

I principali pericoli sanitari legati al consumo dei prodotti ittici

LEZIONE N. 2

Giuseppe Arcangeli
Ferrara 29 ottobre 2009



Processed seafood

Listeria monocytogenes (1)

Caratteristiche generali

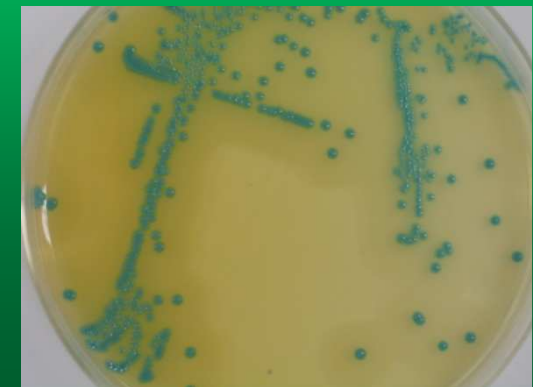
- Gram positivo, ambientale
- Fam. Listeriaceae
- Psicrotrofo, alotollerante, termodurico (72°C x 15")
- Possibili forme VNC
- Sensibile a competizione microbica
- Formazione biofilm
- Possibilità antibiotico-resistenza



***Listeria monocytogenes* (2)**

La malattia nell'uomo

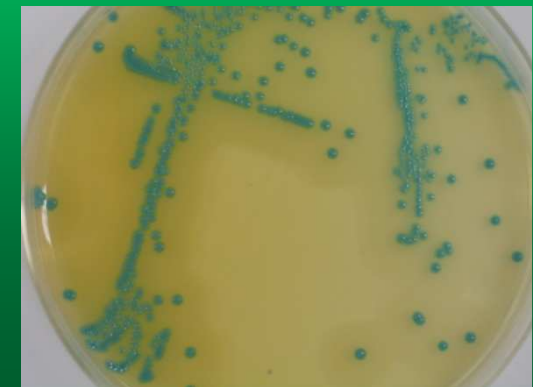
- **Specie più patogena: monocytogenes**
- **Altre specie: Ivanovii, seeligeri**
- **13 sierotipi, 1 e 4 più frequenti**
- **Malattia di origine alimentare in EU (95%)**
- **Più frequente in: formaggi pasta molle, patè, pesce affumicato, vegetali**



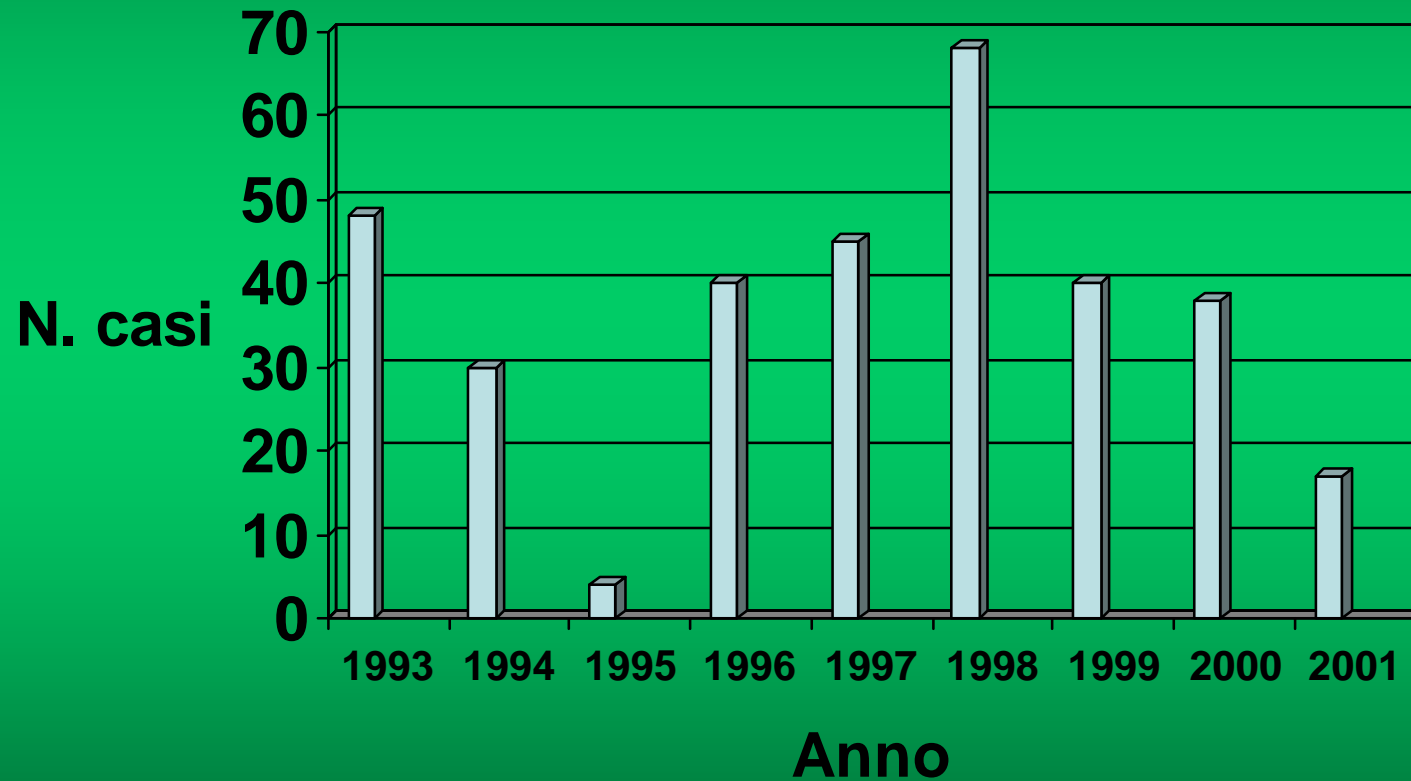
Listeria monocytogenes (2)

La malattia nell'uomo

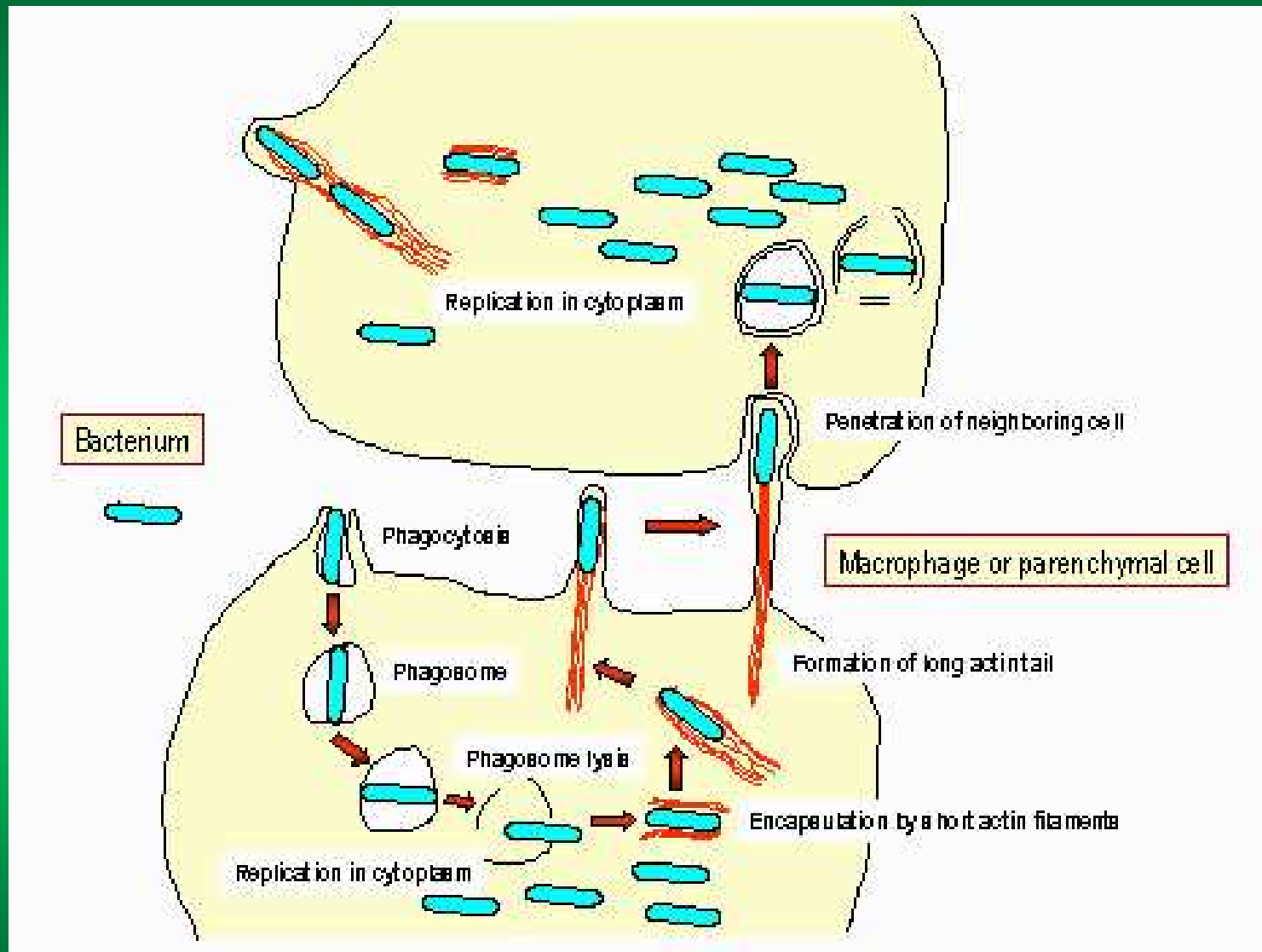
- Immunodepressi: meningite, setticemia, endocardite, polmonite, artrite, epatite, osteomielite, inf. cutanee
- Immunocompetenti: sintomi simil-inflenzali, sintomi enterici
- Solo con elevate dosi infettanti
- Gestanti: aborto
- Elevata letalità (immunodepressi)
- Dose infettante : > 1.000



Notifiche di Listeriosi in Italia



(Rondanelli *et al.*, 2005)



By T. Kenneth, 2003

INTOSSICAZIONE

ALIMENTO CONTAMINATO



MOLTIPLICAZIONE BATTERICA CON PRODUZIONE DI TOSSINA
PRIMA DI CONSUMARE L'ALIMENTO



INGESTIONE DI TOSSINA E BATTERI



SINDROME TOSSICA DA TOSSINA PREFORMATA
E DA TOSSINA FORMATASI IN VIVO PER INGESTIONE
E MOLTIPLICAZIONE BATTERICA



TOSSINFEZIONE ALIMENTARE

TOSSINA DI BACILLUS CEREUS
TOSSINA DI CL. PERFRINGENS



INGESTIONE DI TOSSINA



SINDROME TOSSICA DA TOSSINA PREFORMATA



INTOSSICAZIONE ALIMENTARE

ESOTOSSINA BOTULINICA
ENTEROTOSSINA STAFILOCOCCICA

INFEZIONE

ALIMENTO CONTAMINATO (VEICOLO D'INFEZIONE)



INFEZIONE INTESTINALE
(PER ALCUNI GERMI NECESSARIA DOSE INFETTANTE MINIMA)



INFEZIONE ENTEROINVASIVA

SALMONELLA
SHIGELLA
CAMPYLOBACTER
YERSINIA ENTEROCOLITICA
E.COLI ENTEROINVASIVI (EIEC)
LISTERIA MONOCYTOGENES



INFEZIONE ENTEROTOSSICA

COLERA
E.COLI ENTEROTOSSICI (ETEC)
V. PARAHAEMOLYTICUS

Fino al 2005, in prodotti RTE...*LISTERIA MONOCYTOGENES* **ASSENTE IN 25 !!**



Listeria monocytogenes

.....stabilita la dose massima!

Reg. 2073/2005, *consideranda*

10)obiettivo una concentrazione di L.m. negli alimenti inferiore a 100 ufc/g



Categoria alimentare	Microrganismi	Piano camp.		Limiti		Metodo di analisi di riferimento	Fase a cui si applica il criterio
		n	c	m	M		
1.1 Alimenti pronti per lattanti e alimenti pronti a fini medici speciali (4)	<i>Listeria monocytogenes</i>	10	0	Absence in 25 g		EN/ISO 11290-1	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
1.2 Alimenti pronti che costituiscono terreno favorevole alla crescita di L.m., divisi da quelli destinati ai lattanti e a fini speciali	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 cfu/g (5)		EN/ISO 11290-2	idem
		5	0	Absence in 25 g (7)		EN/ISO 11290-1	Prima che gli alimenti non siano più sotto il controllo diretto dell'operatore del settore alimentare che li produce
1.3 Alimenti pronti che non costituiscono terreno favorevole alla crescita di L.m., divisi da quelli destinati ai lattanti e a fini speciali (4,8)	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 cfu/g(8)		EN/ISO 11290-27	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità


4) Privo di utilità per alimenti che sono stati sottoposti a trattamento termico o ad altra trasformazione avente come effetto l'eliminazione di L.m., quando non è possibile una ricontaminazione dopo tali trattamenti (ad esempio, i prodotti al momento del confezionamento) (es. **Insalate di mare pastorizzate o sottoposte ad alte pressioni**) e nei **bivalvi vivi**

5) Questo criterio si applica se il produttore è in grado di dimostrare, con soddisfazione dell'autorità competente, che il prodotto non supererà il limite di 100 ufc/g durante il periodo di conservabilità. L'operatore può fissare durante il processo limiti intermedi sufficientemente bassi da garantire che il limite di 100 ufc/g non sia superato al termine del periodo di conservabilità. (es. **Salmone affumicato, carpacci pH > 4,4, caviale non pastorizzato, ...**)

7) Questo criterio si applica ai prodotti prima che non siano più sotto il controllo diretto dell'operatore del settore alimentare che li produce, se questi **non è in grado di dimostrarre**, con soddisfazione dell'autorità competente, che il prodotto non supererà il limite di 100 ufc/g durante il periodo di conservabilità

8) I prodotti con $pH \leq 4,4$ o $aw \leq 0,92$ (es. **pesce azzurro e insalate di mare marinate**), I prodotti con $pH \leq 5,0$ e $aw \leq 0,94$, I prodotti con un periodo di conservabilità inferiore a 5 giorni (**carpacci di tonno, ecc.**) sono automaticamente considerati appartenenti a questa categoria. Anche altri prodotti possono appartenere a questa categoria, purché vi sia una giustificazione scientifica

O.M. 7 dicembre 1993 (*Listeria monocytogenes*).....alimenti per loro natura destinati ad essere consumati previa cottura o che rechino sulla confezione la dicitura “da consumarsi previa cottura”.



CRUDI	3	110 colonie/g in 2 u.c. 11 colonie/g in 1 u.c.
CONGELATI o SURGELATI	5	110 colonie/g in 3 u.c. 11 colonie/g in 2 u.c.
PRECOTTI o PASTORIZZATI (bastoncini pesce)	5	110 colonie/g in 1 u.c. 11 colonie/g in 4u.c.

Semiconserve ittiche e *Clostridium botulinum*



	Proteolytic <i>C. botulinum</i> (mesophile)	Non-proteolytic <i>C. botulinum</i> (psychrotroph)
neurotoxins formed	A, B, F	B, E, F
minimum growth pH	4.6	5.0
minimum growth temperature	10-12°C	3.0°C
maximum growth NaCl	10%	5%
spore heat resistance ($D_{100^{\circ}\text{C}}$)	>15 min	<0.1 min

- (1) storage at $<3.0^{\circ}\text{C}^*$
- (2) storage at $\leq 10^{\circ}\text{C}$ and a shelf-life of ≤ 10 days (the "10 day rule")
- (3) A heat treatment of 90°C for 10 min or equivalent lethality (e.g. 80°C for 129 min, 85°C for 36 min) combined with storage at chill temperature (designed to give a 6D process for non-proteolytic *C. botulinum*)** .
- (4) A $\leq \text{pH } 5.0$ throughout the food, combined with storage at chilled temperature
- (5) A salt concentration $\geq 3.5\%$ throughout the food, combined with storage at chilled temperature
- (6) An $\leq a_w 0.97$ throughout the food, combined with storage at chilled temperature
- (7) Combinations of heat treatment and other preservative factors which can be shown consistently to prevent growth and toxin production by *C. botulinum*, combined with storage at chilled temperature

Notes:

* originally 3.3°C , but growth has now been demonstrated at 3.0°C

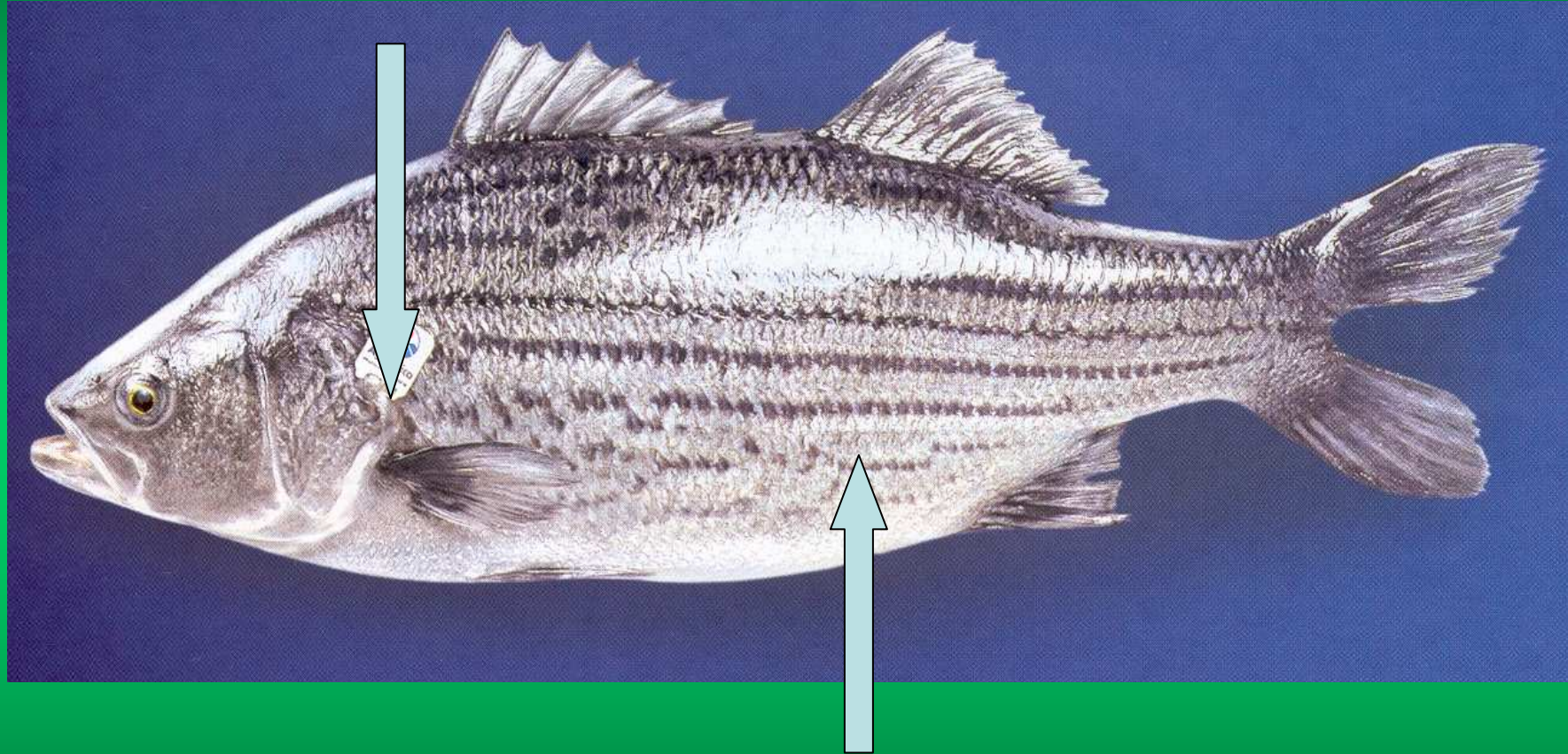
** chill temperature is specified as 8°C in England, Wales and Northern Ireland. In Scotland the requirement is to keep chilled food in "a refrigerator, or refrigerating chamber, or a cool ventilated place".

Peck et al., 2006,
su dati ACMSF (Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food) - UK

Il prodotto preparato: shelf - life



Branchie e cute: Gram negativi



Intestino: Gram positivi e lieviti

Pesci acqua salata: Pseudomonas, Moraxella, Acinetobacter, Shewanella, Aeromonas, Flavobacterium, vibrio e Photobacterium, bacillus, lactobacillus, Clostridium, Micrococcus, coryneformi



Pesci acqua dolce: prevalgono Pseudomonas, Aeromonas, Moraxella



Pesci acque dolci tropicali: prevalgono enterobatteri e Gram positivi

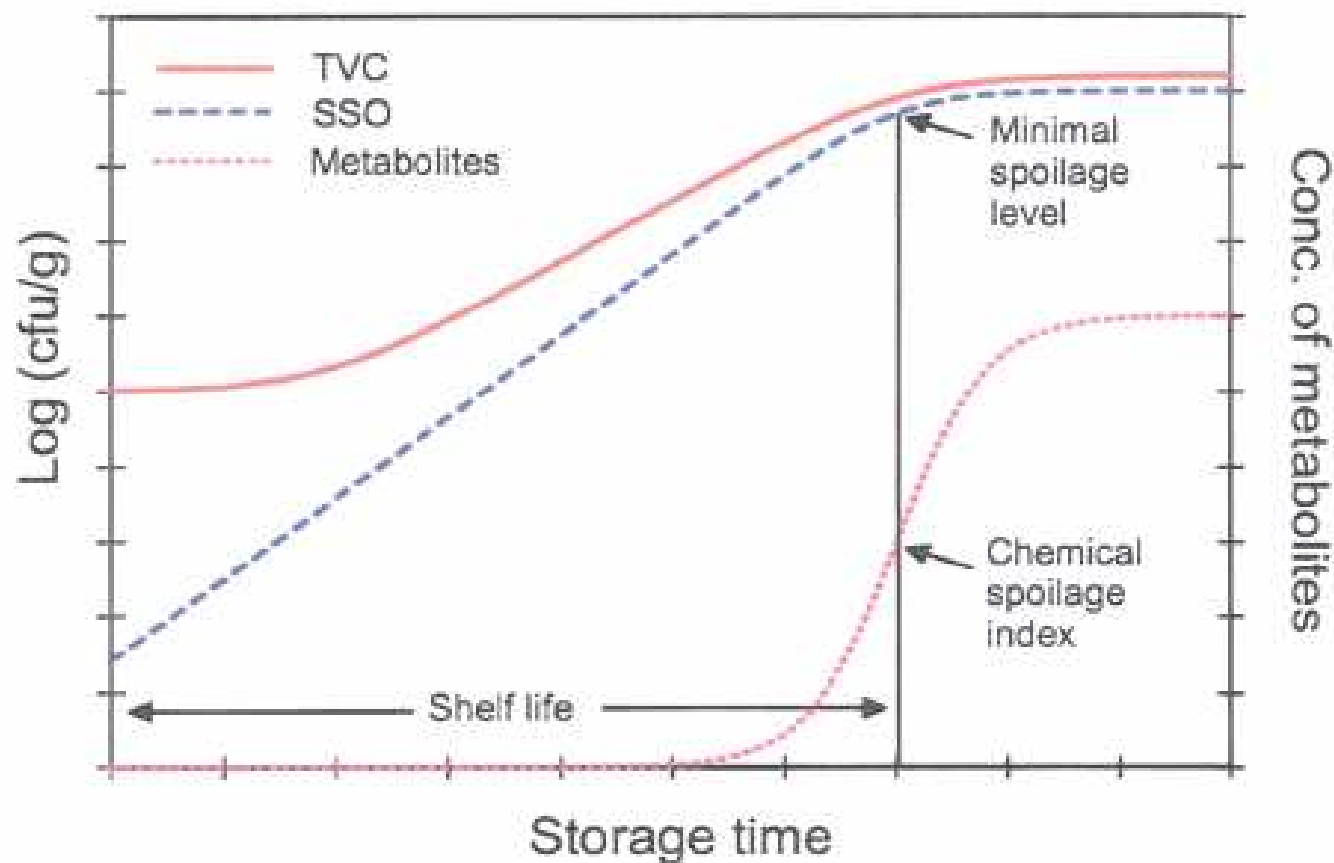


La carica batterica totale non è indicativa per valutare la freschezza del prodotto ittico.

La carica può essere elevata anche in prodotti freschissimi.

E' consigliabile cercare gruppi batterici più specifici:
batteri produttori di H_2S ,
proteolitici,
TMA riduttori, ecc

Specific spoilage organisms (SSO) and indices of quality/spoilage



SSO (Specific Spoilage Organisms)

Pseudomonas

Shewanella putrefaciens

Photobacterium phosphoreum

Pesci acqua dolce

Pseudomonas

aerobio, acqua dolce e salata

TMAO > TMA

Produce idrogeno solforato

Da aminoacidi: aldeidi, chetoni, esteri etilici volatili

Da nucleotidi: Ipoxantina

Pesci acqua salata

Shewanella putrefaciens

Alterante diffuso in alimenti ittici, in particolare in acque temperate e conservati in ghiaccio.

Anaerobio parziale.

Produce idrogeno solforato

Produce ipoxantina da nucleotidi (inosina, IMP)

Utilizza come fonte di carbonio: glucosio, piruvato, lattato, propionato, acetato, etanolo e numerosi aminoacidi.

In particolare il substrato Lattato è il H-donatore che provoca la riduzione di TMAO (cariche di *S. putrefaciens* 10^9)

A fine reazione, quando tutto il TMAO è ridotto, rimane l'acetato come catabolita finale. Il TMAO non è quindi utilizzato come nutriente ma come accettore di elettroni.

Il substrato si sposta così verso l'anaerobiosi.

Sostanze volatili organiche solforate prodotte in carne di pesce da *Shewanella putrefaciens*

Metantiolo

Dimetildisolfuro

Metilpropildisolfuro

Dimetildisolfuro

Metiltioacetato

Bis-metiltiometano

(Cantoni e coll., Ing. Alim. 3/2007)

Pesci acqua salata

Photobacterium phosphoreum (luminescente)

Anaerobio parziale: fino a 60% di CO₂

Tipico in prodotti in atmosfera protettiva

Non produce H₂S

Cresce a partire da 0 °C

E' sensibile al calore (inattivato a 30 -35 °C) ed al congelamento (inattivato a -10 °C)

ed è strettamente alofilo (terreni con 2% sale) per cui non è presente in acque dolci.

Nell'intestino di pesci marini cariche fino a 10⁶

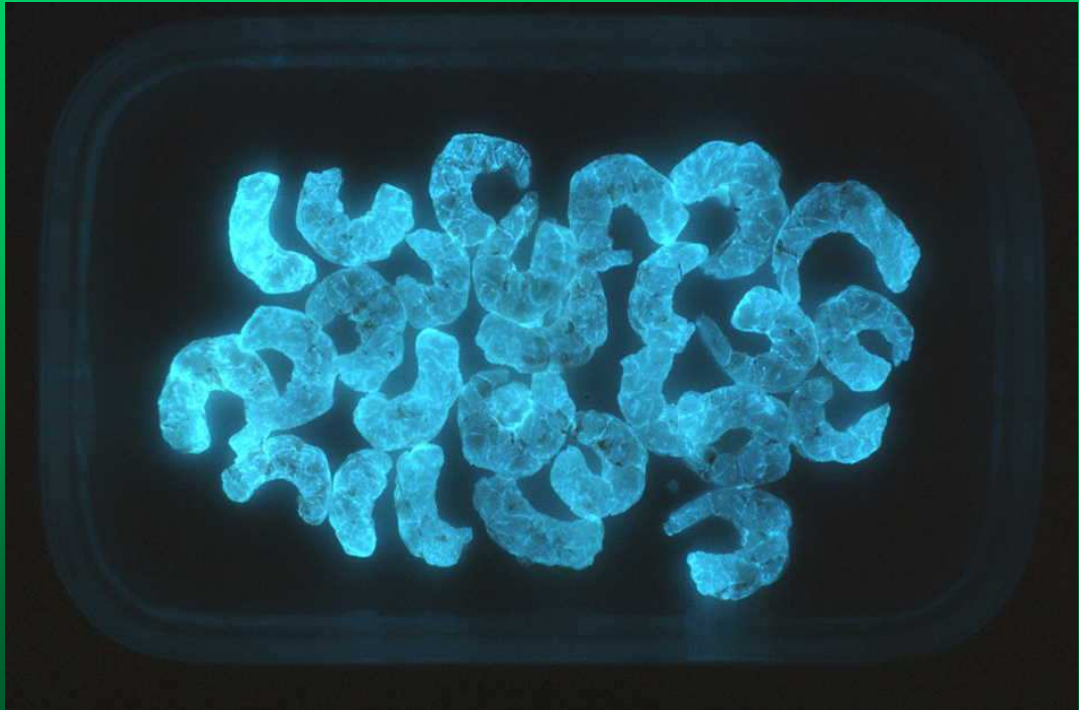
Produce ipoxantina da nucleotidi (inosina, IMP)

Produce TMA 100 volte di più di *S. putrefaciens* e con cariche minori (10⁷),

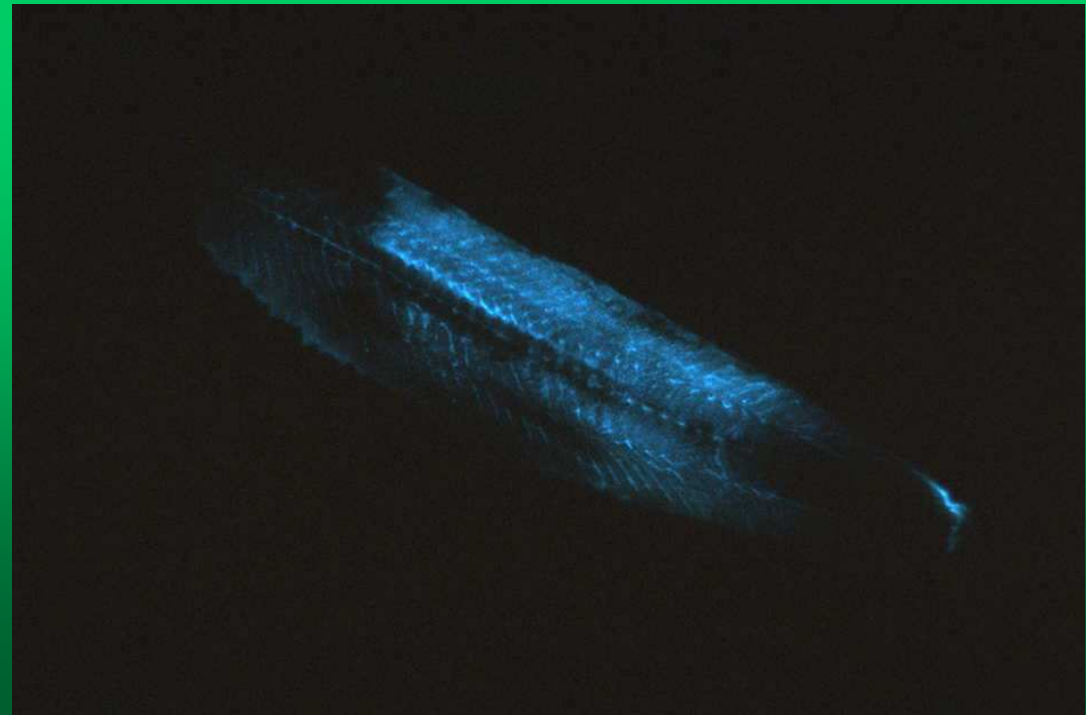
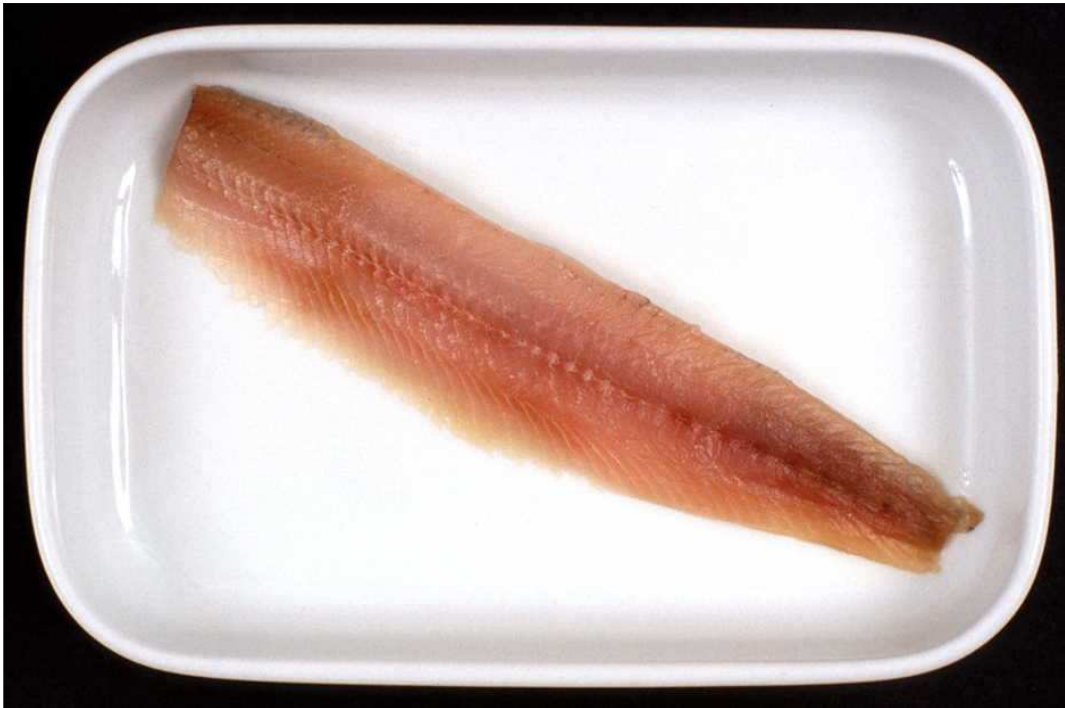
Vibrio logei è anch'esso luminescente

L' FMNH₂ (flavin mononucleotide) viene ridotto ad opera del NADH che è il donatore primario di elettroni che fluiscono attraverso la luciferasi.
L' FMN ora ridotto reagisce in presenza dell'aldeide a catena lunga e in presenza di ossigeno molecolare.





Courtesy Dr. Dalgaard – DTU - Denmark



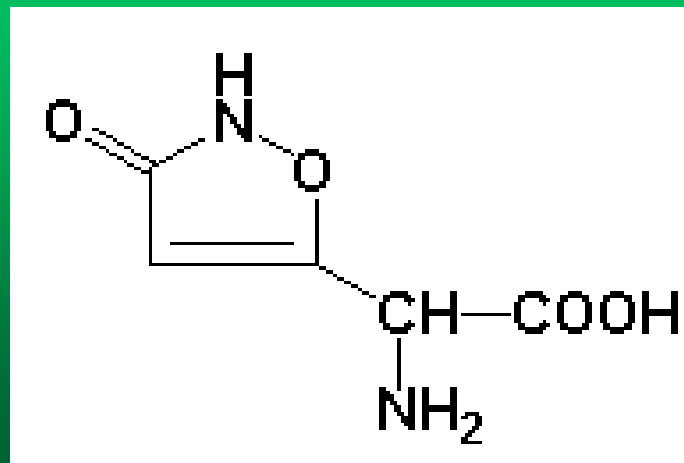
Courtesy dr. Dalgaard – DTU - Denmark

Histamine poisoning (also called *Scombroid poisoning*)

Scombroid poisoning is caused by the ingestion of foods that contain high levels of histamine and possibly other vasoactive amines and compounds.

Histamine and other amines are formed by the growth of certain bacteria and the subsequent action of their decarboxylase enzymes on histidine and other amino acids in food, either during the production of a product such as Swiss cheese or by spoilage of foods such as fishery products, particularly tuna.

However, any food that contains the appropriate amino acids and is subjected to certain bacterial contamination and growth may lead to scombroid poisoning when ingested.



BIOGENIC AMINES: SOURCES

Istidina	→	Istamina
Ornitina	→	Putrescina
Lisina	→	Cadaverina
Tirosina	→	Tiramina
Triptamina	→	Triptofano
Fenilalanina	→	β -feniletilamina

HISTAMINE BACTERIA PRODUCERS

Morganella spp.,
Proteus morganii,
Proteus spp.,
Hafnia alvei,
Klebsiella spp.
Pseudomonas spp. ,
Vibrio spp.,
Photobacterium phosphoreum

Histamine

**Scombridae, Clupeidae, Engraulidae
Coryphenidae, Pomatomidae e Scomberesocidae**



Thunnus thynnus



Scomber scombrus



Sardina pilchardus



Clupea harengus



Engraulis encrasicolus



Coryphaena hippurus



Pomatomus saltator



Scomberesox saurus

Food category	Micro-organisms, toxins or metabolites	Sampling - plan		Limits		Analytical reference method	Stage where the criterion applies
		n	c	m	M		
Fishery products from fish species associated with a high amount of histidine	<i>Histamine</i>	9	2	100-200 ppm		HPLC	Products placed on the market during their shelf-life
Fishery products which have undergone enzyme maturation treatment in brine, manufactured from fish species associated with a high amount of histidine	<i>Histamine</i>	9	2	200-400 ppm		HPLC	Products placed on the market during their shelf-life

L'indice chimico denominato B.A.I. (Biogenic Amines Index) è basato sul rapporto tra la somma delle ammine biologicamente attive (istamina, putrescina, cadaverina) e quelle di provenienza fisiologica (spermidina e spermina), implicate quasi esclusivamente nel metabolismo di accrescimento cellulare endogeno.

E' positivamente correlato con lo stato di conservazione del pesce

$$\text{Indice B.A.I.} = \frac{\sum (\text{istamina} + \text{putrescina} + \text{cadaverina}) \text{ ppm}}{1 + \sum (\text{spermidina} + \text{spermina}) \text{ ppm}}$$

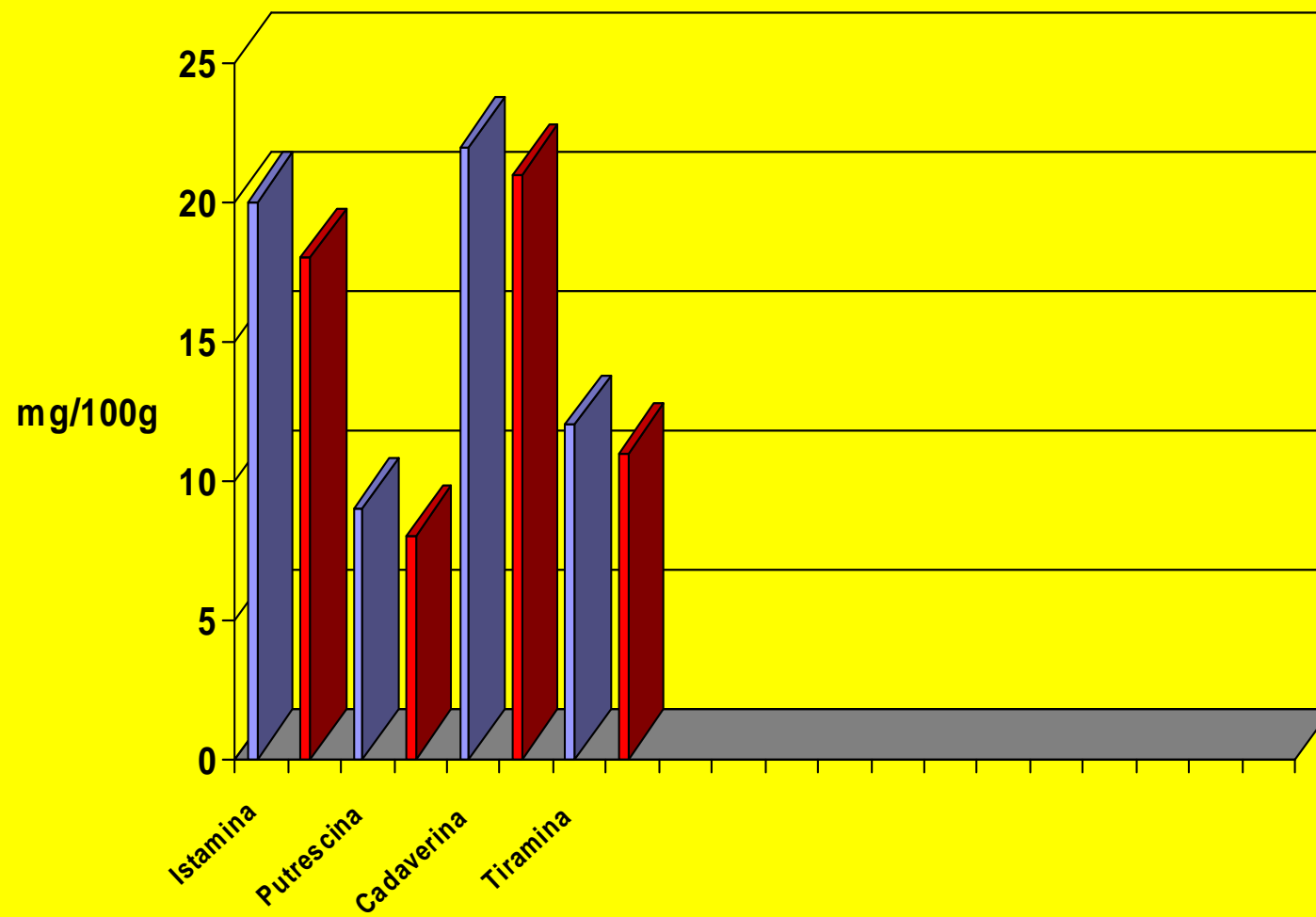
Valutazione dell'indice B.A.I.

< 1 = prodotto di prima qualità

$1 < 10$ = prodotto in stato di alterazione

> 10 = prodotto deteriorato

Biogenic amine concentration in canned mackerel before and after sterilization



**An outbreak after cooked tuna consumption
with 2563 ppm histamine level**



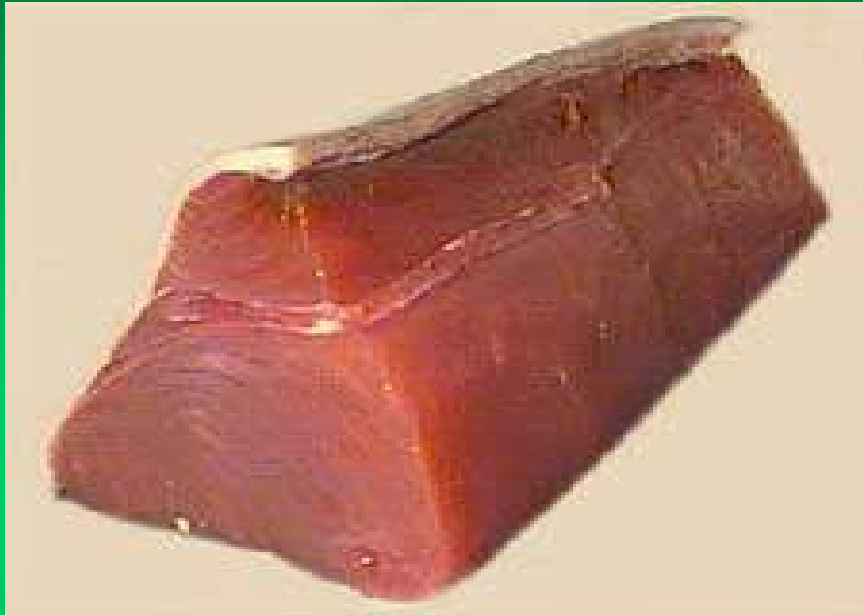
FIRST AID : performance

Clinical pattern: skin erythema,
laboured breathing

Performance: thorax X-ray: neg.,
cortisonic therapy (Bentelan flebo,
Flebocortid e adrenalina e.v.)

Diagnosis: toxic reaction after tuna ingestion

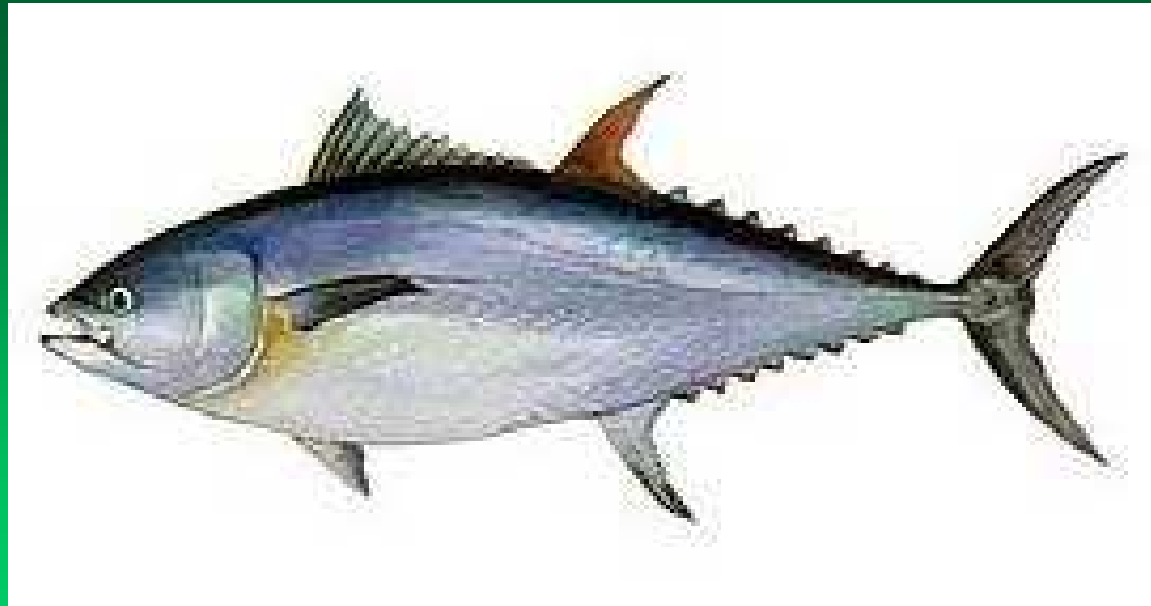
Leave: discharge paper, after 6 hours



← normal

CO added →





BLUEFIN – (*Thunnus thynnus*)



ALBACORE - CHICKEN OF THE SEA (Thunnus alalunga)

ANISAKIDAE



DATE	NOTIFIED BY	REF.	REASON FOR NOTIFYING	NOTIFICATION BASIS	STATUS
26/05/2008	Slovenia	2008.0608	Salmonella enterica (presence /25g) in live edible snails (Helix pomatia) from Croatia	border control - screening sample	distribution on the market (possible) / informing recipients
26/05/2008	Germany	2008.0610	verotoxin producing Escherichia coli in cut silver lime flowers (Tilia tomentosa) for tea-making manufactured in Germany, raw material from Bulgaria	official control on the market	distribution on the market (possible) / informing recipients
27/05/2008	Germany	2008.0613	verotoxin producing Escherichia coli (< 100 CFU/g) in lime blossom tea from Turkey	official control on the market	distribution on the market (possible) / product (to be) destroyed
28/05/2008	Italy	2008.0621	parasitic infestation with Anisakis of fresh Atlantic cod (Gadus morhua) fillets from Denmark	official control on the market	distribution on the market (possible)
29/05/2008	Italy	2008.0626	mercury (1.7 mg/kg - ppm) in frozen sliced swordfish (Xiphias gladius) from Spain	official control on the market	distribution on the market (possible) / product (to be) seized



Reg. 853/ 2004, Sez. VIII, cap. III

D. REQUISITI RELATIVI AI PARASSITI

1. I prodotti ittici di seguito precisati devono essere congelati a una temperatura non superiore a -20°C in ogni parte della massa per almeno 24 ore; il trattamento dev'essere eseguito sul prodotto crudo o sul prodotto finito:
 - a) i prodotti della pesca che vanno consumati crudi o praticamente crudi;
 - b) i prodotti della pesca a base delle specie seguenti, se devono essere sottoposti ad un trattamento di affumicatura a freddo durante il quale la temperatura all'interno del prodotto non supera i 60°C :
 - i) aringhe,
 - ii) sgombri,
 - iii) spratti,
 - iv) salmone (selvatico) dell'Atlantico e del Pacifico;

- c) prodotti della pesca marinati e/o salati se il trattamento praticato non garantisce la distruzione delle larve di nematodi.
2. Gli operatori del settore alimentare non sono obbligati a praticare i trattamenti di cui al paragrafo 1 qualora:
- a) i dati epidemiologici disponibili indichino che le zone di pesca d'origine non presentano rischi sanitari con riguardo alla presenza di parassiti;
 - b) le autorità competenti lo autorizzino.
3. I prodotti della pesca di cui al paragrafo 1 devono essere accompagnati, alla loro immissione sul mercato, da un'attestazione del produttore che indichi il trattamento al quale sono stati sottoposti, salvo qualora siano forniti al consumatore finale.

REGOLAMENTO (CE) N. 2074/2005 DELLA COMMISSIONE del 5 dicembre 2005

recante modalità di attuazione relative a taluni prodotti di cui al regolamento (CE) n. 853/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio e all'organizzazione di controlli ufficiali a norma dei regolamenti del Parlamento europeo e del Consiglio (CE) n. 854/2004 e (CE) n. 882/2004, deroga al regolamento (CE) n. 852/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio e modifica dei regolamenti (CE) n. 853/2004 e (CE) n. 854/2004

...allegato II, capitolo II.....prodotti della pesca

CONTROLLO VISIVO

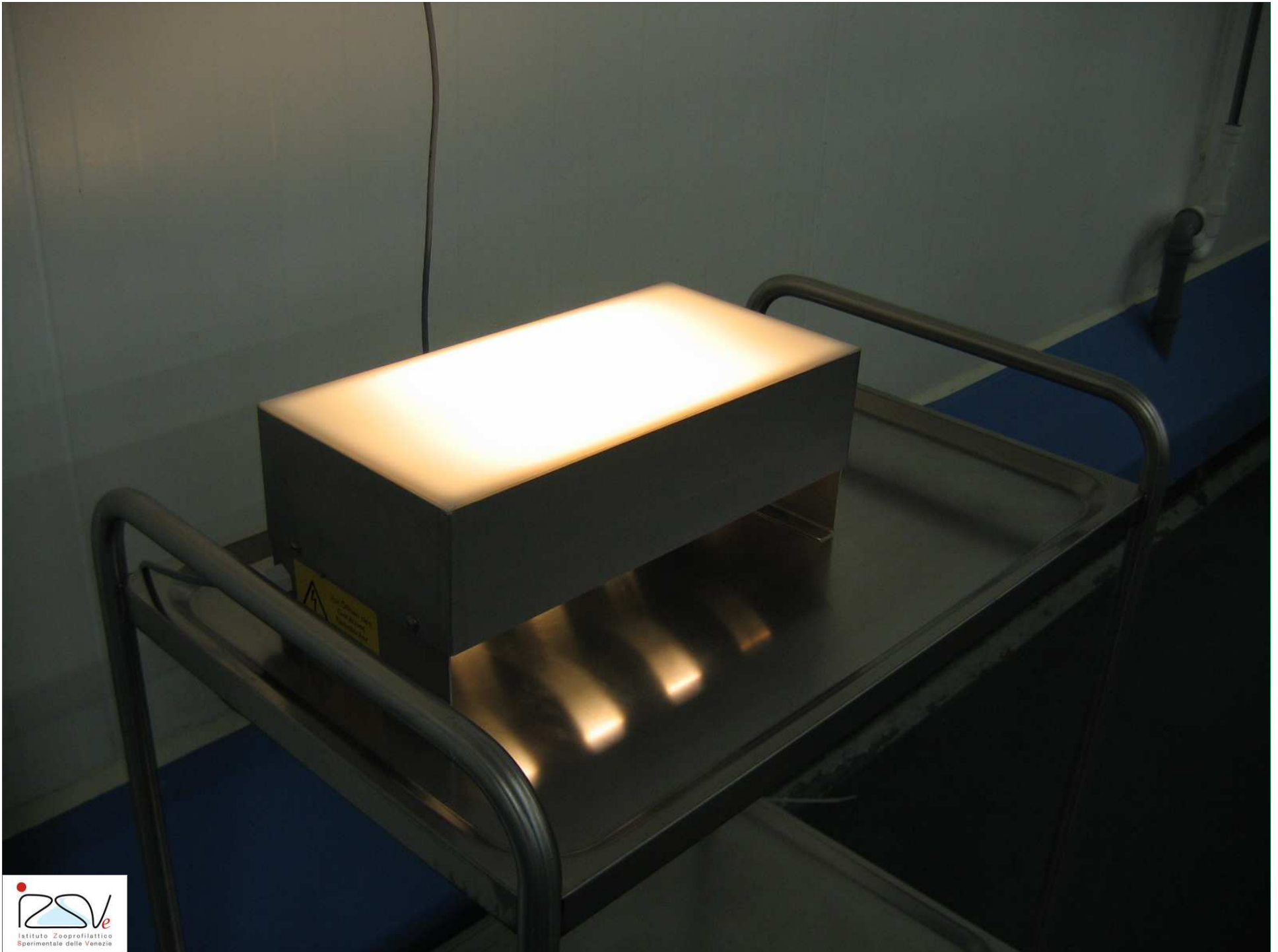
1. Il controllo visivo è effettuato su **un numero rappresentativo di campioni**. I responsabili degli stabilimenti a terra e le persone qualificate a bordo delle navi officina determinano, in funzione della **natura** dei prodotti della pesca, della loro **origine geografica** e del loro **impiego**, l'entità e la frequenza dei controlli. Durante la produzione, il controllo visivo del pesce eviscerato dev'essere effettuato da **persone qualificate** sulla cavità addominale, i fegati e le gonadi destinati al consumo umano. A seconda del metodo di eviscerazione utilizzato, **il controllo visivo deve essere eseguito:**

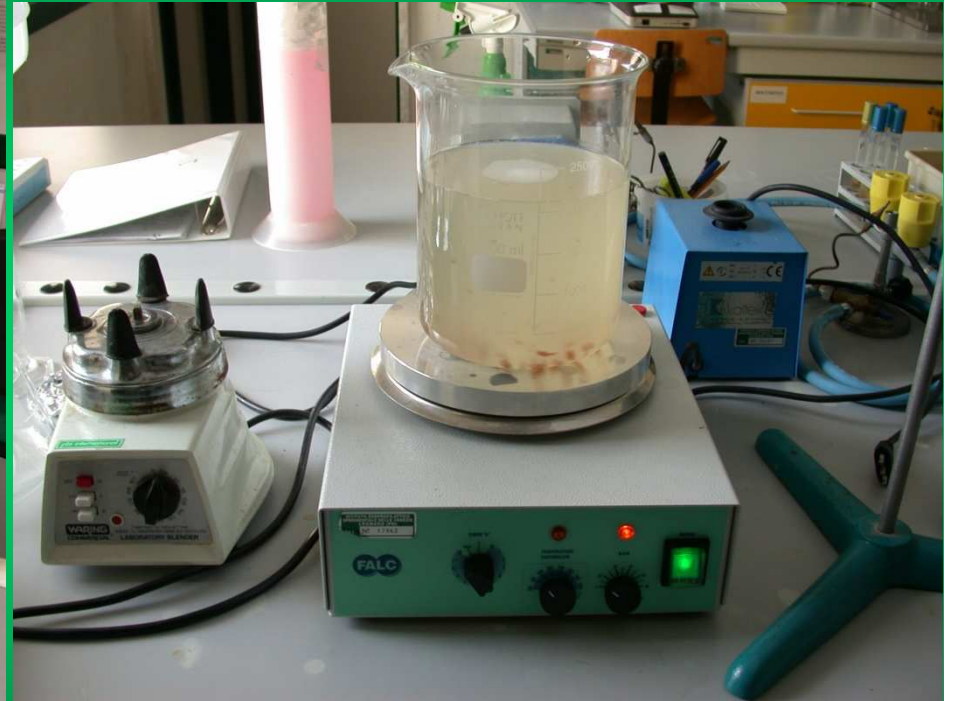
a) in caso di eviscerazione manuale, dall'addetto, in modo continuativo, al momento dell'estrazione dei visceri e del lavaggio;

b) in caso di eviscerazione meccanica, per campionamento, effettuato su un numero rappresentativo di unità, costituito da almeno dieci esemplari per partita.

2. Il controllo visivo dei **filetti o dei tranci** di pesce dev'essere effettuato dagli operatori durante la preparazione successiva alla sfilettatura o all'affettatura. Qualora le dimensioni dei filetti o le tecniche di sfilettatura non consentano un controllo individuale, un **piano di campionamento** deve essere predisposto e tenuto a disposizione dell'autorità competente, a norma dell'allegato III, sezione VIII, capitolo II, punto 4, del regolamento (CE) n. 853/2004. Qualora sia tecnicamente necessaria, **la speratura** dei filetti dovrà essere inclusa nel piano di campionamento.









Sanchez-Monsalvez I. *et al.*, 2005, J. Food Prot., 68, 1066-1072

Distruzione di larve di Anisakis in acciughe marinate crude

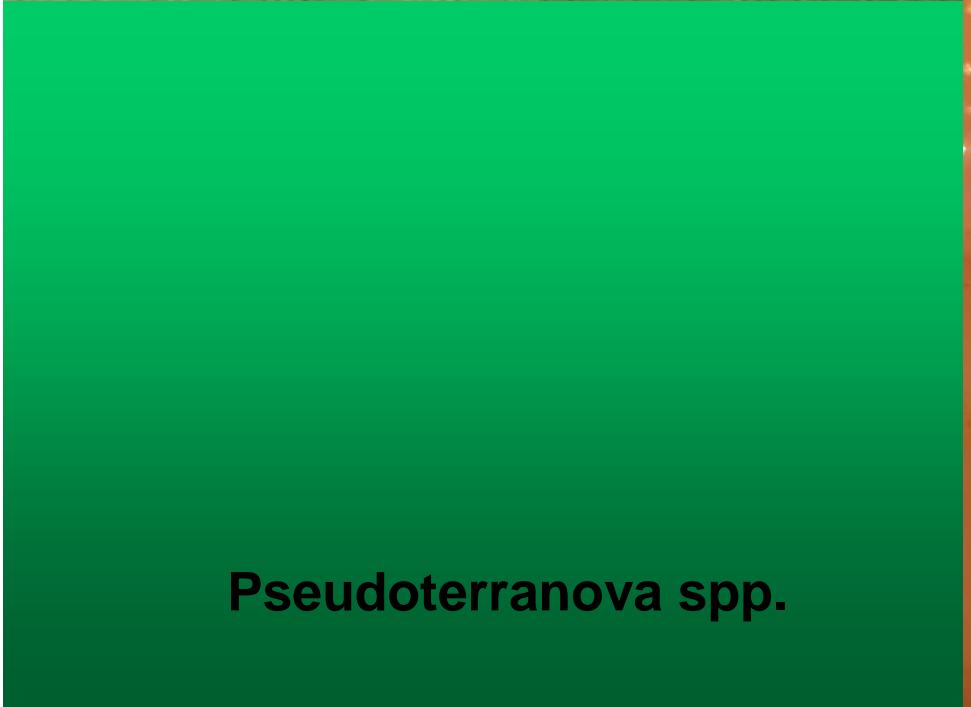
Parametro fisso: sale 12 %

10 % acido acetico > morte dopo 5 gg di marinatura

40 % acido acetico > morte dopo 2 gg

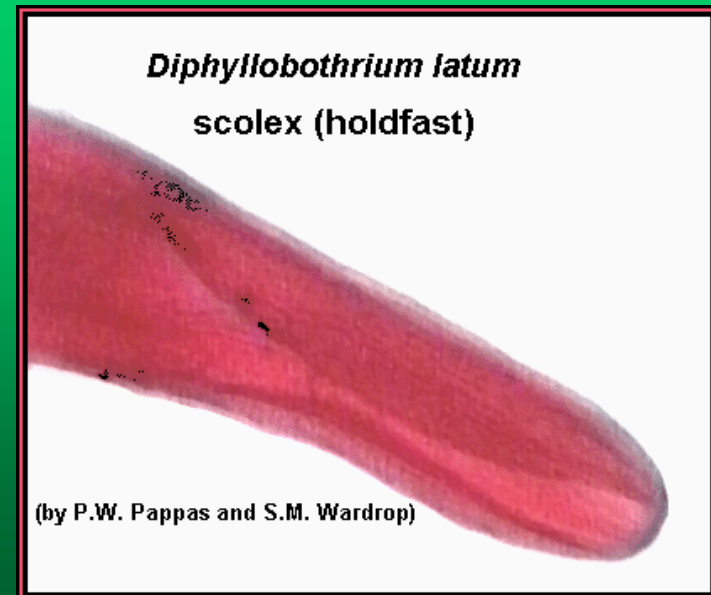
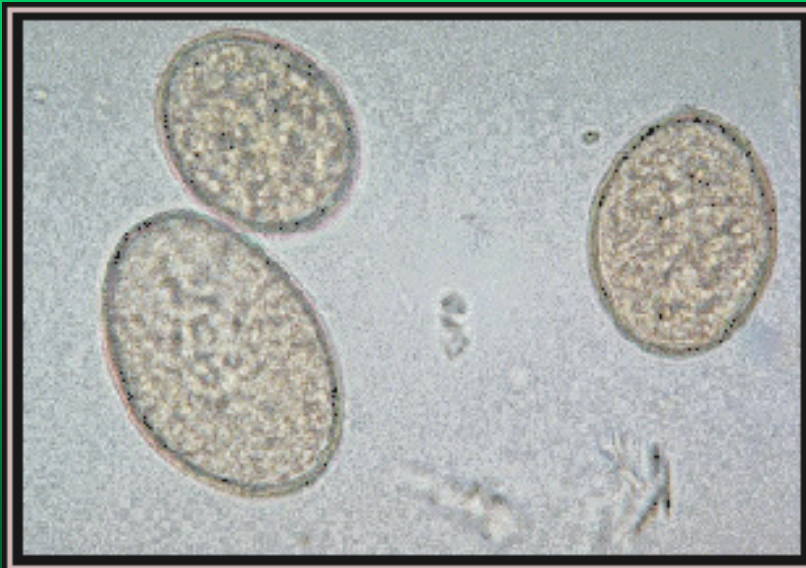
6% acido acetico (aceto), > morte dopo 13 gg

Prove condotte inserendo le larve nel muscolo dell'acciuga

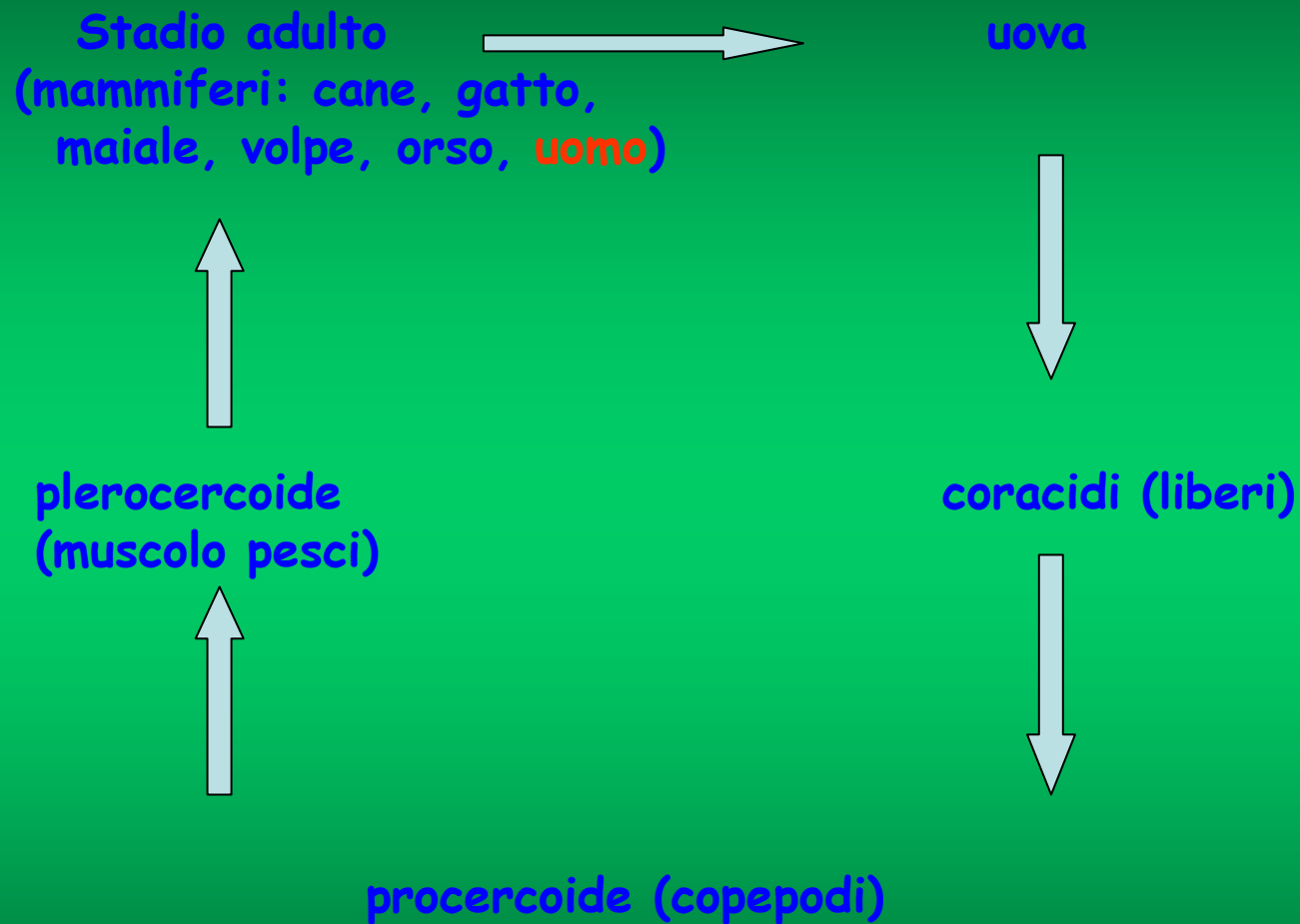


Pseudoterranova spp.

D. latum



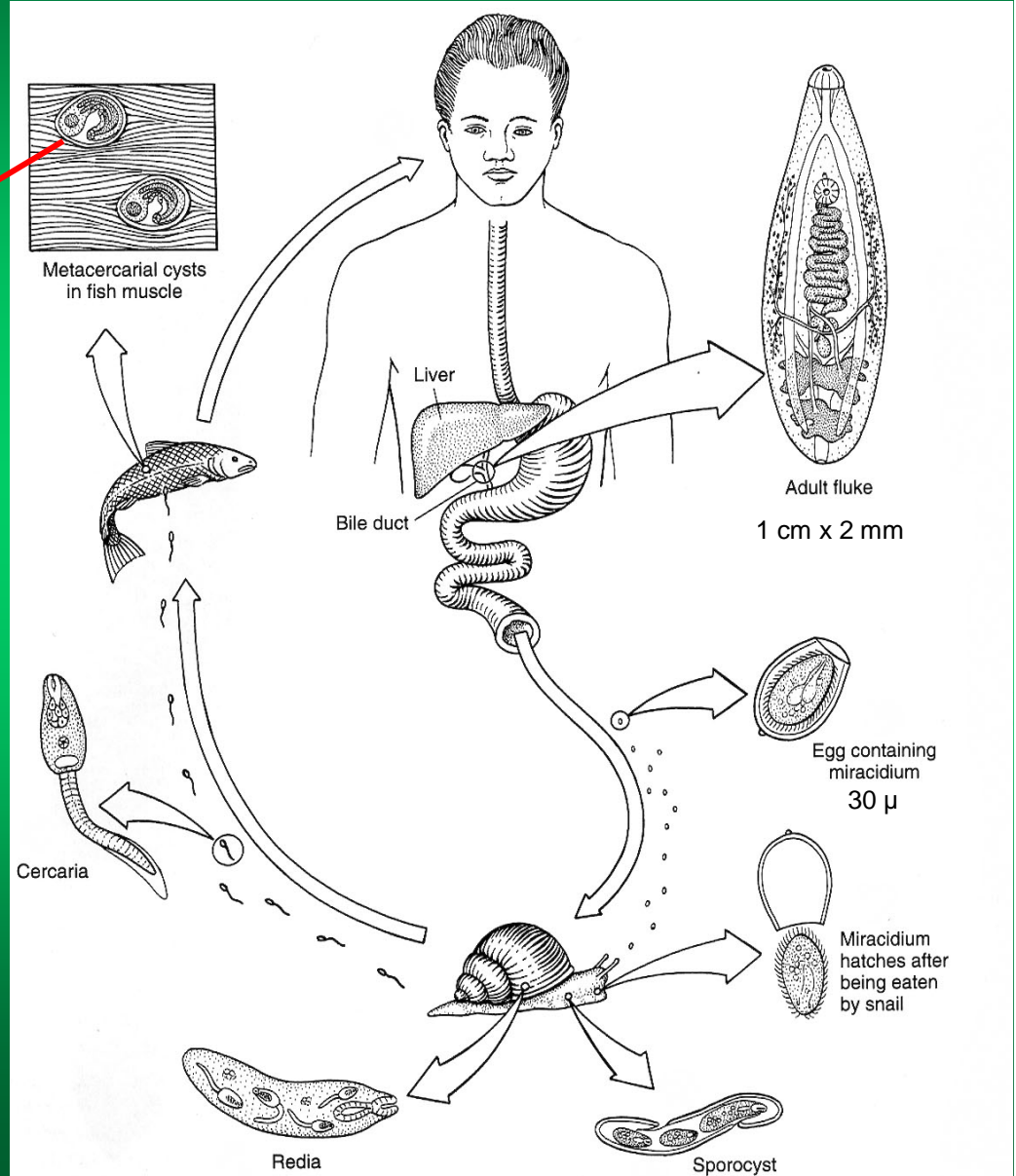
Ciclo biologico del Diphylob.



Il consumo di pesce crudo (Ciprinidae) di acqua dolce



OPISTORCHIS FELINEUS (Distomatosi epatica)



MIN SAL 23 febbraio 2008
Prot. 0003133



Metacercaria - 100 x – tessuto muscolare di *Tinca tinca*

Bythinia spp.



SINTOMI NELL'UOMO

L'INFESTAZIONE E' SPESSO ASINTOMATICA

FASE ACUTA (INSORGE DOPO 2-4 SETTIMANE):

FEBBRE, MALESSERE GENERALE, ASTENIA, PERDITA DELL'APPETITO, NAUSEA, DOLORI AI QUADRANTI SUPERIORI SDELL'ADDOME, MIALGIE, DIARREA, SUBITTERO, MANIFESTAZIONI CUTANEE ORTICARIOIDI.

FASE CRONICA:

COLANGITE RICORRENTE, CALCOLOSI DELLA COLECISTI,
SOLO RARAMENTE: PANCREATITE E COLAGIOCARCINOMI

INDAGINI DI LABORATORIO

**LEUCOCITOSI EOSINOFILA
AUMENTO FOSFATASI ALCALINA
AUMENTO DELLA GAMMA GT
INCREMENTO IgE SERICHE**

DIAGNOSI DI CERTEZZA: RISCONTRO DI UOVA DEL PARASSITA NELLE FECI

INDAGINI DI SUPPORTO: ECOGRAFIA, INDAGINE SIEROLOGICA (TEST ELISA)

TERAPIA : ISOCHINOLONICI E BENZIMIDAZOLICI

PRAZIQUANTEL

ALBENDAZOLO (SECONDA SCELTA)

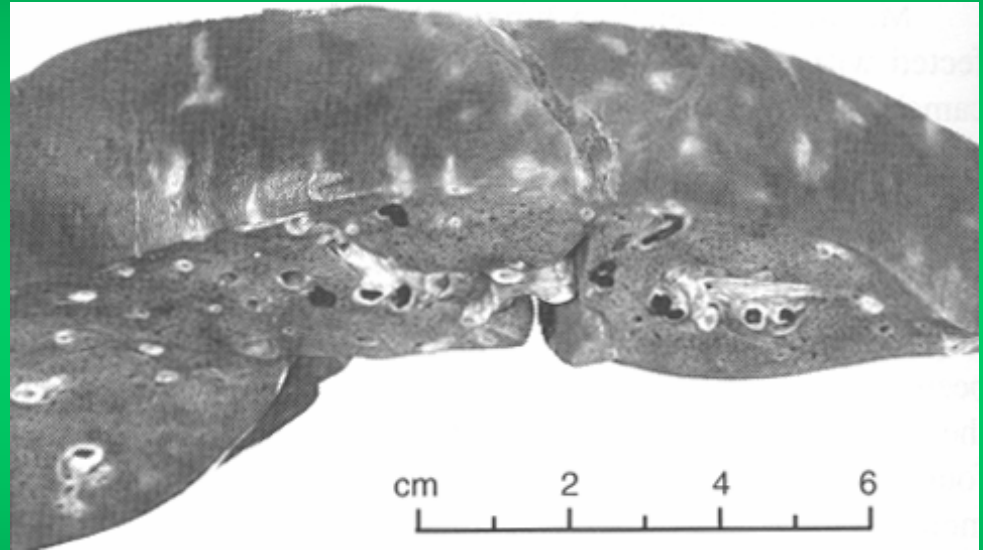


Tabella 1. Infestazioni umane da *Opisthorchis felineus* documentate in Italia

Anno	No. pazienti	Pesce consumato	Sospettata o accertata origine del pesce	Luogo del consumo	Ospedale
2003	2	Tinca marinata	Trasimeno	Ristorante sul lago Trasimeno	Azienda Ospedaliera Perugia
2006	8	Tinca, carpa, persico marinati	Trasimeno	Ristorante sull'Isola Maggiore del lago Trasimeno	Azienda Ospedaliera Perugia
2007	20	Carpaccio di tinca	Bolsena	Cena privata	Azienda Ospedaliera Viterbo
2007	2	Carpaccio di tinca	Bolsena	Ristorante sul lago di Piediluco*	Azienda Ospedaliera Perugia Azienda Ospedaliera Rieti
Totale	32				

* Il pesce originava dal lago di Bolsena

Tabella 2. Infestazioni animali da *Opisthorchis felineus* documentate in Italia in seguito alle infestazioni umane

Anno	Ospite	No. animali positivi/esaminati (%)	Origine	Modalità di identificazione del parassita
2006	Gatto randagio	4/10 (40%)	Isola Maggiore del lago Trasimeno	Osservazione microscopica delle uova in campioni fecali
2007	Tinca	28/38 (74%)	Bolsena	Osservazione microscopica e molecolare delle metacercarie
2007	Gatto randagio	6/23 (26%)	Bolsena	Osservazione microscopica delle uova in campioni fecali
2008	Tinca	2/2	Vico	Osservazione microscopica delle metacercarie
2007	Tinca	19/20 (95%)	Bracciano	Osservazione microscopica delle metacercarie

MISURE PRECAUZIONALI

Adeguate informazione del personale veterinario operante nel SSN, degli addetti alla ristorazione, alla commercializzazione del pesce d'acqua dolce e più in generale ai consumatori ed ai possessori quali cani e gatti;

Commercializzazione controllata con l'indicazione "da consumarsi previa cottura o congelamento a - 20°C per una settimana";

Indagini conoscitive sul pescato proveniente da altri laghi, invasi e bacini lacustri dell'Italia settentrionale, centrale meridionale ed insulare, per monitorare la diffusione di questo patogeno nelle specie ittiche ivi presenti, con particolare riguardo a quelle della famiglia Cyprinidae.