

**Listeria monocytogenes – Metodi di campionamento,
analisi e sistemi di tipizzazione.**

**Esperienze nel settore del prosciutto nella AUSL di
Parma.**

Langhirano, 10 aprile 2014

Pongolini Stefano



Istituto Zooprofilattico Sperimentale
della Lombardia e dell'Emilia-Romagna
Bruno Ubertini

Listeria monocytogenes e prodotti carnei IZSLER

- I prodotti a base di carne della tradizione italiana non sono esenti dal problema *Listeria monocytogenes*
 - tra questi i prosciutti crudi di maggior rilevanza economica
 - in Europa è imposto un limite massimo di contaminazione per questi prodotti durante la vita commerciale
 - in diversi altri paesi (es. USA e Giappone) si richiede un limite più basso, corrispondente allo zero analitico con metodi analitici definiti
-

Metodi di campionamento



- Prodotto
 - Ambiente (spugnette)
-

Metodi di campionamento



- Diversi ambienti e impianti

PRODOTTO

- Materiali sterili: forbici, coltelli, bisturi, pinze, guanti, sacchetti
 - Disinfettanti: acqua ossigenata-etanolo o equivalente – prodotti iodati per gli insaccati
 - Disinfettare l'involucro esterno (se doppio) o l'unico involucro
 - Prelevare almeno 100 gr per LM a 0-4°C -> analisi entro 24h
-

Metodi di campionamento

SUPERFICI

- Spugnette di cellulosa sterili (min 3,5x7,5 cm) e reidratante
 - Sacchetti e guanti sterili
 - Delimitatori per superficie (30x30 cm)
 - Lavare e disinfettare mani ed avambracci
 - Reidratare la spugna (9-10 ml) eliminare l'eccesso
 - Indossare il guanto sterile e strofinare (10x10 volte)
 - Riporre la spugna in contenitore eliminando l'aria in eccesso.
 - Inviare al lab a 0-4°C -> analisi entro 24h
-

Metodi di campionamento

SUPERFICI

- quali prelievi? Il piano prevede di massimizzare la sensibilità
 - *A contatto (10):*
 - In fase operativa (in lavorazioni post-letali) 70% dei campioni
 - In fase pre-operativa (per raggiungere punti difficili) 30%
 - *Non a contatto (5):*
 - Ovunque c'è il prodotto
 - Zone non comunemente sanitizzate (es. zone aeree)
 - Punti difficili o 'sensibili' (scarichi, condense ecc.)
 - Zone di passaggio o di incrocio con aree di lavorazione
-



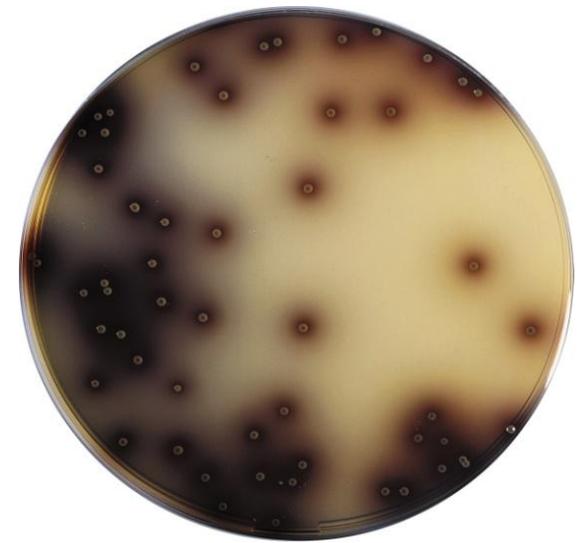
- F.S.I.S. Microbiology Laboratory Guidebook (MLG) 8.09 rev.9 (2013)

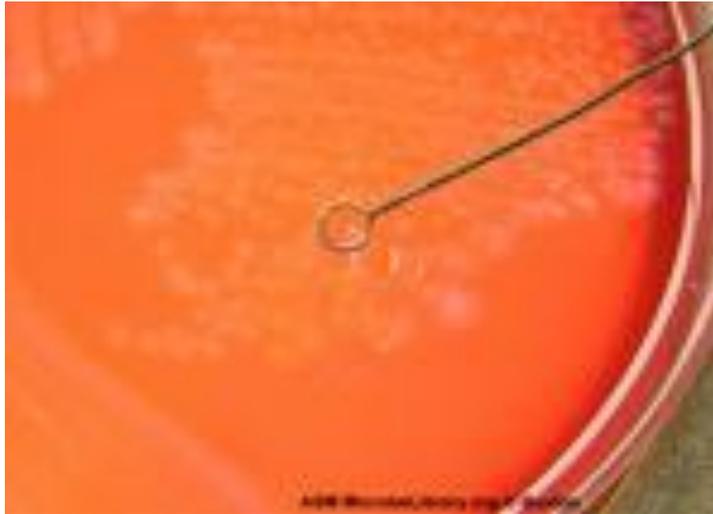
Analisi



- Trapianto in Fraser broth

- Piastratura in MOX

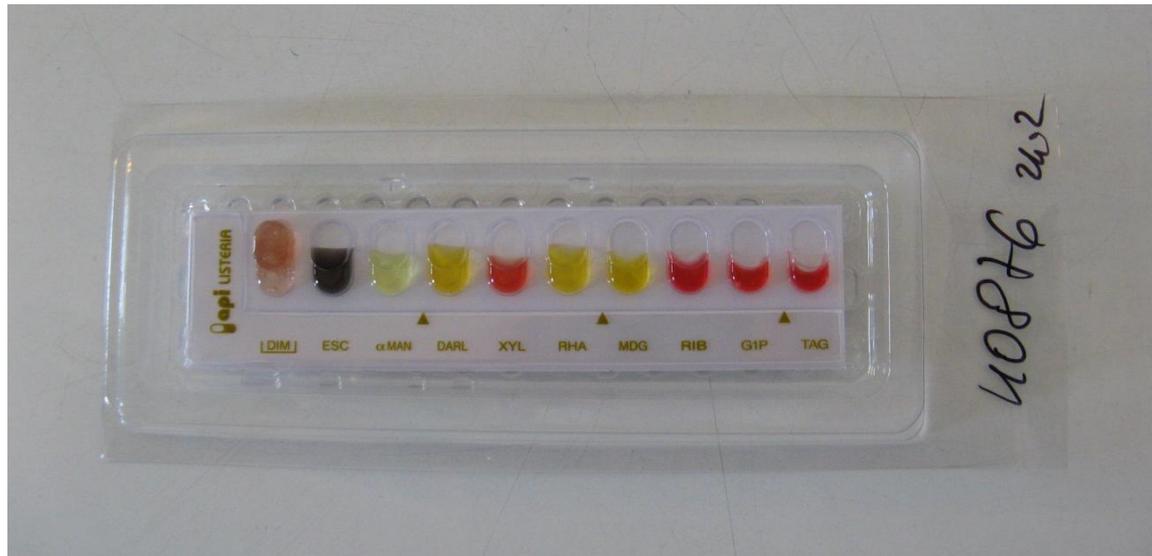




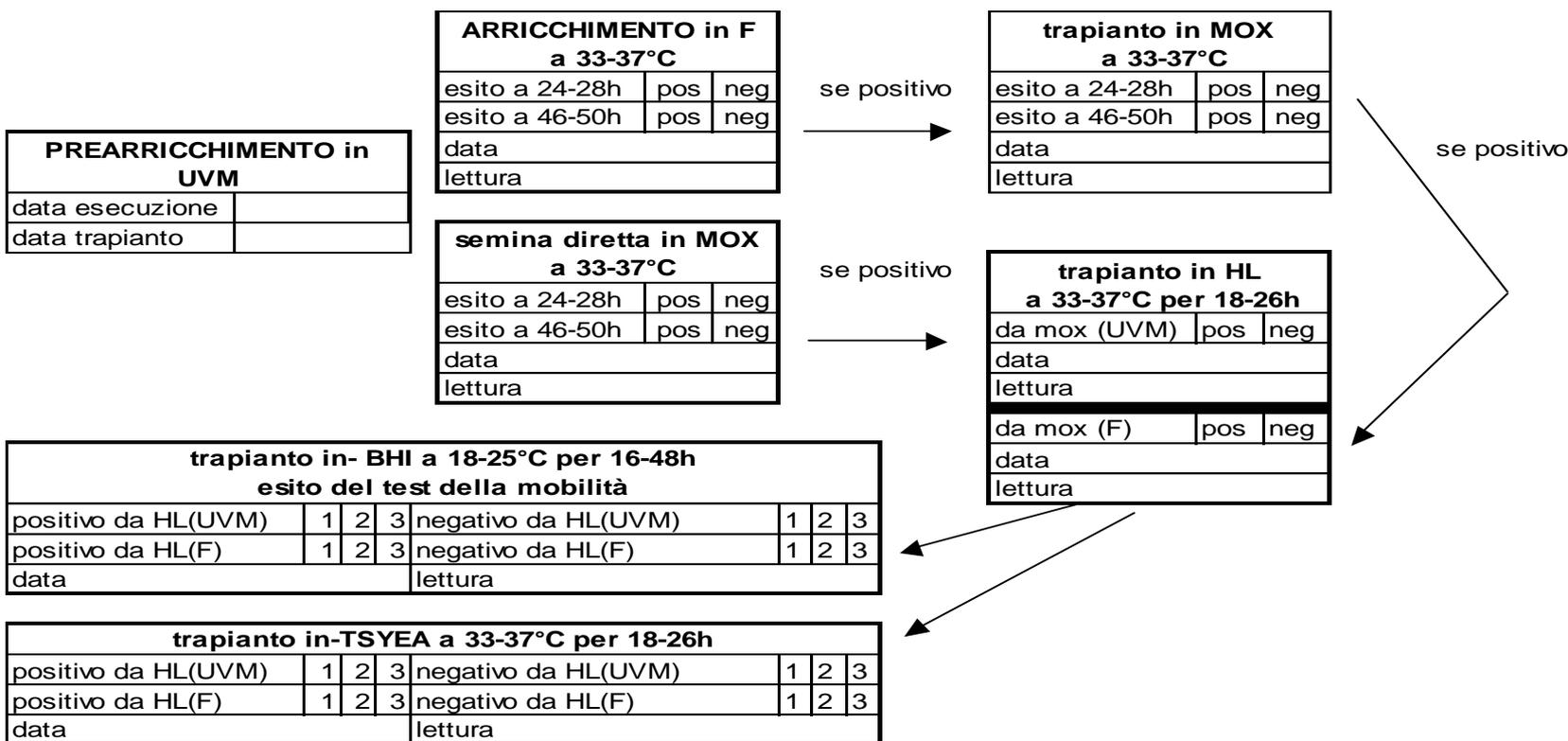
- Prove biochimiche

- Test dell'emolisi





- Prove biochimiche



TEST BIOCHIMICI: API LISTERIA							
DA UVM				DA FRASER			
N.	data/operatore	codice	esito	N.	data/operatore	codice	esito
1			listeria	1			listeria
2			listeria	2			listeria
3			listeria	3			listeria

ESITO: Listeria SP	pos	neg
ESITO: Listeria monocytogenes	pos	neg
lettura	data	

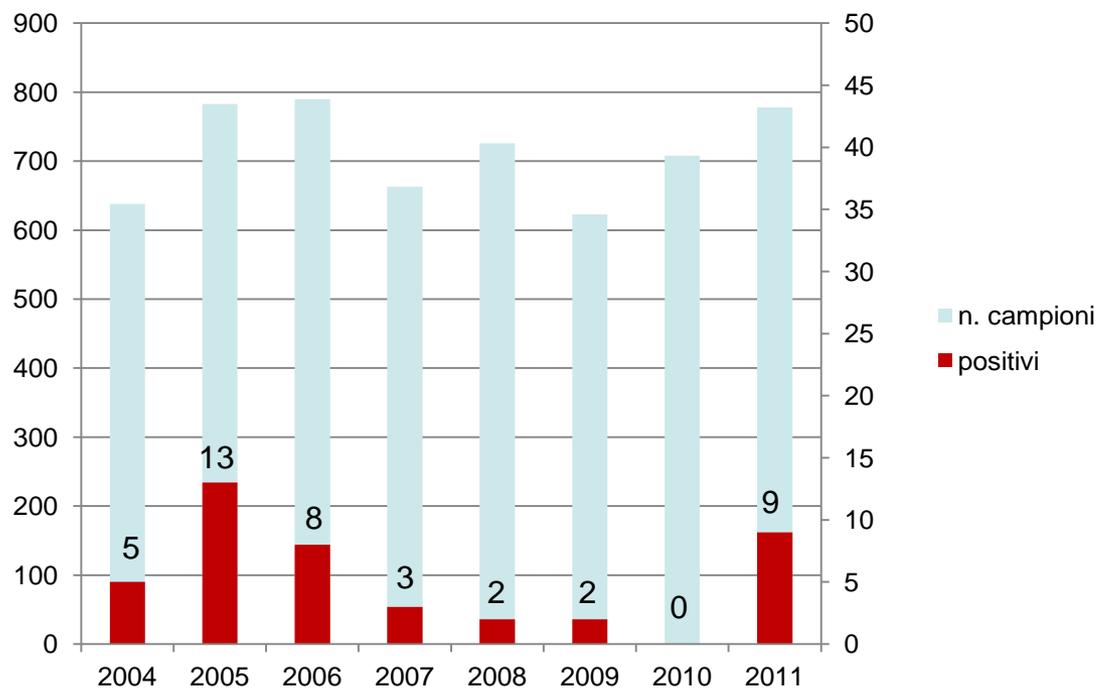
- È possibile fare pool di campioni?



- Sì, adeguando i volumi di pre-arricchimento (5x25 gr)
 - 100 ml/spugna se in pool di spugnette (max 5)
-

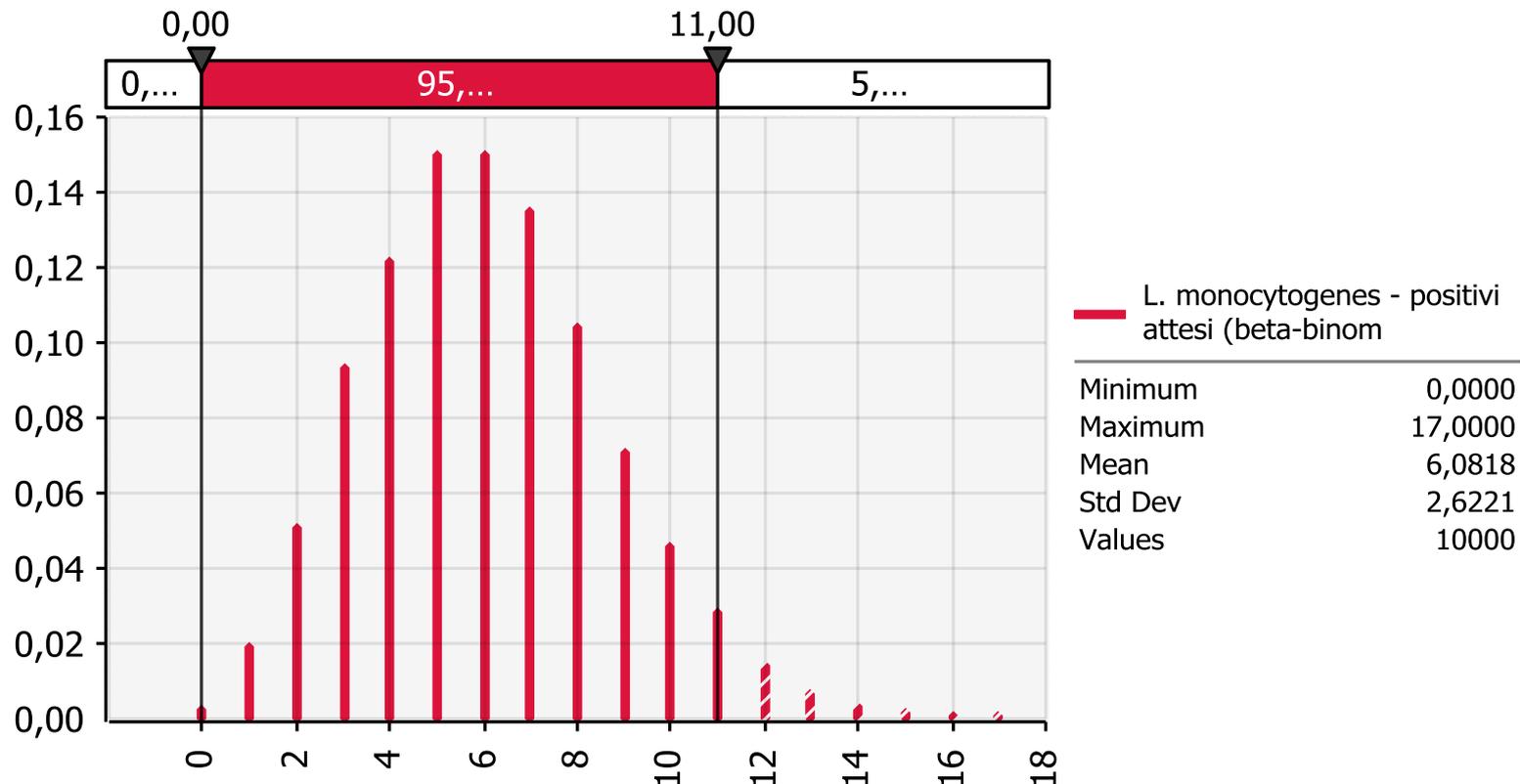
Listeria monocytogenes e prosciutto

- Da un decennio esiste uno specifico piano di controllo per *Listeria monocytogenes* sui prodotti carnei destinati all'export USA
- Dati relativi al prosciutto crudo di Parma (diverse tipologie) per USA



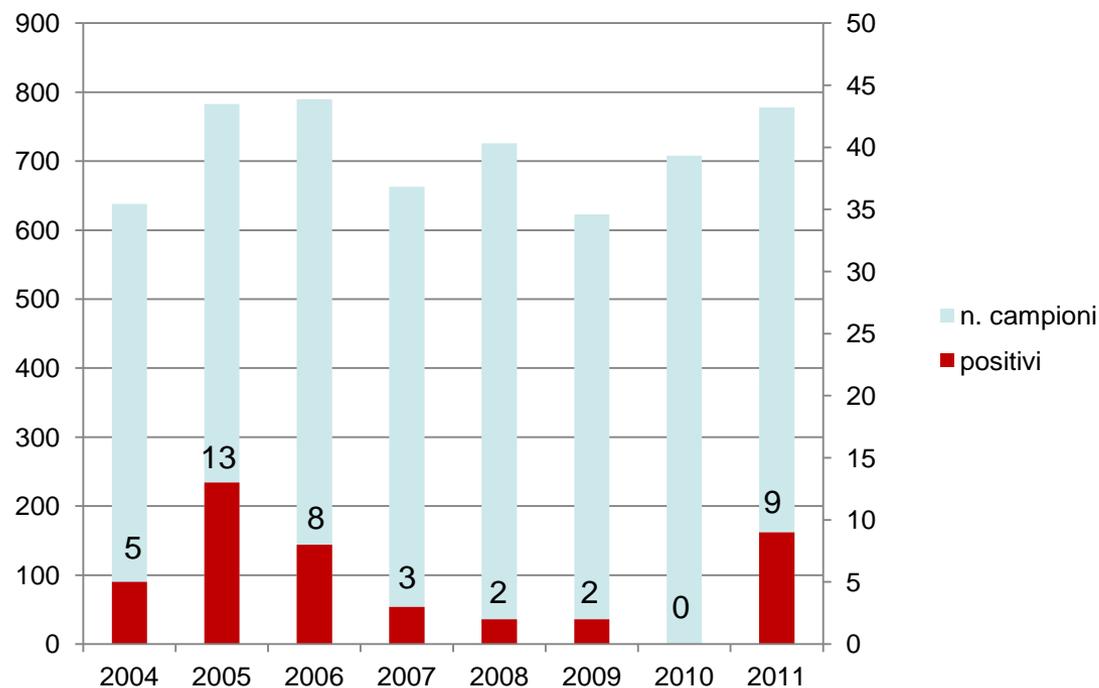
Quanti positivi sono *normali*?

L. monocytogenes - positivi attesi (beta-bin...



Listeria monocytogenes e prosciutto

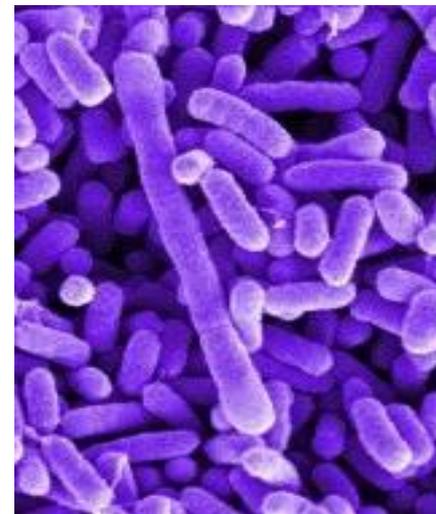
- Dati relativi al prosciutto crudo di Parma (diverse tipologie) per USA



Epidemiologia molecolare

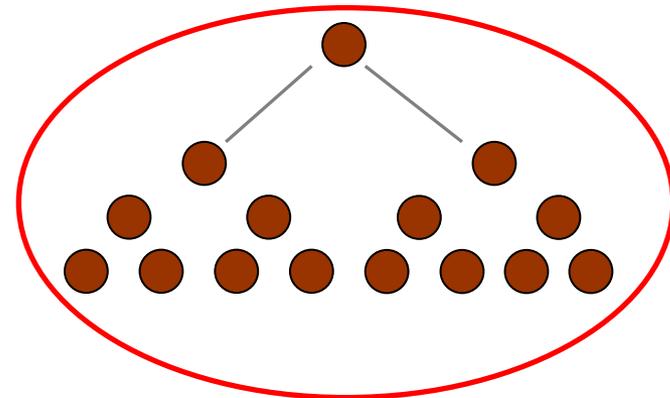
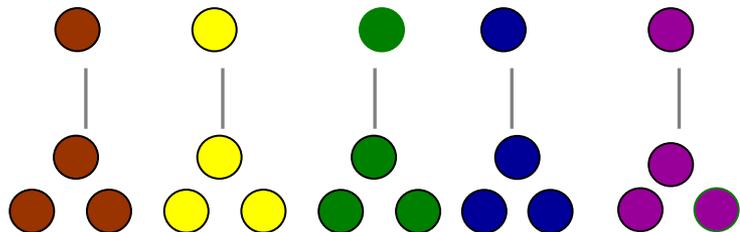
- Identificazione e indagine di focolai

- Tracciare il permanere e il diffondersi dei ceppi batterici

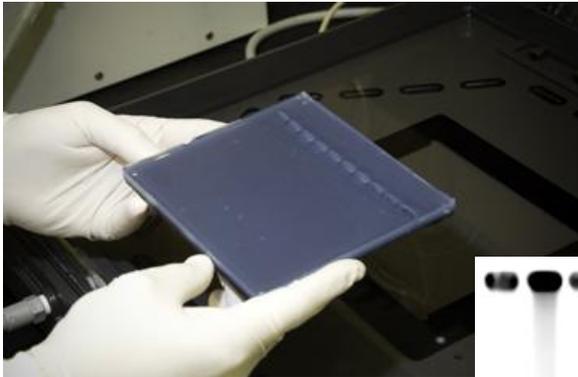


Presupposto

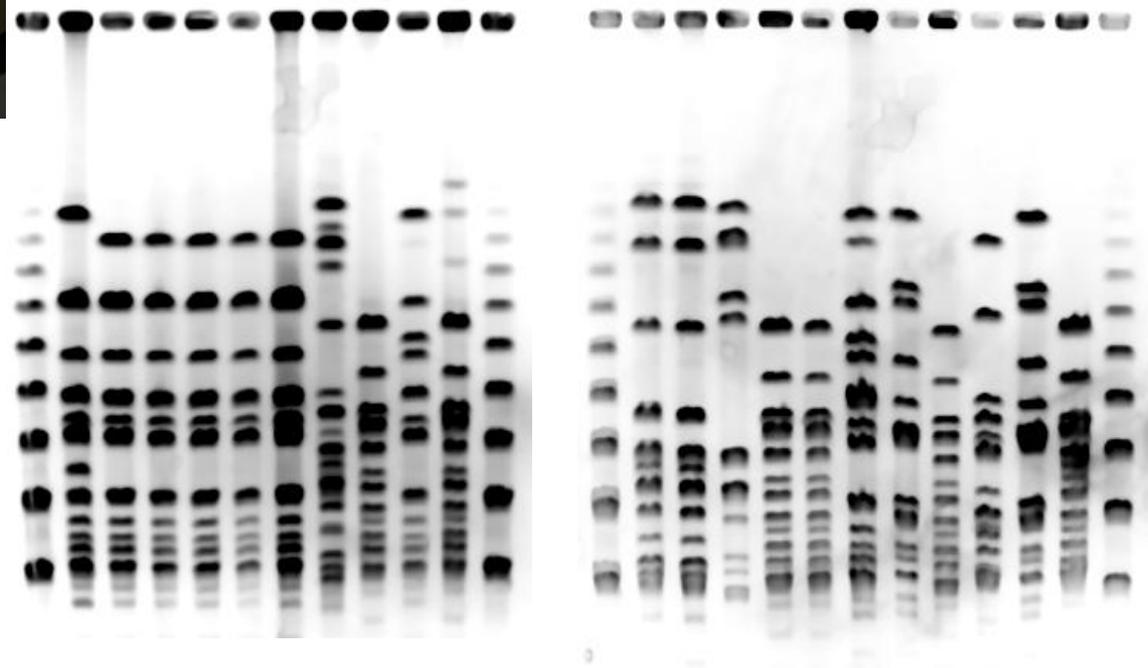
Ceppi epidemici: espansione clonale di un singolo precursore

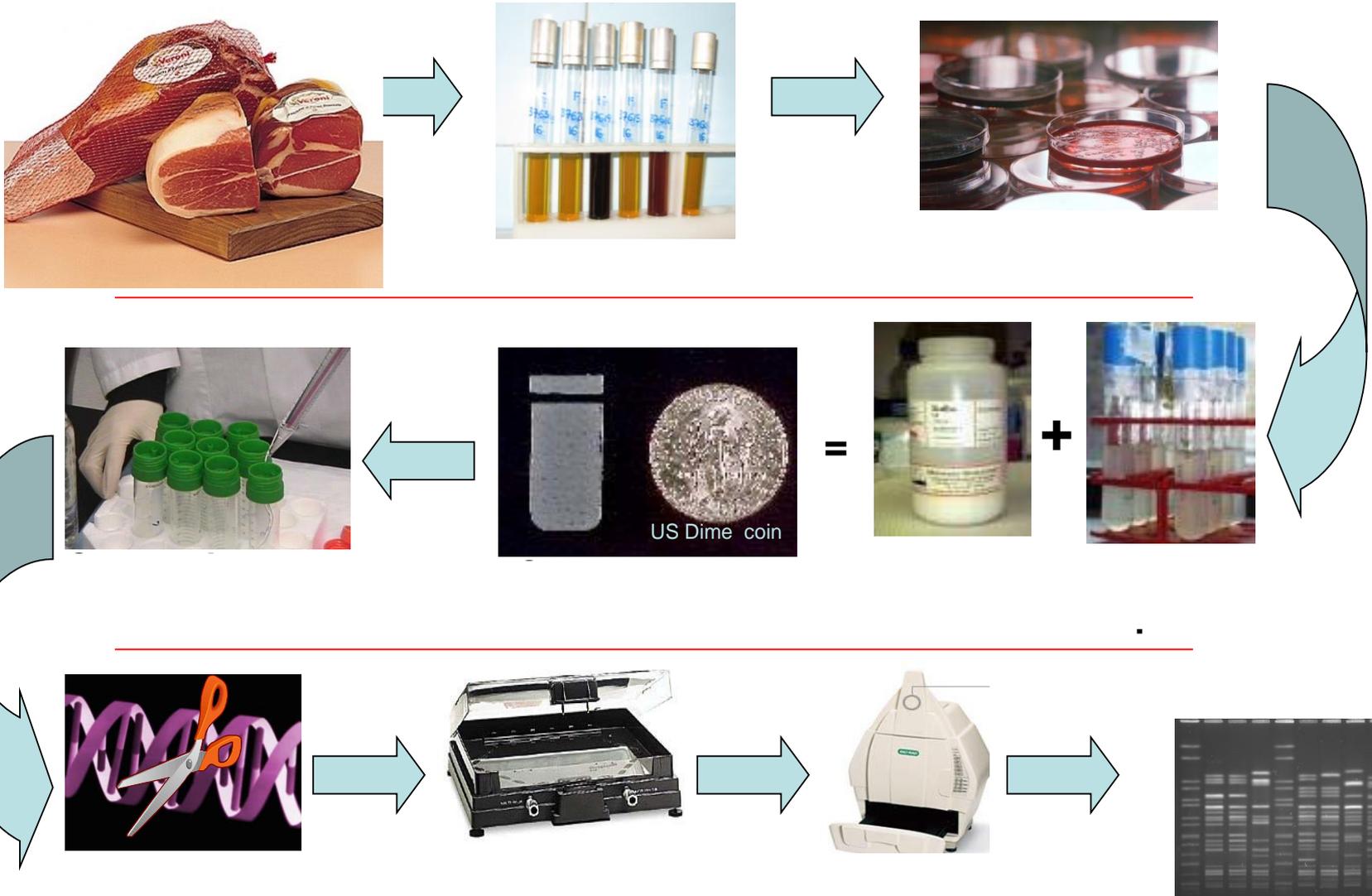


PFGE (Pulsed Field Gel Electrophoresis)

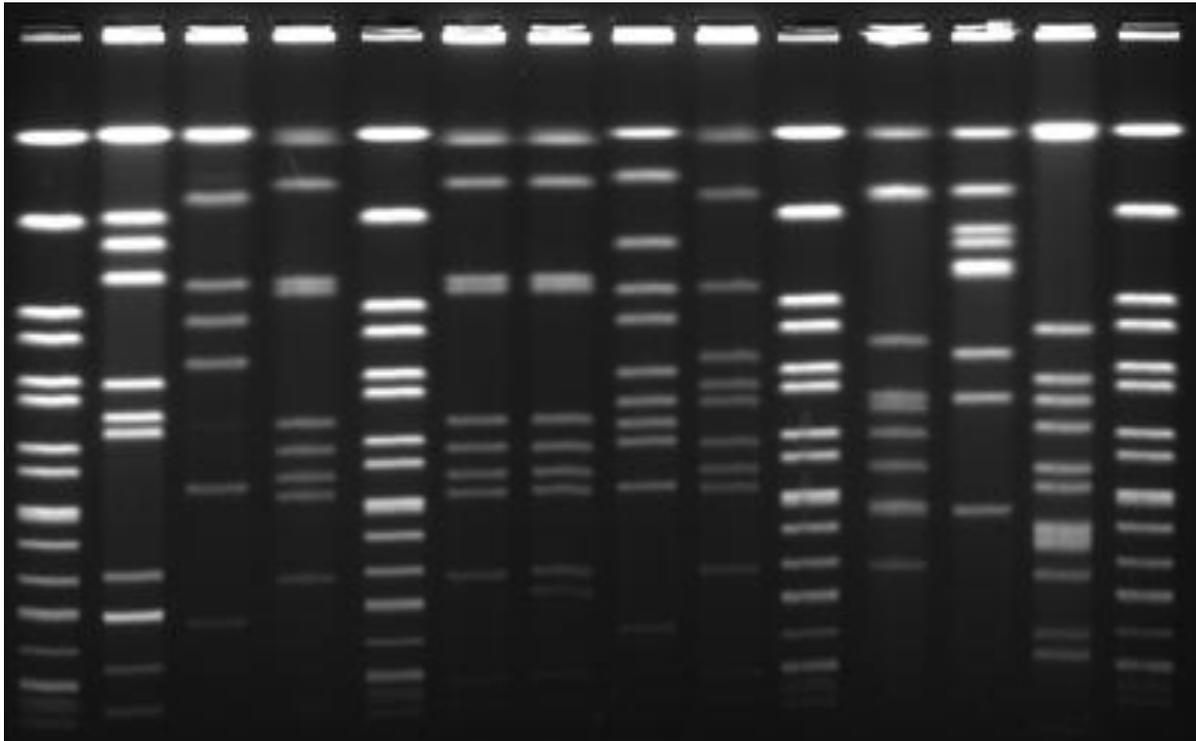


Listeria monocytogenes (Apa I)

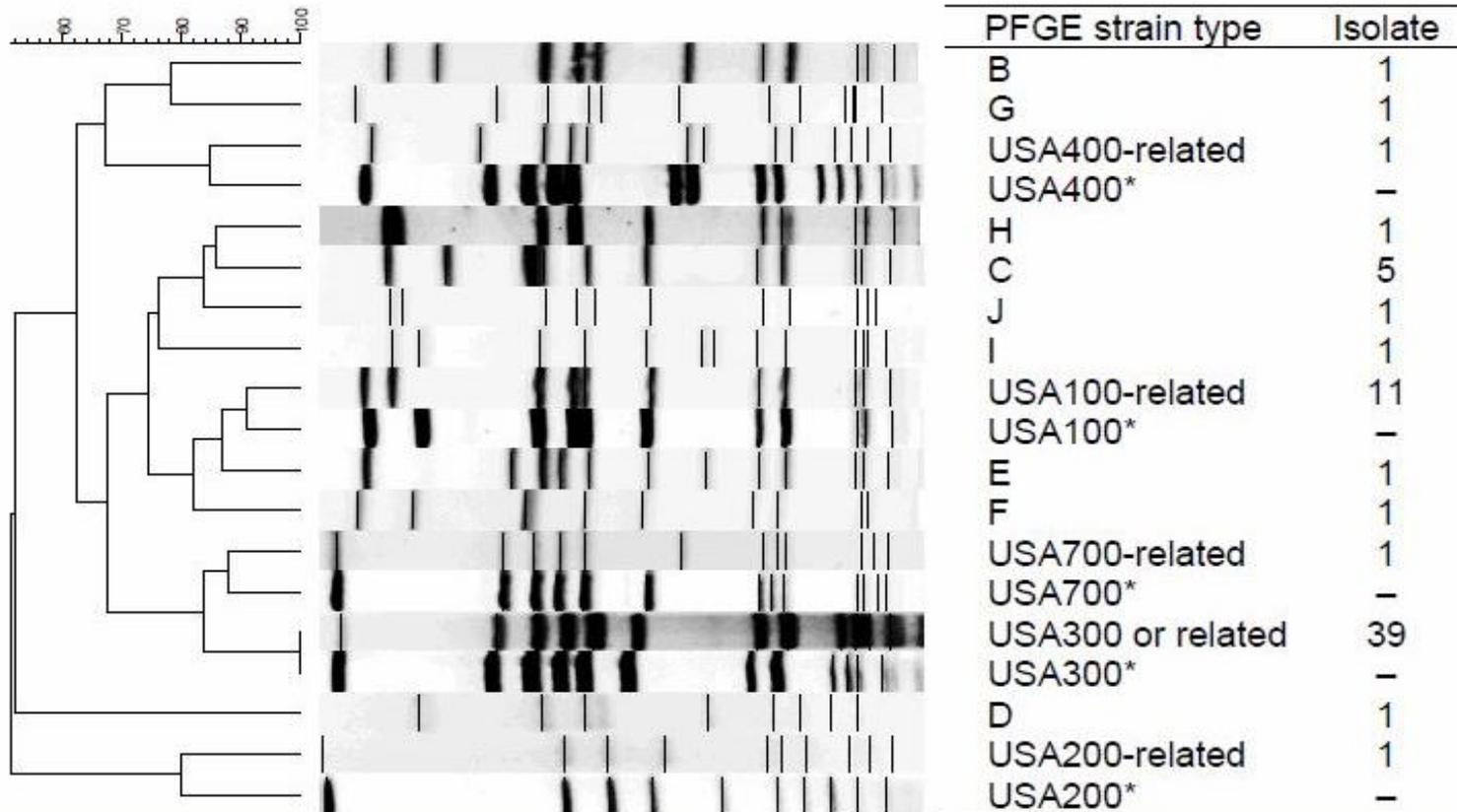




... il risultato!

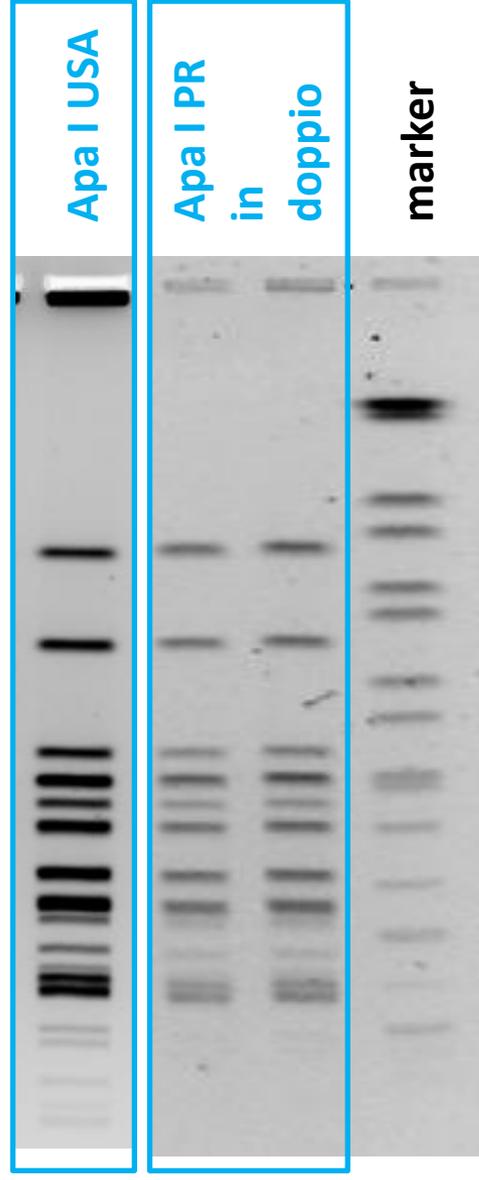
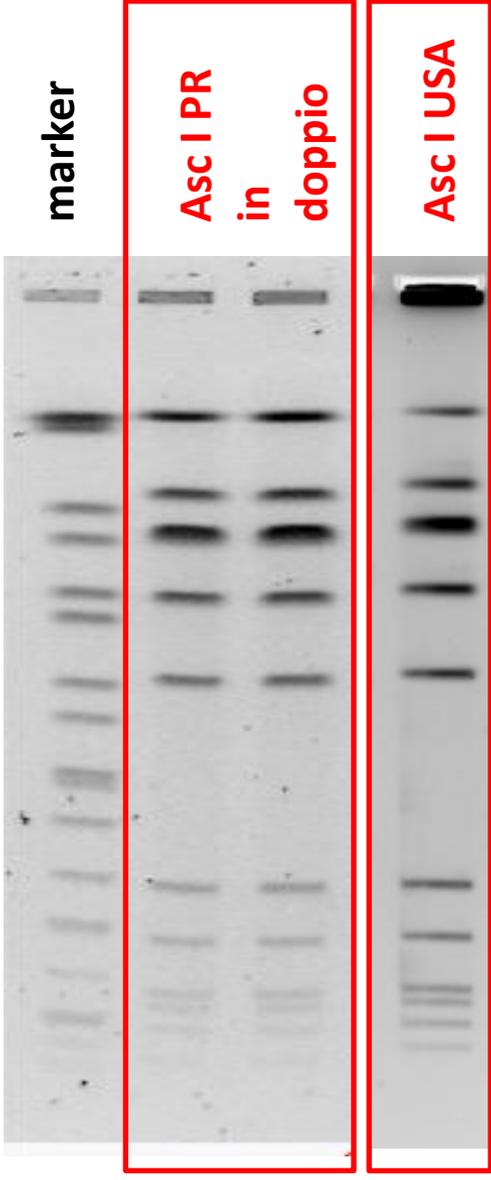


comparison



Listeria monocytogenes ITA-USA

- 2012 associazione tra caso umano US e prosciutti da ITA [stesso genotipo PFGE]
 - CDC – USDA/FSIS -> chiedono informazioni UE e ITA su PFGE
 - Ceppo da disosso corrisponde al ceppo US
 - Indagine approfondita sul disosso ritrova diverse positività per quello specifico genotipo PFGE dopo settimane dalla prima segnalazione
-



Listeria monocytogenes esame superfici

- Piano di controllo per *Listeria monocytogenes* su prosciuttifici Parma attivi nell'export USA – esame delle superfici in lavorazione
 - 24 prelievi da superfici sia a contatto che non, suddivisi in 4 categorie fondamentali:
 - spogliatoi
 - salatura
 - lavaggio-stuccatura
 - spedizione
-

Listeria monocytogenes esame superficiali

- Risultati relativi a 19 prosciuttifici
 - 25/447 campioni totali di superficie positivi (5,6%)
 - 15/19 almeno una positività (79%)
 - 0/19 spogliatoi
 - 14/19 salatura
 - 2/14 spedizione
-

Listeria monocytogenes esame superfici

- dei 25 positivi
 - 20/25 (80%) nel reparto del fresco di salagione, (8 di queste 20 sulla macchina massaggiatrice in lavorazione).
 - 3/25 (12%) nell'area della macchina lava prosciutti (pozzetto)
 - 2/25 (8%) nella zona di spedizione
-

Listeria monocytogenes ITA-USA

- disossato il 30.12.2013 - positività segnalata a febbraio da FSIS
- tracciato US ricevuto a marzo, confrontato con 3 ceppi del 10.3.2014 da (1) scarpe del disosso (2) pavimento del disosso [uguali US] (3) scarico [diverso]

PFGE-A PFGE-Ascl-LIST

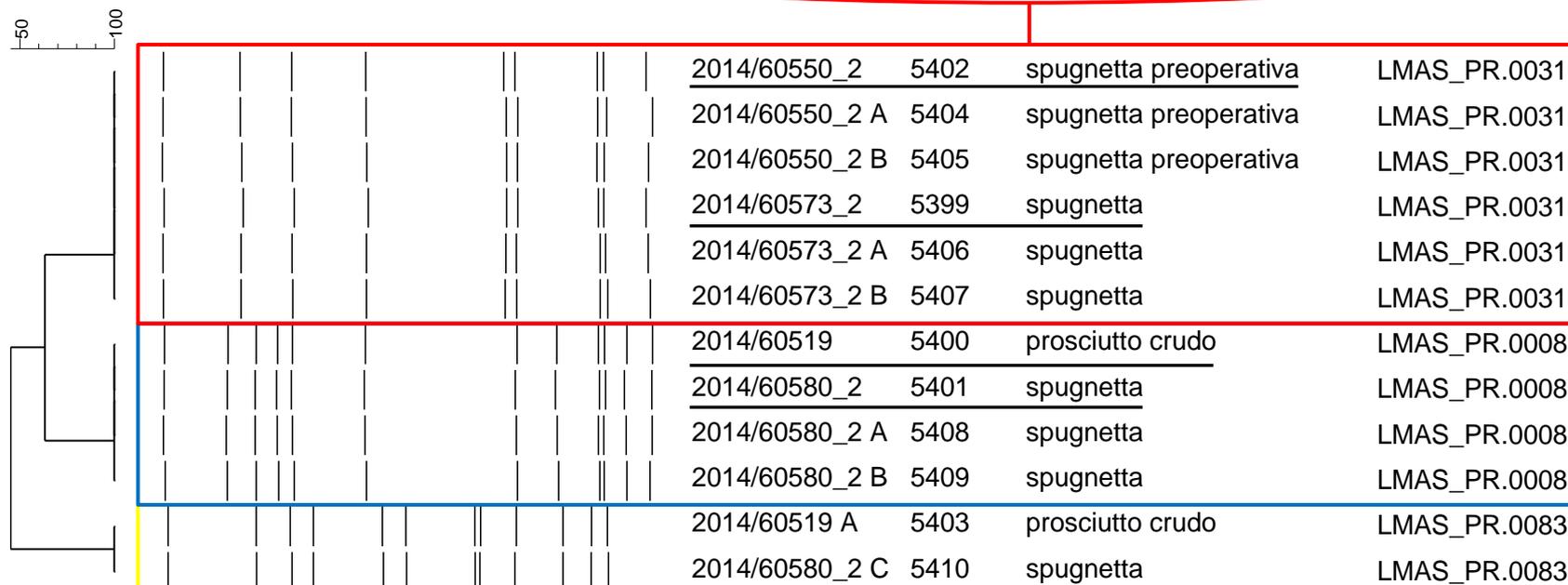
PFGE-A	PFGE-Ascl-LIST	Accession	Size	Source	Reference
		102746	5228	sugna	LMAS_PR.0025
		159044_14	alimenti	spugna	LMAS_PR.0025
		2013/143044_7	5364	Spugna	LMAS_PR.0025
		2014/82197_2	5412	spugna	LMAS_PR.0025
		2014/82197_3	5413	spugna	LMAS_PR.0025
		210073786		prosciutto	LMAS_PR.0025

Listeria monocytogenes ITA-USA

- Marzo 2014 - dal prosciutto 2 diverse LM su 2 colonie testate
- dal pavimento 2 diverse LM [le stesse del prosciutto] su 4 colonie testate
- 1 sola LM su 6 colonie testate in apparecchiature [3 pre-operative e 3 post-operative]

PFGE-Ascl-I PFGE-Ascl-LIST

Isolato in US 11/2013 da stesso disosso



Obblighi per la genotipizzazione

- Esportazione prodotti a base di carne verso USA – piano di sorveglianza ufficiale per *L. monocytogenes* e *Salmonella spp.* 2014

I ceppi di *L. monocytogenes* isolati da prodotti e superfici dovranno essere inviati agli IZS competenti per la genotipizzazione ...

È responsabilità dello stabilimento assicurarsi che il laboratorio che ha eseguito l'autocontrollo effettui la spedizione ... negli stabilimenti che non dovessero inviare i ceppi, l'attività di esportazione verso gli USA verrà sospesa fino al ripristino delle condizioni di affidabilità dell'autocontrollo e comunque non meno di 90 giorni

conclusioni

- Il problema sanitario posto da *Listeria monocytogenes* è ostico
- *Listeria monocytogenes*, si introduce frequentemente
- è molto facile disseminarla
- facilmente diviene persistente
- occorre gestire correttamente i flussi, gli ambienti e le disinfezioni
- essenziale non ricontaminare a fine stagionatura
- lo studio degli episodi di contaminazione è possibile e utile per capire e prevenire ... prima che dagli USA ci segnalino il problema