

Studio di challenge test nella ventricina teramana

Anna Franca Sperandii*, Gabriella Centorotola, Patrizia Tucci, Diana Neri, Francesco Pomilio, Giacomo Migliorati

Laboratorio Nazionale di Riferimento per *Listeria monocytogenes*, Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise "G. Caporale", Teramo
*a.sperandii@izs.it



Listeria monocytogenes
Laboratorio Nazionale di Riferimento



Introduzione

La ventricina teramana è un prodotto tipico abruzzese a base di carne suina; si presenta come un salume a grana spalmabile di colore aranciato. Viene prodotta utilizzando guancia, pancetta e ritagli di prosciutto di suino, macinati finemente e amalgamati con peperoncino piccante e altre spezie. In passato, l'impasto veniva conservato solo nello stomaco (che dà il nome all'insaccato) o nella vescica di suino, mentre oggi viene commercializzato anche in barattoli di vetro di varie capacità. Se conservata a una temperatura di 10-15 °C ha una shelf life di 6 mesi. Essendo un alimento tradizionale pronto per il consumo, generalmente consumato crudo dopo alcuni giorni dalla preparazione (15 gg), rientra nel campo di applicazione del Reg. CE 2073/2005 sui criteri microbiologici. Tale regolamento prevede che gli operatori del settore alimentare provvedano affinché i prodotti alimentari siano conformi ai relativi criteri microbiologici ed effettuino studi sul prodotto per determinare la capacità dei microrganismi patogeni, debitamente inoculati, di svilupparsi o sopravvivere nel prodotto in diverse condizioni di conservazione. Per la ventricina teramana vi è una carenza di dati scientifici che valutino sia i livelli igienico sanitari del prodotto che il comportamento di microrganismi patogeni durante le fasi di produzione e conservazione. I challenge test sono strumenti scientifici utilizzati per determinare i livelli di sicurezza igienico-sanitaria degli alimenti e dei processi di produzione. Scopo del presente lavoro è stato quello di progettare specifici challenge test per valutare, dopo contaminazione artificiale, il comportamento di *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium ed *Escherichia coli* O:157 in relazione alle variazioni del pH, dell' a_w e della flora microbica autoctona, durante il processo di produzione. La selezione dei ceppi batterici è stata effettuata in funzione dei microrganismi patogeni più frequentemente coinvolti in episodi di tossinfezione alimentare, ipotizzando una contaminazione accidentale delle materie prime utilizzate per la preparazione del prodotto (10) (12). La preparazione dei ceppi e la contaminazione della matrice alimentare sono state effettuate in accordo con la Guida tecnica del Laboratorio di Riferimento Europeo per *Listeria monocytogenes* (3). I dati ottenuti permetteranno di classificare la ventricina come alimento che supporti o meno la crescita dei patogeni studiati (δ) (11).

Materiali e metodi

Produzione dell'alimento. Sono stati utilizzati circa 24 kg di impasto di ventricina teramana, forniti da una azienda che opera nel territorio della provincia di Teramo, prodotta secondo la ricetta tradizionale. L'impasto è stato suddiviso in laboratorio in 4 aliquote di 6 Kg ciascuna, una è stata utilizzata come lotto di controllo e le altre tre sono state contaminate ciascuna con una delle tre specie di batteri patogeni. Gli ingredienti utilizzati per la produzione sono stati: grasso di pancetta di suino 60 - 70 %; ritagli/rifilature di carne suina 30 - 40 %; bucce di arancia, sale, peperoncino piccante in polvere, pepe nero, aglio e rosmarino. Il prodotto è stato successivamente confezionato in vasetti di vetro sterili da 350 g stoccati in cella termostatica (Piardi CC2000) per 196 gg a 10 ± 1 °C (17 vasetti per lotto) (Figura 1).

Ceppi batterici. La sospensione batterica di inoculo per la contaminazione, per ciascuna delle tre specie patogene, è stata preparata con una mix di due ceppi: un ceppo di riferimento ATCC e un altro isolato da prodotti a base di carne suina. Nello specifico per *Listeria monocytogenes*, il ceppo ATCC 7644 e il ceppo EURL 12MOB046LM isolato da prodotti a base di carne; per *Salmonella* Typhimurium, il ceppo ATCC 14028 e un ceppo isolato da salamella; per *Escherichia coli* O:157, il ceppo ATCC25952 e il ceppo 206M/13/A1. I ceppi sono stati adattati in BHI modificato a pH 5,5 e NaCl 2,3 % (tipici del prodotto oggetto di studio) alla temperatura di 10 ± 1 °C, fino al raggiungimento della fase di crescita stazionaria. La contaminazione è stata effettuata nell'impasto di ogni aliquota con un volume di inoculo inferiore all'1 % del peso totale, in modo da ottenere una concentrazione di 10^5 ufc/g nel prodotto finito.

Campionamento e analisi. Su tutti i lotti e per tutto il periodo di conservazione (196 gg) sono stati effettuati campionamenti periodici, secondo il seguente calendario: $T_0, T_7, T_{14}, T_{21}, T_{28}, T_{42}, T_{56}, T_{70}, T_{84}, T_{98}, T_{112}, T_{126}, T_{140}, T_{154}, T_{168}, T_{182}, T_{196}$ (T= giorni). Il T_0 rappresenta il giorno della contaminazione del prodotto nonché l'inizio della fase di conservazione. La presenza naturale dei tre patogeni è stata valutata sul campione di controllo al T_0 . In Tabella 1 sono riportati i metodi di prova utilizzati e gli accertamenti eseguiti sui lotti contaminati e sul lotto di controllo. Tutte le analisi sono state condotte in tre repliche per ogni campionamento/tempo.

Figura 1. Fasi della preparazione della ventricina teramana per il challenge test.



Risultati

I risultati sono stati calcolati considerando il valore medio e la rispettiva deviazione standard.

Gli andamenti del pH e dell' a_w hanno subito un decremento nel tempo.

Il pH è diminuito rapidamente da un valore iniziale medio di $5,53 \pm 0,01$ a T_0 , a $4,72 \pm 0,01$ a T_7 , e ad un valore di $4,44 \pm 0,01$ a T_{196} .

Nella Figura 2 sono stati rappresentati gli andamenti di *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Typhimurium ed *Escherichia coli* O:157, in funzione dell' a_w .

Il valore di a_w si è ridotto gradualmente, passando da un valore medio di $0,972 \pm 0,001$ a T_0 ad un valore di $0,935 \pm 0,001$ a T_{196} .

Per tutti i lotti è stato osservato un evidente declino della concentrazione dei patogeni, arrivando ad una concentrazione inferiore al limite di rilevamento del metodo a T_{84} per *L. monocytogenes* ed *E. coli* O:157 e a T_{98} per *S. Typhimurium*.

Nella Figura 3 è stato riportato l'andamento della flora lattica autoctona (lattococchi e lattobacilli). Si evidenzia un incremento di lattobacilli e di lattococchi, già nella prima settimana del periodo di stagionatura, da una carica iniziale rispettivamente di $7,54 \pm 0,03 \log_{10}$ ufc/g e $7,47 \pm 0,03 \log_{10}$ ufc/g a cariche di $8,76 \pm 0,02 \log_{10}$ ufc/g e di $8,78 \pm 0,03 \log_{10}$ ufc/g a T_{21} . Successivamente è stata osservata una diminuzione graduale dei lattobacilli e dei lattococchi che hanno raggiunto rispettivamente, a T_{196} , una concentrazione di $6,36 \pm 0,03 \log_{10}$ ufc/g e $5,90 \pm 0,01 \log_{10}$ ufc/g.

I risultati ottenuti nel corso del challenge test hanno permesso di calcolare il potenziale di crescita.

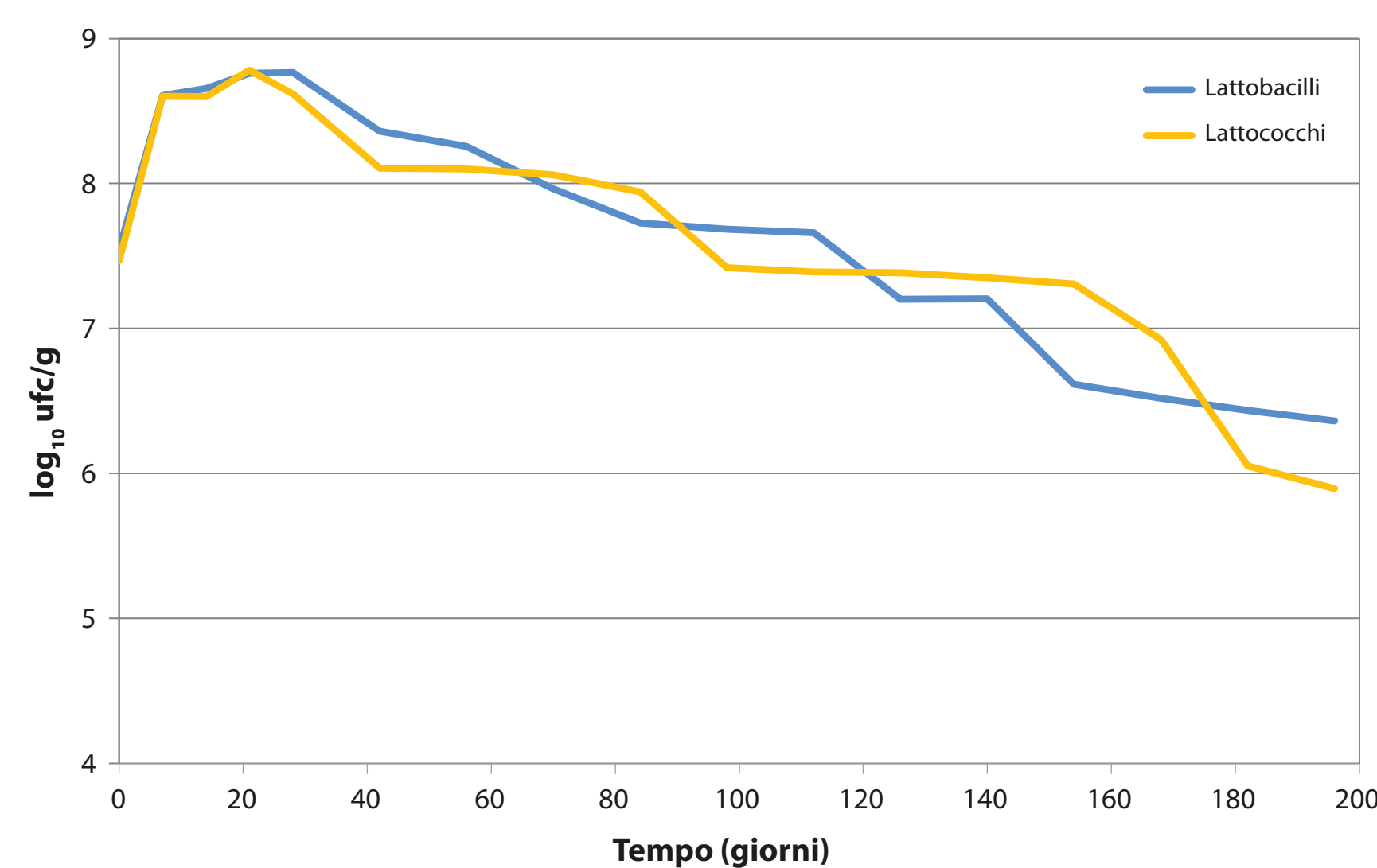
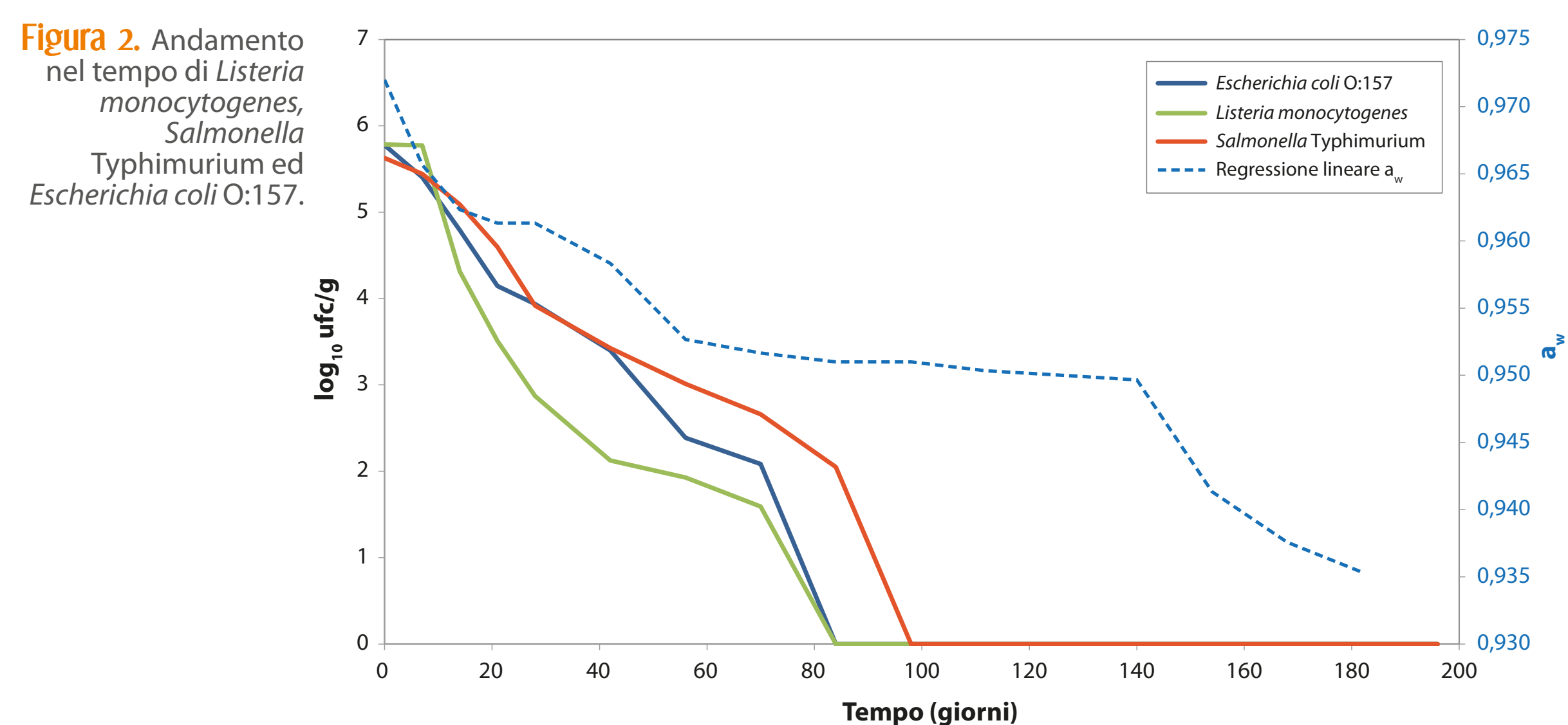


Tabella 1. Elenco dei metodi di prova impiegati, metodo di analisi e accertamenti eseguiti nei lotti contaminati e nel lotto di controllo.

Accertamento eseguito	Metodo	Lotti contaminati	Lotto di controllo
Determinazione dell'attività dell'acqua	ISO 21807:2004 (7)		X
Determinazione del pH	Metodo interno		X
Numerazione <i>E. coli</i> O:157	Metodo interno	X	
Numerazione Lattobacilli	ISO 15214:1998 (6)		X
Numerazione Lattococchi	Rapporti ISTISAN 08/36 (16)		X
Numerazione <i>L. monocytogenes</i>	ISO 11290-2:1998/Amendment 1:2004 (5, 17)	X	
Numerazione <i>Salmonella</i> spp.	Metodo interno	X	
Ricerca di <i>L. monocytogenes</i>	ISO 11290-1:1996/Amendment 1:2004 (4, 14)		X
Ricerca di <i>Salmonella</i> spp.	ISO 6579:2002 - Cor 1:2004 (8, 15)		X
Ricerca <i>E. coli</i> O:157	ISO 16654:2001 (9)		X

Conclusioni

Sulla base dei risultati ottenuti, la ventricina teramana non costituisce terreno favorevole alla crescita di *L. monocytogenes* ($< 0,5 \log_{10}$ ufc/g). L'applicazione degli stessi parametri di crescita microbica a *S. Typhimurium* ed *E. coli* O:157, per i quali non esistono linee guida specifiche, consente di trarre le stesse conclusioni.

La riduzione della carica microbica dei tre patogeni, durante la conservazione, potrebbe essere collegata alla precoce acidificazione del prodotto e alla competizione esercitata dalla flora microbica autoctona (13). Tuttavia sono necessari ulteriori studi per dimostrare l'attività antibatterica esercitata da questi due fattori.

Anche gli acidi m-cumarico e cinammico contenuti nel peperoncino (2), potrebbero aver svolto un'attività antibatterica (1).

Sebbene la ventricina non supporti lo sviluppo dei microrganismi patogeni utilizzati nello studio, non è in grado di assicurare la loro completa inattivazione, pertanto una contaminazione accidentale del prodotto durante le fasi di produzione e conservazione potrebbe rappresentare un potenziale rischio per il consumatore.

Bibliografia

- Corona A. & Quaglio P. 2001. Sensibilità di *Escherichia coli* VTEC ad erbe e spezie. *Industrie alimentari*, luglio-agosto, 738-740.
- Dorantes L., Colmenero R., Hernandez H., Mota L., Jaramillo M.E., Fernandez E. & Solano C. 2000. Inhibition of growth of some foodborne pathogenic bacteria by Capsicum.
- EURL *Listeria monocytogenes* ANSES. 2014. Technical guidance document for conducting shelf-life studies on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Version 3 – 6 June 2014.
- International Organization for Standardization (ISO). 1996. ISO 11290-1:1996. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* - Part 1: Detection method.
- International Organization for Standardization (ISO). 1998. ISO 11290-2:1998. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* - Part 2: Enumeration method.
- International Organization for Standardization (ISO). 1998. ISO 15214:1998. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria - Colony-count technique at 30 degrees C.
- International Organization for Standardization (ISO). ISO 21807:2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Determination of water activity.
- International Organization for Standardization (ISO). 2002. ISO 6579:2002. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.
- International Organization for Standardization (ISO). 2001. ISO 16654:2001. Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the detection of *Escherichia coli* O157.
- Organizzazione Mondiale della Sanità. 2008. Foodborne disease outbreaks: guidelines for investigation and control. World Health Organization.
- Reg. (CE) 2073/2005 della Commissione del 15 Novembre 2005 sui Criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari.
- Thévenot D., Dernburg A., Verzozy-Rozand C. 2006. An updated review of *Listeria monocytogenes* in the pork meat industry and its products. *J Appl Microbiol*, 101 (1), 7-17.
- Vignolo G.M., Suriani F., Pesce de Ruiz Holgado A., Oliver G. 1993. Antibacterial activity of *Lactobacillus* strains isolated from dry fermented sausages. *Journal of Applied Bacteriology*, 75 (4), 344-349.
- International Organization for Standardization (ISO). 2004. ISO 11290-1:1996/Am 1:2004. Modification of the isolation media and the haemolysis test, and inclusion of precision data.
- International Organization for Standardization (ISO). 2004. ISO 6579:2002/Cor 1:2004.
- Aureli P., Fiore A., Scalfaro C., Franciosa G. 2008. Metodi microbiologici tradizionali e metodi molecolari per l'analisi degli integratori alimentari a base di o con probiotici per uso umano. Roma: Istituto Superiore di Sanità. (Rapporti ISTISAN 08/36).
- International Organization for Standardization (ISO). 2004. ISO 11290-2:1998/Am 1:2004. Modification of the enumeration medium.