I risultati della ricerca corrente condotta
dall'Istituto Zooprofilattico Sperimentale
dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale Anno 2013
Teramo, 6 Giugno 2014

IZSAM G.CAPORALE
TERAMO

Valutazione del livello di sicurezza alimentare in prodotti RTE a base di carne suina per alcuni patogeni

Anna Franca Sperandii

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

STUDIO DELLE DINAMICHE DI CONTAMINAZIONE DA AGENTI ZOONOTICI NELL'AMBITO DELLA FILIERA SUINICOLA E DEI MECCANISMI DI INSORGENZA DI PATOLOGIE CORRELATE ALL'INFEZIONE NELL'UOMO."

Unità operativa: Responsabile Vincenza Prencipe

Anna Franca Sperandii, Violeta Di Marzio, Diana Neri, Romina Romantini, Gino Angelo Santarelli

Valutare il grado di sicurezza dell'alimento rispetto ad agenti patogeni quali *Campylobacter*, *Listeria monocytogenes* e *Yersinia enterocolitica*.

Tale studio prevede la verifica di come e in quali particolari condizioni un determinato microrganismo si possa sviluppare su una matrice (1441/2007).

Premessa

- Nonostante i notevoli investimenti nella ricerca, i meccanismi di diffusione, di contaminazione e patogenetici di agenti di zoonosi non sono ancora completamente noti. Una delle possibile cause di questo risiede nell'insufficiente conoscenza dei fattori di rischio che contribuiscono, in varia misura e in punti differenti della filiera di produzione, alla contaminazione dei prodotti alimentari.

- **La normativa alimentare dell'Unione Europea (Reg. 2073/2005 e linee guida) prevede l'impiego di Challenge test per determinare i livelli di sicurezza dei prodotti pronti al consumo.**

Premessa

Definizione di prodotto RTE: un prodotto a base di carne o di pollame che è in forma <u>edibile</u> senza ulteriori trattamenti per renderlo un alimento sicuro . ("ready to eat" disciplinati dal Reg 2073/2005CE modificato dal Reg 1441/2007CE (2,3))

Premessa
Fasi per l'esecuzione di un MCT

1 - Disegno sperimentale
2 - Procedure di inoculo
3 - Procedure di saggio
4 - Interpretazione dei risultati

- microrganismi che devono essere inoculati
- mantenimento delle colture
- preparazione dell'inoculo
- livello di inoculo
- metodo di inoculo

Obiettivi generali

- Fornire informazioni, oltre che sull'andamento di tre importanti microrganismi patogeni, anche sulla microflora associata alla produzione di insaccati freschi.
- Valutare i risultati relativi al comportamento di microrganismi potenzialmente patogeni per l'uomo, al variare di fattori quali Aw-T°, microbiologia predittiva.

Obiettivi specifici

Il progetto, articolato in macrofasi, ha previsto le seguenti attività:

- Stesura protocolli Sperimentali per l'effettuazione di *Challenge test* per *Campylobacter* spp, *Listeria monocytogenes* e *Yersinia enterocolitica* in insaccati freschi (RTE);
- Esecuzione del *challenge test;*

  Definizione delle procedure di analisi, che permettano di standardizzare le fasi cruciali del MCT (in accordo con la Guida tecnica **Laboratorio di riferimento europeo per la *Listeria monocytogenes*** (ANSES 2008)
  - Dai criteri di selezione dei ceppi
  - Alla preparazione degli inoculi
- Analisi dei dati

Protocollo sperimentale

Il protocollo sperimentale negli alimenti RTE ha previsto :

- Rilievo del processo produttivo;
- Rilievo delle caratteristiche microbiologiche e chimico-fisiche del prodotto (identificare e quantificare lattococchi e/o lattobacilli), profilo di pH e Aw, presenza di additivi ad attività battericida-batteriostatica (lattato/di acetato di sodio) in grado di influire sulla capacità di sopravvivenza dei microrganismi oggetto di studio nel corso della shelf-life;
- Produzione sperimentale;
- Contaminazione dell'alimento;
- Individuazione delle temperature di esposizione del prodotto

Protocollo di analisi

- Selezione dei ceppi
- Adattamento
- Inoculo
- Challenge test

Scelta dei microrganismi

- ***Campylobacter* spp.**, non esistono ad oggi dati che ci permettano di valutare il contributo nell'infezione umana delle produzioni alimentari a base di carne suina. Dai dati riportati in letteratura sulla filiera suinicola i campioni positivi sono stati 235 (57,6%): di questi il **63% è risultato rappresentato dalla specie *C. coli***, il 10,5% da *C. jejuni.*
- In EU nel 2007 sono stati registrati 8979 casi di infezioni da ***Yersinia enterocolitica*** nell'uomo con un'incidenza di 2,1 casi/100.000 abitanti. Veicolo dell'infezione è la carne di maiale cruda o poco cotta. Yersiniosi terza infezione zoonosica di origine alimentare rilevata in Europa (EFSA, 2013).
- ***Listeria monocytogenes*** batterio caratterizzato da elevate capacità di sopravvivenza negli ambienti di lavorazione e conseguentemente nei prodotti finiti. Molto importante la capacità di *L. monocytogenes*, come di *Y. enterocolitica*, di crescere a temperatura di refrigerazione (+4°C), facendo aumentare il rischio di infezione in alimenti con lunga *shelf-life*.

Scelta del prodotto e descrizione

- Prodotti a base di carne suina consumati crudi o poco cotti o con periodo di stagionatura breve con un pH e aW sono considerati tra gli alimenti a rischio (EFSA 2009).
- È stata scelta la salsiccia fresca di carne suina, secondo una ricetta che rappresenta la tipologia più comune in Abruzzo, dove tal prodotto viene consumato sia crudo che cotto, subito o dopo un periodo di asciugatura naturale a temperatura ambiente (www.arssa.abruzzo.it/atlanteprodotti).

Materiali e metodi. Produzione sperimentale

Le fasi di produzione e preparazione sono state eseguite presso il Laboratorio di Trasformazioni Sperimentali dell'IZSAM. Struttura ad alto contenimento biologico che consente la produzione degli alimenti contaminati da agenti patogeni per lo studio del loro comportamento nelle diverse fasi e nel periodo di *shelf-life*.

Le prove sono state condotte su due distinti lotti di prodotto per studiare meglio il comportamento dei patogeni in condizioni diverse.

Analisi materie prime

Carne, budello, sale e pepe sono stati analizzati al fine di valutarne il grado di contaminazione di partenza ,eventuale presenza di patogeni e livelli della microflora autoctona.

Materiali e metodi.
Fasi produzione sperimentale

- Stoccaggio
- Mondatura
- Pesata
- Macinazione delle carni e del grasso
- Preparazione della concia
- Miscelazione
- Insacco
- Legatura
- Foratura delle salsicce
- Stoccaggio (celle)

Materiali e metodi
Ceppi batterici utilizzati

- ***Campylobacter:*** *Campylobacter coli* ATCC 33559 e 2 ceppi di campo(IZS)
- ***Yersinia enterocolitica****:* 1 ceppo appartenente a una collezione internazionale (NCTC 10463) e 2 ceppi di campo isolati da tonsille di suino (IZS 20012 e IZS 1735).
- ***Listeria monocytogenes****:* il ceppo di riferimento ATCC 7644, 2 ceppi di campo isolati da salsiccia (sierotipo 1/2a e sierotipo 1/2c)

Tutti i ceppi di campo provengono da collezioni dell'IZSAM.

Adattamento

- Concentrazione salina: NaCl 23%;
- Temperature per ***Listeria e Yersinia:***
  - 8°C (refrigerazione domestica) e 20°C (mantenimento a temperatura ambiente)per I° lotto e 12°C e 18° per il II° lotto
- pH 7,4

Materiali e metodi
Inoculo *Listeria e Yersinia*

- Prima di procedere alla fase di contaminazione sono state determinate per ogni ceppo le rispettive curve di crescita in (BHI) a 37°C [lag phase (t°/t)].
- È stato effettuato l'adattamento dei ceppi in brodo di coltura modificato secondo i parametri di pH e concentrazione salina tipici del prodotto oggetto di studio. Per l'allestimento delle sospensioni batteriche sono state adottate le indicazioni riportati nella procedura redatta dal Laboratorio Sperimentale (IZSB3.1.2) (in accordo ANSES 2008).
- La concentrazione di inoculo della mix dei 3 ceppi di ogni agente patogeno è stata di: 10^4-10^5UFC/g. per il 1° lotto, 10^2 UFC/g per il 2°.
- Il volume dell'inoculo è stato inferiore all'1% del volume delle unità di prova (campioni di controllo con soluzione fisiologica) ed è stato effettuato in 3 punti di ciascuna salsiccia.

Materiali e metodi. Inoculo *Campylobacter*

- Per il *Campylobacter* non essendoci dati a riguardo sono state effettuate diverse prove per la creazione di una mix di inoculo con risultati significativi (microaerofilo)
- Sono stati utilizzati tre ceppi di *Campylobacter coli* (1 ATCC, 2 di campo)
- Sono state prese in considerazione le temperature di refrigerazione 8°C e 12°C
- La sperimentazione è stata condotta per 10 giorni

Campionamento e determinazioni analitiche – 1° lotto

- Tempi di prelievo: **1-2-3-4-5-6-7-9-12-14-17-20** (I° lotto).
- N° di campioni: **3** salsicce analizzate ad ogni tempo.

Determinazioni analitiche eseguite

Microrganismo	ISO
Numerazione stafilococchi coagulasi positivi(e micrococcaceae)	6888-1:1999
Numerazione Lattobacilli a 30°C	15214:1998
Numerazione *E. coli beta-D-glucuronidasi*	16649-2:2001
Numerazione batteri solfito riduttori	15213:2003
Numerazione Lieviti e muffe Prodotti Aw>0,95	21527-1:2008
Ricerca *Yersinia enterocolitica*	10273:2003
Determinazione del pH	Metodo interno
Numerazione *Yersinia enterocolitica*	Metodo interno
Determinazione dell'aW	21807:2004
Ricerca *Listeria monocytogenes*	11290-1:96/Amendment 1:2004
Ricerca *Salmonella* spp.	6579/2002
Numerazione *Listeria monocytogenes*	11290-2:98/Amendment 1:2004
Numerazione Enterobacteriaceae	21528-2:2004
Numerazione Enterococchi	NO 68 4Th Ed.2004-Nordic Committee- on Food ANALYSIS
Numerazione di *Bacillus cereus*	7932:2004

Campionamento e determinazioni analitiche – 2° lotto

I dati del 1° lotto sono stati sottoposti alla valutazione statistica (Baranij) che ha indicato i tempi e le temperature per il 2° lotto

Programma a 12°C

Inoculo il giorno 0 alle 9:00 (misurare)

Misurazioni:
Giorno 1 alle 9:00
Giorno 2 alle 9:00 e alle 17:00
Giorno 3 alle 9:00 e alle 17:00
Giorno 4 alle 9:00 e alle 17:00
Giorno 5 alle 9:00 e alle 17:00

Dal giorno 6 all'11 nessuna misurazione

Dal giorno 12 al 20 misurare ogni due giorni, una sola volta al giorno.

In tutto, compreso l'inoculum, sono 15 misurazioni

L'aw deve essere misurata due volte al giorno tutti i giorni su prodotto non contaminato.

Programma a 18°C

Inoculo il giorno 0, va bene alle 17:00 (ci aspettiamo una crescita più rapida rispetto a 12°C)

Misurazioni:
Giorno 1 alle 9:00, 13:00 e 17:00
Giorno 2 alle 9:00, 13:00 e 17:00
Giorno 3 alle 9:00, 13:00 e 17:00

Dal giorno 4 all'11 nessuna misurazione

Dal giorno 12 al 20 misurare ogni due giorni, una sola volta al giorno

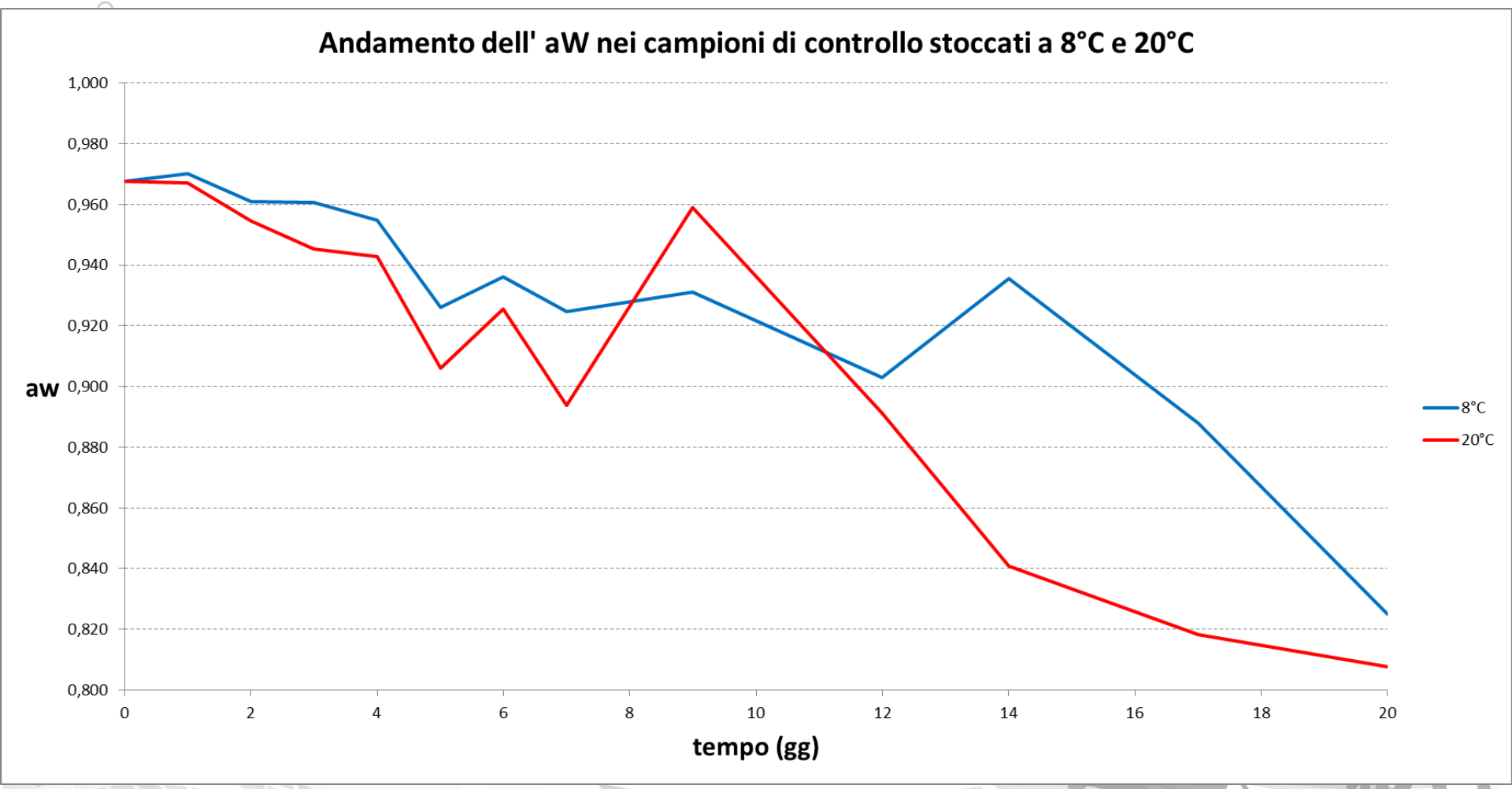
Aw due volte al giorno tutti i giorni

Anche in questo caso sono 15 misurazioni, compreso l'inoculum

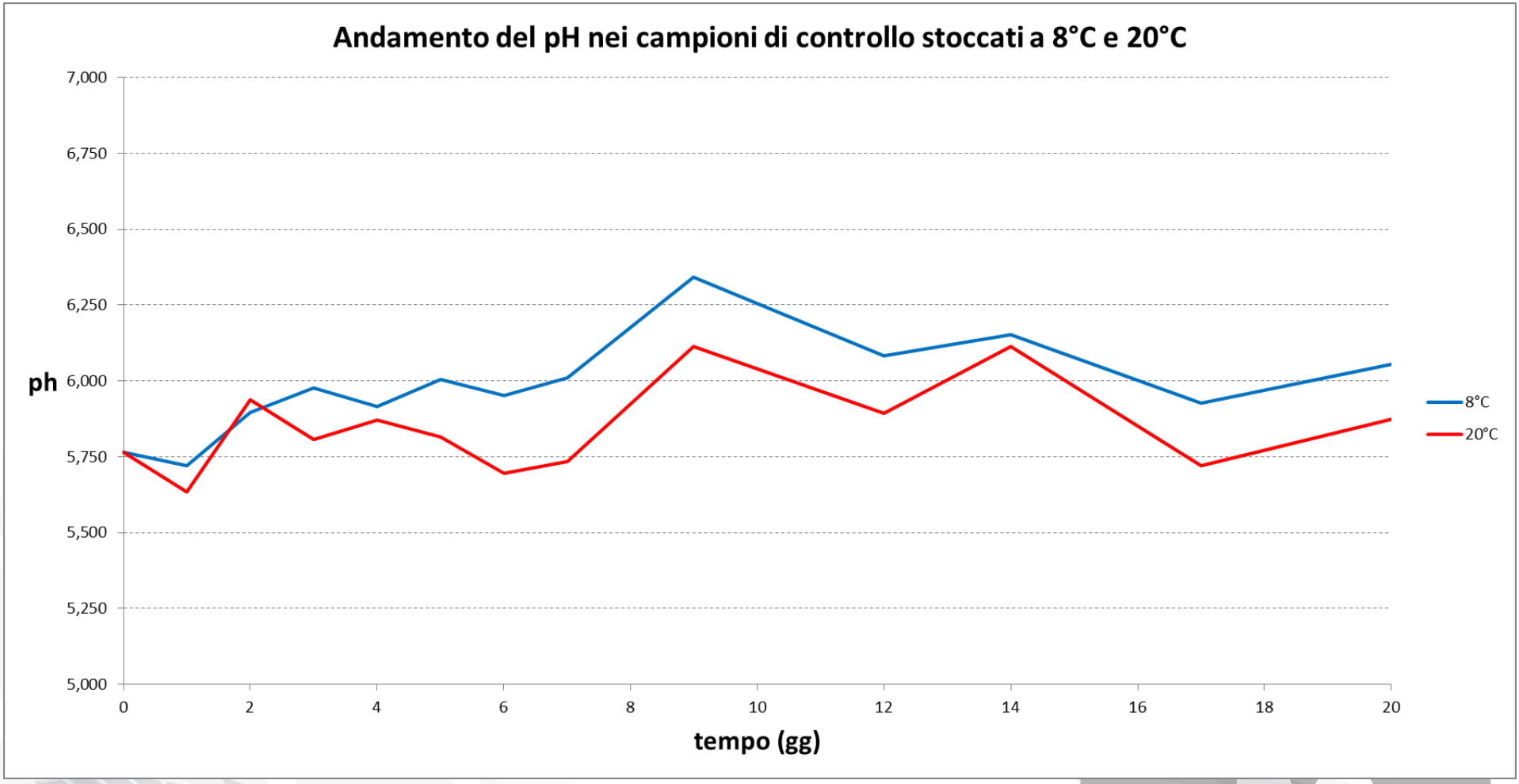
Campionamento e determinazioni analitiche – 2° lotto

Microrganismo	ISO
Determinazione del pH	Metodo interno
Numerazione *Yersinia enterocolitica*	Metodo interno
Determinazione dell'aW	21807:2004
Numerazione *Listeria monocytogenes*	11290-2:98/Amendment 1:2004
Numerazione Campylobacter	Campy ISO 10172-2:2006

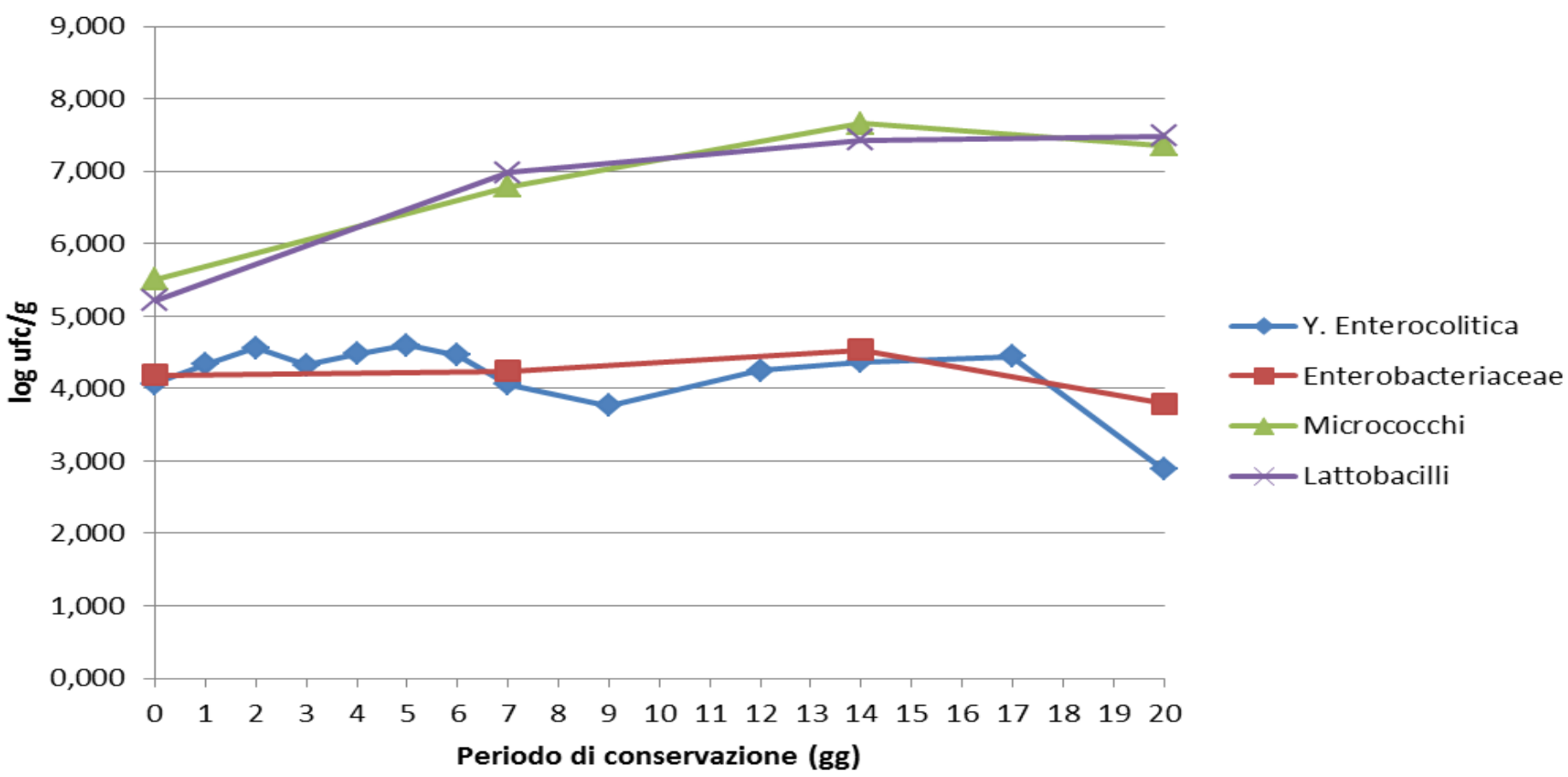
Risultati. Parametri chimico-fisici 1° lotto



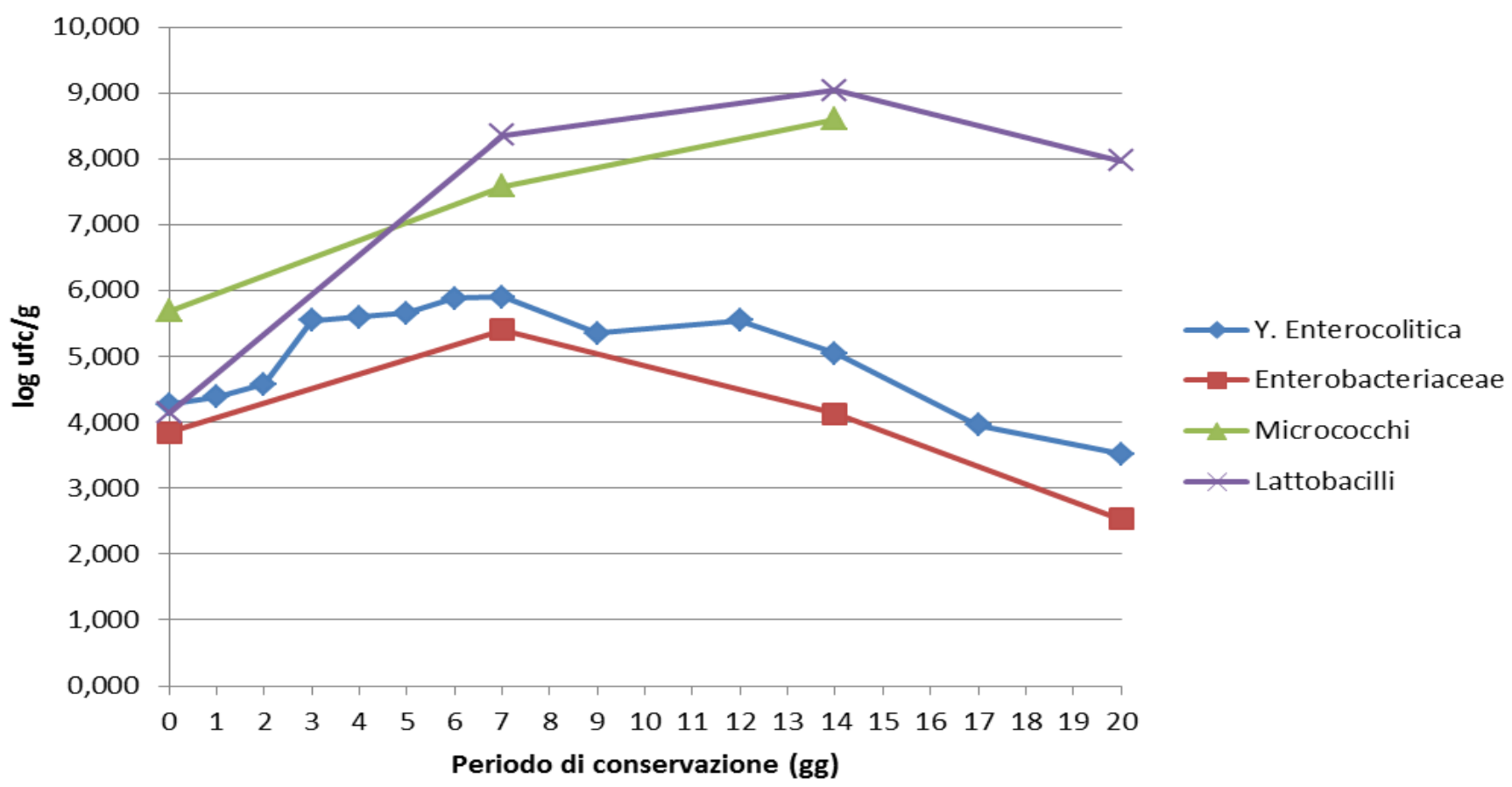
Risultati. Parametri chimico-fisici 1° lotto



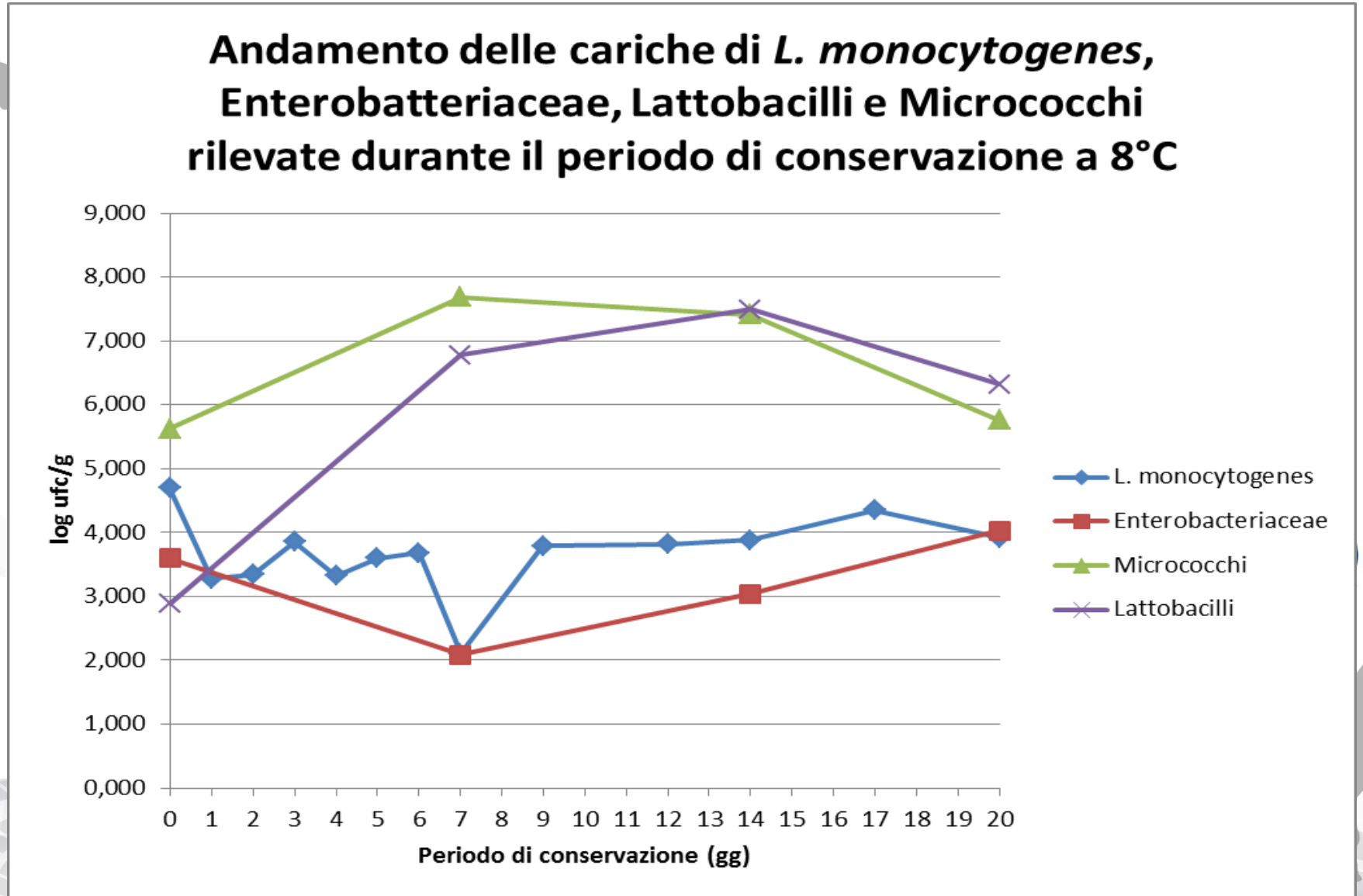
Risultati 1° lotto



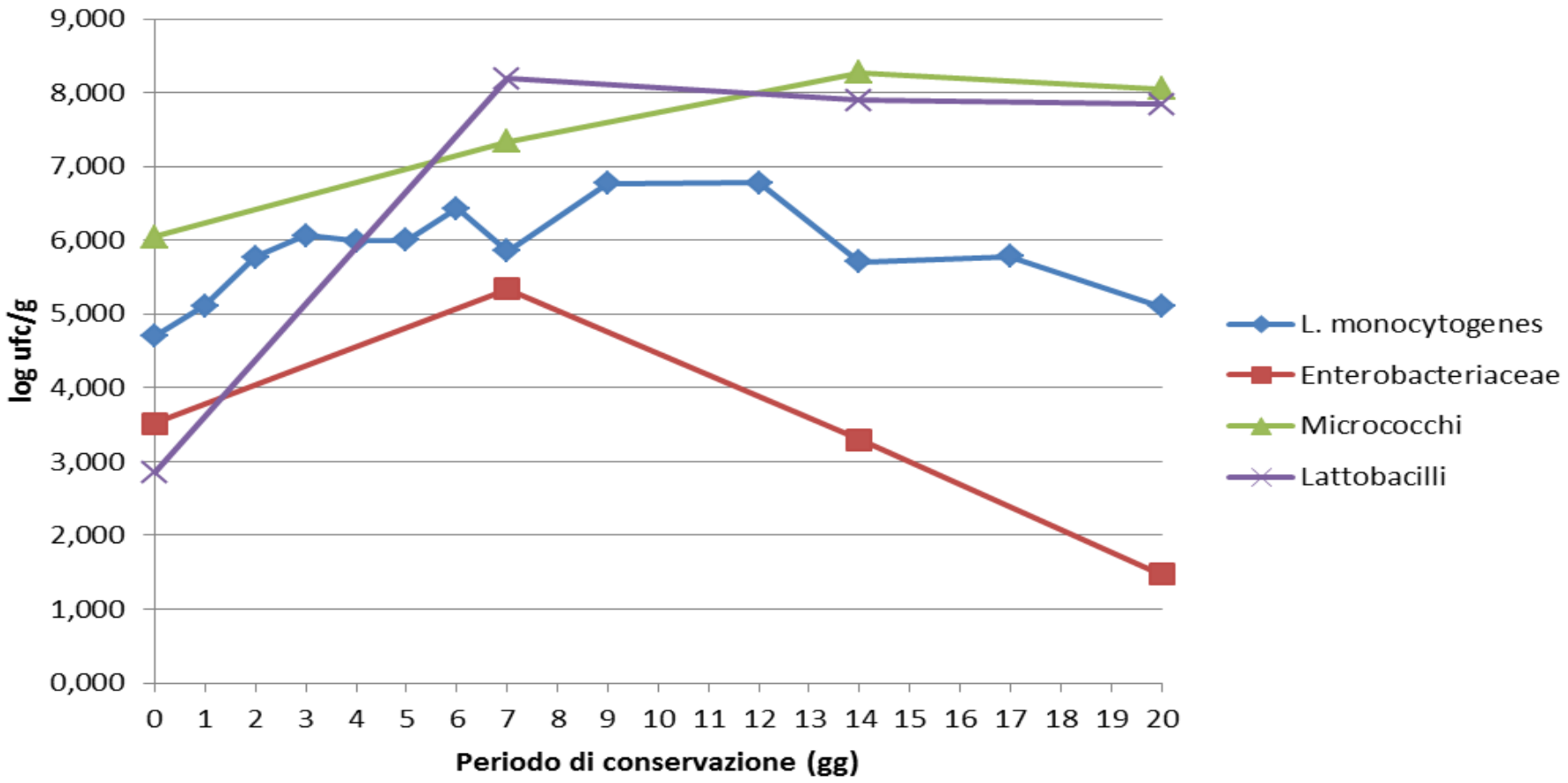
Risultati 1° lotto



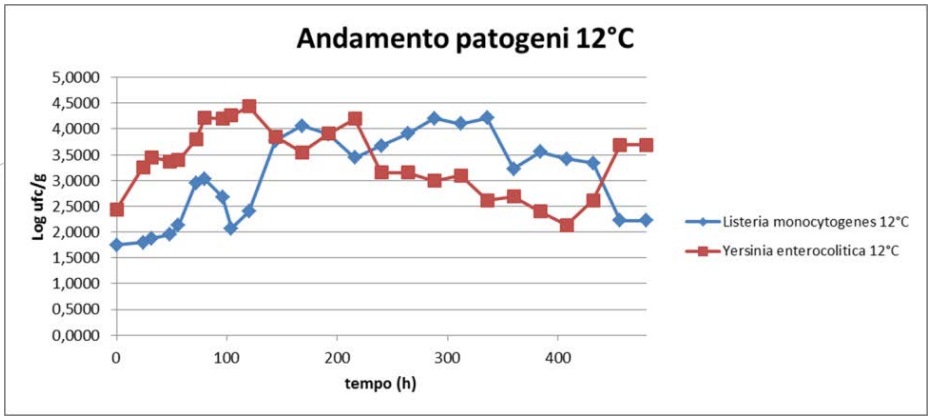
Risultati 1° lotto

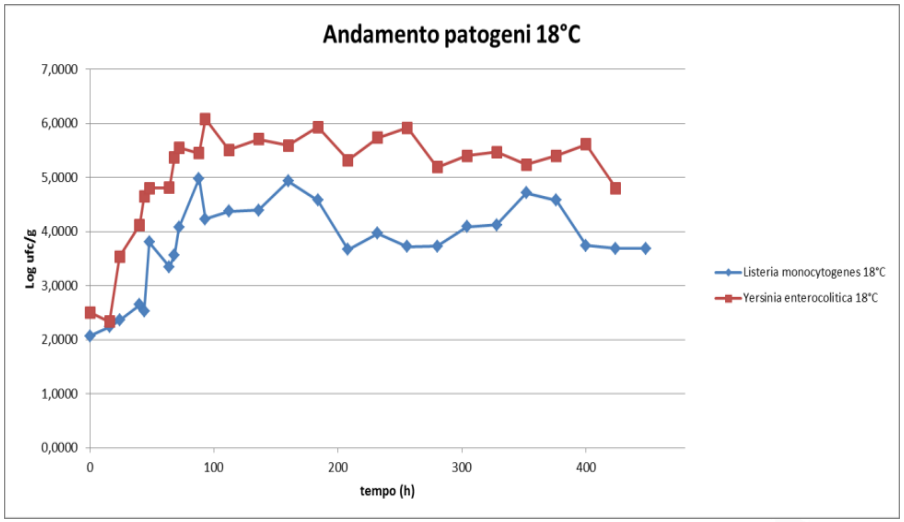


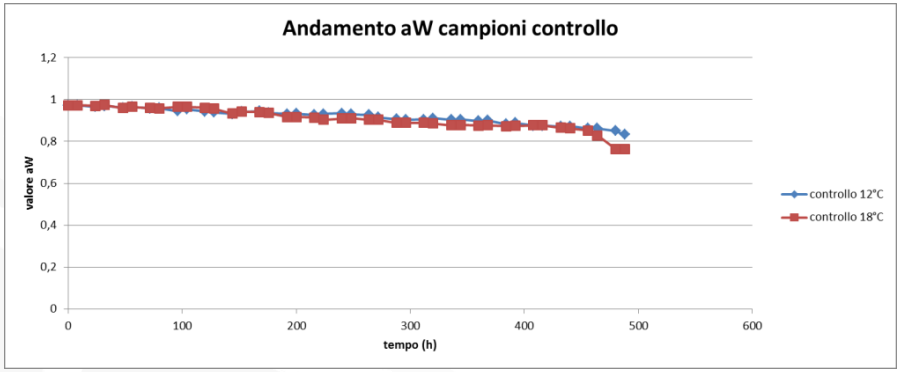
Risultati 1° lotto

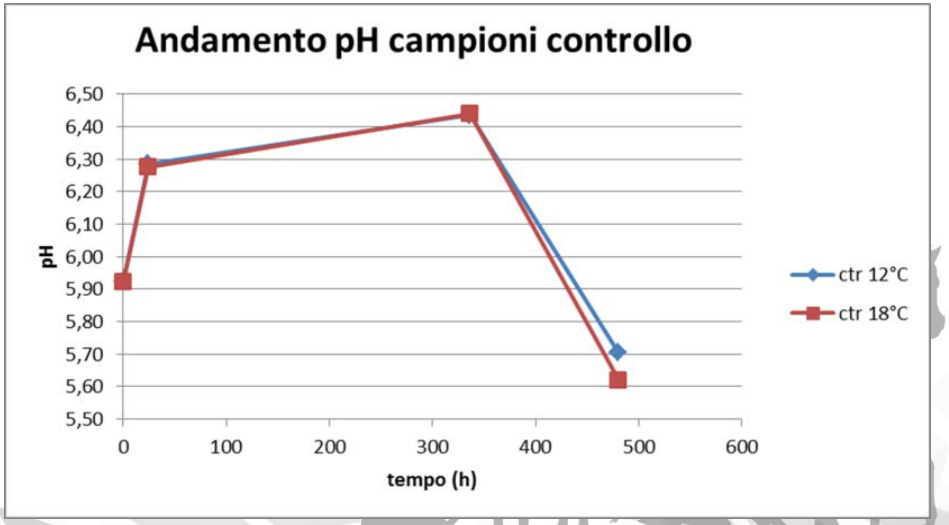


Risultati 2° lotto





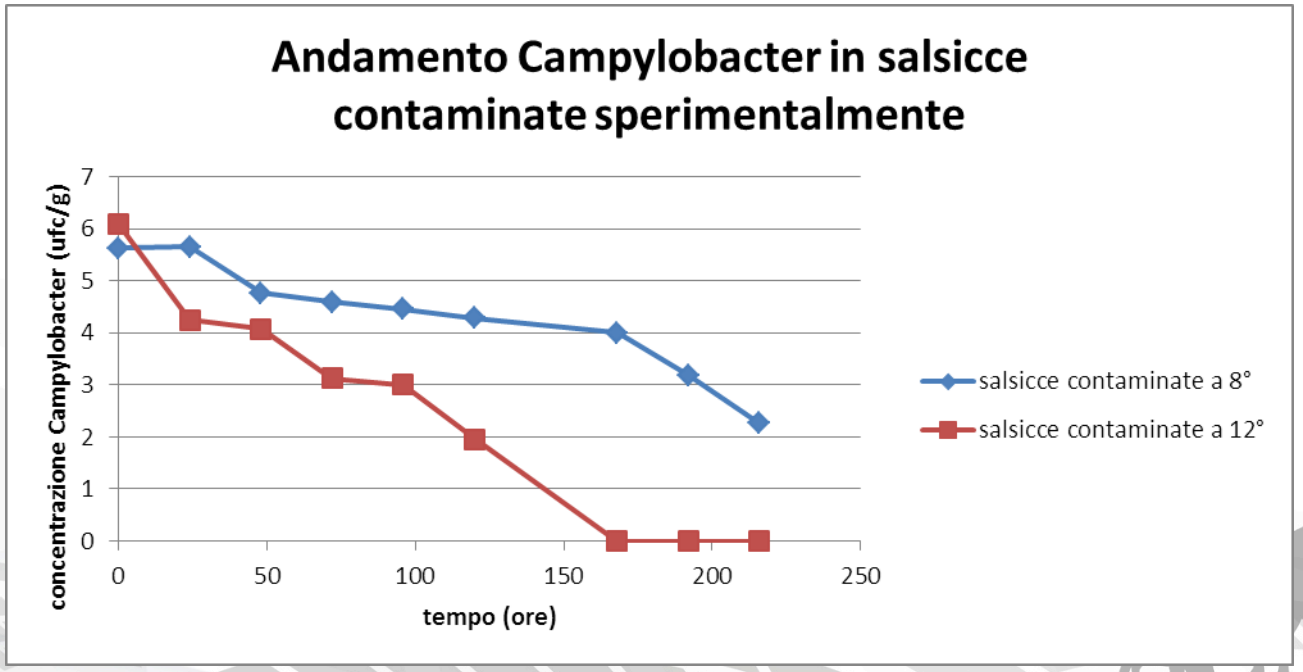




Risultati 2° lotto.

Valutazione del comportamento di *Campylobacter*

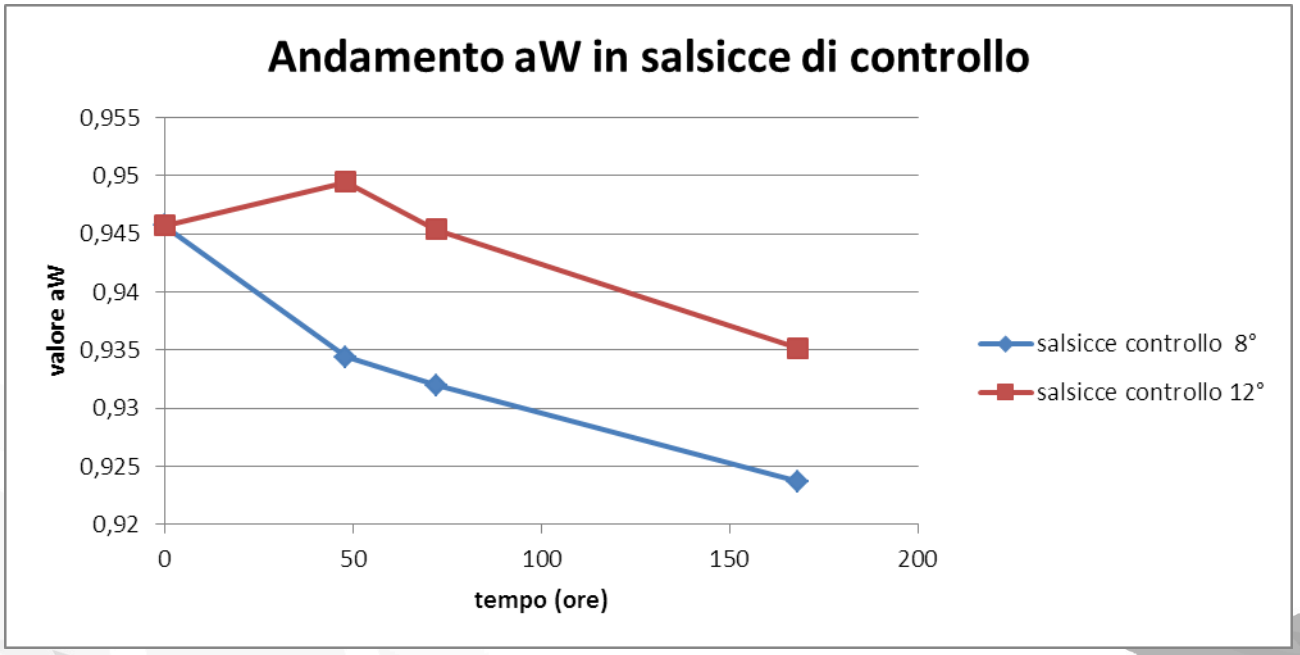
Le cariche di *Campylobacter* hanno avuto andamenti diversi nelle due temperature di stoccaggio: a 12°C si è assistito ad una graduale diminuzione della concentrazione che è arrivata a zero dal 7° giorno di analisi ,fino alla fine della sperimentazione. A 8°C, invece, sebbene la carica tende a regredire durante tutto il periodo di analisi , ma non si azzera



Risultati 2° lotto.

Valutazione del comportamento di *Campylobacter*

I valori di acqua libera hanno mostrato il seguente andamento: a 12°C si nota un minimo aumento nelle prime 48h per poi subire una lenta e graduale diminuzione; a 8°C la diminuzione è più rapida e più spinta nelle prime 48h e più lenta e graduale fino al termine della sperimentazione.



Valutazione dei risultati

- La temperatura svolge un ruolo determinante nel contenimento della carica.
- La microflora presente non sembra svolgere un ruolo competitivo mentre determina alterazione del prodotto entro i 15 giorni dalla produzione.
- **Per *L. monocytogenes*** l'effetto della temperatura ha determinato il mantenimento della carica per tutto il periodo a 8°C , mentre a 20°C si è registrata una crescita progressiva fino al 12° giorno.
- **Per *Y. enterocolitica*** è stato rilevato un incremento nella prima settimana ad entrambe le temperature sebbene a 20°C la curva denoti un incremento maggiore .
- **Per *Campylobacter*** a 8°C e 12°C le cariche decrescono: ma mentre a 12°C si raggiunge la fase di morte del patogeno dal 7° giorno**.** a **8°C la carica persiste fino al termine della sperimentazione.**

Conclusioni

- La “salsiccia fresca” non presenta caratteristiche intrinseche né processi tecnologici di produzione tali da abbattere o contenere eventuali patogeni che accidentalmente possono contaminare il prodotto durante la lavorazione e stoccaggio.
- Pertanto il **periodo di maggior consumo** di questi prodotti (**7 giorni** dalla produzione) corrisponde al periodo di **maggior crescita** dei microrganismi patogeni studiati, fatta eccezione per i prodotti contaminati da *L. monocytogenes* conservati a 8°C.
- Per la sperimentazione relativa al *Campylobacter,* visti gli inaspettati risultati ottenuti a (7° giorni), i dati verranno confermati attraverso l’esecuzione di un nuovo MCT.

Considerazioni finali

- Prodotto spesso conservato a T° ambiente nella fase di vendita.
- Difficoltà nella dimostrazione dei livelli di sicurezza di questi prodotti ,per la scarsità di dati scientifici disponibili.

❖ I risultati saranno impiegati per la progettazzione di **modelli predittivi** secondari **specifici** per questo prodotto RTE saranno in grado di mostrare l'andamento dei microrganismi al variare di T°e aW.

Grazie dell’attenzione!

AUGURI CINZIA!!!!!!!!!!!!!!