IZSAM G.CAPORALE
TERAMO

Challenge test per la determinazione del tasso di crescita massimo di ceppi di *Listeria monocytogenes* di origine diversa (umana e alimentare) in prosciutto cotto tagliato a cubetti

Patrizia Tucci

PROGETTO: IZS AM 02/12 RC

I risultati della ricerca corrente condotte dall'IZSAM. Anno 2016
Teramo, 13 giugno 2017

Progetto

Nell'ambito del progetto di RICERCA CORRENTE IZS AM 02/12 RC "**Analisi filogenetica ed epidemiologica molecolare di ceppi di *Brucella spp.* e di *Listeria monocytogenes* in Italia**", presso il Laboratorio di Trasformazioni Sperimentali, è stato effettuato uno studio che ha previsto l'esecuzione di challenge test microbiologici di prodotto per valutare la dinamica di comportamento di 2 ceppi di *Listeria monocytogenes* (con stesso pulsotipo), uno isolato da un caso clinico (ceppo umano) e un secondo ceppo isolato da un alimento (prosciutto cotto).

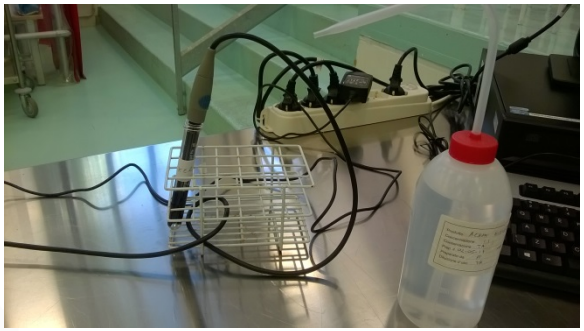
Introduzione

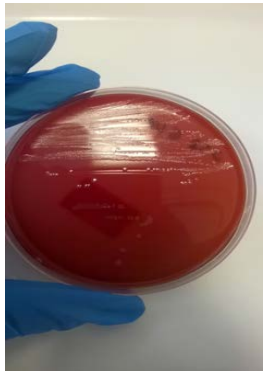
L'obbiettivo del lavoro è stato quello di valutare l'andamento della concentrazione dei due ceppi attraverso la determinazione **del tasso massimo di crescita** su un prodotto confezionato in vaschette pronto per l'uso (prosciutto cotto a dadini), inoculato con *Listeria monocytogenes.*

Attraverso tale studio i due ceppi sono stati valutati singolarmente a due temperature di conservazione (4° e 12°C).

Introduzione

Oltre alla dinamica di comportamento del microrganismo patogeno sono stati valutati anche l'andamento nel tempo dei parametri chimico-fisici e microbiologici del prodotto.





Prodotto:
Prosciutto cotto a cubetti

Ingredienti:
carne di suino 86%, acqua, sale, destrosio, correttore di acidità: lattato di sodio; aromi naturali, stabilizzante: carragenina; antiossidante: ascorbato di sodio; conservante: nitrito di sodio.

Il prodotto è confezionato in atmosfera protettiva.

Processo produttivo

- **Selezione per peso e pH**
- **Disosso a mano**
- **Siringatura** (salina iniettata con aghi e costituita da acqua, sale, nitriti, nitrati, marsala, rhum, ac. ascorbico e fruttosio)
- **Intenerimento** (inteneritori a cilindri e ad aghi)
- **Zangolatura** (massaggio, assorbimento salina ed estrazione proteica per circa 72 ore, alternando 20 minuti di lavoro con 80 minuti di pausa)
- **Stampaggio** (forme e dimensioni variabili, effettuato a mano)
- **Pressatura**
- **Cottura** (in forni ad acqua, a doccia, ad aria o a vapore statico (barbottage). Temperatura a 70°C dell'ambiente riscaldante (68°C al cuore del prodotto) per 1-1,5 ore per Kg di prodotto
- **Ripressatura**
- **Raffreddamento** (per 24 ore a 0° C fino a raggiungere i 2°C)
- **Toelettattura e confezionamento** (tagliati a fette, possono essere affettati sul momento ed incartati oppure affettati in precedenza e chiusi in confezioni di plastica sotto vuoto o in atmosfera protettiva; tranci di prosciutto cotto, sotto vuoto o in atmosfera protettiva, che possono poi essere affettati in seguito o **pezzi di prosciutto tagliati a cubetti** pronti per essere utilizzati in cucina; interi in una confezione sottovuoto

Materiali e metodi

Per la sperimentazione sono state acquistate 204 confezioni di prosciutto cotto tagliato a dadini in vaschette da 100 g provenienti da un unico lotto di produzione.

La sperimentazione ha previsto la preparazione di campioni contaminati singolarmente con i due ceppi di *L. monocytogenes* e poi conservati a due temperature diverse.

L'esecuzione della prova è stata effettuata anche su campioni di controllo non contaminati.

Materiali e metodi

I campioni sono stati così suddivisi:

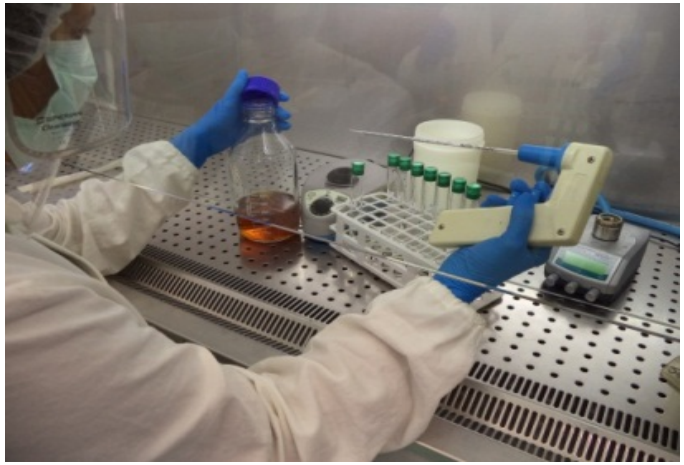
Contaminati = 176 confezioni

Ceppo isolato da alimento → 44 a 4 ± 1°C; 44 a 12 ± 1°C

Ceppo umano → 44 a 4 ± 1°C; 44 a 12 ± 1°C

Controllo = 28 confezioni

Controllo → 14 a 4 ± 1°C; 14 a 12 ± 1°C



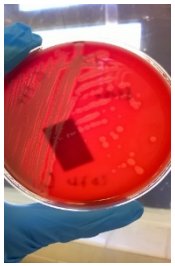
Ceppi batterici

I ceppi utilizzati per la preparazione della sospensione di inoculo sono stati:

- *L. monocytogenes* ceppo umano ID 209
- *L. monocytogenes* isolato da alimento (prosciutto cotto)

La procedura seguita per l'esecuzione del challenge test ha fatto riferimento alle linee guida del Laboratorio Europeo di Riferimento per *L. monocytogenes.*

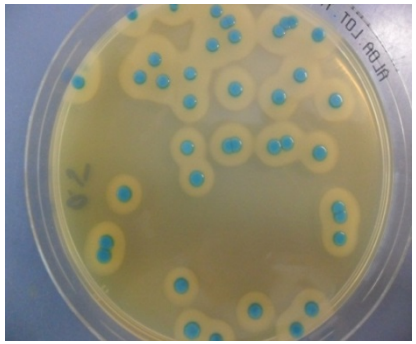
Inoculo



Sono state preparate 2 brodocolture con ogni singolo ceppo.

I 2 ceppi sono stati adattati alle temperature di conservazione del prodotto (**4°C e 12°C**), fino al raggiungimento della fase stazionaria di crescita.

Per ottenere nel prodotto una contaminazione di 2 $\log_{10}$ UFC/g sono state utilizzate concentrazioni di inoculo di 4 $\log_{10}$ UFC/ml.



Modalità di Contaminazione

- Sulle confezioni è stato collocato un setto di gomma in diagonale su tutta la confezione.
- Gli inoculi sono stati effettuati i n 3 punti.
- La contaminazione è stata effettuata con una siringa, distribuendo complessivamente 1 ml di mix (l'1% del volume del prodotto, riducendo così al minimo le modifiche alle proprietà chimico-fisiche).
- I campioni di controllo sono stati inoculati con 1 ml di soluzione fisiologica.

- Successivamente ogni setto è stato sigillato per assicurare maggiore impermeabilità alla confezione.
- Per garantire una contaminazione omogenea le vaschette sono state agitate manualmente per 1 minuto.

Modalità di contaminazione riportata nella EURL *Lm* TECHNICAL GUIDANCE DOCUMENT) (mantenimento delle condizioni atmosferiche interne)

Campionamento

CONTROLLO

	T0	T4	T6	T8	T15	T25	T35
4°C	X	X	X	X	X	X	X
12°C	X	X	X	X	X	X	X

CONTAMINATI

	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10	T12	T15	T19	T20	T25	T30	T35
4°C	X	2X	2X	2X	2X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X
12°C	X	2X	2X	2X	2X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

* da T1 a T4 sono stati eseguiti 2 prelievi al giorno (ore 08:00 e ore 16:30)

Ad ogni prelievo sono state prelevate ed analizzate due confezioni di prosciutto cotto. Ogni campionamento è stato effettuato prelevando e sottoponendo a macinazione il contenuto intero di ciascuna vaschetta (campione di 100 g) e effettuando successivamente 3 prelievi di 25 g ciascuno.

Metodi analitici

Campioni di controllo:

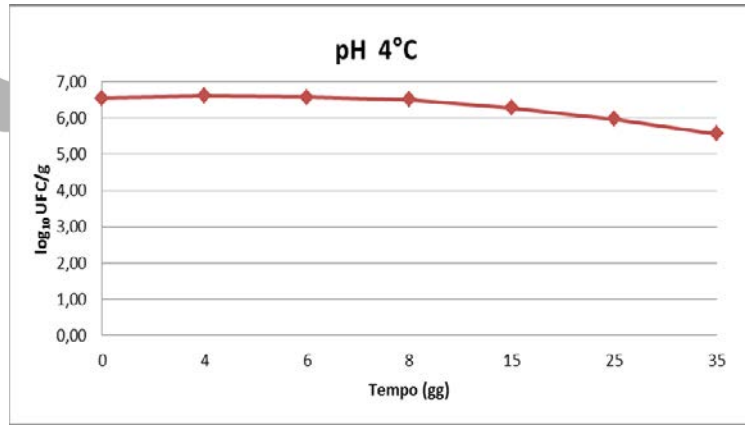
- **Carica batterica mesofila totale (ISO 4833:2013);**
- **Determinazione dell'attività dell'acqua (a_w) (ISO 21807:2004);**
- **Determinazione del pH (metodo interno);**
- **Numerazione dei Lattobacilli a 30°C in aerobiosi (ISO 15214:1998);**
- **Ricerca di *L. monocytogenes* (ISO 11290-1:96/Amendment 1:2004).**

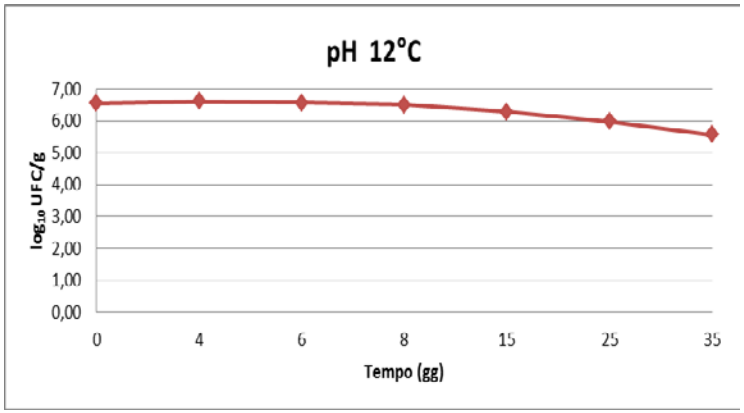
Campioni contaminati:

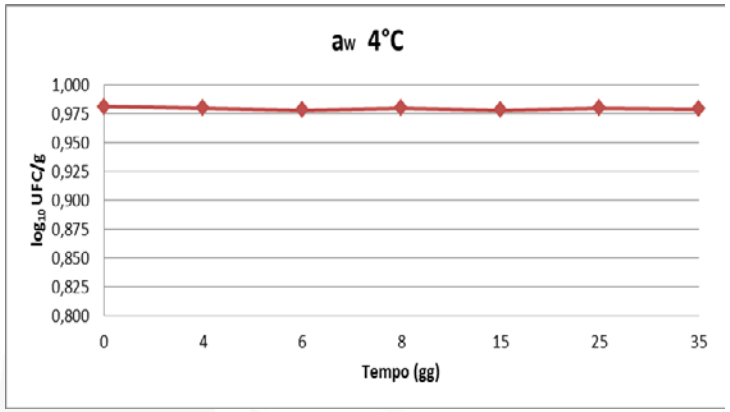
- **Numerazione di *L. monocytogenes* (ISO11290-2:98/Amendment 1:2004).**

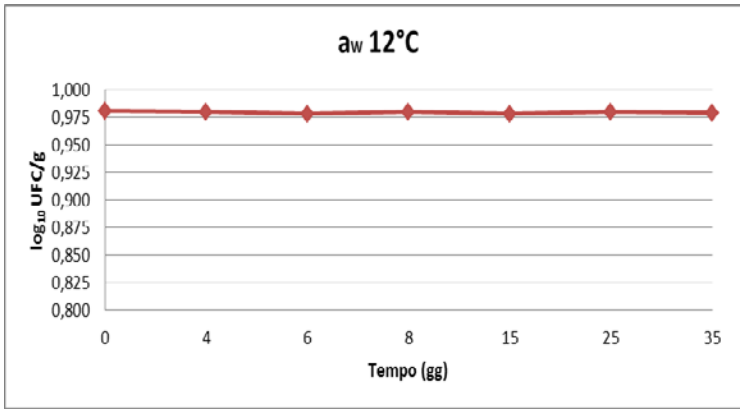
Per i ceppi di *L. monocytogenes* è stato calcolato il tasso massimo di crescita (µmax) a 35 giorni, calcolato in log_{10}UFC/g/h (incremento orario in log_{10}UFC/g), con le modalità di calcolo indicate dall'EURL *Lm* per *L. monocytogenes* e con il software combase /DMFit (Combase 2017).

Risultati
Campioni di controllo



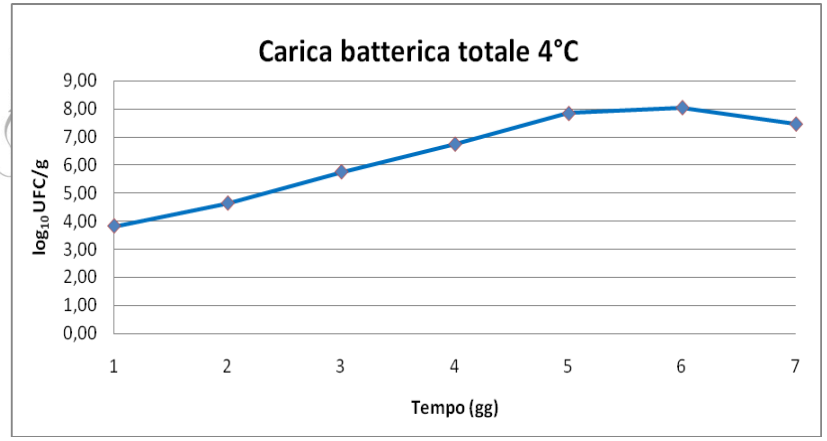


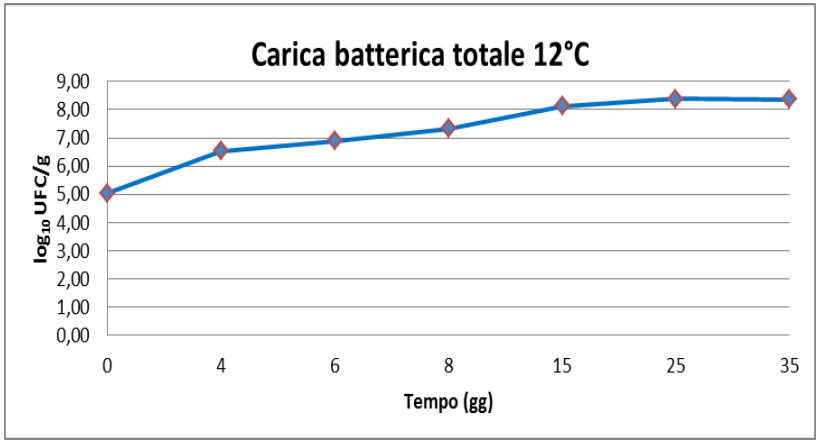


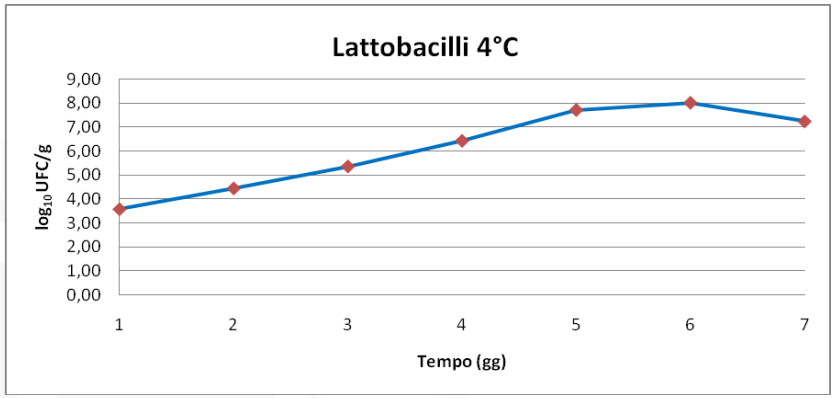


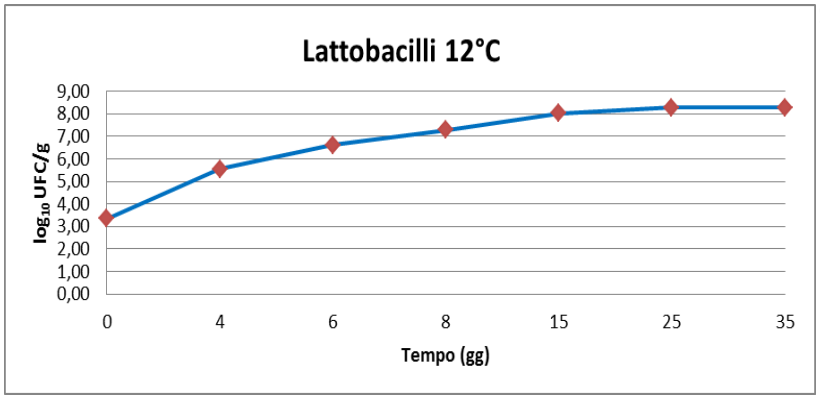
I valori di pH hanno mostrato un lieve decremento durante la prova, da 6.5 a T0 a 5.9 a T35, mentre l'aw è rimasta pressoché costante con valori intorno a 0.98.

Risultati
Campioni di controllo



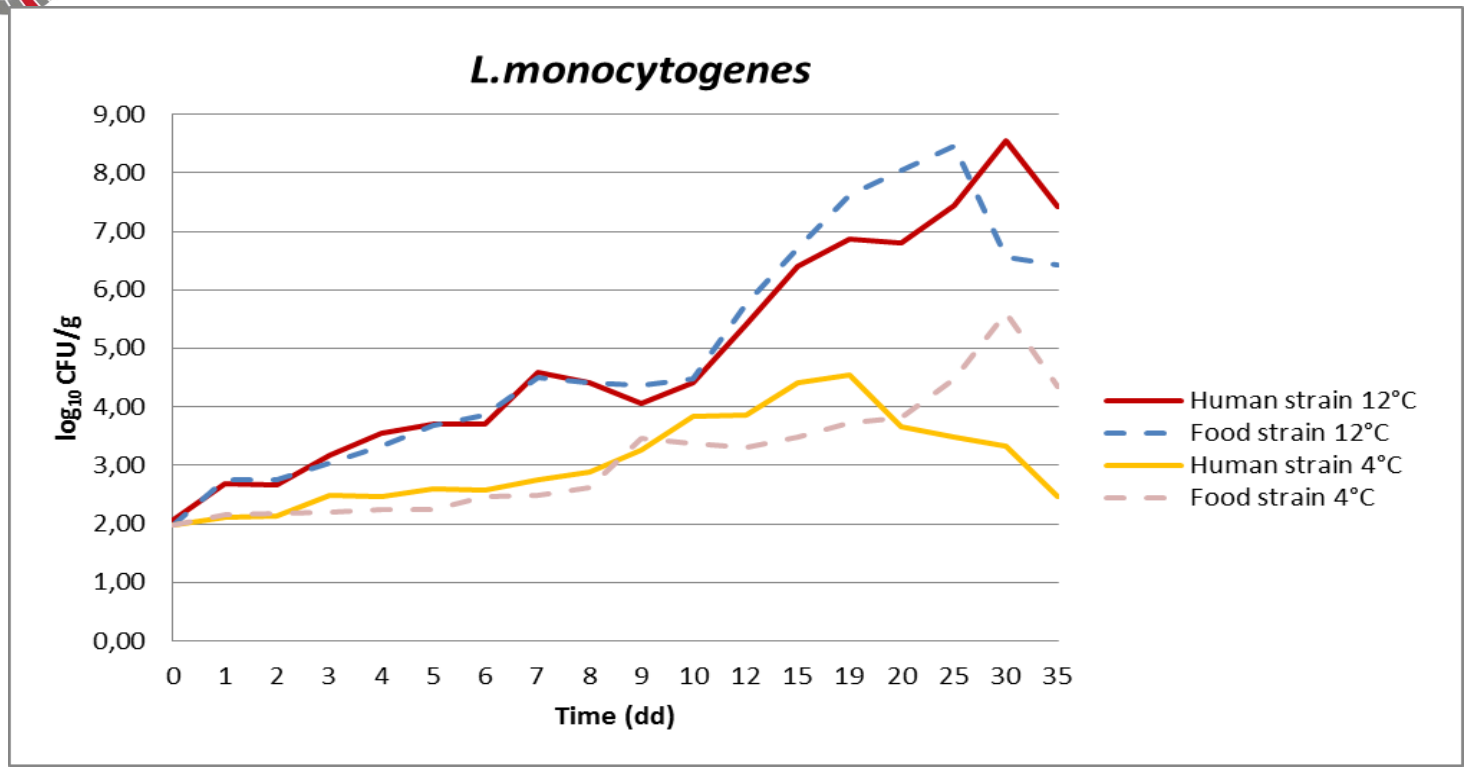






A T0 le concentrazioni medie dei Lattobacilli sono stati di 3,57 $\log_{10}$UFC/g a 4 °C e 3,43 a 12 °C, mentre i valori medi della Carica batterica totale erano di 3,82 a 4 °C e 5,04 a 12 °C. Incremento durante la conservazione.

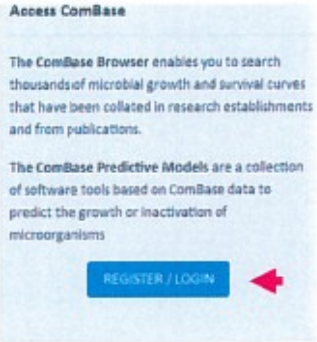
Risultati
Campioni contaminati



Il ceppo di origine alimentare ha mostrato una crescita maggiore durante la shelf life, crescendo fino a T30 a 4°C, mentre il ceppo clinico è aumentato solo fino a T19. Anche il picco di concentrazione è risultato più elevato per il ceppo alimentare (5,6 vs 4,5 log_{10} UFC/g).

Nelle confezioni conservate a 12°C il ceppo umano ha mostrato un aumento della concentrazione fino a T30, mentre il ceppo alimentare fino a T25.

Risultati



I tassi massimi di crescita ottenuti sono stati:

- **µmax** del ceppo umano:
  0.00881 ± 0.00398 $\log_{10}$ UFC/h a 4°C
  0.0103 ± 0.000848 $\log_{10}$ UFC/h a 12°C

- **µmax** del ceppo alimentare:
  0.0045 ± 0.000486 $\log_{10}$ UFC/h a 4°C
  0.0136 ± 0.00246 $\log_{10}$ UFC/h a 12°C.

Avendo calcolato il tasso massimo di crescita e conoscendo il livello di contaminazione dell'alimento ad un dato momento della shelf-life, è possibile calcolare, per le stesse condizioni, la concentrazione attesa in qualsiasi altro momento.

Conclusioni

- Nel corso di numerosi studi ceppi di diversa provenienza (clinici e di altra origine) sono stati caratterizzati per verificare alcune caratteristiche biologiche (adattabilità, resistenza, ecc.). I risultati ottenuti non hanno fornito indicazioni univoche, pertanto è necessario verificare che ceppi di diversa origine mostrino proprietà diverse.

Conclusioni

Nel caso della nostra sperimentazione:

- I ceppi clinici hanno una fase di latenza più lunga e raggiungono nell'alimento contaminato una concentrazione inferiore rispetto ai ceppi isolati da alimenti, quindi è probabile che necessitino di una fase di adattamento all'alimento prima di replicarsi.

- Il µmax mostrato dai due ceppi è più elevato nel ceppo alimentare a 12°C e a 4°C nel ceppo clinico.

Conclusioni

- Questi risultati forniscono informazioni sulle differenze di cinetica di crescita dei ceppi di *L. monocytogenes* di origine diversa.

- I risultati devono essere confermati ripetendo le prove e, nel caso venissero confermati, è necessario effettuare studi di trascrittomica e proteomica al fine di ipotizzare il perché di questa differenza.

- Dopo la conferma dei risultati ottenuti i dati possono essere utilizzati per la realizzazione di modelli predittivi nel quadro della valutazione del rischio connesso alla contaminazione del prosciutto cotto con *L. monocytogenes*.

IZSAM G.CAPORALE
TERAMO

Ringraziamenti:

Dott. Giacomo Migliorati
Dott. Francesco Pomilio
Dott. Luigi Iannetti
Dott.ssa Anna Franca Sperandii

GRAZIE PER L'ATTENZIONE