



Con il Patrocinio di



MILANO 2015  
NUTRIRE IL PIANETA  
ENERGIA PER LA VITA

# RICERCA, SINERGIE E PROSPETTIVE NEL CONTROLLO DEGLI ALIMENTI

Sorrento, 28 - 30 ottobre 2015

Abstract book



XXV CONGRESSO NAZIONALE DELL'ASSOCIAZIONE ITALIANA VETERINARI IGIENISTI



**AIVI**  
Associazione  
Italiana  
Veterinari  
Igienisti

# RICERCA, SINERGIE E PROSPETTIVE NEL CONTROLLO DEGLI ALIMENTI

## **Presidente**

Enrico Pietro Luigi De Santis, *Università di Sassari, Italy*

## **Vicepresidente**

Luca Cianti, *Servizio Veterinario A.S.L. di Firenze, Italy*

## **Segretario**

Christian Scarano, *Università di Sassari, Italy*

## **Comitato scientifico**

Aniello Anastasio, *Università degli Studi di Napoli Federico II, Italy*

Teresa Bossù, *Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana, Italy*

Enrico Pietro Luigi De Santis, *Università di Sassari, Italy*

Gaetano Celano, *Università di Bari, Italy*

Beniamino Terzo Cenci Goga, *Università di Perugia, Italy*

Daniela Gianfaldoni, *Università di Pisa, Italy*

Alessandro Giuffrida, *Università di Messina, Italy*

Adriana Ianieri, *Università di Parma, Italy*

Anna Rita Loschi, *Università di Camerino, Italy*

Roberto Macrì, *Servizio Veterinario Regione Calabria, Italy*

Domenico Mollica, *Servizio Veterinario A.S.L. Sorrento, Italy*

Enrico Novelli, *Università di Padova, Italy*

Giuseppe Palma, *Assoittica, Italy*

Marilia Tantillo, *Università di Bari, Italy*

Sebastiano Virgilio, *Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Italy*

Antonio Panebianco, *Università di Messina, Italy*

Maria Luisa Cortesi, *Università degli Studi di Napoli Federico II, Italy*

Roberto Rosmini, *Università di Bologna, Italy*

Tiziana Civera, *Università di Torino, Italy*

## **Revisori dei conti**

Alessandra Guidi, *Università di Pisa, Italy*

Sandro Fichera, *ASUR Marche, Italy*

Raffaele Marrone, *Università di Napoli, Italy*

## **Collegio dei probiviri**

Stefano Bilei, *Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana, Italy*

Maria Teresa Bottero, *Università di Torino, Italy*

Giovanni Munaò, *Servizio Veterinario A.S.L. Firenze, Italy*

## **Delegati regionali**

*Abruzzo:* Alberto Vergara

*Calabria:* Raffaele Grillone, Roberto Macrì

*Campania:* Maria Luisa Cortesi, Domenico Mollica

*Lombardia:* Claudia Balzaretti, Lisa Vallone

*Piemonte:* Claudio Biglia, Tiziana Civera, Lucia Decastelli

*Emilia Romagna:* Franco Brindani, Gaetano Liuzzo, Antonio Poeta, Roberto Rosmini

*Marche:* Loredana Di Giacomo, Annarita Loschi

*Toscana:* Luca Cianti, Daniela Gianfaldoni, Giovanni Munaò

*Umbria:* Beniamino Terzo Genci Goga

*Molise:* Giampaolo Colavita

*Sardegna:* Enrico Pietro Luigi De Santis, Pier Luigi Piras, Sebastiano Virgilio

*Lazio:* Francesco Leone, Giuseppe Palma

*Puglia:* Leonardo Carosielli, Gaetano Celano

*Sicilia:* Alessandro Giuffrida, Antonio Giuliano, Giuseppe Barbera

## COMITATO ORGANIZZATORE

Maria Luisa Cortesi, *Università degli Studi di Napoli Federico II, Italy*

Aniello Anastasio, *Università degli Studi di Napoli Federico II, Italy*

Loredana Baldi, *Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Portici, Italy*

Rosanna Bruno, *Azienda Sanitaria Locale Napoli 3 Sud, Italy*

Francesco Saverio Castellano, *Azienda Sanitaria Locale Napoli 3 Sud, Italy*

Federico Capuano, *Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Portici, Italy*

Catello Coppola, *Azienda Sanitaria Locale Napoli 3 Sud, Italy*

Paola Damiani, *Azienda Sanitaria Locale Napoli 3 Sud, Italy*

Esterina De Carlo, *Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Portici, Italy*

Domenico Mollica, *Azienda Sanitaria Locale Napoli 3 Sud, Italy*

Nicoletta Murru, *Università degli Studi di Napoli Federico II, Italy*

Raffaelina Mercogliano, *Università degli Studi di Napoli Federico II, Italy*

Tiziana Pepe, *Università degli Studi di Napoli Federico II, Italy*

Vincenzo Rapesta, *Azienda Sanitaria Locale Napoli 3 Sud, Italy*

Adriano Santoro, *Università degli Studi di Napoli Federico II, Italy*

# RICERCA, SINERGIE E PROSPETTIVE NEL CONTROLLO DEGLI ALIMENTI

Sorrento, 28 - 30 ottobre 2015

## Mercoledì 28 ottobre 2015

- 10.30 Apertura segreteria  
12.00 Assaggio di territorio  
12.30 Inizio lavori

### 12.30 – 16.00 Comunicazioni scientifiche (Filiera latte)

**Moderatori: Nicoletta Murru, Ester De Carlo**

- C01** Livelli di contaminazione da diossine e policlorobifenili nel latte ovino proveniente dal SIN di Porto Torres  
*Francesco Sgarangella, Maria Caterina Suelzu, Giuseppe Bitti, Patrizia Piras, Gianuario Fiori, Maurizio Cossu, Giannina Chessa, Pietro Desini*
- C02** Valutazione di differenti metodi di estrazione e amplificazione del DNA per la ricerca di *Coxiella burnetii* nel latte bovino  
*Yolande T.R. Proroga, Anna Giannina Perugini, Andrea Mancusi, Achille Guarino, Federico Capuano*
- C03** Rilievo di *Bacillus cereus* enterotossici in formaggi prodotti in Campania  
*Yolande T.R. Proroga, Angela Giordano, Marcella Palomba, Assunta Esposito, Achille Guarino, Federico Capuano*
- C04** Evoluzione del profilo microbico di ricotte salate intere nel corso della *shelf-life*  
*Daniele Casti, Christian Scarano, Carlo Pala, Francesca Cossu, Sonia Lamon, Vincenzo Spanu, Michela Ibba, Anna Maria Mocci, Francesco Tedde, Gavino Nieddu, Carlo Spanu, Enrico Pietro Luigi De Santis*
- C05** Valutazione della *shelf-life* in ricotta fresca ovina confezionata in atmosfera protettiva  
*Carlo Pala, Christian Scarano, Massimiliano Venusti, Daniela Sardo, Daniele Casti, Francesca Cossu, Sonia Lamon, Vincenzo Spanu, Michela Ibba, Michela Marras, Antonio Paba, Carlo Spanu, Enrico Pietro Luigi De Santis*
- C06** Abstract non presentato

- C07** Sopravvivenza di *Listeria monocytogenes* in yogurt artigianali e adattamento in ambiente acido  
*Erica Tironi, Cristian Bernardi, Stella Simone*
- C08** Sviluppo di un metodo per la valutazione del potenziale alterante di ceppi di *Pseudomonas* nel settore lattiero-caseario  
*Francesco Chiesa, Chiara Costantini, Sara Lomonaco, Tiziana Civera*
- C09** Produzione di pigmento blu e formazione di biofilm in *Pseudomonas fluorescens*  
*Chiara Rossi, Clemencia Chaves López, Annalisa Serio, Elisa Goffredo, Beniamino Terzo Cenci Goga, Antonello Paparella*
- C10** Indagine preliminare per la valutazione dell'idoneità igienico-sanitaria del processo produttivo di caseificazione nelle malghe trentine  
*Rosaria Lucchini, Sabrina Paternolli, Franco Fasoli, Roberto Gerola, Giovanni Farina*

### 16.00 – 18.30 Tavola Rotonda

#### La ristorazione tra tradizione ed innovazione 1ª parte

**Moderatori: Daniela Gianfaldoni, Gennaro Del Franco, Achille Guarino**

Le autorità competenti nella ristorazione: dalla legge 283/62 ai regolamenti comunitari  
*Domenico Mollica*

Articolazione e compiti dei NAS dei carabinieri  
*Gennaro Tiano*

Organizzazione e validità dei controlli microbiologici nel settore della ristorazione  
*Yolande T.R. Proroga*

Tavola Rotonda

- 18.30 Sala Consiliare Comune di Sorrento  
Saluto delle Autorità  
Concerto di benvenuto con aperitivo



**Giovedì 29 ottobre 2015**

8.30 Apertura segreteria

**9.00 – 13.00 Tavola Rotonda (con traduzione simultanea)  
Present status and future developments  
in food control**

**Moderatori: Maria Luisa Cortesi, Enrico Pietro Luigi De Santis**

Research to improve food safety and concerns  
with emerging pathogens in the U.S.  
*Pina Fratamico*

25 years of *Clostridium botulinum* research in Helsinki  
– and more to come!  
*Miia Lindstrom*

11.00 Coffee Break

Trends in the monitoring of residues in foods of animal origin  
in the EU since 1998  
*Martin Danaher*

State of play of the ongoing EU legislative proposals  
affecting the food safety chain  
*Davide Lecchini*

Tavola Rotonda

13.00 Pausa pranzo

**14.00 – 16.45 Comunicazioni scientifiche (Filiera ittica)**

**Moderatori: Aniello Anastasio, Alessandro Giuffrida, Teresa Bossù,  
Giuseppe Palma**

**C11** Pesce marinato e rischio anisakis: l'esame istologico a tutela  
del consumatore  
*Serena Meistro, Daniele Muscolino, Marzia Pezzolato,  
Filippo Giarratana, Mario Botta, Elisa Baioni, Guia Richelmi,  
Antonio Panebianco, Elena Bozzetta*

**C12** Multiplex PCR per l'identificazione di specie tossiche della  
famiglia *Gempylidae* (*Ruvettus pretiosus* e *Lepidocybium  
flavobrunneum*)  
*Alice Giusti, Lorenzo Castigliengo, Daniela Gianfaldoni,  
Alessandra Guidi, Andrea Armani*

**C13** Studio preliminare sull'attività anisakicida di R(+) limonene  
*Filippo Giarratana, Daniele Muscolino, Felice Panebianco,  
Andrea Patania, Chiara Beninati, Graziella Ziino, Alessandro Giuffrida*

**C14** Confronto fra due terreni colturali per il rilevamento di batteri  
produttori di istamina: dati preliminari  
*Leonardo Alberghini, Riccardo Miotti-Scapin, Valerio Giaccone,  
Ehab Salama*

**C15** Riconoscimento di alcune specie di *Pleuronectiformes* mediante  
analisi proteomica  
*Marina Ceruso, Celeste Mascolo, Raffaele Marrone, Giorgio Smaldone,  
Maria Luisa Cortesi*

**C16** Analisi di un frammento del citocromo B di *Engraulis encrasi-  
colus*: risultati preliminari  
*Celestina Mascolo, Marina Ceruso, Claudia Chirollo, Giuseppe Palma,  
Tiziana Pepe*

**C17** Applicazione di uno schema predittivo per la valutazione del  
grado di infestazione in prodotti della piccola pesca  
*Giorgio Smaldone, Claudia Chirollo, Lucia Vollano,  
Mariagrazia Girasole, Raffaele Marrone*

**C18** Indagine sulla qualità igienico sanitaria e sulla corretta identifi-  
cazione dei prodotti ittici nella ristorazione collettiva del Triveneto  
*Michela Rabini, Giuseppe Arcangeli, Mariachiara Armani,  
Michele Civettini, Gabriella Conedera, Michela Favretti,  
Rosaria Lucchini, Sabrina Paternolli, Alessandra Pezzuto*

**C19** Distribuzione di inquinanti organici persistenti in campioni di  
tonno in relazione a differenti zone FAO di pesca  
*Giuseppe Labella, Sara Panzeri, Francesco Arioli, Luca Chiesa*

**C20** Influenza dei trattamenti tecnologici di reidratazione  
su parametri microbiologici e sensoriali in baccalà  
*Francesco Chiesa, Benedetta Coda, Alessandra Dalmaso, Tiziana Civera*

**C21** Indagine sulla prevalenza di *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*,  
*V. vulnificus* in *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850)  
dell'Emilia Romagna e della Sardegna  
*Pier Luca Passalacqua, Emanuele Zavatta, Giorgia Bignami,  
Andrea Serraino, Patrizia Serratore*

**C22** Valutazione della potenzialità applicativa dei molluschi bivalvi  
filtratori come bioindicatori di inquinamento da patogeni virali  
nelle acque costiere: risultati preliminari  
*Giovanna Fusco, Maria Grazia Amoroso, Luisa Marati, Aniello Anastasio,  
Achille Guarino, Giorgio Galiero, Maurizio Viscardi, Barbara Cioffi*

**C23** Ricerca e caratterizzazione genotipica di *Toxoplasma gondii* in  
mitili allevati e commercializzati nella Regione Sardegna  
*Tiziana Tedde, Sara Salza, Annunziata Giangaspero, Marianna Marangi,  
Edoardo Marongiu, Sebastiano Virgilio*

**C24** Nuove disposizioni per l'etichettatura dei prodotti della pesca:  
difficoltà applicative del Regolamento (UE) n. 1379/2013  
*Priscilla D'Amico, Lorenzo Castigliengo, Alessandra Guidi,  
Daniela Gianfaldoni, Andrea Armani*

**16.45 – 18.00 Comunicazioni scientifiche (Filiera carni)**

**Moderatori: Annarita Loschi, Loredana Baldi, Roberto Macri**

**C25** Contaminazione da Salmonella in un macello suino: analisi di  
carcasse e superfici a contatto  
*Silvia Bonardi, Irene Alpigiani, Ilaria Bruini, Alice Vismarra, Elena Barilli,  
Franco Brindani, Marina Morganti, Paola Bellotti, Stefano Pongolini*

**C26** Studio sull'insorgenza di bioluminescenza in carni avicole  
refrigerate  
*Simone Stella, Mario Gennari*



- C27** Oli essenziali di *Thymus vulgaris* (timo rosso) e *Caryophyllus aromaticus* (chiodi di garofano) per il controllo degli alteranti nelle carni suine in atmosfera protettiva  
Serena D'Amato, Giovanni Mazzarino, Chiara Rossi, Annalisa Serio, Clemencia Chaves López, Gaetano Vitale Celano, Antonello Paparella
- C28** Valutazione di iQ-Check STEC kit per lo screening di *Escherichia coli* produttori di Shiga tossine in campioni di carne bovina macinata  
Federica Boccia, Gian Marco Branzoni, Pina M. Fratamico, Aniello Anastasio, Lori Bagi, Tiziana Pepe
- C29** Effetto di diete integrate con estratto di origano (*Origanum vulgare* L.) ed estratto di corteccia di castagno (*Castanea sativa* Mill.) sulle caratteristiche microbiologiche e chimico-fisiche di prosciutto cotto durante il periodo di conservazione  
David Ranucci, Dino Miraglia, Massimo Trabalza Marinucci, Gabriele Acuti, Michela Codini, Maria Rachele Ceccarini, Claudio Forte, Raffaella Branciarì
- C30** Identificazione di *Listeria spp.* in prodotti a base di carne e stabilimenti di produzione mediante *PCR multiplex*  
Roberta Mazza, Francesca Piras, Daniela Ladu, Miriam Putzolu, Simonetta Gianna Consolati, Rina Mazzette
- C31** Caratteristiche di ceppi di *Lactobacillus sakei* isolati da salumi italiani; focus su ceppi da Ventricina del Vastese  
Carmela Amadoro, Franca Rossi, Michele Piccirilli, Giampaolo Colavita

18.30 Assemblea dei soci

20.30 Cena di gala

## Venerdì 30 ottobre 2015

8.00 Apertura segreteria

8.00 – 10.00 ESERCITAZIONE PRATICA (solo per ECM)  
SESSIONE POSTER (con la presenza degli autori)

### 10.00 – 13.30 Tavola Rotonda La ristorazione tra tradizione ed innovazione 2<sup>a</sup> parte

**Moderatori: Roberto Rosmini, Antonio Limone, Catello Coppola**

Tendenze e pregiudizi nella ristorazione  
Tiziana Pepe

Enti e Utenti: *performances* in sinergia  
Giuseppe Pezone

La normativa nella ristorazione: dalla rintracciabilità alla nuova etichettatura  
Francesco Aversano

Le impressioni di uno chef  
Alfonso Iaccarino

Tavola Rotonda

13.30 Pausa pranzo

### 14.30 – 17.30 Comunicazioni scientifiche (argomenti vari) Moderatori: Federico Capuano, Raffaele Marrone

- C32** Alimenti per l'infanzia: controllo e sicurezza alimentare  
Serena Santonicola, Maria Francesca Peruzi, Nicoletta Murru, Raffaella Mercogliano
- C33** Etichettatura di Döner Kebab: conformità alle informazioni obbligatorie sugli alimenti secondo la normativa comunitaria  
Gaetano Liuzzo, Roberto Rossi, Andrea Serraino, Federica Giacometti, Antonio Poeta
- C34** Contaminanti ambientali e neonicotinoidi nel miele e nel polline  
Simonetta Menotta, Annunziata Cannavacciuolo, Damiano Accurso, Lucia Piana, Giancarlo Naldi, Giorgio Fedrizzi
- C35** Valutazione del livello di contaminazione da *Listeria monocytogenes* e *Listeria spp.* in *Ready-To-Eat sandwiches* commercializzati in distributori automatici di differenti strutture ospedaliere  
Francesca Cossu, Carlo Spanu, Silvia Deidda, Erica Mura, Daniele Casti, Carlo Pala, Sonia Lamon, Vincenzo Spanu, Michela Ibba, Elena Marrocu, Christian Scarano, Andrea Piana, Enrico Pietro Luigi De Santis
- C36** Proteine dell'uovo in alimenti e rischio per il consumatore allergico. Indagine in Regione Piemonte nel biennio 2013-2014  
Daniela Manila Bianchi, Silvia Gallina, Daniela Adriano, Sara Astegiano, Giuseppina Buonincontro, Sandra Fragassi, Walter Vencia, Fabio Zuccon, Lucia Decastelli
- C37** Impiego di un concentrato di fenoli ottenuto dall'acqua di vegetazione del frantoio nella conservazione di prodotti freschi  
Enrico Novelli, Barbara Cardazzo, Stefania Balzan, Lisa Carraro, Agnese Taticchi, Maurizio Servili, Luca Fasolato
- C38** Crescita di *Listeria monocytogenes* in tre diverse tipologie di frutta di IV gamma (melone, papaya e mela) durante il periodo di conservabilità  
Giuliana Cammi, Elena Cosciani Cunico, Elena Dalzini, Simone Russo, Paolo Daminelli, Chiara Garbarino, Matteo Ricchi, Norma Arrigoni
- C39** Frutti di bosco prodotti in Piemonte: sicurezza sanitaria e qualità microbiologica  
Clara Ippolito, Guerrino Macorì, Daniela Adriano, Alberto Bellio, Daniela Manila Bianchi, Silvia Gallina, Giovanna Gilardi, Maria Lodovica Gullino, Lucia Decastelli
- C40** Software *web-based* predittivo semplificato per la gestione ed il controllo della salubrità di alimenti refrigerati  
Pierluigi Polese, Manuela Del Torre, Mara Stecchini
- C41** *Space Bonus Food*: qualità microbiologica e nutrizionale degli alimenti consumati sulla *International Space Station*  
Alberto Bellio, Silvia Gallina, Edoardo Fontanella, Nadia Civalieri, Daniela Manila Bianchi, Liliana Ravagnolo, Laura Bersani, Lucia Decastelli
- 17.30 Verifica dell'apprendimento con questionario
- 18.00 Chiusura del Congresso e consegna attestati di partecipazione

## Sessione POSTER

**P01** Diffusione e persistenza di *Pseudomonas spp.* in aziende di bovine lattifere di piccole-medie dimensioni in Piemonte

*Daniele Michele Nucera, Sara Lomonaco, Patrizia Morra, Marco Francesco Ortoffi, Daniele Giaccone, Maria Ausilia Grassi*

**P02** Standardizzazione di un metodo di prova per la ricerca di larve di *Anisakis* in prodotti della pesca attraverso l'utilizzo del sistema Trichineasy®

*Michele Chetta, Antonella Costa, Gaetano Cammilleri, Stefania Graci, Rosaria Collura, Maria Drusilla Buscemi, Maria Cusimano, Angela Alongi, Silvia Palumbo, Claudia Porcarello, Sabrina Mutolo, Giuseppe Giangrosso, Antonio Vella, Vincenzo Ferrantelli*

**P03** Ruolo del cinghiale quale indicatore della presenza della tubercolosi bovina e valutazione del rischio sanitario legato al consumo e alla manipolazione delle carni

*Francesco Sgarangella, Maria Giovanna Cancedda, Stefano Lollai, Antonio Pintore, Daniela Marongiu, Giuseppe Bitti, Pietro Desini*

**P04** Virus dell'Epatite A e Norovirus in molluschi eduli lamellibranchi: metodi di estrazione a confronto

*Barbara Cioffi, Maria Grazia Amoroso, Maurizio Viscardi, Loredana Cozzolino, Vincenzo Pasquale, Achille Guarino, Giorgio Galiero, Giovanna Fusco*

**P05** Monitoraggio della contaminazione da idrocarburi policiclici aromatici in impianti di mitilicoltura situati nel golfo di Pozzuoli

*Mauro Esposito, Stefania Cavallo, Maurizio della Rotonda, Ciro Sbarra, Maria Stefanelli, Teresa Bruno, Sara Lambiase, Loredana Baldi*

**P06** Sieroprevalenza di *Toxoplasma gondii* in pecore allevate nel Nord Italia

*Cristina Bacci, Alice Vismarra, Carlo Mangia, Elena Barilli, Marco Genchi, Ilaria Bruini, Franco Brindani, Laura Helen Kramer*

**P07** Analisi di residui di corticosteroidi in campioni di urine, fegato e muscolo mediante kit ELISA

*Maria Campaniello, Annalisa Conticelli, Simona Summa, Sonia Lo Magro, Marilena Muscarella*

**P08** Indagine sul tenore di istamina ed azoto basico volatile totale in prodotti ittici commercializzati in Puglia

*Pasquale Moscarelli, Sonia Lo Magro, Antonella Russo, Pasquale D'Antini, Marilena Muscarella*

**P09** Metodi di screening per l'analisi di verde malachite e leucomalachite nel muscolo di pesce

*Ivana Decina, Pasquale D'Antini, Maria Campaniello, Sonia Lo Magro, Marilena Muscarella*

**P10** Validazione di metodi di screening strumentali quantitativi per analisi di residui di farmaci in alimenti di origine animale

*Sonia Lo Magro, Simona Summa, Antonio Armentano, Ivana Decina, Maria Campaniello, Marilena Muscarella*

**P11** Ricerca e caratterizzazione biomolecolare di *Vibrio parahaemolyticus* in molluschi bivalvi vivi della regione Sardegna

*Giuseppe Tedde, Marta Marceddu, Giuseppa Lorenzoni, Igor Arras, Donatella Ottaviani, Francesca Leoni, Alessandro Mudadu, Maria Teresa Uda, Giovanna Sanna, Edoardo Marongiu, Sebastiano Virgilio*

**P12** Determinazione della concentrazione di metalli in alimenti di origine animale e vegetale prodotti in Campania

*Stefania Cavallo, Mauro Esposito, Guido Rosato, Vittorio Soprano, Pasquale Gallo, Eugenio Chiaravalle, Oto Miedico, Roberta Pellicanò, Loredana Baldi*

**P13** Determinazione dei tenori di cadmio in organi e tessuti bovini, suini, ovini ed equini allevati in Sicilia

*Andrea Macaluso, Antonio Vella, Giuseppe Giangrosso, Gaetano Cammilleri, Stefania Graci, Marco Collura, Michele Chetta, Nicola Cicero, Vincenzo Ferrantelli*

**P14** Indagine preliminare sui rapporti tra consulenza e operatori del settore alimentare nei Pubblici Esercizi a Milano

*Claudia M. Balzaretti, Daniele Vittorio Moroni, Katia Razzini, Sabrina Ratti*

**P15** Monitoraggio del punto crioscopico del latte bufalino

*Antonella Pesce, Caterina Salzano, Anna De Felice, Francesca Garofalo, Salvatore Liguori, Annunziata De Santo, Pierpaolo Palermo, Achille Guarino*

**P16** Analisi dei Controlli Ufficiali in Regione Campania

*Diletta Mandato, Germana Colarusso, Roberta Pellicanò, Loredana Baldi, Achille Guarino, Paolo Sarnelli*

**P17** Cadmio e piombo in muscoli e fegati equini macellati nella regione Puglia

*Marina Tarallo, Celeste Tancredi, Oto Miedico, Ciro Pompa, Eleuterio Pellegrino, Leonardo Carosielli, Eugenio Chiaravalle*

**P18** Monitoraggio dei residui di medicinali veterinari e di contaminanti ambientali negli animali vivi e nei prodotti di origine animale nel triennio 2012-2014 in Regione Campania

*Rosa D'Ambrosio, Roberta Brunetti, Pierpaolo Palermo, Loredana Baldi, Daniela Bove, Paolo Sarnelli, Achille Guarino*

**P19** Prevalenza di *E. coli* Verocitotossici negli alimenti. Studio sperimentale del trattamento radiante finalizzato alla sicurezza e qualità igienica degli alimenti

*Cinzia Cardamone, Maria Cristina D'Oca, Antonio Bartolotta, Aldo Parlato, Giuseppa Oliveri, Giorgia Caruso, Annamaria Di Noto*

**P20** *Campylobacter spp.* in preparazioni di carne avicola. Prevalenza di *Campylobacter spp.* in preparazioni di carne avicola prelevate al dettaglio e negli stabilimenti di trasformazione della regione Lazio

*Ziad Mezher, Stefano Saccares, Rita Marcianò, Paola De Santis, Eda Maria Flores Rodas, Veronica De Angelis, Roberto Condoleo*

**P21** Identificazione dello stato di conservazione della carne di pollo: esame istologico e metodica HADH a confronto

*Fabio Olivo, Serena Meister, Mario Botta, Danilo Pitardi, Marzia Pezzolato, Katia Varello, Luca Nocilla, Elisa Baioni, Daniela Meloni, Elena Bozzetta*

**P22** Approccio quantitativo sulla presenza di suini fortemente contaminati da *Salmonella spp.*: l'esperienza in un mattatoio suino della provincia di Fermo

*Valentina Silenzi, Loredana Di Giacomo, Marta Paniccià, Emanuele Simoni, Francesca Ciuti, Antonio Angellotti, Sara Novelli, Eleonora Scoccia, Chiara Francesca Magistrali*

**P23** Categorizzazione del rischio in uno stabilimento per la produzione di tofu: l'esperienza dell'area vasta 4 di Fermo

*Loredana Di Giacomo, Ezio Ferretti, Antonio Angellotti, Sara Novelli, Matteo Michetti, Federica Pietracci, Xiaoting Wang, Anna Rita Loschi*



**P24** Caratteristiche organolettiche, chimico-fisiche e microbiologiche di carne di bovini alimentati con diete integrate con sansa vergine di oliva (sottoprodotto dell'industria elaiotecnica)

Raffaella Branciarì, David Ranucci, Dino Miraglia, Stefania Urbani, Sonia Esposto, Maurizio Servili

**P25** Identificazione di legumi irraggiati con metodo di screening DNA comet

Rosa Villani, Grazia Siragusa, Francesca Floridi, Michele Mangiacotti, Eugenio Chiaravalle

**P26** Dosimetria con tecnica EPR di cosce di rana irradiate

Michele Tomaiuolo, Michele Mangiacotti, Guido Vegliante, Eugenio Chiaravalle

**P27** Rilevamento e caratterizzazione di ceppi di *Staphylococcus aureus* isolati dal guscio di uova raccolte in allevamenti rurali del maceratese

Daniela Bencardino, Luca Agostino Vitali, Manuela Prenna, Dezemona Petrelli

**P28** Trasferimento delle aflatoxine M<sub>1</sub> e B<sub>1</sub> dal latte di bufala alla mozzarella

Gilberto Giangolini, Carlo Boselli, Francesco Filippetti, Alessandro Proietti, Riccardo Biccocchi, Simonetta Amatiste

**P29** Risultati preliminari di uno studio epidemiologico sulla diffusione dei principali patogruppi di *Escherichia coli* negli alimenti e nel latte crudo in provincia di Salerno

Pasquale Fraulo, Esterina DeCarlo, Carmelo Morena, Giovanna Serluca, Achille Guarino

**P30** Studio della dinamica di popolazione di *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas fluorescens* in mozzarella di bufala con prove di challenge test

Donatella Nava, Salvatore Capo, Vincenzo Caligiuri, Valerio Giaccone, Loredana Biondi, Federico Capuano, Gerardo Vaccaro, Achille Guarino

**P31** Indagine microbiologica e chimico-fisica di prodotti carni tradizionali cinesi fabbricati in Italia

Erica Tirloni, Cristian Bernardi, Simone Stella, Lisa Vallone, Luigi Piscitelli, Carla Bersani, Patrizia Cattaneo

**P32** Monitoraggio sulla presenza di acido domoico sulle zone di produzione di molluschi bivalvi

Rachele Rossi, Olga Arace, Maria Giovanna Buonomo, Daniela Capozzo, Vincenzo Castellano, Samantha Imbimbo, Vittorio Soprano

**P33** Sicurezza alimentare: dal banco alla tavola

Valeria Morena, Patrizia Leggeri, Marzia Romolaccio, Antonella Bozzano, Stefano Saccares

**P34** Criticità nell'applicazione delle norme di sicurezza alimentare in una realtà multietnica: il mercato di Piazza Vittorio a Roma

Patrizia Leggeri, Valeria Morena, Gianfranco Masotti, Priamo Pedè, Stefano Saccares

**P35** Fattori di rischio nella qualità microbiologica della carne di selvaggina abbattuta

Francesca Orsoni, Roberto Barbani, Nicola Ferrari, Nicola Canetti, Paolo Brulatti, Lia Bardasi, Giuseppe Merialdi, Valentina Sabbioni

**P36** Caratterizzazione di *Listeria monocytogenes* in due macelli suini: prevalenza, profilo molecolare e pattern di contaminazione

Giuliana Franzini, Elena Carra, Deborah Baldi, Simona Naldi, Marina Morganti, Giuseppe Merialdi, Federica Bergamini, Nadia Losio, Stefano Pongolini, Antonietta Gattuso, Gianluca Rugna

**P37** Evidenze di laboratorio in un'epidemia di tossinfezione alimentare da consumo di prodotti della tradizione culinaria giapponese

Selene Marozzi, Tatiana Bogdanova, Elena Dell'Aira, Ilaria Di Domenico, Patrizia Palmieri, Francesco Tomassetti, Sarah Lovari, Stefano Bilei

**P38** Valutazione *in vitro* delle interazioni tra *Penicillium roqueforti* e *Listeria monocytogenes*

Sibilla Dolci, Milena Brasca, Lisa Vallone

**P39** Stafilococchi coagulasi positivi ed enterotossine in formaggio di malga: gestione del caso per la prevenzione della tossinfezione

Mariachiara Armani, Guerrino Macorì, Michela Rabini, Gloria Paolazzi, Silvia Gallina, Fabio Zuccon, Lucia Decastelli, Dorotea Lombardo

**P40** Bisfenolo A nei prodotti ittici

Adele Repossi, Federica Farabegoli, Teresa Gazzotti, Elisa Zironi, Giampiero Pagliuca

**P41** I controlli ufficiali sui prodotti tradizionali cinesi nella provincia di Prato

Bianca Maria Varcasia, Paola Marconi, Ettore Facibeni, Paola De Santis

**P42** Focus sul virus dell'Epatite A in molluschi eduli lamellibranchi allevati nella regione Sardegna

Riccardo Bazzardi, Maria Caterina Fattaccio, Monica Rosaria Molotzu, Laura Marongiu, Antonella Canu, Alfonsina Marras, Margherita Pisanu

**P43** Presenza del virus dell'Epatite E nei cinghiali (*Sus scrofa scrofa*) nella regione Lazio

Antonella Froio, Sarah Lovari, Giuseppe Micarelli, Enrica Martini, Lucia Scaramella, Paola De Santis

**P44** Studio proteomico dei meccanismi di formazione di biofilm in *Staphylococcus Aureus*

Pierluigi Di Ciccio, Paola Roncada, Emanuela Zanardi, Sergio Ghidini, Viviana Greco, Cristian Piras, Luigi Bonizzi, Adriana Ianieri

**P45** Presenza di geni di virulenza in *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus* e *Acobacter skirrowii* isolati da fonti alimentari, animali e ambientali

Federica Giacometti, Grazia Gariano, Silvia Piva, Andrea Serraino, Silvia Gallina, Renato Giulio Zanoni, Lucia Decastelli

**P46** Valutazione delle contaminazioni microbiologiche rilevanti per la sicurezza alimentare in stabilimenti di produzione di formaggi ovis della Sardegna

Christian Scarano, Carlo Spanu, Francesca Piras, Daniele Casti, Carlo Pala, Sonia Lamon, Vincenzo Spanu, Elena Marrocu, Francesca Cossu, Gavino Murittu, Gavino Nieddu, Enrico Pietro Luigi De Santis

**P47** Ottimizzazione di una piattaforma molecolare per l'identificazione di *Salmonella enteritidis* e *Salmonella typhimurium*

Elisabetta Delibato, Eleonora Pucci, Sabatino Russo, Maria Carullo, Sarah Lovari, Stefano Bilei, Dario De Medici, Federico Capuano, Yolande T.R. Proroga

**P48** Analisi delle positività ottenute tramite metodica di screening in real time PCR per batteri patogeni da alimenti

Paolo Bonilauri, Lia Bardasi, Roberto Leonelli, Maria Cristina Fontana, Mattia Ramini, Andrea Luppi, Giuseppe Merialdi



## COMUNICAZIONI SCIENTIFICHE

Mercoledì 28 ottobre 2015

### C01

#### Livelli di contaminazione da diossine e policlorobifenili nel latte ovino proveniente dal SIN di Porto Torres

Francesco Sgarangella,<sup>1</sup> Maria Caterina Suelzu,<sup>1</sup> Giuseppe Bitti,<sup>1</sup> Patrizia Piras,<sup>2</sup> Gianuario Fiori,<sup>2</sup> Maurizio Cossu,<sup>2</sup> Giannina Chessa,<sup>2</sup> Pietro Desini<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Azienda Sanitaria Locale n. 1 Sassari, Dipartimento di Prevenzione, Sassari; <sup>2</sup>Istituto Zooprofilattico di Sassari, Laboratorio di Chimica Ambientale, Sassari, Italy

L'esposizione umana a diossine e policlorobifenili deriva principalmente dall'assunzione per via alimentare di prodotti di origine animale. Il presente studio riporta i dati di un piano di monitoraggio svolto in un'area prossima ad un Sito di Interesse Nazionale (SIN) considerato ad alto rischio di contaminazione ambientale. L'obiettivo era quello di fornire un'informazione diretta sul livello di contaminazione di specifiche sostanze trasferibili dall'ambiente alla catena alimentare. Per l'indagine sono stati individuati quali indicatori d'elezione l'allevamento ovino e la matrice latte. Le specie animali da pascolo, quali gli ovini, sono considerati indicatori sensibili capaci di rilevare la presenza di contaminanti ambientali. Il consumo di pascolo e l'ingestione di suolo superiore, che potrebbe risultare contaminato da deposizioni aeree, ha riflessi infatti sulla qualità e sui livelli di contaminazione del latte prodotto. Il latte ovino risulta infatti idoneo per monitorare i contaminanti organici persistenti e liposolubili, quali le diossine e i policlorobifenili, anche in virtù dell'elevato livello di grasso presente. L'attività di predisposizione del piano, selezione delle aziende e del campionamento è stata eseguita dal Dipartimento di Prevenzione dell'ASL di Sassari mentre i controlli analitici sono stati effettuati dal Laboratorio di Chimica Ambientale dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, accreditato secondo la norma ISO/UNI 17025. Le determinazioni dei livelli di policlorodibenzo-p-diossine (PCDD), policlorodibenzofurani (PCDF), policlorobifenili diossina simili (PCB-DL) e policlorobifenili non-diossina-simili (PCB-NDL) sono state condotte su 60 campioni di latte prelevati in 60 allevamenti ovini localizzati nell'area di indagine. Gli allevamenti selezionati prevedevano l'utilizzo di pascolo estensivo o alimentazione con foraggi o mangimi prodotti nell'area di studio. Le aziende erano localizzate in prossimità o all'interno del perimetro che delimita le due aree del SIN denominato Aree industriali di Porto Torres e discarica di Calancoi. I metodi utilizzati rispondono ai requisiti della legislazione EU in materia di sicurezza alimentare ai sensi del Regolamento (UE) n. 252/2012. Nel latte le concentrazioni medie di PCDD/PCDF e di PCB-DL sono risultate entrambe pari a 0.25 pg WHO-TEQ/g grasso; il livello medio dei PCB-NDL (espresso come somma dei sei congeneri) è risultato pari a 1.86 ng/g di grasso. Tutti i campioni analizzati hanno pertanto mostrato concentrazioni conformi ai limiti normativi. I dati mostrano, nel loro insieme, una situazione di moderata contaminazione e di rischio contenuto per la sicurezza degli alimenti di origine animale prodotti nell'area investigata. Le concentrazioni non si discostano significativamente da quelle rilevate nei piani di controllo regionali su campioni prelevati al consumo. L'esperienza condotta ha mostrato la validità dell'utilizzo degli ovini quali indicatori zootecnici di qualità ambientale. Le conoscenze disponibili hanno consentito di effettuare un'attività di monitoraggio in grado di evidenziare problematiche di sicurezza alimentare attraverso un'efficace valutazio-

ne del rischio derivante dalla presenza di sostanze tossiche. Lo studio ha consentito inoltre di acquisire indicazioni a supporto delle Autorità competenti circa l'uso a fini zootecnici di aree critiche soggette a studi di caratterizzazione ambientale.

### C02

#### Valutazione di differenti metodi di estrazione e amplificazione del DNA per la ricerca di *Coxiella burnetii* nel latte bovino

Yolande T.R. Proroga, Anna Giannina Perugini, Andrea Mancusi, Achille Guarino, Federico Capuano

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Dipartimento Ispezione degli Alimenti, Portici (NA), Italy

*Coxiella burnetii* (Coxiella) è l'agente etiologico della febbre Q, zoonosi a diffusione pressoché planetaria che ha nei ruminanti il maggiore serbatoio. Benché la principale via d'infezione sia l'inalazione di aerosol contaminati, anche l'ingestione di latte non pastorizzato, o di suoi derivati, è una accertata via di trasmissione del germe. Nel tempo sono stati messi a punto numerosi metodi diagnostici verso *Coxiella* basati su metodiche molecolari (PCR), ma poco si sa circa le più vantaggiose combinazioni tra protocolli di estrazione e di amplificazione del DNA. In questo studio, sei metodi di purificazione del DNA sono stati valutati in combinazione con tre metodiche PCR, su campioni di latte contaminati con concentrazioni note di *Coxiella*. A tal fine, latte bovino di una azienda indenne da febbre Q è stato contaminato con diluizione di una coltura di *Coxiella* (50,000 cellule di *Coxiella*/microlitro) fornita dall'INRA Val de Loire Research Center (Nouzilly, France). I sistemi di estrazione considerati sono stati 5 kit commerciali (QIAamp DNA Mini kit; DNeasy Mericon Food kit; Nucli SENS miniMAG; NucleoSpin Food; Wizard Genomic DNA Purification Kit) ed il metodo CTAB. I metodi di amplificazione valutati sono stati la PCR, la TaqMan real-time PCR e la SYBR Green/TM, tutti aventi quale target il gene *IS1111* di *Coxiella*. Le migliori performance sono state ottenute con il kit di estrazione DNeasy Mericon Food in abbinamento con le metodiche TaqMan e SyBr Green (5 cellule di *Coxiella*/reazione); i kit QIAamp DNA Mini e NucleoSpin Food hanno mostrato la stessa efficienza del precedente ma solo in combinazione con la TaqMan PCR. Le metodiche TaqMan e SYBR Green evidenziano performance complessivamente migliori (da 5 a 5x102 cellule di *Coxiella* /reazione) rispetto alla PCR (da 5x102 a 5x103 cellule di *Coxiella* /reazione). Questo studio mette in luce una considerevole differenza nella sensibilità dei metodi molecolari, anche in funzione del metodo di estrazione del DNA utilizzato. La sensibilità sembra correlata alle dimensioni dell'amplicone. Infatti i metodi di estrazione possono causare una frammentazione del DNA, quindi la scelta di molecole target di piccole dimensioni può consentire migliori performance rispetto a target di maggiori dimensioni. La sensibilità manifestata dalla TaqMan PCR ne suggerisce l'utilizzo su campioni di latte di massa di aziende di grandi dimensioni, mentre la PCR e la metodica SYBR Green sono più adatte per la diagnosi su campioni di latte individuali o di massa di aziende di piccole dimensioni.

### C03

#### Rilievo di *Bacillus cereus* enterotossici in formaggi prodotti in Campania

Yolande T.R. Proroga, Angela Giordano, Marcella Palomba, Assunta Esposito, Achille Guarino, Federico Capuano

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Portici (NA), Italy

*Bacillus cereus* complex comprende cinque specie, strettamente correlate, di batteri sporigeni Gram positivi. *B. cereus*, il microrganismo di riferimento che dá il nome all'intero gruppo, è responsabile di infezioni sistemiche nonché di due distinte forme di malattie alimentari. Una forma emetica, legata alla produzione della tossina termostabile cereulide e una forma enterica, dovuta alla produzione del complesso di peptidi enterotossici termolabili citotossina K (cytK), enterotossina FM (entFM) e dei complessi peptidici emolisina BL (HBL) e enterotossina non emolitica (NHE). In questo studio gli isolati di *B. cereus* ottenuti da formaggi prodotti in Campania sono stati analizzati con l'obiettivo di rilevare la presenza dei geni codificanti per la produzione delle enterotossine. Centonovantaquattro campioni di formaggi sono stati analizzati (ISO 7932:2005) per il rilievo di *B. cereus*. Di questi, 62 (32%) sono risultati positivi. Tutti gli isolati sono stati sottoposti ad analisi molecolari per il rilievo dei loci codificanti le diverse enterotossine. Per le analisi sono stati utilizzati i primers (nome primers/primer forward/primer reverse): HBL-A/gcaaaatctatgaatgccta;/gcatctgttcgta-atgttt; HBL-C /cctatcaataactctcgcaa/tttcctttgtatagctgc; HBL-D/gaaacagggtctcatattct/tgaatgcgaagagctgcttc; NHE-A/taaggagggg-caaacagaag/tgaatgcgaagagctgcttc; NHE-B/caagctccagttcatgctgg/gatccattgtgtaccattg; NHE-C/acaatctttgacgacagaac/ccaccgcaatgac-catatc; cytK/ cgacgtcacaagttgtaaca/cgtgtgtaaatacccagtt; entFM/gttcgttcagggtgctgctac/cgtgtgtaaatacccagtt. I geni di più frequente riscontro sono stati entFM (62/62) e il complesso NHE (59/62). In accordo con quanto riportato in letteratura, i 62 isolati sono stati raggruppati in quattro gruppi in base al profilo tossigenico rilevato. Gruppo I (13/62): ceppi positive per tutti i loci indagati; Gruppo II (14/62): isolati positivi per tutti i target ad eccezione del complesso HBL; Gruppo III (1/62): isolati positivi per tutti i target ad eccezione della citotossina K; Gruppo IV (27/62): isolati positivi per entFM e per il complesso NHE. Il *B. cereus* è un batterio ubiquitario in grado di sopravvivere alla pastorizzazione e alla maggior parte dei trattamenti termici utilizzati nelle produzioni industriali del settore lattiero caseario. I dati da noi ottenuti evidenziano una presenza non trascurabile del *B. cereus* proprio in questa tipologia di prodotti. L'analisi dei profili genetici da noi effettuata ha messo in evidenza nel 100% dei ceppi isolati i geni codificanti per le tossine NHE e HBL responsabili della sintomatologia enterica e nel 20% dei ceppi isolati è stata riscontrata compresenza dei geni, indice di un'elevata patogenicità dei ceppi. L'elevata variabilità dei profili genetici presenti nei ceppi di *B. cereus* e la sua ubiquarietà pone i laboratori di microbiologia degli alimenti e delle industrie alimentari di fronte alla necessità di dover affrontare concretamente un nuovo pericolo per la salute pubblica.

## C04

### Evoluzione del profilo microbico di ricotte salate intere nel corso della shelf-life

Daniele Casti,<sup>1</sup> Christian Scarano,<sup>1</sup> Carlo Pala,<sup>1</sup> Francesca Cossu,<sup>1</sup> Sonia Lamon,<sup>1</sup> Vincenzo Spanu,<sup>1</sup> Michela Ibba,<sup>1</sup> Anna Maria Mocchi,<sup>1</sup> Francesco Tedde,<sup>1</sup> Gavino Nieddu,<sup>2</sup> Carlo Spanu,<sup>1</sup> Enrico Pietro Luigi De Santis<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Sassari, Sassari;

<sup>2</sup>Cooperativa Allevatori Ovini Formaggi Soc. Coop. Agricola, Oristano, Italy

L'obiettivo del presente lavoro è quello di determinare il profilo microbico e chimico fisico della ricotta salata ottenuta da siero di latte di pecora confezionata sottovuoto, nel corso della sua conservazione. Un totale di 18 ricotte salate confezionate sottovuoto, appartenenti a 3 lotti differenti, provenienti da un caseificio sardo, venivano conservate a 4±2°C e analizzate rispettivamente a 24 ore (T0) a 60 (T60) e 90

giorni (T90) dal loro confezionamento. Dalla superficie e dal centro di ciascuna forma sono stati prelevati 25 g di prodotto, su cui veniva effettuata la ricerca di carica mesofila totale, *Listeria monocytogenes*, Enterobacteriaceae, lieviti e muffe, *Bacillus cereus*. Contestualmente sono stati valutati il pH, l'attività dell'acqua ( $a_w$ ) e la composizione centesimale. Non è mai stata rilevata la presenza di *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus*. La carica microbica totale in superficie mostrava un andamento costante nel tempo con valori ( $\log_{10}$  cfu/g) 7.90±0.64 (T0), 7.79±2.21 (T60), 9.19±0.58 (T90), mentre nel centro sono stati registrati valori di 2.95±0.68 (T0), 4.51±1.66 (T60), 4.27±1.10 (T90). Nella superficie venivano registrati valori crescenti nel tempo ( $P < 0.05$ ) di Enterobacteriaceae, rispettivamente di 4.22±0.66 (T0), 5.16±0.59 (T60) e 5.30±0.73 (T90), nel centro i valori erano costanti nel tempo 3.13±1.80 (T60), 2.80±0.88 (T90). Lieviti e muffe venivano rilevati nella superficie con valori di 3.02±0.36 (T0), 4.99±0.81 (T60), 4.01±1.03 (T90); nel centro si registravano valori di 2.00±0.00 (T0), 1.67±0.58 (T60), 2.30±0.00 (T90). Il pH mostra una riduzione costante durante la conservazione ( $P < 0.05$ ) con valori rispettivamente di 6.54±0.03 (T0), 6.04±0.14 (T60), 5.68±0.18 (T90). L' $a_w$  (0.97), l'umidità (57%), la sostanza secca (43%), il grasso (20%), le proteine (15%) e il sale (3%) non hanno mostrato variazioni statisticamente significative nel tempo. Nella produzione della ricotta salata, le fasi di manipolazione come la pressatura, salatura e il confezionamento possono essere causa di contaminazioni secondarie che nel tempo possono portare ad una alterazione delle caratteristiche organolettiche e sensoriali del prodotto. A seguito di procedure errate di produzione la contaminazione può riguardare anche il centro della pasta oltre che la superficie. La ricotta salata per via del particolare processo di produzione ad elevate temperature che inattivano la microflora competitiva, per le caratteristiche di elevato pH ed elevata umidità e per la ricchezza in elementi nutritivi, rappresenta un ottimo substrato per la crescita di microrganismi alteranti e patogeni. Nel presente lavoro sono state osservate importanti contaminazioni da Enterobacteriaceae, mentre la presenza di lieviti e muffe è un reperto più occasionale. In particolare la ricotta salata data la conservazione refrigerata per lunghi periodi di tempo è particolarmente favorevole alla crescita di patogeni psicotropi quali *L. monocytogenes* e *B. cereus*. Considerata la diversa origine della contaminazione, ambientale per *L. monocytogenes* e dalle materie prime per *B. cereus*, cambiano le strategie per il loro controllo. La prima può essere controllata attraverso l'implementazione di buone prassi igieniche nel processo di lavorazione o l'adozione di trattamenti postletali. L'eliminazione di *B. cereus* dal latte è praticamente impossibile, pertanto il suo controllo si basa sulla limitazione della sua crescita attraverso il mantenimento della catena del freddo.

## C05

### Valutazione della shelf-life in ricotta fresca ovina confezionata in atmosfera protettiva

Carlo Pala,<sup>1</sup> Christian Scarano,<sup>1</sup> Massimiliano Venusti,<sup>2</sup> Daniela Sardo,<sup>2</sup> Daniele Casti,<sup>1</sup> Francesca Cossu,<sup>1</sup> Sonia Lamon,<sup>1</sup> Vincenzo Spanu,<sup>1</sup> Michela Ibba,<sup>1</sup> Michela Marras,<sup>1</sup> Antonio Paba,<sup>3</sup> Carlo Spanu,<sup>1</sup> Enrico Pietro Luigi De Santis<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Sassari, Sassari; <sup>2</sup>Agenzia LAORE Sardegna, Dipartimento di Produzioni Zootecniche, Sassari; <sup>3</sup>Agenzia AGRIS Sardegna, Dipartimento per la ricerca nelle produzioni animali, Sassari Italy

La ricotta fresca ovina all'affioramento risulta essere pressoché priva di una microflora propria caratterizzante, con la presenza di spore

sopravvissute al riscaldamento del siero a temperature elevate (80-85°C). In tutte le fasi successive questo prodotto è estremamente sensibile alle contaminazioni post-processo e nel corso della conservazione i parametri intrinseci (pH tra 6.1 e 6.8,  $a_w$  0.974- >991) sono favorevoli allo sviluppo microbico. Alla ricotta fresca confezionata in carta alimentare viene attribuita una conservabilità non >5-7 giorni. Nei caseifici industriali si è diffuso il confezionamento in atmosfera protettiva (MAP), con l'obiettivo di raggiungere le 2-3 settimane di vita commerciale. Il presente studio è stato condotto con lo scopo di valutare la *shelf-life* della ricotta fresca confezionata in MAP. Sono stati analizzati un totale di 108 campioni provenienti da tre diversi caseifici industriali della Sardegna. Lo studio è stato condotto su tre differenti lotti di produzione per ciascun caseificio. Nel corso delle attività sono state rilevati i parametri tecnologici ed igienici di produzione e confezionamento. Nel corso della conservazione le ricotte sono state analizzate a 0 (T0), 7 (T7), 14 (T14) e 21 (T21) giorni. Sui campioni si è proceduto a determinare carica microbica totale, Enterobacteriaceae ed *Escherichia coli*, *Pseudomonas spp.*, Enterococchi, lieviti e muffe, batteri lattici (mesofili e termofili), cocchi lattici (mesofili e termofili), *L. monocytogenes*, *B. cereus*, parametri chimico-fisici (pH,  $a_w$ ) e composizione% (grasso, proteine, umidità). *E. coli*, *L. monocytogenes* e *B. cereus* non sono risultati rilevabili. La CBT era di log 2.43-3.56 ufc/g (T0), con presenza di *Pseudomonas spp.* e Enterobacteriaceae nei prodotti di 1 dei 3 caseifici. La CBT ha subito un incremento progressivo fino a log ufc 5.91-7.43 (T21), in particolare associato allo sviluppo di *Pseudomonas spp.*, con valori di log 5.99-7.28. Le Enterobacteriaceae inizialmente rilevabili in 1 dei 27 campioni (T0) mostravano valori crescenti fino al termine della conservazione e, rilevabili in 20 su 27 dei campioni a T21, presentavano valori che variavano tra log 3.46-5.83, in relazione al caseificio considerato. Trai lattici era trascurabile la presenza di termofili e batteri lattici mesofili, mentre i cocchi mesofili erano rilevabili (3-6 log) anche se con notevole variabilità tra i campioni. Enterococchi mostravano presenza sporadica (3 su 108 campioni), Lieviti e muffe erano non rilevabili. Nella conservazione le variazioni di pH (6.5-6.8) e  $a_w$  (0.979-0.994) sono contenute. I valori di composizione delle ricotte (media±ds) erano: proteine% 8.48±0.66; grasso% 11.94±2.33; umidità 76.36±2.44. La composizione dei gas nello spazio di testa è risultata piuttosto variabile e con frequente presenza di  $O_2$  in percentuale >1-2%, valori compatibili con lo sviluppo di aerobi quali *Pseudomonas spp.* Le condizioni di produzione hanno mostrato notevole variabilità tra gli stabilimenti, con la rilevazione di criticità igieniche, tecnologiche e nel confezionamento. L'evoluzione della microflora dimostra come la conservabilità della ricotta fresca ovina in ATM non può essere superiore ad una settimana o, in condizioni ottimali e controllate di produzione e confezionamento, potrebbe raggiungere le due settimane.

## C06

### Abstract non presentato

## C07

### Sopravvivenza di *Listeria monocytogenes* in yogurt artigianali e adattamento in ambiente acido

Erica Tirloni, Cristian Bernardi, Simone Stella

Dipartimento di Scienze Veterinarie per la Salute, la Produzione Animale e la Sicurezza Alimentare, Università degli Studi di Milano, Milano, Italy

*Listeria monocytogenes* è ritenuta uno dei principali contaminanti

post-processo dell'industria lattiero-casearia. Scopo della prima fase di questo studio è stata la valutazione della sopravvivenza di tale batterio in yogurt artigianali naturali (N) e alla fragola (F), questi ultimi ottenuti aggiungendo al prodotto naturale purea di frutta. *L. monocytogenes* ATCC 7644 è stata inoculata a due differenti concentrazioni iniziali (2 e 5 Log UFC/g) nelle due tipologie di yogurt (N e F). Successivamente, a tempi stabiliti (0, 1, 2, 3, 4, 7, 10, 13, 16, 20, 23, 26, 33, 40, 47, 54, 61 e 68 giorni dall'inoculo) è stata effettuata in duplicato la ricerca qualitativa e quantitativa di *L. monocytogenes* seguendo i metodi AFNOR BRD 074-0998 e AFNOR BRD 0705-0901. Nella seconda fase è stata valutata l'abilità del microrganismo di adattarsi all'ambiente acido. *L. monocytogenes* ATCC 7644 (Wild, W) e il medesimo ceppo, isolato nella prima fase dopo 68 giorni dall'inoculo (Adattato, A) sono stati inoculati in parallelo in campioni di yogurt N e F (concentrazione iniziale di 4 Log UFC/g). Quindi a tempi stabiliti (0, 7, 14, 21, 28, 35, 42, 49, 56, e 63 giorni dall'inoculo) è stata effettuata in duplicato la ricerca qualitativa e quantitativa di *L. monocytogenes* seguendo i metodi AFNOR sopracitati. Nella prima fase, *L. monocytogenes* inoculata a 2 Log UFC/g ha mostrato un decremento iniziale in entrambi i prodotti (N e F), risultando contabile ( $\geq 1$  Log UFC/g) fino a 33 giorni dopo l'inoculo, senza differenze significative tra le due serie. Nei campioni inoculati ad una concentrazione iniziale di 5 Log UFC/g, è stato osservato un moderato ma costante decremento delle cariche, risultate contabili fino a 61 giorni dopo l'inoculo. I valori sono risultati significativamente più bassi nella serie F rispetto alla serie N ( $P < 0.05$ ), probabilmente grazie all'azione antimicrobica svolta dal sorbato di potassio presente nella purea. Ad entrambe le concentrazioni iniziali, il microrganismo è comunque risultato presente per tutta la sperimentazione (68 giorni). Nella seconda fase, in entrambe le serie, *L. monocytogenes* W e A hanno mostrato un graduale decremento, con cariche  $< 1$  Log UFC/g da 28 giorni dopo l'inoculo. Non sono state rilevate differenze evidenti fra ceppo A e W, che sono risultati generalmente presenti fino a 56 giorni dall'inoculo. Questi risultati evidenziano l'abilità di *L. monocytogenes* di resistere all'ambiente acido dello yogurt anche in assenza di preadattamento.

## C08

### Sviluppo di un metodo per la valutazione del potenziale alterante di ceppi di *Pseudomonas* nel settore lattiero-caseario

Francesco Chiesa, Chiara Costantini, Sara Lomonaco, Tiziana Civera

Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino, Torino, Italy

Il potenziale alterante di *Pseudomonas* ha catturato l'attenzione mediatica con il fenomeno delle *mozzarelle blu* nel 2010, ma gli episodi perdurano ancora oggi in caseifici di tutto il territorio nazionale. Il presente lavoro è stato, pertanto, finalizzato all'individuazione di un metodo per identificare in modo rapido i ceppi di *Pseudomonas fluorescens* produttori di pigmento blu. Se studi risalenti agli ultimi anni '90 e primi 2000, avevano identificato i ceppi di *Pseudomonas fluorescens* appartenenti al biovar IV, come responsabili delle variazioni cromatiche delle paste filate, recenti studi di caratterizzazione hanno, invece, dimostrato che i ceppi pigmentanti coinvolti nei casi dal 2010, appartengono ad un sottogruppo comprendente il biovar I. Il metodo proposto ha come fine l'individuazione degli isolati appartenenti a questo sottogruppo e la valutazione del loro potenziale pigmentante. Lo studio ha previsto



l'allestimento di un protocollo di multiplex PCR per amplificare una regione interna del gene *oprI* (che codifica per una lipoproteina di membrana), come target indicante l'appartenenza al genere *Pseudomonas*, e del gene *AprX* (che codifica per una proteasi alcalina termoresistente), per l'appartenenza al sottogruppo *fluorescens*. Successivamente l'eventuale capacità di sintetizzare pigmento è stata confermata tramite semina su Potato Dextrose Agar (PDA). Per ultimo, è stato realizzato un albero filogenetico le sequenze di *AprX* al fine di valutare le relazioni genotipiche dei ceppi analizzati all'interno del gruppo *Pseudomonas fluorescens*. Per la messa a punto del metodo ci si è avvalsi di un set di 29 campioni. Di questi, 19 sono stati usati come ceppi di riferimento, mentre i restanti 10 campioni, provenienti dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte e della Valle D'Aosta, erano stati isolati da mozzarelle, alcune delle quali (8) si presentavano alterate cromaticamente e altre (2) all'apparenza prive di alterazioni. L'amplificazione del gene *oprI* si è rivelata uno strumento efficace per confermare l'appartenenza al genere *Pseudomonas*, come dimostrato dalle prove di inclusività ed esclusività. L'amplificazione del gene *AprX*, invece, ha correttamente identificato i ceppi del sottogruppo *Pseudomonas fluorescens*, identificando, in particolare, i ceppi appartenenti al biovar I. Nessuno degli isolati negativi per la presenza del gene *AprX* ha dato colorazione sul PDA. Degli 8 isolati da *mozzarella blu*, 6 sono risultati positivi per *AprX* e, di questi, 4 hanno prodotto pigmento su PDA. Questi risultati, apparentemente in contrasto con l'ipotesi di partenza, sono verosimilmente dovuti alla difficoltà di isolare correttamente il microrganismo: esiste, infatti, la possibilità che, per l'elevata eterogeneità della popolazione o per fenomeni di competizione tra sottopopolazioni, gli isolati analizzati non siano quelli che hanno determinato la pigmentazione. Dall'analisi dell'albero filogenetico derivato dai frammenti del gene *AprX*, tuttavia, si conferma come tutti gli isolati in cui il gene è stato amplificato, appartengano ad un gruppo isolato che sembrerebbe definire i ceppi appartenenti al biovar I. Il metodo proposto, sebbene necessiti di essere testato su un numero maggiore di campioni, si è dimostrato essere un mezzo valido per l'identificazione tramite PCR di *Pseudomonas*, ed in particolare modo del sottogruppo contenente i ceppi responsabili della pigmentazione blu.

## C09

### Produzione di pigmento blu e formazione di biofilm in *Pseudomonas fluorescens*

Chiara Rossi,<sup>1</sup> Clemencia Chaves López,<sup>1</sup> Annalisa Serio,<sup>1</sup> Elisa Goffredo,<sup>2</sup> Beniamino Terzo Cenci Goga,<sup>3</sup> Antonello Paparella<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Facoltà di Bioscienze e Tecnologie Agroalimentari e Ambientali, Università degli Studi di Teramo, Mosciano Stazione (TE); <sup>2</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata, Foggia; <sup>3</sup>Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Perugia, Perugia, Italy

Negli ultimi anni particolare attenzione è stata posta alla presenza del genere *Pseudomonas* nei prodotti lattiero-caseari ed in particolare a *Pseudomonas fluorescens* e al suo ruolo nell'alterazione blu della mozzarella. Il lavoro si propone di valutare la capacità di 64 ceppi di *Pseudomonas fluorescens* di produrre pigmento blu *in vitro* e di formare biofilm. 64 ceppi di *P. fluorescens*, tutti di origine lattiero-casearia, sono stati sottoposti alla prova di valutazione della produzione di pigmento blu *in vitro*, mediante crescita di inoculo standardizzato su tre diversi terreni sintetici: *Pseudomonas Isolation Agar* (PIA), *Potato Dextrose Agar* (PDA) e *Agar Mascarpone* (MA). La capacità di formare biofilm degli stessi ceppi è stata valutata in micropiastrella utilizzando

il cristalvioletto come colorante ed il *Tryptone Soya Broth* (TSB) con 0,2% di glucosio come substrato di crescita. Di ogni ceppo sono state effettuate 5 repliche e per l'inoculazione è stata utilizzata una coltura overnight standardizzata. Le micropiastre inoculate sono state incubate per 24 h e 48 h a due differenti temperature (+10°C e +30°C). La Densità Ottica è stata misurata a 590 nm ed i ceppi sono stati raggruppati nel modo seguente: non produttori, debolmente produttori, moderatamente produttori e fortemente produttori. Dei 64 ceppi di *Pseudomonas fluorescens* saggiati, 13 sono risultati capaci di produrre pigmento blu sui terreni sintetici *Potato Dextrose Agar* e *Agar Mascarpone*. Dallo studio è emerso che la maggioranza dei ceppi è stata capace di produrre biofilm e che tale capacità è legata al ceppo e alla temperatura di incubazione. In generale, la maggior parte dei ceppi dopo 24 h di incubazione ha prodotto quantità maggiori di biofilm a +10°C. Inoltre, è stata evidenziata un'alta correlazione tra la produzione di pigmento e la formazione di biofilm, sia a +10°C sia a +30°C. La capacità di *P. fluorescens* di produrre biofilm si è dimostrata dipendente dalla temperatura e dal ceppo. Temperature di incubazione inferiori (+10°C) hanno favorito la formazione del biofilm dopo 48 h, probabilmente perché i ceppi erano ben adattati alle basse temperature degli ambienti di produzione dell'industria lattiero-casearia. Interessante è la correlazione evidenziata tra produzione di pigmento e biofilm, che potrà essere oggetto di ulteriori ricerche.

## C10

### Indagine preliminare per la valutazione dell'idoneità igienico-sanitaria del processo produttivo di caseificazione nelle malghe trentine

Rosaria Lucchini,<sup>1</sup> Sabrina Paternolli,<sup>1</sup> Franco Fasoli,<sup>2</sup> Roberto Gerola,<sup>2</sup> Giovanni Farina<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Struttura Complessa Territoriale 5, Trento; <sup>2</sup>Azienda Sanitaria per i Servizi Sanitari della provincia Autonoma di Trento, Dipartimento Prevenzione, Unità Operativa Igiene e Sanità Pubblica Veterinaria, Trento, Italy

La lavorazione del latte nelle casere annesse alle malghe e nei piccoli caseifici aziendali presenta spesso delle criticità dovute alle difficili situazioni in cui si trovano ad operare gli operatori del settore alimentare. Se da un lato in queste microimprese si riscontrano le maggiori problematiche, per contro, esse rappresentano un'importante risorsa per l'economia locale e per la salvaguardia del territorio montano. Nel corso della stagione estiva 2014 è stata condotta da parte del Servizio Veterinario dell'Azienda Provinciale per i Servizi Sanitari (APSS) della Provincia di Trento un'indagine preliminare nelle malghe (n.71) del Trentino che trasformano il latte, volta a raccogliere informazioni per valutare l'idoneità igienico-sanitaria delle produzioni e degli ambienti di lavoro in alpeggio. In ciascuna malga sono stati raccolti sia campioni di matrici alimentari (latte crudo, cagliata e formaggio a varie stagionature: n. 122) che tamponi effettuati su attrezzature e superfici di lavoro (n. 108) per un totale di 230 campioni. Quali criteri di sicurezza alimentare sono stati ricercati *Salmonella spp.* (*Real Time PCR-AFNOR BRD 07/06-07/04*, confermata con ISO 6579:2002/Cor 1:2004 E), *Listeria monocytogenes* (*Real Time PCR-AFNOR BRD 07/10-04/05*, confermata con UNI EN ISO 11290-1:2005) ed enterotossine stafilococciche (ANSES-EU-RL VIDAS Staph enterotoxin II SET 2 Versione 5:2010). Quali indicatori di igiene sono stati considerati *Stafilococchi Coagulasi Positivi* (SCP) (ISO 6888-2:1999/Amd 1 2003) e *Escherichia coli* (EC) (ISO 16649-2:2001). Nessun campione è risultato positivo per



*Salmonella spp.*; *L. monocytogenes* è stata individuata in 2 campioni; le enterotossine stafilococciche sono state riscontrate solo in un campione. Il 5% di campioni provenienti in particolare da 12 malghe presentavano elevati livelli SCP e EC, soprattutto in riferimento alle superfici di appoggio e ai cestelli di plastica per caciotte e ricotta, risultate le superfici a maggiore rischio di contaminazione e per le quali è necessario porre particolare attenzione durante le operazioni di pulizia e disinfezione. L'indagine preliminare svolta, pur rilevando una condizione igienico-sanitaria soddisfacente sia dei prodotti che degli ambienti di lavoro, ha evidenziato delle criticità riferite per lo più a singoli episodi e risolte mediante l'applicazione di strategie preventive efficaci. Sulla base delle evidenze emerse si è ritenuto opportuno impostare nelle casere annesse agli alpeggi e nei minicaseifici aziendali un piano di moni-

toraggio triennale strutturato e condiviso da tutte le unità operative dell'APSS della Provincia di Trento. Il piano prevede una serie di verifiche relative ai parametri igienico sanitari del latte, della cagliata e dei formaggi nel primo periodo di stagionatura, ossia in corrispondenza delle fasi del processo produttivo ritenute più critiche per il possibile sviluppo di microrganismi patogeni e/o indicatori di igiene o loro tossine. Prevede inoltre la promozione di un'attività di formazione del personale che opera in alpeggio in riferimento allo stato di salute degli animali e, in particolare, della mammella; alle buone pratiche di mungitura; alle corrette modalità di conservazione del latte; all'igiene delle produzioni. In questo modo sarà possibile rilevare precocemente eventuali non conformità e attuare tempestivamente le azioni correttive idonee a garantire la sicurezza alimentare del consumatore.

Non-commercial use only

## Giovedì 29 ottobre 2015

### C11

#### Pesce marinato e rischio anisakis: l'esame istologico a tutela del consumatore

Serena Meistro,<sup>1</sup> Daniele Muscolino,<sup>2</sup> Marzia Pezzolato,<sup>1</sup>  
Filippo Giarratana,<sup>2</sup> Mario Botta,<sup>1</sup> Elisa Baioni,<sup>1</sup> Guia Richelmi,<sup>1</sup>  
Antonio Panebianco,<sup>2</sup> Elena Bozzetta<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino; <sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Messina, Polo Universitario Annunziata, Messina, Italy

Lo scopo del presente lavoro è stato valutare le performance dell'esame istologico nel differenziare il pesce marinato fresco da quello decongelato. Sessanta alici (*Engraulis encrasicolus*) pescate in Sicilia sono state sfilettate manualmente e poste in un bagno di marinatura costituito da una miscela di aceto ed acqua (1:1), contenente 0.1% di acido citrico e 3% di NaCl, secondo i protocolli di marinatura tradizionalmente impiegati nelle industrie ittiche. Trenta di esse sono state marinate e mantenute a 4°C per 24 ore; le altre trenta sono state conservate per 24 ore a -20°C prima di essere marinate per 24 ore, quale metodo di inattivazione dell'*Anisakis* secondo quanto previsto dalla normativa vigente. Dopo la marinatura, tutti i campioni sono stati fissati in formalina tamponata al 10% presso l'Università di Messina e conferiti al Laboratorio di Istopatologia (Torino), dove sono stati processati routinariamente, inclusi in paraffina e tagliati al microtomo in sezioni di 3±2, che sono state colorate con ematossilina-eosina. I preparati sono stati osservati al microscopio ottico con obiettivi ad ingrandimenti crescenti e classificati come positivi (congelati-decongelati) o negativi (freschi), in base alla procedura operativa standard in uso presso il Laboratorio di Istopatologia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, la quale prevede che i campioni siano classificati come positivi in caso di riscontro di spazi otticamente vuoti o ripieni di materiale amorfo eosinofilo, collocati all'interno delle fibrocellule muscolari e formati in seguito all'azione dei cristalli di ghiaccio. Il metodo istologico per distinguere il pesce fresco dal decongelato è stato messo a punto, validato ed accreditato nel 2009 con le seguenti performance: sensibilità 90,70% (IC 95%: 82.49-95.90%) e specificità 92.59% (IC 95%: 75.71-99.09%); la sua validità non è influenzata dalla specie ittica. Nel nostro studio sono state calcolate sensibilità e specificità della metodica istologica applicata alle alici marinate. È stato possibile distinguere correttamente i campioni freschi da quelli congelati. I valori di sensibilità e specificità della metodica sono risultati rispettivamente del 100% (IC 95%: 88.4-100%) e 100% (IC 95%: 88.4-100%). I risultati ottenuti evidenziano come l'esame istologico rappresenti uno strumento analitico valido ed economico che consente di differenziare il pesce marinato fresco da quello decongelato e possa essere applicato per proteggere il consumatore nei confronti dell'*Anisakis* e di eventuali pratiche fraudolente. Il Regolamento CE 853/2004, consolidato dal Regolamento UE 1276/2011, prevede che il pesce destinato ad essere consumato crudo o praticamente crudo debba essere sottoposto ad abbattimento termico preventivo, a -20°C per almeno 24 ore o -35°C per almeno 15 ore, allo scopo di uccidere parassiti diversi dai Trematodi. Il metodo istologico è validato per il protocollo -20°C/24 ore mentre per il -35°C/15 ore è in corso un ulteriore studio di validazione. Sebbene la marinatura rappresenti in Europa

uno dei più antichi e popolari metodi di conservazione del pesce, particolarmente apprezzato nelle aree costiere italiane, essa non risulta efficace per tale scopo ed è pertanto obbligatorio anche abbattere termicamente i prodotti della pesca marinati crudi. Il presente studio indica come sia possibile estendere anche ai suddetti prodotti il campo di applicabilità del metodo istologico.

### C12

#### Multiplex PCR per l'identificazione di specie tossiche della famiglia Gempylidae (*Ruvettus pretiosus* e *Lepidocybium flavobrunneum*)

Alice Giusti, Lorenzo Castigliano, Daniela Gianfaldoni,  
Alessandra Guidi, Andrea Armani

FishLab, Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università di Pisa, Pisa, Italy

Il *Ruvettus pretiosus* ed il *Lepidocybium flavobrunneum*, Tirsite o Ruvetto secondo la normativa nazionale, sono specie ittiche tossiche della famiglia Gempylidae, caratterizzate da un'elevata quantità di lipidi complessi a livello muscolare. Le loro carni, se ingerite, possono causare disturbi gastrointestinali acuti, caratterizzati da diarrea oleosa associata a dolori addominali, nausea e vomito. Per tale ragione molti Paesi hanno introdotto delle disposizioni legislative che ne regolamentano il commercio. In Europa, secondo il Reg. (CE) n. 853/2004 le due specie possono essere immesse sul mercato solo in forma di prodotti confezionati o imballati e opportunamente etichettate al fine di informare i consumatori sulle modalità di preparazione o cottura e sul rischio connesso alla presenza di sostanze con effetti gastrointestinali nocivi. La vendita in forma di preparati favorisce l'utilizzo di queste specie al posto di altre più pregiate. La sostituzione di Merluzzo (*Gadus spp.*), Tonno (*Thunnus spp.*) e Carbonaro d'Alaska (*Anoplopoma fimbria*) è stata segnalata in prodotti a base di pesce crudo (sushi). Scopo di questo studio è stato quello di sviluppare una multiplex PCR per l'identificazione delle due specie tossiche e delle altre specie ittiche con le quali vengono più frequentemente sostituite. Sono stati raccolti 108 campioni di riferimento: 26 Gempylidae, 5 *A. fimbria*, 38 *Thunnus spp.* e specie affini e 39 *Gadus spp.* e specie affini. Il DNA è stato estratto e due geni mitocondriali (*COI* e *cytb*) sono stati amplificati e sequenziati utilizzando primers universali. Le sequenze ottenute, insieme a quelle scaricate dai database, sono state allineate ed analizzate per valutare la presenza di polimorfismi. Sono stati quindi progettati dei primers per amplificare frammenti di lunghezza differente appartenenti ai geni *COI* e *cytb*. In particolare, un primers forward comune disegnato sul gene *COI* è stato utilizzato insieme ad un reverse comune per le specie tossiche *R. pretiosus* e *L. flavobrunneum* (478pb) ed a reverse specifici per *A. fimbria* (400pb) e *Thunnus spp.* (289pb). Una coppia di primers genere specifici per *Gadus spp.* (199pb) è stata disegnata sul *cytb*. Una coppia di primers universali, in grado di amplificare un frammento del gene 16SrRNA, è stata utilizzata come controllo positivo di reazione. Il metodo è stato validato su tutti i campioni di riferimento e su altre specie ittiche utilizzate per la preparazione di sushi. L'analisi delle sequenze dei geni selezionati ha rivelato una variabilità sufficiente per la progettazione di primers specifici per le due specie tossiche e per *A. fimbria* e di primers genere-specifici per *Gadus spp.* Questi ultimi, permettono una discriminazione anche nei confronti di specie affini appartenenti alla famiglia Gadidae. Data la scarsa variabilità interspecifica del gene *COI*, i primers sviluppati per il genere *Thunnus* amplificano anche il DNA di specie affini, quali i tonnetti (*Euthynnus spp.* e *Katsuwonus pelamis*), non inficiando, tuttavia, lo

scopo della metodica. La multiplex PCR non ha restituito prodotti di amplificazione aspecifica ed è stata in grado di identificare in modo univoco tutti i campioni analizzati. La metodica può rappresentare un utile strumento, sia a livello ufficiale che privato, per garantire la corretta applicazione della normativa sulla tracciabilità prevista per il comparto ittico e tutelare il consumatore nei confronti di frodi sanitarie.

### C13

#### Studio preliminare sull'attività anisakicida di R(+) limonene

Filippo Giarratana, Daniele Muscolino, Felice Panebianco, Andrea Patania, Chiara Beninati, Graziella Ziino, Alessandro Giuffrida

Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Messina, Messina, Italy

Lo scopo del presente lavoro è stato valutare *in vitro* l'attività anisakicida di R(+) limonene (LMN) su larve di *Anisakis* tipo I al fine di ipotizzarne l'utilizzo nei processi di marinatura. Tutte le larve utilizzate venivano ottenute da differenti esemplari di *Lepidopus caudatus* (Pesce sciabola) pescati nelle acque antistanti lo Stretto di Messina (zona FAO 37). I pesci venivano prelevati presso gli esercizi di vendita entro 5 ore dalla cattura. Le larve venivano preliminarmente esaminate allo Stereo Microscopio (Leica M205 C) al fine di valutarne la vitalità e l'appartenenza al genere *Anisakis* di tipo I. L'effetto anisakicida del R(+) Limonene è stato saggiato su diverse matrici liquide: i) soluzione fisiologica al fine di valutarne preliminarmente l'efficacia anisakicida; ii) soluzione di acqua/aceto (rapporto 1:1), con il 3% di NaCl e acido citrico all'1%, al fine di valutarne gli effetti e l'applicabilità in una soluzione di marinatura normalmente utilizzata a livello industriale; iii) olio di semi di girasole per simulare la normale conservazione post-marinatura e stoccaggio dei prodotti della pesca marinati. Per tutti e tre le matrici si utilizzavano le seguenti concentrazioni 5, 1, 0,5, 0,1, 0% di LMN. In tutte le sperimentazioni effettuate il controllo era rappresentato dalle soluzioni saggiate con lo 0% di LMN. I parassiti (50 per ogni sperimentazione) posti in piastre Petri sterili con le differenti concentrazioni dei composti da saggiare, mantenute a 20°C, venivano controllati per la vitalità ad intervalli regolari seguendo specifici criteri di valutazione della vitalità delle larve. La vitalità delle larve veniva valutata allo stereomicroscopio (Leica M 205 C) in soluzione salina (0,9% NaCl). Infine su tutte le larve morte si effettuava un'indagine ultrastrutturale al microscopio elettronico a scansione (SEM) Phenom SEM (Phenom-World BV, Eindhoven, Paesi Bassi). Sulla base di tali parametri si è utilizzato il punteggio medio normalizzato al fine di valutare il tasso di inattivazione degli *Anisakis* (IR=percentuale di riduzione vitalità in un intervallo di tempo, in condizioni di trattamento fissi). I risultati ottenuti evidenziavano una buona attività anisakicida del LMN. Alla massima concentrazione saggiata (5%) in soluzione fisiologica, la completa inattivazione delle larve si osservava già a partire dalla 24esima ora di trattamento, mentre alle concentrazioni minori (1 e 0,5%) a partire dalla 48esima ora. In soluzione di marinatura, la totale inattivazione delle larve si osservava già a 16 ore di trattamento per la concentrazione maggiore (5%), a 24 ore al 1% e a 32 ore allo 0,5% di limonene. I risultati delle prove in cui larve di *Anisakis* venivano poste in olio di semi di girasole mostravano solo una riduzione della vitalità delle stesse a tutte le concentrazioni di LMN saggiate. Le valutazioni microscopiche evidenziavano danni a carico della cuticola e del

tratto digerente di parassiti trattati con LMN. Questo lavoro rappresenta il primo studio *in vitro* sull'attività di LMN contro larve di *Anisakis*. L'attività larvicida probabilmente è correlato al danno riscontrato nel parassita nel tratto digerente. L'efficacia di LMN contro larve di *Anisakis* documentata nel presente studio giustifica ulteriori indagini per valutarne l'uso potenziale durante il processo di marinatura industriale.

### C14

#### Confronto fra due terreni culturali per il rilevamento di batteri produttori di istamina: dati preliminari

Leonardo Alberghini,<sup>1</sup> Riccardo Miotti-Scapin,<sup>1</sup> Valerio Giaccone,<sup>1</sup> Ehab Salama<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute, Università degli Studi di Padova, Padova, Italy; <sup>2</sup>Department Food Control and Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Suez Canal University, Ismailia, Egypt

Dal punto di vista analitico esistono diverse metodiche per la quantificazione chimica dell'istamina nelle matrici alimentari. L'unica tra queste ufficialmente riconosciuta dal Regolamento Comunitario n. 2073/2005 è la metodica di high-performance liquid chromatography. Queste analisi hanno comunque come finalità la stima della quantità d'istamina già formata nell'alimento e quindi non forniscono informazioni riguardanti la flora istaminogena (FI) presenti in una matrice. Dal punto di vista dell'igiene alimentare è opportuno invece distinguere i batteri istamino-produttori da quelli che non lo sono e ben identificarli, tipizzandoli. Scopo del presente studio è confrontare la capacità diagnostica di 2 mezzi culturali per la determinazione della FI, quali il terreno di Niven (TN) e il Seawater Agar Medium (SAM) in una formulazione da noi personalmente modificata a pH 5,8. Abbiamo considerato come campioni oggetto delle analisi 494 esemplari di varie specie ittiche analizzando per ognuno il contenuto intestinale e la massa muscolare. I campioni sono stati prelevati tra il mese di gennaio 2013 e gennaio 2015 presso diversi punti vendita al dettaglio distribuiti tra le province di Treviso e Padova. Per ogni stipse microbico isolato dai 2 terreni incubati a 31±2°C e risultato positivo alla produzione d'istamina, è stata eseguita la colorazione di Gram, la prova della citocromo-ossidasi, la prova della catalasi e le prove biochimiche in micrometodo API (Biomérieux) per identificare la specie di appartenenza. La *shelf-life* dei terreni di coltura oggetto della ricerca è stata verificata mediante la valutazione del calo ponderale, pH, sterilità e fertilità. I risultati ottenuti con i due differenti terreni sono stati analizzati statisticamente utilizzando il Test statistico Z di confronto tra 2 percentuali e il chi quadro. Su un totale di 54 ceppi isolati, sono state identificate le seguenti specie microbiche: *Citrobacter youngae*, *Enterobacter amnigenus* tipo 2, *Enterobacter amnigenus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas fluorescens*, *Hafnia alvei*, *Citrobacter braakii* tipo 1, *Staphylococcus xylosum*, *Escherichia vulneris*, *Enterobacter cloacae*, *Morganella morganii* biogrupo 1, *Averyella dalhousiensis* e *Serratia marcescens*. I ceppi: *Citrobacter youngae*, *Enterobacter amnigenus*, dopo l'identificazione sono stati esaminati con un test immunoenzimatico competitivo (Ridascreen Histamin, R-Biopharm AG) al fine di saggiare la loro reale potenzialità istaminogena. Tali ceppi si sono dimostrati produttori di istamina e la concentrazione prodotta era compresa tra 302 e 197 mg/kg. Dal risultato del test Z possiamo affermare che il terreno SAM modificato è significativamente più veloce di 24 ore rispetto a TN (P<0,001), mentre il test del chi quadro indica una significativa associazione tra gli esiti dei 2 terreni pari a 118 (P<0,001). Entrambi i terreni presentano invece una medesi-

ma *shelf-life* di 14 giorni. Alla luce di questi dati preliminari possiamo concludere che l'utilizzo del terreno SAM modificato può costituire una valida e rapida alternativa a TN. L'individuazione del microbiota intestinale nei pesci potrà permettere in studi futuri di delimitare il microbioma al fine di chiarire il ruolo della FI nei prodotti della pesca.

## C15

### Riconoscimento di alcune specie di *Pleuronectiformes* mediante analisi proteomica

Marina Ceruso, Celeste Mascolo, Raffaele Marrone, Giorgio Smaldone, Maria Luisa Cortesi

Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli, Italy

L'ordine dei Pleuronectiformes comprende numerose specie ittiche, note come *Pesci piatti*. Si tratta di specie morfologicamente simili tra loro, ma con caratteristiche organolettiche e nutrizionali molto diverse e, quindi, differente valore commerciale. Quando queste specie sono poste sul mercato sotto forma di prodotti preparati o trasformati, è difficile risalire alla specie d'appartenenza mediante il semplice esame visivo. L'analisi del DNA mitocondriale è il metodo più diretto per l'identificazione di specie. Tuttavia, qualora le specie ittiche presentino un elevato grado di omologia del genoma, come nel caso dei Pleuronectiformes, il riconoscimento è particolarmente complesso, poiché i frammenti indagati si differenziano per poche mutazioni puntiformi. In questo caso la proteomica, ovvero lo studio del completo corredo proteico espresso da una cellula o da un tessuto di un individuo, si rivela complementare alla genomica. A tale scopo, è stato analizzato e confrontato il proteoma di sei specie di appartenenti all'ordine dei Pleuronectiformes. Lo studio è stato condotto su sei specie di Pleuronectiformes, con diverso pregio commerciale e diversa origine geografica. Sono stati analizzati tre esemplari per specie. Le specie oggetto di indagine sono state le seguenti: *Solea vulgaris* (Sogliola); *Solea senegalensis* (Sogliola atlantica); *Solea lascaris* (Sogliola dal porro); *Solea kleinii* (Sogliola turca); *Microchirus variegatus* (Sogliola fasciata); *Synaptura cadenati* (Sogliola oceanica). Le proteine sarcoplasmatiche sono state analizzate mediante elettroforesi monodimensionale (SDS-PAGE) ed elettroforesi bidimensionale (2-DE). Per l'SDS-PAGE sono state utilizzate 100µg di proteine. La IEF degli estratti è stata effettuata su 300µg di proteine, utilizzando strip di gel di 7 cm di lunghezza in un range di pH 3-10 non lineare. La seconda dimensione è stata eseguita su un gel al 12,5% di acrilammide, con amperaggio costante di 25 mA per gel. La colorazione delle mappe proteiche è stata effettuata attraverso l'utilizzo di Bio-Safe Coomassie (Biorad). L'elettroforesi monodimensionale degli estratti proteici ha consentito di rilevare un elevato grado di polimorfismo tra le sei specie appartenenti all'ordine dei Pleuronectiformes. Le 2-DE hanno permesso di evidenziare spot diversi per qualità e quantità tra le specie in analisi. L'acquisizione e l'analisi del *pattern* proteico degli esemplari appartenenti all'ordine dei Pleuronectiformes indagati si è confermato uno strumento valido per discriminare tra le specie. È stato possibile individuare spot specifici per ciascuna delle specie oggetto di indagine. Evoluzioni di questo studio sono in corso per identificare le proteine specie-specifiche mediante tecniche di spettrometria di massa e per risalire al gene che codifica tali proteine. In questo modo sarebbe possibile individuare tratti del genoma dei Pleuronectiformes che presentino un maggiore polimorfismo di specie rispetto ai tratti finora utilizzati in letteratura ai fini identificativi di specie. Tale

approccio consentirebbe di disegnare *primers* specifici che permettano il riconoscimento anche in prodotti trasformati mediante l'utilizzo di tecniche molecolari di routine.

## C16

### Analisi di un frammento del citocromo B di *Engraulis encrasicolus*: risultati preliminari

Celestina Mascolo,<sup>1</sup> Marina Ceruso,<sup>1</sup> Claudia Chirillo,<sup>1</sup> Giuseppe Palma,<sup>2</sup> Tiziana Pepe<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Zootecniche ed Ispezione degli Alimenti, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli; <sup>2</sup>Segretario Generale Assoitica Italia, Roma, Italy

La specie *Engraulis encrasicolus* (alice) ha origine da aree geografiche diverse con differenti habitat marini. Scopo della presente indagine è stato quello di analizzare un frammento di 1044 bp del citocromo b (*cytb*) al fine di valutare la eventuale presenza di polimorfismi intraspecifici. Il grado di omologia delle sequenze nucleotidiche di una specie, infatti, può fornire utili indicazioni per definire la provenienza del pescato in base alle Geographical Sub-Areas (GSAs). Sono stati esaminati 9 esemplari integri di *E. encrasicolus* provenienti da tre diverse aree e pescati in giorni differenti: n. 3 campioni provenienti da Roseto degli Abruzzi (Te) N 42(°)41(')25(") E 14°16(')26(") - GSA 17, pescati a maggio 2015; n. 3 campioni provenienti da Cariatì (Cs) N 39(°)31(') E 16(°)59(') - GSA 19, pescati a maggio 2015; n. 3 campioni provenienti da Procida (Na) N 40(°)43(')58,2(") E 14(°)2(')22(") - GSA 10, pescati a settembre 2014. Tutti gli esemplari sono stati identificati come appartenenti alla specie *E. encrasicolus* sulla base dei caratteri morfologici ed anatomici presso il Dipartimento di Medicina Veterinaria e produzioni animali, Università degli Studi di Napoli Federico II. Aliquote di 0,1 g sono state prelevate e triturate da ciascun campione con bisturi sterile. L'omogenato è stato utilizzato per l'estrazione del DNA secondo il protocollo Ikeda (2004). Il DNA estratto è stato quantificato mediante analisi spettrofotometrica. La reazione di PCR è stata condotta utilizzando i *primers*: *Cytb F* (CCTACTCAAGATCGCTAACGA) e *Cytb R* (AGTTTAACTTAGAATGCTAGCTTTGG). La purificazione dei prodotti di amplificazione è stata effettuata con l'utilizzo del kit GeneDirex, seguendo le indicazioni fornite dalla ditta. I prodotti di amplificazione sono stati sequenziati mediante sequenziatore automatico ABI 3730xl. Le sequenze ottenute sono state analizzate con l'ausilio del programma informatico ClustalW (Software BioEdit version 7.2.5) che consente l'analisi dell'elettroferogramma e l'allineamento delle sequenze. L'allineamento e l'analisi delle sequenze ottenute è stato effettuato anche con la sequenza del gene *cytb* della specie *E. encrasicolus* depositata nella National Center for Biotechnology Information (NCBI) attraverso il Basic Local Alignment Search Tool (BLASTn). Il grado di omologia tra i campioni analizzati è stato valutato utilizzando il Software Mega. La tecnica utilizzata ha consentito di estrarre il DNA in buona quantità e qualità. Il frammento del gene *cytb* mitocondriale di 1044 bp è stato correttamente amplificato in tutti gli esemplari esaminati. Lo studio delle sequenze ha evidenziato un grado di omologia variabile in percentuali comprese fra il 100% e ~ l'80% fra campioni provenienti dalle diverse zone di pesca. I risultati preliminari di questo studio evidenziano la presenza di polimorfismi nell'ambito delle sequenze analizzate. Tuttavia, sono necessari ulteriori approfondimenti perché sia possibile discriminare, nell'ambito della specie *E. encrasicolus*, gli esemplari provenienti da diverse zone di pesca. Questo studio, in accordo con il Regolamento



(UE) 1379/2013 relativo al regime di controllo della rintracciabilità dei prodotti della pesca, potrebbe contribuire alla caratterizzazione biomolecolare del pescato in base alle sotto-zone FAO.

## C17

### Applicazione di uno schema predittivo per la valutazione del grado di infestazione in prodotti della piccola pesca

Giorgio Smaldone, Claudia Chirollo, Lucia Vollano, Mariagrazia Girasole, Raffaele Marrone

Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli, Italy

Nessun areale di pesca può essere considerato libero da *A. simplex*. I controlli ufficiali ed i programmi di autocontrollo, basati sul sistema HACCP, comprendono pratiche atte ad eliminare o ridurre il rischio di questo pericolo biologico. Nonostante questo, vi è notevole attenzione relativamente a potenziali azioni legali che potrebbero incorrere quando un lotto di pesce infestato è attenzionato dall'autorità competente in una qualsiasi fase successiva alla cattura. Questi problemi sorgono soprattutto a causa dell'applicazione soggettiva di alcuni concetti come *parassita visibile* e *manifestamente infestato*. Infatti l'assenza di un criterio standard per l'ispezione e la mancanza di un limite critico analitico per valutare l'accettabilità di un lotto provocano un eterogeneo modus operandi. Considerando che l'EFSA, in un recente parere, invita allo sviluppo di strumenti per la valutazione del rischio relativo ai parassiti nei prodotti della pesca, scopo del lavoro è stato l'applicazione dello schema predittivo SADE ai fini della caratterizzazione del grado di infestazione dei prodotti della piccola pesca. Il suddetto schema prevede l'assegnazione di un punteggio che identifica la gravità del pericolo e punteggi bassi sono legati a pericoli maggiori. Sono stati campionati 5 differenti lotti di pesci, tutti provenienti dal Mediterraneo, costituiti da n. 1504 *E. encrasicolus*, n. 116 *T. trachurus*, n. 78 *S. scombrus*, n. 115 *M. merluccius* con lunghezza inferiore ai 30 cm e n. 41 con lunghezza superiore ai 30 cm. I campioni sono stati sottoposti sia ad ispezione visiva che a digestione enzimatica per la ricerca di parassiti e le larve rinvenute sono state caratterizzate dal punto di vista biomolecolare. *S. scombrus* e *E. encrasicolus* non sono risultati parassitati e tale dato è da tenere in debita considerazione ai fini della possibile applicazione delle deroghe al congelamento previste dal Reg. UE 1276/11, considerando le particolari modalità di consumo di tali pesci. *T. trachurus* è risultato maggiormente infestato rispetto a *M. merluccius*, ma è da considerare che in termini di sicurezza alimentare è determinante la localizzazione del parassita: nel *T. trachurus*, infatti, solo lo 0,35% dei parassiti è stato rinvenuto nel muscolo. In *M. merluccius* è stata valutata una correlazione diretta tra lunghezza e numero di parassiti ed una loro diversa distribuzione spaziale: in particolare nei prodotti di lunghezza inferiore ai 30 cm la maggior parte dei parassiti era presente a livello viscerale e celomatico mentre in quelli di lunghezza superiore ai 30 cm il 55 e il 41% di parassiti è stato rinvenuto rispettivamente a livello celomatico e muscolare. Tutte le larve identificate appartengono alla specie *A. pegreffii*. Con l'applicazione dello schema SADE *S. scombrus* e *E. encrasicolus* hanno ottenuto il massimo punteggio mentre *M. merluccius* e *T. trachurus* hanno ottenuto punteggi compresi tra 1 e 5. Ai fini esclusivamente commerciali l'attuazione della sorveglianza basata sullo schema predittivo SADE potrebbe rendere più facile per l'azienda categorizzare l'aspetto economico legato alla presenza di parassiti. Lo schema infatti aiuta a comprendere la gravità dell'infestazione e le misure correttive da adottare nell'ambito dei piani di

autocontrollo relativi alla commercializzazione di prodotti della pesca che presentano punteggi più bassi.

## C18

### Indagine sulla qualità igienico sanitaria e sulla corretta identificazione dei prodotti ittici nella ristorazione collettiva del Triveneto

Michela Rabini, Giuseppe Arcangeli, Mariachiara Armani, Michele Civettini, Gabriella Conedera, Michela Favretti, Rosaria Lucchini, Sabrina Paternolli, Alessandra Pezzuto

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Legnaro (PD), Italy

Negli ultimi anni i prodotti ittici sono diventati una componente sempre più richiesta nelle mense pubbliche di ospedali, case di cura assistenziali e scuole grazie alla crescente convinzione delle proprietà nutrizionali e salutistiche. Tra i prodotti ittici è aumentata la commercializzazione di quelli già lavorati, più pratici ma che possono esporre il consumatore ad un maggior rischio dal punto di vista microbiologico, per la possibile presenza di allergeni e per la difficoltà di riconoscere la specie ittica in base alle sole caratteristiche morfologiche. Diventa importante, per la tutela del consumatore, implementare le strategie di controllo nel campo della ristorazione collettiva. Con il progetto di ricerca finanziato dal Ministero della Salute RC IZSVE 06/11, è stata valutata l'esposizione del consumatore a pericoli igienico-sanitari legati al consumo di prodotti ittici, parallelamente alla valutazione della problematica degli allergeni e alla verifica di eventuali sostituzioni di specie riguardanti tali alimenti. Sono state considerate quattro categorie: materia prima cruda e cotta, prodotti della pesca lavorati da cucinare e cotti. Per valutare il rispetto dei criteri di produzione degli alimenti sono stati analizzati 134 campioni per i parametri di sicurezza alimentare e di igiene di processo. L'identificazione della specie ittica per la valutazione della corrispondenza con quanto riportato in etichetta, è stata effettuata mediante metodiche biomolecolari (sequenziamento del gene *COI*) in 101 campioni di prodotti ittici. Per la ricerca degli allergeni ci si è indirizzati verso le problematiche più frequenti nella ristorazione collettiva e si è deciso di adottare metodiche immunoenzimatiche per l'analisi quantitativa delle proteine del glutine e di crostaceo, analizzando rispettivamente 52 e 19 campioni. Da una valutazione generale dei risultati relativi al controllo microbiologico dei prodotti alimentari si evince che se il prodotto ittico viene sottoposto ad una adeguata cottura, difficilmente si possono riscontrare cariche batteriche superiori a  $10^3$  ufc/g. I criteri di sicurezza alimentare sono sempre stati rispettati. Solo in tre casi è stata rinvenuta la presenza di *Listeria monocytogenes* in campioni costituiti da materia prima ittica congelata. Dei 101 campioni sottoposti all'identificazione di specie ittica, il 4% è risultato non sequenziabile, mentre il 20% è risultato non conforme. I pesci che più frequentemente sono risultati oggetto di sostituzione sono stati il merluzzo, l'halibut, la cernia e la platessa. Comunque, nei casi in cui si è verificata sostituzione di specie tutti i pesci appartenevano a specie commestibili. I risultati ottenuti dall'analisi dei campioni per la ricerca di allergeni hanno evidenziato una bassa frequenza di contaminazione in fase di produzione, rispettivamente del 2% per il glutine e del 6% per le proteine di crostaceo. I risultati ottenuti dalle analisi non mostrano un particolare rischio per il consumatore dal punto di vista microbiologico. Nei campioni per la ricerca di allergeni è stata evidenziata una bassa frequenza di contaminazione in fase di produzione e all'identificazione biomolecolare sono state rilevate sostituzioni di specie ittiche con risvolti solamente di tipo

commerciale ma non sanitario (assenza specie tossiche). Resta comunque di fondamentale importanza mantenere le strategie di controllo nel campo della ristorazione collettiva.

## C19

### Distribuzione di inquinanti organici persistenti in campioni di tonno in relazione a differenti zone FAO di pesca

Giuseppe Labella,<sup>1</sup> Sara Panseri,<sup>2</sup> Francesco Arioli,<sup>1</sup> Luca Chiesa<sup>2</sup>

<sup>1</sup>VESPA, Dipartimento di Scienze Veterinarie per la Salute, la Produzione Animale e la Sicurezza Alimentare; <sup>2</sup>DIVET, Dipartimento di Scienze Veterinarie e Sanità Pubblica, Università degli Studi di Milano, Milano, Italy

Gli inquinanti organici persistenti (POPs) rappresentano una vasta gamma di contaminanti ambientali ed alimentari. Essi hanno, come caratteristica principale, la capacità di essere molto stabili e perdurare nell'ambiente nel tempo (si parla anche di decine di anni). Grande attenzione è rivolta nei confronti dei POPs per quanto concerne i programmi di sicurezza alimentare, poiché possono distribuirsi ed accumularsi all'interno degli organismi con conseguenti rischi per la salute dei consumatori. Nel presente studio si è valutata la presenza dei POPs in campioni di tonno provenienti da 4 zone FAO differenti (FAO 51, FAO 71, FAO 34; FAO 37) in modo da avere una visione quanto più ampia sulla loro distribuzione nelle principali zone di pesca. 29 composti (6 Policlorobifenili (PCBs), 16 organoclorurati (OCs) e 7 Polibromodifenileteri (PBDEs)) sono stati selezionati come rappresentativi dei POPs per le analisi; il tonno invece è stato scelto come matrice per due ragioni: in primis poiché essendo un pesce di grandi dimensioni all'apice della catena alimentare bioaccumula, e poi perché è principalmente distribuito nelle acque, in mare aperto, delle regioni tropicali e temperate di tutto il mondo, come appunto l'oceano Pacifico, Atlantico, Indiano ed anche il mar Mediterraneo. 80 campioni di muscolo di tonno (20 per ogni zona FAO) sono stati analizzati utilizzando la Gas-Cromatografia accoppiata con la Spettrometria di massa tandem (GC-MS/MS); come metodica estrattiva si è ricorsi all'estrazione accelerata con solvente (ASE) seguita da una fase di clean-up con cartucce per estrazione in fase solida (SPE). Residui di molti POPs sono stati trovati nei campioni analizzati. I PCB risultano essere i contaminanti più presenti, infatti sono stati rilevati in tutti i campioni provenienti dalle zone FAO prese in considerazione, mentre solo alcuni degli OCs e dei PBDEs risultano essere presenti e non in tutti i campioni. La zona FAO 37, corrispondente al mar Mediterraneo, è la più inquinata, infatti mostra concentrazioni molto più elevate di PCBs, inoltre sono presenti anche alcuni OCs che non sono stati rilevati in nessuna delle altre zone in questione. I risultati di questo studio mostrano che gli inquinanti presi in considerazione sono distribuiti diversamente nelle diverse aree, ed hanno anche una diversa prevalenza, maggiore soprattutto nella zona del Mediterraneo, in seguito alle caratteristiche geografiche del mare stesso.

## C20

### Influenza dei trattamenti tecnologici di reidratazione su parametri microbiologici e sensoriali in baccalà

Francesco Chiesa, Benedetta Coda, Alessandra Dalmaso, Tiziana Civera

Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università di Torino, Torino, Italy

Per garantire la conservabilità di un prodotto salinato reidratato è

necessario utilizzare, oltre a corrette pratiche igieniche ulteriori barriere quali il confezionamento in MAP e additivi ad azione conservativa, tra cui si ricordano a. citrico, a. lattico, sorbato. Lo scopo del lavoro è stato quello di valutare la conservabilità, di due tipologie produttive: i filettoni di baccalà reidratato e un prodotto cubettato, pronto al consumo, mediante analisi sensoriali e microbiologiche. Oltre a valutare l'effetto dei trattamenti sulle caratteristiche microbiologiche ed organolettiche dei prodotti, lo studio si proponeva anche l'obiettivo di valutare la possibilità di fissare dei limiti, in particolare per gli alteranti specifici come *Shewanella spp.*: valutare, quindi, la possibilità di mettere in relazione l'accettabilità del prodotto, dal punto di vista commerciale, con i dati quantitativi relativi ai microrganismi presi in esame. Le analisi sono state eseguite su due distinti lotti nei seguenti giorni: zero (corrispondente al giorno del campionamento), cinque, nove, tredici e diciannove. I prodotti, entrambi confezionati in MAP (50% di CO<sub>2</sub> e 50% di N<sub>2</sub>), in confezioni con film barrierato, sono stati trattati al termine della fase di reidratazione di circa 60 ore nei modi seguenti: a) acido lattico (circa 3 litri sua 800 litri di acqua con monitoraggio del pH che si mantiene tra 2 e 3), per 8-10 ore; b) Come nel precedente, ma con aggiunta di sorbato di potassio in un passaggio finale alla concentrazione di 0,5‰ finale (permanenza nella soluzione per 3 min). Su entrambi i prodotti sono state eseguite ricerche sui seguenti parametri: -carica batterica mesofila (CBM, 30°C); -Enterobatteriacee; -lieviti; -*Shewanella spp.* E' stata inoltre effettuata la ricerca di eventuali microrganismi patogeni (*Listeria monocytogenes* e *Staphylococcus aureus*). La ricerca di ogni parametro è stata condotta seguendo le metodiche ISO di riferimento. Tutte le prove sono state eseguite in doppio. I dati relativi alle voci microbiche sono stati analizzati con il T test per dati appaiati per verificare se gli effetti dei due trattamenti fossero statisticamente significativi. E' importante evidenziare che da nessun campione sono stati isolati batteri patogeni. I campioni di tartare trattati con sorbato hanno evidenziato un profilo microbiologico migliore dei campioni non trattati (T test <=0,05). I risultati ottenuti risentono della variabilità dei lotti commerciali, in quanto il produttore pur selezionando attentamente i fornitori, non riesce ad ottenere un prodotto con caratteristiche standard, pur trattandosi sempre di prodotto salato a secco, proveniente da merluzzo nordico dichiarato lavorato a fresco, privo di additivi in origine. I trattamenti con sorbato, pur a basse concentrazioni, al di là delle caratteristiche microbiologiche strette, fortemente influenzate dalla qualità della materia prima, evidenziano un effetto favorevole soprattutto sulle caratteristiche sensoriali, che si mantengono migliori (tessitura, odore, lucentezza della muscolatura, odore) nel prodotto che subisce trattamento con a.lattico e sorbato, anche per quanto riguarda i filettoni. I risultati del presente lavoro confermano l'efficacia del trattamento con sorbato associato al confezionamento in MAP, importante soprattutto per la tartare, dove si osserva, in particolare, un significativo contenimento dello sviluppo di *Shewanella spp.*

## C21

### Indagine sulla prevalenza di *V. parahaemolyticus*, *V. cholerae*, *V. vulnificus* in *Ruditapes philippinarum* (Adams & Reeve, 1850) dell'Emilia Romagna e della Sardegna

Pier Luca Passalacqua, Emanuele Zavatta, Giorgia Bignami, Andrea Serrano, Patrizia Serratore

Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Università di Bologna, Bologna, Italy

*R. philippinarum* è una delle specie di molluschi bivalvi maggiormente coltivate nel mondo. La produzione nazionale, prevalentemen-

te di acquacoltura, è concentrata nell'Adriatico nordoccidentale dal Friuli-Venezia Giulia all'Emilia Romagna, mentre in Sardegna è attualmente marginale e prevalentemente di pesca, ma con prospettive di ulteriore sviluppo. Circa il 93% delle infezioni associate al consumo di bivalvi è attribuibile alla contaminazione primaria, ed i vibroni marini quali *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* e *V. cholerae*, sono responsabili della maggior parte delle infezioni di natura batterica. Lo scopo del presente studio è stato quello di accertare la prevalenza di questi target e dei ceppi potenzialmente patogeni, in *R. philippinarum* proveniente dall'Emilia Romagna e dalla Sardegna. I target batterici sono stati ricercati utilizzando il metodo del triple plating: isolamento su CHROMagar™ Vibrio e successivo trapianto su TCBS (Thiosulfate-citrate-bile salts-sucrose) Agar ed m-CPC (modified-Cellulose-Polymyxin B-Colistin) Agar. Le colonie sospette sono state purificate e sottoposte a test biochimico funzionali, nonché a genotipizzazione mediante tecniche di PCR. Per la conferma dei tratti di specie sono stati utilizzati come marcatori toxRP per *V. parahaemolyticus*, vvhA e hsp per *V. vulnificus*, toxRC e hlyA per *V. cholerae*. Come determinanti di patogenicità sono stati utilizzati tdh e trh per *V. parahaemolyticus*; vcg, CPS, 16s-rRNA per *V. vulnificus*; tcpI, tcpA, ctxA, ctxB, stn/sto per *V. cholerae*. Inoltre i campioni della Sardegna sono stati analizzati mediante Multiplex PCR allestita per i marcatori di specie toxRP, vvhA, toxRC, ed applicata direttamente all'omogenato previo arricchimento in acqua peptonata alcalina. *Vibrio parahaemolyticus* è stato isolato nel 30,3% dei campioni della Sardegna, tutti ceppi negativi ai marcatori di patogenicità, e nel 27,8% dei campioni dell'Emilia Romagna, di cui il 18,2% positivi per i marcatori di patogenicità. *V. vulnificus* è stato isolato nel 10% dei campioni dell'Emilia Romagna, di cui il 37,5% dei ceppi positivo per uno o più dei marcatori di patogenicità, e nel 6% dei campioni della Sardegna, tutti ceppi negativi ai marcatori di patogenicità. *V. cholerae* non è stato isolato nei campioni dell'Emilia Romagna, mentre è stato isolato in un campione della Sardegna, ceppo negativo ai marcatori di patogenicità. L'indagine con multiplex PCR sui molluschi della Sardegna ha confermato la positività per *Vibrio vulnificus* ottenuta con isolamento e successiva genotipizzazione. La positività per *V. parahaemolyticus* è risultata del 63,6%, più che doppia rispetto ad isolamento e genotipizzazione, mentre ha dato risultati negativi per *V. cholerae*. La prevalenza di *V. parahaemolyticus* è risultata molto simile nelle due aree, ma con differenze sostanziali rispetto al riscontro dei caratteri di patogenicità, non rilevati nei ceppi dei campioni della Sardegna. La prevalenza di *Vibrio vulnificus* è risultata maggiore in Emilia Romagna con presenza di ceppi positivi ai marcatori di patogenicità. *V. cholerae* è stato isolato unicamente in Sardegna. L'impiego della multiplex PCR, sembra fornire maggiori riscontri di positività rispetto al metodo colturale solo per *Vibrio parahaemolyticus*, specie normalmente più abbondante degli altri target nei campioni ambientali, evidenziando che anche con arricchimento sussiste un significativo limite di sensibilità del metodo.

## C22

### Valutazione della potenzialità applicativa dei molluschi bivalvi filtratori come bioindicatori di inquinamento da patogeni virali nelle acque costiere: risultati preliminari

Giovanna Fusco,<sup>1</sup> Maria Grazia Amoroso,<sup>1</sup> Luisa Marati,<sup>1</sup> Aniello Anastasio,<sup>2</sup> Achille Guarino,<sup>1</sup> Giorgio Galiero,<sup>1</sup> Maurizio Viscardi,<sup>1</sup> Barbara Cioffi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Dipartimento di Sanità Animale, Portici (NA); <sup>2</sup>Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali, Università degli Studi di Napoli, Napoli, Italy

Il monitoraggio delle acque costiere, relativamente alla presenza di contaminanti virali responsabili di gravi gastroenteriti dell'uomo a trasmissione oro-fecale, è un argomento ancora oggi trascurato dall'attuale normativa. Quest'ultima infatti prevede, per la classificazione delle acque di allevamento dei molluschi eduli lamellibranchi (MEL), il conteggio del solo indicatore *E. coli*, nonostante sia ormai noto che un marcatore biologico, per essere definito tale, deve avere caratteristiche fisiche e biochimiche simili al patogeno da ricercare. Scopo di questo studio è stato quello di individuare un virus di interesse zoonosico in MEL, da impiegare come indicatore virale, in affiancamento al conteggio di *E. coli*, in Piani di sorveglianza per la valutazione del grado di fecalizzazione di specchi d'acqua adibiti all'allevamento. Nel presente studio sono stati esaminati 90 campioni di MEL provenienti da allevamenti situati in zone di classe A e B delle province di Napoli e Caserta. I campioni sono stati prelevati dai Servizi Veterinari delle ASL durante le attività previste dai piani di monitoraggio. Per ogni campione sono stati ricercati, mediante Real-time PCR, virus enterici quali Epatite A (HAV), Epatite E (HEV), Norovirus GI (NGI) e GII (NGII), Rotavirus, Astrovirus, Adenovirus. In aggiunta ai patogeni virali, sono stati ricercati anche *Toxoplasma gondii* ed *E. coli*. Il genoma di HAV e NGI e NGII è stato ricercato mediante la metodica di *Real-Time PCR* descritta nella norma UNI CEN ISO/TS 15216-2:2013. Per la ricerca di HEV e *Toxoplasma* sono stati impiegati protocolli di *Real-time PCR* riportati in letteratura. Infine, per la ricerca di Rotavirus, Astrovirus e Adenovirus sono stati utilizzati i kit Ceeram Tools (Ceeram SAS, France). Dei 90 campioni analizzati, 41 sono risultati positivi ad almeno un target virale. Astrovirus e NGII sono i virus riscontrati con maggiore frequenza, rispettivamente in 31 e 21 campioni. I Rotavirus sono stati rilevati in 7 campioni, *Toxoplasma gondii* in 3 campioni. Nessun campione è risultato positivo a HEV e Adenovirus. Le infezioni miste da NGI, NGII, Rotavirus e Astrovirus sono state riscontrate in 5 dei 90 campioni esaminati. Nell'unico campione positivo a HAV è stato rilevato anche Astrovirus. Tutti i MEL positivi al target virale risultavano conformi al parametro *E. coli* fissato dal Reg. CE 2073/2005. I dati raccolti evidenziano la presenza di contaminanti virali anche in MEL provenienti da acque classificate A. La presenza di *E. coli* non è associata alla presenza del target virale, così come già riportato in letteratura. Astrovirus e Norovirus risultano essere i patogeni virali enterici più diffusi. La contemporanea presenza di Astrovirus nel campione positivo all'HAV potrebbe suggerire, in via preliminare e se confermato da ulteriori analisi, la ricerca di tale virus quale marcatore virale, insieme a *E. coli*, in piani sanitari di monitoraggio delle acque. In conclusione, i riscontri ottenuti nel presente studio evidenziano la necessità di non sottovalutare i contaminanti virali nelle acque di allevamento. Potrebbe pertanto risultare errata la strategia di rimandare la scelta di apportare integrazioni all'attuale normativa, e questo anche alla luce dei recenti episodi di malattia nell'uomo e dei ritrovamenti di HAV nei mitili allevati in regione Campania che hanno fatto scattare sistemi di allerta e preoccupazione nel consumatore finale.

## C23

### Ricerca e caratterizzazione genotipica di *Toxoplasma gondii* in mitili allevati e commercializzati nella Regione Sardegna

Tiziana Tedde,<sup>1</sup> Sara Salza,<sup>1</sup> Annunziata Giangaspero,<sup>2</sup> Marianna Marangi,<sup>2</sup> Edoardo Marongiu,<sup>1</sup> Sebastiano Virgilio<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Struttura Complessa Igiene degli Alimenti, Sassari; <sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Agrarie, degli Alimenti e dell'Ambiente, Università di Foggia, Foggia, Italy



Scopo del lavoro è stato quello di acquisire dati epidemiologici sul livello di contaminazione da *Toxoplasma gondii* in mitili allevati nella regione Sardegna e sui genotipi presenti, standardizzare metodi d'identificazione e caratterizzazione genotipica e fornire un contributo alla valutazione del rischio. Nel periodo compreso tra i mesi di settembre del 2013 e del 2014 sono stati sottoposti ad indagini molecolari per la ricerca di protozoi zoonotici della specie *T. gondii* n. 137 campioni di mitili, per un totale di 1644 esemplari, provenienti da 17 diverse zone di produzione ubicate lungo tutte le coste della Sardegna e dal circuito commerciale. Dagli esemplari costituenti ciascun campione sono state prelevate branchie e ghiandole digestive (epatopancreas) per formare due distinti *pool* (per un totale di n. 274 *pool*), sottoposti entrambi ad una fase preliminare di concentrazione delle (oo)cisti. Successivamente da ciascun *pool* si è proceduto all'estrazione del DNA genomico, poi sottoposto a *Real Time PCR* per la ricerca del gene B1 di *T. gondii*, con l'utilizzo dei *primers* ToxB-41f e ToxB-169r e a genotipizzazione mediante analisi HRM. Al fine di confermare i genotipi ottenuti, i campioni positivi per *T. gondii* sono stati sequenziati con gli stessi *primers* utilizzati nelle rispettive reazioni di PCR. Sono risultati positivi alla *Real Time PCR* per *T. gondii* complessivamente n. 28 campioni di mitili (20,43%), per un totale di 336 esemplari, tutti appartenenti alla specie *Mytilus galloprovincialis*. Dei 28 campioni positivi, n. 20 (71,4%) sono stati prelevati in allevamento, n. 8 (28,5%) nell'ambito del circuito commerciale. Relativamente ai *pool* di branchie ed epatopancreas analizzati, sono risultati positivi in tutto n. 36 *pool* (13,1%), di cui 20 (14,5%) di epatopancreas e 16 (11,6%) di branchie. Nell'ambito dei 28 campioni positivi, è stata riscontrata presenza di *T. gondii* in n. 8 campioni (28,5%) sia nel *pool* di branchie che di epatopancreas. Dei 36 *pool* positivi per *T. gondii* n. 29 (80,5%) provenivano da 11 diverse zone di produzione (64,7%). L'analisi HRM dei campioni positivi ha evidenziato l'appartenenza al Tipo I di *T. gondii*. Il sequenziamento ha confermato tale risultato. Il presente contributo rappresenta la prima segnalazione di oocisti di *T. gondii* Tipo 1 in campioni di mitili allevati e commercializzati in Italia. Il riscontro di (oo)cisti protozoarie non solo in campioni di mitili in allevamento ma anche in campioni immessi nel circuito commerciale rappresenta una indicazione, seppure indiretta, della scarsa efficacia dei trattamenti di depurazione dei molluschi attualmente in uso nei confronti di tali organismi. L'utilizzo del solo parametro *E. coli* per la classificazione delle acque di allevamento e l'esiguità del numero e della tipologia dei criteri di sicurezza previsti dalla normativa vigente per i molluschi bivalvi destinati al consumo umano diretto, suggerisce l'eventualità di una possibile revisione degli stessi criteri con l'inserimento, ad es., di *T. gondii*. Considerata inoltre la particolare suscettibilità alle infezioni da *Toxoplasma* da parte di alcune categorie di consumatori (immunodepressi, donne in gravidanza), sarebbe auspicabile un'integrazione della normativa sull'etichettatura di tali prodotti, con particolare riferimento al rischio sanitario conseguente ad un inadeguato trattamento di cottura.

## C24

### Nuove disposizioni per l'etichettatura dei prodotti della pesca: difficoltà applicative del Regolamento (UE) n. 1379/2013

Priscilla D'Amico, Lorenzo Castigliengo, Alessandra Guidi, Daniela Gianfaldoni, Andrea Armani

Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università di Pisa, Pisa, Italy

L'Unione Europea (UE), con il suo piano di rinnovamento della politica comune della pesca e dell'organizzazione comune del mercato, con il capo IV del Regolamento (UE) n. 1379/2013 ha introdotto nuovi requisiti in materia di etichettatura dei prodotti della pesca. Essi, oltre a fornire ai consumatori una più completa informazione, integrando il Reg. (UE) n. 1169/2011, sono stati concepiti come strumento di prevenzione delle frodi e della pesca illegale. Tuttavia, il suddetto Reg. presenta alcune controversie che hanno suscitato non poche perplessità. Queste riguardano le categorie di prodotti della pesca che ricadono sotto il capo IV e le modalità di informazione al consumatore in sede di somministrazione. Pertanto, l'obiettivo di questo lavoro è stato quello di analizzare le principali difficoltà applicative del capo IV e di fornire delle linee guida a supporto degli Operatori del Settore Alimentare (OSA) e delle Autorità di Controllo coinvolte. È stata effettuata un'analisi del capo IV del Reg. (UE) n. 1379/2013, confrontandolo con quanto previsto dalle precedenti normative (Reg. (CE) n. 104/2000 e n. 2065/2001). Inoltre, sono stati analizzati i Capitoli 3 e 16 del Reg. di esecuzione (UE) n. 1001/2013 sulla nomenclatura combinata. Infine, sono state analizzate le definizioni di *prodotto trasformato*, *prodotto non trasformato* e *trattamento* contenute nel Reg. (CE) n. 852/2004 e di *prodotti della pesca preparati* e *prodotti della pesca freschi*, inclusi del Reg. (CE) n. 853/2004. Per quanto riguarda i prodotti *processati*, alcuni di essi (affumicati, cotti o salati) sono esplicitamente inclusi nel campo d'applicazione, mentre altri sono estromessi (sughi e conserve) o non specificati (marinati). Inoltre, il quadro è ulteriormente complicato dal fatto che le categorie dei prodotti specificate dal Regolamento non corrispondono alle definizioni di prodotto trasformato previste dai regolamenti del Pacchetto Igiene. Controverta è invece l'esclusione dall'obbligo di etichettatura degli invertebrati acquatici, come ricci o cetrioli di mare, che ad oggi sono molto consumati in UE. Infine, è stata evidenziata una certa ambiguità per quanto riguarda l'informazione al consumatore in sede di ristorazione collettiva. Se da un lato il Regolamento richiama all'obbligo di informare i consumatori anche in questa sede, di fatto, come esplicitato dall'UE, gli OSA non sono tenuti a riportare le menzioni obbligatorie nei propri menù. Infatti, è sufficiente che esse siano fornite su richiesta del consumatore o dell'autorità competente. Ciò sembra però collidere con i dettami del capo IV, secondo il quale i prodotti della pesca destinati al consumatore finale o alle collettività devono riportare, tramite un *contrassegno* o un'etichettatura, le informazioni, sottintendendo presumibilmente che esse siano pubblicamente visibili. Questo lavoro conferma la difficoltà nell'individuazione delle categorie di prodotti della pesca sottostanti al capo IV. In taluni punti, le nuove disposizioni in materia di etichettatura dei prodotti della pesca non sembrano propriamente rispecchiare i principi europei sulla trasparenza di informazione al consumatore. Sarebbe auspicabile che, ai fini di colmare le lacune applicative del capo IV, fossero definite a livello europeo delle linee guida ufficiali in grado di supportare in maniera chiara e pratica gli OSA nei loro adempimenti comunitari, soprattutto quelli riguardanti la ristorazione collettiva.

## C25

### Contaminazione da Salmonella in un macello suino: analisi di carcasse e superfici a contatto

Silvia Bonardi,<sup>1</sup> Irene Alpigiani,<sup>1</sup> Ilaria Bruini,<sup>1</sup> Alice Vismarra,<sup>1</sup> Elena Barilli,<sup>1</sup> Franco Brindani,<sup>1</sup> Marina Morganti,<sup>2</sup> Paola Bellotti,<sup>2</sup> Stefano Pongolini<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Medico Veterinarie, Unità di Ispezione degli Alimenti di origine animale, Università di Parma, Parma; <sup>2</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Parma, Italy



Il suino rappresenta un importante serbatoio di Salmonella, che può contaminare carni fresche e prodotti derivati. Diverse misure preventive possono ostacolare la diffusione di tali microrganismi dall'animale alle carni durante la macellazione, essendo questa un processo critico per il controllo della contaminazione da Salmonella sulle carcasse suine. Nel presente lavoro si è valutata la prevalenza di contaminazione da Salmonella sulle carcasse e sulle superfici a contatto in un grande macello del nord Italia, mettendo in evidenza aspetti importanti legati al processo produttivo. Nel periodo aprile 2014–maggio 2015, in un macello del Nord Italia, sono state analizzate 90 carcasse suine, appartenenti a 20 lotti di animali, e 21 superfici a contatto. Il campionamento è stato eseguito durante sette visite, intervallate di circa due mesi. Durante ogni sessione si sono campionate tre superfici e 10-20 carcasse, mediante l'impiego di spugne sterili 3M Sponge Stick imbevute di BPW. Sulle carcasse sono stati analizzati 100 cm<sup>2</sup> di 4 siti (gola, lombo e coscia sulla superficie esterna e costato nella superficie interna) per un totale di 400 cm<sup>2</sup>, mentre per le superfici, quali tavoli di sezionamento, nastri trasportatori e attrezzature, le aree campionate variavano da 300 a 500 cm<sup>2</sup>. I campioni sono stati analizzati mediante il sistema di rilevazione molecolare Salmonella Molecular Detection System (3M) basato sull'amplificazione isoterma del DNA. I campioni positivi sono stati confermati mediante metodo ISO 6572:2002. Gli isolati sono stati tipizzati dal punto di vista sierologico (schema di Kaufmann-White-Le Minoir) e genotipico (XbaI PFGE). La prevalenza di contaminazione da Salmonella nelle carcasse suine è risultata pari al 17,8% (16 positivi/90 carcasse) (IC 95%: 10,5-27,3). Nelle 7 sessioni di campionamento la prevalenza di carcasse contaminate ha fatto registrare ampie variazioni, passando dallo 0,0% (0/20) al 6,7% (1/15), 10% (1/10), 40% (4/10) e 60% (9/15). Le sierovarianti isolate sono state *S. Typhimurium* variante monofasica (formula antigenica 4,[5],12:i:-) (37,5%), *S. Rissen* (37,5%), *S. Derby* (12,5%) e *S. Bovismorbificans* (12,5%). Nell'ambito di ciascuna sessione di campionamento sono stati individuati identici pulsotipi per le sierovarianti *S. enterica* 4,[5],12:i:-, *S. Rissen* e *S. Bovismorbificans*. Salmonella è stata isolata da tre superfici a contatto (tavoli e nastri trasportatori) con prevalenza pari al 14,3% (3/21). Nell'ambiente di sezionamento sono stati identificati due stipiti di *S. Derby*, appartenenti a pulsotipi diversi, e un ceppo di *S. Livingstone*. Nel macello si sono verificati due episodi che possono influenzare la contaminazione delle carcasse: 1) in un lotto di suini, l'80% delle carcasse esaminate (4/5) era contaminato da *S. Rissen* appartenente ad un unico pulsotipo, mentre il lotto successivo, campionato in sequenza, non mostrava alcuna contaminazione. Questo caso fa presupporre il possibile verificarsi di un *effetto lotto* nella contaminazione da Salmonella; 2) in una sessione di campionamento, in cui si erano verificate interruzioni nel sistema di depilazione dei suini, il 60% delle carcasse (9/15) ed il 66,7% (2/3) delle superfici analizzate sono risultate positive per Salmonella, mettendo in evidenza il ruolo cruciale di una corretta macellazione nel controllo della contaminazione batterica delle carni e dell'ambiente di lavorazione.

## C26

### Studio sull'insorgenza di bioluminescenza in carni avicole refrigerate

Simone Stella, Mario Gennari

Dipartimento di Scienze veterinarie per la salute, la produzione animale e la sicurezza alimentare, Università degli Studi di Milano, Milano, Italy

Scopo di questo lavoro è stato lo studio di un'alterazione delle carni

refrigerate di pollo, consistente in una forma di luminescenza di origine microbica segnalata dall'azienda produttrice. Presso l'azienda di produzione sono stati prelevati alcuni campioni di petto di pollo che presentavano aree superficiali luminescenti. I campioni sono stati sottoposti ad analisi microbiologica, valutando la carica batterica totale, la carica di *Pseudomonas spp.* e la carica di batteri bioluminescenti di origine marina su terreno Glycerol-based Marine Agar (GMA). Dalle piastre di GMA sono stati isolati diversi ceppi luminescenti, alcuni dei quali sono stati sottoposti a sequenziamento genomico della regione V3-V8 del 16S rDNA e a caratterizzazione genetica mediante RAPD-PCR. Sono state effettuate delle prove di riproduzione dell'alterazione su campioni di carni di pollo (a diverse temperature di conservazione), suino e bovino. Gli isolati sono stati inoltre valutati per la possibile produzione di istamina *in vitro* e sulle carni di pollo artificialmente contaminate. È stato attivato un monitoraggio sugli ambienti di lavorazione e sui prodotti, per rilevare la diffusione e la permanenza dei microrganismi luminescenti. Nei campioni alterati è stata rilevata, su terreno GMA, una carica di batteri bioluminescenti pari a  $2.4 \times 10^8$  ufc/g. I ceppi responsabili dell'alterazione sono stati identificati come *Photobacterium phosphoreum*. L'analisi mediante RAPD-PCR ha mostrato la presenza di una certa biodiversità tra ceppi (almeno 5 diversi profili genetici). La semina dei ceppi isolati su campioni di carne di pollo ha permesso di replicare l'alterazione, con un tempo di insorgenza di circa 36 ore a 20°C, 4 giorni a 8°C e 7 giorni a 4°C, in corrispondenza di una carica media di  $3.4 \times 10^7$  ufc/g. La replicazione dell'alterazione è stata minima sulle carni suine, assente su quelle bovine. Circa il 10% degli isolati ha mostrato una marcata capacità di produrre istamina *in vitro*, ma nessuno ha prodotto istamina in campioni di carne di pollo artificialmente contaminati. La frequenza dei fotobatteri nei campioni di carne prodotti in azienda è risultata pari al 2.3%. Il campionamento ambientale ha rilevato la presenza di fotobatteri nello stabilimento (10.7% dei campioni), ma limitatamente ai punti a contatto con il pollame in lavorazione. L'alterazione osservata è già stata ampiamente descritta in prodotti ittici, ma non è stata ancora correttamente segnalata in carni di pollo. La presenza di *P. phosphoreum* su questo substrato risulta particolarmente interessante in quanto si tratta di un microrganismo alofilo legato all'ambiente marino. La fonte primaria di contaminazione risulta ancora di difficile identificazione. I ceppi isolati sono psicrotrofi e possono sopravvivere e moltiplicarsi in ambiente iposalino. Il potenziale rischio per il consumatore appare trascurabile, considerando che non sono noti episodi infettivi causati da questi batteri, e che la loro potenziale produzione di istamina risulta inefficace su carni avicole sperimentalmente inoculate. Inoltre la quantità necessaria di fotobatteri per una manifestazione di luminescenza si associa costantemente a cariche microbiche totali molto elevate, in grado di compromettere lo stato organolettico e la commerciabilità delle carni. L'osservanza delle buone pratiche produttive impedisce l'insorgenza dell'alterazione descritta.

## C27

### Oli essenziali di *Thymus vulgaris* (timo rosso) e *Caryophyllus aromaticus* (chiodi di garofano) per il controllo degli alteranti nelle carni suine in atmosfera protettiva

Serena D'Amato,<sup>1</sup> Giovanni Mazzarrino,<sup>1</sup> Chiara Rossi,<sup>1</sup> Annalisa Serio,<sup>1</sup> Clemencia Chaves López,<sup>1</sup> Gaetano Vitale Celano,<sup>2</sup> Antonello Paparella<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Facoltà di Bioscienze e Tecnologie Agroalimentari e Ambientali, Università degli Studi di Teramo, Mosciano Stazione (TE); <sup>2</sup>Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Bari, Valenzano (BA), Italy

Negli ultimi anni, è stata confermata l'attività antimicrobica degli oli essenziali (OE) e dei loro metaboliti secondari, capaci di inibire la crescita o inattivare le cellule microbiche. L'applicazione di metodi di bioconservazione con OE apre interessanti prospettive anche nell'industria delle carni. Il lavoro si propone di valutare l'effetto del dipping con OE di timo rosso e chiodi di garofano sullo sviluppo della popolazione alterante di carni fresche suine confezionate in atmosfera protettiva (MAP). In particolare, la ricerca si è concentrata su *Brochothrix thermosphacta*, microrganismo alterante di carni fresche confezionate in anaerobiosi o MAP. Cinque ceppi di *B. thermosphacta* (type strain ATCC 11059 e quattro isolati da nuggets di pollo) sono stati impiegati per valutare l'attività antimicrobica *in vitro* di OE commerciali di timo rosso, chiodi di garofano, santoreggia, menta piperita, salvia, rosmarino e origano, mediante la determinazione della MIC (Minimal Inhibitory Concentration) con il metodo delle microdiluizioni. Campioni di 25 g di carni suine refrigerate (Longissimus dorsi, fette) a 48h post mortem sono stati sottoposti a dipping con 2% e 4% OE timo rosso e chiodi di garofano (4 serie di campioni), confezionati in MAP (70% O<sub>2</sub>, 20% CO<sub>2</sub>, 10% N<sub>2</sub>) e conservati a +4°C per 13 giorni. Lo sviluppo della carica mesofila aerobia (CMA) e di *B. thermosphacta* è stato seguito anche in un controllo non trattato con campionamenti ogni due giorni. Gli OE che *in vitro* hanno manifestato una maggiore attività antimicrobica sono stati, nell'ordine: chiodi di garofano (MIC 0,06-0,25%), origano (MIC 0,125-1,0%), santoreggia (MIC 0,25-0,5%) e timo rosso (MIC 0,25-2,0%). Per le prove su carne, abbiamo selezionato il primo e l'ultimo OE in ordine di efficacia (timo rosso e chiodi di garofano), aumentando la dose a 2 e 4%, per considerare l'effetto matrice che rende indisponibile parte del bioconservante. Nel test su alimento, l'OE meno attivo *in vitro* è risultato il più efficace: in presenza di 4% OE timo rosso, la carica iniziale di *B. thermosphacta* subiva un incremento di circa 1 Log UFC/g fino al T6 (2,90 Log UFC/g), mentre il controllo al T6 aveva una carica di 5,35 Log UFC/g. Invece, il trattamento con 4% OE chiodi di garofano non ha determinato differenze significative rispetto al controllo, con 6,40 Log UFC/g dopo 13 giorni a +4°C. La CMA nel controllo a T13 era di 6,93 Log UFC/g mentre nei campioni trattati con i due OE l'unica differenza significativa è stata per 4% OE timo rosso (6,18 Log UFC/g). *In vitro* è emersa una maggiore efficacia dell'OE chiodi di garofano rispetto a quello di timo rosso, mentre *in situ* il timo rosso ha mostrato una maggiore capacità di controllo dello sviluppo di *B. thermosphacta*. La motivazione può essere ricercata nel fatto che *in vitro* si lavora con sistemi semplici, costituiti da brodo di coltura, per cui le variabili sono piuttosto contenute; al contrario, in un sistema complesso come la carne, la composizione del substrato influenza la diffusione dei fitocomplessi contenuti negli OE e le modalità di contatto con il microrganismo. Inoltre il dato MIC ottenuto su specifici ceppi non corrisponde necessariamente al comportamento della specie. Il contenimento dello sviluppo di un alterante come *B. thermosphacta*, attraverso l'impiego di OE, incoraggia la ricerca di metodi alternativi per il prolungamento della *shelf-life* di carni fresche in MAP.

## C28

### Valutazione di iQ-Check STEC kit per lo screening di *Escherichia coli* produttori di Shiga tossine in campioni di carne bovina macinata

Federica Boccia,<sup>1,2</sup> Gian Marco Branzoni,<sup>1</sup> Pina M. Fratamico,<sup>1</sup> Aniello Anastasio,<sup>2</sup> Lori Bagi,<sup>1</sup> Tiziana Pepe<sup>2</sup>

<sup>1</sup>US Department of Agriculture, Agricultural Research Service, Eastern Regional Research Center, Wyndmoor, PA, USA; <sup>2</sup>Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli, Italy

*Escherichia coli* produttori di Shiga tossine (STEC) sono batteri patogeni che possono essere trasmessi all'uomo attraverso il consumo di alimenti o acqua contaminata. Il bovino e altri ruminanti sono considerati il principale serbatoio. Molti alimenti possono essere contaminati da STEC e rappresentare un rischio per la salute del consumatore. Si rende pertanto necessario lo sviluppo di metodi di screening veloci ed affidabili per la ricerca di questi patogeni. Il sierotipo O157:H7 è quello più frequentemente riscontrato nei casi di malattia dell'uomo, seguito dai sierotipi O26, O45, O103, O111, O121 e O145. L'United States Department of Agriculture (USDA) Food Safety and Inspection Service (FSIS) ha stabilito un criterio di assenza questi sierotipi in 325g in carne bovina cruda e in prodotti a base di carne bovina, fornendo un metodo standard per la loro ricerca ed isolamento. Scopo di questo lavoro è stato quello di determinare la presenza di STEC in campioni di carne bovina macinata e artificialmente contaminata mediante un kit di PCR real-time proposto da BioRad e di confrontare i risultati ottenuti con il metodo attualmente utilizzato dall'USDA FSIS. N. 56 campioni di carne macinata sono stati contaminati con 4-19 CFU STEC. N. 28 campioni sono stati omogeneizzati in stomacher, previa aggiunta di 975mL di STEC Enrichment Broth (SEB), secondo il protocollo previsto da BioRad e sottoposti ad arricchimento a 42°C per 12 e 18h. Per i rimanenti 28 campioni è stata seguita la stessa procedura, utilizzando modified Tryptone Soya Broth (mTSB), secondo il protocollo FSIS. L'analisi preliminare dei campioni è stata effettuata tramite iQ-Check STEC VirX e iQ-Check STEC serO (BioRad) per quelli arricchiti con SEB e tramite BAX System Real-Time PCR assays (DuPont) per quelli arricchiti con mTSB. I batteri target sono stati quindi concentrati tramite immunoseparazione magnetica (Life Technologies and Romer Labs) e seminati su Rainbow Agar O157 (Biolog) modificato. Le colonie sospette sono state confermate tramite test di agglutinazione lattica (Abraxis) e successivamente tramite PCR real-time. Tutti i campioni artificialmente contaminati e sottoposti ad arricchimento sono risultati positivi allo screening di STEC con entrambi i kit. Il solo arricchimento del campione per 12h è risultato sufficiente ad individuare livelli anche molto bassi di STEC (meno di 0,1 CFU/g). I valori dei Cicli di Threshold (CT) dei kit iQ-Check STEC (VirX e SerO) e BAX System Real-Time PCR assays non sono sovrapponibili per ogni campione, probabilmente a causa della presenza di un'elevata livello microflora batterica naturalmente presente nei campioni analizzati (circa 4000 CFU/g), di piccole differenze di livello di inoculo e dello stress termico a 4°C al quale sono stati sottoposti i campioni. Non è stata comunque evidenziata alcuna differenza significativa tra i valori di CT ottenuti dai kit prodotti dalle due ditte, che offrono pertanto prestazioni molto simili. Da ogni campione positivo tre colonie sospette sono state isolate e confermate con successo tramite PCR real-time, escludendo ogni possibilità di risultati falsi positivi. Nonostante rimanga necessario l'isolamento di STEC per considerare il campione positivo, i risultati di questo lavoro indicano che i kit iQ-Check STEC (VirX e SerO) possono essere considerati una valida alternativa per lo screening di STEC in campioni di carne bovina macinata.

## C29

### Effetto di diete integrate con estratto di origano (*Origanum vulgare* L.) ed estratto di corteccia di castagno (*Castanea sativa* Mill.) sulle caratteristiche microbiologiche e chimico-fisiche di prosciutto cotto durante il periodo di conservazione

David Ranucci,<sup>1</sup> Dino Miraglia,<sup>1</sup> Massimo Trabalza Marinucci,<sup>1</sup>

Gabriele Acuti,<sup>1</sup> Michela Codini,<sup>2</sup> Maria Rachele Ceccarini,<sup>2</sup>  
Claudio Forte,<sup>1</sup> Raffaella Branciarì<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Medicina Veterinaria; <sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Farmaceutiche, Università degli Studi di Perugia, Perugia, Italy

Scopo del presente lavoro è stato quello di valutare l'effetto di una integrazione della dieta di suini con estratto di origano (*Origanum vulgare* L.) e di corteccia di castagno (*Castanea sativa* Mill.) sulle caratteristiche igienico-sanitarie e chimico-fisiche di prosciutto cotto, durante il periodo di conservazione. Sono stati ottenuti 6 prosciutti cotti da ciascuno di tre gruppi di suini (10 animali per ciascun gruppo) alimentati con una dieta standard (CTRL), una arricchita con 0,2% di estratto di origano (OR) e una con 0,2% di estratto di corteccia di castagno (SCW). I prodotti sono stati affettati e confezionati in atmosfera protettiva (N<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub>=80:20) e quindi analizzati a tre differenti tempi di conservazione (0, 10 e 20 giorni a 4±1 °C). Il potere antiossidante (ORACFL) e la composizione chimica centesimale sono state valutate solo a tempo 0, mentre la carica microbica totale (TVC), il contenuto in batteri lattici (LAB), la conta delle Enterobacteriaceae, la presenza di *Listeria monocytogenes*, il pH, il colore (coordinate L\*a\*b\*), l'azoto volatile basico totale (TVBN) e le sostanze reattive all'acido tiobarbiturico (TBARS) sono state valutate ad ogni tempo di prelievo stabilito. Non sono state riscontrate differenze nella composizione chimica centesimale, pH, luminosità (L\*), TVBN, TVC, LAB ed Enterobacteriaceae tra i campioni appartenenti ai differenti gruppi, né è stata isolata *Listeria monocytogenes*. Sono state invece riscontrate differenze nei valori di ORACFL a tempo 0, di a\* e b\* e di TBARS, a 10 e 20 giorni di conservazione, con valori più alti per ORACFL, a\* e b\* e più bassi per TBARS in SCW e OR rispetto a CTRL. Si conferma come l'aggiunta nella dieta degli estratti considerati non abbia effetto sulle caratteristiche igienico-sanitarie del prodotto durante il periodo di conservazione mentre è stata evidenziata una migliore stabilità ossidativa, avvalorata anche da una maggiore stabilità del colore.

### C30

#### Identificazione di *Listeria spp.* in prodotti a base di carne e stabilimenti di produzione mediante *PCR multiplex*

Roberta Mazza, Francesca Piras, Daniela Ladu, Miriam Putzolu,  
Simonetta Gianna Consolati, Rina Mazzette

Dipartimento di Medicina Veterinaria, Settore Ispezione degli Alimenti di Origine Animale, Università di Sassari, Sassari, Italy

Il genere *Listeria* comprende 6 specie (*L. monocytogenes*, *L. grayi*, *L. welshmeri*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri* e *L. innocua*). *L. monocytogenes* è considerata la più patogena ed è responsabile della maggior parte dei focolai di listeriosi, una malattia a trasmissione alimentare che rappresenta un grave problema per la salute pubblica a causa della severità dei sintomi e del tasso di mortalità, che si attesta al 13%. Gli alimenti pronti al consumo (*Ready-To-Eat*) sono quelli più frequentemente implicati nei casi di listeriosi. Negli ultimi anni sono stati riportati, sia nell'uomo che negli animali, casi di malattia accompagnati da manifestazioni cliniche aspecifiche, attribuiti a specie di *Listeria* diverse dalla *monocytogenes*, quali *L. ivanovi* in pazienti affetti da AIDS, un caso di batteriemia con esito fatale in un paziente di 62 anni causato da *L. innocua* e un caso di meningite attribuito a *L. seeligeri* in un paziente immunocompromesso. Con i metodi colturali più comunemente utilizzati per l'isolamento e l'identificazione, *L. monocytogenes* e le altre specie di *Listeria* presentano strette somiglianze morfologiche e biochimiche. Inoltre, tali metodiche com-

portano lunghi tempi di esecuzione e costi elevati. L'elevata mortalità della listeriosi rende invece necessaria la disponibilità di metodi rapidi e sensibili di rilevamento del patogeno. Lo scopo del presente lavoro è stato pertanto quello di mettere a punto una metodica rapida, sensibile e specifica per il rilevamento delle sei specie di *Listeria* (*L. grayi*, *L. welshmeri*, *L. ivanovii*, *L. monocytogenes*, *L. seeligeri*, *L. innocua*), utilizzando specifiche coppie di *primers* in un'unica reazione di *PCR multiplex*. Sono stati selezionati 118 ceppi di *Listeria spp.* precedentemente isolati in stabilimenti di produzione di salsiccia sarda da matrici carnee e superfici a contatto e non a contatto con le carni. I ceppi sono stati sottoposti a identificazione biochimica mediante sistema API *Listeria* e, successivamente, è stata messa a punto una *PCR multiplex* utilizzando 6 ceppi di referenza. La *PCR* è stata in seguito applicata ai 118 ceppi di *Listeria spp.* ed è stato effettuato un confronto tra i risultati dell'identificazione biochimica e molecolare. Con l'identificazione biochimica n. 73 ceppi (61,9%) sono risultati appartenere alla specie *L. innocua*, n. 26 (22%) a *L. welshmeri* e n. 9 (7,6%) a *L. monocytogenes*. Per n. 10 ceppi (8%) l'identificazione è risultata dubbia. La *PCR multiplex* ha invece mostrato una maggiore specificità rispetto all'identificazione biochimica, permettendo di identificare tali ceppi in maniera univoca. I risultati suggeriscono pertanto che la *PCR multiplex* applicata nella nostra indagine possa rappresentare un test di screening rapido, sensibile e specifico per la rilevazione di tutte le specie di *Listeria*, sia in alimenti che in campioni clinici, ed anche uno strumento utilizzabile ai fini epidemiologici in focolai di tossinfezione alimentare.

### C31

#### Caratteristiche di ceppi di *Lactobacillus sakei* isolati da salumi italiani; focus su ceppi da Ventricina del Vastese

Carmela Amadoro, Franca Rossi, Michele Piccirilli,  
Giampaolo Colavita

Dipartimento di Medicina e Scienze della Salute, Università degli Studi del Molise, Campobasso, Italy

In questo studio isolati batterici provenienti dal salume Ventricina del Vastese, precedentemente identificati come *Lactobacillus sakei*, sono stati caratterizzati dal punto di vista genotipico, fenotipico e sulla base di alcuni tratti tecnologicamente rilevanti. È stato preso in esame un totale di 70 *L. sakei* isolati da ventricine ottenute mediante fermentazione naturale in un singolo impianto di produzione. Sei gruppi genotipici sono stati distinti sulla base dei profili di Rep-PCR con il primer GTG5, alcuni dei quali sono stati isolati solo dai salami stagionati a temperature più basse. Sei ceppi sono stati scelti come rappresentativi di tali genotipi e sono stati caratterizzati ulteriormente mediante la definizione dei profili biochimici ed altre caratteristiche fisiologiche rilevanti per la qualità e l'igiene del prodotto. Una notevole diversità è stata osservata nei loro profili fermentativi e, in base alla capacità di crescita e di acidificazione in estratto di carne, sono stati distinti diversi gruppi. Nessuno dei ceppi ha prodotto istamina o tiramina in piastra. Un ceppo ha mostrato una leggera capacità di inibire *L. monocytogenes* e *L. innocua* in piastra e tutti e sei i ceppi hanno inibito leggermente 12 ceppi di enterobatteri isolati da Ventricina del Vastese. I risultati hanno mostrato che la maggior parte dei ceppi *L. sakei* di può avere un ruolo nel miglioramento della sicurezza igienica di salumi a bassa acidità, nonostante la scarsa capacità acidificante in un substrato simile alla carne. La presenza di ceppi *L. sakei* capaci di produrre amine biogene è improbabile in salumi ottenuti con fermentazione naturale.



## Venerdì 30 ottobre 2015

C32

### Alimenti per l'infanzia: controllo e sicurezza alimentare

Serena Santonicola, Maria Francesca Peruzi, Nicoletta Murru, Raffaella Mercogliano

Dipartimento di Medicina Veterinaria e Produzioni Animali, Università degli Studi di Napoli Federico II, Napoli, Italy

Gli idrocarburi policiclici aromatici (IPA) sono contaminanti ambientali e alimentari prodotti nel corso di processi naturali, antropici e tecnologici, ad azione mutagena, teratogena e oncogena. I bambini sono esposti per via alimentare attraverso il consumo di alimenti per l'infanzia (*Baby Food*). Il Regolamento (CE) n.609/2013 identifica le tipologie di alimenti per l'infanzia per le quali il Reg. (CE) n.1881/06 fissa un limite massimo di 1 µg/kg per il Benzo(a)pirene (BaP) e la somma di un sistema di 4 IPA (BaP, Crisene, Benzo(a)antracene, Benzo(b)fluorantene). Scopo della ricerca è stato quello di valutare la presenza e la distribuzione di IPA in *Baby Food* commercializzati con i principali brand presenti sul mercato. È stato determinato il profilo di 14 IPA in 27 campioni, suddivisi in 5 tipologie, mediante fasi di estrazione del grasso, purificazione su colonnine SPE ed analisi cromatografica HPLC associata a spettrofotometria. I dati ottenuti indicano la presenza dei 14 IPA ricercati, dei marker e di IPA probabili e possibili oncogeni. La media degli IPA totali è risultata pari a 41.32, 52.30, 45.48, 55.37, 50.95 µg/kg, rispettivamente in merende, pappe e pastine, omogeneizzati, yogurt, formaggini. Le concentrazioni medie del BaP hanno raggiunto valori pari a 0.65 µg/kg in merende e omogeneizzati, 1.07 µg/kg nelle pappe e pastine, 0.38 e 0.27 µg/kg in yogurt e formaggini, rispettivamente. La somma dei 4 IPA marker ha mostrato valori medi di 0.55 g/kg per le merende, 1.66 g/kg per le pappe, 1.55 g/kg per gli omogeneizzati, 1.12 g/kg per gli yogurt, 2.16 g/kg per i formaggini. Il superamento del limite normativo per il BaP è avvenuto in 5 campioni distribuiti tra le varie tipologie, esclusi gli yogurt, e in 18 campioni per la somma dei 4 IPA marker. Il profilo degli IPA nei *Baby Food* indica: a) la possibilità di un'esposizione legata al consumo di alimenti in cui sono presenti idrocarburi oncogeni considerati prioritari nella valutazione del rischio di effetti avversi a lungo termine sulla salute umana; b) l'influenza e la pressione della contaminazione ambientale sulle materie prime, lungo la catena alimentare, per la presenza di Antracene, Benzo(a)antracene e Crisene, a basso peso molecolare; c) una possibile duplice fonte di contaminazione negli omogeneizzati, a base di ingredienti di origine animale (prosciutto, pollo, vitello) e vegetale (semolino, pasta, farina di riso), in accordo con l'approccio del margine di esposizione secondo l'EFSA opinion 2008; d) una contaminazione ambientale del latte, ingrediente base di merende, yogurt, formaggini e omogeneizzati di formaggio, a cui si associa quella di origine tecnologica derivante dall'aggiunta dei diversi ingredienti (frutta, semi, aromi di origine vegetale) nel corso della produzione. Il Reg. (CE) n.1881/06 fissa il limite massimo per i soli idrocarburi marker, ma non per il gruppo degli IPA ad alto peso molecolare, ritenuti genotossici e oncogeni. Inoltre stabilisce limiti solo per in alcuni alimenti, compresi quelli per l'infanzia, ma non nel latte, spesso utilizzato come ingrediente-base per i *Baby Food*. Il raggiungimento di un elevato livello di sicurezza alimentare è fondamentale per i bambini, in quanto consumatori sensibili. È necessario migliorare la valutazione del rischio di contaminazione da idrocarburi, identificando le possibili fonti di contaminazione e prendendo in considerazione misure

correttive attuabili per la riduzione dell'impatto ambientale sulle materie prime.

C33

### Etichettatura di Döner Kebab: conformità alle informazioni obbligatorie sugli alimenti secondo la normativa comunitaria

Gaetano Liuzzo,<sup>1</sup> Roberto Rossi,<sup>1</sup> Andrea Serraino,<sup>2</sup> Federica Giacometti,<sup>2</sup> Antonio Poeta<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Azienda Sanitaria Locale, Modena; <sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum-Università di Bologna, Ozzano Emilia (BO); <sup>3</sup>Azienda Sanitaria Locale, Reggio Emilia, Italy

Scopo del presente lavoro è stato quello di verificare la conformità al Reg. (UE) 1169/2011 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 25 ottobre 2011, relativo alla fornitura di informazioni sugli alimenti ai consumatori, di preparazioni a base di carne riferibili a Döner Kebab e testare una check-list, elaborata *ad hoc*, quale strumento di valutazione dell'etichettatura. Mediante l'ausilio di una check list sono state analizzate nove etichette di Döner Kebab, delle quali sono state valutate sia le indicazioni obbligatorie, così come stabilito all'art. 9 del Reg. 1169/2011, con l'eccezione delle indicazioni di cui ai punti 9.1, lettere i), k), l) in quanto o non pertinenti o non obbligatorie nel caso di specie, sia il requisito, obbligatorio per le preparazioni a base di carne, di cui all'art. 5.1, lettera b) ed All. II, Sez. I lettera B) del Reg. (CE) 853/2004. La denominazione dell'alimento non è risultata conforme a quanto stabilito dall'art. 17 ed all'All. VI del Reg. (UE) 1169/2011 in sei casi sui nove esaminati. I motivi delle non conformità sono riferibili a: refusi di varia entità circa la denominazione (3 casi), mancata indicazione dello stato fisico a fianco della denominazione (6 casi) e mancata indicazione delle proteine aggiunte (2 casi). Il requisito relativo all'indicazione obbligatoria degli ingredienti non è mai risultato conforme. In cinque casi su nove l'indicazione delle sostanze allergeniche in etichetta non era realizzata secondo quanto prescritto dall'art. 21. Il requisito relativo all'indicazione della quantità di taluni ingredienti è risultato soddisfatto in soli 5 casi su nove. Dei nove prodotti analizzati l'indicazione della quantità netta è risultata non conforme solo in un caso. L'espressione con cui è stata indicata sia la data di scadenza che il termine minimo di conservazione non è risultata mai conforme a quanto stabilito dall'allegato X. In un caso la lingua utilizzata non era quella italiana e anche la data non è stata indicata in modo conforme in tre casi su nove. L'indicazione della modalità di conservazione è stata considerata sempre necessaria in quanto il prodotto era congelato, e tale requisito non è risultato conforme in sei casi su nove. L'indicazione del nome o la ragione sociale e l'indirizzo dell'OSA responsabile delle informazioni sugli alimenti non è risultata conforme in tre casi su nove. In un caso il requisito riferibile a quanto stabilito dall'art. 5, lettera b) del Reg. (CE) 853/2004 è risultato non conforme per la non leggibilità dell'approval number dello stabilimento di produzione. L'analisi compiuta su nove etichette di Döner Kebab ha permesso di mettere in luce evidenti e grossolane non conformità alla normativa in materia di informazione sugli alimenti. L'impiego della check list di supporto è risultato fondamentale ed indispensabile per una attenta valutazione del rispetto delle prescrizioni stabilite dalla normativa comunitaria. Di rilievo soprattutto le non conformità che riguardano la mancata indicazione di sostanze che provocano allergie o intolleranze e la conseguente impossibilità, da parte degli OSA delle collettività che utilizzano questo tipo di prodotto, di informare correttamente il consumatore finale.



## C34

**Contaminanti ambientali e neonicotinoidi nel miele e nel polline**

Simonetta Menotta,<sup>1</sup> Annunziata Cannavacciuolo,<sup>1</sup> Damiano Accurso,<sup>1</sup> Lucia Piana,<sup>2</sup> Giancarlo Naldi,<sup>2</sup> Giorgio Fedrizzi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Reparto Chimico degli Alimenti, Bologna; <sup>2</sup>Osservatorio Nazionale Miele, Castel San Pietro Terme (BO), Italy

Lo scopo dello studio era quello di verificare il grado di contaminazione di campioni di miele e polline di provenienza nazionale, considerando la diversa origine botanica e regionale. Sono stati analizzati 71 campioni di miele e 54 campioni di polline prodotti nel 2012; il miele di produzione nazionale proveniva da 18 regioni (15 differenti origini botaniche) mentre il polline proveniva da 6 diverse regioni. I campioni sono stati forniti dall'Osservatorio Nazionale Miele. Sui campioni di miele pronto per la commercializzazione e sui campioni di polline sono state eseguite le determinazioni di residui di alcuni fitofarmaci neonicotinoidi: Imidacloprid, Thiametoxan, Acetamiprid, Clothianidin, Thiacloprid; le analisi sono state eseguite mediante tecnica LC-MS/MS. Inoltre su tutti i campioni sono state eseguite le ricerche di Arsenico (As), Cadmio (Cd), Cromo (Cr), Ferro (Fe), Manganese (Mn), Mercurio (Hg), Nichel (Ni), Piombo (Pb), Rame (Cu), Stagno (Sn), Tallio (Tl) e Zinco (Zn); le analisi sono state eseguite con tecnica ICP-MS. In 28 campioni di miele scelti casualmente sono state effettuate le determinazioni delle sostanze perfluoroalchiliche (PFAS) mediante LC-MS/MS. Infine 10 campioni di miele sono stati analizzati per la ricerca di Policlorodibenzodiossine (PCDD), Policlorodibenzofurani (PCDF) e Policlorobifenili diossina-like (PCB-DL) e non diossina-like (PCB-NDL) mediante tecnica HRGC-HRMS. In 11 campioni di miele e 17 campioni di polline è stata rilevata la presenza di neonicotinoidi. In alcuni campioni è stata trovata la contemporanea presenza di 2 o più neonicotinoidi. Thiametoxan e Clothianidin non sono stati rinvenuti nei campioni di miele, mentre nel polline sono stati evidenziati tutti e 5 i composti della famiglia dei neonicotinoidi. Nessun campione presenta concentrazioni superiori ai limiti massimi indicati dal Reg. CE 396/2005 e s.m.i. Il miele di agrumi è risultato essere il più contaminato. Nessun campione di miele e di polline è risultato contaminato da PCDD/F, PCB e PFAS. Le concentrazioni dei singoli elementi rilevate sono risultate diverse in relazione all'origine botanica e regionale del campione. Le concentrazioni di Cd, Fe, Ni, Mn, Zn e Cu erano significativamente più alte ( $p < 0,05$ ) nel polline rispetto al miele; al contrario la concentrazione di Cr era più alta ( $p < 0,05$ ) nel miele. Tra le varie tipologie di miele quello di melata è risultato essere quello in cui sono stati osservati campioni con composizione minerale che, per proporzione dei diversi metalli, si differenziavano dalla norma. In base al recente Regolamento comunitario (UE) n° 2015/1005 del 25/06/2015, che definisce i tenori massimi di Pb applicabili dal 01/01/2016, 3 campioni di miele risulterebbero non conformi per le concentrazioni di Pb rilevate. Lo studio ha evidenziato una relazione tra le origini regionali e botaniche e la contaminazione di miele e polline. Diverse variabili potrebbero influenzare l'origine della contaminazione del miele e del polline, come la pratica del nomadismo, lo scambio di materiale apistico, le pratiche di stoccaggio e di confezionamento.

## C35

**Valutazione del livello di contaminazione da *Listeria monocytogenes* e *Listeria spp.* in Ready-To-Eat sandwiches commercializzati in distributori automatici di differenti strutture ospedaliere**

Francesca Cossu,<sup>1</sup> Carlo Spanu,<sup>1</sup> Silvia Deidda,<sup>2</sup> Erica Mura,<sup>2</sup> Daniele Casti,<sup>1</sup> Carlo Pala,<sup>1</sup> Sonia Lamon,<sup>1</sup> Vincenzo Spanu,<sup>1</sup> Michela Ibbà,<sup>1</sup> Elena Marrocu,<sup>1</sup> Christian Scarano,<sup>1</sup> Andrea Piana,<sup>2</sup> Enrico Pietro Luigi De Santis<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Medicina Veterinaria; <sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Biomediche, Igiene e Medicina Preventiva, Università degli Studi di Sassari, Sassari, Italy

I *Ready-To-Eat food* sono prodotti pronti per il consumo, con o senza preriscaldamento, capaci di dare ristorazione rapida e a basso costo. Questi prodotti, incontrano le esigenze dei consumatori per la velocità e la facilità d'uso. Diverse sono le tipologie presenti in commercio e tra queste i più diffusi sono i *Ready-To-Eat sandwiches* (RTEs). I RTEs sono solitamente costituiti da prodotti da forno (pan carré o altre tipologie di pane), farciti con diversi ingredienti, quali prodotti a base di carne, prodotti caseari, prodotti ittici, vegetali e salse. Presentano *shelf-life* prolungata a temperature di refrigerazione e vengono consumati tal quali, senza subire alcun trattamento. Il presente lavoro è parte di un più ampio progetto di ricerca finanziato dalla Regione Sardegna (Legge n. 7 del 2007, CUP: J71J12000460007), che prevede lo sviluppo di una strategia per incrementare la sorveglianza attiva nei confronti della *Listeria* umana, attraverso lo sviluppo di protocolli operativi per la ricerca di *Listeria monocytogenes* (LM). Tra gli obiettivi del progetto vi era la valutazione del livello di contaminazione da LM in alimenti somministrati a soggetti ospedalizzati o disponibili presso strutture ospedaliere. Pertanto, presso n.6 differenti strutture ospedaliere della Regione Sardegna, si è proceduto all'acquisto random di n. 55 RTEs, presso distributori automatici refrigerati, collocati in prossimità dei reparti o comunque facilmente accessibili ai pazienti ospedalizzati. Nell'arco di 7 mesi sono stati eseguiti 4 campionamenti di RTEs, tutti confezionati in atmosfera modificata e prodotti da n. 5 differenti ditte dell'intero territorio nazionale. È stata determinata la carica microbica totale e la contaminazione da Enterobatteriaceae, *Listeria spp.* e LM, *Pseudomonas spp.*, lieviti e muffe, *Staphylococcus aureus*, Stafilococchi Coagulasi Negativi (SCN), *Salmonella spp.* e *Bacillus cereus*, infine pH,  $a_w$  e composizione del gas dello spazio di testa delle confezioni. I RTEs hanno evidenziato una prevalenza per *Pseudomonas spp.* del 9,1% (n. 5 campioni positivi) con media pari a  $3,40 \pm 0,44$  (media $\pm$ ds)  $\log_{10}$  ufc/gr, per le Enterobatteriacee del 27,3% (n. 15 campioni positivi) con valori di  $2,16 \pm 1,03$   $\log_{10}$  ufc/gr, per i lieviti e muffe del 14,5% (n.8 campioni positivi) con valori di  $3,28 \pm 0,91$   $\log_{10}$  ufc/gr ed infine per gli SCN una prevalenza del 45,5% (n. 25 campioni positivi) e media pari a  $3,49 \pm 0,90$   $\log_{10}$  ufc/gr. Nessun campione analizzato presentava valori superiori al limite di sensibilità del metodo per *Salmonella spp.*, *S. aureus*, *B. cereus* e per *Listeria spp.* secondo metodica quantitativa. La ricerca qualitativa di *Listeria spp.* ha evidenziato n. 9 campioni positivi (16,4%) di cui n. 3 (5,5%) identificati come LM. Questi ultimi erano riconducibili a RTEs prodotti dalla stessa azienda. Pertanto i RTEs potrebbero rappresentare un rischio potenziale, quale veicolo di LM per i consumatori appartenenti a categorie a rischio e tra questi i soggetti ospedalizzati. Di fatto se pur i RTEs esaminati, sono risultati, in tutti i casi, conformi ai criteri microbiologici del Reg. (CE) n. 2073/2005, la disponibilità presso strutture ospedaliere, dovrebbe essere accompagnata da una maggiore informazione verso i soggetti ospedalizzati. Infatti i pazienti dovrebbero essere informati

del fatto che questi prodotti, innocui per i consumatori sani, possono risultare potenzialmente nocivi per consumatori con sistema immunitario deficitario o in alcuni casi compromesso.

### C36

#### **Proteine dell'uovo in alimenti e rischio per il consumatore allergico. Indagine in Regione Piemonte nel biennio 2013-2014**

Daniela Manila Bianchi, Silvia Gallina, Daniela Adriano, Sara Astegiano, Giuseppina Buonincontro, Sandra Fragassi, Walter Vencia, Fabio Zuccon, Lucia Decastelli

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Struttura Complessa Controllo Alimenti e Igiene delle Produzioni, CREALIA Centro Regionale per le Allergie e Intolleranze Alimentari, Torino, Italy

Le allergie alimentari rappresentano una problematica di sanità pubblica con una prevalenza che varia dal 2% al 4% tra gli adulti e fino all'8% tra i bambini. La normativa cogente riconosce 14 ingredienti allergizzanti che devono essere obbligatoriamente inseriti sulle etichette alimentari. Piani di monitoraggio per la verifica della conformità delle etichette sono annualmente inseriti nei Piani Regionali per la Sicurezza Alimentare. Questo lavoro riporta i risultati dei piani 2013-2014, della Regione Piemonte, per la ricerca di proteine dell'uovo (ovoproteine) non dichiarate in etichetta. Lo studio ha permesso di valutare, in termini quantitativi, il rischio per il consumatore allergico, in relazione alla dose che provoca reazione (Eliciting Dose; ED1). Nel presente studio sono inclusi i campioni analizzati per la ricerca di proteine delle uova non dichiarate in etichetta relativi a: Piano Ufficiale regionale di monitoraggio; casi di sospetta reazione allergica; altre segnalazioni da parte di consumatori. I campioni sono stati analizzati con il kit commerciale Elisa Ridascreen Fast El/Egg Protein (R-Biopharm AG). Presso il Centro Regionale per le Allergie e Intolleranze Alimentari (CREALIA) dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Torino, il kit risulta validato e accreditato per l'utilizzo su campioni destinati all'alimentazione umana. Il metodo è caratterizzato da un LOD pari a 0.27 ppm e un LOQ pari a 0.55 ppm di proteine totali dell'uovo. Per valutare il rischio per il consumatore allergico, sono stati considerati la ED1 proposta dallo studio internazionale VITAL2.0 e i livelli di Assunzione di Riferimento di Nutrienti proposti dalla Società Italiana di Nutrizione Umana (SINU). Nel biennio gennaio 2013 - dicembre 2014, presso CREALIA, sono stati analizzati 188 campioni (84 nel 2013; 104 nel 2014) per la presenza di ovoproteine non dichiarate in etichetta. Cinque campioni (2.7% del totale) sono risultati non conformi: tre campioni (3.6%) nel 2013 e due campioni (1.9%) nel 2014. Sebbene non necessario ai sensi della normativa vigente, le analisi sono state eseguite in termini quantitativi e i campioni hanno fatto riscontrare concentrazioni di allergene target da 0.91 ppm fino a 13.5 ppm, pari al limite maggiore che il metodo è in grado di quantificare. Per le tipologie di alimenti non conformi (gnocchi di patate, salsiccia fresca e pasta nel 2013; hamburger e nervetti di vitello cotti nel 2014) sono indicate dal SINU dosi medie di assunzioni che variano da 80g (pasta e nervetti) a 150 g (gnocchi). La ED1 per l'allergene uovo è pari a 0.03 mg di proteine totali. Le potenziali porzioni che un consumatore medio potrebbe ingerire dei cinque campioni positivi per la presenza di uovo superano la ED1 da 2 a 36 volte. L'indagine ha rivelato la presenza di proteine delle uova non dichiarate nel 2.7% dei campioni. Il livello di rischio per i consumatori è risultato potenzialmente elevato poiché la contaminazione si è rivelata essere superiore rispetto alla ED1 fissata a livello internazionale. L'uovo è impiegato nell'industria alimentare come ingrediente o nelle sue diver-

se forme e costituenti, come adiuvante tecnologico o additivo. La sua presenza in impianti di produzioni alimentari è diffusa, così come diffusa può essere la contaminazione accidentale di alimenti che non lo contengono tra gli ingredienti di produzione.

### C37

#### **Impiego di un concentrato di fenoli ottenuto dall'acqua di vegetazione del frantoio nella conservazione di prodotti freschi**

Enrico Novelli,<sup>1</sup> Barbara Cardazzo,<sup>1</sup> Stefania Balzan,<sup>1</sup> Lisa Carraro,<sup>1</sup> Agnese Taticchi,<sup>2</sup> Maurizio Servili,<sup>2</sup> Luca Fasolato<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Biomedicina Comparata e Alimentazione (BCA), Università degli Studi di Padova, Legnaro (PD); <sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari ed Ambientali, Università degli Studi di Perugia, Perugia, Italy

I fenoli sono composti bioattivi contraddistinti da diverse proprietà tra cui quelle antiossidante e antimicrobica. Lo studio descrive l'applicazione di un concentrato fenolico derivante dall'acqua di vegetazione del frantoio (CVW) nella conservazione di due prodotti freschi, pesce e petto di pollo. Il trattamento di superficie è avvenuto a mezzo spray nel caso dell'orata (L1:0.75 mg/mL e L2:1.5 mg/mL) e per immersione nel caso della carne avicola (22 g/L). Dopo il confezionamento in vaschette di polistirolo e pellicola per simulare le condizioni di commercio, i prodotti sono stati refrigerati (3±1 °C) per 10 giorni (petto di pollo) e 14 giorni (orata). La freschezza è stata monitorata utilizzando il quality index method (QIM) per l'orata e uno specifico sensory index per la carne avicola. Per descrivere i cambiamenti nella popolazione microbica sono stati misurati: conta mesofila totale, conta psicofila totale (TPC), Enterobacteriaceae, batteri lattici, *Pseudomonas*, batteri H<sub>2</sub>S produttori, muffe e lieviti. Per determinare gli effetti del concentrato fenolico sulla variabili allo studio, i dati analitici e le valutazioni della freschezza sono stati processati con la *distance based non-parametric permutation methodologies* e *latent variable approaches* (*Principal component analysis PCA* e *Linear discriminant analysis-LDA*). I descrittori delle curve di crescita sono stati ricavati mediante DMfit usando modelli primari di accrescimento microbico. Le concentrazioni impiegate per orata non hanno evidenziato differenze significative. La *shelf-life* è descritta dalla TPC, target selezionato dalla LDA e dalle analisi di comparazione non parametrica con le variabili del QIM. Il DMfit Models suggerisce un effetto solo sulle specie H<sub>2</sub>S-produttrici con un aumento della fase di latenza nei campioni trattati (C: 52 h vs L2: 136 h). L'immersione nel CVW ha invece significativamente modificato il profilo microbico della carne avicola. *Pseudomonas* ed Enterobatteriacee sono risultate fortemente influenzate dal trattamento con una riduzione sia della velocità di crescita che della carica massima raggiunta. Sulla base delle curve di crescita di *Pseudomonas* le carni trattate presentano una *shelf-life* di almeno 2 giorni superiore. I risultati, pur se preliminari, evidenziano le potenzialità di utilizzo di questo concentrato bioattivo in prodotti di origine animale refrigerati.

### C38

#### **Crescita di *Listeria monocytogenes* in tre diverse tipologie di frutta di IV gamma (melone, papaya e mela) durante il periodo di conservabilità**

Giuliana Cammi,<sup>1</sup> Elena Cosciani Cunico,<sup>2</sup> Elena Dalzini,<sup>2</sup> Simone Russo,<sup>1</sup> Paolo Daminelli,<sup>2</sup> Chiara Garbarino,<sup>1</sup> Matteo Ricchi,<sup>1</sup> Norma Arrigoni<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Piacenza; <sup>2</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna, Reparto di Microbiologia, Brescia, Italy

Lo scopo del lavoro è stato quello di valutare il comportamento di *Listeria monocytogenes* in tre differenti tipologie di prodotti vegetali di IV gamma, rappresentati da papaya, melone e mela freschi, commercializzati pre-tagliati in vaschette, da conservarsi a temperatura di frigorifero per un periodo di 7 giorni (compreso il giorno di confezionamento). In relazione al valore di acidità della frutta, sono stati effettuati tre challenge test per verificare il potenziale di crescita ( $\delta$ ) (mela a fette) e il tasso di crescita massimo ( $\mu_{max}$ ) (papaya e melone a pezzi) di *L. monocytogenes*, nei prodotti artificialmente contaminati; i protocolli applicati sono stati quelli indicati dal Documento tecnico di orientamento per gli studi sulla vita commerciale degli alimenti pronti al consumo inerenti *Listeria monocytogenes* AFSSA/ EU Community Reference Laboratory For *Listeria monocytogenes* 2008. Il tasso massimo di crescita ( $\mu_{max}$ ) di *L. monocytogenes*, calcolato grazie al software DMfit, sulla base del modello primario Baranyi, è risultato essere di 0,0445 log<sub>10</sub> UFC/h (tempo di duplicazione 6 ore e 45 minuti) nella papaya a pezzi e di 0,0288 log<sub>10</sub> UFC/h (tempo di duplicazione 10 ore e 45 minuti) nel melone cubettato, conservati rispettivamente alla temperatura statica di 10 e 8°C. Inoltre, utilizzando il modello secondario Ratkowsky, è stato possibile stimare, per questi due prodotti, il tasso massimo di crescita a diverse temperature di conservazione (4, 6 e 12°C) per valutare in quanto tempo (ore e giorni), partendo da livelli ipotetici di contaminazione, viene raggiunto il limite massimo di 100 ufc/g di *L. monocytogenes*, ammesso dal Regolamento (CE) 2073/2005 per gli alimenti pronti per il consumo. Sia nel caso della papaya che del melone, solamente partendo da un livello di contaminazione iniziale estremamente contenuto (1 colonia di *L. monocytogenes*/25 g) e rispettando temperature di conservazione non superiori ai 6°C, si raggiunge il limite normato dal Reg. (CE) 2073/2005, in un tempo superiore a quello della *shelf-life* indicata per questi prodotti. Nella mela a fette il potenziale di crescita massimo ( $\delta$ ) osservato è risultato essere di 0,93 log<sub>10</sub> UFC/g, quindi superiore al limite di 0,5 log<sub>10</sub> UFC/g, che caratterizza gli alimenti che non supportano lo sviluppo di *L. monocytogenes*. Anche la stima della crescita di *L. monocytogenes* effettuata mediante l'utilizzo di modelli predittivi, partendo da condizioni simili a quelle presenti nello studio sperimentale, ha evidenziato tassi di crescita superiori a quelli attesi. La papaya ed il melone si confermano essere substrati favorevoli allo sviluppo di *L. monocytogenes* che può raggiungere, nelle previste condizioni di conservazione di questi prodotti, livelli di contaminazione superiori a quelli consentiti a livello legislativo. Nella mela a fette, la crescita di *L. monocytogenes* è stata superiore a quella attesa per un alimento che, sulla base del valore di acidità, non viene considerato supportante lo sviluppo del microrganismo. I risultati dello studio confermano l'importanza dell'utilizzo dei challenge test microbiologici per la valutazione della *shelf-life* dei prodotti ortofrutticoli freschi pronti per il consumo, al fine di una corretta gestione del rischio alimentare.

### C39

#### Frutti di bosco prodotti in Piemonte: sicurezza sanitaria e qualità microbiologica

Clara Ippolito,<sup>1</sup> Guerrino Macori,<sup>1</sup> Daniela Adriano,<sup>1</sup> Alberto Bellio,<sup>1</sup> Daniela Manila Bianchi,<sup>1</sup> Silvia Gallina,<sup>1</sup> Giovanna Gilardi,<sup>2</sup> Maria Lodovica Gullino,<sup>2</sup> Lucia Decastelli<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Struttura Complessa Controllo Alimenti e Igiene delle Produzioni, Torino;

<sup>2</sup>Centro di Competenza per l'Innovazione in Campo Agro-Ambientale (AGROINNOVA), Università degli Studi di Torino, Grugliasco (TO), Italy

I piccoli frutti (lamponi, ribes, more, mirtillo) rappresentano, all'interno del panorama frutticolo piemontese ed italiano, una piccola ma importante componente. Negli ultimi anni il mercato ortofrutticolo è stato coinvolto in episodi sanitari importanti, quali contaminazioni da *Escherichia coli* verocitotossici (STEC) in germogli di fieno greco e da virus dell'epatite A nei frutti di bosco. Scopo del presente lavoro è stato la caratterizzazione microbiologica dei piccoli frutti coltivati nel territorio piemontese al fine di indagare l'origine delle possibili contaminazioni delle produzioni ortofrutticole e per valutare l'efficacia dei metodi di sanificazione e decontaminazione. Sono stati coinvolti 50 produttori, 25 grandi aziende (dimensione superiore a 2.000mq) e 25 piccole (tra 300 e 1.999mq); per ciascun produttore sono state valutate la tipologia di coltivazione, irrigazione e caratteristiche di manodopera utilizzata. Per i piccoli produttori è stato campionato un lotto (25 campioni), mentre per i grandi sono stati campionati due lotti (50 campioni). Sono stati campionati: 40 mirtillo (53,3%), 27 lamponi (36,0%), 6 more (8,0%) e 2 ribes (2,6%). I campioni sono stati sottoposti alla ricerca del virus dell'epatite A (HAV), *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes* e STEC. Sono stati inoltre valutati i parametri di igiene di processo: *E. coli*  $\beta$ -glucuronidasi positivi, carica batterica totale (CBT) ed Enterobacteriaceae. Per quanto attiene le caratteristiche aziendali, la tipologia di irrigazione utilizzata dalle aziende è a raccolta superficiale (70,0%) o raccolta da pozzo artesiano (30,0%); la manodopera impiegata per la raccolta e cura delle coltivazioni è di tipo avventizia (30,0%) o familiare (70,0%) e la coltura si distingue in tradizionale, con piantagione a terra (94,0%) e fuori dal suolo (6,0%). I campioni sono risultati negativi per HAV e per i patogeni *Salmonella spp.*, *L. monocytogenes* e STEC. La CBT è risultata <10<sup>3</sup> ufc/g in 44 campioni (58,7%), compresa tra 10<sup>3</sup> e 10<sup>4</sup> ufc/g in 20 campioni (26,7%) e compresa tra 10<sup>4</sup> e 10<sup>5</sup> ufc/g in 10 campioni (13,3%); un campione ha avuto un valore di 8,1\*10<sup>6</sup> ufc/g. Il parametro Enterobacteriaceae è risultato <40 ufc/g in 58 campioni (77,3%), compresa tra 10 e 10<sup>2</sup> ufc/g in 9 campioni (12,0%), compresa tra 10<sup>2</sup> e 10<sup>3</sup> ufc/g in 3 campioni (4,0%) e >10<sup>3</sup> ufc/g in 5 campioni (6,7%). Per quanto riguarda il parametro *E. coli*, un solo campione ha evidenziato carica rilevante pari a 4,5\*10<sup>4</sup>; tale campione d'altro canto è quello che ha fatto registrare i più alti livelli di CBT (8,1\*10<sup>6</sup> ufc/g) e di Enterobacteriaceae (5\*1<sup>4</sup> ufc/g). I campioni con elevati valori di Enterobacteriaceae (>10<sup>3</sup> ufc/g), utilizzano una coltivazione tradizionale a terra e una manodopera prevalentemente avventizia (4 su 5); per quanto attiene la tipologia di irrigazione questa sembra essere equamente distribuita sia con l'utilizzo di canali che di pozzi. Le analisi condotte su questa tipologia di prodotto hanno messo in evidenza l'assenza di patogeni nei prodotti freschi campionati. I valori degli indicatori di igiene (carica batterica totale, Enterobacteriaceae e *E. coli*) sono risultati mediamente soddisfacenti, tranne per un campione di mirtillo dove è stata riscontrata la presenza di *E. coli* con un valore di 4,5\*10<sup>4</sup> ufc/g. Considerati gli esiti ottenuti si può considerare la produzione primaria piemontese di frutto di bosco un prodotto ad elevati standard dal punto di vista microbiologico.

### C40

#### Software web-based predittivo semplificato per la gestione ed il controllo della salubrità di alimenti refrigerati

Pierluigi Polese,<sup>1</sup> Manuela Del Torre,<sup>2</sup> Mara Stecchini<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Chimica, Fisica e Ambiente; <sup>2</sup>Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università degli Studi di Udine, Udine, Italy



Allo stato attuale la modellistica nel settore della microbiologia è patrimonio di pochi specialisti, per lo più in ambito accademico. Un software semplificato, in grado di tradurre la realtà in strutture matematiche e viceversa, sarebbe utilizzabile da una utenza molto più vasta, con evidenti ricadute in termini di salubrità degli alimenti e riduzione di costi. Come scopo di questo lavoro, ci si è proposti di sviluppare un software di microbiologia predittiva, di ausilio per i produttori e per gli organi preposti all'attività di controllo e che quindi sia in grado di rispondere ad una esigenza fondamentale del consumatore che richiede alimenti di comprovata salubrità. Il software proposto ha come core un prototipo basato su di una interfaccia growth/no growth semplificata, che, come input, richiede dati chimico-fisici, come temperatura, pH, attività dell'acqua e la quantificazione di eventuali additivi. Il software consente di ottenere la probabilità di crescita di microrganismi patogeni, anche in alimenti complessi, non avvalendosi di costose e laboriose analisi microbiologiche, ma utilizzando dati analitici di base. Una importante funzionalità del sistema permette di valutare il contributo frazionario dei singoli fattori inibitori, così da poter intervenire nel processo tecnologico con approcci mirati. L'associazione con modelli cinetici (cinetica di crescita, cinetica di devitalizzazione), già approntata nel prototipo, consente di calcolare l'entità della crescita o della riduzione microbica in seguito ad un trattamento termico. L'introduzione di un parametro, in grado di integrare la probabilità con il tempo, consente infine di definire una probabilità di crescita relativa ad uno specifico tempo di scaffale. L'adozione del software, che fornisce risposte basate su elementi oggettivi e confrontabili, si traduce in vantaggi sia per i produttori sia per gli organi di controllo. Ai primi consente di orientare possibili interventi correttivi in fase di processo nonché una verifica della coerenza della *shelf-life* impiegata o una eventuale riprogettazione della stessa. I secondi si avvalgono di un metodo scientifico per una rapida caratterizzazione dei prodotti alimentari in base al rischio, presupposto funzionale ad una eventuale programmazione dei piani di controllo secondo criteri di appropriatezza ed efficacia.

#### C41

### **Space Bonus Food: qualità microbiologica e nutrizionale degli alimenti consumati sulla *International Space Station***

Alberto Bellio,<sup>1</sup> Silvia Gallina,<sup>1</sup> Edoardo Fontanella,<sup>2</sup>  
Nadia Civalleri,<sup>1</sup> Daniela Manila Bianchi,<sup>1</sup> Lilianna Ravagnolo,<sup>3</sup>  
Laura Bersani,<sup>2</sup> Lucia Decastelli<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, SC Controllo Alimenti e Igiene delle Produzioni, Torino; <sup>2</sup>Laboratorio Chimico della Camera di Commercio di Torino, Torino; <sup>3</sup>Advanced Logistics Technology Engineering Center, Torino, Italy

Gli *Space Bonus Food* (SBF) sono alimenti che vengono scelti dai

singoli astronauti e che si differenziano dal pasto standard fornito dalle agenzie spaziali per le missioni sulla *International Space Station* (ISS). Questi alimenti sono ideati da chef stellati e sono concordati con il singolo astronauta, che può sceglierli in base ai propri gusti. Scopo del presente lavoro è stato valutare alcuni SBF sia sotto l'aspetto microbiologico che nutrizionale. Su incarico dell'azienda *Advanced Logistics Technology Engineering Center* (ALTEC), responsabile della fornitura di questi alimenti all'ISS, sono stati analizzati sette SBF: tre conserve a base di carne, una a base di pesce, due dolci e un panino. Presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta sono state condotte le analisi per verificare la stabilità dei prodotti e i parametri igienico-sanitari quali carica batterica totale, Enterobacteriaceae, *E. coli*, anaerobi solfito riduttori, stafilococchi coagulasi positivi, *Bacillus cereus*, muffe e lieviti, *Salmonella spp.*, *L. monocytogenes*, clostridi produttori di tossine botuliniche. Il Laboratorio Chimico della Camera di Commercio di Torino si è occupato di valutare le caratteristiche chimiche necessarie alla stesura dell'etichettatura nutrizionale, tra cui: contenuto calorico, quantità di grassi, colesterolo, sodio, carboidrati, proteine, vitamina A, vitamina C, calcio e ferro. Tutti gli alimenti sono risultati negativi per la ricerca dei microrganismi patogeni, con cariche batteriche inferiori a 10 UFC/g e stabili sia a temperatura ambiente sia alle temperature di 30°C e 55°C. I valori nutrizionali riscontrati sono stati raccolti e valutati secondo lo schema di etichettatura nutrizionale statunitense, che prevede l'espressione dei valori per porzione e la quantificazione percentuale rispetto al fabbisogno giornaliero. Garantire la sicurezza e l'equilibrio nutrizionale degli alimenti e delle bevande consumati durante le missioni spaziali riveste un'estrema importanza in quanto avvengono notevoli cambiamenti, a causa dell'ambiente confinato e dell'assenza di gravità, rappresentati da alterazioni metaboliche e fisiologiche tra le quali la riduzione della risposta immunitaria; osservazioni sperimentali, inoltre, hanno evidenziato come in assenza di gravità aumenti la virulenza di alcuni batteri. La qualità microbiologica e nutrizionale degli alimenti destinati alle missioni spaziali risulta quindi fondamentale, soprattutto per gli SBF che sono prodotti *ad hoc* per i singoli astronauti e che non rientrano tra gli alimenti prodotti con procedure consolidate. La valutazione microbiologica di ogni lotto di produzione, associata alle buone pratiche di lavorazione affidate ad aziende con comprovata esperienza nel campo conserviero, è considerata pertanto una misura preventiva determinante. Le informazioni sul contenuto nutrizionale contribuiscono, inoltre, al mantenimento dello stato di salute degli astronauti: fornendo i dati nutrizionali si agevola la composizione dei pasti giornalieri attraverso la scelta e l'associazione degli alimenti disponibili, in funzione delle richieste metaboliche. La ricerca riveste un ruolo importante nel campo degli alimenti destinati alle missioni spaziali, che tendono ad essere sempre più lunghe e necessitano di livelli di sicurezza, durabilità e qualità organolettiche e nutritive adeguate.



## SESSIONE POSTER

Venerdì 30 ottobre 2015

### P01

#### Diffusione e persistenza di *Pseudomonas* spp. in aziende di bovine lattifere di piccole-medie dimensioni in Piemonte

Daniele Michele Nucera,<sup>1</sup> Sara Lomonaco,<sup>2</sup> Patrizia Morra,<sup>2</sup>  
Marco Francesco Ortoffi,<sup>2</sup> Daniele Giaccone,<sup>3</sup> Maria Ausilia Grassi<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Agrarie Forestali ed Alimentari, Grugliasco (TO);  
<sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Torino, Grugliasco (TO); <sup>3</sup>ARAP-Associazione Regionale Allevatori del Piemonte, Torino, Italy

Questo studio è stato finalizzato a raccogliere dati sulla presenza, la diffusione e la persistenza di *Pseudomonas* in aziende lattiero-casearie di piccole-medie dimensioni al fine di verificare l'efficacia dei programmi di controllo. Cinque aziende di bovine lattifere (con meno di 200 capi in mungitura) sono state selezionate tra i conferenti di latte di una grande cooperativa Piemontese. Una di esse possedeva un piccolo caseificio annesso e ad essa è stata abbinata un'altra azienda piemontese, non conferente della cooperativa, utile per verificare il passaggio diretto di microrganismi dalla produzione primaria alla lavorazione. Ogni azienda è stata visitata tre volte nel 2014, consentendo la raccolta di 116 campioni di acqua (da pozzi e da diversi punti di erogazione) e 117 campioni ambientali (tettarelle di mungitura e tombini). Questi ultimi sono stati raccolti, tramite il metodo sponge-bag, sia sulle quattro tettarelle del singolo gruppo di mungitura sia nei tombini situati nella stanza del tank di raccolta nello stabilimento lattiero-caseario. Ad ogni prelievo si è campionata una superficie di 100 cm<sup>2</sup>. Sui campioni raccolti si sono valutate le cariche di Pseudomonadaceae utilizzando CN-Pseudomonas agar. Da 3 a 5 colonie per campione sono state selezionate per la successiva identificazione tramite sequenziamento del gene 16SrDNA seguito poi da caratterizzazione mediante Enterobacterial-Repetitive-Intergenic-Consensus (ERIC) PCR. *Pseudomonas* spp. è stato rilevato nel 55% delle tettarelle e nel 66% dei tombini. Le cariche microbiche variavano da 4,3-7 log (CFU)/ unità di superficie. I campioni di acqua da pozzo sono sempre risultati positivi, mentre quelli prelevati dal caseificio, dal locale di mungitura e da quello di stoccaggio latte sono risultati positivi, rispettivamente, nel 40, 72 e 52% dei casi, con cariche medie pari a 3,6-4,5 log (CFU)/mL. L'incidenza di campioni positivi è in leggero aumento tra inverno e estate, tuttavia non vi è variazione significativa. Le colonie selezionate sono stati identificate mediante PCR e sequenziamento come *Pseudomonas fluorescens* (45%), *Pseudomonas grimontii* (35%), e *Pseudomonas aeruginosa* (8%). Altre specie erano meno frequenti (7%) e alcuni isolati sono stati identificati solo come appartenenti al genere *Pseudomonas* (5%). I risultati della caratterizzazione con ERIC-PCR hanno evidenziato 32 tipi persistenti diffusi tra le aziende agricole e il 50% persisteva per più di 6 mesi. La presenza di *Pseudomonas* in aziende lattiero-casearie di piccole-medie dimensioni rappresenta un problema, soprattutto considerando le alte cariche di contaminazione. Ceppi persistenti possono indicare la possibilità del ceppo di formare biofilm e/o di resistere ai sanificanti utilizzati. La presenza di *Pseudomonas* negli impianti di trasformazione implica il trasferimento dei microrganismi dalla produzione primaria. Quindi buone prassi igieniche (GHP) e buone prassi di lavorazione (GMP) dovrebbero sempre essere attuate ed i relativi manuali devono essere

costantemente aggiornati, migliorati e verificati al fine di prevenire il rischio di diffusione di *Pseudomonas* e il trasferimento all'interno della fattoria e degli impianti di trasformazione. Progetto finanziato da Regione Piemonte, Misura 124, Azione 1 (Cooperazione per lo sviluppo di nuovi prodotti, processi e tecnologie nel settore agro-alimentare - sfile Health Check).

### P02

#### Standardizzazione di un metodo di prova per la ricerca di larve di *Anisakis* in prodotti della pesca attraverso l'utilizzo del sistema Trichineasy®

Michele Chetta, Antonella Costa, Gaetano Cammilleri,  
Stefania Graci, Rosaria Collura, Maria Drusilla Buscemi,  
Maria Cusimano, Angela Alongi, Silvia Palumbo,  
Claudia Porcarello, Sabrina Mutolo, Giuseppe Giangrosso,  
Antonio Vella, Vincenzo Ferrantelli

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, Palermo, Italy

*Anisakis* ed altri nematodi appartenenti alla famiglia Anisakidae sono parassiti di notevole interesse sanitario a causa del loro potenziale zoonotico. In particolare le larve di *Anisakis* possono essere responsabili dell'anisakiasi, una malattia parassitaria contratta dall'uomo a seguito dell'assunzione di prodotti della pesca infestati, consumati crudi o poco cotti. L'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA), nel documento *Scientific Opinion on risk assessment of parasites in fishery products* del 2010 ha evidenziato i rischi per i consumatori derivanti anche da possibili reazioni allergiche. Il metodo ufficiale, riconosciuto a livello comunitario, per la ricerca delle larve di parassiti nei prodotti della pesca, è quello visivo (Reg. CE 2074/2005). Altri metodi vengono riportati nello stesso documento EFSA, tra cui la digestione artificiale che prevede l'utilizzo di una soluzione di acido cloridrico/pepsina: tale procedura permette di liberare i parassiti dal tessuto muscolare ittico, recuperando praticamente tutti i nematodi anisakidi potenzialmente presenti. Quest'ultima procedura di esame, che si ricollega al Reg. CE 2075/2005 relativo alla rilevazione di larve di *Trichinella* spp. in diversi campioni di carne, con opportune modifiche, può rivelarsi efficace anche nella rilevazione di larve di Anisakidae. Scopo del presente lavoro è stato quello di applicare il metodo della digestione cloro-peptica in diversi campioni di prodotti della pesca, utilizzando l'apparecchiatura Trichineasy®, già standardizzata per la ricerca e l'identificazione di larve di *Trichinella* in campioni di carne. La strumentazione Trichineasy® è composta da due settori principali ben distinti e si avvale di un kit apposito PLYtricons®: nel primo settore si trova un sistema di omogeneizzazione del campione, costituito da un contenitore con mixer a lame, per la triturazione del campione, nel secondo un sistema di filtraggio, costituito da un filtro di 180 µm seguito da un cilindro di raccolta unito ad un apparato di aspirazione per lo scarico del prodotto di digestione. L'intero sistema viene regolato da una tastiera con display. Il liquido digestivo ottenuto viene filtrato ed il filtro osservato allo microscopio per evidenziare i parassiti presenti. Al fine di validare il metodo è stata valutata la performance, ovvero l'accuratezza e la precisione. Sono stati preparati campioni positivamente con larve di *Anisakis*. La messa a punto del metodo ha previsto prove con l'utilizzo di diverse temperature, tempi e quantità di reagenti, al fine di ottenere le condizioni ottimali per la rilevazione dei nematodi vitali. Una digestione di 20 minuti con una temperatura di 36±1°C, con l'utilizzo di 10 grammi di pepsina e 50 mL di HCl al 10% è risultata essere la condizione ottimale al fine della diagnostica. Il protocollo di digestione, così messo a punto, ha permesso di ottenere un recupero delle

larve di nematodi del 100%, con i parassiti vitali e integri. Le prove effettuate su 14 diverse tipologie di campioni ittici, per un totale di 100 prove, hanno mostrato l'efficacia di questa strumentazione per la ricerca di larve di *Anisakis* nei prodotti della pesca.

### P03

#### **Ruolo del cinghiale quale indicatore della presenza della tubercolosi bovina e valutazione del rischio sanitario legato al consumo e alla manipolazione delle carni**

Francesco Sgarangella,<sup>1</sup> Maria Giovanna Cancedda,<sup>2</sup> Stefano Lollai,<sup>2</sup> Antonio Pintore,<sup>2</sup> Daniela Marongiu,<sup>1</sup> Giuseppe Bitti,<sup>1</sup> Pietro Desini<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Azienda Sanitaria Locale di Sassari, Dipartimento di Prevenzione, Sassari;

<sup>2</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Sassari, Dipartimento di Sanità Animale, Sassari, Italy

Tra il 2007 e il 2008 numerosi focolai di tubercolosi bovina causati da *Mycobacterium bovis* sono stati individuati nella Sardegna centro-settentrionale. Gli allevamenti interessati sono stati 75 con 1.073 capi bovini risultati positivi o dubbi al test di intradermoreazione alla tubercolina bovina. Nell'ecosistema sardo sono presenti alcuni fattori che potrebbero favorire la trasmissione dell'infezione tra bovino e cinghiale, quali pascolo e punti di abbeverata in comune, contatto con materiale contaminato da liquame o presenza di discariche non controllate. Scopo del presente studio è quello di dimostrare che il cinghiale è un indicatore di presenza della malattia e in quanto tale valutare, attraverso i risultati delle indagini batteriologiche e anatomo-isto-patologiche, il rischio sanitario derivante dal manipolare le carcasse e/o dal consumare la carne cruda di cinghiali cacciati in un territorio interessato da focolai di tubercolosi bovina. Il primo step dello studio è stato condotto su 47 cinghiali cacciati durante la stagione venatoria 2008-2009, in un'area, denominata Goceano, interessata in quel periodo da numerosi focolai di tubercolosi bovina. Alla luce dei risultati ottenuti, che hanno dimostrato il ruolo di questa specie come indicatore della presenza di malattia, si è cercato di valutare il rischio zoonosico derivante dal consumo e/o dalla manipolazione delle carni. Per dare forza a questo lavoro, sono stati esaminati, durante la stagione venatoria 2014-2015, 67 cinghiali cacciati in un'area, denominata Anglona, comunque distante dalla precedente con assenza di focolai di tubercolosi bovina. In entrambe le aree di studio i cinghiali sono stati sottoposti ad esame ispettivo, con prelievo di linfonodi retro-faringei e sotto-mandibolari inviati all'Istituto Zooprofilattico di Sassari per l'esame istologico e batteriologico. Nei 47 cinghiali campionati nel primo step sono stati isolati *Mycobacterium bovis*, *Micobacterium sp.* e *Micobacterium avium* da 29 campioni. N. 18 di questi campioni sono stati esaminati anche anatomo-isto-patologicamente, con evidenza di 11 lesioni granulomatose, indicative di tubercolosi, e 7 negativi. Su 6 dei restanti 18 campioni, risultati batteriologicamente negativi, è stato effettuato l'esame anatomo-istolo-patologico che ha evidenziato una lesione granulomatosa indicativa di tubercolosi in un campione mentre 5 sono risultati negativi. Dei 67 cinghiali esaminati nel secondo step soltanto uno ha evidenziato lesioni riferibili a linfoadenite granulomatosa di natura non tubercolare. L'esame batteriologico effettuato su quest'ultimo è risultato negativo. I risultati indicano che, in Sardegna, nelle aree interessate da focolai di tubercolosi bovina nel domestico, la prevalenza della tubercolosi nel campione dei cinghiali cacciati risulta elevata, a conferma del ruolo di questa specie di biondicatore della presenza della malattia. L'esame batteriologico è

risultato essere più sensibile nel rilevare l'infezione tubercolare rispetto all'esame anatomo-isto-patologico. Di conseguenza la batteriologia associata all'esame anatomo-isto-patologico e le attività di educazione sanitaria rivolte ai cacciatori possono risultare indispensabili per ridurre il rischio di contagio attraverso la manipolazione e il consumo di carni in aree problema.

### P04

#### **Virus dell'Epatite A e Norovirus in molluschi eduli lamellibranchi: metodi di estrazione a confronto**

Barbara Cioffi,<sup>1</sup> Maria Grazia Amoroso,<sup>1</sup> Maurizio Viscardi,<sup>1</sup> Loredana Cozzolino,<sup>1</sup> Vincenzo Pasquale,<sup>2</sup> Achille Guarino,<sup>1</sup> Giorgio Galiero,<sup>1</sup> Giovanna Fusco<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Dipartimento di Sanità Animale, Portici (NA); <sup>2</sup>Dipartimento di Scienze e Tecnologie, Centro Direzionale, Università degli Studi di Napoli Parthenope, Napoli, Italy

I molluschi eduli lamellibranchi (MEL) sono organismi filtratori in grado di concentrare inquinanti di diversa natura presenti nell'acqua. Scopo dello studio è stato quello di valutare la presenza di virus enterici, quali Epatite A (HAV) e Norovirus (NGI e NGII), focalizzando l'attenzione sull'ottimizzazione del metodo di estrazione degli acidi nucleici, al fine di minimizzare i risultati falsi negativi. In particolare, sono stati messi a confronto due sistemi di estrazione automatizzati: MagMAX (Applied Biosystems, Foster City, USA) ed EZ1 Advanced XL (Qiagen Inc., Valencia, CA, USA), entrambi basati su una tecnologia di estrazione che prevede l'impiego di particelle magnetiche. Complessivamente sono stati analizzati 40 campioni di MEL per la ricerca dei virus HAV, NGI e NGII. I campioni analizzati in parte provenivano da allevamenti ubicati nelle Province di Napoli e Caserta, ed in parte dai circuiti interlaboratorio (Cefas). I target virali sono stati ricercati mediante *Real Time PCR*, secondo la norma UNI CEN ISO/TS 15216-2: 2013 *Microbiology of food and animal feed - Horizontal method for determination of hepatitis A virus and norovirus in food using real-time RT-PCR - Part 2: Method for qualitative detection*. Dopo una prima fase di estrazione dei virus dall'epatopancreas dei MEL, sono stati estratti gli acidi nucleici virali mediante i sistemi MagMAX (Applied Biosystems) ed EZ1 (Qiagen), seguendo i protocolli forniti dalle relative aziende produttrici. La performance di ciascun sistema di estrazione è stata valutata aggiungendo ai campioni in esame il Mengovirus, come controllo di processo, rilevato in contemporanea agli altri target virali mediante una one step multiplex RT-PCR e confrontando i valori di ciclo soglia. In particolare, l'efficienza di estrazione è stata calcolata confrontando il valore soglia di ogni campione con il valore soglia del controllo di processo, per entrambe le estrazioni, con EZ1 e MagMAX, secondo la seguente formula:  $\text{Recupero} = 2^{-(\Delta Ct)} * 0,6$ .  $\Delta Ct = \text{valore soglia campione} - \text{valore soglia standard}$  alla diluizione 1:10. Il fattore 0,6 tiene conto della frazione di campione sottoposta ad estrazione degli acidi nucleici. Il valore medio dell'efficienza di estrazione dell'EZ1, considerando anche la deviazione standard, è risultato essere  $1,15 \pm 1,35$ ; quello del MagMAX è risultato essere  $3,46 \pm 3,73$ . È stato inoltre applicato il test t di Student per valutare se la differenza delle efficienze di estrazione dei due sistemi può essere considerata significativa. I valori ottenuti sono  $t=2,94$ , con un livello di significatività  $P=0,0049$ . La differenza osservata tra le medie è statisticamente significativa per  $P<0,05$ . Dallo studio effettuato è emerso che Mengovirus può essere considerato un target semplice da identificare ed affidabile nella valutazione delle efficienze di estrazione degli acidi nucleici dal virus dell'Epatite A (HAV)

e dai Norovirus (NGI e NGII). Esso, inoltre, risulta non patogeno per l'uomo. Dall'analisi dei dati si è evinto che il sistema MagMAX presenta una efficienza di estrazione significativamente ( $P < 0,05$ ) superiore rispetto all'EZ1 sui diversi tipi di campioni analizzati. Il sistema MagMAX ha, inoltre, il vantaggio di poter processare fino a 96 campioni contemporaneamente, con una conseguente notevole riduzione dei tempi di esecuzione delle analisi.

## P05

### Monitoraggio della contaminazione da idrocarburi policiclici aromatici in impianti di mitilicoltura situati nel golfo di Pozzuoli

Mauro Esposito,<sup>1</sup> Stefania Cavallo,<sup>1</sup> Maurizio della Rotonda,<sup>2</sup> Ciro Sbarra,<sup>3</sup> Maria Stefanelli,<sup>3</sup> Teresa Bruno,<sup>1</sup> Sara Lambiasi,<sup>1</sup> Loredana Baldi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Portici (NA); <sup>2</sup>Unità Operativa Dirigenziale Prevenzione Sanità Pubblica Veterinaria, Regione Campania, Centro Direzionale is.C3, Napoli; <sup>3</sup>Unità Operativa Zoosanitaria ASL NA2 Nord, Bacoli (NA), Italy

Gli Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA) sono microinquinanti generati da processi di combustione incompleta di sostanze organiche. Fonti riconosciute di contaminazione sono il traffico autoveicolare e navale e i sistemi di riscaldamento domestico e di cottura (barbecue e affumicatura), anche se la maggiore produzione proviene da impianti industriali. Per la tossicità e l'azione sinergica dimostrata, l'Agenzia per la Ricerca sul Cancro (IARC) ha classificato il benzo[a]pirene (BaP) come cancerogeno per l'uomo e altri IPA come probabili (2A) o possibili (2B) cancerogeni. Sulla base di queste valutazioni la Commissione Europea ha fissato tenori massimi per il BaP e per la somma di quattro IPA (IPA4) in alcuni prodotti alimentari, tra cui i molluschi bivalvi. Nell'ambito del Piano di Controllo della Molluschicoltura promosso dalla Regione Campania, anche gli IPA sono stati inseriti tra i contaminanti chimici da ricercare nei molluschi allevati negli impianti o raccolti nei banchi naturali. In esecuzione del Piano è stato rilevato un campione di cozze (*Mytilus galloprovincialis*) in cui la concentrazione di BaP e la somma IPA4 superavano i limiti massimi. In seguito a questo episodio le Autorità Sanitarie hanno disposto il divieto di commercializzazione dei mitili allevati in quell'area e avviato un monitoraggio mensile. L'indagine è stata quindi effettuata nel periodo compreso fra dicembre 2013 e giugno 2015, su campioni prelevati in impianti di mitilicoltura situati nell'area del golfo di Pozzuoli antistante il lago Lucrino e inviati all'Istituto Zooprofilattico del Mezzogiorno. Per la determinazione degli IPA è stato utilizzato un metodo di analisi che prevede la saponificazione del campione e quindi una estrazione con cicloesano con purificazione dell'estratto mediante SPE Silica. L'analisi strumentale è effettuata in HPLC su colonna Envirosep PP con rivelazione in fluorescenza. Il metodo è stato validato secondo i criteri di prestazione previsti dal Regolamento CE 836/2011, determinando il limite di quantificazione (LOQ) per ciascun analita, la precisione attraverso il calcolo del coefficiente di Horrat alle concentrazioni di 2,0 e 5,0 µg/kg e l'accuratezza come recupero per i singoli IPA, verificando che rientrassero nell'intervallo di accettabilità previsto dalla normativa. I risultati del monitoraggio hanno dimostrato che, dopo il primo caso di positività, le concentrazioni di IPA si sono mantenute elevate e solo con l'inizio della stagione primaverile c'è stata una drastica riduzione della contaminazione, con valori prossimi al LOQ. Tuttavia, con l'avvicinarsi della stagione invernale, il contenuto in IPA ha cominciato ad aumentare, raggiungendo

valori superiori ai limiti massimi. Anche in questo caso all'inizio della primavera i valori sono tornati a livelli bassi. Al di là della contaminazione riscontrata, si sottolinea l'andamento stagionale osservato, che potrebbe essere messo in relazione con fenomeni meteorologici o mareggiate. È allo studio una eventuale correlazione fra medie di contaminazione, stagionalità e fonti di contaminazione. Per queste ultime, in assenza di una chiara indicazione, è stato avviato un tavolo tecnico con ARPAC e Amministrazione del Comune di Pozzuoli, allo scopo di identificare le fonti di contaminazione, attribuibili ad impianti industriali in cui siano stati già evidenziate problematiche di inquinamento da IPA, ad una intensa attività dei porti di Pozzuoli e Baia o ad eventuali scarichi abusivi.

## P06

### Sieroprevalenza di *Toxoplasma gondii* in pecore allevate nel Nord Italia

Cristina Bacci, Alice Vismarra, Carlo Mangia, Elena Barilli, Marco Genchi, Ilaria Bruini, Franco Brindani, Laura Helen Kramer

Dipartimento Scienze Medico-Veterinarie, Università degli Studi di Parma, Parma, Italy

*Toxoplasma gondii* è uno dei più importanti agenti zoonosici e proprio recentemente l'Autorità Europea per la Sicurezza Alimentare ha ribadito la necessità di monitorarne la prevalenza in diverse specie animali (suini, capre e pecore). Attualmente i dati relativi alla diffusione del parassita sul territorio italiano sono molto limitati. La tendenza del consumatore a richiedere prodotti biologici locali sani ha portato ad un crescente interesse anche per i prodotti derivanti dalla specie ovina, in particolare per la carne e il latte di pecora. Scopo del presente studio è stato quello di stimare la diffusione dell'infezione in pecore transumanti allevate nel Nord Italia e, conseguentemente, valutare il potenziale rischio per il consumatore. Nel periodo maggio-novembre 2014 è stato analizzato il siero di 587 pecore adulte, principalmente femmine, allevate allo stato semi brado nella regione Emilia Romagna. Il siero è stato ottenuto da campioni di sangue, raccolti e poi centrifugati a 1600 rpm per 5 minuti. Con il test Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) sono stati ricercati anticorpi IgG. La positività del saggio è espressa dal valore percentuale di densità ottica che supera il 50%, letta a 450 nm. Quattro cuori prelevati da animali appartenenti ad uno stesso allevamento sono stati utilizzati per isolare il parassita e verificarne la vitalità *in vitro*, su cellule VERO. La presenza del parassita è stata controllata sia con osservazione giornaliera del monostrato cellulare sia con metodica biomolecolare. Dopo 3 settimane e, successivamente, dopo 5 settimane è stato estratto il DNA. Quest'ultimo veniva processato, impiegando la coppia di primer TOX4 e TOX5, con Polymerase Chain Reaction (PCR) per l'identificazione della sequenza genica di 529 bp. Il test ELISA ha rilevato gli anticorpi verso *T. gondii* in 118 su un totale di 170 pecore del primo allevamento e in 341 su un totale di 417 pecore appartenenti al secondo, con una sieroprevalenza rispettivamente del 69,4% e del 81,8%. Solo cinque campioni sono risultati dubbi. Relativamente al tentativo di isolamento *in vitro* del parassita, solo un campione è risultato positivo alla PCR ad entrambi i tempi di analisi. I pochi studi condotti sul territorio nazionale hanno valutato principalmente la sieroprevalenza del parassita in pecore allevate nelle regioni del sud e nelle isole. La diffusione del patogeno in tali allevamenti è risultata pari al 28,5% nella regione Campania, al 31,52-62,5% in Sardegna, al 49,9% in Sicilia. I risultati del presente studio rilevano che, nella provincia di Parma, si ha un'alta sieroprevalenza del

parassita (78,2%). Il dato, simile a quello ottenuto da un'indagine condotta su pecore al pascolo nell'area centrale ed orientale delle Alpi, evidenzia l'importanza che gli animali selvaggi hanno nella diffusione dell'agente patogeno. Questo studio, anche se preliminare, mostra infatti che la presenza di anticorpi IgG contro *T. gondii* in questi animali, deputati anche alla produzione di carne e latte, è molto elevata rimarcando, quindi, l'esistenza di un potenziale rischio per i consumatori di tali prodotti.

## P07

### Analisi di residui di corticosteroidi in campioni di urine, fegato e muscolo mediante kit ELISA

Maria Campaniello, Annalisa Conticelli, Simona Summa, Sonia Lo Magro, Marilena Muscarella

Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Puglia e Basilicata, Foggia, Italy

I corticosteroidi sono usati in terapia umana e veterinaria come farmaci antinfiammatori o come soppressori del sistema immunitario. Sebbene il loro uso in ambito veterinario sia consentito, a causa del loro effetto anabolizzante sono vietati come promotori di crescita (D.L.vo 158/2006). Il PNR 2015 definisce un limite di rilevabilità (CC) per lo screening di corticosteroidi pari a 2 µg/kg per il fegato e 2 µg/L per le urine mentre la presenza nel campione di tali molecole è considerata come limite di azione. Le richieste legislative e l'incremento dell'attenzione per tutelare la salute pubblica hanno promosso in questi ultimi anni lo sviluppo di metodi sensibili, rapidi ed economici per il controllo ufficiale di corticosteroidi in diverse matrici. Fra questi, i metodi immunochimici hanno il vantaggio di individuare i sospetti non-conformi che necessitano poi di essere confermati con tecniche separative accoppiate a rivelatori di massa. In questo lavoro è stato impiegato un metodo ELISA per le analisi di campioni ufficiali pervenuti negli anni 2012-2015, monitorando la presenza di corticosteroidi in fegato, urine e muscolo di origine bovina ed equina. Il kit L'screen CORTICO, fornito dalla ditta Tecna, permette l'identificazione simultanea di desametasone, flumetasone, betametasone e prednisolone a concentrazioni superiori a 0.20 µg/kg per fegato e muscolo, e 0.25 µg/L per le urine. Dopo aver messo a punto la procedura estrattiva da urine, fegato e muscolo, i metodi sono stati validati secondo la Decisione 657/2002/CE, ottenendo valori di CC inferiori a 2 µg/L per le urine e a 2 µg/kg per il fegato e per il muscolo. I corticosteroidi vengono estratti dall'urina con dietil etere, e dal fegato e dal muscolo con acetonitrile. I solventi vengono poi essiccati ed i residui vengono ripresi col tampone di diluizione fornito nel kit e filtrati. Negli anni 2012-2015 sono stati analizzati 352 campioni totali (118 di fegato, 208 di urine e 26 di muscolo). Di essi 5 campioni, di cui 4 di urine ed 1 di fegato, risultati sospetti non conformi, sono stati poi sottoposti ad analisi di conferma mediante spettrometria di massa dalla quale è emerso l'uso di desametasone in due campioni: un campione di urina bovina (C=1,30 µg/L) conforme perchè proveniente da un allevamento con animali in trattamento terapeutico con corticosteroidi, ed uno di fegato bovino (C=1,19 µg/kg) in cui l'uso di desametasone non era stato dichiarato. Inoltre nel 2013, su disposizione del Ministero della Salute, sono stati effettuati dei controlli su muscolo equino di importazione proveniente da animali destinati alle corse e non alla macellazione, quindi potenzialmente contaminati con sostanze anabolizzanti. Dei 26 campioni di muscolo analizzati nessuno è risultato non conforme. Per i campioni di urine, analizzati con il metodo ELISA, è stata notata una maggior incidenza di falsi positivi, dovuta probabilmente alla presenza di

interferenti di matrice. L'impiego di metodi immunochimici nell'analisi di screening risulta efficace per individuare sospetti non conformi, ed è un metodo valido, rapido ed economico, per l'attività di sorveglianza e di controllo ufficiale. Le positività riscontrate suggeriscono di mantenere alta la frequenza e l'efficacia dei controlli.

## P08

### Indagine sul tenore di istamina ed azoto basico volatile totale in prodotti ittici commercializzati in Puglia

Pasquale Moscarelli, Sonia Lo Magro, Antonella Russo, Pasquale D'Antini, Marilena Muscarella

Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Puglia e Basilicata, Foggia, Italy

Il pesce, ricco in proteine ed acidi grassi polinsaturi, è un alimento essenziale nella dieta umana. L'elevato tenore di acqua e di sostanze azotate non proteiche, la presenza di amminoacidi e di enzimi endogeni rendono però tale prodotto facilmente deperibile. Il controllo dei prodotti ittici riveste un ruolo cruciale sia ai fini igienico-sanitari che commerciali soprattutto in una regione come la Puglia dove essi hanno largo consumo e commercializzazione. L'istamina, normata dal Reg. 2073/2005 per specie ittiche ad alto tenore d'istidina (famiglie Scombridae, Engraulidae, Coryfenidae, Pomatomidae, Scombresoidae), e l'azoto basico volatile totale (ABVT), i cui limiti sono fissati nel Reg. 1022/2008 per alcune famiglie e specie, sono fra i parametri indicati dal Reg. 854/2004/CE per la valutazione dei prodotti ittici e rientrano nei piani dei controlli ufficiali stabiliti dalla Regione. Al contrario dell'istamina, indice dello stato di deterioramento dei prodotti ittici ad alto tenore d'istidina, l'ABVT è un parametro di freschezza aspecifico, costituito da tutte le frazioni azotate, fra le quali ammine volatili, che si formano per azione di enzimi endogeni e batterici. Il lavoro riporta un'indagine sul tenore di istamina e ABVT eseguita su prodotti ittici pervenuti in laboratorio per controllo ufficiale negli anni 2014-2015. Per la valutazione dell'istamina si sono impiegati, in fase di screening, un metodo ELISA e, per la conferma di campioni positivi, uno basato sulla cromatografia liquida con rivelazione fluorimetrica, previa derivatizzazione chimica post-colonna. Entrambi i metodi, sviluppati presso il nostro laboratorio, sono riportati in letteratura. L'ABVT è stato invece determinato mediante il metodo di riferimento titrimetrico descritto nel Reg. 2074/2005. Per quanto riguarda l'istamina, su un totale di 145 campioni (85 campioni di pesce fresco e 60 di prodotti in scatola) solo 3 campioni sono risultati non conformi. Si trattava di due campioni di alici fresche (concentrazioni pari a 328±49 mg/kg e 1220±151 mg/kg) ed uno di tonno in scatola commercializzato sfuso nel banco di un supermercato (concentrazione pari a 2219±260 mg/kg), pervenuto in laboratorio per confermare un caso di sospetta sindrome sgombroide. Tenori di istamina inferiori a 10 mg/kg, riscontrati nell'88% dei campioni di pesce fresco, hanno rivelato buona qualità ed idonee condizioni igieniche e di conservazione dei prodotti. Analogamente ai campioni di tonno in scatola, anche le alici in salamoia, per le quali il limite massimo è 400 mg/kg, hanno mostrato una contaminazione inferiore ai 50 mg/kg. I tenori di ABVT, quali indicatori di freschezza, non hanno evidenziato particolari problemi per la qualità del pesce fresco. Infatti, su un totale di 81 campioni pervenuti in laboratorio ed appartenenti sia alle famiglie indicate nel Reg. 1022/2008 che ad altre specie, solo 1 è risultato non conforme, mentre 46 (57%) hanno mostrato una concentrazione inferiore al limite di quantificazione del metodo (C<5 mg/100g). I risultati conseguiti dimostrano che i prodotti ittici commercializzati ed importati



nella nostra regione non costituiscono un rischio per la salute dei consumatori. Andrebbero tuttavia evitate talune pratiche, quali la commercializzazione di prodotti ittici sfusi conservati in condizioni improprie.

## P09

### Metodi di screening per l'analisi di verde malachite e leucomalachite nel muscolo di pesce

Ivana Decina, Pasquale D'Antini, Maria Campaniello,  
Sonia Lo Magro, Marilena Muscarella

Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Puglia e Basilicata, Foggia, Italy

Il verde malachite (VM) è un colorante trifenilmetanico impiegato come ectoparassiticida, fungicida e antisettico in acquacoltura. Nei pesci, il VM è ridotto, fino al 90%, a leuco-verde malachite (LVM), che viene eliminato più lentamente del suo precursore. A causa dei loro effetti teratogeni e cancerogeni, la Decisione 25/2004/CE prevede, per la somma di VM e LVM nel muscolo di pesce, un livello minimo di rendimento richiesto (LMRR) pari a 2 µg kg<sup>-1</sup>. Tale valore è un limite di armonizzazione europeo per i metodi impiegati per l'analisi di tali residui e può essere adottato come limite di azione per la valutazione della non conformità. In accordo alla normativa UE, le analisi di conferma di VM possono essere effettuate solo adoperando la spettrometria di massa. Metodi basati su tecnica enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) e su cromatografia liquida ad elevate prestazioni (HPLC) sono idonei per lo screening, ai livelli dell'LMRR, purché raggiungano sensibilità adeguate ed un tasso di falsi negativi minore del 5%. Questo lavoro si propone di ottimizzare, validare e confrontare due metodi di screening HPLC e ELISA per l'analisi di controllo ufficiale di VM e LVM nel muscolo di pesce. La fase estrattiva del metodo in HPLC è una ottimizzazione di quella proposta da Alborali *et al.* ed è seguita da una derivatizzazione del LVM in VM con biossido di piombo (PbO<sub>2</sub>). La separazione cromatografica, con cromatografo liquido Agilent SL 1200 e colonna LUNA C18 (l: 250 mm, d.i: 4.6 mm, d.p.: 5 µm), prevede una eluzione isocratica con tampone acetato pH 4.5/acetone nitrile 40/60. Il VM, eluito a 6 minuti, viene quindi rivelato ad una λ = 618 nm. Per il metodo ELISA si adopera il kit MaxSignal® Malachite Green/LMG (Biooscientific). Il campione è trattato seguendo il protocollo del kit e le piastre ELISA sono lette ad una λ di 450 nm mediante spettrofotometro per microtitolazione Anthos HT2, GSG ROBOTIX. Sebbene le metodiche siano sensibili al livello di 1 µg kg<sup>-1</sup> per entrambe le molecole, il saggio in ELISA richiede una preparazione del campione più lunga e complessa rispetto a quella in HPLC e non consente di individuare separatamente i contributi di VM e LVM alla concentrazione totale. Il metodo HPLC si è dimostrato quindi più versatile in fase di screening e post-screening di campioni sospetti. Dopo la fase di ottimizzazione dell'estrazione e delle condizioni cromatografiche, si è proceduto alla validazione secondo le indicazioni della Decisione 657/2002/CE, valutando quanto segue. Specificità ed errore (≤5%): studiati analizzando in parallelo 20 bianchi campione di orata e 20 additivati con VM e LVM entrambi al livello di 1 µg/kg. Precisione: determinata in termini di deviazione standard relativa percentuale di riproducibilità intra-laboratorio (RSDR%), pari al 5.3 e 5.6% rispettivamente per VM e LVM. Robustezza: valutata per cambiamenti lievi mediante l'approccio di Youden. Anche il metodo ELISA è stato sottoposto a convalida secondo le specifiche del produttore, verificando sia l'assenza di falsi positivi per i controlli negativi che l'assenza di falsi negativi per i fortificati ad 1 µg/kg.

Per entrambi i metodi, si sono ottenuti, infine, risultati comparabili sia in circuiti inter-laboratorio che nell'analisi di routine. I risultati conseguiti hanno dimostrato l'affidabilità dei metodi proposti nel controllo ufficiale di screening previsto dal Piano Nazionale Residui e nelle attività di monitoraggio.

## P10

### Validazione di metodi di screening strumentali quantitativi per analisi di residui di farmaci in alimenti di origine animale

Sonia Lo Magro, Simona Summa, Antonio Armentano,  
Ivana Decina, Maria Campaniello, Marilena Muscarella

Istituto Zooprofilattico Sperimentale di Puglia e Basilicata, Foggia, Italy

Per l'analisi di screening di residui di farmaci è molto diffuso l'uso di tecniche ELISA e microbiologiche. Sebbene comportino indubbi vantaggi, quali sensibilità, semplicità e rapidità di esecuzione, esse mostrano tuttavia dei limiti legati alla natura aspecifica dell'analisi stessa, che non consente di discernere tra le molecole oggetto dell'analisi ed altri interferenti presenti. Nei laboratori di analisi una delle tendenze attuali, per garantire affidabilità e specificità dell'analisi e ridurre i costi, è quella di sviluppare metodi di screening basati, ove possibile, su tecniche strumentali semplici come la cromatografia liquida ad elevate prestazioni. L'obiettivo, rispetto alle tecniche ELISA e microbiologiche, è infatti di evitare la presenza di falsi negativi e ridurre il numero di falsi positivi, che richiederebbero inutili analisi di conferma complesse e dispendiose. La validazione dei metodi è uno degli strumenti migliori per soddisfare questa esigenza. Per l'analisi dei residui di farmaci in alimenti di origine animale la recente letteratura e la Decisione 657/2002/CE, ulteriormente chiarita da note del Laboratorio Comunitario di Riferimento (CRL), definisce le performances da valutare per la validazione di metodi di conferma strumentali e di metodi di screening immunoenzimatici. Per la validazione di metodi di screening strumentali quantitativi si fa riferimento a quelli di conferma, pur non essendo necessario lo studio completo di tutte le performances analitiche. Questo lavoro ha come scopo quello di proporre un protocollo per la validazione di metodi di screening strumentali quantitativi che sia di semplice esecuzione per i laboratori di analisi e richieda un numero minimo di prove. La Decisione 657/2002/CE prevede obbligatoriamente, per metodi di screening quantitativi, lo studio di performances analitiche quali specificità, precisione e robustezza. Al livello d'interesse, inoltre, il tasso di falsi negativi deve essere ≤5% (errore). In linea con le indicazioni del CRL, per la verifica della specificità e dell'errore, si analizzano 20 campioni bianchi, scelti fra le specie di validazione, e 20 campioni additivati al livello d'interesse. In tal modo, oltre a valutare l'assenza di interferenti nei bianchi (specificità), si verifica che, al livello d'interesse, in nessuno o al massimo in uno degli additivati non siano presenti i segnali delle molecole indagate (errore β ≤5%). Eseguendo le 20 prove sugli additivati in almeno due sedute analitiche diverse, si può verificare anche la precisione del metodo in condizioni di riproducibilità intra-laboratorio. La robustezza per cambiamenti lievi si valuta individuando le variabili critiche delle fasi analitiche e studiandole mediante test di Youden. Si può inoltre valutare, con test statistici, l'applicabilità della metodica validata anche ad altre specie e a matrici simili a quella di validazione. L'approccio proposto può essere utilizzato presso i laboratori per la validazione di metodi di screening strumentali.

## P11

### Ricerca e caratterizzazione biomolecolare di *Vibrio parahaemolyticus* in molluschi bivalvi vivi della regione Sardegna

Giuseppe Tedde,<sup>1</sup> Marta Marceddu,<sup>2</sup> Giuseppa Lorenzoni,<sup>1</sup>  
Igor Arras,<sup>1</sup> Donatella Ottaviani,<sup>3</sup> Francesca Leoni,<sup>3</sup>  
Alessandro Mudadu,<sup>1</sup> Maria Teresa Uda,<sup>1</sup> Giovanna Sanna,<sup>1</sup>  
Edoardo Marongiu,<sup>1</sup> Sebastiano Virgilio<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Struttura Complessa Igiene degli Alimenti, Sassari; <sup>2</sup>Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Sassari, Sassari; <sup>3</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Laboratorio Nazionale di Riferimento per il Controllo delle Contaminazioni Batteriche nei Molluschi Bivalvi, Ancona, Italy

Lo scopo del presente lavoro è stato quello di definire i livelli di prevalenza di *Vibrio parahaemolyticus* in molluschi bivalvi vivi allevati e commercializzati nella regione Sardegna, caratterizzare i ceppi isolati sotto il profilo della patogenicità e contribuire alla valutazione del rischio. Nell'ambito del Piano della Regione Sardegna di monitoraggio in allevamento e di vigilanza alla commercializzazione dei molluschi bivalvi vivi, nel 2013 sono stati sottoposti alla ricerca di *Vibrio parahaemolyticus* n. 1079 campioni, appartenenti alle specie *Mytilus galloprovincialis* e *Mytilus edulis*, *Tapes philippinarum* e *Tapes decussatus*, *Crassostrea gigas* e *Ostrea edulis*, di cui n. 754 prelevati nel monitoraggio e n. 325 in commercializzazione. La ricerca è stata effettuata mediante tecniche colturali tradizionali (metodo ISO/TS 21872-1: 2007) e gli isolati sono stati sottoposti a prove biomolecolari di conferma, mediante amplificazione del gene specie-specifico *toxR*, e di caratterizzazione con la ricerca dei geni di virulenza *tdh* e *trh*. La metodica di PCR gruppo specifico (GS), basata sulla variazione della sequenza genica *toxRS*, è stata utilizzata per rilevare il clone pandemico in correlazione con il gene *tdh*. Tutti i campioni positivi per il gene codificante la tossina *trh* sono stati sottoposti a sequenziamento. Su un totale di 1079 campioni di molluschi bivalvi analizzati, sono risultati positivi per *V. parahaemolyticus* n. 38 (3,5%) campioni, di cui 35 (92,1%) campioni nell'ambito dell'attività di monitoraggio e 3 (7,9%) nell'ambito dell'attività di vigilanza. Relativamente alla tipologia di prodotto, è stata riscontrata positività in n. 8 campioni di *Tapes decussatus*, n. 2 di *Tapes semidecussatus*, n. 20 di *Mytilus galloprovincialis*, n. 7 di *Mytilus edulis* e n. 1 campione di *Crassostrea gigas*. Per quanto riguarda la stagionalità, è stata riscontrata positività per *V. parahaemolyticus* nel periodo invernale (dicembre, gennaio, febbraio) e primaverile (marzo, aprile, maggio). Dei 38 ceppi di *V. parahaemolyticus* identificati per la presenza del gene *toxR* specie-specifico, i 3 ceppi isolati dai campioni prelevati nell'ambito della vigilanza alla commercializzazione non presentavano i geni che codificano per i fattori di patogenicità *tdh* e *trh*. Relativamente ai 35 ceppi isolati da campioni prelevati nell'ambito delle attività di monitoraggio, n. 28 non presentavano i geni per i fattori di patogenicità, mentre 2 (5,7%) (1 da mitili e 1 da vongole) sono risultati positivi per il gene codificante la tossina *tdh* e n. 5 (14,3%) (3 da mitili, 2 da vongole e 1 da ostriche) sono risultati positivi per la presenza del gene *trh*, manifestando il 100% di identità con una delle due sequenze geniche note depositate su National Center for Biotechnology Information (n. 2 per JF730306 e n. 3 per AF378099). Ceppi di *V. parahaemolyticus* potenzialmente patogeni *tdh+* sono stati isolati raramente in molluschi bivalvi provenienti da zone di raccolta italiane. I 2 ceppi di *V. parahaemolyticus* *tdh+* sono stati analizzati mediante GS-PCR evidenziando la non appartenenza al complex

clonale pandemico. I risultati ottenuti suggeriscono l'opportunità di inserire questo microrganismo nei programmi di monitoraggio delle aree di raccolta dei molluschi bivalvi e nell'ambito dei sistemi di sorveglianza per le infezioni gastroenteriche umane.

## P12

### Determinazione della concentrazione di metalli in alimenti di origine animale e vegetale prodotti in Campania

Stefania Cavallo,<sup>1</sup> Mauro Esposito,<sup>1</sup> Guido Rosato,<sup>2</sup>  
Vittorio Soprano,<sup>1</sup> Pasquale Gallo,<sup>1</sup> Eugenio Chiaravalle,<sup>3</sup>  
Oto Miedico,<sup>3</sup> Roberta Pellicanò,<sup>1</sup> Loredana Baldi<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Portici (NA); <sup>2</sup>Unità Operativa Dirigenziale Prevenzione Sanità Pubblica Veterinaria, Regione Campania, Centro Direzionale is. C3, Napoli; <sup>3</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata, Foggia, Italy

L'emergenza *Terra dei Fuochi* in regione Campania ha portato a elaborare piani di monitoraggio delle produzioni agricole e zootecniche al fine di verificare se fenomeni di interrimento o di combustioni illecite di rifiuti urbani o industriali potessero aver compromesso la qualità e la salubrità degli alimenti prodotti in quelle aree considerate a maggior rischio di esposizione. In particolare è stata indagata l'area compresa tra il Litorale Domitio-Flegreo, l'Agro Aversano-Atellano, l'Agro Acerrano-Nolano e Vesuviano e la città di Napoli. In questa zona, definita come *Terra dei Fuochi* per il gran numero di roghi che vengono appiccati ai rifiuti, ricadono anche aree appartenenti agli ex SIN e i 57 comuni individuati dalla direttiva interministeriale prevista dal D.L. 10/12/2013 n.136, convertito in Legge n. 6 del 06/02/2014. Tra i contaminanti ambientali su cui maggiormente è stata posta l'attenzione rientrano i metalli pesanti, piombo e cadmio, per i quali la normativa europea ha fissato dei limiti massimi. Oltre a questi sono stati ricercati rame, nichel, molibdeno, arsenico, mercurio, cromo, tallio, berillio, stagno, vanadio, cobalto, manganese, zinco, uranio e stronzio, elementi chimici potenzialmente tossici, anche se per essi non sono stati stabiliti tenori massimi ammissibili. L'indagine è stata effettuata su campioni di latte bufalino, uova e prodotti ortofruttilicoli prelevati dai Servizi Veterinari e dai SIAN delle ASL. I campioni di latte sono stati prelevati presso allevamenti bufalini, le uova provenivano da aziende familiari con le galline allevate a terra ed erano tutte destinate all'autoconsumo mentre i vegetali sono stati raccolti direttamente in campo in corrispondenza del periodo di raccolta. Per la determinazione dei metalli sono stati seguiti i metodi UNI EN 13804:2002 e UNI EN 13805:2002, omogeneizzando l'intera aliquota dei campioni di latte e di uova (tuorlo e albume) mentre, per i campioni di vegetali, è stata omogeneizzata la parte edibile, eliminando i residui di terriccio e la buccia. La mineralizzazione è stata effettuata mediante digestione acida in microonde con HNO<sub>3</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mentre la determinazione strumentale è stata effettuata con uno spettrometro di massa al plasma induttivamente accoppiato (Elan DRC II) seguendo il metodo UNI EN 15763:2010. La curva di taratura è stata costruita su 5 livelli di fortificazione nel range 0.0-10 ng/mL. Il LOQ del metodo per ciascun elemento è stato calcolato come 10 volte la deviazione standard di 20 bianchi. Precisione ed esattezza sono state determinate adoperando Materiali di Riferimento Certificati. La concentrazione di metalli su ciascun campione risulta dalla media di 2 determinazioni, senza correzione per il fattore di recupero. Gli esami effettuati sugli alimenti hanno evidenziato solo un superamento del limite massimo per la presenza di piombo su prodotti vegetali, in particolare per un campione di lattuga. Nessun

superamento è stato osservato invece per il cadmio. Per le uova, pur in assenza di limiti massimi, sono stati rilevati in alcuni casi valori elevati di taluni metalli in campioni con presenza di PCDD/F e DL-PCB oltre i limiti consentiti. Per tutti gli altri elementi chimici non sono state evidenziate particolari criticità sia rispetto a un valore medio ottenuto sia per confronto con i dati riportati in letteratura sul contenuto di metalli pesanti in alimenti prelevati in diverse aree, anche quelle esposte a maggior rischio perché in prossimità di aree industriali.

### P13

#### **Determinazione dei tenori di cadmio in organi e tessuti bovini, suini, ovini ed equini allevati in Sicilia**

Andrea Macaluso,<sup>1</sup> Antonio Vella,<sup>1</sup> Giuseppe Giangrosso,<sup>1</sup> Gaetano Cammilleri,<sup>1</sup> Stefania Graci,<sup>1</sup> Marco Collura,<sup>1</sup> Michele Chetta,<sup>1</sup> Nicola Cicero,<sup>2</sup> Vincenzo Ferrantelli<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, Palermo; <sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Veterinarie, Università degli Studi di Messina, Messina, Italy

Il cadmio ed altri metalli pesanti sono elementi di ormai nota tossicità diffusamente utilizzati nel settore industriale. Tra i settori produttivi alimentari maggiormente coinvolti dalla contaminazione di questi composti rientra sicuramente l'allevamento terrestre. Molti degli animali allevati nel territorio siciliano, attraverso il consumo di vegetali possibilmente contaminati a causa di politiche di irrigazione non controllate, possono incorrere a fenomeni di bioaccumulo di queste sostanze, rappresentando un grave problema per la salute dei consumatori e degli stessi animali. In questo studio sono stati esaminati 339 campioni di tessuto ed organi appartenenti alle specie *Bos taurus*, *Sus scrofa domesticus* L., *Ovis aries*, *Equus caballus*, per la rilevazione delle concentrazioni di cadmio attraverso l'implementazione di una metodica basata sull'assorbimento atomico. La prima fase estrattiva del campione richiede la digestione del campione attraverso l'utilizzo di un digestore a microonde. Il campione digerito è stato successivamente diluito con acqua deionizzata e sottoposto ad analisi attraverso l'utilizzo di uno spettrofotometro ad assorbimento atomico dopo calibrazione. I risultati hanno mostrato tenori di cadmio al di sotto del limite di rivelabilità del metodo (LOD), tranne per un campione di fegato bovino. I dati ottenuti suggeriscono uno stato di contaminazione da cadmio dei prodotti allevati in territorio siciliano molto basso, con tenori che garantiscono la salvaguardia del consumatore. Il livello di cadmio over LOD può essere ricondotto all'organo esaminato. Nel fegato il cadmio si lega con alcune proteine e forma complessi che sono trasportati ai reni, dove si accumula e danneggia i sistemi di filtrazione. Ciò causa l'escrezione di proteine essenziali e di zuccheri ed un ulteriore danno renale.

### P14

#### **Indagine preliminare sui rapporti tra consulenza e operatori del settore alimentare nei Pubblici Esercizi a Milano**

Claudia M. Balzaretto,<sup>1</sup> Daniele Vittorio Moroni,<sup>2</sup> Katia Razzini,<sup>3</sup> Sabrina Ratti<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze veterinarie per la salute, la produzione animale, e la sicurezza alimentare, Milano; <sup>2</sup>Tecnico della Prevenzione, Milano; <sup>3</sup>Dottore in Scienze della Prevenzione, Segretario Regionale U.N.P.I.S.I., Milano, Italy

Sebbene siano trascorsi molti anni dall'entrata in vigore dei regolamenti europei noti come *Pacchetto Igiene* e sebbene l'OSA sia divenuto il responsabile primario delle sue produzioni, nella maggioranza dei casi questi si affida ad un consulente e tecnico che dovrebbe essere in grado di supportarlo nella applicazione corretta dell'intero sistema. Partendo dalla considerazione che il legislatore, contrariamente a quanto previsto per la sicurezza dei lavoratori, non ha ritenuto di fissare requisiti minimi per i consulenti che operano nel settore della sicurezza alimentare, come stesura di piani di autocontrollo, formazione degli addetti, ci siamo proposti di sottoporre ad indagine preliminare un campione di pubblici esercizi della città di Milano relativamente ai rapporti tra le aziende di consulenza e gli operatori del settore alimentare. Le aree di interesse sono state: la modalità di scelta del consulente, la tipologia del rapporto professionale, la coerenza dei manuali di autocontrollo proposti, la fruibilità di informazioni e la tipologia di formazione. Sono stati effettuati 65 sopralluoghi a pubblici esercizi operanti nel settore ATECO sez. 554 e 553 nella città di Milano nel periodo settembre - dicembre 2014 con una check list composta da 27 domande, di cui 11 relative all'OSA, 8 relative al consulente, 6 relative al Manuale e 2 relative alla formazione dell'OSA. Nel 34% delle osservazioni è emerso che i piani di autocontrollo non sono coerenti con l'attività svolta e che nel 68% non sono stati aggiornati dopo la prima edizione, che è contestuale alla apertura della attività. Questo dato è correlabile ai requisiti del consulente che, nel 52% dei casi osservati, potrebbe non avere i requisiti tecnico-professionali per la prestazione resa in quanto non ha reso fruibile all'OSA il proprio titolo di studio. Inoltre, sebbene sia evidente un'attenzione particolare da parte dei consulenti ad adempiere agli obblighi espressamente richiamati dalla normativa, come ad esempio la redazione del piano di autocontrollo, è altrettanto evidente che la trattazione è lacunosa e insufficiente, esponendo l'OSA a una carenza documentale che potrebbe portare a sanzioni amministrative di rilievo. Per quanto riguarda la formazione degli OSA, assolta da un punto di vista formale, si evidenzia infine che è ancora lontano l'obiettivo di renderli soggetti realmente autonomi in tema di sicurezza alimentare.

### P15

#### **Monitoraggio del punto crioscopico del latte bufalino**

Antonella Pesce, Caterina Salzano, Anna De Felice, Francesca Garofalo, Salvatore Liguori, Annunziata De Santo, Pierpaolo Palermo, Achille Guarino

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Portici (NA), Italy

Scopo del lavoro è stato quello di elaborare i dati ottenuti dalle analisi eseguite negli ultimi 7 anni al fine di ottenere il valore medio di punto crioscopico (PC) più rappresentativo per la specie bufalina. Inoltre è stata stimata la variabilità del parametro PC, nell'intervallo di tempo considerato, confrontandolo con i dati medi della specie bovina. Lo studio è stato condotto analizzando campioni di latte di massa bufalino della provincia di Caserta, pervenuti presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno nel periodo 2008-2014. Tutti i campioni sono stati esaminati in doppio e sottoposti a controllo chimico - fisico. La determinazione del PC è stata effettuata solo su campioni di latte che avevano un'acidità, espressa in acido lattico, non superiore a 0,18 g di acido lattico per 100 mL di latte e che, all'esame chimico fisico, presentavano percentuali di grasso, proteine e lattosio tipiche della specie bufalina. I dati sono stati normalizzati, eliminando i valori outlier. Nel periodo dal 2008 al 2014 sono stati esaminati 1886 campioni di latte bufalino

e 1711 campioni di latte bovino. Dalla elaborazione dei dati si è ottenuto un valore medio di PC di  $-0,528^{\circ}\text{C}$  per il latte bufalino e di  $-0,522^{\circ}\text{C}$  per il latte bovino. In particolare, si è osservato che, nel periodo compreso tra il 2008 al 2014, la percentuale di campioni con un valore al di sopra di  $-0,520^{\circ}\text{C}$  si è ridotta dal 35 al 6% per il latte bufalino e dal 35 al 5.4% per il latte bovino. Analizzando l'ultimo anno di campionamento (2014) si è evidenziato un valore medio di PC pari a  $-0,536^{\circ}\text{C}$ , con un intervallo di confidenza  $-0,534/-0,537^{\circ}\text{C}$ , una varianza di 81,51 e una deviazione standard di 9,03. Oltre il 90% del patrimonio nazionale bufalino è concentrato nelle regioni del sud Italia. La Campania alleva circa il 70% dei capi e per tale motivo il numero di prove valutate risulta decisamente rappresentativo. Il valore medio di PC nel latte bufalino è risultato più basso rispetto a quello bovino, ciò è giustificabile dalla differente composizione del latte bufalino, più ricco in sali minerali. La percentuale dei campioni di latte che presentano un valore maggiore di  $-0,520^{\circ}\text{C}$  nel latte bufalino e bovino si è ridotta negli ultimi anni. Questo dato farebbe pensare ad una probabile diminuzione delle percentuali di frodi; in realtà il punto di congelamento dipende da molteplici fattori che ne determinano la variabilità: mungitura serale e mattutina, stato sanitario della mammella, tipo di alimentazione (gravi carenze o diete sbilanciate, carenza di fibra, pascolo), modalità di mungitura (acqua tecnologica), sistema di raccolta latte, modalità di prelievo e conservazione (acidità del latte). Di conseguenza la diminuzione di questa percentuale potrebbe essere dovuta semplicemente ad una maggiore sensibilizzazione e attenzione, da parte dell'allevatore, alla corretta gestione dei fattori che influenzano il punto crioscopico. Una delle cause che maggiormente influenza il valore del PC è il periodo di lattazione. In particolare, nelle aziende bufaline, gli allevatori utilizzano la tecnica di destagionalizzazione, concentrando i parti in primavera-estate. Pertanto, ulteriori indagini dovrebbero essere effettuate in tale periodo, per valutare l'influenza di questa pratica sulla composizione del latte di massa e quindi sul PC.

## P16

### Analisi dei Controlli Ufficiali in Regione Campania

Diletta Mandato,<sup>1</sup> Germana Colarusso,<sup>1</sup> Roberta Pellicanò,<sup>1</sup> Loredana Baldi,<sup>1</sup> Achille Guarino,<sup>1</sup> Paolo Sarnelli<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Portici (NA);  
<sup>2</sup>Regione Campania, Unità Operativa Dirigenziale Prevenzione e Sanità Pubblica Veterinaria, Napoli, Italy

I Controlli Ufficiali rappresentano lo strumento delle AASSLL atto a migliorare e rendere uniforme il livello di Sicurezza Alimentare e di Sanità Pubblica Veterinaria sul territorio regionale. La programmazione dei controlli è dettata dal Piano Regionale Integrato (PRI). Il PRI promuove un approccio coerente, completo ed integrato ai Controlli Ufficiali su tutti i settori e tutte le fasi della catena alimentare animale e umana, della Sanità Pubblica Veterinaria e della salute dei vegetali; individua le priorità in funzione dei rischi, i criteri per la categorizzazione del rischio e le procedure di controllo più efficaci. Il PRI è lo strumento basilare da utilizzare sia a livello regionale che territoriale affinché i Controlli Ufficiali siano pianificati, programmati e svolti secondo principi di integrazione e ottimizzazione. In Regione Campania le attività inerenti la Sicurezza Alimentare e la Sanità Animale sono gestite e registrate da un sistema informatico unico regionale, su piattaforma WEB, denominato GISA. Questo è utilizzato dalle Autorità Competenti per inserire tutte le informazioni sulle imprese e sulla relativa categorizzazione in base

al rischio, sulle attività di controllo ufficiale e sulle non conformità riscontrate. È dotato inoltre di uno specifico capitolo relativo alla reportistica per ottenere l'aggregazione di dati in tempo reale. Nel periodo 2011-2014 sono stati effettuati e registrati 294.557 Controlli Ufficiali. Il maggior numero di controlli è effettuato negli stabilimenti registrati e riconosciuti nonché nelle aziende zootecniche. La suddivisione per tipologia di controllo ufficiale è rappresentata per il 91% (270.124) da ispezioni semplici, per l'8% da ispezioni per la categorizzazione del rischio degli stabilimenti (22.463) e per lo 0.6% da audit (1617); il restante 0,4% riguarda controlli effettuati per altri motivi. Nel quadriennio sono state riscontrate 22.926 non conformità sull'intero territorio regionale, rilevate attraverso 15.565 controlli ufficiali effettuati presso 10.563 attività. La rilevazione delle non conformità avviene per il 99,9% in corso di ispezioni semplici e solo per lo 0,1% in corso di ispezioni effettuate per la categorizzazione degli stabilimenti. Nel corso del quadriennio si è assistito ad un incremento progressivo nell'utilizzo del Sistema Informativo Regionale GISA, sia per quanto attiene l'anagrafica che l'inserimento delle attività di controllo e campionamento. La maggiore criticità anagrafica è a carico degli operatori del settore mangimi e dei grossisti dei medicinali veterinari. Nell'attività di categorizzazione degli stabilimenti quasi la metà degli stabilimenti riconosciuti ha registrato un decremento della categoria di rischio, mentre per gli stabilimenti registrati tale quota ammonta al 39% del totale dei categorizzati. Per questi ultimi si evidenzia che i controlli si distribuiscono solo su una ridotta percentuale delle unità presenti sul territorio regionale. Particolare criticità si riscontra nella distribuzione all'ingrosso, nei trasporti e nella ristorazione pubblica. Si registra invece un monitoraggio costante sulla ristorazione collettiva e sulle altre tipologie di attività. Per gli stabilimenti riconosciuti il controllo avviene in maniera più omogenea e costante, garantendo ogni anno un monitoraggio puntuale di tutti gli stabilimenti attivi sul territorio regionale.

## P17

### Cadmio e piombo in muscoli e fegati equini macellati nella regione Puglia

Marina Tarallo,<sup>1</sup> Celeste Tancredi,<sup>1</sup> Oto Miedico,<sup>1</sup> Ciro Pompa,<sup>1</sup> Eleuterio Pellegrino,<sup>1</sup> Leonardo Carosielli,<sup>2</sup> Eugenio Chiaravalle<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata, Foggia;  
<sup>2</sup>Azienda Sanitaria Locale di Foggia, Foggia, Italy

A causa della diffusa contaminazione da cadmio, già a partire dal 2005 una nota ministeriale vietava il consumo a uso umano di tutti i fegati equini, indipendentemente dall'età e dalla provenienza geografica degli animali. In riferimento alle indicazioni del Ministero della Salute, è stato condotto uno studio per monitorare, a distanza di un decennio, il livello di contaminazione da cadmio (Cd) e piombo (Pb) in muscolo e fegato di equini, con riferimento ai limiti imposti dalla normativa vigente (Reg. CE 1881/2006). Sono stati analizzati per contenuto di Cd e Pb 52 campioni di muscolo e 52 di fegato, prelevati da altrettanti esemplari equini, 13 provenienti dall'Italia e 39 dalla Polonia, macellati in provincia di Bari, nel periodo marzo-maggio 2015. Gli animali, di età compresa tra 4 e 30 mesi (solo due di 5 anni), erano 20 femmine e 32 maschi. L'analisi è stata eseguita con metodo normato (UNI EN 15763:2010): i campioni di fegato e muscolo (circa 500 g) sono stati omogeneizzati mediante mixer a lame; 1 g è stato mineralizzato con 6 mL di HNO<sub>3</sub> e 2 mL di H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La soluzione ottenuta, diluita a 50 mL, è stata analizzata mediante Spettrometro di Massa al



Plasma Induttivamente Accoppiato (Elan DRC II, PerkinElmer) mediante taratura interna matrice-specifica. Come controllo qualità è stato analizzato ad ogni seduta il Materiale Certificato NIST 1577b Bovine Liver. Per ciascun campione è stata eseguita l'analisi in doppio, con ripetibilità <5%. L'incertezza estesa del metodo, necessaria per stabilire la conformità ai limiti di legge, è pari a 13% e 15% per Cd e Pb, rispettivamente. Tutti i campioni di muscolo sono risultati inferiori ai limiti di legge, che per il Cd è 0,20 mg/kg e per il Pb è 0,10 mg/kg (parametro di riferimento, valido per matrici simili come muscolo bovino, suino, ovino e pollame). La media delle concentrazioni di Cd nel muscolo è risultata pari a 0,010 mg/kg, con distribuzione tra 0,0016 e 0,071 mg/kg; per il Pb si è riscontrato un tenore medio pari a 0,0053 mg/kg con valori compresi fra 0,0025 e 0,030 mg/kg. Nei campioni di fegato è stata rilevata una media dei valori di Cd pari a 0,68 mg/kg, con concentrazioni comprese tra 0,0051 e 2,07 mg/kg. Sono state riscontrate 25 non conformità per Cd (limite ammesso 0,50 mg/kg) in 20 campioni di provenienza polacca e 5 italiana. Il valore medio dei tenori di Pb è risultato pari a 0,151 mg/kg, con livelli compresi tra 0,016 e 1,91 mg/kg. Il limite di riferimento per il Pb (0,50 mg/kg) è stato superato in 3 campioni (2 esemplari polacchi ed 1 italiano). Lo studio mostra la presenza di un elevato livello di contaminazione da Cd nei fegati equini. Il 48% dei campioni è risultato infatti non conforme, con un tenore medio superiore al limite e valori massimi fino a 4 volte più elevati. La provenienza geografica sembra avere una sostanziale influenza sull'incidenza delle non conformità, mentre non sono emerse differenze dovute all'età e al sesso degli animali. Pertanto, sembra ragionevole, a 10 anni di distanza, mantenere in vigore il divieto di consumo dei fegati equini, senza distinzione di provenienza ed età dell'animale macellato, a meno che non si controllino in laboratorio i tenori di contaminazione. Lo studio ha inoltre evidenziato che, nel muscolo di equini commercializzati nella regione Puglia, i livelli di Cd e Pb rientrano, rispettivamente, nei limiti massimi consentiti dalla legge o fissati per altre specie, a conferma di un elevato standard di sicurezza per la tutela della salute del consumatore.

## P18

### Monitoraggio dei residui di medicinali veterinari e di contaminanti ambientali negli animali vivi e nei prodotti di origine animale nel triennio 2012-2014 in Regione Campania

Rosa D'Ambrosio,<sup>1</sup> Roberta Brunetti,<sup>1</sup> Pierpaolo Palermo,<sup>1</sup> Loredana Baldi,<sup>1</sup> Daniela Bove,<sup>1</sup> Paolo Sarnelli,<sup>2</sup> Achille Guarino<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Portici (NA);

<sup>2</sup>Regione Campania, Unità Operativa Dirigenziale Prevenzione e Sanità Pubblica Veterinaria, Napoli, Italy

Scopo del lavoro è analizzare i risultati del Piano Nazionale Residui (PNR) svolto in Regione Campania (RC) nell'arco del triennio 2012-2014. La Commissione Europea (CE) prevede che tutti gli Stati Membri dispongano di un sistema di sorveglianza e controllo degli alimenti di origine animale per la ricerca di residui di farmaci veterinari, di sostanze vietate e di sostanze indesiderabili. La direttiva 96/23/CE stabilisce i criteri dei PNR, definendo il numero minimo di campioni da prelevare, i luoghi (allevamenti, mattatoi, centri di raccolta e di imballaggio delle uova), le categorie animali e le categorie di sostanze da ricercare suddivise in A e B. Alla categoria A, divisa in 6 gruppi (A1-A6), appartengono le sostanze ad effetto anabolizzante e le sostanze non autorizzate, alla categoria

B, suddivisa in 3 gruppi (B1, B2 e B3), appartengono i medicinali veterinari e gli agenti contaminanti. La RC, sulla base delle indicazioni del PNR ed in considerazione delle realtà zootecniche, predispone il Piano Regionale, coordinando l'attività delle Aziende Sanitarie Locali responsabili del prelievo dei campioni. L'esecuzione delle analisi di laboratorio è affidata alla rete degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali. In RC, l'Osservatorio Regionale Sicurezza Alimentare (ORSA) presso IZS del Mezzogiorno, procede mensilmente all'elaborazione dei dati estratti dal Sistema Informativo per la Gestione dei Laboratori di Analisi (SIGLA); verifica la congruità degli stessi attraverso il software statistico IMB Spss® 21, con quanto richiesto dal Ministero della Salute (attraverso specifico tracciato record) per l'upload nel Sistema Informativo Nazionale (NSIS). Infine, l'ORSA procede all'aggiornamento ed alla rendicontazione dello stato di avanzamento del PNR per il nucleo di monitoraggio regionale. Nel 2012 sono stati analizzati 1.424 campioni, di cui 31% per la categoria A e 69% per categoria B. Nel 2013 sono stati analizzati 1.328 campioni, di cui 29,2% per la categoria A e 70,8% per la categoria B. Nel 2014 sono stati analizzati 1.420 campioni, di cui 27,2% per la categoria A e 72,8% per la categoria B. L'attività di monitoraggio è risultata sempre superiore rispettivamente del 32, 17 e 35% rispetto al numero di campioni programmati per ciascun anno. Nel triennio 2012-2014, sono stati analizzati 4.176 campioni di cui 8 risultati non conformi (NC), pari allo 0,2%. In tali NC è stata rilevata la presenza di residui appartenenti alla categoria B, gruppo B3: altre sostanze e contaminanti ambientali. Le 8 NC sono così distribuite negli anni: 4 nel 2012 (0,28%), 3 nel 2013 (0,23%) ed 1 nel 2014 (0,07%). In allevamento sono state rilevate 4 NC: 3 per aflatoossine M1 nel latte ed 1 per aflatoossine B1 nel mangime. Al macello sono state rilevate 4 NC per piombo di cui 2 in muscolo suino e 2 in muscolo bovino. L'assenza di NC in Regione Campania delle sostanze appartenenti alla categoria A è in controtendenza al dato nazionale. Le 4 NC per aflatoossine registrate negli anni 2012-2013 sono legate all'emergenza climatica verificatasi nell'estate 2012 che ha comportato un aumento della presenza di aflatoossina nel mais e, come conseguenza, di aflatoossine M1 nel latte. Le 4 NC per piombo nel muscolo possono essere attribuite alla vicinanza degli allevamenti di origine ad arterie stradali ad elevata percorrenza. Nel complesso l'esiguità del numero assoluto delle NC è in linea con il trend delle non conformità a livello nazionale.

## P19

### Prevalenza di *E. coli* Verocitotossici negli alimenti. Studio sperimentale del trattamento radiante finalizzato alla sicurezza e qualità igienica degli alimenti

Cinzia Cardamone,<sup>1</sup> Maria Cristina D'Oca,<sup>2</sup> Antonio Bartolotta,<sup>2</sup> Aldo Parlato,<sup>3</sup> Giuseppa Oliveri,<sup>1</sup> Giorgia Caruso,<sup>1</sup> Annamaria Di Noto<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sicilia, Palermo; Dipartimento di Scienze e Tecnologie Biologiche, Chimiche e Farmaceutiche; <sup>2</sup>Dipartimento di Energia, Ingegneria dell'Informazione e Modelli Matematici, Università degli Studi di Palermo, Palermo, Italy

Gli STEC (Shiga toxin-producing *E. coli*) rappresentano attualmente una tra le più importanti cause di malattia di origine alimentare nei paesi industrializzati. Negli ultimi anni, i dati dell'ECDC indicano in Europa un trend in aumento del numero di infezioni da STEC, con circa 6000 casi nel 2013, in particolar modo riconducibili a *E. coli* O157 (48.9%), seguito da O26 (12.8%). Il bovino rappresenta il

principale serbatoio di STEC in quanto è in grado di albergare il patogeno nell'intestino in modo del tutto asintomatico. La carne ed i prodotti derivati costituiscono dunque la principale fonte di infezione per l'uomo. Al fine di raccogliere dati sulla contaminazione da STEC lungo la filiera produttiva sono stati analizzati 136 campioni (81 di carni, 55 di latte crudo) mediante PCR Real Time (ISO/TS 13136:2012). I risultati di tale screening hanno evidenziato la positività per i determinanti di virulenza caratteristici degli STEC in 8 campioni (5,8%), di cui 6 di muscolo (4,4%) e 2 di latte (1,5%). La PCR inoltre ha confermato la presenza del gene O157 in 3 campioni di muscolo suino, mentre il gene per il sierogruppo O145 è stato riscontrato in 1 campione di carne bovina. Nell'ambito delle strategie finalizzate alla riduzione della contaminazione degli alimenti da agenti patogeni, il trattamento con radiazioni ionizzanti rappresenta un approccio innovativo rispetto ai metodi tradizionali ed il suo uso sta gradualmente aumentando a livello internazionale. È risultato quindi interessante condurre uno studio sperimentale con l'obiettivo di valutare l'efficacia del trattamento radiante sulla contaminazione da STEC e da *E. coli* non patogeni. Campioni di carne macinata sono stati contaminati con concentrazioni di  $10^4$  ufc/g di *E. coli* apatogeno (ATCC 25922) ed *E. coli* O157 (ATCC 35150) e successivamente irradiati alle dosi di 0.15, 0.25, 0.35 e 0.50 kGy. Le analisi microbiologiche per la numerazione di *E. coli* (ISO 16649-2:2010) ed *E. coli* O157 (CT-SMAC, 37°C per 24 h) hanno evidenziato un abbattimento delle cariche dei due microrganismi direttamente proporzionale all'aumento della dose di radiazioni ionizzanti impartita. In particolare, la dose di 0.25 kGy ha determinato un abbattimento delle cariche rispettivamente di circa 1,71 e 1,84 log ufc/g mentre la dose di 0.50 kGy si è dimostrata sufficiente ad abbattere la contaminazione al di sotto del limite di determinazione del metodo (<10 ufc/g). Nessuna differenza significativa è stata riscontrata nella riduzione della contaminazione tra il ceppo non patogeno di *E. coli* ed *E. coli* O157, a differenza di quanto riportato in letteratura, ovvero che è presente una certa variabilità nella resistenza all'irraggiamento oltre che interspecifica anche intraspecifica, tra diversi sierotipi e ceppi. Nell'ambito della problematica riferita alla contaminazione da STEC, l'irraggiamento potrebbe quindi rappresentare una buona strategia nel controllo dell'infezione in quanto una dose di 0.5 kGy è sufficiente a fornire un ampio margine di sicurezza ai consumatori, date anche le basse cariche con cui solitamente tali patogeni sono presenti negli alimenti. Lo studio è stato effettuato grazie al finanziamento del Ministero della Salute, nell'ambito del Progetto di Ricerca Corrente 2012 (Research Project code IZS SI 07/12).

## P20

### ***Campylobacter spp.* in preparazioni di carne avicola. Prevalenza di *Campylobacter spp.* in preparazioni di carne avicola prelevate al dettaglio e negli stabilimenti di trasformazione della regione Lazio**

Ziad Mezher,<sup>1</sup> Stefano Saccares,<sup>1</sup> Rita Marciandò,<sup>2</sup> Paola De Santis,<sup>1</sup> Eda Maria Flores Rodas,<sup>1</sup> Veronica De Angelis,<sup>1</sup> Roberto Condoleo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, Roma;

<sup>2</sup>Regione Lazio, Area Sanità Veterinaria, Roma, Italy

La campilobatteriosi è una delle più frequenti zoonosi a trasmissione alimentare in Europa. Gli avicoli sono considerati il reservoir più importante e *C. jejuni* e *C. coli* sono le due specie maggiormente associate a tale malattia. Lo scopo dello studio è stato quello di stimare la prevalenza di *Campylobacter spp.* in preparazioni di carne

avicola (pollo, tacchino e mista) prelevate dai Servizi Veterinari presso esercizi di vendita al dettaglio e stabilimenti di trasformazione nell'ambito di un piano di campionamento della regione Lazio. È stato inoltre osservato se determinati fattori, come la specie di provenienza e la tipologia di prodotto, potessero influenzare il tasso di isolamento. I campioni sono stati analizzati secondo il metodo colturale ISO 10272:2006, che consiste nell'inoculo di un campione di 25 g in un brodo selettivo di pre-aricchimento (Bolton Broth) in microaerofilia a 37°C per 6 ore e in una semina successiva su terreni selettivi (Modified Charcoal Cefoperazone Deoxycholate Agar and *Campylobacter* Selective Medium – Skirrow) per 48 ore a 41.5°C. I ceppi isolati, dopo conferma con test biochimici, sono stati tipizzati mediante RT-PCR e Multiplex PCR, la prima per identificare le sequenze di tre specie d'interesse (*C. coli*, *C. jejuni* e *C. lari*), la seconda per distinguere tra *C. jejuni* e *C. coli*. *Campylobacter spp.* è stato isolato da 12 campioni di preparazioni di carne di pollame (12/209, 5.7%) e *C. coli* e *C. jejuni* sono state le due specie maggiormente riscontrate. *Campylobacter spp.* è stato rilevato con maggiore frequenza nei campioni prelevati negli esercizi di vendita al dettaglio (10/146) e provenienti da prodotti non confezionati. Le cosce di pollo sono risultate la preparazione maggiormente contaminata (6/51). La prevalenza è risultata significativamente più bassa di analoghi studi precedenti. La ragione di tale minor tasso di isolamento potrebbe derivare dal maggiore grado di attenzione che negli ultimi anni è stato prestato nei confronti dell'igiene della macellazione al fine di ridurre i livelli di contaminazione. Il più alto tasso di isolamento da campioni prelevati in fase di vendita rispetto a quelli prelevati presso stabilimenti di lavorazione è stato riportato da altri autori e può essere motivato da una cross-contaminazione dovuta ad alla manipolazione degli alimenti al dettaglio. La più frequente contaminazione di carni di pollo, rispetto a quelle di tacchino, è in linea con recenti report europei e conferma il significativo ruolo epidemiologico di tale specie nella trasmissione del batterio. Nonostante la bassa prevalenza, la ricerca di *Campylobacter spp.* nella carne di pollame dovrebbe rimanere una priorità per i servizi veterinari in considerazione sia del fatto che quasi tutti i ceppi isolati appartenevano alle due specie più frequentemente associate alla campilobatteriosi umana sia dell'elevato numero di casi riportati dai sistemi di sorveglianza europei.

## P21

### **Identificazione dello stato di conservazione della carne di pollo: esame istologico e metodica HADH a confronto**

Fabio Olivo, Serena Meistro, Mario Botta, Danilo Pitardi, Marzia Pezzolato, Katia Varello, Luca Nocilla, Elisa Baioni, Daniela Meloni, Elena Bozzetta

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino, Italy

Da uno studio sui consumi dei diversi tipi di carne è stato recentemente stimato che la carne di pollo, attualmente al secondo posto dopo quella di maiale, diventerà nel 2020 la più consumata al mondo. Tra le frodi che interessano questo tipo di alimento sicuramente la vendita di prodotti decongelati per freschi ha suscitato da sempre l'attenzione sia degli organi legislativi che di quelli di controllo. Dal punto di vista del controllo ufficiale è necessario quindi un metodo analitico adeguato per differenziare carni fresche vs. decongelate in modo da garantire l'autenticazione del processo di produzione e consentire ai consumatori di fare scelte consapevoli. Tale metodo deve essere semplice, rapido e affidabile. Lo scopo del

lavoro è stato testare l'applicabilità dell'esame istologico e della determinazione dell'attività dell'HADH (-idrossi-Acil-CoA-deidrogenasi), come strumenti per l'individuazione della carne di pollo decongelata. Le carcasse sono state campionate al macello. Per l'esame istologico sono stati preparati 20 campioni freschi di petto di pollo e 40 congelati (-20°C per differenti periodi di tempo); essi sono stati fissati in formalina, processati, inclusi in paraffina, tagliati al microtomo, colorati con ematossilina-eosina, esaminati al microscopio ottico e classificati come positivi (congelati) quando sono stati osservati spazi otticamente vuoti causati dai cristalli di ghiaccio, negativi in caso contrario. Lo studio HADH è stato condotto su 40 campioni dei 60 esaminati istologicamente: 20 freschi e 20 congelati (-20°C per 6 giorni). Dal succo ottenuto pressando i campioni, è stata valutata spettrofotometricamente l'attività dell'HADH, misurando l'assorbanza del prodotto di reazione: nicotinamide adenina dinucleotide (NADH). Sono state calcolate sensibilità e specificità delle metodiche e il Kappa di Cohen per il metodo istologico. I valori di sensibilità e specificità del metodo istologico sono risultati rispettivamente 100% (IC 95% SE: 91,2-100%) e 70% (IC SP 95%: 45,7-88,1%), il Kappa di Cohen 0,757 (IC 95% 0,578-0,936). Per la prova HADH, è stato determinato il valore di cut-off di 0,55 per distinguere correttamente campioni freschi/decongelati; i valori di sensibilità e specificità sono risultati 100% (IC 95%: 83-100%) e 100% (IC 95%: 83-100%). I risultati dimostrano l'applicabilità di entrambi i test per l'identificazione della carne di pollo fresca e decongelata. La matrice è altamente deperibile e richiede un attento controllo della temperatura durante tutte le fasi del processo produttivo. Il Regolamento CE 1234/2007 prevede che essa venga commercializzata fresca o congelata, ma quella decongelata non può essere dichiarata fresca. Considerando che nel 2020 potrebbe diventare la carne più consumata a livello mondiale e che quella fresca non è visibilmente differente da quella decongelata, esiste un potenziale di frode nei confronti del consumatore ed è necessario poter disporre di un metodo analitico semplice, rapido e affidabile che le differenzi. Dai nostri risultati il test HADH risulta il più idoneo a tale scopo. E' fondamentale proteggere consumatori ed operatori del settore alimentare nei confronti di tale vendita fraudolenta, garantendo al tempo stesso il rispetto della normativa in materia.

## P22

### Approccio quantitativo sulla presenza di suini fortemente contaminati da *Salmonella spp.*: l'esperienza in un mattatoio suino della provincia di Fermo

Valentina Silenzi,<sup>1</sup> Loredana Di Giacomo,<sup>2</sup> Marta Paniccià,<sup>1</sup> Emanuele Simoni,<sup>1</sup> Francesca Ciuti,<sup>1</sup> Antonio Angellotti,<sup>2</sup> Sara Novelli,<sup>3</sup> Eleonora Scoccia,<sup>4</sup> Chiara Francesca Magistrali<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche, Terni; <sup>2</sup>Azienda Sanitaria Unica Regionale Marche, Servizio Igiene degli Alimenti di Origine Animale Area Vasta 4, Fermo; <sup>3</sup>Scuola di Specializzazione in Ispezione degli Alimenti di Origine Animale, Università degli Studi di Perugia, Perugia; <sup>4</sup>Osservatorio Epidemiologico Veterinario, Perugia, Italy

L'infezione da *Salmonella spp.* è una delle zoonosi più diffuse trasmesse attraverso gli alimenti. Dopo uova e carne di pollo, la carne suina rappresenta una delle più importanti fonti di contaminazione per l'uomo. Scopo del presente lavoro è stato quello di valutare il livello quantitativo della contaminazione da *Salmonella spp.* in un mattatoio della regione Marche. La struttura, di tipo semi-industriale, macella una volta a settimana circa 50-55 suini di provenienza

locale (trasporto in circa 2 ore; sosta di 48 ore prima della macellazione). Il campionamento, effettuato da maggio a dicembre 2014, è stato calcolato per stimare la prevalenza di suini con una carica di *Salmonella spp.* a livello ciecale maggiore o uguale a 1000 batteri/grammo ( $\geq 3$  log) per giornata di macellazione (suini fortemente contaminati - SFC). Si è considerato un livello di confidenza (IC) del 95%, una prevalenza attesa del 12% e una precisione del 10%. Il livello di prevalenza attesa è stato calcolato sulla base degli esiti di un progetto pilota. Per ciascun animale, selezionato tramite randomizzazione semplice, è stato effettuato un prelievo del contenuto ciecale e un tampone di carcassa. Il campionamento delle carcasse è avvenuto prima del lavaggio finale seguendo la norma UNI EN ISO 17604:2003/E. Al fine di verificare l'assenza di *Salmonella spp.* all'interno della struttura sono stati effettuati tamponi ambientali su 9 punti della catena di macellazione sanificata. Sono state complessivamente monitorate 12 sessioni di macellazione, per un totale di 600 campioni (300 feci e 300 tamponi di carcassa) dai suini macellati e 108 campioni ambientali. Per la ricerca di *Salmonella spp.* è stata utilizzata la metodica ISO/TS 6579/2:2012/A1 e gli isolati sono stati sottoposti a sierotipizzazione e numerazione mediante Most Probable Number (MPN) (ISO 7218:2007/E). I risultati ottenuti hanno mostrato l'assenza di *Salmonella spp.* da tutti i tamponi ambientali. Le positività di *Salmonella spp.* nei contenuti ciecali sono state 52 pari al 17,33% (IC95%: 15-20%); 21 di questi presentavano una carica  $\geq 3$  log, con una prevalenza stimata di SFC pari al 7% (IC95%: 4,49-10,66%). Le positività riferite ai tamponi carcassa sono state di 2, pari a 0,67% (IC95%: 0,42- 1,46%). La sierotipizzazione ha evidenziato la presenza di *S. Derby* (54%), *S. Livingstone* (2%), *S. Rissen* (23%), *S. 4,[5],12:i:-* (21%). I due stiptipi provenienti da tamponi carcasse sono stati attribuiti ai sierotipi *Derby* e *4,[5],12:i:-*. I sierotipi di *Salmonella spp.* riscontrati nel corso del presente lavoro sono in linea con quanto riportato in letteratura. Complessivamente, i livelli di prevalenza di *Salmonella spp.* sono invece più contenuti rispetto a quanto descritto in altre indagini svolte in Italia, in particolare per la contaminazione delle carcasse. Ciò può essere ricondotto ad alcune caratteristiche dell'azienda in esame (tempi brevi di trasporto, basso volume di macellazione, buone condizioni di igiene ambientale). Nonostante la presenza di sierotipi associati ad infezioni zoonosiche e di suini fortemente contaminati, potenziale fonte di contaminazione diretta o indiretta di *Salmonella* per le carcasse, le basse positività sulla superficie delle carcasse e a livello ambientale indicano una efficace applicazione delle procedure di pulizia e sanitizzazione, capaci di circoscrivere o minimizzare la contaminazione della carne suina.

## P23

### Categorizzazione del rischio in uno stabilimento per la produzione di tofu: l'esperienza dell'Area Vasta 4 di Fermo

Loredana Di Giacomo,<sup>1</sup> Ezio Ferretti,<sup>1</sup> Antonio Angellotti,<sup>1</sup> Sara Novelli,<sup>2</sup> Matteo Michetti,<sup>3</sup> Federica Pietracchi,<sup>4</sup> Xiaoting Wang,<sup>5</sup> Anna Rita Loschi<sup>6</sup>

<sup>1</sup>Azienda Sanitaria Unica Regionale Marche, Servizio Igiene degli Alimenti di Origine Animale Area Vasta 4, Fermo; <sup>2</sup>Scuola di Specializzazione in Ispezione degli Alimenti di Origine Animale, Università degli Studi di Perugia, Perugia; <sup>3</sup>Scuola di Specializzazione in Igiene e Controllo dei Prodotti della Pesca e dell'Acquacoltura, Università degli Studi di Camerino, Camerino (MC); <sup>4</sup>Biologo, Libero Professionista, Porto San Giorgio (AP); <sup>5</sup>Tecnologo Alimentare, Libero Professionista; <sup>6</sup>Scuola di Bioscienze e Medicina Veterinaria, Polo di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Camerino, Camerino (MC), Italy



Il Regolamento (CE) 882/04 stabilisce che gli Stati Membri devono garantire che i controlli ufficiali siano eseguiti periodicamente in base ad una valutazione dei rischi e con frequenza appropriata. La frequenza ed il tipo dei controlli dovrebbero essere preceduti da una specifica valutazione e categorizzazione del rischio delle singole attività produttive insistenti nel territorio che diventa pertanto propedeutica ad una elaborazione dei piani di programmazione del controllo ufficiale. Attualmente con il Decreto Dirigenziale n. 45 del 17/03/2015, la Regione Marche, ai fini della classificazione in base al rischio degli stabilimenti di produzione e lavorazione delle sostanze alimentari, ha definito 12 criteri raggruppati nelle seguenti categorie: caratteristiche dello stabilimento, entità produttiva, caratteristiche dei prodotti, igiene della produzione, sistema di autocontrollo e dati storici. Da sottolineare che la categoria caratteristiche dei prodotti ha sostituito la tipologia di attività, considerata nella precedente normativa, prendendo in esame 3 criteri: complessità delle attività produttive, grado di deperibilità e destinazione d'uso. Scopo del presente lavoro è stato quello di valutare le fasi della produzione tofu in uno stabilimento riconosciuto di tipo industriale al fine della corretta definizione della categoria di rischio. Sono state prese in esame le due linee produttive, una dedicata alla produzione di silken tofu, l'altra di tofu fresco, fritto e caramellato. Per la valutazione della deperibilità delle varie tipologie di tofu sono stati effettuati dei campionamenti per la determinazione del valore di pH e di  $a_w$ . Sono state prese in esame le schede tecniche dei suindicati prodotti dove erano riportate, tra le altre informazioni, la *shelf-life* e la destinazione d'uso di ognuno. I risultati delle analisi hanno evidenziato valori di pH compresi tra 6,5 e 5,5 (6,5 silken tofu, 5,5 tofu fresco, 5,9 tofu fritto e 6,2 tofu caramellato) ed elevati tenori di  $a_w$  pari a 0,98/0,99 per tutte le tipologie di prodotto. La determinazione della *shelf-life* dei singoli prodotti è stata effettuata dal produttore sulla base delle indagini bibliografiche, dei risultati delle analisi microbiologiche eseguite in autocontrollo e delle caratteristiche di produzione del tofu, in termini di trattamenti termici e tipologia di confezionamento. In particolare il silken tofu prevede un primo trattamento del latte di soia a 60°C, un secondo trattamento a 100°C, il confezionamento in vaschette, un ulteriore trattamento termico del prodotto confezionato a 80-90°C ed una durabilità di 2 mesi. La tecnologia di produzione del tofu fresco e di quello fritto prevede un trattamento termico del latte di soia a 100°C, un confezionamento sottovuoto o con acqua di governo per il primo, un confezionamento in sacchetto termosigillato per il secondo e la durabilità è di 10 giorni. Per il tofu caramellato è previsto un trattamento termico del latte di soia a 100°C, seguito dalla caramellatura a vapore e un confezionamento sottovuoto, e la *shelf-life* è di 1 mese. Per quanto concerne la destinazione d'uso, sono tutti prodotti da consumare previa cottura ad eccezione del silken tofu che è considerato un *Ready-To-Eat*. La categorizzazione, effettuata mediante i suindicati criteri, ha collocato l'azienda ad un livello di rischio medio, perfettamente sovrapponibile alla categorizzazione determinata con la precedente normativa.

## P24

### Caratteristiche organolettiche, chimico-fisiche e microbiologiche di carne di bovini alimentati con diete integrate con sansa vergine di oliva (sottoprodotto dell'industria elaiotecnica)

Raffaella Branciani,<sup>1</sup> David Ranucci,<sup>1</sup> Dino Miraglia,<sup>1</sup>  
Stefania Urbani,<sup>2</sup> Sonia Esposito,<sup>2</sup> Maurizio Servili<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Medicina Veterinaria; <sup>2</sup>Dipartimento di Scienze Agrarie, Alimentari ed Ambientali, Università degli Studi di Perugia, Perugia, Italy

Scopo del presente lavoro è stato quello di valutare l'effetto dell'impiego nell'alimentazione di bovini da carne della sansa di oliva (un prodotto secondario dell'estrazione meccanica dell'olio vergine di oliva) sulle caratteristiche igieniche e chimico-fisiche della carne confezionata con film permeabile all'ossigeno durante il periodo di conservazione. Tre gruppi di animali sono stati alimentati con le seguenti diete: dieta standard (CTR); dieta con 0,5% di sansa negli ultimi 90 giorni prima della macellazione (OC1); dieta con 0,5% di sansa per 60 giorni seguita da dieta standard negli ultimi 30 giorni prima della macellazione (OC2). Le carcasse sono state sezionate, dopo un periodo di frollatura di 10 giorni a T° di 0±2 °C, e la carne è stata confezionata in atmosfera ambiente con film permeabile all'ossigeno. Sono state effettuate analisi per la conta della Carica Batterica Totale e delle Enterobacteriaceae, il colore (CIE L\*a\*b\* colour system), i perossidi, le sostanze reattive all'acido tiobarbiturico e l'analisi sensoriale a quattro differenti tempi di conservazione (0, 3, 6 e 9 giorni di conservazione a temperatura di 4±1°C). L'aggiunta della sansa nella dieta degli animali non ha esercitato alcun effetto sulla flora microbica, mentre è stata evidenziata una migliore stabilità ossidativa (minor numero dei perossidi, del valore dei TBARS e di off-odor) e del colore (più alti valori di a\* e dell'indice di saturazione e minori valori di Hue nei campioni OC) della carne durante la conservazione, maggiormente evidente nel gruppo OC 1. I risultati del presente studio dimostrano che la sansa vergine di oliva usata nella dieta degli animali ritarda l'ossidazione dei lipidi, lo sviluppo di off-odor e favorisce il mantenimento del colore della carne. Ulteriori studi sono necessari per verificare l'effetto di queste sostanze bioattive sulla vita commerciale del prodotto in diversi sistemi di packaging.

## P25

### Identificazione di legumi irraggiati con metodo di screening DNA comet

Rosa Villani, Grazia Siragusa, Francesca Floridi,  
Michele Mangiacotti, Eugenio Chiaravalle

Centro di Referenza Nazionale per la Ricerca della Radioattività nel Settore Zootecnico-Veterinario, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata, Foggia, Italy

L'irraggiamento è un trattamento fisico utilizzato nell'industria alimentare per il miglioramento della qualità igienico-sanitaria e il prolungamento della *shelf-life* dei prodotti alimentari di origine animale e vegetale. Per garantire la sicurezza dei prodotti alimentari ed assicurare il diritto di scelta del consumatore si rende necessario lo sviluppo di metodi di screening e di conferma accreditati per il controllo ufficiale di alimenti irraggiati. Il DNA Comet Assay (DCA) è una tecnica biologica di screening che consente di visualizzare il danno cellulare indotto da radiazioni ionizzanti e che è stata utilizzata in questo studio per identificare e valutare, in modo affidabile ed in tempi brevi, campioni di semi di legumi secchi irraggiati di diverse varietà. Sono stati acquistati sul mercato locale campioni di semi di leguminose (fam. Fabaceae) delle più comuni varietà di specie di *Cicer arietinum*, *Lens culinaris* e *Phaseolus vulgaris*. I campioni sono stati aliquotati in parti uguali, utilizzando la prima aliquota come controllo negativo, mentre le restanti parti sono state irraggiate a dosi crescenti di 0,5-1-1,5 kGy con un irraggiatore a raggi X a bassa energia. I livelli di trattamento sono stati scelti tenendo conto della dose globale media consentita per tale categoria alimentare ai sensi della Direttiva 1999/2/CE. Poiché le radiazioni ionizzanti provocano frammentazione del DNA, il DCA consente di rilevare in



modo efficace il danno al DNA e di visualizzarlo mediante microscopio ad epifluorescenza. Al fine di ottimizzare la valutazione del trattamento radiante sono stati testati diversi tempi riferiti alle fasi di sedimentazione, lisi ed elettroforesi. Tutti i campioni analizzati sono stati correttamente identificati discriminando il campione non trattato da quello irradiato a tutti i livelli di dose somministrata. Sono stati definiti i parametri ottimali che hanno consentito di velocizzare i tempi di esecuzione delle analisi e ridurre contestualmente il fenomeno della poliploidia, comune nei vegetali. I *pattern* cellulari così ottenuti ed i valori di intensità di fluorescenza risultano proporzionali alla dose di trattamento e tale fenomeno è evidente anche a basse dosi (0,5 kGy). È stato pertanto esteso il campo di applicazione del metodo normato (UNI EN 13784:2002), identificando varietà vegetali non validate a livello Europeo ma suscettibili di irraggiamento. Per le matrici vegetali analizzate, la cui identificazione presenta maggiori difficoltà, rispetto ai tessuti di origine animale, sia per la presenza di una parete cellulare che per l'ampia variabilità di specie, sono stati definiti i parametri ottimali. È stata messa a punto un'unica metodica, rapida, semplice e sensibile per discriminare con successo campioni irraggiati di diverse specie di legumi, in grado di evidenziare una dipendenza del danno al DNA dalla dose. Sarebbe opportuno estendere tali procedure analitiche anche a campioni di legumi di diversa origine o varietà della stessa specie (o inter-varietale), per attestare la robustezza ed il grado di specificità (falsi positivi) del metodo.

## P26

### Dosimetria con tecnica EPR di cosce di rana irradiate

Michele Tomaiuolo, Michele Mangiacotti, Guido Vegliante, Eugenio Chiaravalle

Centro di Referenza Nazionale per la Ricerca della Radioattività nel Settore Zootecnico-Veterinario, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Puglia e della Basilicata, Foggia, Italy

Le rane hanno rappresentato un importante alimento fin dall'antichità e un ottimo approvvigionamento alimentare in tempi di guerra anche se oggi tale alimento è considerato di nicchia. Le carni di rana sono comunemente contaminate da patogeni quali *Salmonella*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* e per tali ragioni la UE ha consentito l'irraggiamento di tale prodotto con radiazioni ionizzanti fino ad un livello massimo di 5 kGy, inteso come dose globale media. Con tali trattamenti la carica batterica viene drasticamente ridotta, la *shelf-life* del prodotto allungata mentre le componenti nutritive e organolettiche restano inalterate. Ai fini dell'identificazione del prodotto trattato con radiazioni ionizzanti il Comitato Europeo di Normazione (CEN) ha sviluppato e validato vari metodi, tra cui quello basato sulla tecnica EPR su alimenti contenenti ossa (EN 1786:1996). Per garantire il rispetto della normativa vigente ed assicurare il diritto di scelta del consumatore, sarebbe auspicabile la messa a punto di metodologie idonee per la stima della dose di trattamento, motivo del presente lavoro. È stato condotto uno studio della stabilità del segnale EPR nel tempo sia su campioni di cosce di rana congelate, della specie *Hoplobatrachus rugulosus*, già identificati come positivi in controlli ufficiali, sia su campioni della stessa specie trattati in laboratorio con raggi X. I campioni sono stati trattati con un irradiatore biologico a raggi X nel range 1-7.5 kGy per uno studio del segnale EPR in funzione della dose. Per la ricostruzione della dose di trattamento si è testata l'applicabilità del metodo delle dosi additive con step di 1 kGy. Il controllo dosimetrico è stato effettuato con un sistema

dosimetrico alanina-EPR. Identificazione qualitativa: i campioni di cosce di rana congelate risultate positivi ai controlli ufficiali e analizzate annualmente in un arco di tempo di tre anni hanno mostrato sempre il segnale tipico delle ossa irraggiate consentendo l'identificazione del trattamento ben oltre la *shelf-life* del prodotto (tipicamente due anni). Analisi quantitativa: lo studio della risposta del segnale EPR in funzione della dose ha mostrato come l'ampiezza del segnale cresca linearmente nel range in esame, senza evidenti fenomeni di saturazione. Lo studio del fading nei campioni trattati in laboratorio ha evidenziato come una rilevante parte del segnale decada nella prima settimana dall'irraggiamento, stabilizzandosi attorno al 60% del valore iniziale. Nella ricostruzione della dose col metodo delle dosi additive la relazione funzionale che meglio ha stimato la dose impartita al campione è stata quella lineare, con una leggera sovrastima (di circa il 20%). Per una corretta ricostruzione della dose si è considerata anche l'influenza del parametro di fading del segnale. La ricerca ha messo in luce come una stima della dose impartita sia possibile col metodo delle dosi additive, con opportune correzioni che tengano conto del fading iniziale. Inoltre è stata dimostrata la possibilità dell'identificazione del trattamento con radiazioni ionizzanti utilizzando la tecnica EPR fino ad un tempo superiore alla *shelf-life* del prodotto considerato. La metodologia sviluppata potrebbe quindi essere applicata da parte delle autorità deputate ai controlli ufficiali anche per la stima della dose somministrata.

## P27

### Rilevamento e caratterizzazione di ceppi di *Staphylococcus aureus* isolati dal guscio di uova raccolte in allevamenti rurali del maceratese

Daniela Bencardino,<sup>1</sup> Luca Agostino Vitali,<sup>2</sup> Manuela Prenna,<sup>1</sup> Dezemona Petrelli<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Scuola di Bioscienze e Medicina Veterinaria; <sup>2</sup>Scuola di Scienze del Farmaco e dei Prodotti della Salute, Università di Camerino, Camerino (MC), Italy

Nelle realtà rurali dell'entroterra marchigiano è piuttosto radicato il consumo di uova provenienti da piccoli allevamenti che provvedono al fabbisogno di una o più famiglie. La contaminazione esogena di queste uova, causata dalla mancanza di controlli e protocolli igienici nell'allevamento e nella manipolazione, potrebbe rappresentare un pericolo per la sicurezza, in particolare per la presenza di *Staphylococcus aureus* (SA). Lo scopo del presente lavoro è stato quello di caratterizzare i ceppi di SA presenti sul guscio di tali uova al fine di valutarne il potenziale patogeno e il ruolo di reservoir di geni di antibiotico-resistenza. Lo studio è stato condotto su 50 uova raccolte tra luglio e dicembre 2014 in 5 piccoli allevamenti del maceratese. Sono stati isolati e identificati 34 ceppi di SA e sugli stessi è stata determinata la sensibilità ai principali antibiotici mediante Kirby-Bauer e la presenza di geni codificanti 6 delle tossine più diffuse (enterotossina stafilococcica A, C, I, M, O e la tossina della sindrome da shock tossico, TSST) tramite PCR. Lo spa typing, il multilocus sequence typing (MLST) e l'agr typing hanno completato la tipizzazione dei ceppi. SA è stato isolato in 26 delle 50 uova analizzate (52%). L'antibiogramma ha rivelato l'assenza di ceppi meticillino resistenti (MRSA) mentre si sono riscontrate alte percentuali di resistenza alla penicillina (80%), alla tetraciclina (15%) e all'eritromicina (20%). Dei 34 isolati analizzati, 24 hanno evidenziato la presenza di almeno un gene codificante per le tossine considerate e 5 ne possedevano ben 4; l'enterotos-

sina stafilococcica M e l'enterotossina stafilococcica O sono risultate le più frequenti mentre la presenza dell'enterotossina I non è stata evidenziata in nessuno degli isolati. Mediante spa typing, i ceppi sono stati classificati in 15 spa types diversi, di cui 7 con nuovi pattern di ripetizioni. Il 56% degli isolati è stato classificato come t026. L'agr I è stato rilevato tra la maggior parte degli isolati mentre per nessuno ceppo è stato riportato un agr di tipo 4. La presente indagine ha evidenziato il potenziale di patogenicità e virulenza dello SA isolato dal guscio delle uova e rappresenta il punto di partenza per la valutazione del pericolo che potrebbe derivarne per il consumatore.

## P28

### Trasferimento delle aflatoxine M<sub>1</sub> e B<sub>1</sub> dal latte di bufala alla mozzarella

Gilberto Giangolini, Carlo Boselli, Francesco Filippetti, Alessandro Proietti, Riccardo Bicchocchi, Simonetta Amatiste

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana, Roma, Italy

L'aflatossina M<sub>1</sub> (AFM<sub>1</sub>) può essere presente nel latte in seguito all'ingestione di aflatoxina B<sub>1</sub> (AFB<sub>1</sub>) eventualmente presente negli alimenti per gli animali lattiferi. Scopo del lavoro è stato quello di studiare il trasferimento dell'AFB<sub>1</sub> tal quale e come forma metabolizzata AFM<sub>1</sub> nel latte e da quest'ultimo al formaggio e ai prodotti della lavorazione. Otto bufale di razza Mediterranea Italiana (produzione media 6,9 kg/bufala/die) sono state alimentate con una razione naturalmente contaminata con AFB<sub>1</sub> (217 µg/bufala/die) per 6 giorni e controllate per ulteriori 3 giorni. Il latte ottenuto al I, III, V, VII e IX giorno della prova è stato caseificato per la produzione di mozzarella. Durante le caseificazioni sono stati raccolti il siero, l'acqua di lavorazione e l'acqua di conservazione. Le mozzarelle e gli altri prodotti ottenuti sono stati congelati a -20°C fino al momento delle analisi. L'estrazione di AFM<sub>1</sub> e AFB<sub>1</sub> è stata eseguita in tutte le matrici mediante colonne di immunoaffinità. La concentrazione è stata determinata mediante HPLC con rivelatore fluorimetrico. Il Carry Over dell'AFM<sub>1</sub> e dell'AFB<sub>1</sub>, calcolato durante il periodo di plateau, è risultato rispettivamente 0,19 e 0,02%. Nel latte la media della concentrazione di AFM<sub>1</sub> è stata di 32,3±19,8 ng/kg, mentre la concentrazione di AFB<sub>1</sub> è risultata di 2,3±2,1 ng/kg. La distribuzione percentuale di AFM<sub>1</sub> nei derivati e nei prodotti della caseificazione, rispetto alla quantità presente nel latte, è risultata del 38,4% nella mozzarella, del 39,2% nel siero, del 18,3% nell'acqua di lavorazione e del 4,1% nell'acqua di conservazione. Nel presente studio, quindi, il 57,5% dell'AFM<sub>1</sub> presente nel latte è stato eliminato attraverso il siero e l'acqua di lavorazione. Il Coefficiente di Concentrazione dell'AFM<sub>1</sub> e dell'AFB<sub>1</sub> ottenuto per la mozzarella è risultato rispettivamente di 1,69 e 1,74. L'uso di acqua calda per la filatura, previsto nella tecnologia di produzione della mozzarella, contribuisce alla riduzione della concentrazione di AFM<sub>1</sub> nel prodotto finale, come dimostra la presenza di una cospicua percentuale di AFM<sub>1</sub> nell'acqua di lavorazione. Il Coefficiente di Concentrazione di 1,69, ottenuto nel presente studio, è inferiore a quello raccomandato dal Ministero della Salute (parere del Comitato Nazionale per la Sicurezza Alimentare n.13 del 10/06/2013) che indica in via provvisoria un Coefficiente di Concentrazione massimo di 3,0 per i formaggi a pasta tenera. La presenza di AFB<sub>1</sub> nel latte e nella mozzarella di bufala, anche se in concentrazioni molto basse, suggerisce ulteriori indagini in considerazione della sua cancerogenicità (IARC Group 1 Carcinogenic to humans). Lavoro eseguito con il contributo del Ministero della Salute nell'ambito della Ricerca Corrente (IZS LT 12/05 RC).

## P29

### Risultati preliminari di uno studio epidemiologico sulla diffusione dei principali patogeni di *Escherichia coli* negli alimenti e nel latte crudo in provincia di Salerno

Pasquale Fraulo, Esterina DeCarlo, Carmelo Morena, Giovanna Serluca, Achille Guarino

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Unità Operativa Microbiologia Alimentare, Salerno, Italy

Lo studio ha lo scopo di rilevare la diffusione dei principali patogeni di *Escherichia coli* negli alimenti, al fine di verificare la effettiva esistenza del rischio legato alla presenza di gruppi patogeni di tale microrganismo, con riferimento sia a quelli zoonosici che a serbatoio umano. I campioni pervenuti in laboratorio sono stati sottoposti alla conta di *E. coli* β glucuronidasi-positivo. I positivi sono stati sottoposti a screening mediante PCR-RT per la ricerca dei geni che codificano i fattori di virulenza dei diversi patogeni (VTEC, EPEC, ETEC, EAggEC, EIEC). Sono state impiegate le metodiche indicate dal Laboratorio Comunitario di Riferimento per *E. coli* enteropatogeni. Ad oggi sono stati analizzati 529 campioni di alimenti ed effettuate 3174 analisi. Le matrici maggiormente campionate sono state fior di latte, mozzarella, carne e vegetali (61,4%). È stato analizzato anche latte crudo bovino, bufalino ed ovicaprino. La conta di *E. coli* ha rilevato positività nel 24,8%. Tra i campioni positivi più dell'80% presenta cariche microbiche comprese tra 100-100.000 ufc/gr e circa il 28% una numerazione di *E. coli* β glucuronidasi-positivo compresa tra 1000-10.000 ufc/gr. Le matrici che hanno riportato più spesso positività sono risultate i prodotti lattiero-caseari ed il latte crudo. Tutti i campioni positivi alla conta di *E. coli* β glucuronidasi-positivo sono stati processati per la ricerca dei patogeni, ETEC, EAggEC, EIEC, EPEC e VTEC. È stata registrata una prevalenza del 6,71% di positività per EIEC e del 7,48% per EPEC, che rappresentano i patogeni maggiormente rilevati. Il patogeno dei VTEC riporta una prevalenza del 7,01% di cui il 2,8% da latte crudo. Il patogeno degli EAggEC ha registrato una prevalenza dell'1,83%. In nessun campione sono stati rilevati geni del gruppo ETEC. I sierogruppi VTEC isolati dagli alimenti sono stati il O:145 e l'O:26. Gli EPEC sono stati riscontrati soprattutto nei prodotti ittici, mentre gli EIEC sono stati rilevati anche nella mozzarella e nel latte crudo bufalino, con percentuali maggiori nella mozzarella rispetto al latte crudo. La prevalenza più elevata di EIEC è stata registrata nel fiordilatte. Gli EAggEC sono stati rilevati solo nei derivati del latte stagionati pastorizzati. Sui campioni che hanno dato positività per EAggEC è stato rilevato solo il gene AggR. Da una analisi dei dati preliminari del presente studio appare evidente che in una significativa percentuale di casi, a fronte della positività alla conta per *E. coli*, si riscontra la preoccupante presenza di geni codificanti per i principali fattori di patogenicità. È opportuno, pertanto, avviare uno studio epidemiologico più approfondito, avente lo scopo di definire meglio la reale diffusione e l'origine di tali agenti patogeni, con riferimento anche a quelli fino ad ora ritenuti non comuni nel nostro paese. Fra questi segnaliamo gli EIEC che hanno registrato una prevalenza interessante nel presente studio e sono stati responsabili di alcuni importanti focolai di tossinfezione. La disponibilità di dati epidemiologici più completi, consentirebbe la identificazione di protocolli analitici ed ispettivi idonei, finalizzati ad una più adeguata gestione dei casi di positività alla conta per *E. coli*, che tenga conto anche della potenziale pericolosità dell'alimento contaminato.

## P30

### Studio della dinamica di popolazione di *Listeria monocytogenes* e *Pseudomonas fluorescens* in mozzarella di bufala con prove di challenge test

Donatella Nava,<sup>1</sup> Salvatore Capo,<sup>1</sup> Vincenzo Caligiuri,<sup>1</sup>  
Valerio Giaccone,<sup>2</sup> Loredana Biondi,<sup>1</sup> Federico Capuano,<sup>1</sup>  
Gerardo Vaccaro,<sup>3</sup> Achille Guarino<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico del Mezzogiorno, Dipartimento Ispezione degli Alimenti, Portici (NA); <sup>2</sup>Dipartimento di Medicina Animale, Produzioni e Salute, Università degli Studi di Padova, Padova; <sup>3</sup>Azienda Sanitaria Locale NA3 Sud, Italy

La mozzarella di bufala è uno dei formaggi più conosciuti e apprezzati nel mondo intero, considerato un'eccezione nazionale e soprattutto campana. Lo scopo della presente ricerca è stato quello di studiare la dinamica di popolazione di *Listeria monocytogenes* da sola ed in associazione a *Pseudomonas fluorescens* in tale prodotto. Per svolgere il presente lavoro è stata applicata la procedura di prova messa a punto ricalcando le linee-guida AFSSA (2008) per la determinazione della shelf-life degli alimenti, con opportune integrazioni e adattamenti. Le analisi sono state condotte in un laboratorio appositamente attrezzato allo scopo. Abbiamo programmato e svolto un challenge test con prove di inoculazione sperimentale dei due batteri, singolarmente o in associazione fra di loro, nella mozzarella di bufala. I campioni, conservati a temperature di 4°C e 12°C sono stati analizzati al 1°, 3°, 6°, 9° e 11° giorno di conservazione, utilizzando le seguenti metodiche: VIDAS Listeria AFNOR LMO2 per la Ricerca Listeria; EN/ISO 11290 - 2 per la conta di *L. monocytogenes*; ISO/TS 11059/IDF/RM per la conta di *P. fluorescens*. È stata altresì condotta la determinazione dei valori di pH delle mozzarelle (con pHmetro Knick 911 CRAMI-GROUP) e di  $a_w$  (con FA-st LAB GBX). I risultati ottenuti hanno evidenziato la presenza di *L. monocytogenes* in tutti i campioni analizzati. Nei campioni di mozzarella dove *L. monocytogenes* è stata inoculata da sola, senza la compresenza di *P. fluorescens*, la carica del batterio si è mantenuta praticamente invariata rispetto a quella iniziale, con meno di 0,5 gradi LOG di carica tra il valore stimato al giorno 1 (T1) e quello determinato al termine delle prove (T11). Invece, campioni nei quali *L. monocytogenes* è stata inoculata insieme a *P. fluorescens*, la dinamica della prima è influenzata in senso positivo dalla crescita della seconda specie. In condizioni di corretta conservazione del prodotto a 4°C o a temperature inferiori, partendo da cariche basse del patogeno (intorno a 10 ufc/g), si osserva una sostanziale assenza di crescita di *L. monocytogenes*; la presenza di *P. fluorescens* nella mozzarella può influenzare in modo positivo la sopravvivenza e la crescita di *L. monocytogenes*, nel formaggio. Tali dinamiche di popolazione microbica sono tenute efficacemente sotto controllo con la corretta conservazione della Mozzarella di Bufala Campana alla prevista temperatura di refrigerazione, mentre sono accentuate se il formaggio, nell'arco della sua vita commerciale, va incontro ad abuso termico. La corretta sanificazione delle superfici di lavoro all'interno del caseificio, quindi, costituisce indubbiamente uno dei fattori determinanti per tenere sotto controllo le contaminazioni della Mozzarella di Bufala Campana con *L. monocytogenes* e *P. fluorescens*.

## P31

### Indagine microbiologica e chimico-fisica di prodotti carni tradizionali cinesi fabbricati in Italia

Erica Tirloni,<sup>1</sup> Cristian Bernardi,<sup>1</sup> Simone Stella,<sup>1</sup> Lisa Vallone,<sup>1</sup>  
Luigi Piscitelli,<sup>2</sup> Carla Bersani,<sup>1</sup> Patrizia Cattaneo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Veterinarie per la Salute, la Produzione Animale e la Sicurezza Alimentare, Università degli Studi di Milano, Milano; <sup>2</sup>Dipartimento di Prevenzione Veterinario, Azienda Sanitaria Locale di Milano, Milano, Italy

Questo lavoro è stato svolto con lo scopo di valutare, da un punto di vista batteriologico e chimico-fisico, alcune tipologie di prodotti carni tradizionali cinesi fabbricati nel nostro Paese e presenti sul mercato nazionale. Sono stati prelevati, presso punti vendita al dettaglio, campioni di muscolo di bovino cotto (n=3), orecchio di suino cotto (n=1), pancetta di suino secca (n=5), zampe di pollo cotto (n=4), ali di pollo al forno (n=1) e zampe di anatra cotte (n=2). I campioni sono stati sottoposti ad analisi microbiologica per la ricerca quantitativa di: Conta Batterica Totale (CBT) (ISO 4833-2:2013), *Pseudomonas spp.* (ISO 13720:2010), Enterobacteriaceae (ISO 21528-2:2004), *Escherichia coli* (ISO 16649-1:2001), Coliformi Totali (ISO 4832:2006), Stafilococchi Coagulasi Positivi (SCP) (ISO 6888-1:1999), *Bacillus cereus* presunto (ISO 7932:2004), anaerobi solfito-riduttori (ISO 15213:2003), muffe e lieviti (ISO 21527:2008). È stata inoltre ricercata la presenza in 25 g *Listeria monocytogenes* (AFNOR BRD 07/04-09/98). Sugli stessi campioni sono stati determinati  $a_w$ , pH e concentrazione di NaCl. In nessuno dei campioni è stata rilevata la presenza *Listeria monocytogenes*. I campioni di muscolo di bovino, orecchio di suino, ali e zampe di pollo e zampe di anatra hanno mostrato valori di CBT molto contenuti (<2-3.2 Log UFC/g). Tutti gli altri microrganismi ricercati sono risultati sotto il limite di rilevabilità (2 Log UFC/g), eccetto cariche contenute (2-3 Log UFC/g) di miceti in diversi i campioni. Per quanto riguarda i campioni di pancetta secca, le cariche microbiche riscontrate sono risultate più elevate (CBT media: 5.15±0.65 Log UFC/g). Di particolare interesse in questo prodotto sono le cariche rilevate di Stafilococchi coagulasi positivi (3.97±0.74 Log UFC/g) e di *B. cereus* presunto (3.88±0.81 Log UFC/g), indice di una contaminazione della materia prima e/o durante il processo di lavorazione. Nelle stesse pancette i parametri chimico-fisici rilevati ( $a_w$ : 0.761, pH: 5.84 e NaCl: 2.75%) indicavano comunque l'impossibilità di replicazione batterica durante il periodo di conservabilità. In 2 campioni di pancetta su 5 sono state rilevate cariche di lieviti nel range 3.98-4.18 Log UFC/g, mentre tutti gli altri parametri ricercati sono risultati sotto il limite di rilevabilità. Ulteriori indagini sono necessarie al fine di valutare il potenziale rischio che può intercorrere in seguito al consumo di tali prodotti, specialmente di pancette secche nelle quali i valori di *B. cereus* presunto e SCP risultano vicini a concentrazioni sufficienti per una significativa produzione di tossine.

## P32

### Monitoraggio sulla presenza di acido domoico sulle zone di produzione di molluschi bivalvi

Rachele Rossi, Olga Arace, Maria Giovanna Buonomo,  
Daniela Capozzo, Vincenzo Castellano, Samantha Imbimbo,  
Vittorio Soprano

Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Portici (NA), Italy

Le biotossine algali sono un gruppo eterogeneo di composti chimici



prodotti da alcune alghe microscopiche che costituiscono il fitoplancton. I molluschi bivalvi, nutrendosi di fitoplancton, possono accumulare questi composti fino a diventare essi stessi tossici. Sono stati segnalati numerosi casi di intossicazione alimentare per consumo di molluschi contaminati da biotossine algali, con conseguenze sanitarie diversamente gravi in relazione al tipo di biotossina presente. Tali tossinfezioni alimentari hanno spinto il nostro sistema sanitario a prevedere un costante controllo negli impianti di molluschicoltura nell'ambito di piani di monitoraggio igienico-sanitario svolti dalle A.A.S.S.L.L. per diverse tipologie di biotossine. In questo lavoro si riportano i risultati del controllo delle biotossine appartenenti al gruppo delle ASP (Amnesic Shellfish Poisoning), Acido Domoico (DA), prodotto dalle alghe del genere *Pseudonitzschia*, che causa la sindrome amnesica con confusione e perdita di memoria. Il nostro laboratorio oltre ad avere eseguito con il metodo ufficiale i controlli sui mitili prelevati nei siti di molluschicoltura del Golfo di Napoli ha anche effettuato analisi con un metodo sperimentale su alcuni di questi campioni mediante spettrometria di massa ad alta risoluzione, riscontrando la presenza della tossina e dei suoi isomeri in bassissime quantità. Per la determinazione delle biotossine algali, è stato utilizzato il metodo ufficiale in cromatografia liquida con rivelatore UV. È stato poi utilizzato sugli stessi estratti un rivelatore MS/TOF ad alta risoluzione (metodo interno sperimentale) per la determinazione delle tossine al di sotto della sensibilità del metodo ufficiale. La determinazione di acido domoico con il metodo ufficiale non ha mai dato risultati non conformi, a parte due campioni contenuti circa 3 mg/kg. Tutti gli altri campioni sono sempre risultati al di sotto della sensibilità del metodo (3 mg/kg). Invece l'analisi con il rivelatore MS/TOF su 58 campioni ha permesso di riscontrare la presenza di Acido Domoico nell'80% dei campioni analizzati a livelli compresi tra 0.005 ppm e 3.177 ppm. Inoltre, l'approccio in alta risoluzione, ha permesso di riscontrare anche la presenza di alcuni isomeri dell'Acido Domoico. L'analisi effettuata mediante metodo ufficiale, da gennaio 2015 al 10 luglio 2015, ha dato sempre risultati conformi: le poche quantità trovate presentavano livelli assai inferiori rispetto ai limiti di legge consentiti (20 mg/kg). L'analisi mediante LC-MS/TOF ha evidenziato una frequente presenza di Acido Domoico a valori non rivelabili con il metodo ufficiale. La presenza di tale tossina, seppur minima, è comunque indice di presenza di *Pseudonitzschia* le cui fioriture improvvise devono essere sempre tenute sotto controllo. Anche se i programmi di monitoraggio in corso sembrano essere efficaci nel prevenire intossicazioni acute da biotossine algali negli esseri umani, potrebbero verificarsi conseguenze a lungo termine (che devono ancora essere identificate) per esposizioni ripetute a bassi livelli di tossine.

### P33

#### Sicurezza alimentare: dal banco alla tavola

Valeria Morena,<sup>1</sup> Patrizia Leggeri,<sup>1</sup> Marzia Romolaccio,<sup>2</sup> Antonella Bozzano,<sup>2</sup> Stefano Saccares<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro Studi per la Sicurezza Alimentare; <sup>2</sup>Ufficio di Staff Formazione, Comunicazione e Documentazione, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana, Roma, Italy

Il concetto di sicurezza alimentare ingloba il significato di cibo sicuro (*food safety*) e quello di disponibilità in quantità sufficiente per tutti (*food security*). Per garantire la sicurezza degli alimenti (*food safety*), l'UE si è dotata di un ampio pacchetto normativo, prevedendo che gli operatori predispongano adeguate procedure operative, mentre i controlli ufficiali verificano il rispetto della normativa. Anche il consumatore è responsabile delle scelte alimentari e di comportamenti

corretti. Si vuole evidenziare il ruolo del consumatore e l'importanza dell'educazione nella sicurezza alimentare sin dai banchi di scuola per formare un consumatore consapevole. In particolare la scuola è stata individuata come ambito di intervento prioritario in quanto *detiene la responsabilità di stimolare e creare conoscenza, consapevolezza, attitudini e abilità tali da influenzare positivamente scelte alimentari e stili di vita salutari*. L'IZSLT considera *strategica l'attività della formazione e la utilizza anche per informare e aggiornare l'utenza in merito a problematiche e temi relativi alla sanità pubblica veterinaria ed alla sicurezza alimentare*. Dal 2006 ad oggi, attraverso l'operato del Centro Studi per la Sicurezza Alimentare (CSA) e l'Ufficio di Staff Formazione, Comunicazione e Documentazione sono stati realizzati 9 progetti formativi di educazione alimentare volti alla promozione della salute e più in generale all'adozione di stili di vita sani. Otto sono gli Istituti Scolastici coinvolti, dalla scuola dell'infanzia alla scuola secondaria, e più di 4000 gli alunni partecipanti. Si riportano a titolo di esempio il progetto *Sicurezza Alimentare* realizzato presso il liceo Scientifico Volterra di Ciampino e l'evento *I diti in pasta* programmato sulla scia delle manifestazioni di Expò 2015. Presso il liceo, nell'anno 2014-2015 è stato affrontato un tema di attualità, *Il caso Romics: un caso di intossicazione stafilococcica* per approfondire temi di sicurezza alimentare e focalizzando l'attenzione sulle precauzioni da intraprendere. A latere è stata organizzata un'attività laboratoriale basata su tecniche di isolamento e identificazione batterica ed un periodo di alternanza scuola - lavoro che ha permesso agli studenti di una classe di respirare l'aria dei laboratori del nostro Istituto. L'evento *I diti in pasta* ha invece impegnato il CSA e l'Ufficio Formazione in 4 laboratori didattici rivolti ai più piccoli: *I segreti del frigorifero: scopriamo come sistemare bene gli alimenti*, *Le mani in piastra: quanto sono pulite le nostre mani*, *Dalla mucca allo yogurt: quante scene e quanti protagonisti* e *Giochiamo a tavola: diventiamo protagonisti per avvincenti sfide sul tappeto della salute*. I risultati ottenuti sono lusinghieri visto l'entusiasmo di alunni, genitori ed insegnanti, e la realizzazione di materiale divulgativo: 3 articoli su riviste, 7 poster e 2 relazioni presentati in congressi e convegni, 2 tesi di laurea, 4 opuscoli e diverse brochure. Gli studenti hanno realizzato disegni, cartelloni, power point e filmati sulle attività svolte. Concludendo, una campagna di informazione attraverso la rete scolastica rappresenta una valida opportunità, perché responsabilizza i giovani rendendoli consumatori capaci di scelte consapevoli e allo stesso tempo, veicolo di divulgazione in famiglia, della cultura appresa.

### P34

#### Criticità nell'applicazione delle norme di sicurezza alimentare in una realtà multietnica: il mercato di Piazza Vittorio a Roma

Patrizia Leggeri,<sup>1</sup> Valeria Morena,<sup>1</sup> Gianfranco Masotti,<sup>2</sup> Priamo Pede,<sup>3</sup> Stefano Saccares<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Centro Studi per la Sicurezza Alimentare, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana; <sup>2</sup>Servizio Veterinario Azienda Sanitaria Locale RMA; <sup>3</sup>Dipartimento di Prevenzione nell'Ambiente e nei Luoghi di Lavoro, Università La Sapienza di Roma, Roma, Italy

Le realtà multietniche che si stanno sviluppando nelle nostre città rappresentino un'opportunità di integrazione fra popoli e di crescita non solo socio economica ma anche socio-sanitaria. Nel Nuovo Mercato Esquilino di Piazza Vittorio, tradizione e modernità si trovano spesso in contrapposizione con quelle che sono le norme vigenti in materia di igiene e sicurezza. I problemi legati alla sicurezza, alla qua-



lità e all'igiene degli alimenti sono molteplici e ancor più amplificati se si considera la differenza di culture all'interno del mercato, caratterizzato da una forte prevalenza straniera. In tale contesto la conoscenza e l'applicazione della normativa alimentare risulta fondamentale per garantire la salute del consumatore. Questo è anche il fine di una ricerca ancora in corso, che coinvolge il CSA e il Dipartimento di Prevenzione della ASL RM A per contribuire al miglioramento delle condizioni igienico-sanitarie relative al commercio e alla somministrazione dei prodotti alimentari intervenendo sull'integrazione socio-culturale tra le diverse etnie. La prima fase del progetto è stata dedicata all'individuazione delle diverse etnie presenti nel mercato. Tale attività ha permesso altresì di rilevare il grado di conoscenza e di applicazione della normativa alimentare da parte degli operatori. Infatti garantire la completa sicurezza alimentare è un'impresa complessa che prevede diversi controlli in tutte le fasi dei processi produttivi iniziando dalle materie prime fino al prodotto esitato al consumatore. A tal proposito, per garantire la salubrità degli alimenti, riveste un ruolo rilevante l'applicazione obbligatoria del sistema di autocontrollo (HACCP) di competenza dell'operatore del settore alimentare. Dal censimento sono risultati 133 banchi di vendita di differenti tipologie di alimenti: carne, pesce, frutta, verdure e spezie, per lo più gestiti da cittadini del Bangladesh (68). Solo 25 sono gestiti da italiani ed il restante, in ordine decrescente, da cittadini dei paesi dell'est, egiziani, filippini, cinesi, nigeriani, spagnoli. La maggior parte degli operatori presenti a vario titolo presso i banchi vendita hanno collaborato alla raccolta dati per la stesura del censimento nonostante evidenti difficoltà linguistiche. Nel corso delle visite sono state riscontrate diverse criticità, peraltro più volte segnalate dai servizi di prevenzione: carenze igieniche dei locali e delle attrezzature, assenza o mancata applicazione del piano HACCP, inadeguato rispetto della catena del freddo, carenza nella formazione professionale e non conformità di etichettatura. È stata evidenziata, quindi, la mancata applicazione della norma sull'autocontrollo per quanto riguarda la formazione del personale. Da qui si è valutata la necessità di creare strumenti, quali opuscoli informativi inerenti le problematiche legate alla detenzione, manipolazione e vendita di alimenti, in diverse lingue, comprensibili e condivisi per la conoscenza e l'adeguamento alla normativa sulla sicurezza alimentare. Inoltre, è stata ipotizzata l'attivazione di corsi in varie lingue, al fine di formare ed educare tutto il personale sulle buone pratiche igienico sanitarie. I responsabili degli autocontrolli dovranno avere una parte attiva e fondamentale per il raggiungimento degli obiettivi. In tal modo sarà possibile facilitare una efficace azione di prevenzione che possa estendersi a tutti gli operatori del settore degli alimenti presenti nel mercato.

### P35

#### Fattori di rischio nella qualità microbiologica della carne di selvaggina abbattuta

Francesca Orsoni,<sup>1</sup> Roberto Barbani,<sup>2</sup> Nicola Ferrari,<sup>3</sup> Nicola Canetti,<sup>4</sup> Paolo Brulatti,<sup>2</sup> Lia Bardasi,<sup>5</sup> Giuseppe Merialdi,<sup>5</sup> Valentina Sabbioni<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Medico Veterinario, Libero Professionista, Bologna; <sup>2</sup>Azienda Unità Sanitaria Locale Bologna, Dipartimento di Sanità Pubblica Veterinaria, Bologna; <sup>3</sup>Università degli Studi di Milano, Facoltà di Medicina Veterinaria, Milano; <sup>4</sup>Biologo Tecnico Faunistico, Libero Professionista, Bologna; <sup>5</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Sezione di Bologna, Bologna, Italy

Scopo di questo studio è stata l'individuazione di fattori di rischio che incidano sulla qualità microbiologica delle carcasse di ungulati selva-

tici abbattuti. Sono stati campionati 37 cinghiali e 7 caprioli presso due centri di lavorazione della selvaggina della prov. di Bologna. I campioni sono stati eseguiti sul m. grande psoas al fine di verificare l'igiene dell'eviscerazione in campo e sui mm. gluteo medio/superficiale e semitendinoso per valutare l'igiene della scuoiatura, con metodo non distruttivo come previsto dal Reg. (CE) 2073/05 e succ. mod. (carica batterica totale - CBT, Enterobacteriaceae - EB e *Salmonella spp.*). Ad ogni soggetto è stata assegnata una scheda di raccolta dati di tipo biometrico (specie, sesso, classe d'età, ecc) e gestionale (tipo di ferita da sparo, tempi di processazione, eventuali lavaggio con acqua/pulizia con panno umido). Durante lo studio è stato inoltre effettuato un corso on site al fine di sensibilizzare gli addetti ad una corretta manipolazione delle carni, specie durante la fase di scuoiatura. L'analisi statistica dei risultati ha identificato fattori che hanno influito significativamente. Per quanto riguarda sia le CBT sia le EB è stata riscontrata una differenza di specie, col cinghiale più contaminato del capriolo, e di taglio, con la coscia meno contaminata del filetto. Gli animali colpiti in addome erano più contaminati da EB rispetto a quelli colpiti in testa ed in torace; la stessa tendenza si presentava all'aumentare della classe d'età. L'aumento del tempo tra abbattimento e scuoiatura ha determinato una maggior contaminazione di CBT, come il lavaggio con acqua e la pulizia con panno, qualora eseguiti. Il lavaggio ha influenzato negativamente le carcasse colpite alla testa rispetto a quelle colpite in torace. La formazione agli operatori ha influito positivamente sulla CBT, specialmente nella coscia, che ha mostrato valori medi inferiori ai limiti del Reg. (CE) 2073/05. Tutti i campioni sono risultati negativi per la ricerca di *Salmonella spp.* La differenza di specie conferma quanto già riportato in letteratura sulla minor contaminazione nei ruminanti selvatici rispetto al cinghiale; mentre, l'influenza della classe d'età è discordante con gli studi ad ora effettuati, che identificano gli animali più leggeri e giovani come maggiormente contaminati. Si conferma la validità dello sparo in torace o in testa come buona pratica venatoria rispetto al colpo in addome che, come atteso, peggiora l'igiene della carcassa; risulta importante diminuire quanto più possibile le tempistiche che intercorrono tra l'abbattimento e la scuoiatura. L'adozione di pratiche come l'uso di acqua o del panno sono da sconsigliare, per l'influenza negativa sull'igiene della lavorazione, a favore invece di una corretta manipolazione e scuoiatura della carcassa. Ciò confermato dall'effetto positivo della formazione agli operatori, che ha permesso di abbassare le CBT della coscia al di sotto dei limiti individuati dal Reg. (CE) 2073/05. Lo studio effettuato mostra che, nell'ambito della filiera della selvaggina abbattuta, le corrette pratiche di lavorazione riportate nella determina 15856/2007 della RER (colpo in torace/testa, rapida eviscerazione/dissanguamento/refrigerazione, scuoiamento corretto, pulizia della ferita) permettono di ridurre la contaminazione microbiologica delle carcasse ad un livello sovrapponibile a quello degli ungulati allevati, rendendo il consumo di tali carni sicuro e di qualità.

### P36

#### Caratterizzazione di *Listeria monocytogenes* in due macelli suini: prevalenza, profilo molecolare e pattern di contaminazione

Giuliana Franzini,<sup>1</sup> Elena Carra,<sup>1</sup> Deborah Baldi,<sup>1</sup> Simona Naldi,<sup>1</sup> Marina Morganti,<sup>1</sup> Giuseppe Merialdi,<sup>1</sup> Federica Bergamini,<sup>1</sup> Nadia Losio,<sup>1</sup> Stefano Pongolini,<sup>1</sup> Antonietta Gattuso,<sup>2</sup> Gianluca Rugna<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Brescia; <sup>2</sup>Istituto Superiore di Sanità, Roma, Italy

Allo scopo di valutare la pressione e i *pattern* di contaminazione in fase di lavorazione, è stato condotto uno studio di caratterizzazione molecolare (PFGE) di *Listeria monocytogenes* (Lm) in due impianti di macellazione e sezionamento di suini, della durata di un anno. I campioni, ambientali e su prodotto intermedio, sono stati suddivisi nelle seguenti categorie: amigdale, feci e linfonodi ileo-cecali (LIC); locali di macellazione (M); locali di sezionamento a caldo (SC); locali di sezionamento a freddo (SF); cosce a fine sezionamento (CC); cosce dopo stazionamento in cella frigorifera e prima della rifilatura nel sezionamento a freddo (CF). Le cosce (tampone superficiale) sono state analizzate in *pool* costituiti da lotti distinti della stessa giornata produttiva, le superfici in *pool* di campioni omogenei per tipologia (a contatto e non, con gli alimenti). Suini portatori. Lm è stata rilevata nel 3,5% (IC 95%: 1,7-6,3%) dei campioni da amigdale e nello 0,7% (IC 95%: 0,1-2,5%) di quelli fecali. I risultati preliminari hanno mostrato positività in 3/35 LIC. Sono stati rilevati 10 pulsotipi Ascl-Apal. Macello A. Lm è stata rilevata in 1/36 campioni SC e 9/27 SF. Lm non è mai stata isolata da M, CC e CF. La PFGE ha rilevato 8 pulsotipi, di cui solo uno è stato rilevato più di una volta, in due sessioni di macellazione consecutive. Macello B. Nei locali di M, Lm è stata rilevata solo in 1/30 campione (sega mezzene). Al contrario, sono risultati positivi 17/40 (42,5%) campioni SC e 15/30 (50%) di SF. Lm è stata isolata in 4/10 e 8/10 *pool* di CC e CF, rispettivamente. Sono stati rilevati 7 pulsotipi, di cui i tre predominanti (35,7; 25; 14,2%) risultavano anche persistenti. Durante il periodo di studio, Lm è stata isolata in entrambi i macelli con prevalenze ambientali significativamente differenti e ciò si riflette nella più alta probabilità di contaminazione dei prodotti intermedi osservata nel macello B. Un'ulteriore conferma potrebbe derivare dal confronto della prevalenza sul prodotto finito. Sempre nel macello B è stato evidenziato un aumento di prevalenza e un'omogeneizzazione dei pulsotipi lungo la catena produttiva (M=8; SC=7; SF=4 pulsotipi). Inoltre, nel SF sono stati isolati gli unici 3 pulsotipi isolati su CF. Questi dati sostengono l'ipotesi che l'alta pressione di contaminazione ambientale nel SC sia l'origine di cross-contaminazione tra superfici a contatto e prodotto e viceversa, con successivo trascinamento e adattamento di ceppi a valle del processo produttivo. I risultati supportano, come riportato in letteratura, l'assenza di carry-over diretto di Lm dal suino portatore al prodotto finito, evidenziando un ruolo più importante delle fonti ambientali. L'esame delle amigdale ha evidenziato una più alta prevalenza di suini portatori (2=4,17; P<0,05), se confrontata con l'esame di campioni fecali. Nel macello B, un pulsotipo persistente nel SC è stato isolato da 2 LIC e dalla sega mezzene. Questi risultati, insieme al mancato isolamento di Lm dalle superfici ambientali di M in entrambi gli stabilimenti, lasciano supporre un possibile ruolo di altri organi come fonte di contaminazione di ambienti ed attrezzature del sezionamento, rispetto alla contaminazione fecale delle carcasse. Lo studio sottolinea l'importanza della pressione ambientale di Lm, soprattutto a carico delle superfici a contatto, sulla probabilità di contaminazione del prodotto in lavorazione e la necessità di identificare e risolvere fenomeni di persistenza ambientale del microrganismo.

### P37

#### Evidenze di laboratorio in un'epidemia di tossinfezione alimentare da consumo di prodotti della tradizione culinaria giapponese

Selene Marozzi, Tatiana Bogdanova, Elena Dell'Aira, Ilaria Di Domenico, Patrizia Palmieri, Francesco Tomassetti, Sarah Lovari, Stefano Bilei

Istituto Zooprofilattico del Lazio e della Toscana, Roma, Italy

Nel lavoro viene descritto un episodio epidemico di tossinfezione alimentare da consumo di prodotti della tradizione culinaria giapponese verificatosi nella Capitale nel corso di un evento fieristico e le successive indagini di laboratorio volte ad identificare il nesso causale tra malattia, alimenti sospetti e fonte di contaminazione. In seguito ad un episodio epidemico che ha interessato circa 30 persone, sono stati prelevati dalla ASL competente per territorio, presso lo Stand gastronomico presente nei padiglioni della Nuova Fiera di Roma e successivamente nei locali dello stabilimento di produzione, 5 campioni tra sushi e sashimi. Sugli stessi sono state effettuate le seguenti indagini di laboratorio: attività dell'acqua libera ( $a_w$ ) (ISO 21807:2004), *E. coli* b-glucuronidasi positivi (ISO 16649-2: 2001 - Parte 2), Enterobatteri (ISO 21528-2: 2004- Parte 2), pH (MFHPB-03:2012), *Salmonella spp.* (ISO 6579: 2002/ cor 1 2004), *Listeria monocytogenes* (UNI EN ISO 11290: 2005-Parte1 e 2) Stafilococchi coag. pos. (ISO 6888-3: 2004 - part 3), *Vibrio cholerae* e *Vibrio parahaemolyticus* (ISO/TS 21872-1:2007/Cor1:2008, parte 1), enterotossine stafilococciche (ANSES EU-CRL VER 5:2010). Un ulteriore campione costituito da 5 ceppi di Stafilococchi coagulasi positivi ottenuti da 1 operatore della ditta coinvolta e da 4 pazienti sono stati inviati all'IZSLT dall'ARPA Lazio sezione provinciale di Roma. I ceppi di Stafilococchi coagulasi positivi isolati dall'operatore, dai pazienti e dagli alimenti sono stati valutati mediante Polymerase Chain Reaction (PCR) multiplex per la presenza dei geni sea, seb, sec, sed, see, seg, seh, sei, sej, sep e ser, codificanti le enterotossine stafilococciche A, B, C, D, E, G, H, I, J, P e R e successivamente inviati al Laboratorio Nazionale di Riferimento per gli Stafilococchi coagulasi positivi dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta per l'accertamento dei pulsotipi mediante pulsed-field gel electrophoresis (PFGE) (Anses EU.CRL for coagulase positive staphylococci CEB 0.1 2005). Le analisi condotte presso i laboratori dell'IZSLT hanno rilevato la presenza in 2 campioni di sushi (40%) di enterotossine stafilococciche ed in 4 campioni (80%) su 5 saggiati, di Stafilococchi coagulasi positivi con valori  $>10^3$  ufc/g. In particolare i 2 campioni positivi per presenza di enterotossine presentavano Stafilococchi coagulasi positivi nell'ordine di  $10^8$  ufc/g. Le indagini eseguite sui ceppi umani hanno identificato la presenza dei geni codificanti per le enterotossine stafilococciche tipo A, tipo B e tipo H in tutti gli isolati saggiati. Infine, l'esame dei pulsotipi dei campioni umani ha accertato delle sostanziali omologie tra i ceppi dell'operatore e dei pazienti e tra gli isolati alimentari e quelli dello stesso addetto alla preparazione dei pasti. Le analisi di laboratorio hanno permesso di collegare a livello diagnostico i casi umani di malattia, gli alimenti e la fonte di contaminazione. In particolare l'epidemia è stata determinata dal consumo di sushi manipolato da un operatore portatore di Stafilococchi coagulasi positivi. L'indagine epidemiologica condotta a seguito del focolaio ha infine identificato nella conservazione dell'alimento a temperature superiori a quelle di refrigerazione, la probabile causa dell'avvenuta moltiplicazione stafilococcica con conseguenziale formazione di enterotossine.

### P38

#### Valutazione *in vitro* delle interazioni tra *Penicillium roqueforti* e *Listeria monocytogenes*

Sibilla Dolc,<sup>1</sup> Milena Brasca,<sup>2</sup> Lisa Vallone<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze veterinarie per la salute, la produzione animale e la sicurezza alimentare, Università degli Studi di Milano, Milano; <sup>2</sup>Istituto di Scienze delle Produzioni Alimentari, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Milano, Italy

Valutare, *in vitro*, le possibili interazioni fra *Penicillium roqueforti* e *Listeria monocytogenes*. Sono stati oggetto del test tre ceppi differenti di *P. roqueforti*, come ceppo di controllo, *Penicillium nalgiovensis*, isolati precedentemente da formaggi del commercio ed il ceppo di *L. monocytogenes* ATCC 7644. A partire da colture pure, sono state allestite sospensioni di spore dei quattro ceppi di *Penicillium* ed una brodo-coltura di *L. monocytogenes*. La valutazione dell'interazione fra i microrganismi scelti per la ricerca è stata effettuata su Tryptone Soy Agar (TSA), dove i singoli miceti e *L. monocytogenes* sono stati seminati con modalità differenti. 1. Su piastra di terreno TSA, sono stati strisciati con modalità differenti i singoli miceti e *L. monocytogenes*. 2. È stata effettuata una semina del batterio su terreno TSA, sulla quale sono stati sovrapposti dischetti sterili di carta bibula imbibiti con le sospensioni di spore fungine, una per ogni singolo ceppo. 3. Analogamente, i ceppi di *Penicillium* sono stati strisciati su terreno TSA e sono stati sovrapposti allo striscio dischetti sterili di carta bibula imbibiti con brodo-coltura di *L. monocytogenes*. 4. Su terreno TSA è stato eseguito uno striscio (1x3 cm) di *L. monocytogenes*, incubato a 37°C per 24 ore e successivamente, sul terreno agarizzato è stata sovrapposta una sospensione di spore ottenuta da ciascun ceppo fungino in Malt Soft Agar (overlay). Le piastre sono state poi incubate a 27°C per 7 giorni. Per verificare eventuali modificazioni nella morfologia di *L. monocytogenes* sono state allestite colorazioni di Gram. Tutte le prove sono state eseguite in doppio. Le prove n. 1 e 2 hanno evidenziato uno sviluppo fungino sull'intera superficie del terreno sovrastando lo sviluppo del batterio, non più visibile. La prova n. 3 ha messo in evidenza lo sviluppo di *L. monocytogenes* sulla superficie del terreno di coltura eccetto che in prossimità del dischetto di carta su cui si è sviluppato il ceppo fungino, manifestando, quindi, l'inibizione da parte di quest'ultimo. Dalla prova n. 4 è stato possibile rilevare la crescita di tutti i ceppi fungini e non di *L. monocytogenes*. Tuttavia, i miceti, hanno acquisito aspetto differente rispetto a quello rilevato sulle piastre di controllo. La colorazione di Gram di *L. monocytogenes* cresciuta in presenza dei miceti *P. roqueforti* ha evidenziato una modificazione della morfologia con cellule tondeggianti coccoidi in catenelle. Dalle prove effettuate risulta evidente uno sviluppo ridotto e stentato di *L. monocytogenes* qualora non sia già moltiplicata prima dell'inoculato dei miceti. Una preliminare conclusione ci porta ad affermare che *P. roqueforti* produce uno o più metaboliti secondari in grado di ostacolare lo sviluppo di *L. monocytogenes*. La specie *P. roqueforti* è un noto produttore di diversi metaboliti quali roquefortina C, PR tossina, acido micofenolico. Per quanto riguarda il ceppo di controllo, *Penicillium nalgiovensis*, questo ha avuto, in tutte le prove, un analogo comportamento a *P. roqueforti*.

### P39

#### Stafilococchi coagulasi positivi ed enterotossine in formaggio di malga: gestione del caso per la prevenzione della tossinfezione

Mariachiara Armani,<sup>1</sup> Guerrino Macori,<sup>2</sup> Michela Rabini,<sup>1</sup> Gloria Paolazzi,<sup>1</sup> Silvia Gallina,<sup>2</sup> Fabio Zuccon,<sup>2</sup> Lucia Decastelli,<sup>2</sup> Dorotea Lombardo<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Bolzano; <sup>2</sup>Laboratorio Nazionale di Riferimento per gli Stafilococchi Coagulasi Positivi incluso *S. aureus*, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle d'Aosta, Torino, Italy

I prodotti lattiero caseari di malga rappresentano una risorsa eco-

nomica e culturale molto importante per i territori di montagna a forte vocazione zootecnica. Questi prodotti sono intimamente legati al territorio di appartenenza: da un lato ciò ne favorisce le proprietà organolettiche, dall'altro, a causa delle difficili condizioni in cui si trovano ad operare gli OSA, può comprometterne le caratteristiche igienico sanitarie. Uno dei rischi che non si riduce con la stagionatura è la presenza di enterotossine stafilococciche, spesso associate a fenomeni di intossicazione alimentare da consumo di formaggio a base di latte crudo. Durante la stagione d'alpeggio 2014, in seguito ad un controllo effettuato dall'azienda sanitaria del servizio veterinario di Bressanone (BZ), alcuni formaggi stagionati, prodotti a base di latte crudo di vacca in una malga del luogo, sono risultati positivi per enterotossine stafilococciche (SE). Tutta la produzione della stagione è stata sottoposta ad analisi microbiologiche per valutarne la conformità al Reg. CE 2073/05. I ceppi di Stafilococchi coagulasi positivi isolati dall'intera produzione sono stati tipizzati per poterne determinare l'origine, ed analizzati per la ricerca dei geni codificanti le SE. Dall'analisi dei 77 campioni, corrispondenti a 25 lotti diversi, è emerso un valore medio di stafilococchi coagulasi positivi superiore ai limiti di legge. Conseguentemente ai valori ottenuti, tutti i campioni sono stati sottoposti ad analisi per la determinazione di enterotossine mediante test VIDAS SET 2 (ANSES-EU-RL Versione 5:2010): solamente il 6,5% dei campioni è risultato superiori al valore soglia (TV $\geq$ 0,13). I 28 ceppi di stafilococchi coagulasi positivi sono stati analizzati per verificare la presenza di geni codificanti le SE solo uno è risultato positivo per i geni *sea*, *ser* e *sej*. Alla biotipizzazione quest'ultimo isolato è risultato di origine non-ospite specifica (NHS5), mentre i restanti 27 erano di origine ovina. La ricerca di geni codificanti le enterotossine stafilococciche rappresenta uno strumento molto utile per effettuare studi epidemiologici ed indirizzare i controlli. La discriminazione precoce della natura tossigena o meno dei ceppi può facilitare la gestione di situazioni potenzialmente rischiose prima ancora che il prodotto sia disponibile sul mercato. Dai risultati delle analisi si è evidenziato l'isolamento di *S. aureus* potenzialmente in grado di produrre la tossina SEA, spesso coinvolta in casi di tossinfezione alimentare. La biotipizzazione ha invece messo in luce la presenza di una popolazione di ceppi di origine ovina. La determinazione dell'origine della specie eventualmente coinvolta nella contaminazione permette di indirizzare l'intervento del personale competente all'igiene della mungitura ed a strategie di controllo di eventuali cross-contaminazioni prima ancora che ai processi di trasformazione del latte. In particolare, la presenza del biotipo ovino indica una possibile promiscuità nella gestione della malga che potrebbe essere corretta a monte, consentendo l'ottenimento di un prodotto salubre.

### P40

#### Bisfenolo A nei prodotti ittici

Adele Reposi, Federica Farabegoli, Teresa Gazzotti, Elisa Zironi, Giampiero Pagliuca

Laboratorio di Chimica Analitica Bio-Agroalimentare, CABA-Lab, Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum-Università di Bologna, Ozzano dell'Emilia (BO), Italy

Il Bisfenolo A (BPA) è un composto utilizzato da più di 50 anni per la sintesi di policarbonato, resine epossidiche ed epossifenoliche, materiali comunemente utilizzati in ambito domestico, sia per la produzione di oggetti in plastica ad uso quotidiano, sia per il rivestimento di recipienti alimentari. Tale molecola ha suscitato l'atten-



zione da parte delle Autorità a causa dei suoi possibili effetti endocrini pericolosi per la salute umana e per la sua ampia diffusione nell'ambiente. Si stima infatti che a livello globale la produzione annuale di BPA raggiunga i 5 milioni di tonnellate. In base ai dati disponibili in letteratura, i prodotti ittici risultano tra quelli maggiormente contaminati da BPA. Inoltre, è stata riscontrata la possibilità che tale molecola migri dall'imballaggio al contenuto alimentare. In questo lavoro è stata condotta un'ampia ricerca bibliografica per rivisitare lo stato dell'arte dell'ultimo decennio sulla presenza di BPA nella parte edibile dei prodotti ittici. Inoltre, a supporto della ricerca, sono stati presi in considerazione i più recenti report di diverse Autorità scientifiche come l'Agenzia Europea per la Sicurezza Alimentare (EFSA), l'Agenzia per la Sicurezza Alimentare Francese (ANSES) e la Food and Drug Administration (US FDA). In base a quanto riportato dall'EFSA, la dieta costituisce la principale via di esposizione per l'uomo al BPA ed i prodotti in scatola sono generalmente più contaminati rispetto a quelli freschi. L'analisi dei dati più recenti presenti in letteratura conferma quanto pubblicato dall'EFSA nel suo ultimo report: i livelli di contaminazione dei prodotti ittici non conservati raramente raggiungono i 100 µg/kg e si attestano a concentrazioni prossime a 10 µg/kg, mentre i valori medi dei prodotti in scatola si aggirano attorno ai 37 µg/kg e spesso si ritrovano concentrazioni superiori ai 100 µg/kg. È stato appurato che il sito di campionamento incide particolarmente sulla contaminazione del prodotto esaminato: molluschi pescati nel golfo di Gdansk, nel Mar Baltico, le cui acque sono particolarmente inquinate, hanno riportato concentrazioni fino a 197 µg/kg. Tali livelli superano notevolmente la media dei dati esaminati, mentre valori relativi ad altri monitoraggi su molluschi provenienti dalle coste della Galizia e dal Nord Adriatico sono risultati comparabili ad altri lavori presenti in letteratura. Infine, dall'analisi dei dati pubblicati dal 2005 ad oggi, si può desumere che la presenza di BPA nel pesce nei paesi europei è in media dello stesso ordine di grandezza rispetto a quella riscontrata nei paesi asiatici e nel continente americano. Secondo il parere dell'US FDA, confermato nell'ultimo report dell'EFSA, il BPA non rappresenta un rischio per la salute umana ai livelli di esposizione a cui sono sottoposti i consumatori, in nessuna fascia d'età. Inoltre, grazie ad un metodo di valutazione del rischio più accurato, gli esperti dell'EFSA hanno considerevolmente ridotto la dose giornaliera tollerabile (DGT) da 50 µg/kg a 4 µg/kg su peso corporeo, valore provvisorio in attesa di ulteriori studi tossicologici. L'EFSA ritiene tuttavia necessarie ulteriori indagini sul BPA in carne e in pesce, e secondo alcuni autori, è importante non sottovalutare l'effetto sinergico tra i vari interferenti endocrini presenti nelle derivate alimentari, anche se singolarmente presenti a livelli al di sotto della DGT.

## P41

### I controlli ufficiali sui prodotti tradizionali cinesi nella provincia di Prato

Bianca Maria Varcasia,<sup>1</sup> Paola Marconi,<sup>1</sup> Ettore Facibeni,<sup>2</sup> Paola De Santis<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana, Roma;

<sup>2</sup>Azienda Unità Sanitaria Locale 4 Prato, Dipartimento della Prevenzione-Igiene Alimenti di Origine Animale, Prato, Italy

I cibi etnici importati nell'Unione Europea, in particolare quelli di origine animale, devono essere conformi a quanto previsto dalla legislazione comunitaria. In Italia, un caso particolare è la provincia di Prato, dove si è sviluppato un importante commercio di cibi etnici

a causa della presenza di una numerosa comunità cinese. In tale contesto, tra il 2012 e il 2015 sono stati prelevati dai Servizi Veterinari della ASL di competenza presso alcuni esercizi di vendita complessivamente 52 campioni di alimenti prodotti in Cina, prodotti gastronomici che rappresentano varietà di cibi tradizionali cinesi largamente consumati nell'ambito della comunità di Prato. In particolare sono stati prelevati 39 prodotti a base di carne (bovino, suino, anatra e pollo), 8 campioni di uova in guscio di anatra e di pollo e 5 campioni di bevande varie, a base di latte e frutta. I 52 campioni sono stati sottoposti ad un esame ispettivo e successivamente ad identificazione di specie, al fine di valutarne la conformità alla normativa sulla sicurezza alimentare (Regolamento CE 852/04, Regolamento CE 853/04 e Decisione CE 994/02 e s.m.i.). La valutazione della conformità si basa su tre criteri: (i) non conformità di etichettatura (Reg. CE 1169/2011), (ii) presenza di matrici alimentari d'importazione vietata (Dec. CE 994/02) e (iii) verifica dell'esistenza della documentazione di accompagnamento e tracciabilità (Reg. CE 178/2002). I campioni prelevati sono stati sottoposti a controllo visivo da parte degli ispettori in merito alle condizioni della confezione, dell'etichettatura e della conservazione nonché alla presenza o meno di documentazione di accompagnamento. Successivamente sono stati analizzati per l'identificazione di specie mediante sistema *low density microarray*, utilizzando il kit GeneTop Meat™ (LifeLineLab, Italia) che consente di rilevare e differenziare 17 diverse specie zoologiche. Dall'analisi congiunta dell'esame ispettivo e di laboratorio, tutti i 52 campioni sono risultati non conformi ad uno o più dei criteri sopra citati. Ad esempio per le 5 bevande a base di latte, 1 campione è risultato non conforme per la presenza di latte bovino, matrice di cui è vietata l'importazione e 4, nonostante non sia stata evidenziata presenza di alcuna specie animale, per l'etichetta scritta con i soli ideogrammi cinesi. I risultati hanno dimostrato che le importazioni di prodotti alimentari, in violazione dei divieti sanciti da decisioni comunitarie, è frequente all'interno della comunità cinese di Prato. Questo fenomeno è probabilmente legato al desiderio di proteggere le proprie tradizioni alimentari, importanti per mantenere l'identità culturale, la coesione del gruppo e il legame con il paese di origine. L'analisi di laboratorio è stato un utile e fondamentale supporto al controllo ufficiale, in quanto spesso questi prodotti hanno subito trattamenti e modalità di preparazione particolari che non trovano corrispettivi analoghi nella nostra tradizione alimentare. L'etichettatura, inoltre, spesso incompleta e non in italiano non sempre ha consentito l'identificazione e la categorizzazione del prodotto ai fini della valutazione dei parametri di sicurezza alimentare. Data la complessità e la varietà di questi prodotti, emerge anche la necessità di una formazione specifica degli operatori incaricati del Controllo Ufficiale.

## P42

### Focus sul virus dell'Epatite A in molluschi eduli lamellibranchi allevati nella regione Sardegna

Riccardo Bazzardi, Maria Caterina Fattaccio, Monica Rosaria Molotzu, Laura Marongiu, Antonella Canu, Alfonsina Marras, Margherita Pisanu

Struttura Complessa Igiene Alimenti, Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Sardegna, Sassari, Italy

I prodotti alimentari possono essere un veicolo per la trasmissione all'uomo di agenti infettivi sia di natura batterica che virale. Studi epidemiologici e clinici dimostrano che il virus dell'Epatite A (HAV) sta assumendo una crescente importanza come causa di malattia tra-



smessa con gli alimenti e i Molluschi Bivalvi Vivi (MBV) rappresentano la categoria alimentare più frequentemente implicata in episodi di severe infezioni di origine alimentare. Gli animali marini filtratori sono capaci di concentrare nel loro organismo, oltre alle sostanze nutritive necessarie al proprio fabbisogno metabolico, anche microrganismi patogeni e virus, tra cui il virus dell'epatite virale A. Scopo del presente lavoro è stato quello di analizzare, in un periodo di 5 anni, i molluschi eduli lamellibranchi provenienti dalle zone di allevamento della regione Sardegna, al fine di avere un'indicazione sull'incidenza del virus dell'Epatite A nelle popolazioni animali oggetto di questo studio. Durante il periodo in esame, la tecnica della *Real time PCR* per la rilevazione dell'RNA virale ha subito una serie di variazioni, allo scopo di perfezionare la metodica e di aumentarne la sensibilità. Nel periodo gennaio 2011 - giugno 2015 sono stati analizzati un totale di 3014 molluschi bivalvi, 2397 mitili, 162 ostriche e 455 vongole. Tutti i campioni sono pervenuti dalle zone di allevamento e di produzione della regione Sardegna, aree marino costiere, già classificate per la molluschicoltura e soggette ad attività di monitoraggio. Ogni campione comprendeva una aliquota costituita da un numero minimo di 10 individui per le specie più grandi come le ostriche ed i mitili e 30 individui per le vongole. Tutte le aliquote sono state sottoposte alla fase di estrazione della particella virale dal tessuto animale, con successiva concentrazione ed estrazione degli acidi nucleici utilizzando il protocollo NucliSENS Magnetic Extraction miniMAG (Biomérieux), seguendo le indicazioni della casa produttrice. Per l'amplificazione ed rilevazione mediante Real-Time PCR con metodica Taqman del genoma di HAV sono stati utilizzati primer senso, antisense e sonda seguendo la metodica fornita dal Dipartimento di Sanità Pubblica veterinaria e di Sicurezza Alimentare - Reparto Adempimenti Comunitari e Sanità Pubblica dell'Istituto Superiore di Sanità fino all'anno 2013. A partire dall'anno 2014 le aliquote sono state sottoposte a saggio molecolare seguendo la Norma ISO/TS 15216-2:2013. Nell'indagine condotta è stata rilevata la presenza di HAV in 1 dei 136 campioni di vongole analizzati (incidenza dello 0,8%) e in 5 dei 796 campioni di mitili analizzati (incidenza dello 0,6%) nei mesi da gennaio a marzo dell'anno 2014; mentre è stata rilevata, nel solo periodo di febbraio 2015, la presenza del virus in un campione di mitili allevati nella zona sud della regione Sardegna. I risultati ottenuti nel presente lavoro confermano che la maggiore contaminazione da HAV è stata registrata nei campioni prelevati nei mesi invernali evidenziando l'importanza di sorvegliare periodicamente le aree di produzione dei molluschi in tutto il territorio regionale al fine di valutare, grazie anche alle recenti metodiche molecolari, la presenza del virus e l'individuazione di zone definite a rischio.

### P43

#### Presenza del virus dell'Epatite E nei cinghiali (*Sus scrofa scrofa*) nella regione Lazio

Antonella Froio,<sup>1</sup> Sarah Lovari,<sup>1</sup> Giuseppe Micarelli,<sup>2</sup> Enrica Martini,<sup>2</sup> Lucia Scaramella,<sup>1</sup> Paola De Santis<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Lazio e della Toscana, Roma;  
<sup>2</sup>Servizio Veterinario Azienda Sanitaria Locale di Viterbo, Viterbo, Italy

L'Epatite E (HE) è una malattia infettiva la cui severità può variare da asintomatica a fulminante, che può causare insufficienza epatica e morte. Nelle donne in gravidanza, il tasso di mortalità può raggiungere il 20-25%. Focolai di HE sono associati al consumo di acqua contaminata e/o di alimenti crudi o poco cotti, soprattutto carne. L'agente eziologico di HE è un virus (HEV) senza envelope, con genoma ad RNA a singola elica a polarità positiva, che comprende quattro genotipi principali (HEV 1-4), con l'RNA virale com-

posto da tre Open Reading Frame (ORF1 a 3) parzialmente sovrapposti. Possibili serbatoi di HEV sono alcune specie di vertebrati quali roditori, ovini, caprini, bovini, suini, polli, primati non umani e molti animali selvatici. La trasmissione zoonotica del virus è supportata dall'evidenza che ceppi di HEV isolati da suini, antigenicamente e geneticamente correlati ad HEV umani, identificati all'interno dello stesso distretto, sono stati ritrovati in diversi paesi in tutto il mondo. L'infezione, storicamente considerata un problema di salute pubblica solo nei paesi in via di sviluppo, sta ora acquisendo importanza anche nei paesi sviluppati. Lo scopo del presente studio è stato quello di stabilire l'eventuale circolazione di ceppi di HEV in cinghiali nella regione Lazio. In tre stagioni venatorie consecutive sono stati prelevati 350 campioni di fegato, da cinghiali cacciati nell'ambito di un programma di controllo della popolazione nella provincia di Viterbo. L'RNA totale è stato purificato e l'RNA virale di HEV amplificato usando un kit per PCR RT-Real Time commerciale in grado di rilevare tutti i 4 genotipi di HEV (Hepatitis E kit, CeeramTools, Italia). Successivamente, per la conferma dei risultati, è stato utilizzato un protocollo di RT-PCR nested adattato dalla letteratura. Il 14% dei campioni di cinghiale di fegato è risultato positivo ad HEV. Il sequenziamento nucleotidico e l'analisi filogenetica hanno permesso di identificare i genotipi HEV e di confrontarli con sequenze pubblicate in letteratura: tutti i ceppi identificati sono risultati appartenere al genotipo HEV-3. Dalla disamina dei risultati ottenuti, la percentuale di campioni HEV positivi riscontrata, mette in evidenza la necessità di valutare e quantificare il livello di rischio rappresentato per l'uomo a seguito del consumo di carne ed organi di cinghiali. E' pratica diffusa che i cinghiali cacciati siano venduti direttamente ai ristoranti, aggirando i controlli sanitari, che la carne e il fegato siano usati per confezionare le tradizionali salsicce di fegato e che, talvolta, le stesse siano consumate crude. Queste categorie di prodotti sono vendute sia a livello locale che consumate direttamente dal cacciatore, in ambito familiare o con amici. La vendita di fegato di cinghiale contaminato da HEV a negozi di alimentari locali è stato descritto all'interno dell'UE. Nonostante questo, nessun test di laboratorio viene effettuato regolarmente per rilevare HEV nell'uomo e tanto meno in alimenti di origine animale. La ricerca dell'HEV nei cinghiali nella regione Lazio potrebbe rivelarsi uno strumento utile per valutare meglio il ruolo dei cinghiali e le modalità di diffusione del virus e, di conseguenza, poter intraprendere azioni di controllo efficaci.

### P44

#### Studio proteomico dei meccanismi di formazione di biofilm in *Staphylococcus Aureus*

Pierluigi Di Ciccio,<sup>1</sup> Paola Roncada,<sup>2,3</sup> Emanuela Zanardi,<sup>1</sup> Sergio Ghidini,<sup>1</sup> Viviana Greco,<sup>4,5</sup> Cristian Piras,<sup>3</sup> Luigi Bonizzi,<sup>3</sup> Adriana Ianieri<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze degli Alimenti, Università degli Studi di Parma, Parma; <sup>2</sup>Istituto Sperimentale Italiano Spallanzani, Milano; <sup>3</sup>Dipartimento di Scienze Veterinarie e Sanità Pubblica, Università degli Studi di Milano, Milano; <sup>4</sup>Dipartimento di Medicina Sperimentale e Chirurgia, Università di Roma Torvergata, Roma; <sup>5</sup>Laboratorio di Proteomica e Metabonomica, Fondazione Santa Lucia, Istituto di Ricovero e Cura a Carattere Scientifico, Roma, Italy

Numerosi batteri patogeni hanno dimostrato capacità di formare biofilm. Tra questi, particolare rilevanza in ambito clinico ed alimentare riveste *Staphylococcus aureus* (S.a). Il biofilm può essere definito come una comunità sessile di batteri, irreversibilmente adesa ad una super-

ficie, immersa in una matrice extracellulare composta da sostanze polimeriche prodotte dalle cellule stesse e caratterizzata da una alterato fenotipo ed espressione genica. Attualmente, approcci avanzati innovativi quali ad esempio l'analisi proteomica volta ad approfondire la particolare fisiologia dei microrganismi in forma sessile rispetto alla forma planctonica sta riscuotendo un notevole successo. Studi recenti hanno dimostrato, infatti, che l'espressione proteica delle cellule batteriche organizzate in forma sessile rivela alterazioni rispetto alla forma planctonica. Lo scopo del nostro studio è stato quello di identificare proteine differenzialmente espresse in ceppi produttori di biofilm di *S.a* in forma planctonica e in forma sessile. L'indagine è stata condotta sui ceppi di riferimento di *S.a.* (alti produttori, basso produttori di biofilm). Per la forma planctonica è stata allestita una cultura overnight in Trypticase Soy Broth. La produzione del biofilm è stata allestita su piastrine di polistirene sterili a 37°C in accordo ad un nostro precedente protocollo. Per ogni ceppo sono stati analizzati 3 replicati biologici, in particolare 50 mg di pellet batterico è stato diluito in 500 microlitri di tampone di reidratazione (7M urea, 2M tiourea, 2% CHAPS) e 500 mg di sfere di Zirconio (BioSpec Products inc, USA). I campioni sono stati processati con 5 cicli da 1 minuto ciascuno (bead beating) intervallato da 5 minuti in ghiaccio e 2 minuti di centrifugazione (2°C, 14000 rpm). 100 microgrammi di estratto proteico è analizzato in elettroforesi bidimensionale ad alta risoluzione, colorato con Comassie staining Colloidale e l'analisi delle immagini digitalizzate è stata effettuata con il software dedicato Progenesis Same Spots (Non linear dynamics). Le proteine differenzialmente espresse, escisse dal gel 2D, sono state digerite mediante tripsina e i peptidi analizzati mediante spettrometria di massa MALDI TOF (Ultraflex III, Bruker) in modalità reflectron positiva. Gli spettri di massa ottenuti, caratteristici di ciascuna proteina (spot), sono stati processati mediante il software Flex Analysis 3.3 e la lista di picchi ottenuta (m/z) analizzati mediante l'algoritmo Mascot v.2.4 utilizzando il database Swiss Prot \_2015\_05 selezionato per la tassonomia *Staphylococcus aureus* (bacteria). Per l'identificazione sono stati utilizzati i seguenti parametri di ricerca: tolleranza di massa 50 ppm, carbamidometilazione della cisteina fra le modificazioni variabili e ossidazione della metionina fra le modificazioni fisse. I risultati evidenziano l'espressione differenziale di 8 proteine comuni ai due ceppi presi in considerazione. Tra le 8 proteine identificate oggetto dell'analisi, si evidenziano l'alcool deidrogenasi, la putative long chain fatty acid CoA ligasi e la Inosina 5 monofosfato deidrogenasi che aumentano nelle condizioni sessili (quindi in fase di formazione biofilm). Queste proteine ci forniscono nuove chiavi di lettura in merito alla produzione di biofilm, in particolare il coinvolgimento di molecole del quorum sensing (inosina 5 monofosfato deidrogenasi), la resistenza ai disinfettanti (alcol deidrogenasi), il potenziamento della lipofilicità e la difficoltà di penetrazione dell'acqua e antimicrobici (LCFACoA ligasi).

## P45

### Presenza di geni di virulenza in *Arcobacter butzleri*, *Arcobacter cryaerophilus* e *Arcobacter skirrowii* isolati da fonti alimentari, animali e ambientali

Federica Giacometti,<sup>1</sup> Grazia Gariano,<sup>2</sup> Silvia Piva,<sup>1</sup> Andrea Serraino,<sup>1</sup> Silvia Gallina,<sup>2</sup> Renato Giulio Zanoni,<sup>1</sup> Lucia Decastelli<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Scienze Mediche Veterinarie, Alma Mater Studiorum-Università di Bologna, Ozzano Emilia (BO); <sup>2</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Piemonte, Liguria e Valle D'Aosta, Torino, Italy

Lo scopo del presente studio è stato quello di determinare la presenza di 9 geni codificanti per fattori di virulenza in *Arcobacter spp.* isolati da diverse fonti, al fine di determinarne il loro potenziale patogenetico. Un

totale di 151 isolati di *Arcobacter spp.*, rispettivamente 113 *Arcobacter butzleri*, 34 *Arcobacter cryaerophilus* e 4 *Arcobacter skirrowii*, provenienti da 16 campioni alimentari, 37 campioni fecali di animali da latte, 12 filtri dell'impianto di mungitura e 86 ambientali analizzati in precedenti studi, sono stati sottoposti a un protocollo di multiplex-PCR per la ricerca dei seguenti geni: *cadF* e *cj1349* responsabili di adesività; *ciaB* e *pldA* responsabili di invasività; *tlyA*, *hecA* e *hecB* responsabili dell'attivazione di emolisine; *mviN* codificante una proteina per la sintesi del peptidoglicano; *irgA* codificante una proteina di membrana ferro-dipendente. In relazione alla presenza dei geni di virulenza sono stati definiti i patotipi (P-type), espressi da valori numerici decrescenti in base al numero di geni presenti. I geni più frequentemente rilevati sono stati *ciaB*, *mviN* e *tlyA* con percentuali pari a 96.0, 85.4 e 70.2% rispettivamente. Sono stati evidenziati un totale di 18 P-types; di questi i più rappresentativi sono risultati: il P-type 4 (*cadF-pldA-tlyA-ciaB-mviN-cj1349*) evidenziato in 60 isolati di *A. butzleri*, di cui 8, 7, 7, 21 e 17 provenienti rispettivamente da campioni alimentari, fecali, filtri dell'impianto di mungitura, da superfici a contatto e non a contatto con alimenti; il P-type 14 (*ciaB-mviN*) rilevato in 22 isolati di *A. cryaerophilus*, di cui 20 fecali e 2 provenienti da superfici a contatto con alimenti, 1 *A. butzleri* isolato da superfici a contatto con alimenti e 1 *A. skirrowii* isolato da campioni fecali; il P-type 7 (*cadF-tlyA-ciaB-mviN-Cj*) in 18 isolati di *A. butzleri*, di cui 10 e 6 provenienti rispettivamente da superfici a contatto e non a contatto con alimenti e 2 campioni alimentari; il P-type 16 (*ciaB*) evidenziato in 9 isolati di *A. cryaerophilus*, di cui 3 e 5 provenienti da campioni fecali e da filtri dell'impianto di mungitura e 1 da superfici a contatto con alimenti, 3 di *A. skirrowii*, di cui 2 fecali e 1 alimentare e 1 *A. butzleri* di origine fecale. Dai risultati di questo studio, *A. butzleri* appare la specie dotata di un maggior potenziale di virulenza, mentre il numero inferiore di geni di patogenicità rilevati in *A. cryaerophilus* e *A. skirrowii* potrebbe essere riconducibile ad un loro diverso comportamento patogenetico o ad una maggiore eterogeneità dei loro genomi, tale da rendere meno accurata la ricerca di tali geni. Infine, si può notare come la presenza o assenza di determinati geni codificanti per fattori di virulenza sia correlata alla tipologia di matrice analizzata; nello specifico, i P-types da 14 a 18, ovvero da 0 a 2 geni di virulenza, sono stati rilevati per lo più in campioni fecali e filtri dell'impianto di mungitura a differenza dei P-types 1-13 che sono stati rilevati quasi esclusivamente in campioni ambientali e alimentari. Questi risultati indicano che le tre specie di *Arcobacter* indagate sono potenziali agenti patogeni per l'uomo e per gli animali e sottolineano il ruolo chiave che l'ambiente riveste per l'epidemiologia di questo genere emergente. Tuttavia, sarà necessario eseguire ulteriori indagini mirate a verificare l'espressione di questi geni di virulenza per stabilire il loro effettivo potere patogeno e i rischi connessi per l'uomo e gli animali.

## P46

### Valutazione delle contaminazioni microbiologiche rilevanti per la sicurezza alimentare in stabilimenti di produzione di formaggi ovis della Sardegna

Christian Scarano,<sup>1</sup> Carlo Spanu,<sup>1</sup> Francesca Piras,<sup>1</sup> Daniele Casti,<sup>1</sup> Carlo Pala,<sup>1</sup> Sonia Lamon,<sup>1</sup> Vincenzo Spanu,<sup>1</sup> Elena Marrocu,<sup>1</sup> Francesca Cossu,<sup>1</sup> Gavino Murittu,<sup>2</sup> Gavino Nieddu,<sup>3</sup> Enrico Pietro Luigi De Santis<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Dipartimento di Medicina Veterinaria, Università degli Studi di Sassari; <sup>2</sup>F.I.I. Pinna Industria Casearia S.p.A, Thiesi, (SS); <sup>3</sup>Cooperativa Allevatori Ovis Soc. Coop. Agricola, Fenosu (OR), Italy

Nell'ambito di un programma finanziato dalla misura INNOVA.RE, P.O.R. FESR 2007-2013 della Regione Sardegna e cofinanziato dall'Unione Europea (C.U.P. J85G09000350002), è stato realizzato un progetto per

innovare la gestione della Sicurezza Alimentare in stabilimenti caseari industriali, con l'utilizzazione di un test per la rilevazione di biofilm e materiali organici, l'adozione di soluzioni per la rilevazione di patogeni e la mappatura dei siti di contaminazione in caseificio. Nel presente lavoro sono riportati i risultati di uno studio sulle contaminazioni microbiche ambientali, condotto in due caseifici leader nella trasformazione del latte di pecora della Regione Sardegna, nel corso di una annata casearia. In ciascun caseificio sono stati eseguiti 3 campionamenti, da superfici situate lungo le linee di lavorazione del Pecorino Romano DOP e della ricotta fresca. I prelievi sono stati effettuati in due fasi: a) nel corso della produzione (fase operativa); b) dopo la detersione e la sanificazione (fase post-operativa). Sono stati analizzati campioni di superfici a contatto con l'alimento (carrelli, ripiani, macchine lava formaggio, nastri trasportatori in acciaio e in teflon, presse, salatrici, robot, guanti operatori e stampi) e non a contatto con l'alimento (pareti, pavimenti e canalette di drenaggio). Sono stati prelevati campioni di latte crudo e di alcuni *pool* della superficie di forme di Pecorino Romano DOP e di forme di ricotta salata. In tutti i campioni è stata effettuata la ricerca di *Listeria spp.* e *L. monocytogenes* (LM), *Bacillus cereus*, *Pseudomonas spp.* e *Pseudomonas fluorescens*, *Salmonella spp.* e *Escherichia coli* verocitotossico mediante metodiche colturali normate. Gli isolati sono stati identificati mediante metodiche molecolari. Sono stati raccolti 228 campioni, 89 durante la fase operativa e 122 in fase post-operativa. I campioni erano rappresentativi di superfici non a contatto con l'alimento (117) e superfici a contatto (94), campioni di latte (6) e campioni di *pool* della superficie di forme di Pecorino Romano DOP e di ricotta salata (11). *Listeria spp.* è stata rilevata, mediante metodica qualitativa, in 13 campioni (5,7%). Degli isolati appartenenti a questa specie 7 (53,8%) sono stati identificati come LM; 6 isolati provenivano da campioni prelevati in fase post-operativa e 1 da campioni prelevati in fase operativa. Mediante determinazione quantitativa *Listeria spp.* è stata rilevata in 4 campioni (1,8%), con 3 isolati riferibili a LM (1 isolato in fase post-operativa e 2 in fase operativa), provenienti da superfici non a contatto con l'alimento. *B. cereus* è stato rilevato in 25 campioni (11,0%), 8 (32,0%) dei quali prelevati durante la fase post-operativa e 13 (52,0%) durante la fase operativa. *Pseudomonas spp.* è stato isolato in 111 campioni (48,7%), dei quali 57 (51,4%) prelevati in fase operativa e 48 (43,2%) in fase post-operativa. Degli isolati appartenenti a *Pseudomonas spp.*, 16 (14,4%) sono stati identificati come *Pseudomonas fluorescens*. *Salmonella spp.* è stata isolata da una canaletta di drenaggio mentre *Escherichia coli* verocitotossico non è mai stato rilevato. I risultati ottenuti consentono di acquisire informazioni sulla distribuzione di patogeni ed alteranti negli ambienti dei caseifici e sono preliminari per l'effettuazione di studi di tracciabilità e per la definizione di una mappatura dei siti di contaminazione presenti in stabilimento.

#### P47

##### Ottimizzazione di una piattaforma molecolare per l'identificazione di *Salmonella enteritidis* e *Salmonella typhimurium*

Elisabetta Delibato,<sup>1</sup> Eleonora Pucci,<sup>1</sup> Sabatino Russo,<sup>2</sup> Maria Carullo,<sup>3</sup> Sarah Lovari,<sup>4</sup> Stefano Bilei,<sup>4</sup> Dario De Medici,<sup>1</sup> Federico Capuano,<sup>3</sup> Yolande T.R. Proroga<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Istituto Superiore di Sanità, Roma; <sup>2</sup>Dipartimento di Prevenzione, Azienda Sanitaria Locale Napoli 2 Nord, Napoli; <sup>3</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Portici (NA); <sup>4</sup>Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana, Roma, Italy

Le malattie trasmesse dagli alimenti rappresentano un serio pericolo

per la sicurezza alimentare e costituiscono quindi un problema crescente di sanità pubblica. Secondo quanto pubblicato nel Report EFSA-ECDC del 2015, i microrganismi più notificati come causa di malattie di origine alimentare nell'Unione Europea sono *Campylobacter* e *Salmonella*. Tuttavia occorre sottolineare come l'adozione di programmi di monitoraggio per ridurre la prevalenza di *Salmonella*, ed in particolare *Salmonella enteritidis* (SE) e *Salmonella typhimurium* (ST), lungo la filiera avicola, ha fatto registrare un decremento delle notifiche di salmonellosi all'interno dell'UE. Inoltre, allo scopo di ridurre ulteriormente la prevalenza della *Salmonella* nel pollame la Commissione Europea, con il Regolamento CE 1086/2011, ha emanato un criterio microbiologico di sicurezza, che prevede l'assenza di SE e ST nella carne fresca di pollame. Considerando che il metodo di analisi di riferimento per la determinazione e sierotipizzazione della *Salmonella* (EN/ISO 6579) richiede più di 7 giorni, è sempre più sentita la necessità di avere a disposizione nuovi metodi, sensibili e rapidi, da poter utilizzare sia nell'ambito del controllo ufficiale sia nei piani di autocontrollo. A tale scopo, nel presente lavoro, è stata ottimizzata una multiplex Real-time PCR (qPCRSET) per la simultanea determinazione di SE e ST. La qPCRSET è stata ottimizzata utilizzando una coppia di primer e una sonda in grado di amplificare un frammento genetico conservato esclusivamente nei sierotipi di SE (locus *saFA*) e una coppia di primer e una sonda specifici per i sierotipi ST (locus *flyA-IS200*). La selettività delle due piattaforme molecolari è stata verificata utilizzando 229 sierotipi di *Salmonella* (30 SE, 75 ST e 124 altri sierotipi) e 70 ceppi non-salmonella. *Questi risultati sono stati ottenuti nell'ambito del progetto IZS ME 13/12 RC, Sviluppo e validazione di un metodo di Multiplex real time PCR per valutare la presenza di Salmonella spp. Salmonella Enteritidis e Salmonella Typhimurium nella filiera avicola, finanziato dal Ministero della Salute.*

#### P48

##### Analisi delle positività ottenute tramite metodica di screening in real time PCR per batteri patogeni da alimenti

Paolo Bonilauri, Lia Bardasi, Roberto Leonelli, Maria Cristina Fontana, Mattia Ramini, Andrea Luppi, Giuseppe Merialdi

Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, Italy

Lo scopo di questo lavoro è quello di analizzare retrospettivamente i risultati ottenuti nell'ambito del piano regionale alimenti (PRA) della regione Emilia Romagna per gli anni 2012, 2013 e 2014 relativamente alle rilevazioni del DNA di *Salmonella*, *Listeria monocytogenes* e *Campylobacter termofili* tramite Real Time PCR. Tutte le Unità Campionarie utili allo scopo pervenute nelle sezioni di Bologna e Reggio Emilia (IZSLER) nell'ambito del PRA, sono state analizzate tramite Real Time PCR seguendo metodiche validate AFNOR:ISO-16140. Le metodiche prevedono, in caso di reazione positiva alla Real Time PCR, la conferma del risultato analitico con metodo microbiologico partendo dal medesimo terreno di arricchimento. Dal 2012 al 2014 sono state analizzate in tutto 6768 unità campionarie per *Salmonella*, 7796 per *L. monocytogenes* e 634 per *C. termofili*. Sono stati ottenuti i seguenti risultati. *Salmonella*: 130 (2%) reazioni positive alle Real Time PCR, di cui 26 (20%) confermate dall'esame microbiologico. Tutte le reazioni confermate, provenivano da carne cruda. I positivi non confermati provenivano da carni crude, cotte, bevande, uova, insaccati, dolci, cioccolato e frutta. *L. monocytoge-*

nes: 150 (2%) reazioni positive alle *Real Time PCR*, di cui 67 (45%), sono state confermate. Queste sono risultate inferiori al LOQ microbiologico nel 86% dei casi e comunque non superiori a 20 ufc/g quando quantificabili. Anche in questo caso le conferme microbiologiche sono arrivate per lo più da carni crude o prodotti RTE (90%), ma sono state confermate anche reazioni da prodotti sottoposti a cottura (10%). *C. thermofili*: 19 (3%) reazioni positive alle *Real Time PCR*, di cui soltanto 8 (42%) confermate. La ricerca di questi patogeni è stata condotta esclusivamente su carni crude. Questa analisi retrospettiva conferma che le metodiche molecolari, se comparate con l'esame microbiologico mostrano una sensibilità analitica maggiore. Infatti, nonostante il terreno di arricchimento sia comune alle due metodiche, soltanto una frazione dei positivi molecolari viene isolata con successo dal campione. Va tuttavia sottolineato come le metodiche molecolari presentino note aspecificità (effetti matrice e/o cross reazioni) soltanto in parte dichiarate nei certificati di validazione e che comunque necessitano di ulteriori approfondimenti.

Sorprendente il basso tasso di conferma ottenuto per *Salmonella* ed il fatto che tutte le conferme microbiologiche siano state ottenute soltanto in carni crude. Quanto osservato al netto delle reazioni aspecifiche e delle positività osservate in prodotti cotti (14% in tutto), potrebbe significare che soltanto una frazione di cellule risulta effettivamente coltivabile ed isolabile tramite metodiche tradizionali e che questo isolamento risulta particolarmente complicato in matrici differenti dalla carne cruda. Per *L. monocytogenes* le conferme microbiologiche sono arrivate nel 45% dei casi ed in matrici di differenti origine e natura. Per *Campylobacter* la ricerca è stata svolta soltanto nelle carni crude e da questa matrice circa il 40% dei positivi in *Real Time PCR* risulta essere coltivabile. In conclusione il presente lavoro, fornisce una comparazione tra prevalenze microbiologiche e molecolari osservate per tre patogeni a trasmissione alimentare che possono risultare preziose nella valutazione dei risultati ottenuti dai piani regionali di controllo in un'ottica di analisi quantitativa del rischio microbiologico.



## Indice degli autori

Accurso, Damiano	17	Bozzano, Antonella	36
Acuti, Gabriele	15	Bozzetta, Elena	6,30
Adriano, Daniela	18,19	Branciarì, Raffaella	15,32
Alberghini, Leonardo	7	Branzoni, Gian Marco	14
Alongi, Angela	21	Brasca, Milena	38
Alpigiani, Irene	12	Brindani, Franco	12,23
Amadoro, Carmela	15	Bruini, Ilaria	12,23
Amatiste, Simonetta	34	Brulatti, Paolo	37
Amoroso, Maria Grazia	11,22	Brunetti, Roberta	29
Anastasio, Aniello	11,14	Bruno, Teresa	23
Angellotti, Antonio	31	Buonincontro, Giuseppina	18
Arace, Olga	35	Buonomo, Maria Giovanna	35
Arcangeli, Giuseppe	9	Buscemi, Maria Drusilla	21
Arioli, Francesco	10		
Armani, Andrea	6,12	Caligiuri, Vincenzo	35
Armani, Mariachiara	9,39	Cammi, Giuliana	18
Armentano, Antonio	25	Cammilleri, Gaetano	21,27
Arras, Igor	26	Campaniello, Maria	24,25
Arrigoni, Norma	18	Cancedda, Maria Giovanna	22
Astegiano, Sara	18	Canetti, Nicola	37
		Cannavacciuolo, Annunziata	17
Bacci, Cristina	23	Canu, Antonella	40
Bagi, Lori	14	Capo, Salvatore	35
Baioni, Elisa	6,30	Capozzo, Daniela	35
Baldi, Deborah	37	Capuano, Federico	1,35,43
Baldi, Loredana	23,26,28,29	Cardamone, Cinzia	29
Balzan, Stefania	18	Cardazzo, Barbara	18
Balzaretti, Claudia M.	27	Carosielli, Leonardo	28
Barbani, Roberto	37	Carra, Elena	37
Bardasi, Lia	37,43	Carraro, Lisa	18
Barilli, Elena	12,23	Carullo, Maria	43
Bartolotta, Antonio	29	Caruso, Giorgia	29
Bazzardi, Riccardo	40	Castellano, Vincenzo	35
Bellio, Alberto	19,20	Casti, Daniele	2,17,42
Bellotti, Paola	12	Castigliengo, Lorenzo	6,12
Beninati, Chiara	7	Cattaneo, Patrizia	35
Bergamini, Federica	37	Cavallo, Stefania	23,26
Bernardi, Cristian	3,35	Ceccarini, Maria Rachele	15
Bersani, Carla	35	Celano, Gaetano Vitale	13
Bersani, Laura	20	Cenci Goga, Beniamino Terzo	4
Bianchi, Daniela Manila	18,19,20	Ceruso, Marina	8
Biocchi, Riccardo	34	Chaves López, Clemencia	4,13
Bignami, Giorgia	10	Chessa, Giannina	1
Bilei, Stefano	38,43	Chetta, Michele	21,27
Biondi, Loredana	35	Chiaravalle, Eugenio	26,28,32,33
Bitti, Giuseppe	1,22	Chiesa, Francesco	3,10
Bogdanova, Tatiana	38	Chiesa, Luca	10
Bonardi, Silvia	12	Chirollo, Claudia	8,9
Bonilauri, Paolo	43	Cicero, Nicola	27
Bonizzi, Luigi	41	Cioffi, Barbara	11,22
Boselli, Carlo	34	Ciuti, Francesca	31
Botta, Mario	6,30	Civalleri, Nadia	20
Bove, Daniela	29	Civera, Tiziana	3,10
		Civettini, Michele	9
		Coda, Benedetta	10

Codini, Michela	15	Fasoli, Franco	4
Colarusso, Germana	28	Fattaccio, Maria Caterina	40
Colavita, Giampaolo	15	Favretti, Michela	9
Collura, Marco	27	Fedrizzi, Giorgio	17
Collura, Rosaria	21	Ferrantelli, Vincenzo	21,27
Condoleo, Roberto	30	Ferrari, Nicola	37
Conedera, Gabriella	9	Ferretti, Ezio	31
Consolati, Simonetta Gianna	15	Filippetti, Francesco	34
Conticelli, Annalisa	24	Fiori, Gianuario	1
Cortesi, Maria Luisa	8	Flores Rodas, Eda Maria	30
Cosciani Cunico, Elena	18	Floridi, Francesca	32
Cossu, Francesca	2,17,42	Fontana, Maria Cristina	43
Cossu, Maurizio	1	Fontanella, Edoardo	20
Costa, Antonella	21	Forte, Claudio	15
Costantini, Chiara	3	Fragassi, Sandra	18
Cozzolino, Loredana	22	Franzini, Giuliana	37
Cusimano, Maria	21	Fratamico, Pina M.	14
		Fraulo, Pasquale	34
D'Amato, Serena	13	Froio, Antonella	41
D'Ambrosio, Rosa	29	Fusco, Giovanna	11,22
D'Amico, Priscilla	12		
D'Antini, Pasquale	24,25	Galiero, Giorgio	11,22
D'Oca, Maria Cristina	29	Gallina, Silvia	18,19,20,39,42
Dalmasso, Alessandra	10	Gallo, Pasquale	26
Dalzini, Elena	18	Garbarino, Chiara	18
Daminelli, Paolo	18	Gariano, Grazia	42
De Angelis, Veronica	30	Garofalo, Francesca	27
De Felice, Anna	27	Gattuso, Antonietta	37
De Medici, Dario	43	Gazzotti, Teresa	39
De Santis, Enrico Pietro Luigi	2,17,42	Genchi, Marco	23
De Santis, Paola	30,40,41	Gennari, Mario	13
De Santo, Annunziata	27	Gerola, Roberto	4
DeCarlo, Esterina	34	Ghidini, Sergio	41
Decastelli, Lucia	18,19,20,39,42	Giaccone, Daniele	21
Decina, Ivana	25	Giaccone, Valerio	7,35
Deidda, Silvia	17	Giacometti, Federica	16,42
Del Torre, Manuela	19	Gianfaldoni, Daniela	6,12
Delibato, Elisabetta	43	Giangaspero, Annunziata	11
Dell'Aira, Elena	38	Giangolini, Gilberto	34
della Rotonda, Maurizio	23	Giangrosso, Giuseppe	21,27
Desini, Pietro	1,22	Giarratana, Filippo	6,7
Di Ciccio, Pierluigi	41	Gilardi, Giovanna	19
Di Domenico, Ilaria	38	Giordano, Angela	1
Di Giacomo, Loredana	31	Girasole, Mariagrazia	9
Di Noto, Annamaria	29	Giuffrida, Alessandro	7
Dolci, Sibilla	38	Giusti, Alice	6
		Goffredo, Elisa	4
Esposito, Assunta	1	Graci, Stefania	21,27
Esposito, Mauro	23,26	Grassi, Maria Ausilia	21
Esposito, Sonia	32	Greco, Viviana	41
		Guarino, Achille	1,11,22,27,28,29,34,35
Facibeni, Ettore	40	Guidi, Alessandra	6,12
Farabegoli, Federica	39	Gullino, Maria Lodovica	19
Farina, Giovanni	4		
Fasolato, Luca	18	Ianieri, Adriana	41

Ibba, Michela	2,17	Menotta, Simonetta	17
Imbimbo, Samantha	35	Mercogliano, Raffaelina	16
Ippolito, Clara	19	Meriardi, Giuseppe	37,43
		Mezher, Ziad	30
Kramer, Laura Helen	23	Micarelli, Giuseppe	41
		Michetti, Matteo	31
Labella, Giuseppe	10	Miedico, Oto	26,28
Ladu, Daniela	15	Miotti-Scapin, Riccardo	7
Lambiase, Sara	23	Miraglia, Dino	14,32
Lamon, Sonia	2,17,42	Mocci, Anna Maria	2
Leggeri, Patrizia	36	Molotzu, Monica Rosaria	40
Leonelli, Roberto	43	Morena, Carmelo	34
Leoni, Francesca	26	Morena, Valeria	36
Liguori, Salvatore	27	Morganti, Marina	12,37
Liuzzo, Gaetano	16	Moroni, Daniele Vittorio	27
Lo Magro, Sonia	24,25	Morra, Patrizia	21
Lollai, Stefano	22	Moscarelli, Pasquale	24
Lombardo, Dorotea	39	Mudadu, Alessandro	26
Lomonaco, Sara	3,21	Mura, Erica	17
Lorenzoni, Giuseppa	26	Murittu, Gavino	42
Loschi, Anna Rita	31	Murru, Nicoletta	16
Losio, Nadia	37	Muscarella, Marilena	24,25
Lovari, Sarah	38,41,43	Muscolino, Daniele	6,7
Lucchini, Rosaria	4,9	Mutolo, Sabrina	21
Luppi, Andrea	43		
		Naldi, Giancarlo	17
Macaluso, Andrea	27	Naldi, Simona	37
Macori, Guerrino	19,39	Nava, Donatella	35
Magjstrali, Chiara Francesca	31	Nieddu, Gavino	2,42
Mancusi, Andrea	1	Nocilla, Luca	30
Mandato, Diletta	28	Novelli, Enrico	18
Mangia, Carlo	23	Novelli, Sara	31
Mangiacotti, Michele	32,33	Nucera, Daniele Michele	21
Marangi, Marianna	11		
Marati, Luisa	11	Oliveri, Giuseppa	29
Marceddu, Marta	26	Olivo, Fabio	30
Marcianò, Rita	30	Orsoni, Francesca	37
Marconi, Paola	40	Ortoffi, Marco Francesco	21
Marongiu, Daniela	22	Ottaviani, Donatella	26
Marongiu, Edoardo	11,26		
Marongiu, Laura	40	Paba, Antonio	2
Marozzi, Selene	38	Pagliuca, Giampiero	39
Marras, Alfonsina	40	Pala, Carlo	2,17,42
Marras, Michela	2	Palermo, Pierpaolo	27,29
Marrocu, Elena	17,42	Palma, Giuseppe	8
Marrone, Raffaele	8,9	Palmieri, Patrizia	38
Martini, Enrica	41	Palomba, Marcella	1
Mascolo, Celeste	8	Palumbo, Silvia	21
Mascolo, Celestina	8	Panebianco, Antonio	6
Masotti, Gianfranco	36	Panebianco, Felice	7
Mazza, Roberta	15	Paniccià, Marta	31
Mazzarrino, Giovanni	13	Panserì, Sara	10
Mazzette, Rina	15	Paolazzi, Gloria	39
Meistro, Serena	6,30	Paparella, Antonello	4,13
Meloni, Daniela	30	Parlato, Aldo	29

Pasquale, Vincenzo	22	Russo, Sabatino	43
Passalacqua, Pier Luca	10	Russo, Simone	18
Patania, Andrea	7		
Paternolli, Sabrina	4,9	Sabbioni, Valentina	37
Pede, Priamo	36	Saccares, Stefano	30,36
Pellegrino, Eleuterio	28	Salama, Ehab	7
Pellicanò, Roberta	26,28	Salza, Sara	11
Pepe, Tiziana	8,14	Salzano, Caterina	27
Perugini, Anna Giannina	1	Sanna, Giovanna	26
Peruzy, Maria Francesca	16	Santonicola, Serena	16
Pesce, Antonella	27	Sardo, Daniela	2
Petrelli, Dezemona	33	Sarnelli, Paolo	28,29
Pezzolato, Marzia	6,30	Sbarra, Ciro	23
Pezzuto, Alessandra	9	Scaramella, Lucia	41
Piana, Andrea	17	Scarano, Christian	2,17,42
Piana, Lucia	17	Scoccia, Eleonora	31
Piccirilli, Michele	15	Serio, Annalisa	4,13
Pietracci, Federica	31	Serluca, Giovanna	34
Pintore, Antonio	22	Serraino, Andrea	10,16,42
Piras, Cristian	41	Serratore, Patrizia	10
Piras, Francesca	15,42	Servili, Maurizio	18,32
Piras, Patrizia	1	Sgarangella, Francesco	1,22
Pisanu, Margherita	40	Silenzi, Valentina	31
Piscitelli, Luigi	35	Simoni, Emanuele	31
Pitardi, Danilo	30	Siragusa, Grazia	32
Piva, Silvia	42	Smaldone, Giorgio	8,9
Poeta, Antonio	16	Soprano, Vittorio	26,35
Polese, Pierluigi	19	Spanu, Carlo	2,17,42
Pompa, Ciro	28	Spanu, Vincenzo	2,17,42
Pongolini, Stefano	12,37	Stecchini, Mara	19
Porcarello, Claudia	21	Stefanelli, Maria	23
Prenna, Manuela	33	Stella, Simone	3,13,35
Proietti, Alessandro	34	Suelzu, Maria Caterina	1
Proroga, Yolande T.R.	1,43	Summa, Simona	24,25
Pucci, Eleonora	43		
Putzolu, Miriam	15	Tancredi, Celeste	28
		Tarallo, Marina	28
Rabini, Michela	9,39	Taticchi, Agnese	18
Ramini, Mattia	43	Tedde, Francesco	2
Ranucci, David	14,32	Tedde, Giuseppe	26
Ratti, Sabrina	27	Tedde, Tiziana	11
Ravagnolo, Liliana	20	Tirloni, Erica	3,35
Razzini, Katia	27	Tomaiuolo, Michele	33
Repossi, Adele	39	Tomassetti, Francesco	38
Ricchi, Matteo	18	Trabalza Marinucci, Massimo	14
Richelmi, Guia	6		
Romolaccio, Marzia	36	Uda, Maria Teresa	26
Roncada, Paola	41	Urbani, Stefania	32
Rosato, Guido	26		
Rossi, Chiara	4,13	Vaccaro, Gerardo	35
Rossi, Franca	15	Vallone, Lisa	35,38
Rossi, Rachele	35	Varcasia, Bianca Maria	40
Rossi, Roberto	16	Varello, Katia	30
Rugna, Gianluca	37	Vegliante, Guido	33
Russo, Antonella	24	Vella, Antonio	21,27



Vencia, Walter	18	Wang, Xiaoting	31
Venusti, Massimiliano	2		
Villani, Rosa	32	Zanardi, Emanuela	41
Virgilio, Sebastiano	11,26	Zanoni, Renato Giulio	42
Viscardi, Maurizio	11,22	Zavatta, Emanuele	10
Vismarra, Alice	12,23	Ziino, Graziella	7
Vitali, Luca Agostino	33	Zironi, Elisa	39
Vollano, Lucia	9	Zuccon, Fabio	18,39

Non-commercial use only









in collaborazione con:



Città di Sorrento

