pH > 5,0 con di aw > 0,94  
conservabilità ≥ a 5 giorni

**Assenza in 25g**

**Max 100 ufc/g**

Se l'alimentarista ( **OSA** ) è in grado di  
dimostrare ( **AC** ) che questo limite non verrà  
mai superato nell'arco della vita commerciale  
in condizioni ragionevolmente prevedibili di  
distribuzione, conservazione ed uso



# La responsabilità al produttore

Il produttore deve:

- valutare la possibilità di accrescimento durante la shelf-life
- garantire che *Listeria monocytogenes* non superi 100 cfu/g alla fine della shelf-life del prodotto

mediante

1. studi di letteratura scientifica
2. Utilizzo di modelli matematici di microbiologia predittiva
3. **Prove di contaminazione sperimentale ( challenge test )**

**Tali studi sono soggetti all'approvazione dell'Autorità Sanitaria**



## La responsabilità al produttore

### Prove di contaminazione sperimentale ( challenge test )

- 1 ) **Documento di orientamento** per gli studi sulla vita commerciale degli alimenti pronti al consumo inerenti la *Listeria monocytogenes* ai sensi del Reg. (CE) n° 2073/2005 del 15 novembre 2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari **DG SANCO 2008**  
( documento istituito a solo scopo informativo )



- 2) **Documento tecnico di orientamento** per gli studi sulla vita commerciale degli alimenti pronti al consumo inerenti alla *Listeria monocytogenes* **AFSSA 2008**

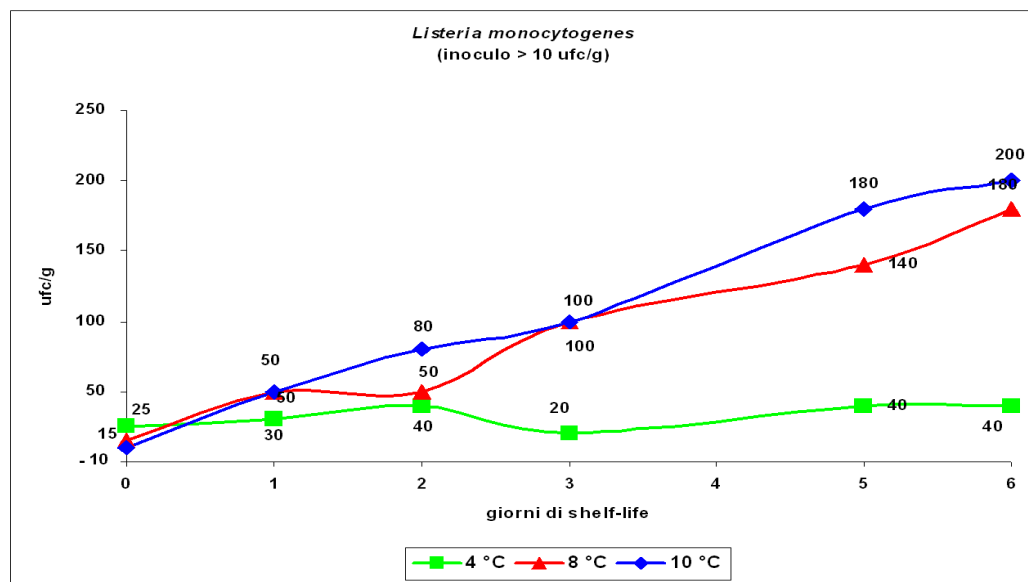
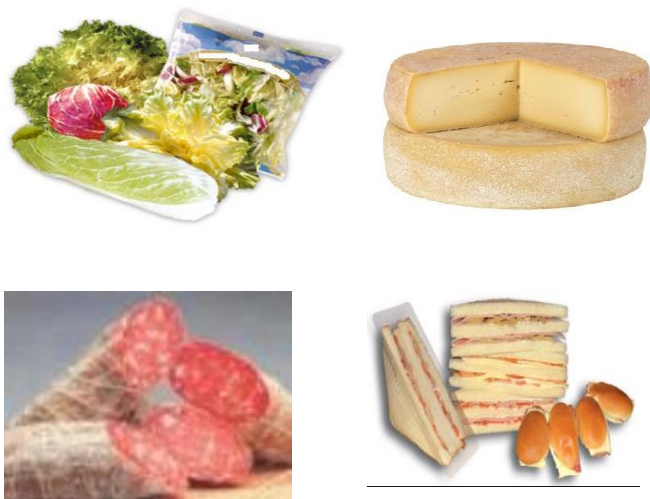


Tali studi sono soggetti all'approvazione dell'Autorità Sanitaria

# Aree di miglioramento e sviluppo della SCS8

## Prove di ChallengeTest\_per *Listeria monocytogenes*

Studio della dinamica di sviluppo della *Listeria monocytogenes* in alimenti **ready-to-eat**, come previsto dal Reg. (CE ) n° 2073/2005 e altri documenti tecnici emanati dalla Comunità Europea e dal Laboratorio comunitario di riferimento (AFSSA) per dimostrare l'applicabilità dei limiti di tolleranza per tale patogeno in diverse tipologie di prodotti immessi sul mercato.



# Aree di miglioramento e sviluppo della SCS8

## Servizio di validazione della shelf-life dei prodotti

Studio dell'evoluzione delle caratteristiche microbiologiche, chimico-fisiche ed organolettiche delle matrici alimentari nella fase di conservazione sia nelle condizioni standard previste dall'operatore che nelle condizioni di abuso termico che si possono ragionevolmente verificare durante la distribuzione commerciale fino al consumatore finale.



**Reg. (CE) 2073/05**

## **Capitolo 1. Criteri di sicurezza alimentare**



**La cucina sperimentale**



# La cottura degli alimenti

Sotto ponendo un alimento ad una temperatura superiore a **75°C** in modo uniforme in tutti i suoi punti per un tempo sufficiente (10min), i batteri patogeni vengono **eliminati**

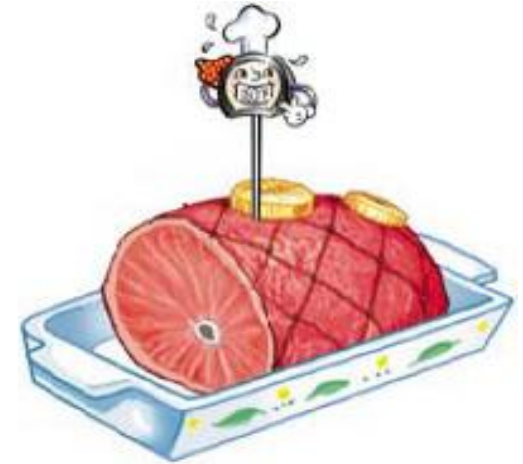


**Fattore di rischio : Cottura insufficiente**



# Fattori che hanno contribuito all'insorgenza di focolai tossinfettivi batterici ( **Salmonella** )

- *Impropria temperatura di conservazione - 33,4 %*
- **Cottura insufficiente - 26,0 %**
- *Attrezzature contaminate - 11,9 %*
- *Cibo contaminato all'origine - 7,0 %*
- *Scarsa igiene personale 17,5 %*
- *Altro - 3,9 %*



- *Dati riguardanti 537 focolai*

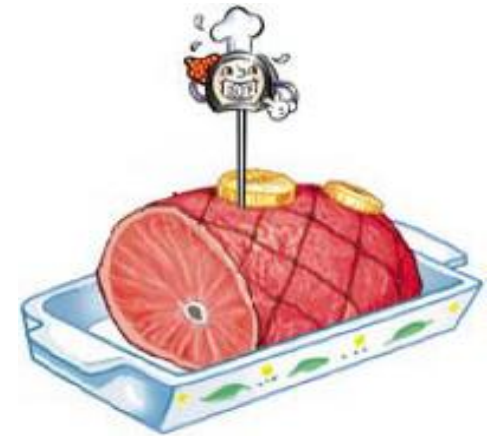
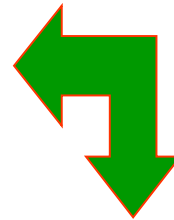
## Informazioni in etichetta :

“ Da consumarsi previa cottura”

“ Da consumarsi previa accurata cottura”

# Fattori che hanno contribuito all'insorgenza di focolai tossinfettivi batterici ( **Salmonella** )

- *Impropria temperatura di conservazione - 33,4 %*
- **Cottura insufficiente - 26,0 %**
- *Attrezzature contaminate - 11,9 %*
- *Cibo contaminato all'origine - 7,0 %*
- *Scarsa igiene personale 17,5 %*
- *Altro - 3,9 %*
- *Dati riguardanti 537 focolai*



Sono necessarie informazioni  
chiare e precise per una **sicura**  
cottura del prodotto

Informazioni in etichetta “ **certificate e  
validate** ”

# Aree di miglioramento e sviluppo SCS8

## La cucina sperimentale



## Cucina sperimentale

Prodotti più sicuri, aziende più garantite



# Regolamento (CE) n. 178/2002

## art. 6 analisi del rischio

1. Ai fini del conseguimento dell'obiettivo generale di un livello elevato di tutela della vita e della salute umana, la **legislazione alimentare si basa sull'analisi del rischio** .....
2. La **valutazione del rischio** si basa sugli **elementi scientifici** a disposizione ed è svolta in modo indipendente, obiettivo e trasparente.

# Regolamento (CE) n. 178/2002

## art. 14 requisiti di sicurezza degli alimenti

.....

3. Per determinare se un **alimento sia a rischio** occorre prendere in considerazione quanto segue:
- a) le **condizioni d'uso normali** dell'alimento da parte del consumatore in ciascuna fase della produzione, della trasformazione e della distribuzione;
  - b) le informazioni messe a disposizione del consumatore, comprese le **informazioni riportate sull'etichetta** o altre informazioni generalmente accessibili al consumatore sul modo di **evitare specifici effetti nocivi** per la salute provocati da un alimento o categoria di alimenti.

.....



# Aree di miglioramento e sviluppo della SCS8

## La cucina sperimentale

- Valutare la **resistenza** a trattamenti termici di microrganismi patogeni a trasmissione alimentare attraverso **prove di cottura**
- Definire **protocolli di cottura** di alimenti contaminati che consentano di inattivare specifici patogeni
- Fornire strumenti agli **OSA** per gestire il rischio microbiologico per il consumatore finale attraverso il processo di cottura.
- Garantire e attestare che il processo produttivo utilizzato in azienda è corretto e sicuro dal punto di vista microbiologico.( **informazioni sicure in etichetta** )



# Il controllo microbiologico nella sicurezza alimentare : stato dell'arte e sviluppi futuri

**Grazie per l'attenzione**



**SCS8 Valorizzazione delle produzioni alimentari**