

## Patogeni umani e prodotti ortofrutticoli: una nuova sfida

Lucia Decastelli  
Maria Lodovica Gullino

INCONTRI FITOIATRICI 2015  
Centro Congressi Torino Incontra, 17 marzo 2015



Negli ultimi 10 anni si è registrato un aumento della domanda di prodotti RTE



- ▶ Velocità di preparazione
- ▶ Apporto di vitamine e minerali
- ▶ Dieta salutare e bilanciata
- ▶ Ampia scelta nella GDO

(Baldi e Casati, 2013)

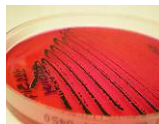
## Problema di sicurezza alimentare in molti Paesi



- Alcuni ceppi batterici sono in grado di colonizzare
- ▶ il suolo
  - ▶ fusti, foglie e frutti con meccanismi simili ai patogeni vegetali veri e propri
  - ▶ Capacità di sopravvivenza elevata
  - ▶ Passaggio nella catena alimentare
- ▶ Questi microrganismi interagiscono con
- ▶ la microflora presente
  - ▶ gli insetti
  - ▶ i patogeni vegetali

[Fletcher *et al.*, 2013]

## Microrganismi patogeni



- ▶ *Salmonella* spp.
- ▶ *Listeria monocytogenes*
- ▶ Shiga-Toxin producing *Escherichia coli* (STEC)
- ▶ *Shigella* spp.
- ▶ *Campylobacter* spp.
- ▶ *Yersinia* spp.
- ▶ *Staphylococcus aureus*

**REGOLAMENTO (CE) N. 1441/2007 DELLA COMMISSIONE**  
del 5 dicembre 2007  
che modifica il regolamento (CE) n. 2073/2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari

**Criteri di sicurezza alimentare**

1.3. Alimenti pronti che non costituiscono terreno favorevole alla crescita di <i>Listeria monocytogenes</i> , diversi da quelli destinati ai lattanti e a fini medici speciali <sup>(1), (2)</sup>	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 ufc/g	EN/ISO 11290-2 <sup>(3)</sup>
1.18. Semi germogliati (pronti al consumo) <sup>(1), (2)</sup>	<i>Salmonella</i>	5	0	Assente in 25 g	EN/ISO 6579
1.19. Frutta e ortaggi pretagliati (pronti al consumo)	<i>Salmonella</i>	5	0	Assente in 25 g	EN/ISO 6579
1.20. Succhi di frutta e di ortaggi non pastorizzati (pronti al consumo)	<i>Salmonella</i>	5	0	Assente in 25 g	EN/ISO 6579

**REGOLAMENTO (CE) N. 1441/2007 DELLA COMMISSIONE**  
del 5 dicembre 2007  
che modifica il regolamento (CE) n. 2073/2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari

**Criteri di igiene di processo**

2.5.1. Frutta e ortaggi pretagliati, (pronti al consumo)	<i>E. coli</i>	5	2	100 ufc/g	1 000 ufc/g
2.5.2. Succhi di frutta e di ortaggi non pastorizzati (pronti al consumo)	<i>E. coli</i>	5	2	100 ufc/g	1 000 ufc/g

**REGOLAMENTO DI ESECUZIONE (UE) N. 208/2013 DELLA COMMISSIONE**  
dell'11 marzo 2013  
recante le prescrizioni in materia di rintracciabilità per i germogli e i semi destinati alla produzione di germogli

- ▶ Germogli
- ▶ Semi destinati alla produzione di germogli
- ▶ Non si applica a germogli sottoposti a trattamento che elimini il rischio microbiologico
- ▶ Registrazione in tutte le fasi di produzione di
  - ▶ Descrizione accurata dei semi/germogli, peso, partita, data di spedizione, destinatario
- ▶ Spedizioni accompagnate da certificato conforme al Regolamento

**REGOLAMENTO (UE) N. 209/2013 DELLA COMMISSIONE**  
dell'11 marzo 2013  
che modifica il regolamento (CE) n. 2073/2005 per quanto riguarda i criteri microbiologici applicabili ai germogli e le norme di campionamento per le carcasce di pollame e la carne fresca di pollame

c) vengono aggiunte la seguente riga 1.29 e le corrispondenti note 22 e 23:

1.29 Germogli <sup>(1)</sup>	<i>E. coli</i> produttori di tossina Shiga (STEC) O157, O26, O111, O103, O145 e O104:H4	5	0	Assente in 25 grammi	CEN/ISO TS 13116 <sup>(2)</sup>	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
------------------------------	---	---	---	----------------------	---------------------------------	--

<sup>(1)</sup> Tenuto conto dell'aggiornamento più recente del laboratorio comunitario di riferimento per l'*Escherichia coli*, nonché per gli *E. coli* produttori di verocitotossine (VTEC), ai fini del rilevamento dello STEC O104:H4.

<sup>(2)</sup> Esclusi i germogli che hanno ricevuto un trattamento efficace teso a eliminare *Salmonella* spp e STEC.

## Dati dei controlli

- Campionamenti per analisi microbiologiche (PRISA 2014):
  - Salmonella spp., Listeria monocytogenes, VTEC

15	Frutta e ortaggi pretagliati pronti al consumo (IV gamma), semi germogliati pronti al consumo	Frutta e ortaggi pretagliati pronti al consumo (IV gamma)	60
		Frutti di bosco	20
		Semi germogliati pronti al consumo	20

- Analisi eseguite PRISA 2014

- IV gamma

Analisi	Totali	Positivi
Salmonella	65	0
Listeria	131	0
VTEC	40	1

- Semi e spezie

Analisi	Totali	Positivi
Salmonella	15	1
Listeria	90	0

## Numerose segnalazioni di infezioni enteriche causate da enterobatteri in vegetali a foglia e altri ortofrutticoli



Cause di diffusione di prodotti freschi contaminati

- Crescente consumo di ortaggi a foglia e prodotti di IV gamma
- Aumento dell'import/export
- Presenza sui nostri mercati di prodotti importati da Paesi Terzi
- Conservazione per lunghi periodi prima della commercializzazione



## Dati EFSA 2014 - Italy 2012

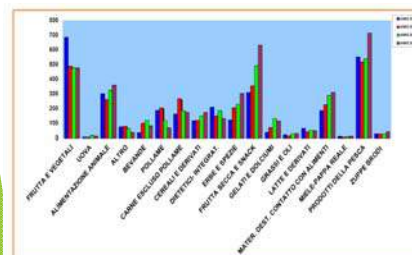
prodotti ortofrutticoli destinati al consumo umano



- 4,1% *E. coli* patogeni
- 1,2 *Listeria monocytogenes*
- 0,6 *Salmonella* spp.



## Orticole da foglia e prodotti ortofrutticoli: oggetto di notifica



► *Salmonella* spp. :

- 61% del totale delle notifiche per microrganismi patogeni
- 8% delle notifiche in frutta e vegetali

► Negli ultimi anni: *Salmonella* Napoli in rucola prodotta in Campania

- regione ad alta produzione e trasformazione
- *Salmonella* Napoli: dati di isolamento in Piemonte nel 2014
  - 11(2%) isolate da uomo in Piemonte; 4 (4%) da ambiente
  - 8 (5%) da animali: 88% cinghiale, 12% daino

► *E. coli*:

- 26% del totale delle notifiche per microrganismi patogeni; 5% in frutta e vegetali

► *Listeria monocytogenes*:

- 21% del totale delle notifiche per microrganismi patogeni; 5% in frutta e vegetali


*Ministero della Salute*  
 RELAZIONE SUL  
 SISTEMA DI ALLERTA EUROPEO  
**ANNO 2014**

### Quali sono le fonti di contaminazione?



- carenze igieniche nelle pratiche colturali o nelle operazioni di raccolta e lavorazione
- utilizzo di ammendanti (letame)
- utilizzo di acque di scolo contaminate per l'irrigazione di colture in pieno campo

### Colonizzazione dell'ospite da parte dei patogeni umani



- Tecniche di concimazione:  
Batteri enterici patogeni colonizzano l'intestino degli animali zootecnici in assenza di sintomi
- Tecniche di irrigazione  
Prelievo di acqua in prossimità di allevamenti o pascoli = contaminazione da residui animali, liquami e reflui zootecnici

[Solomon *et al.*, 2002]

### Utilizzo di acqua e letame contaminati da *E. coli* O157:H7 consentono



- Il raggiungimento dei tessuti della coltura (lattuga) attraverso l'apparato radicale
- La sopravvivenza
  - nel terreno per 154-196 giorni
  - in cipolle dopo 74 giorni
  - In carote dopo 168 giorni

[Islam *et al.*, 2005]


**OBIETTIVO RICERCA:** valutare la presenza (effettiva e/o sospetta) di *E. coli* STEC in

- feci di bovini
- campioni di terreno e campioni di vegetali di suoli concimati



di **96 allevamenti di bovini**, con l'obiettivo di capire se i patogeni siano in grado di trasferirsi dalle feci e di contaminare il terreno e i vegetali.

Per ciascun campione di terreno da orti familiari e campi è stata ricercata la presenza dei **geni responsabili della virulenza** di *E. coli* STEC (*stx1*, *stx2*, *eae*) tramite Real-Time PCR.

I campioni risultati positivi alla presenza dei geni *stx1* ed *stx2*, sono stati sottoposti ad un'ulteriore RT-PCR per analizzare i **sierotipi** di *E. coli* STEC presenti (**O 26, O 103, O 111, O 145, O 157**).



- **CAMPIONI ANALIZZATI: 70**
- **CAMPIONI POSITIVI ai geni di virulenza: 25 (35,71%)**
  - Gene *stx1* ritrovato in 16 campioni (22,9%)
  - Gene *stx2* ritrovato in 16 campioni (22,9%)
  - Gene *eae* ritrovato in 18 campioni (25,7%)
- **Sierotipi ritrovati:**
  - O 26:** in 10 campioni
  - O 103:** in 6 campioni
  - O 111:** in 10 campioni
  - O 145:** in 10 campioni
  - O 157:** in 18 campioni

**Elevata tolleranza ai disinfettanti normalmente utilizzati nelle procedure industriali di lavaggio dei vegetali consumati freschi**



- ▶ Composti ossidativi
- ▶ Ipoclorito di sodio
- ▶ Perossido di idrogeno

[Back *et al.*, 2014]

**Inibizione della formazione di biofilm attraverso:**

- ▶ Inibitori del *quorum sensing*
- ▶ Sostanze che bloccano la sintesi delle componenti del biofilm (es. cellulosa)
- ▶ Oli essenziali (eucalipto, timo)
- ▶ Competizione con batteri probiotici




**Livello di *E. coli* nel letame influenzato da svariati fattori**



- ▶ Utilizzo di insilati nell'alimentazione aumenta la sopravvivenza di *E. coli* O157:H7 nel letame rispetto al fieno

[Franz *et al.*, 2005]

**L'applicazione di corrette procedure di maturazione del letame è in grado di abbattere la carica batterica originale**



### La tecnica di irrigazione utilizzata incide sulla contaminazione



- ▶ L'irrigazione per scorrimento favorisce la diffusione de batteri rispetto all'irrigazione a goccia

### In seguito alla contaminazione della pianta, i batteri si diffondono e raggiungono le parti edibili

- ▶ Il grado di contaminazione dipende dalla posizione della pianta: Dopo contaminazione sperimentale con *Salmonella* spp., lattuga e prezzemolo mostrano concentrazioni maggiori rispetto al pomodoro

[Melloul *et al.*, 2001]



### La contaminazione della pianta da parte dei patogeni umani riguarda

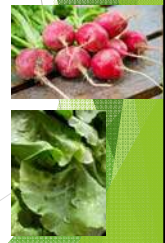
- ▶ Superficie
- ▶ Tessuti interni
- ▶ Foglie, apparato radicale, fiore e seme
- ▶ *E. coli* O157:H7 capace di contaminare il seme in seguito a contaminazione iniziale del fiore e del falso frutto [Burnett *et al.*, 2000]
- ▶ Contaminazione del seme
  - ▶ Sopravvivenza della specie batterica
  - ▶ Trasmissione del patogeno nella nuova generazione (germogli)



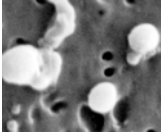
### La colonizzazione della pianta da parte dei patogeni prevede delle fasi che portano ad una permanenza duratura

[Gullino *et al.*, 2012]

- ▶ Ingresso di *E. coli* attraverso le radici  
ravanello, carota, radicchio [Itoh *et al.*, 1998; Auty *et al.*, 2005]
- ▶ *E. coli* O157:H7 e *Salmonella* spp. colonizzano le estremità o la base delle radici
  - ▶ secrezione di aminoacidi e zuccheri in prossimità delle ramificazioni radicali [Jaeger *et al.*, 1999]
- ▶ Formazione di colonie di *E. coli* O157:H7 nell'apoplasto, nelle cellule epidermiche e corticali in spinacio e lattuga [Wright *et al.*, 2013]
- ▶ *E. coli* O157:H7 colonizza le lenticelle della mela fino a 40 µm [Burnett *et al.*, 2000]



### Capacità di entrare in quiescenza (VBNC = *viable but non-culturable state*)



- ▶ nelle fasi di preparazione, conservazione e trasporto dei prodotti freschi destinati al consumo, aumenta il rischio di infezione
- ▶ metodi molecolari disponibili per rilevare VBNC
- ▶ necessarie nuove linee di ricerca

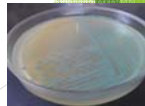
### La gestione delle colture ortofrutticole oggi deve considerare

- ▶ il rischio di contaminazione da parte di patogeni umani
- ▶ la loro possibile presenza all'interno dei prodotti
- ▶ che gli attuali trattamenti di inattivazione e di lavaggio dei prodotti riducono le sole contaminazioni esterne
- ▶ che l'adozione di buone pratiche agricole consente di evitare la contaminazione dei frutti  
es. pomodori in coltura idroponica [Lopez-Galvez *et al.*, 2014]



### L'applicazione rigorosa di GAP e GMP permette di ottenere RTE con migliore qualità microbiologica

- ▶ Prevalenze in I gamma
  - ▶ 0,75% *Salmonella* spp.
  - ▶ 1,61% *Listeria monocytogenes*
- ▶ 0,29% *Listeria monocytogenes* sul prodotto RTE
- ▶ Isolamento culturale in microbiologia tradizionale:  
1 solo campione positivo per *Salmonella* spp.



[De Giusti *et al.*, 2010]

### La ricerca deve considerare

- ▶ L'efficacia dei mezzi di difesa utilizzati contro i funghi e i batteri fitopatogeni, anche nei confronti dei batteri patogeni per l'uomo
- ▶ La selezione di microrganismi in grado di contrastare lo sviluppo dei patogeni umani
  - ▶ Attività antagonistica di lattobacilli verso *Campylobacter* [Wang *et al.*, 2014]
  - ▶ lotta biologica in fase sperimentale, può essere utilizzata da sola o in combinazione con altri mezzi solo se metodi registrati [Hudson *et al.*, 2009]

