

Microbiological findings in ready-to-eat and precooked food distributed in public catering halls in Cagliari Province, Italy

Silvana Brignardello,¹ Rosangela Sabiu,¹ Tiziana Tedde,² Enrica Cocco,³ Gabriella Pitzalis,⁴ Clara Meli,⁵ Maria Paola Cogoni¹

¹Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Elmas (CA); ²Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Sassari; ³Servizio Igiene degli Alimenti e della Nutrizione, ASL 8, Cagliari; ⁴Servizio Igiene degli Alimenti e della Nutrizione, ASL 7, Carbonia (CI); ⁵Servizio Igiene degli Alimenti e della Nutrizione, ASL 6, Sanluri (VS), Italy

Abstract

During this research 159 samples of ready-to-eat and precooked food were examined for the detection of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, coagulase-positive staphylococci and *Enterobacteriaceae*, bacterial count. All samples were negative for *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes*; although a low count of coagulase-positive staphylococci (no. 5 samples) and *E. coli* (no. 3) was found. We proceeded with the identification of the isolates on every sample with high, moderate and low-count of *Enterobacteriaceae*, to better understand the microbial ecology. The *Enterobacteriaceae* species most frequently detected were *Pantoea* spp. (29.62%), *Enterobacter cloacae* (20.37%) and *Serratia liquefaciens* (12.96%); other different species of *Enterobacteriaceae* were detected with a <10% presence. Since there are no legal regulations indicating tolerance or limit values or this kind of microorganisms related to the samples, it would be appropriate, in the presence of high count of *Enterobacteriaceae* or by type of ready-to-eat and precooked food, to proceed with the identification of every microorganism.

Introduzione

Nel periodo aprile 2012-aprile 2013 sono stati analizzati presso il Laboratorio di Microbiologia degli alimenti del Dipartimento di Cagliari dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna (IZS Sardegna)

159 campioni di piatti pronti e precotti, prelevati dal Servizio Igiene degli Alimenti e della Nutrizione (SIAN). I campioni sono stati suddivisi nelle seguenti tipologie alimentari: i) preparazioni gastronomiche precotte, ii) preparazioni gastronomiche cotte e spuntini, iii) insalate di mare, iv) dolci e dessert, v) insalate e ortaggi, vi) salse e sughi, vii) frutta e succhi, come riportato in un precedente lavoro (Nyenje *et al.*, 2012). In tutti i campioni sono stati determinati i seguenti parametri microbiologici: *Listeria monocytogenes* (n. 118 campioni), *Salmonella* spp. (n. 131), *Enterobacteriaceae* (n. 130), *Escherichia coli* (n. 133), stafilococchi coagulasi positivi (n. 124), microrganismi mesofili aerobi (n. 10).

Lo scopo di questo lavoro è stato quello di acquisire informazioni per valutare la qualità microbiologica in campioni di piatti pronti e precotti, provenienti dalla ristorazione pubblica e collettiva distribuiti nel territorio della provincia di Cagliari e di approfondire lo studio di alcune specie batteriche presenti in elevata o moderata carica.

Materiali e Metodi

La ricerca di *Listeria monocytogenes* è stata effettuata secondo la Norma UNI EN ISO 11290-1:2005 (UNI, 2005); la ricerca di *Salmonella* spp. è stata effettuata secondo la Norma ISO 6579:2008 (ISO, 2008); la ricerca di *Enterobacteriaceae* è stata effettuata secondo la Norma ISO 21528-2:2004 (ISO, 2004); la ricerca di *E. coli* è stata effettuata secondo la Norma 16649-2:2001 (ISO, 2001); la ricerca di stafilococchi coagulasi positivi è stata effettuata secondo la norma UNI EN ISO 6888-2:2004 (UNI, 2004); la ricerca di mesofili aerobi è stata effettuata secondo la Norma ISO 4833:2003 (ISO, 2003). Per l'identificazione di specie sono stati utilizzati tests biochimici e gallerie miniaturizzate. In particolare, per l'identificazione delle *Enterobacteriaceae* è stata effettuata la colorazione di Gram e il test dell'ossidasi. Per l'identificazione di specie delle *Enterobacteriaceae* sono state utilizzate le gallerie API 20E (bioMérieux, Marcy l'Etoile, Francia). Per l'analisi statistica i valori UFC/g sono stati convertiti in log₁₀; i valori numerici delle *Enterobacteriaceae* ottenuti nelle tipologie alimentari sottoposte ad analisi, sono stati comparati mediante analisi della varianza a una via (one-way ANOVA) seguito da un test di comparazione multipla di Tukey. L'analisi statistica è stata eseguita con SPSS versione 15.0 e sono stati considerati significativi i valori con P<0,05.

Correspondence: Maria Paola Cogoni, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Via dell'acquedotto romano, 09132 Elmas, CA, Italy. Tel. +39.070.21914213 - Fax: +39.070.2135121. E-mail: paola.cogoni@izs-sardegna.it

Key words: Ready-to-eat, *Enterobacteriaceae*, Microbiological quality.

Conflict of interests: the authors declare no potential conflict of interests.

Acknowledgments: the authors thank Dr. Cristian Pilo, research fellow at the Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna (Sardinian institute to help prevent disease in domestic herds of animals) Cagliari, Italy, for his helpful collaboration.

Received for publication: 21 May 2013.

Revision received: 13 January 2014.

Accepted for publication: 13 January 2014.

This work is licensed under a Creative Commons Attribution 3.0 License (by-nc 3.0).

©Copyright S. Brignardello *et al.*, 2014

Licensee PAGEPress, Italy

Italian Journal of Food Safety 2014; 3:1733

doi:10.4081/ijfs.2014.1733

Risultati

Tutti i campioni sono risultati negativi per *Salmonella* spp. (n. 131) e per *Listeria monocytogenes* (n. 118). In 5/124 e 3/133 campioni analizzati rispettivamente per stafilococchi coagulasi positivi e *E. coli* è stata riscontrata una carica accettabile secondo i parametri stabiliti dal Reg. (CE) n. 2073 del 2005 (Commissione Europea, 2005) e successive modifiche. Per meglio comprendere l'ecologia microbica nei campioni con una carica di *Enterobacteriaceae* >10 UFC/g (n. 54 campioni), si è proceduto alla identificazione degli isolati. *Enterobacter* spp. (31,5%) è risultato il genere prevalente; le specie identificate sono risultate essere *Enterobacter cloacae* (20,37%), *Enterobacter agglomerans* (5,55%), altri (5,55%) mentre, *Pantoea* spp. e *Serratia* spp. rappresentano rispettivamente il 29,6% e il 16,6% degli isolati (Tabella 1). Un valore elevato di *Klebsiella pneumoniae* (2,4x10⁶ ufc/g) è stato accertato in un campione di insalata di mare. L'analisi della varianza ha evidenziato una significatività statistica tra i valori delle *Enterobacteriaceae* (log₁₀ UFC/g); il test di comparazione multipla (Tukey) ha dettagliato le tipologie di alimenti differenti tra loro (P<0,05) (Tabella 2).

Discussione

Dai risultati ottenuti in relazione alla qualità microbiologica si riscontra una assenza di microrganismi patogeni quali *Salmonella* spp. e *Listeria monocytogenes* mentre, per quanto riguarda le *Enterobacteriaceae* le cariche più elevate sono state riscontrate nelle insalate di mare ($3,08 \pm 1,89 \log_{10}$ UFC/g) e nelle insalate fresche e ortaggi ($3,05 \pm 1,08 \log_{10}$ UFC/g). Questi valori sono risultati significativamente più alti rispetto alle altre tipologie alimentari ad eccezione delle preparazioni gastronomiche precotte che presentano un valore di $2,18 \pm 2,35 \log_{10}$ UFC/g. Il dato non risulta significativamente differente ($P > 0,05$). Le restanti tipologie alimentari hanno presentato medie dei valori compresi tra 1,00 e $1,53 \log_{10}$ UFC/g; queste categorie risultano non significativamente differenti fra loro e con le PPC.

Tra le *Enterobacteriaceae* isolate, il genere prevalente è rappresentato da *Pantoea* spp., riscontrato in diverse tipologie di alimenti di cui circa il 50% nelle insalate di verdure. Recenti studi dimostrano che *Pantoea* spp. è uno fra gli endofiti naturalmente presente

nelle piante per cui, dai dati raccolti, si può ritenere che tale microrganismo appartenga alla flora batterica naturale presente nelle verdure (Houa *et al.*, 2013). La categoria insalate e ortaggi rappresenta la tipologia di prodotti alimentari maggiormente contaminati da *Enterobacter cloacae*. Tale dato è sovrapponibile ai risultati ottenuti da Falomir *et al.* (2010). Come riportato in letteratura (Jay *et al.*, 2011), tale microrganismo è inserito tra gli otto batteri Gram-negativi che possiedono almeno un fattore di virulenza spesso associato a patogeni alimentari. I valori delle *Enterobacteriaceae* nei piatti precotti presentano un range elevato (Tabella 2), ma trattandosi di alimenti per i quali il trattamento termico riduce il valore della carica batterica, tale categoria di alimento non costituisce un rischio per il consumatore. Non è da sottovalutare tuttavia, la possibile presenza di alcune enterotossine termostabili prodotte da alcuni microrganismi come *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae* (Jay *et al.*, 2011) per i quali l'azione del calore risulta inefficace. Il piatto pronto insalata di mare è costituito da un prodotto base che comprende diverse specie ittiche cotte, verdure crude, ortaggi e spezie. Il prodotto base è presumibilmente privo

di elevate cariche batteriche poiché sottoposto a cottura ma, l'aggiunta di verdure crude e spezie, può rappresentare una possibile fonte di contaminazione del prodotto finito. Le *Enterobacteriaceae* rappresentano un parametro inserito tra i criteri di igiene di processo [Reg. (CE) n. 2073 del 2005 e successive modifiche; Commissione Europea, 2005] con valori di riferimento associati. Nel caso in cui si effettui la ricerca di *Enterobacteriaceae* su matrici non inserite nel corpus legislativo, l'interpretazione del dato analitico è difficoltosa e la mancanza di valori di riferimento implica un confronto quasi esclusivo con la bibliografia scientifica.

Conclusioni

Sarebbe opportuno, in presenza di una carica medio alta e in assenza di valori di riferimento, procedere all'identificazione per la valutazione del rischio legato alla specie. A tutt'oggi, sulla base del risultato, l'autorità competente effettua le opportune verifiche sul processo di produzione e sulle misure

Tabella 1. *Enterobacteriaceae*: specie isolate da piatti pronti e precotti.

Specie	% sul totale delle colonie identificate
<i>Pantoea</i> spp.	29,62
<i>Enterobacter cloacae</i>	20,37
<i>Serratia liquefaciens</i>	12,96
<i>Klebsiella oxytoca</i>	9,25
<i>Enterobacter agglomerans</i>	5,55
<i>Hafnia alvei</i>	5,55
<i>Enterobacter</i> spp. (<i>aerogenes</i> , <i>amnigenus</i> , <i>sakazakii</i>)	5,55
<i>Routella</i> spp.	5,55
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	3,70
<i>Serratia</i> spp. (<i>rubidaea</i> , <i>funticola</i>)	3,70
<i>Citrobacter</i> spp.	3,70
Altre specie	11,11

Tabella 2. *Enterobacteriaceae* in piatti pronti e precotti: statistiche descrittive e comparazione multipla (test Tukey).

Tipologia di alimento	Range <i>Enterobacteriaceae</i> ($\log_{10}$ UFC/g)	Media $\pm$ DS <i>Enterobacteriaceae</i> ($\log_{10}$ UFC/g)	P						
			PPC	PC	IM	D	IO	S	F
PPC	<1,0-5,7	$2,18 \pm 2,35$	-	0,882	0,814	0,935	0,844	0,964	0,704
PC	<1,0-5,6	$1,41 \pm 0,92$	0,882	-	0,000	1,000	0,000	1,000	0,978
IM	<1,0-6,6	$3,08 \pm 1,89$	0,814	0,000	-	0,003	1,000	0,005	0,002
D	<1,0-3,7	$1,44 \pm 0,83$	0,935	1,000	0,003	-	0,006	1,000	0,986
IO	<1,0-5,0	$3,05 \pm 1,08$	0,844	0,000	1,000	0,006	-	0,010	0,004
S	<1,0-4,5	$1,53 \pm 1,13$	0,964	1,000	0,005	1,000	0,010	-	0,961
F	<1,0-1,0	$1,00 \pm 0,00$	0,704	0,978	0,002	0,986	0,004	0,961	-

DS, deviazione standard; PPC, preparazioni gastronomiche precotte; PC, preparazioni gastronomiche cotte e spuntini; IM, insalata di mare; D, dolci e dessert; IO, insalate e ortaggi; S, salse e sughi; F, frutta e succhi.

messe in atto dall'operatore del settore alimentare. È auspicabile che, a livello regionale, si elabori un protocollo tecnico che preveda dei valori guida in relazione alla matrice e al risultato analitico, al fine di una migliore interpretazione e gestione del dato da parte degli enti interessati.

Bibliografia

- Commissione Europea, 2005. Regolamento della Commissione del 15 novembre 2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari, 2073/2005/CE. In: Rivista Ufficiale, L 338/1, 22/12/2005.
- Falimir MP, Gozalbo D, Rico H, 2010. Coliform bacteria in fresh vegetables: from cultivated lands to consumers. Available from: <http://www.formatex.org/microbiology2/chapters2.html>
- Houa Z, Finka RC, Radtkea C, Sadowsky MJ, Diez-Gonzalez F, 2013. Incidence of naturally internalized bacteria in lettuce leaves. *Int J Food Microbiol* 162:260-5.
- ISO, 2001. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive *Escherichia coli*. Part 2: colony-count technique at 44 degrees C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide. Norma ISO 16649-2:2001. Organizzazione Internazionale per la Standardizzazione ed., Ginevra, Svizzera.
- ISO, 2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the enumeration of microorganisms. Colony-count technique at 30 degrees C. Norma ISO 4833:2003. Organizzazione Internazionale per la Standardizzazione ed., Ginevra, Svizzera.
- ISO, 2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal methods for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae. Part 2: colony-count method. Norma ISO 21528-2:2004. Organizzazione Internazionale per la Standardizzazione ed., Ginevra, Svizzera.
- ISO, 2008. Microbiology of food and animal feeding stuffs. Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp. Norma ISO 6579:2008. Organizzazione Internazionale per la Standardizzazione ed., Ginevra, Svizzera.
- Jay JM, Loessner MJ, Golden DA, 2005. Modern food microbiology. Springer, Amsterdam, The Netherlands.
- Nyenje ME, Odjadjare CE, Tanih NF, Green E, Ndip RN, 2012. Foodborne pathogens recovered from ready-to-eat foods from roadside cafeterias and retail outlets in Alice, Eastern Cape Province, South Africa: public health implications. *Int J Environ Res* 9:2608-19.
- UNI, 2004. Norma UNI EN ISO 6888-2:2004. Microbiologia di alimenti e mangimi per animali. Metodo orizzontale per la conta di stafilococchi coagulasi-positivi (*Staphylococcus aureus* e altre specie). Tecnica che utilizza il terreno agar al plasma di coniglio e al fibrinogeno. Ente Italiano di Normazione ed., Milano, Italy.
- UNI, 2005. Norma UNI EN ISO 11290-1:2005. Microbiologia di alimenti e mangimi per animali - Metodo orizzontale per la ricerca e la conta di *Listeria monocytogenes*. Parte 1: metodo per la ricerca. Ente Italiano di Normazione ed., Milano, Italy.