

PRODOTTI DI GASTRONOMIA PRONTI AL CONSUMO E RISCHIO *LISTERIA MONOCYTOGENES*

LISTERIA MONOCYTOGENES RISK EVALUATION IN READY TO EAT DELI PRODUCTS

Grassi M.A., Pistone V.(*), Chiesa F., Civera T.

Dipartimento di Patologia Animale- Via L. da Vinci 44- 10095 Grugliasco; *ASL TO-3

SUMMARY

Listeria monocytogenes has become one of the major concerns for food safety. Its ability to survive and replicate at low temperature, pH and high salt concentration, makes the bacterium a threat, mostly for RTE products. For these reasons, the present research was aimed at detecting the ability of growth of *L. monocytogenes* in RTE products retrieved from one deli store. Samples were analysed for *L. monocytogenes* detection, then inoculated with the pathogen (10^5 cell/ml) and stored at refrigeration temperature for the duration of their shelf-life (15-60 days). In all the products *L. monocytogenes* was not detected before experimental contamination. The challenge test evidenced that experimentally inoculated *L. monocytogenes* was not able to multiply for the duration of the entire shelf-life. These results indicated that the tested products could be considered as foods which are not able to support the growth of *L. monocytogenes*, as indicated by E.C. Regulation 2073/05. However, in order to guarantee consumer's safety, it needs to be emphasized the need of a correct application of the GMPs, required for lowering the risk of initial contamination.

Keywords

L. monocytogenes, Challenge test, R.T.E. products.

INTRODUZIONE

Negli ultimi 25 anni *Listeria monocytogenes* ha assunto una notevole importanza quale agente di malattia alimentare con un'incidenza nei 26 paesi membri di circa 0,3 casi su 100.000 persone (1). La distribuzione ubiquitaria di tale microrganismo, la sua capacità di moltiplicarsi a temperatura di refrigerazione, nonché l'abilità adattativa allo stress e ad ambienti con bassi valori di pH, elevati contenuti in cloruro di sodio, rendono particolarmente difficile la sua eliminazione dalla catena alimentare (2). Secondo uno studio condotto dall'International Life Science Institute (3) vengono definiti ad alto rischio quegli alimenti che abbiano la possibilità di essere contaminati da *L. monocytogenes*, ne supportino lo sviluppo, siano pronti al consumo (RTE), richiedano di essere conservati a temperatura di refrigerazione ed abbiano una shelf-life prolungata. Ciò che diffe-

renza gli alimenti ad alto rischio da quelli a basso rischio è soprattutto la capacità dei primi di rappresentare un buon substrato per lo sviluppo di *L. monocytogenes* che, in tal modo, può raggiungere cariche elevate. Nell'ambito della Comunità Europea, il Comitato scientifico per le misure veterinarie in relazione alla salute pubblica (CSMVSP), ha raccomandato che la concentrazione di tale microrganismo, negli alimenti, sia inferiore a 100 ufc/g. Tali indicazioni sono diventate oggetto del Regolamento Comunitario 2073 del 2005 (4), che prevede criteri distinti per le diverse tipologie di alimenti. Negli alimenti pronti per lattanti e pronti a fini medici speciali, *L. monocytogenes* deve essere assente in 25 g, mentre per gli alimenti RTE vengono distinte due differenti tipologie di criterio:

- alimenti pronti che costituiscono un terreno favorevole alla crescita di *L. monocytogenes*, limite di 100 ufc/g per i prodotti immessi sul mercato

durante il loro periodo di conservabilità;
 - alimenti pronti che non costituiscono un terreno favorevole alla crescita del microrganismo, il limite viene fissato in 100 ufc/g per i prodotti immessi sul mercato durante tutta la loro shelf-life.

Alla luce di queste indicazioni abbiamo sviluppato uno studio per valutare il rischio *L. monocytogenes* in preparazioni gastronomiche RTE monitorando sia la presenza del microrganismo negli elaborati a fine produzione sia verificando la possibilità di sviluppo o riduzione nel corso della vita commerciale tramite challenge test.

MATERIALI E METODI

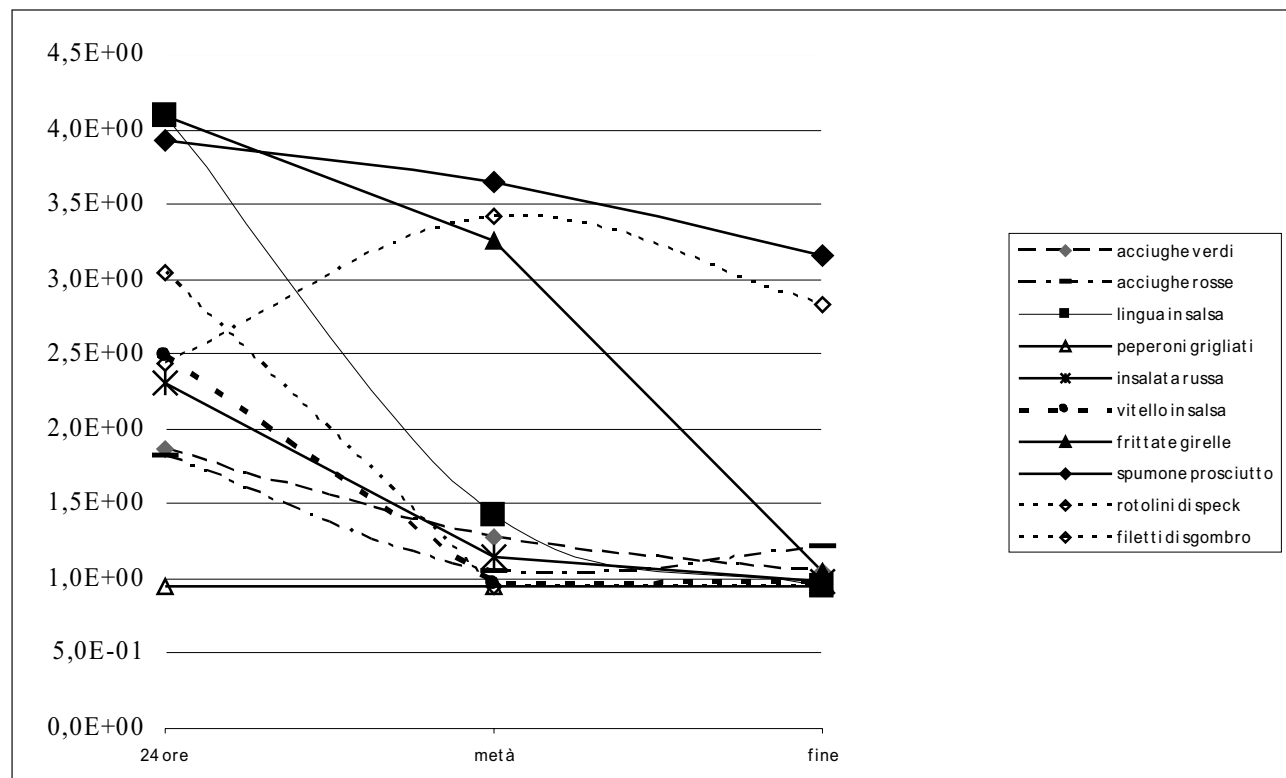
L'indagine è stata svolta presso uno stabilimento adibito alla preparazione di prodotti gastronomici sito nella regione Piemonte. Il protocollo prevedeva un primo screening, atto a valutare, su tutte le tipologie di preparazioni allestite, i valori di pH ed Aw al momento della preparazione e le loro variazioni durante il periodo di conservabilità. Tale screening ha permesso di focalizzare l'attenzione su 10 preparazioni con shelf-life compresa fra 15 e 60 giorni e con le caratteristiche fisico-chimiche riportate in tabella I.

Tabella I – Preparazioni gastronomiche considerate nella presente indagine

	pH	Aw	Shelf life
acciuoghe sott'olio in salsa verde	4,2	0,83	35 gg
acciuoghe sott'olio in salsa rossa	5,09	0,89	35 gg
rotolini di speck in olio	4,5	0,96	35 gg
peperoni grigliati in olio	4,2	0,97	35 gg
insalata russa con tonno	4,3	0,98	30 gg
vitello tonnato	4,7	0,96	30 gg
lingua in salsa	4,3	0,95	60 gg
spumoni di prosciutto cotto in gelatina	4,8	0,98	15 gg
frittate girelle in gelatina	4,2	0,99	15 gg
filetti di sgombro in olio	4,01	0,97	60 gg

Non sono state considerate, ai fini dell'indagine, sia le preparazioni con valori di pH non idonei allo sviluppo del microrganismo (3,50 – 4,00) sia quelle con valori decisamente ottimali per lo sviluppo (5,80 – 5,90), così come le preparazioni di pasta (cannelloni, lasagne, gnocchi di semola) ove le indicazioni in etichetta richiamaivano la necessità di un'ulteriore cottura. Per ogni tipologia di preparazione sono state prelevate presso lo stabilimento 20 vaschette del peso di circa 100 g da sottoporre ad analisi seguendo il seguente protocollo:

Grafico 1 - Evoluzione di *L.monocytogenes* durante il periodo di conservabilità (valori medi log ufc/g).



- cinque aliquote venivano analizzate subito dopo il confezionamento per escludere la presenza di *L. monocytogenes* con metodica ISO 11290-1 (5);
- le restanti venivano inoculate con 1 ml di brodcoltura contenente 10^5 /ml *L. monocytogenes*, appartenenti ai sierotipi 4d/4e, 1/2 a, 3a. Le vascchette, mantenute a temperatura di refrigerazione (+4°C) sino al momento dell'analisi, erano analizzate, a gruppi di cinque, con metodica ISO 11290-2 (5), a 24 ore dall'inoculo, a metà ed alla fine del periodo di vita commerciale.

Su tutte le 20 aliquote è stata anche eseguita un'ulteriore misurazione di Aw (AquaLab CX-3) e pH (pH meter 744 – Metrohm).

RISULTATI

La ricerca qualitativa di *Listeria* è risultata negativa per tutti i campioni, fatta eccezione per un lotto di rotolini di speck, positivi per *Listeria* spp. ma negativi per *L. monocytogenes*. I risultati relativi ai campioni inoculati, sono riportati in grafico1; la carica iniziale, di 10^5 ufc/g, ha subito riduzione in

tutte le tipologie analizzate pur con alcune differenze. Infatti, dopo 24 h dall'inoculo, si è rilevata la diminuzione di un'unità logaritmica in frittate, spumoni di prosciutto e lingua in salsa; di 2-3 unità logaritmiche in filetti di sgombro, rotolini di speck, vitello tonnato e insalata russa con tonno; >3 unità logaritmiche in acciughe, tanto in salsa rossa che in salsa verde, e peperoni grigliati. A metà del periodo di conservazione, si hanno valori inferiori a 100 ufc/g, con una riduzione di 4 unità logaritmiche, per tutte le tipologie ad eccezione di spumoni di prosciutto cotto, rotolini di speck e frittate, che mantengono una carica superiore a 10^3 ufc/g.

A fine shelf-life solo spumoni di prosciutto e rotolini di speck mantengono contaminazioni rilevanti intorno a 10^3 ufc/g.

I valori di pH e Aw sono riportati in tabella II: non si riscontrano variazioni rilevanti nel periodo di osservazione; è stato tuttavia registrato un incremento del valore di pH nelle acciughe in salsa verde (da 4,2 a 5,0) e nei rotolini di speck (da 4,5 a 5,29), ed una riduzione nelle acciughe in salsa rossa (da 5,0 a 4,0) e nei peperoni grigliati (da 4,2 a 3,93).

Tabella II - Andamento del pH e dell'Aw nel corso della conservazione.

A: 24 h; B: metà shelf-life; C: termine shelf-life.

	pH/Aw		
	A	B	C
acciughe in salsa verde	4,2 /0,83	4,58/0,82	5,07/0,82
acciughe in salsa rossa	5,09/0,89	4,46/0,89	4,02/0,88
rotolini di speck in olio	4,5/0,96	4,43/0,95	4,38/0,96
peperoni grigliati in olio	4,2/0,97	4,11/0,98	3,93/0,97
insalata russa con tonno	4,3/0,98	4,29/0,97	4,1/0,98
vitello tonnato	4,7/0,96	4,81/0,96	4,5/0,96
lingua in salsa	4,3/0,95	4,31/0,99	4,43/0,99
spumoni di prosciutto cotto	4,8/0,98	4,63/0,98	4,51/0,98
frittate girelle in gelatina	4,2/0,99	4,7/0,98	5,29/0,95
filetti di sgombro in olio	4,01/0,97	4,08/0,97	4,12/0,97

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

Gli alimenti RTE sono considerati i maggiori responsabili degli episodi di listeriosi umana.. Indagini condotte (6) hanno evidenziato che *L. monocytogenes* è presente nel 1,82% degli alimenti RTE in commercio, con percentuali di isolamento più elevate in insalate a base di pesce e salmone affumicato; bassi livelli, pari all'1,6%, sono stati evidenziati anche da altri autori (2) con percentuali di po-

sività più elevate nel salmone affumicato.

Nessuna preparazione gastronomica da noi esaminata è risultata positiva per *L. monocytogenes* e in un solo lotto di rotolini di speck si è riscontrata *Listeria* spp.

Gli inoculi sperimentali, condotti in modo da ottenere cariche di *L. monocytogenes* più elevate rispetto a quelle comunemente riscontrate negli alimenti (6), hanno evidenziato che *L. monocytogenes* non è in grado di svilupparsi in questi substrati e,

negli alimenti a maggior contenuto vegetale e/o con Aw inferiore, la riduzione è rilevante ed immediata. Per quanto riguarda gli alimenti conservati sott'olio o comunque con salse oleose (peperoni sott'olio, lingua in salsa, vitello tonnato, acciughe con salsa rossa e verde), si può ipotizzare un'attività listericida svolta da composti fenolici presenti nell'olio, come già messo in evidenza per l'olio di oliva (7,8), così come un effetto negativo sulla vitalità delle cellule svolto dalla diminuzione del contenuto di acqua. Infatti in ambienti poveri di acqua è stato segnalato come *L. monocytogenes* possa permanere per lungo tempo, pur non essendo coltivabile soprattutto in terreni selettivi come Palcam e Fraser (9,10) impiegati con il metodo ISO previsto dal Reg. CE 2073/05.

In definitiva tutti i campioni prelevati al termine dell'allestimento e analizzati nell'arco di 24 h rientravano nel limite fissato dal Reg. CE 2073/05 relativamente all'assenza in 25 g (prima che gli alimenti non siano più sotto il controllo del produttore). I risultati del challenge test sono piuttosto confortanti, in quanto si evidenzia che il microrganismo non è in grado di moltiplicarsi in nessuno dei substrati considerati, che possono quindi considerarsi alimenti non idonei allo sviluppo di *L. monocytogenes* in condizioni di corretta conservazione in frigorifero, a temperatura massima di +4°C. Al fine di garantire comunque la sicurezza del consumatore è indispensabile il rispetto delle GMP da parte dell'operatore, per limitare la contaminazione iniziale, dal momento che soprattutto per alcune tipologie, la riduzione nelle prime 24 ore dal confezionamento è contenuta.

BIBLIOGRAFIA

- 1) EFSA (2007). Request for updating the former SCVPH opinion on *Listeria monocytogenes* risk related to ready-to-eat foods and scientific advice on different level of *Listeria monocytogenes* in ready to eat foods and the related risk for human illness. The EFSA Journal 599, 1-42
- 2) Latorre L., Parisi A., Fraccalvieri R., Normanno G., Nardella, La Porta M.C., Goffredo E., Palazzo L., Ciccarese G., Addante N., Santagada G. (2007). Low prevalence of *Listeria monocytogenes* in foods from Italy. *J. Food. Prot.* 70,6, 1507-1512
- 3) International Life Science Institute (2005). Achieving continuous improvement in reductions in foodborne-listeriosis- a risk based approach. *J. Food. Prot.* 68,6, 1932-94
- 4) Regolamento CE n. 2073/2005 del 15 novembre 2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari
- 5) Metodica EN ISO 11290 – 1 e 2:1998/A1 – Metodo orizzontale per la ricerca e la conta di *Listeria monocytogenes*. Aprile 2005
- 6) Gombas D.E, Chen Y., Clavero R.S., Scott V. (2003). Survey of *Listeria monocytogenes* in Ready – to-Eat Foods. *J. Food. Prot.* 66, 4, 559-569
- 7)
- 8) Medina E., de Castro A., Romero C., Brenes M. (2006). Comparison of the concentrations of phenolic compounds in olive oils and other plant oils: correlation with antimicrobial activity. *J.Agric Food Chem.* 54,4954-4961.
- 9) Medina E., Romero C., Brenes M., de Castro A. (2007). Antimicrobial activity of olive oil, vinegar, and various beverages against foodborne pathogens. *J Food Prot.* 70, 1194-1199.
- 10) Besnard V., Federighi M., Declercq E., Jugiau F., Capelier JM. (2002) . Environmental and physico-chemical factors induce VBNC state in *Listeria monocytogenes*. *Vet.Res.* 33, 359-370.
- 11) Dreux N., Albagnac C., Federighi M., Carlin F., Morris Ce, Nguyen-the C. (2007). Viable but non-culturable *Listeria monocytogenes* on parsley leaves and absence of recovery to a culturable state. *J. Appl. Microbiol.* 103, 1272-1281.