

SVILUPPO DI *Listeria innocua* IN COPPA DI TESTA NATURALMENTE CONTAMINATA

GROWTH OF NATURALLY OCCURRING *Listeria innocua* IN COPPA DI TESTA

Bardasi L.¹, Bonilauri P.¹, Rugna G.¹, Galletti G.¹, Fedrizzi G.¹
Santandrea G.², Gandolfi P.², Vecchi G.³, Merialdi G.¹

(¹) Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna

(²) AUSL Bologna Servizio Veterinario Area Sud 3Libero professionista

SUMMARY

Coppa di testa is a traditional cooked pork salami produced in different Italian regions. The main raw material is deboned meat of pork head with the addition of tongue and rind. After a long (3-5 h) high temperature (97°C) cooking, additives and flavourings are added and the salami is prepared. After cooling the salami is often portioned and vacuum-packaged. In this study the growth of naturally occurring contamination of *Listeria innocua* in three batches of vacuum packaged Coppa di testa, stored at 4°C for 80 days, is described. The average μ_{max} was 0.24 (days⁻¹) and the average doubling time was 2.87 days. The maximum growth level ranged from 4.90 to 8.17 (log₁₀ cfu/g). These results indicate that Coppa di testa definitely supports the growth of *Listeria innocua* in the considered storage conditions. Taking into account that at 4°C *Listeria monocytogenes* strains are associated with higher grow rates than *L. innocua*, these results emphasize the importance of preventing *Listeria monocytogenes* contamination in the production stages following cooking.

Key words

Listeria innocua, Coppa di testa, growth rate

INTRODUZIONE

La Coppa di testa, il prodotto oggetto di questo studio, è un salume ad impasto cotto diffuso sul territorio nazionale ma con produzione locale; la produzione avviene in diverse regioni italiane, con processo produttivo analogo ma con variazioni relative all'aggiunta di sostanze aromatizzanti (pepe, noce moscata, aglio, scorza di limone, scorza di arancio, finocchio, olive, mandorle). La materia prima è costituita in tutti i casi da spollo di testa suina, che può essere integrata con lingua di maiale e cotenna. La carne, dopo la cottura, viene addizionata di sale, spezie ed altre sostanze aromatizzanti, miscelata ed insaccata. Può essere commercializzata intera (porzionata al dettaglio) oppure in tranci confezionati sottovuoto. In sintesi, il processo produttivo prevede un trattamento di cottura della materia prima ed una fase successiva di riesposizione ambientale in

cui è possibile la contaminazione da parte dei microrganismi, non seguita da alcun trattamento successivo di bonifica.

Listeria monocytogenes viene normalmente eliminata dall'applicazione di sufficienti trattamenti termici, ma la contaminazione dei prodotti RTE può avvenire nelle fasi produttive che seguono al trattamento letale, per esempio a causa del contatto con superfici degli impianti contaminate (1, 2, 3, 4). I livelli di *L. monocytogenes* raggiunti con la riesposizione ambientale sono solitamente bassi; poichè i dati epidemiologici indicano che gli alimenti coinvolti in casi di listeriosi presentano cariche vitali superiori a 10³ ufc/g, risulta evidente che il rischio per la salute umana è più elevato se lo sviluppo del microrganismo nell'alimento si verifica nel corso della sua shelf life. (5, 6, 7).

Il Reg. 2073/2005/CE (e successive modifiche) prevede la possibilità che *Listeria monocytogenes* possa

essere presente in alimenti pronti al consumo immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità, se questi non ne costituiscono terreno favorevole alla crescita. Appartengono a questa categoria i prodotti con $\text{pH} \leq 4,4$ o $A_w \leq 0,92$, i prodotti con $\text{pH} \leq 5,0$ e $A_w \leq 0,94$, i prodotti con periodo di conservabilità inferiore a 5 giorni, altri prodotti purchè esista una motivazione scientifica accettabile.

Se un alimento pronto al consumo costituisce terreno favorevole alla crescita di *Listeria monocytogenes* la presenza del microrganismo nel prodotto immesso sul mercato è consentita solo se il produttore è in grado di dimostrare che non verrà superato il limite di 100 ufc/g durante il periodo di conservabilità.

La Coppa di testa esaminata è un prodotto che per valori di pH, A_w , durata commerciale e temperature di conservazione rientra fra i prodotti pronti al consumo potenzialmente in grado di sostenere la crescita di *L.monocytogenes*, per cui risulta importante una valutazione delle caratteristiche di crescita del microrganismo nel caso in cui si verificasse una contaminazione accidentale.

In questo studio, che fa parte di una più ampia sperimentazione volta a valutare tutti gli aspetti inerenti la stabilità commerciale del prodotto, gli autori hanno indagato l'andamento di una contaminazione "naturale" da *L. innocua* in porzioni di coppa di testa conservate per 80 giorni sottovuoto a temperature di refrigerazione. La crescita di *L. innocua* a 4°C è infatti paragonabile, seppure in difetto, a quella di ceppi di *L.monocytogenes*, e può quindi rappresentare un indicatore del modello di crescita del patogeno (8).

MATERIALI E METODI

Sono stati esaminati tre diversi lotti di Coppa di testa, prodotti in giornate diverse. Le coppe di testa appartenenti a ciascun lotto sono state suddivise in porzioni di vendita le quali sono state successivamente confezionate sottovuoto.

Ciascun lotto, dopo la produzione, è rimasto stoccato in azienda a +4°C e successivamente è stato trasferito al laboratorio. Al laboratorio sono pervenuti 25 porzioni per ciascun lotto.

I campioni sono stati conservati a +4°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) fino al momento delle analisi, che sono state effettuate rispettivamente a 48 ore, a 15, a 30, a 60 e ad 80 giorni rispetto alla data di produzione. Ad ogni scadenza sono state esaminate singolarmente 5 unità di prodotto.

Le determinazioni chimico/fisiche (pH e A_w) sono state eseguite invece dal pool delle 5 unità.

Per l'esecuzione delle determinazioni microbiologiche quantitative, da ciascuna unità sono stati prelevati in modo rappresentativo 10 g di prodotto, successivamente omogeneizzati con Stomacher in 90 ml di Acqua Peptonata Tamponata; con lo stesso diluente sono state allestite ulteriori diluizioni decimali.

La numerazione di *Listeria* spp. è stata eseguita tramite spatolamento su *Listeria Selective Oxford* Agar. Le piastre sono state incubate a 37°C per 48 ore ed esaminate per valutare la presenza di colonie tipiche riferibili a *Listeria* spp., successivamente conteggiate.

La conferma di appartenenza al genere *Listeria* spp. è stata eseguita effettuando una sub-cultura su *Trypticase Soy Agar* addizionato di estratto di lievito allo 0,6%, testando successivamente la morfologia attraverso la colorazione di Gram (piccolo bacillo Gram positivo) e testando la catalasi (positiva). L'identificazione di *Listeria innocua* è stata eseguita attraverso il test dell'emolisi e attraverso API *Listeria* (Biomérieux).

In parallelo, su ciascuna unità di prodotto è stata eseguita la ricerca di *Listeria monocytogenes/Listeria* spp tramite il metodo ISO 11290-1:1996/Amd 1:2004.

Ai fini della valutazione dei risultati, è stato necessario individuare un valore numerico nei casi in cui *Listeria* spp. era assente e non quantificata o era presente ma in quantità inferiore al limite di rilevazione del metodo. È stato adottato il seguente comportamento: nel caso di assenza di *Listeria* spp. è stato individuato come valore 0,02 ufc/g, valore medio fra 0 e 0.04 ufc/g; nel caso di presenza di *Listeria* spp., ma in quantità non rilevate è stato individuato un valore pari alla media tra 0.04 ufc/g e il limite di rilevazione della metodica quantitativa.

I valori così ottenuti, unitamente ai risultati delle determinazioni quantitative, sono stati trasformati in logaritmo base 10; per ogni intervallo di tempo è stata calcolata la media delle 5 unità esaminate.

I risultati sono stati elaborati anche considerando i campioni come appartenenti ad un unico lotto (lotto U). I valori medi sono stati utilizzati come dati in ingresso (input) per sviluppare il modello di crescita e determinare il valore di μ_{max} (Tasso massimo di crescita), il t-d (tempo di duplicazione) e la durata della fase lag attraverso il software MicroFit 1.0 che sfrutta il modello Baranyi and Roberts (9).

I dati ottenuti dalla sperimentazione sono stati confrontati con le proiezioni fornite per lo sviluppo di *L.monocytogenes* dal software Growth Predictor, nel quale sono stati impostati i valori in base alle caratteristiche del prodotto in esame (temperatura

= 4°C, pH = 6.4, $A_w = 0.96$, concentrazione di nitriti equivalente a 0 ppm).

RISULTATI

I tre lotti sono risultati contaminati da *Listeria innocua* al secondo giorno dalla produzione. Le medie dei valori ottenuti durante il periodo di conservazione del prodotto a 4°C per ogni lotto di produzione sono riassunti nella Tabella n.1 e rappresentati graficamente nella Figura n.1.

I valori di μ_{max} e i tempi di duplicazione (t-d) determinati attraverso il modello di crescita Baranyi e Roberts e l'utilizzo del software MicroFit 1.0 sono riassunti nella Tabella n.2, unitamente ai valori di N_{max} osservati sperimentalmente. Sono riportati anche i valori di RSS (Residual Sum of Square) e RMS (Root Mean Square) elaborati dal software, che forniscono un'indicazione sulla qualità di corrispondenza delle curve ottenute (10).

La determinazione della fase Lag è risultata impossibile partendo dai dati ottenuti durante questa sperimentazione, in quanto la contaminazione ini-

Tabella n.1 - Numerazione di *Listeria innocua* in campioni di coppa di testa durante il periodo di conservazione a 4°C e relativi valori di A_w e di pH. Sono riportati i valori medi (\log_{10} ufc/g) con relative deviazioni standard dei risultati ottenuti dai campioni dei lotti 1,2,3 e dal lotto U.

giorni	Lotto				Aw	pH
	1	2	3	U		
2	0.70±0.00	2.74±0.26	-0.34±1.86	1.03±1.66	-	6.5
15	2.33±1.27	4.62±0.43	1.88±0.40	2.95±1.45	-	6.4
30	4.68±1.36	5.84±0.55	2.87±2.56	4.46±2.02	0.96	6.5
60	6.22±1.80	6.45±0.45	4.92±1.76	5.86±1.53	0.96	6.3
80	8.17±3.22	7.03±0.11	4.90±1.84	6.70±2.21	0.96	6.3

Figura n.1 - Andamento delle medie (\log_{10} ufc/g) dei valori di *Listeria innocua* ottenuti durante il periodo di conservazione a 4°C nei campioni dei lotti esaminati.

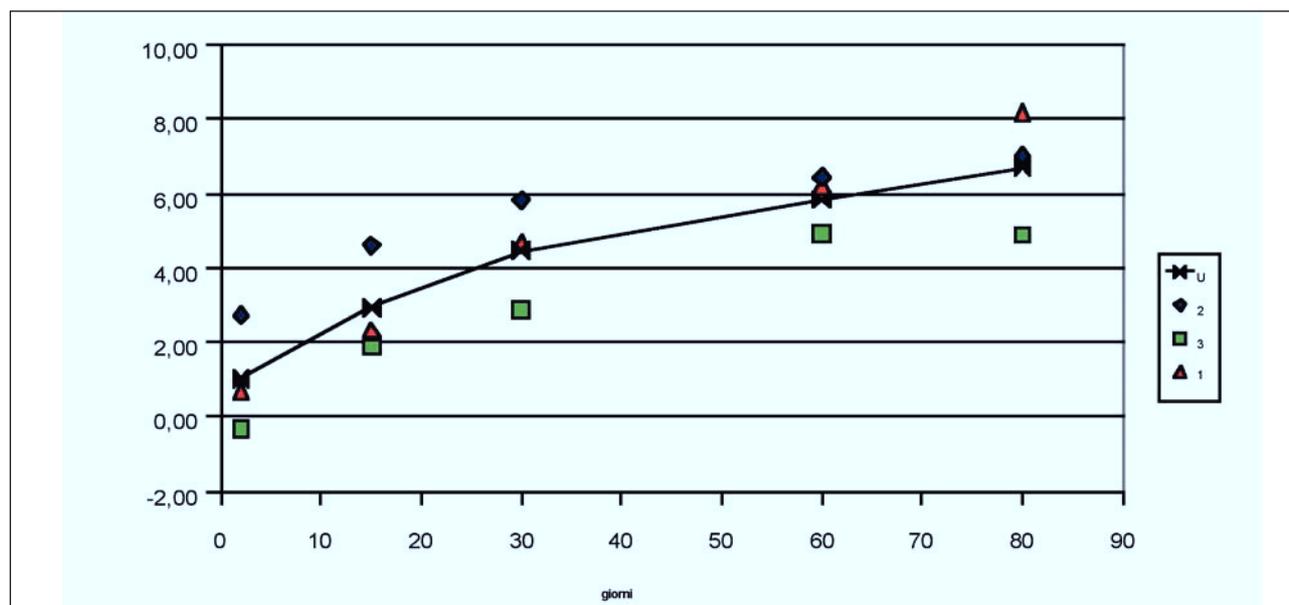


Tabella n.2 - μ_{max} , t-d, RSS, RMS elaborati con MicroFit 1.0; Nmax osservati sperimentalmente.

Lotto	μ_{max} (ln cfu giorno ⁻¹)	t-d (giorni)	Nmax (log ₁₀ ufc g ⁻¹)	RSS-RMS
1	0.20	3.48	8.17	0.84-0.41
2	0.22	3.18	7.03	0.19-0.20
3	0.22	3.09	4.90	0.17-0.19
U	0.24	2.87	6.70	0.35-0.26

ziale (N_0) non è stata determinata e le registrazioni sono iniziate al secondo giorno di conservazione a 4°C.

Attraverso l'utilizzo di Growth Predictor sono stati ottenuti per *L. monocytogenes* i seguenti parametri di crescita: t-d = 37.8 h equivalente a 1.6 giorni, a cui corrisponde una $\mu_{max} = 0.44$ che equivale ad una velocità di crescita circa doppia di quella osservata sperimentalmente.

CONSIDERAZIONI E CONCLUSIONI

La μ_{max} osservata sperimentalmente è risultata molto riproducibile nei tre lotti di produzione analizzati (0,20-0,22-0,22); questa osservazione testimonia la validità dei risultati ottenuti e potrebbe rappresentare una stima della reale velocità di crescita di *Listeria innocua* in questa tipologia di prodotto. Il valore di μ_{max} ottenuto modellando la crescita dei microrganismi partendo dai valori medi ottenuti dal lotto U è nominalmente maggiore (0,24) a quanto osservato nei tre lotti analizzati separatamente; questo è dovuto a fattori casuali e ad inevitabili approssimazioni del modello utilizzato nel descrivere i dati sperimentali rilevati e potrebbe essere un indice della incertezza associata al valore sperimentale ottenuto. La μ_{max} individuata con GrowthPredictor (0,44) equivale ad una velocità di crescita circa doppia rispetto a quella osservata sperimentalmente. Questa differenza può dipendere dalle caratteristiche intrinseche del prodotto e dall'azione di una flora concomitante competitiva rappresentata nel caso specifico da *Lactococcus lactis*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus curvatus*, *Lactobacillus fermentum* (11, 12, 13).

È inoltre documentato che ceppi diversi di *L. monocytogenes* e ceppi diversi di *Listeria innocua* mostrano comportamenti di crescita significativamente

diversi fra loro se l'incubazione avviene a 4°C, differenze che tendono a scomparire se gli stessi ceppi vengono cresciuti a 7°C (8).

Considerato che il processo produttivo nel caso specifico prevede una fase di cottura a 97°C per 5 ore, trattamento in grado di inattivare certamente *Listeria* spp., si può ipotizzare che la contaminazione da *Listeria innocua* sia avvenuta nelle fasi successive (aggiunta di sale, pepe; fasi di impasto, insacco, porzionamento e confezionamento). Come dimostrato in questo studio, livelli di contaminazione inizialmente contenuti possono dare origine durante il periodo di conservazione ad elevate concentrazioni. Si noti che il prodotto è stato mantenuto ad una temperatura costante di +4°C, condizione ottimale di conservazione, mentre si può ipotizzare che nel corso della sua vita commerciale possa subire condizioni di abuso termico tali da facilitare ulteriormente la replicazione di *Listeria* spp.. Risulta pertanto particolarmente importante seguire comportamenti ineccepibili dal punto di vista igienico nelle fasi successive al trattamento termico.

BIBLIOGRAFIA

- 1) Buncic, S., Paunovic, L. and Radisic, D., 1991. The fate of *Listeria monocytogenes* in fermented sausages and in vacuum-packaged frankfurters. *J. Food Protect.* 54, 413–417.
- 2) Cox, L.J., Kleiss, T., Cordier, J.L., Cordellana, C., Konkel, P., Pedrazzini, C., Beumer, R., Siebenga, A. (1989) *Listeria* spp. in food-processing, non-food and domestic environments. *Food Microbiology*. Vol.6 (1): 49-61.
- 3) Tompkin, R.B., (2002): Control of *Listeria monocytogenes* in the food processing environment. *Journal of Food Protection*. 65, 709–725.
- 4) Uyttendaele, M., Rajkovic, A., Benos, G., Francois, K., Devlieghere, F., Debevere, J. (2004) Evaluation of a challenge testing protocol to assess the stability of ready-to-eat cooked meat products against growth of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*. 90, 219-236
- 5) Chen, Y., Ross, W.H., Scott, V.N., Gombas, D.E., (2003). *Listeria monocytogenes*: Low levels equal low risk. *Journal of Food Protection*. 66, 570-577.
- 6) 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. Scientific Opinion of the Panel on Biological Hazards. The EFSA Journal. 599, 1-42.
- 7) Rocourt, J., BenEmbarek, P., Toyofuku, H., Schlundt, J. (2004) Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: the FAO/WHO approach. *Immunology and Medical Microbiology*. Vol 35 (3): 263-267
- 8) Nufer, U., Stephan, R., Tasara, T. (2007) Growth characteristics of *Listeria monocytogenes*, *Listeria welshimeri* and *Listeria innocua* strains in broth cultures and a sliced bologna-type product at 4 and 7°C. *Food Microbiology*. 24, 444-451.
- 9) Baranyi, J. and Roberts, T. A. (1994): A dynamic approach to predicting bacterial growth in Food. *International Journal of Food Microbiology*. 23, 277-294.
- 10) AFFSA, 2008. Technical guidance document. On shelf-life studies for *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. 14/11/2008
- 11) Bakar Diop, M., Dubois-Dauphin, R., Tine, E., Ngom, A., Destain, J., Thonart, P. (2007): Bacteriocin producers from traditional food products. *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 11, 275-281.
- 12) Benkerroum, N., Oubel, H., Zahar, M., Dlia, S., Filali-Maltouf, A. (2000) Isolation of a bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* and application to control *Listeria monocytogenes* in Moroccan jben. *Journal of Applied Microbiology*. Vol.89 (6): 960-968.
- 13) Todorov, S.D., Koep, K.S.C., Van Reenen, C.A., Hoffman, L.C., Slinde, E., Dicks, L.M.T. (2007) Production of salami from beef, horse, mutton, blesbok (*Damaliscus dorcas phillipsi*) and springbok (*Antidorcas marsupialis*) with bacteriocinogenic strains of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus curvatus*. *Meat Science*. Vol.77 (3): 405-412.