

COMPORTAMENTO DI *LISTERIA MONOCYTOGENES* IN SUGHI FRESCHI.

BEHAVIOUR OF LISTERIA MONOCYTOGENES IN FRESH SAUCES

Grassi M.A., Nucera D., Morra P., Civera T.

Dipartimento di Patologia Animale – Facoltà di Medicina Veterinaria - Grugliasco (TO)

SUMMARY

Ready to use fresh sauces are among Ready to Eat foods for which producers need to respect the 100 UFC/g limit for the presence of *L. monocytogenes*. In the current research a Challenge test was performed on fresh mushroom and cheese sauces. Both were placed at two storage temperatures and the *L. monocytogenes* potential growth (δ) was evaluated. Only cheese sauce stored at 8°C showed a $\delta > 0,5 \log_{10}$ UFC/g. However, considering the limited initial contamination it can be excluded that the product could reach 100 UFC/g by the expiration date.

KEYWORDS

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

INTRODUZIONE

La listeriosi è ancora una delle più gravi malattie di origine alimentare della nostra società, a causa della gravità delle manifestazioni (incluse setticemia, meningite e morte fetale), con un tasso di letalità compreso tra il 20 % e 50%. Come descritto dal report comunitario dell'EFSA relativo alle zoonosi (1), gli alimenti Ready-To-Eat (RTE), tra cui prodotti ittici, prodotti carnei e formaggio (2; 3) risultano le maggiori fonti di contaminazione. Per garantire un migliore controllo della contaminazione da *Listeria monocytogenes* lungo tutta la vita commerciale dell'alimento, il produttore, nell'ambito dell'applicazione di quanto indicato nel Regolamento CE 2073/2005 (4) può, tra l'altro, condurre challenge test. A questo proposito nel 2008, è stato redatto, a cura dell'AFSSA (Agence Française de Sécurité Sanitaire Des Aliments) un documento tecnico di orientamento per gli studi sulla vita commerciale degli alimenti pronti al consumo inerenti *Listeria monocytogenes* (5).

Il documento descrive le procedure microbiologiche per determinare la crescita di *L. monocytogenes* mediante challenge test, utilizzando la valutazione della crescita potenziale (δ), o la stima del tasso di crescita massimo (μ_{max}), nonché studi di conservabilità. Per la valutazione del potenziale di crescita (δ),

gli alimenti contaminati, vengono mantenuti nelle condizioni che realisticamente si verificano nelle fasi di trasporto, distribuzione e stoccaggio, fino al momento del consumo.

Tra gli alimenti RTE, potenziali substrati per lo sviluppo di *Listeria monocytogenes*, rientrano anche i sughi e le salse fresche, minimamente trattati, pronti al consumo, che rappresentano una produzione molto richiesta dai consumatori: secondo una ricerca condotta da Nielsen nel 2009, le vendite di tali prodotti hanno sfiorato le 46.000 tonnellate (6). A tale diffusa richiesta, si associa la difficoltà di garantire un livello elevato di sicurezza: si tratta infatti di alimenti che per le caratteristiche merceologiche e per diversi fattori intrinseci, rappresentano un buon substrato per lo sviluppo di diversi microrganismi. Eventuali contaminazioni possono infatti verificarsi sia in fase di lavorazione sia a seguito di contaminazione crociata per carenze igieniche o mancato rispetto delle corrette procedure di lavorazione (rispetto dei parametri tempo-temperatura) (7). A seguito della segnalazione relativa ad un superamento dei limiti previsti per *L. monocytogenes*, abbiamo condotto uno studio per valutare, utilizzando il challenge test, il comportamento di tale microrganismo durante la vita commerciale di salse fresche, da utilizzare come condimento per pasta.

MATERIALI E METODI

Il test è stato eseguito su due tipologie di salse fresche, non pastorizzate :

- salsa ai formaggi prodotta a partire dai seguenti ingredienti: latte parzialmente scremato, fontal (latte, caglio, sale, conservante: E251), grana padano DOP [latte, caglio, sale, conservante: lisozima (proteina dell'uovo)], gorgonzola, olio di semi di girasole, panna in polvere, proteine del latte, farina di riso, pepe, sale, acidificante: E330, antiossidante: E300
- salsa ai funghi prodotta a partire dai seguenti ingredienti: Funghi: champignons (*Agaricus bisporus*), porcini (*Boletus edulis*, *Boletus aureus*, *Boletus pinophilus*, *Boletus reticulatus*, *Boletus luteus*), chiodini (*Pholiota mutabilis*, *Lentinus edodes*, *Pleurotus ostreatus*), Olio di semi di girasole, Cipolle, Grana Padano DOP [latte, sale, caglio, conservante: lisozima (proteina dell'uovo)], Farina di riso, Prezzemolo, Zucchero, Siero di latte, Panna, Sale, Fibra vegetale, Estratto di lievito, Aglio, Pepe, Acidificante: E330, Antiossidante: E300.

Per entrambi i prodotti viene indicata una conservabilità di 31 giorni a temperatura di 2-4°C.

Per ogni tipologia di salsa sono state prelevate, presso lo stabilimento, 110 aliquote da sottoporre ad analisi seguendo il seguente protocollo:

- cinque aliquote venivano analizzate subito dopo il confezionamento per escludere la presenza di *Listeria monocytogenes* con Metodica ISO 11290-1(9);
- le restanti 100 aliquote, di entrambe le tipologie, venivano inoculate con 1 ml di brodocoltura contenente tre differenti ceppi di *L. monocytogenes*, precedentemente isolati da matrici alimentari e appartenenti ai sierotipi 4d/4e, 1/2a e 3b, con carica pari a 10³ UFC/g. Le vaschette contaminate sono state quindi stoccate per tutto il periodo del test a due differenti temperature, rispettivamente a 4° e 8°C: quest'ultima è stata scelta in considerazione della temperatura più elevata dei frigoriferi domestici rispetto ai 4°C della distribuzione. Il test ha previsto quindi l'analisi quantitativa (ISO-11290-2) (9) di 5 vaschette per ogni tipologia di salsa ad intervalli regolari (due volte a settimana), sino alla fine della vita commerciale delle stesse.
- E' stata inoltre conteggiata la flora lattica impiegando MRS Agar (Oxoid) in

microaerofilia a 37°C per 48 ore.

Parallelamente al conteggio di *L. monocytogenes*. è stata eseguita, su tutte le aliquote analizzate, la misurazione di Aw (AquaLab CX-3) e pH (pH meter 744 - Metrohm).

RISULTATI

Ad inizio sperimentazione si registra per entrambi i prodotti una Aw di 0,97 e pH di 5,7 per la salsa ai formaggi e 5,25 per quella ai funghi.

Nella tabella n.1 sono riportati i risultati per quanto concerne il sugo al formaggio, mentre in tabella n.2 i dati relativi a quello ai funghi. La concentrazione dei microrganismi viene espressa come mediana (log₁₀UFC/g).

Per quanto riguarda le salse al formaggio, la flora lattica è compresa fra 5,11 e 7,63 log₁₀ UFC/g nel prodotto conservato a 4°C e tra 6,68 e 8,58 log₁₀ufc/g in caso di stoccaggio a 8°C, dove il prodotto manifesta anche una maggior acidità a partire dal 18 giorno. Per quanto riguarda il comportamento di *L. monocytogenes*, che presenta al primo giorno valori compresi fra 3,28 e 3,49 log₁₀ UFC/g, la carica mostra un lieve incremento nei primi 14-18 giorni per il prodotto conservato a 4°C (δmax. 0,15), salvo poi decrescere in modo costante fino al termine della vita commerciale. Conservando il prodotto a 8°C, lo sviluppo è maggiore, con δmax. 1,02 a 14 giorni., salvo poi decrescere, probabilmente per attività competitiva della flora lattica a valori sovrapponibili a quelli iniziali.

Nelle salse ai funghi, caratterizzate da una maggior acidità iniziale (pH 5,25), il comportamento dei batteri lattici è simile a quanto osservato per la salsa ai formaggi, anche se il substrato mostra una maggior acidificazione durante la conservazione (pH finale di 4,7 nel prodotto stoccato a 4°C e 4,5 a 8°C). Lo sviluppo di *L. monocytogenes* in questo condimento è massimo al 18° giorno per il prodotto conservato a 4°C e a 11 giorni per quello conservato a 8°C; δmax. è pari a 0,42.

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

I valori dei parametri intrinseci ad inizio sperimentazione evidenziano come entrambi i substrati siano idonei allo sviluppo di *L. monocytogenes*. Tuttavia, la dinamica di crescita del patogeno in questi prodotti, evidenziata in questa sperimentazione, può indicare come due sughi non rappresentino un substrato idoneo per lo sviluppo del batterio.

Infatti, secondo le indicazioni del documento

AFSSA, con $\delta > 0,5 \log_{10}$ UFC/g il prodotto viene considerato un buon substrato per lo sviluppo di *L. monocytogenes*, così come definito dalla categoria 1.2, mentre con $\delta \leq 0,5 \log_{10}$ ufc/g il prodotto non rappresenta un buon substrato per lo sviluppo.

Sulla base di queste indicazioni pertanto la salsa ai funghi, ad entrambe le temperature di conservazione, non rappresenta un substrato idoneo a consentire lo sviluppo di *L. monocytogenes*.

Per quanto concerne invece la salsa ai formaggi, mentre a 4°C ha un $\delta \leq 0,5 \log_{10}$ UFC/g, a 8°C arriva a $\delta = 1,02 \log_{10}$ UFC/g, e pertanto l'alimento favorisce lo sviluppo del patogeno. Tuttavia occorre considerare che il prodotto ha basse contaminazioni iniziali tenuto conto che vi è un processo di fusione dei formaggi, a 75-78°C, che svolge anche azione di controllo sul microrganismo e che la corretta applicazione di

GHP e HACCP limita fortemente l'eventuale ricontaminazione in fase di frullatura e omogeneizzazione post-trattamento termico. Pertanto, per quanto riguarda il superamento delle 100 UFC/g durante la vita commerciale del prodotto, stimando una contaminazione iniziale di $0,7 \log_{10}$ UFC/g (5UFC/g) e considerato il δ_{\max} di 1,02, otterremo una contaminazione massima di $1,72 \log_{10}$ UFC/g (54 UFC/g) con stoccaggio a +8°C, al di sotto quindi del limite di 100 UFC/g indicato nel Reg. 2073/2005.

La presente ricerca evidenzia pertanto che i prodotti testati, pur avendo caratteristiche fisico-chimiche tali da consentire lo sviluppo di *L. monocytogenes*, in presenza di adeguate procedure igieniche di lavorazione che limitano l'entità di contaminazione iniziale non superano le 100UFC/g in nessun momento della conservazione e distribuzione.

Tabella 1. Evoluzione della flora microbica (*L.monocytogenes* e batteri lattici) nel corso della conservazione e potenziale di crescita (δ) di *L.monocytogenes* a 4 e 8°C: salsa ai formaggi

Giorni	L.m. \log_{10} UFC/g (4°C) mediana	$\delta (t_x - t_1)$	Lattici \log_{10} UFC/g (4°C) mediana	pH	L.m. \log_{10} UFC/g(8°C) mediana	$\delta (t_x - t_1)$	Lattici \log_{10} UFC/g (8°C) mediana	pH
1	3,49			5,72	3,28			5,68
4	3,50	0,01		5,68	3,59	0,31		5,66
8	3,64	0,15	5,1	5,70	3,87	0,59	6,7	5,54
11	3,50	0,01		5,64	4,04	0,76		5,40
14	3,63	0,14		5,62	4,30	1,02		5,32
18	3,70	0,21	6,5	5,50	3,88	0,60	8,6	5,12
22	3,38	-0,11		5,59	3,52	0,24		5,18
25	3,17	-0,32	7,3	5,45	3,43	0,15	8,5	5,23
28	3,07	-0,42		5,45	3,48	0,20		5,10
31	2,90	-0,59	7,6	5,43	3,47	0,19	8,6	5,18

t_x = Tempo considerato, t_1 = giorno 1

Tabella 2. Evoluzione della flora microbica (*L.monocytogenes* e batteri lattici) nel corso della conservazione e potenziale di crescita (δ) di *L.monocytogenes* a 4 e 8°C: salsa ai funghi

Giorni	L.m. \log_{10} UFC/g (4°C) mediana	$\delta (t_x - t_1)$	Lattici \log_{10} UFC/g (4°C) mediana	pH	L.m. \log_{10} UFC/g (8°C) mediana	$\delta (t_x - t_1)$	Lattici \log_{10} UFC/g (8°C) mediana	pH
1	3,49			5,2	3,43			5,25
4	3,42	-0,07		5,2	3,48	0,05		5,23
8	3,67	0,18	6,0	5,2	3,48	0,05	6,4	5,19
11	3,86	0,37		5,1	3,79	0,36		5,14
14	3,58	0,09		5,2	3,39	-0,04		4,91
18	3,91	0,42	6,3	5,7	3,47	0,04	8,8	4,38
22	2,84	-0,64		5,2	3,47	0,04		4,2
25	2,30	-1,18	6,6	4,7	3,20	-0,23	8,4	4,63
28	1,69	-1,79		4,7	3,30	-0,13		4,5
31	21,60	-1,88	7,6	4,7	3,32	-0,11	8,7	4,46

t_x = Tempo considerato, t_1 = giorno 1

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 levels of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and the related risk for human illness 1. Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazard. The EFSA Journal 599, 1-42.
2. EFSA (2009). Trends and Sources of Zoonoses and Zoonotic Agents in the European Union in 2007.
3. EFSA (2010). The community summary report on trends and sources of zoonoses and zoonotic agents and food-borne outbreaks in the European Union in 2008.
4. Regolamento CE n. 2073/2005 del 15 novembre 2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari
5. AFSSA (2008). TECHNICAL GUIDANCE DOCUMENT On shelf-life studies for *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods
6. Bernieri D. (2009). “Sughi pronti le Discount protagonisti e le PI crescono” GDOWEEK, 34.
7. Bertollo F.M., Dragoni E., Galasso M., Gradassi L., Pancioni S.(2007). “Le contaminazioni dei prodotti pronti al consumo. Una problematica da non sottovalutare” Il progresso veterinario, 10, 457-458.
8. Metodica EN ISO 11290 – 1 e 2:1998/A1 – Metodo orizzontale per la ricerca e la conta di *Listeria monocytogenes* . Aprile 2005.