Listeria monocytogenes in tartare confezionata in *skin*

Simone Stella, Erica Tirloni
Dipartimento VESPA
Università degli Studi di Milano

Giornata di studio: Il Laboratorio Nazionale di Riferimento per *Listeria monocytogenes*
Teramo, 4 luglio 2019

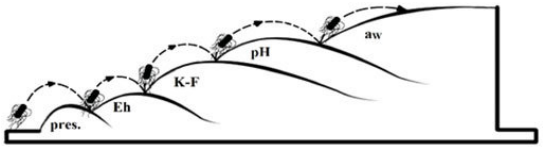
Introduzione/1

- Possibile contaminazione: alteranti (isolate 180 specie), patogeni (focolai noti)
- Elevata deperibilità

- Shelf life molto breve
- Rischio Listeria?

- EFSA, «RTE meat»: 2,07%, 0,43% > 100 UFC/g
- Ready To Eat
- Possibile commercializzazione mediante e-commerce
- Substrato permissivo (probabile…)

Hurdles:



- Confezionamento sottovuoto,
- Refrigerazione,
- Altro…

RICHIAMO

Data: 23/05/2018 Marchio del prodotto:

Denominazione di vendita: TARTARE DI BOVINO ADULTO SCOTTONA

Contaminazione non evitabile al 100 %

Regolamento CE 2073/2005:
< 100 UFC/g per tutta la vita commerciale, se l'OSA è "in grado di dimostrare, con soddisfazione dell'autorità competente, che il prodotto non supererà il limite…"

Scopo dello studio

- «Validare» la shelf life assegnata dal produttore (deperibilità)
- Valutare il potenziale di crescita di *L. monocytogenes* nel prodotto

Tartare

- Ingredienti**:** carne di bovino adulto (93%), sale, aroma, barbabietola in polvere, estratto di paprika
- Pezzatura: 70 g, confezionamento mediante *skin packaging*.
- Vita commerciale assegnata: 12 giorni a max. 4° C.

Valutazione della shelf life

- Conservazione a 4° C,
- Prelievo a 0, 5, 9 e 12 giorni di shelf life
- Analisi in triplo

Analisi microbiologiche

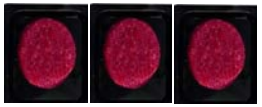
- Conta batterica totale mesofila e psicrotrofa
- *Enterobacteriaceae*
- *Pseudomonas* spp.
- Batteri lattici
- *Brochothryx thermosphacta*
- Spore di clostridi solfito-riduttori
- Lieviti e muffe

Analisi chimico-fisiche e sensoriali

- ABVT
- Parametri colorimetrici
- Valutazione sensoriale
- pH
- Acidi organici

Informazioni utili anche per il challenge test

Challenge test per la valutazione del potenziale di crescita (δ)



- 3 lotti di prodotto (1 lotto/settimana)
- Conservazione a 8° C
- 5 tempi di prelievo: 0, 2, 5, 8 e 12 giorni

Miscela di 3 ceppi di *L. monocytogenes* (LM 045, 085, 112), dal set di riferimento: isolamento dalla carne, abilità di crescita a basso pH e bassa temperatura

1. Ceppi congelati
2. BHI broth (37° C, 24 ore)
3. BHI broth (8° C, 3 giorni)
4. Conta (microscopio)
5. Diluizione
6. Preparazione della miscela

7. Inoculo della massa di prodotto (10 ml in circa 1200 g) = circa **100 UFC/g**
8. Mescolamento
9. Porzionatura (70 g)
10. Confezionamento sottovuoto

Materiali e metodi/3

Campioni inoculati

Analisi in triplo:

- Conta di *L. monocytogenes* (AFNOR): prelievo del campione intero, diluizione 1:5

Campioni "bianchi"

Analisi in singolo:

- CBT mesofila/ psicrotrofa
- LAB
- Enterobatteriacee, *Pseudomonas, B. thermosphacta*, lieviti, muffe
- pH, Aw

Calcolo del potenziale di crescita per ogni lotto

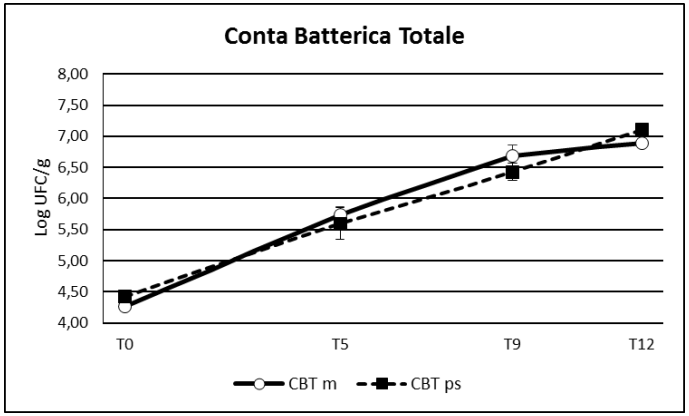
$$\delta = Mediana\, T_{12} - Mediana\, T_0$$

Scelta del valore + alto

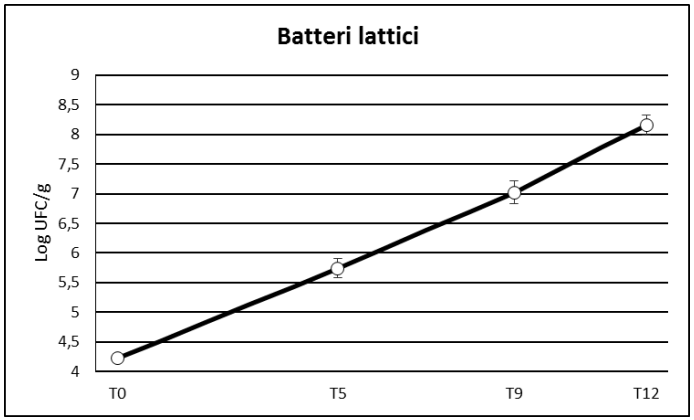
Calcolo degli incrementi durante la shelf life (eventuali picchi): T_2-T_0, T_5-T_2, T_8-T_5, T_{12}-T_8

Classificazione del prodotto (Reg. CE 2073/2005)

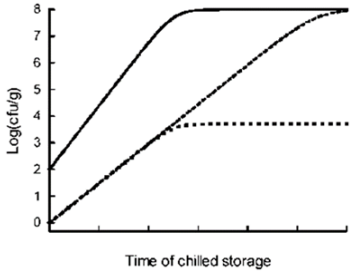
Valutazione della shelf life – Analisi microbiologiche

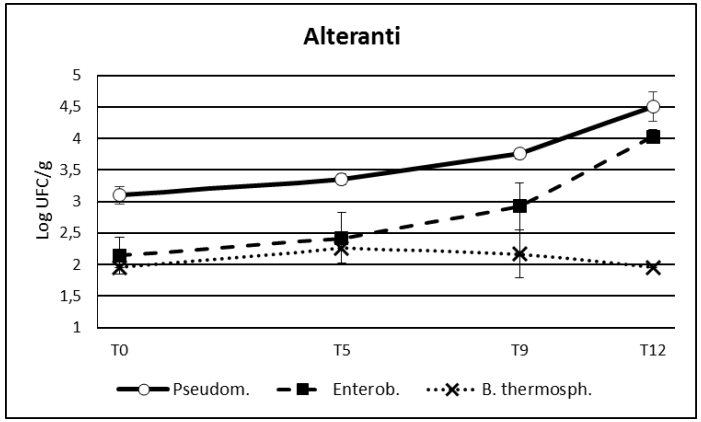


CBT: 4 → 7 Log UFC/g
Psicrotrofa = mesofila (selezione precedente)



+++ Batteri lattici: possibile antagonismo contro alteranti e Listeria?





- Enterobatteriacee, *Pseudomonas*, *Brochothrix*: crescita molto lieve o assente;
- Lieviti, muffe, clostridi: nessuno sviluppo significativo

Valutazione della shelf life – Analisi chimico-fisiche

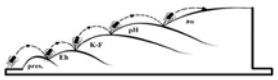
ABVT stabile, colore stabile, tenuta del prodotto…

	T_0	T_5	T_9	T_{12}
pH	5,50	5,57	5,45	5,39
Acido lattico (ppm)	20.891	21.647	25.500	24.747
Acido acetico (ppm)	< L.O.D.	< L.O.D.	1.266	5.097

Ac. lattico già presente + produzione di ac. acetico

Effetto della flora lattica

Acidificazione nella seconda parte della shelf life



È sufficiente per inibire la crescita di *L. monocytogenes*?

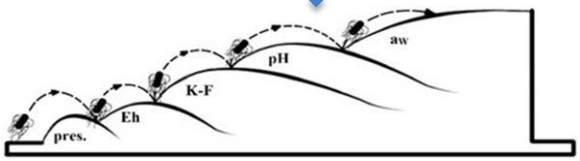
Challenge test: campioni “bianchi”

- Campioni non inoculati: assenza di *L. monocytogenes* (fortuna?)

Campioni “bianchi”

- CBT mesofila/ psicrotrofa → 3-4 Log → 7 Log UFC/g dopo 5-8 gg
- LAB → 3-4 Log → 7,5-8,6 Log UFC/g dopo 12 gg
- Enterobatteriacee, *Pseudomonas, B. thermosphacta*, lieviti, muffe → Scarso sviluppo
- pH → Acidificazione: 5,5 → 5,0/5,1 dopo 12 gg
- Aw → 0,97-0,99

Reg. CE 2073/2005: non si può considerare come substrato «sicuro»



+ acidi organici,
Eh negativo,
sale, …

Hurdles sufficienti?

Challenge test: calcolo del potenziale di crescita

Mediane	T_0	T_2	T_5	T_8	T_{12}	δ T_{12}-T_0
Lotto 1	1,60	2,02	2,11	1,88	1,98	+0,38
Lotto 2	2,15	2,06	2,19	2,36	2,53	+0,38
Lotto 3	2,51	2,55	2,41	2,50	2,50	-0,01

δ = 0,38 Log UFC/g

δ < 0,5 Log UFC/g

Scampato pericolo! Get Away Safely!

Non supporta la crescita

Ma…

«only "day 0" and "day end" are considered, but it is highly recommended to add intermediate points to consider the variability of the matrix»

Δ da T_0	T_2	T_5	T_8	T_{12}
Lotto 1	+0,42	+0,51	+0,27	+0,38
Lotto 2	-0,09	+0,04	+0,21	+0,38
Lotto 3	+0,04	-0,10	-0,01	-0,01

C'è un picco di 0,51 Log a T5: Approccio conservativo?

Risultati/5

Reg. CE 2073/2005:

- Il limite di 100 UFC/g può essere applicato «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»

Δ	T_2-T_0	T_5-T_2	T_8-T_5	T_{12}-T_8
Incremento maggiore tra i 3 lotti	+0,42	+0,13	+0,17	+0,17
Tasso di incremento giornaliero	+0,210	+0,043	+0,057	+0,043

Carica finale
< 2 Log UFC/g

Carica massima tollerabile per ogni giorno di shelf life

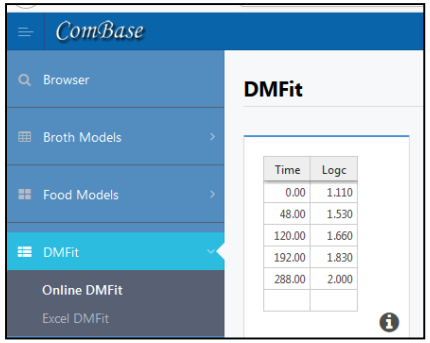
Challenge test: calcolo della carica tollerabile giornaliera

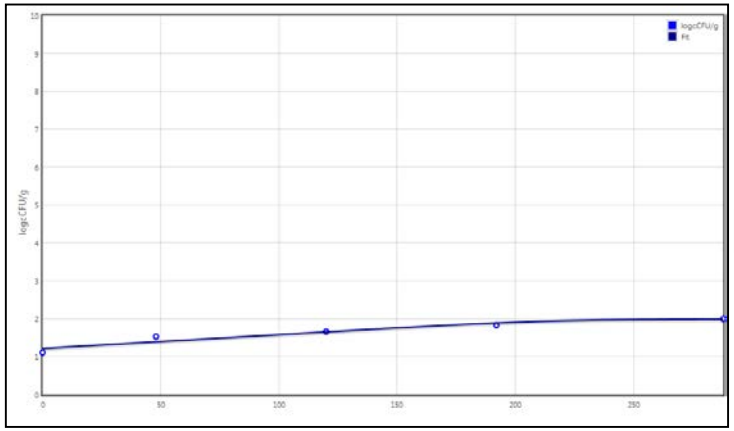
Giorno di shelf life	Log UFC/g	UFC/g
12° g	2	100
11° g	1,96	91
10° g	1,92	83
9° g	1,87	74
8° g	1,83	68
7° g	1,77	59
6° g	1,72	52
5° g	1,66	46
4° g	1,62	42
3° g	1,57	37
2° g	1,53	34
1° g	1,32	21
0 gg	1,11	**13**

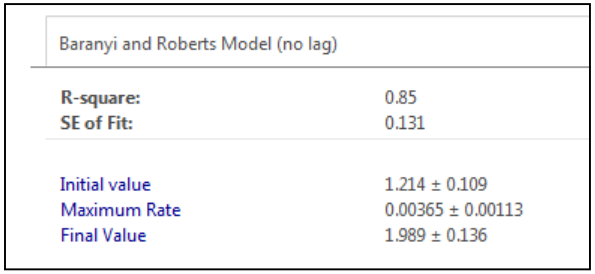
Reg. CE 2073/2005:
«se il produttore è in grado di dimostrare, con soddisfazione dell'autorità competente, che il prodotto non supererà il limite di 100 ufc/g durante il periodo di conservabilità»

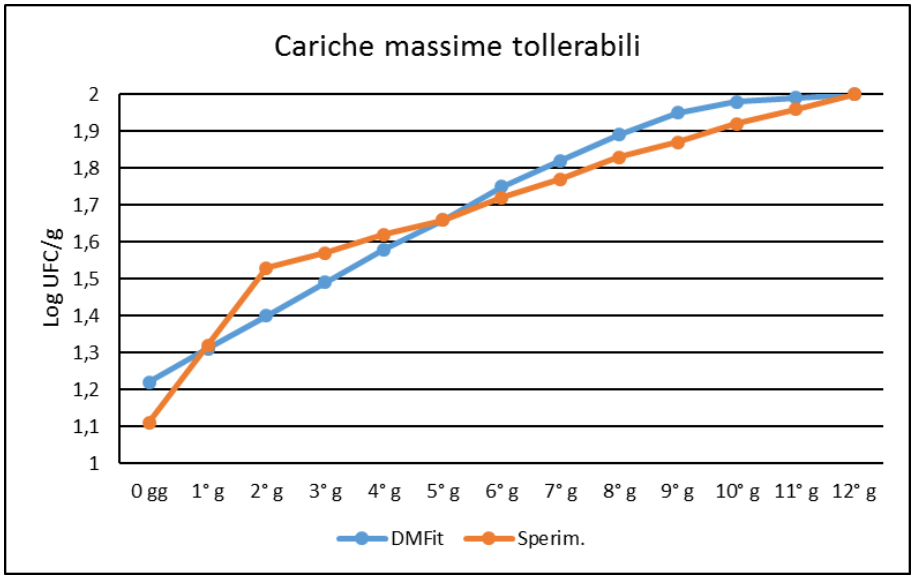
Carica iniziale «tollerabile»

Confronto con i dati ottenuti dall'utilizzo di DMFit







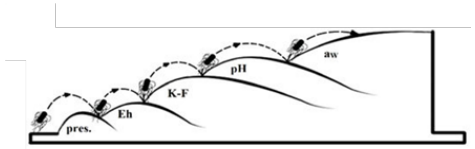


Dati sperimentali:

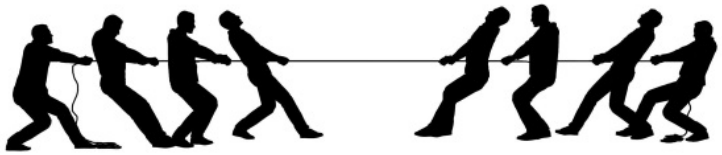
- < «tolleranza» nella carica iniziale: 1,11 *vs* 1,22 Log UFC/g
- > sviluppo nelle fasi iniziali (prima che i LAB inibiscano *Listeria*?)

Conclusioni

- Substrato meno permissivo del previsto: azione dei LAB + ambiente anaerobico….



- Non supporta la crescita ($T_{finale} – T_0$)?



Livello iniziale “tollerabile” (13 - 17 UFC/g): dovrebbe essere facile da assicurare

Se trova la positività, dovrebbe richiedere anche la conta