



**UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA**

**FACOLTÀ DI MEDICINA VETERINARIA**

Dipartimento di Sanità Pubblica, Patologia Comparata e Igiene  
Veterinaria

**TESI DI LAUREA**

*CHALLENGE TEST* DI *LISTERIA MONOCYTOGENES* IN  
SALMONE AFFUMICATO CONFEZIONATO SOTTOVUOTO

**Relatore: Ch.mo Prof. VALERIO GIACCONE**

**Correlatore: Dott. ssa STEFANIA BALZAN**

**Laureanda: MARTA CHIOATO**

**ANNO ACCADEMICO 2008-2009**

*Ai miei genitori,  
a Tatiana ed a Roberto.*

## INDICE

### CAPITOLO 1 – INTRODUZIONE E SCOPO

1.1 Introduzione.....	3
1.2 Scopo.....	4

### CAPITOLO 2

2.1 Il salmone.....	4
2.1.1 Classificazione e biologia del salmone.....	4
2.1.2 Consumi e vendite del salmone affumicato.....	6
2.1.3 Il processo produttivo.....	8
2.2 <i>Listeria monocytogenes</i> .....	10
2.2.1 Caratteristiche microbiologiche.....	10
2.2.2 <i>Listeria monocytogenes</i> nel salmone affumicato.....	11
2.3 La legislazione e il <i>challenge test</i> .....	13
2.3.1 La legislazione.....	13
2.3.2 Il <i>challenge test</i> .....	16

### CAPITOLO 3 – MATERIALI E METODI

3.1 Materiali.....	19
3.2 Metodi.....	21
3.2.1 Modalità di inoculazione sperimentale.....	21
3.2.2 Preparazione dei campioni.....	22
3.2.3 Analisi quantitativa di <i>Listeria monocytogenes</i> .....	24

## **CAPITOLO 4 – RISULTATI E DISCUSSIONE**

4.1 Risultati .....	26
4.2 Discussione.....	42

## **CAPITOLO 5 – CONCLUSIONI**

5.1 Conclusioni.....	43
----------------------	----

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI E WEBGRAFIA.....	45
--	----

RINGRAZIAMENTI.....	51
---------------------	----

## CAPITOLO 1 - INTRODUZIONE E SCOPO

### 1.1 INTRODUZIONE

Il salmone affumicato è un prodotto ittico crudo “da ricorrenza”, consumato soprattutto durante il periodo natalizio, anche se negli ultimi anni sta diventando piuttosto usuale in determinate preparazioni, quali i tramezzini.

Come tale, esso è un alimento pronto al consumo (*Ready - To - Eat*, RTE) e può comportare dei rischi sia microbiologici che chimici per i consumatori poiché, per le sue caratteristiche organolettiche di pH e  $a_w$ , costituisce un terreno favorevole alla crescita di *Listeria monocytogenes*, con il quale durante l'intero processo produttivo può venire a contatto. Il salmone affumicato è uno tra gli alimenti più contaminati da *Listeria monocytogenes* che rappresenta l'*hazard* più importante. Questo batterio è stato indicato dagli estensori del Reg. (CE) 2073/2005 come il criterio di sicurezza per gli alimenti RTE e l'Operatore del Settore Alimentare (OSA) deve avere la certezza che tale criterio sia rispettato per l'intera durata del periodo di conservabilità del prodotto. Per garantire che tale criterio sia rispettato l'OSA deve conoscere in modo dettagliato le caratteristiche del suo prodotto, l'intero processo produttivo individuandone i punti critici ed effettuare delle prove di inoculazione sperimentale per determinare la capacità di *Listeria monocytogenes* di svilupparsi o sopravvivere nel prodotto in diverse condizioni di conservazione ragionevolmente prevedibili. Tra i vari studi che l'OSA può effettuare, assume un ruolo importante il cosiddetto *challenge test* che rappresenta una vera e propria prova di inoculazione sperimentale. Anche se tali prove di inoculazione sono ormai d'obbligo per l'OSA e vengono sempre più utilizzate all'interno delle industrie alimentari, in Italia non esistono linee guida precise per effettuare un corretto *challenge test*. Esistono due tipi di *challenge test*, quello di processo e quello di prodotto. Nel *challenge test* di prodotto si inocula nel prodotto finito il microrganismo oggetto di studio e si valuta cosa succede fino a fine vita commerciale. Nel *challenge test* di processo, invece, si inietta nella materia prima il microrganismo oggetto di studio e si valuta l'azione dell'intero processo produttivo sullo sviluppo del microrganismo stesso.

## 1.2 SCOPO

Lo scopo di questa tesi è stato effettuare un *challenge test* di prodotto nel salmone affumicato per valutare se e come si sviluppa *Listeria monocytogenes* una volta venuta a contatto con l'alimento durante la sua vita commerciale, tenuto presente che a tutt'oggi non sono documentate, in Italia, prove analoghe. A tale fine sono state allestite due tipologie di campioni contenenti la prima mediamente da 1 a 10 ufc/g e la seconda da 10 a 100 ufc/g di *Listeria monocytogenes*. Tali campioni sono stati poi conservati a 4°C rispettando la normale conservazione del salmone affumicato a temperatura di refrigerazione o a 8°C creando così una situazione di abuso termico che può verificarsi con una certa frequenza durante la vita commerciale del prodotto. Ogni 10 giorni sono state eseguite le analisi quantitative di *Listeria monocytogenes* nei vari campioni.

## CAPITOLO 2

### 2.1 IL SALMONE

#### 2.1.1 CLASSIFICAZIONE E BIOLOGIA DEL SALMONE

Il salmone, secondo la classificazione tassonomica, appartiene all'Ordine dei *Salmoniformes*, Fam. *Salmonide*, Gen. *Salmo*, Specie *S. Salar*.

#### CLASSIFICAZIONE SCIENTIFICA

<u>Regno:</u>	<u><i>Animalia</i></u>
<u>Phylum:</u>	<u><i>Chordata</i></u>
<u>Classe:</u>	<u><i>Osteichthyes</i></u>
<u>Sottoclasse:</u>	<u><i>Actinopterygii</i></u>
<u>Ordine:</u>	<u><i>Salmoniformes</i></u>
<u>Famiglia:</u>	<u><i>Salmonidae</i></u>

Sottofamiglia: *Salmoninae*

Genere: *Salmo*

Specie: *S. salar*

Il salmone (fig. 1) è un pesce che vive prevalentemente nell'Oceano Atlantico orientale tra il Golfo di Guascogna a sud e il Circolo Polare Artico a nord, ma è possibile trovarlo anche lungo le coste americane fino al New England e lungo le coste meridionali della Groenlandia. Il salmone è un pesce anadromo che nasce e si riproduce in acqua dolce, ma passa la maggior parte della sua vita in mare dove i maschi e le femmine permangono per un lungo periodo (5 anni in media per il maschio, 7 anni per la femmina) riportandosi poi nello stesso fiume e nello stesso esatto luogo dove sono nati. Giunto in acqua dolce (dove avviene la fregola) il pesce smette di alimentarsi e dopo circa 1-2 settimane si evidenziano i primi cambiamenti anatomici, soprattutto nel maschio, come ad esempio i colori più vivaci e le mandibole incurvate. Una volta raggiunto il luogo atto alla riproduzione, caratterizzato da acqua piuttosto bassa e fondi di ghiaietta, la femmina scava un avvallamento di circa 15 cm di profondità e vi depone dalle 2000 alle 4000 uova che verranno fecondate dal maschio e ricoperte di sedimento. Le larve, che si schiudono verso Marzo/Aprile, rimangono nella ghiaia fino al completo consumo del sacco vitellino per poi uscire dal fondo. Queste forme larvali, chiamate avannotti, crescono fino a raggiungere i 6/7 cm di lunghezza, iniziando a nutrirsi di larve acquatiche e di pesciolini. Raggiunto il peso di 400/500 g ridiscendono i fiumi sfruttando le piene, localizzandosi presso gli estuari, dove rimangono dai 2 mesi ad 1 anno, nutrendosi di crostacei, che conferiscono la classica colorazione rosastra delle carni, per poi allontanarsi dalla costa, diventando completamente ittiofagi ed assumendo uno stile di vita pelagico.

Caratteristiche morfologiche: il salmone è un pesce molto simile alla trota di mare dalla quale si distingue facilmente per la bocca assai più grande che si porta fino all'occhio e per la presenza nella tipica livrea color argento di alcuni punti neri sul dorso e lungo la linea laterale, molto meno numerosi che nella trota. Può raggiungere 1,5 metri di lunghezza e un peso di alcune decine di chilogrammi. Ha il corpo fusiforme, dotato di una potente muscolatura e la testa piccola rispetto alle dimensioni del corpo con l'occhio grande nei piccoli esemplari che diventa sempre più piccolo con l'aumentare della taglia. Lungo il corpo presenta le seguenti pinne:

- due pinne dorsali, la prima relativamente grande e la seconda molto piccola e adiposa;
- la pinna anale, più piccola della prima dorsale;
- la pinna caudale, ampia con una leggera intaccatura centrale;
- le pinne ventrali, piccole e posizionate circa all'altezza della prima dorsale;
- le pinne pettorali.



Fig.1: Immagine del salmone

### **2.1.2 CONSUMI E VENDITE DEL SALMONE AFFUMICATO**

Il salmone affumicato è un alimento ittico comunemente annoverato tra i prodotti ittici “da ricorrenza” solitamente consumato in periodi invernali, ma negli ultimi anni il mercato italiano ha presentato un'evoluzione verso la destagionalizzazione, requisito fondamentale per sviluppare correttamente il mercato del salmone affumicato in Italia. Tuttavia i volumi espressi nel periodo natalizio sono ancora molto elevati rispetto a quelli relativi al resto dell'anno.

In Italia nell'ultimo anno di riferimento terminante ad agosto 2008, si evidenzia una crescita a volume (kg) del 9,4% e a valore (euro) del 6,8%: sono dati rilevanti se si pensa che non è un alimento che trova spazio in tutte le case degli italiani. Se si osserva il mercato più in dettaglio, si evidenziano alcune dinamiche che sono alla base di questa crescita nelle vendite del salmone affumicato.



Nel canale *discount* le vendite di salmone affumicato sono cresciute rispetto all'anno precedente sia a volume sia a valore (Tabella 1) con un prezzo medio che flette del 7,7% (circa 16,48 euro/kg), ma contemporaneamente ottiene un buon risultato di vendite anche il canale del dettaglio tradizionale con un aumento sia a volume che a valore (Tabella1) nonostante un prezzo medio in aumento del 5,8% (circa 33,50 euro/kg). Il tasso di crescita italiano è uno dei più alti d'Europa anche se il valore assoluto del consumo procapite è ancora lontano dai livelli registrati in altri stati.

In questo continuo aumento del consumo di salmone affumicato gioca un ruolo importante la crescente consapevolezza da parte del consumatore dell'utilità di un'alimentazione differenziata, e in particolar modo della positiva immagine del pesce quale elemento caratteristico di una dieta equilibrata.

TAB.1: ANDAMENTO VENDITE SALMONE AFFUMICATO

(Fonte: AC Nielsen)

	Valore in euro			Volume in kg		
	A n n o terminante al 02/09/2007	A n n o terminante al 31/08/2008	Var .%	A n n o terminante al 02/09/2007	A n n o terminante al 31/08/2008	Var. %
<b>Totale Italia</b>	139.728.453,1	149.181.027,5	6,8	5.067.865,0	5.542.145,6	9,4
<b>Ipermercati</b>	45.070.297,4	47.455.334,9	5,3	1.647.064,3	1.716.007,3	4,2
<b>supermercati</b>	62.357.014,0	63.171.303,5	1,3	2.107.546,2	2.144.393,3	1,7
<b>L i b e r o servizio</b>	17.497.847,7	18.928.588,7	8,2	578.122,7	639.642,9	10,6
<b>Discount</b>	10.784.832,1	14.733.166,4	36, 6	610.972,1	893.870,4	46,3
<b>Altro</b>	NA	65.415,2	NA	NA	4.278,5	NA

### **2.1.3 IL PROCESSO PRODUTTIVO**

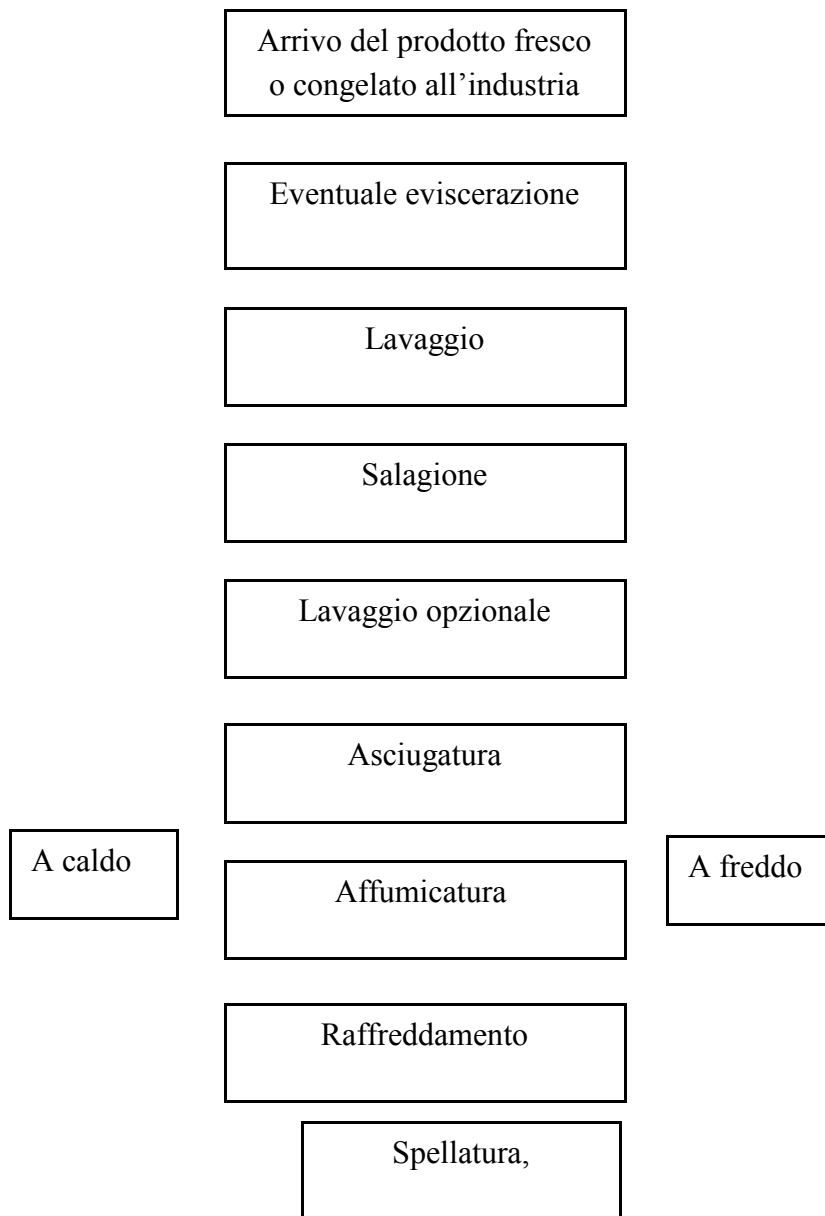
Il processo produttivo del salmone affumicato è caratterizzato da diverse fasi, alcune delle quali possono cambiare da industria ad industria e da Paese a Paese, in base alle preferenze dei consumatori (Rørvik, 2000). In figura 2, attraverso un diagramma di flusso, viene rappresentato l'intero processo produttivo. Analizzando più in dettaglio le diverse fasi vediamo che il salmone arriva all'industria alimentare fresco o congelato e, se non è già stato eviscerato, viene eseguita l'eviscerazione seguita dal lavaggio.

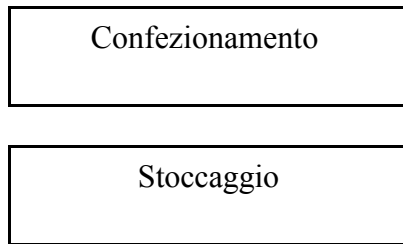
In seguito passa alla fase di salatura che contribuisce ad eliminare parte dell'acqua libera e a stabilizzare le carni, influenza la trama finale dell'alimento e mantiene stabile il colore del prodotto. Le tecniche usate per la salatura possono essere "a secco" usando cloruro di sodio o sale nitrato ad una percentuale del 2-3%, la sosta per 3-5 giorni in una salamoia con una concentrazione di sale attorno al 70-80% o la salatura a umido.

Terminata la salagione, per diminuire ulteriormente la concentrazione dell'acqua, il salmone viene prima asciugato e poi sottoposto al processo di affumicatura a freddo o a caldo. La tecnica a freddo prevede che il salmone venga affumicato a temperature che non superano i 22°C in modo da mantenere il prodotto più tenero, quella a caldo invece, raggiunge una temperatura superiore ai 60°C. Il fumo utilizzato può venire prodotto attraverso la normale combustione di legno o segatura di faggio o quercia, attraverso un campo elettrico che aumenta la deposizione del fumo o utilizzando direttamente del fumo liquido.

A questo punto il salmone viene spellato, filettato e confezionato sottovuoto pronto per essere consumato (Duffes, 1999).

Fig 2 : DIAGRAMMA DI FLUSSO DELL'INTERO PROCESSO PRODUTTIVO DEL SALMONE AFFUMICATO.





## **2.2 LISTERIA MONOCYTOGENES**

### **2.2.1 CARATTERISTICHE MICROBIOLOGICHE**

*Listeria monocytogenes* è un batterio che appartiene alla famiglia delle Listeriaceae che racchiude sei specie: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. grayi*. E' un microrganismo patogeno agente di malattia alimentare che, quando riesce ad inquinare un alimento e a raggiungere cariche elevate, può costituire un vero pericolo per la salute umana.

È un batterio ubiquitario, molto resistente alle condizioni avverse dell'ambiente e capace di sviluppare sempre nuove forme di resistenza, come la capacità di formare un *biofilm* e resistere ai trattamenti di sanificazione. In questo modo *Listeria monocytogenes* riesce ad annidarsi e persistere all'interno delle industrie alimentari e, attraverso le superfici di lavoro, si trasferisce agli alimenti finiti, compresi quelli che hanno già subito diversi trattamenti di conservazione.

*Listeria monocytogenes* è un microrganismo Gram positivo, bastoncellare abbastanza regolare (0,5 x 1,0  $\mu$ ), che in alcuni casi, quando subisce degli stress subletali che inducono una reazione fisiologica, può apparire con una forma filamentosa raggiungendo i 100  $\mu$  di lunghezza. È mobile, non sporigeno, anaerobio facoltativo e psicrotrofo: in condizioni di laboratorio duplica tra -1° e 50 °C e ad intervalli di pH compresi tra 4,0 e 9,5; è allotollerante e riesce a moltiplicare fino a una concentrazione salina dell' 8-10 % con  $a_w$  minima di crescita pari a 0,900 - 0,880. Tra i batteri patogeni non sporigeni è quello più termoresistente: occorrono infatti almeno 15" a 72°C per inattivarlo. Queste sue caratteristiche di sopravvivenza e resistenza possono variare e vengono influenzate dallo stadio vitale in cui si trova il batterio. Se il microrganismo si trova nella fase di crescita stazionaria (VBNC *Viable*

*But Not Culturable cell* o stadio di vita non vitale, nella quale il germe è vivo ma non riesce a duplicare perché utilizza tutte le sue energie per sopravvivere), è molto più resistente a condizioni subletali di pH,  $a_w$  e temperatura; ad esempio diventa molto resistente all'acidità e riesce a sopravvivere fino ad un pH pari a 3 a patto che abbia avuto il tempo di adattarsi all'abbassamento dello stesso pH. Quindi se *Listeria monocytogenes* viene sottoposta a una veloce diminuzione di pH (pH  $\leq$  3,5 condizione letale), la maggior parte della popolazione muore; se invece subisce prima uno stress subletale venendo in contatto con un substrato debolmente acido (pH intorno a 4 - 4,5), diventa più acidodurico. Bisogna considerare anche il tempo di esposizione del batterio all'acido perché un acidulante riesce a inattivare una popolazione batterica se ne rimane a contatto il maggior tempo possibile.

Koutsoumanis e Sofos (2005) hanno inoltre dimostrato una relazione tra carica iniziale di *Listeria monocytogenes* e resistenza del batterio a diverse condizioni di temperatura, pH e valore di  $a_w$  degli alimenti. Gli autori citati hanno evidenziato che il valore di pH e quello di  $a_w$  agiscono in sinergia nel limitare o bloccare del tutto la moltiplicazione batterica e che, se si sfrutta uno solo di questi fattori, bisogna scendere a valori molto più bassi per avere un uguale effetto batteriostatico o battericida.

Inoltre quando *Listeria monocytogenes* viene portato a temperature inferiori a quelle ottimali, reagisce modificando la composizione degli acidi grassi di membrana in due modi:

- riduce la quota di acidi grassi a catena più lunga aumentando quelli a catena più breve (con più basso punto di congelamento);
- aumenta la quantità di acidi grassi insaturi rispetto ai saturi, per cui la membrana cellulare si mantiene più fluida (Mastronicolis *et al.*, 2006).

Tutto questo ci fa capire che nonostante valori standard ottimali di sopravvivenza e crescita quali la temperatura, il pH e la  $a_w$ , *Listeria monocytogenes* è un batterio molto resistente a condizioni ambientali avverse e stress subletali.

### **2.2.2 LISTERIA MONOCYTOGENES NEL SALMONE AFFUMICATO**

Il salmone affumicato è un alimento (RTE) facilmente deperibile con una *shelf life* che varia dalle due alle otto settimane a temperatura di refrigerazione (circa 4°C). È un prodotto della

pesca altamente suscettibile alla contaminazione da parte di *Listeria monocytogenes* e per questo è considerato una potenziale fonte di infezione.

Analizzando in maniera dettagliata l'intero processo produttivo del salmone affumicato si nota che la contaminazione da parte del batterio può avvenire in diverse fasi della lavorazione. La fonte primaria è rappresentata dalla cute e dalla cavità intestinale del salmone stesso. Durante la decapitazione, l'eviscerazione e la filettatura il batterio è quindi trasportato dalla carne alle superfici e alle macchine per la lavorazione che diventano un'ulteriore fonte di contaminazione. Come evidenziato nel lavoro di Duffès (1999), il contatto con il batterio può avvenire anche durante lo scongelamento poiché il salmone viene a contatto con le acque presenti nelle vasche di scongelamento che per il 19% dei casi sono risultate essere contaminate da *Listeria monocytogenes*. Anche la salagione rappresenta una fase critica della lavorazione durante la quale il pesce può essere contaminato da *Listeria monocytogenes*: infatti i bagni per la salamoia e gli aghi utilizzati nella tecnica ad iniezione sono utilizzati più volte diventando dei veicoli per la trasmissione del patogeno stesso e, nonostante l'azione del sale abbassi il livello di  $a_w$  a circa 0,950, questo non è sufficiente ad inibire lo sviluppo di *Listeria monocytogenes*. Infine la fase successiva di affumicatura a freddo non è in grado di eliminare il batterio che in precedenza ha raggiunto l'alimento e anche se al termine dell'intero processo produttivo il salmone affumicato viene confezionato sottovuoto e mantenuto a temperatura di refrigerazione questo non garantisce la mancata crescita di *Listeria monocytogenes*. Porsby *et al.* (2008) inoltre hanno dimostrato che ogni singola fase del processo produttivo non è in grado di prevenire la crescita di *Listeria monocytogenes* ma che lo sviluppo del batterio è controllato solo grazie al susseguirsi delle diverse fasi di lavorazione quali la salagione, l'asciugatura, l'affumicatura in fumo liquido e la conservazione a temperatura di refrigerazione dopo il confezionamento

Nel considerare lo sviluppo di *Listeria monocytogenes* nel salmone affumicato, bisogna tenere presente anche che i fattori che controllano la crescita di una popolazione batterica non sono dettati solo dalle fasi del processo produttivo, ma anche dalle caratteristiche organolettiche dell'alimento preso in esame come ad es. il pH, la  $a_w$ , il livello di acidi organici, i conservanti etc.. Come verificato da Dalgaard *et al.*, (1997) il salmone affumicato a freddo, al termine

della lavorazione, presenta in media una  $a_w$  che va da 0,983 a 0,964, un pH di circa 6 e viene conservato sottovuoto ad una temperatura di circa 5°C. Se si confrontano questi parametri organolettici con i dati citati precedentemente riguardo alle caratteristiche microbiologiche del batterio si può definire il salmone affumicato un alimento pronto al consumo che rappresenta un terreno favorevole alla crescita di *Listeria monocytogenes* (Reg. (CE) 2073/2005).



## **2.3 LA LEGISLAZIONE E IL *CHALLENGE TEST***

### **2.3.1 LA LEGISLAZIONE**

Il cosiddetto “pacchetto igiene” entrato in vigore dal 01/01/2006, come stabilito dal Reg.178/2002, ha come obiettivo fondamentale un elevato livello di protezione della salute pubblica ed è costituito da un insieme di Regolamenti comunitari che stabiliscono i criteri e la metodologia da applicare per il nuovo controllo dell’igiene dei prodotti alimentari.

In questi nuovi regolamenti l’OSA gioca un ruolo fondamentale. Egli infatti deve garantire la salubrità e le qualità igienico-sanitarie degli alimenti e, applicando degli idonei sistemi di verifica, deve avere sotto controllo l’intero processo produttivo. Come recita l’art. 3 del Reg (CE) 852/2004 “*gli operatori del settore alimentare devono garantire che tutte le fasi della produzione, della trasformazione e della distribuzione degli alimenti sottoposte al loro controllo soddisfino i pertinenti requisiti di igiene fissati nel presente regolamento*”. Inoltre

secondo il Reg (CE) 2073/2005 e a norma dell'articolo 4 del Reg (CE) 852/2004, gli OSA sono tenuti a rispettare i criteri microbiologici che definiscono *“l'accettabilità di un prodotto, di una partita di prodotti alimentari o di un processo, in base all'assenza, alla presenza o al numero di microrganismi e/o in base alla quantità delle relative tossine/metaboliti, per unità di massa, volume, area o partita”* (art. 2 Reg. (CE) 2073/2005). A questo scopo, attraverso il prelievo di campioni, essi devono effettuare controlli per accertare il rispetto dei valori fissati per i criteri microbiologici, eseguire analisi e prendere degli eventuali provvedimenti correttivi. Gli OSA hanno inoltre l'obbligo di ritirare dal mercato gli alimenti a rischio in quanto il Reg. (CE) 178/02, all'art. 14, prevede che non possano essere immessi sul mercato *gli alimenti a rischio*, definendo come tali quelli *dannosi per la salute umana o non adatti al consumo umano*. Sono **dannosi per la salute umana** gli alimenti che contengono microrganismi, loro tossine, prodotti del loro metabolismo o residui di composti chimici in quantità superiori ai limiti accettabili per il nostro organismo, mentre **non sono adatte al consumo umano** le derrate alimentari che presentano caratteristiche sensoriali e/o nutrizionali non conformi allo standard noto di ciascuna di esse e che manifestano segni di putrefazione, deterioramento o decomposizione.

La metodica usata dagli OSA per il controllo dell'igiene dei processi produttivi si basa sull'HACCP la cui applicazione è resa obbligatoria dal legislatore in tutte le aziende alimentari. Saranno poi le autorità sanitarie ufficiali di ogni stato membro a verificare che l'OSA abbia effettivamente sotto il suo controllo l'intero processo produttivo.

Tra i vari sistemi di verifica che l'OSA può effettuare sono ammesse anche le prove di inoculazione sperimentale richiamate direttamente dal Reg. (CE) 2073/2005 che all'art. 3 scrive: *“2. Se necessario, gli operatori del settore alimentare responsabili della fabbricazione del prodotto effettuano studi, in conformità all'allegato II, per verificare se i criteri sono rispettati per l'intera durata del periodo di conservabilità. In particolare ciò si applica agli alimenti pronti che costituiscono terreno favorevole alla crescita di Listeria monocytogenes e che possono costituire un rischio per la salute pubblica in quanto mezzo di diffusione di tale batterio”*. All'allegato II, poi, leggiamo che *“Gli studi di cui all'articolo 3, paragrafo 2, comprendono:*

- *prove per determinare la caratteristiche fisiche-chimiche del prodotto, quali pH,  $a_w$  (water activity), contenuto salino, concentrazione di conservanti e tipo di*



*confezionamento, tenendo conto delle condizioni di lavorazione e di conservazione, delle possibilità di contaminazione e della conservabilità prevista;*

- *consultazione della letteratura scientifica disponibile e dei dati di ricerca sulle caratteristiche di sviluppo e sopravvivenza dei microrganismi in questione.*

*(.....) se necessario, in base agli studi summenzionati, l'OSA effettua ulteriori studi, che possono comprendere:*

- *modelli matematici predittivi (.....);*
- *prove per determinare la capacità dei microrganismi in questione, debitamente inoculati, di svilupparsi o sopravvivere nel prodotto in diverse condizioni di conservazione ragionevolmente prevedibili;*
- *studi per valutare lo sviluppo o la sopravvivenza dei microrganismi in questione che possono essere presenti nel prodotto durante il periodo di conservabilità, in condizioni ragionevolmente prevedibili di distribuzione, conservazione e uso.*

È proprio in questo contesto che assume un ruolo importante il *challenge test* che rappresenta una vera e propria prova di inoculazione sperimentale atta a valutare o il comportamento di un microrganismo in una determinata matrice alimentare, secondo le condizioni di manipolazione e/o di conservazione o l'efficacia di letalità di un trattamento termico nei confronti di un germe.

Altri aspetti fondamentali del Reg. (CE) 2073/2005 sono la definizione e la scelta dei criteri di sicurezza alimentare (def. art. 2 paragrafo c: *criterio che definisce l'accettabilità di un prodotto o di una partita di prodotti alimentari, applicabile ai prodotti immessi sul mercato*) che per gli alimenti pronti, quelli che l'uomo può consumare tal quali senza che sia necessaria la cottura o un altro trattamento debatterizzante, deve essere un batterio per vocazione (*professional pathogen*) agente di malattia alimentare, ubiquitario nell'ambiente, in grado di inquinare per qualunque via gli alimenti, molto resistente alle condizioni ambientali avverse, in grado di resistere alle sollecitazioni del processo produttivo e in grado di sviluppare nuove caratteristiche di resistenza come l'antibiotico-resistenza.

Il batterio che gli estensori del Reg. (CE) 2073/2005 hanno individuato come “ criterio di sicurezza” per gli alimenti pronti a cui devono fare riferimento gli OSA è *Listeria monocytogenes* .

Gli alimenti pronti (RTE) che l’uomo può consumare tal quali sono numerosi ma non a tutti l’OSA deve applicare il criterio di sicurezza “ *Listeria monocytogenes* ” .

Gli alimenti pronti al consumo per i quali non sono richieste prove relative a tale criterio, come previsto dal Reg. (CE) 2073/2005 ( nota 4, cap 1 dello stesso regolamento), sono:

- *gli alimenti che sono stati sottoposti a trattamento termico o ad altra trasformazione avente come effetto l’eliminazione di Listeria monocytogenes, quando non è possibile una ricontaminazione dopo tali trattamenti (ad esempio, i prodotti sottoposti a trattamento termico al momento del confezionamento finale);*
- *frutta e ortaggi freschi, non tagliati e non trasformati, tranne i semi germogliati,*
- *pane, biscotti e prodotti analoghi;*
- *acqua, bibite, birra, sidro, vino, bevande spiritose e prodotti analoghi imbottigliati o confezionati;*
- *zucchero, miele e dolciumi, compresi i prodotti a base di cacao e cioccolato,*
- *molluschi bivalvi vivi.*

I rimanenti alimenti RTE, ai quali invece si applica tale criterio, sono stati suddivisi in due classi

- *alimenti che costituiscono terreno favorevole per la crescita di Listeria monocytogenes,*
- *alimenti che per vari motivi non costituiscono terreno favorevole alla crescita di Listeria monocytogenes*

Per quanto riguarda la prima classe l’OSA dovrà garantire che in ogni lotto di produzione non si possa isolare nemmeno 1 *Listeria monocytogenes* in 125 g di alimento quando il prodotto è ancora sotto il suo controllo, prima della distribuzione ai punti di vendita, provvedendo all’analisi di 5 unità campionarie, ciascuna di 25g o che la quantità di *Listeria monocytogenes* sia inferiore a 100 ufc/g in 5 unità campione quando il prodotto è immesso nel mercato durante il suo periodo di conservabilità.

Per il secondo gruppo deve garantire che siano presenti fino ad un massimo di 100 ufc di *Listeria monocytogenes* per grammo di alimento in 5 unità campionarie fino a fine vita commerciale del prodotto.

L'OSA potrà classificare il suo alimento appartenente alla prima o alla seconda classe in base ai parametri elencati dallo stesso Reg. (CE) 2073/2005 che definisce un RTE come terreno non favorevole alla crescita di *Listeria Monocytogenes* se:

- ha un valore di  $\text{pH} \leq 4,4$  o  $a_w \leq 0,92$ ;
- ha un valore di  $\text{pH} \leq 5,0$  e  $a_w \leq 0,94$ ;
- ha una *shelf-life* inferiore a 5 giorni;
- se l'OSA ha una giustificazione scientifica che autorizza questa classificazione.

### **2.3.2 IL CHALLENGE TEST**

I *challenge test* sono prove di laboratorio effettuate su dei substrati alimentari, che hanno assunto una rilevante importanza con l'entrata in vigore del nuovo “pacchetto igiene” e che gli OSA mettono in pratica sempre più sovente all'interno delle industrie alimentari per avere il controllo dell'intero processo produttivo.

Fare un *challenge test* significa inserire una determinata quantità di un microrganismo o di un composto chimico sulla superficie o all'interno di un prodotto alimentare e valutare cosa succede durante le fasi di manipolazione e/o di conservazione.

I *challenge test* che si possono effettuare sono di due tipi:

1. di processo
2. di prodotto.

Nel *challenge test* di processo si inocula nella materia prima, in condizioni controllate, un numero rilevante del microrganismo oggetto dello studio e si valuta cosa succede al microrganismo durante il processo produttivo; questo può fornire una validazione dei processi produttivi.

Nel *challenge test* di prodotto, invece, si inocula nel prodotto finito, in condizioni ambientali controllate, un numero rilevante del microrganismo oggetto dello studio, si effettua il confezionamento del prodotto nelle condizioni di commercializzazione e si valuta cosa succede al microrganismo durante la *shelf-life*. Questo può fornire una giustificazione scientifica per il corretto posizionamento di prodotti RTE nelle categorie alimentari per

*Listeria monocytogenes* previste nel Reg. (CE) 2073/2005, essendo il numero di *Listeria monocytogenes* il “criterio di sicurezza” a cui devono fare riferimento gli OSA che producono RTE. Questo tipo di *challenge test* sarà oggetto del nostro studio per valutare la *shelf-life* del salmone affumicato confezionato sottovuoto.

Attualmente in Italia non esistono delle linee-guida per gli OSA su come impostare un *challenge test* e nemmeno per le autorità sanitarie per controllare la validità di una prova di inoculazione sperimentale. Nella bibliografia internazionale solo gli americani Scott *et al.* (2005) hanno tracciato delle linee-guida per la realizzazione di un *challenge test* con *Listeria monocytogenes*.

L'esecuzione di un *challenge test* è sempre preceduta da una fase di pianificazione, nel corso della quale vengono studiati ed elaborati una serie di fattori relativi all'alimento e al microrganismo oggetto del test di cui bisognerà tenere conto nell'impostare la prova stessa.

Tali fattori sono:

- caratteristiche organolettiche dell'alimento oggetto di studio;
- processo produttivo e conservazione del dato alimento;
- caratteristiche fisiologiche del microrganismo oggetto di studio, nel nostro caso *Listeria monocytogenes*;
- comportamento e capacità di crescita del microrganismo in base al substrato alimentare in esame.

Visto che un valido *challenge test* ha come obiettivo primario valutare nel modo più preciso possibile il comportamento di *Listeria monocytogenes* nell'alimento pronto preso in esame, le prove di inoculazione devono essere effettuate con un ceppo standard di riferimento di *Listeria monocytogenes* disponibile in commercio con adeguato certificato di garanzia, poichè altre specie batteriche pur appartenenti allo stesso genere batterico, come ad es. *Listeria innocua*, inoculate nella stessa matrice alimentare, potrebbero avere delle differenze di resistenza e di comportamento rispetto a *Listeria monocytogenes*. Questo porterebbe ad avere dei risultati che si discostano da quella che è la realtà, invalidando lo stesso *challenge test*.

Il *challenge test* può servire, inoltre, a valutare come si comporta *Listeria monocytogenes* in una matrice alimentare che deve ancora subire dei trattamenti debatterizzanti o in una matrice alimentare che ha già completato il suo processo produttivo e che non dovrà subire alcun

trattamento per ridurre la carica iniziale: questo è un fattore determinante per calcolare la dose da inoculare. Nel primo caso infatti la carica da inoculare sarà cospicua per poter valutare non solo l'efficacia dei trattamenti ma anche di quanti gradi logaritmici viene diminuita la carica iniziale. La dose solitamente non è inferiore a 100.000 o a 1 milione di ufc/g di alimento.

Nel secondo caso la dose è molto inferiore per cercare di simulare quanto avviene nella realtà. Grazie ad alcuni studi (Bartholomew *et al.*, 2005; Francois *et al.*, 2007; Hwang e Marmer, 2007) si è potuto constatare che la carica inquinante iniziale di *Listeria monocytogenes* negli alimenti è compresa nell'ordine di 1-0,01 ufc/g di alimento con una media stimata di 0,04 ufc/g di prodotto. Quindi nel *challenge test* la carica iniziale di *Listeria monocytogenes* deve essere compresa tra 10-100 ufc/g in modo da rappresentare la peggiore situazione riscontrabile nella realtà.

Riguardo al batterio poi, per pianificare un *challenge test*, bisogna prendere in considerazione che i batteri agenti di malattia alimentare come *Listeria monocytogenes*, possono presentarsi in due stadi di vita:

- lo stadio di vita *vitale* in cui il batterio è vivo e in fase di duplicazione più o meno attiva (fase log);
- lo stadio di vita *non vitale* (VBNC *Viable But Not Culturable cell*) in cui il batterio è vivo ma non riesce a duplicare (fase di crescita stazionaria).

Solitamente quando un batterio come *Listeria monocytogenes* arriva ad inquinare un alimento si trova nello stadio di vita non vitale perché ha già subito una serie di trattamenti che agiscono sul ceppo stressandolo e facendolo diventare più resistente. Nella fase di crescita stazionaria il batterio è molto più resistente a sollecitazioni come riduzione del pH e/o  $a_w$ , alte temperature etc.. rispetto alla fase Log e questo può influenzare i risultati del *challenge test*.

Una volta inoculato il batterio, l'alimento oggetto del test viene mantenuto nelle condizioni che più rappresentano le reali fasi di trasporto e di sosta sugli scaffali. Spesso le normali condizioni di conservazione degli alimenti presi in considerazione sono quelle di una conservazione a temperatura di refrigerazione che, con una certa frequenza durante la vita commerciale del prodotto, non vengono mantenute. Di conseguenza sarebbe utile programmare il *challenge test* sia mantenendo i campioni inoculati a temperatura di refrigerazione sia in una condizione di abuso termico (8-10 °C). Il prodotto viene analizzato a

intervalli di tempo regolari verificando il numero di microrganismi che vi si trovano o la quantità di tossine che vi si sono accumulate.

Ultimo aspetto da valutare è la durata della prova di inoculazione sperimentale che dovrebbe concludersi con il termine della vita commerciale del prodotto come previsto dal Reg. (CE) 2073/2005 che obbliga gli OSA a rispettare il criterio di sicurezza previsto “fino a fine vita commerciale del prodotto”.

Alla luce di quanto detto finora si deduce che il *challenge test* è una prova molto utile agli OSA nel controllo della produzione di un alimento ma di difficile pianificazione per il numero cospicuo di fattori da prendere in considerazione.

## CAPITOLO 3 - MATERIALI E METODI

### 3.1 MATERIALI:

- Salmone affumicato (*Salmo salar*): sono stati utilizzati 7 filetoni interi (“baffe”) di salmone di origine norvegese (*Salmo salar*) affumicato a freddo, confezionato sottovuoto proveniente dalla grande distribuzione (fig. 3). In totale il peso complessivo di salmone utilizzato è stato di oltre 15 kg. Le confezioni di salmone sono state trasportate al laboratorio mantenendo la catena del freddo fino al loro utilizzo.



Fig. 3: Immagine di uno dei salmoni affumicati utilizzati

- Listeria monocytogenes: per compensare ed equilibrare le differenti capacità di resistenza di ogni ceppo di *Listeria monocytogenes*, si sono mescolate insieme brodocolture di 4 differenti ceppi di *Listeria monocytogenes*: 1 ceppo standard di riferimento (ATCC 13932) e 3 ceppi “selvaggi” isolati nei mesi scorsi presso il nostro dipartimento da prodotti della pesca. Di ciascuno ceppo si sono utilizzati due stati : (a) quello vitale (in moltiplicazione) e (b) quello di VBNC (crescita stazionaria).
- Soluzione fisiologica sterile: preparata sciogliendo 8 g di NaCl e 1,5 g di peptone universale in 1000 ml di acqua distillata. La soluzione si presenta di colore trasparente e viene sterilizzata in autoclave per 15 minuti a 121°C prima di essere utilizzata.
- Acqua peptonata tamponata: è stata preparata sciogliendo 20 g di terreno disidratato composto da 10 g di peptone, 5 g di sodio cloruro, 3,56 g di fosfato disodico anidro e 1,50 g di fosfato di potassio in 1000 ml di acqua distillata. È stata agitata lentamente fino a completa soluzione e sterilizzata in autoclave a 121°C per 15 minuti
- ALOA (Agar Listeria acc. secondo Ottaviani & Agosti) con ALOA Enrichment-Selective supplements: terreno selettivo per l’isolamento di *Listeria* spp. e la differenziazione di *Listeria monocytogenes* ottenuto sospendendo 35,3 g di ALOA in polvere (composto da peptone 18 g/L, triptone 6 g/L, estratto di lievito 10 g/L, sodio piruvato 2 g/L, glucosio 2 g/L, magnesio glicerofosfato 1 g/L, magnesio solfato 0.5 g/L, sodio cloruro 5 g/L, litio cloruro 10 g/L, disodio idrogeno fosfato anidro 2,5 g/L, 5-bromo-4-cloro-3-indolo-β-D-glucopiranoside 0,05 g/L, agar 13.5 g/L) in 500 ml di acqua distillata fredda, portato ad ebollizione sotto agitazione, sterilizzato in autoclave a 121°C per 15 minuti e successivamente lasciato raffreddare.

Al terreno, una volta raggiunta la temperatura di 45-50°C, viene aggiunto un flacone da 20 ml di ALOA Enrichment Supplement, contenente 1 g di L-α-fosfatidilinositolo, preriscaldato a 48-50°C e il contenuto di un flacone di ALOA Selective Supplement

(composto da acido nalidissico 10 mg, ceftazimide 10 mg, cicloeximide 50 mg, polimixina B 38350 UI) preventivamente ricostituito in 5 ml di una miscela etanolo/acqua distillata sterile (1:1). Il terreno completo ALOA così ottenuto, viene mescolato bene e distribuito all'interno di piastre sterili effettuando tutte le operazioni sotto cappa al fine di garantirne la sterilità. Una volta solidificato, il terreno appare di colore giallo ocra e viene conservato per un massimo di 7 giorni a temperatura compresa fra 2 e 8°C (fig. 4).



Fig 4: Immagine dei vari componenti del terreno ALOA

## 2..2METODI

### 3.2.1 MODALITÀ DI INOCULAZIONE SPERIMENTALE

Per scelta personale si è stabilito di allestire varie serie di campioni che contenessero mediamente da 1 a 10 ufc/g e rispettivamente da 10 a 100 ufc/g di . Per ottenere tali cariche si è proceduto nel modo seguente:



- 1) Allestimento di brodocoltura di ciascun ceppo di *Listeria monocytogenes* in *BHI-broth* e incubazione delle stesse a 37°C per 18 ore;
- 2) Allestimento di diluizioni seriali in base 10 fino a una diluizione 10<sup>-7</sup>;
- 3) Allestimento della sospensione batterica da inoculare nei campioni.

Quest'ultima è stata realizzata sospendendo in 999 ml di soluzione fisiologica sterile 1 ml della diluizione decimale scalare ritenuta più opportuna per raggiungere nei campioni inoculati la carica microbica voluta.

In pratica, poiché nell'allestimento della sospensione microbica utilizzata si partiva da una diluizione decimale, la sospensione batterica utilizzata per l'inoculo è stata ricavata aggiungendo a 999 ml di soluzione fisiologica sterile 1 ml della diluizione seriale -3 (per ottenere la carica 1 a 10) e rispettivamente -2 (per ottenere la carica tra 10-100).

Le altre diluizioni seriali da -4 a -7 sono state, invece, utilizzate per determinare con precisione la carica di partenza della sospensione microbica madre.

### **3.2.2 PREPARAZIONE DEI CAMPIONI**

Sono stati allestiti 144 campioni pesando 90 g ciascuno di salmone affumicato e depositati negli appositi barattoli sterili (fig. 5).

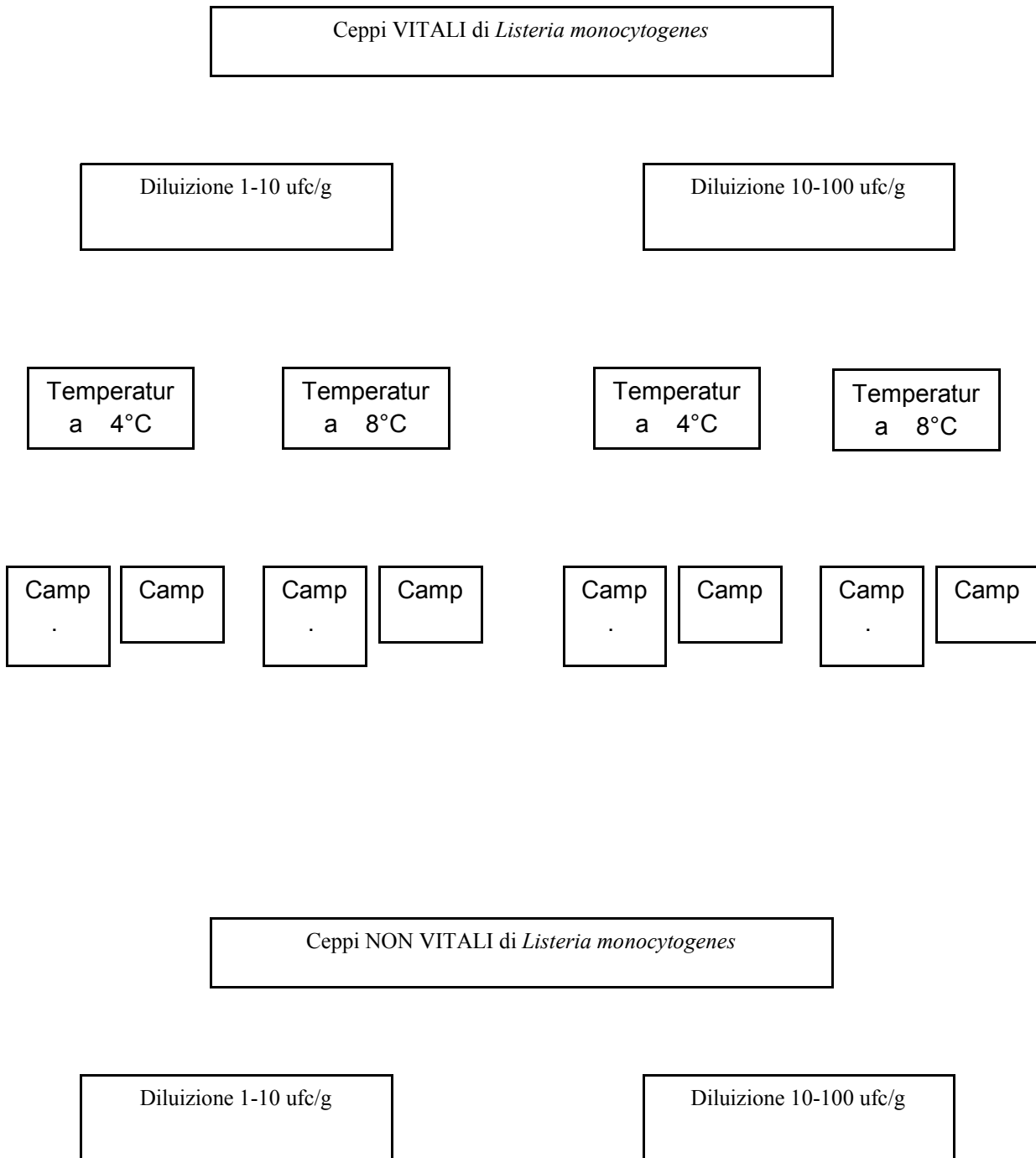


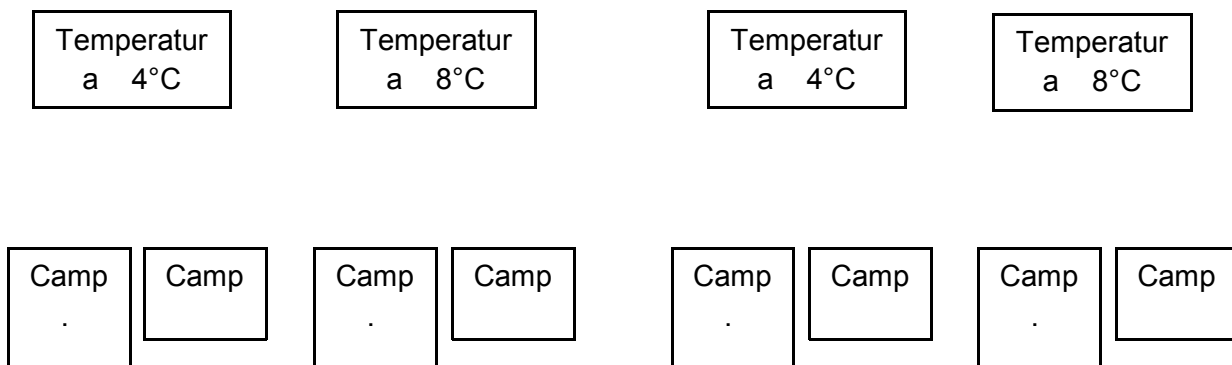
Fig. 5: Due immagini dei 144 barattoli contenenti 90 g di salmone

72 campioni hanno ricevuto un inoculo di 10 ml di *Listeria monocytogenes* appartenente ai ceppi vitali e gli altri 72 di *Listeria monocytogenes* appartenente ai ceppi non vitali. All'interno di ognuno dei due gruppi, 36 campioni sono stati inoculati con il batterio ad una diluizione di 1-10 ufc/g e 36 ad una diluizione di 10-100 ufc/g. Per ogni singolo ceppo e per ogni singola diluizione metà campioni sono stati conservati a 4°C, temperatura di refrigerazione richiesta per la conservazione del salmone affumicato, metà invece sono stati conservati a 8°C in modo tale da creare una situazione di abuso termico.

Partendo da  $T_0 = 24$  ore dopo l'inoculo, ogni 10 giorni per ogni singola diluizione e per ogni singolo ceppo su due campioni conservati a 4°C e due conservati a 8°C è stata fatta un'analisi quantitativa di *Listeria monocytogenes* (fig. 6). L'analisi è stata condotta sistematicamente applicando la metodica standard UNI ISO 11290-2:1998 e rispettivo Amendment 1:2004, utilizzata nei laboratori accreditati.

Fig. 6: SCHEMA RIASSUNTIVO DELLA PREPARAZIONE DEI CAMPIONI.





### 3.2.3 ANALISI QUANTITATIVA DI *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Per effettuare l'analisi quantitativa di *Listeria monocytogenes* è stata seguita la procedura prevista dalla norma UNI ISO 11290-2:1998 e rispettivo Amendment 1:2004, UNI ISO 6887 e 8261 che prevede i seguenti passaggi:

Primo passaggio: prelevo per ogni campione una quantità pari a 10 g di salmone affumicato e lo inserisco in un sacchetto sterile per stomacher. Successivamente effettuo una diluizione (1:10) del campione con 90 ml di acqua peptonata tamponata e omogeneizzo il tutto con l'apposito apparecchio.

Secondo passaggio: con l'utilizzo di pipette sterili trasferisco 0,1 ml della sospensione sulla superficie delle piastre di terreno ALOA, effettuo la semina per spatolamento con spatole sterili e metto ad incubare le piastre a 37°C per 24 ore.

Terzo passaggio: Trascorse le 24 ore di incubazione effettuo la conta delle colonie di *Listeria monocytogenes* che si presentano piccole di colore blu-verde circondate da un alone opaco (fig. 6-7).

A



B



Fig 6: Due immagini di terreno ALOA: A) prima della semina, B) 24 ore dopo la semina si osservano le colonie di *Listeria monocytogenes*

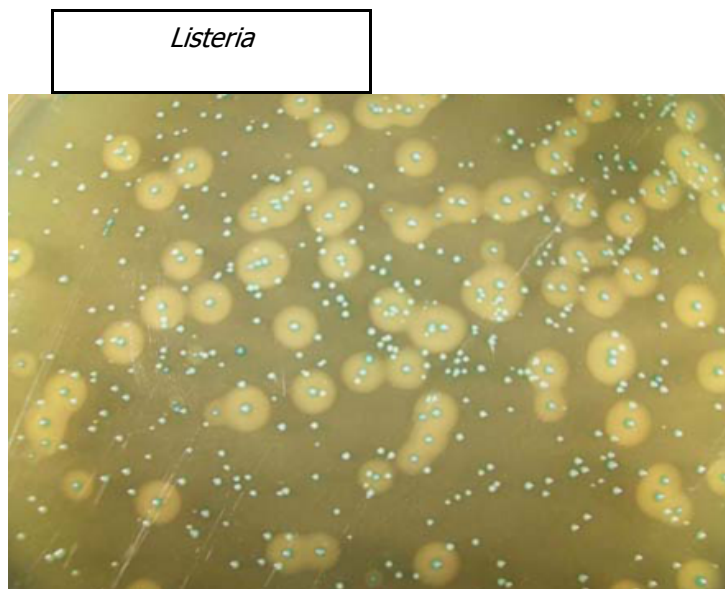


Fig. 7: Colonie di *L. monocytogenes*

## CAPITOLO 4 - RISULTATI E DISCUSSIONE

### 4.1 RISULTATI

Per una migliore e più chiara lettura dei risultati ottenuti, questi sono stati riportati schematicamente nelle tabelle e nei grafici in seguito riportati.

Dalla conta delle colonie eseguita sui campioni di salmone affumicato inoculato con *Listeria monocytogenes* vitale con diluizione iniziale 1-10 ufc/g è stato riscontrato un aumento del numero delle colonie stesse da 35 ufc/g con T=0 a 33.000 ufc/g con T=50gg con un picco di 96.000 ufc/g a T=30gg quando la temperatura di conservazione è stata mantenuta a 4°C (fig.

8 A-B). In presenza di abuso termico con temperatura di conservazione pari a 8°C, il numero di colonie è variato da 55 ufc/g a T=0 a 39.500.000 ufc/g al T=50gg (fig. 9 A-B). Partendo invece da una diluizione iniziale di inoculo di 10-100 ufc/g, il numero di colonie è variato da 725 ufc/g a T=0 fino a 32.064.000 ufc/g a T=50gg mantenendo la temperatura di conservazione a 4°C (fig. 10 A-B). Con temperatura di conservazione pari a 8°C il numero di colonie contato è variato da 865 a T=0 a 492.000.000 a T=50gg (fig. 11 A-B), (tabelle 2-3).



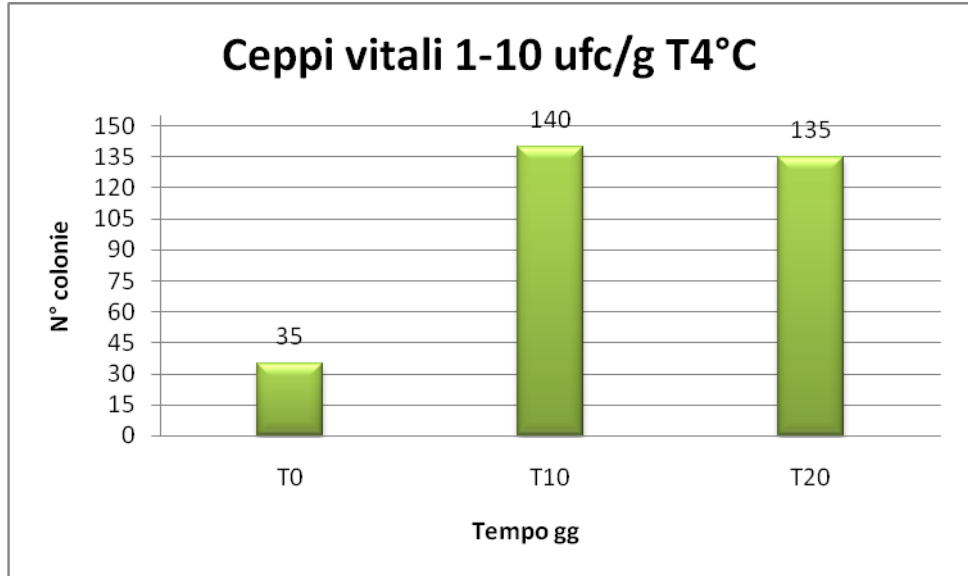
Tab.2: Numero di colonie contate di *Listeria monocytogenes* nello stato vitale (sviluppo a 4°C e, rispettivamente, 8°C )

CEPPO	DILUIZIO NI	TEMPERATURA	CAMPIO NI	N° COLONIE A T0	N° COLONIE A T10	N° COLONIE A T20	N° COLONIE A T30	N° COLONIE A T40	N° COLONIE A T50
V	1-10	4 °C	A	50	160	140	105000	6000	30000
V	1-10	4 °C	B	20	120	130	87000	2200	36000
V	1-10	8 °C	A	60	17000	300	11500000	170000	38000000
V	1-10	8 °C	B	50	4900	800	3500000	3370000	41000000
V	10-100	4 °C	A	770	1860	900	710000	3000	64100000
V	10-100	4 °C	B	680	1350	1100	90000	40000	28000
V	10-100	8 °C	A	800	24000	11000000	1000000	257000000	484000000
V	10-100	8 °C	B	930	23000	12000000	3000000	126000000	500000000

Tab.3: Valori medi delle colonie contate di *Listeria monocytogenes* nello stato vitale (sviluppo a 4°C e, rispettivamente, 8°C )

CEPPO	DILUIZIO NI	TEMPERATURA	CAMPIO NI	N° COLONIE A T0	N° COLONIE A T10	N° COLONIE A T20	N° COLONIE A T30	N° COLONIE A T40	N° COLONIE A T50
V	1-10	4 °C	A	35	140	135	96000	4100	33000
V	1-10	8 °C	A	55	10950	550	7500000	1770000	39500000
V	10-100	4 °C	A	725	1605	1000	400000	21500	32064000
V	10-100	8 °C	A	865	23500	11500000	2000000	191500000	492000000

A



B

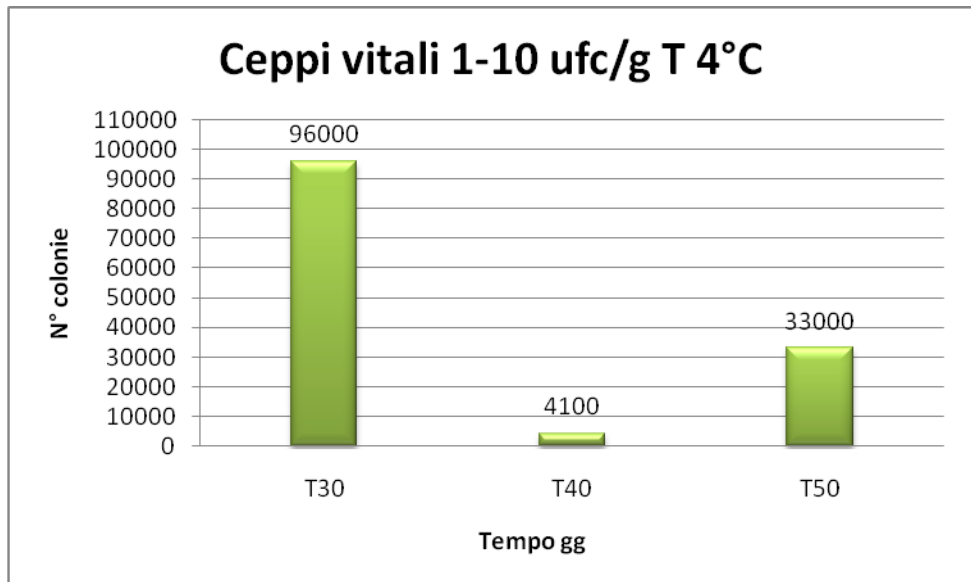
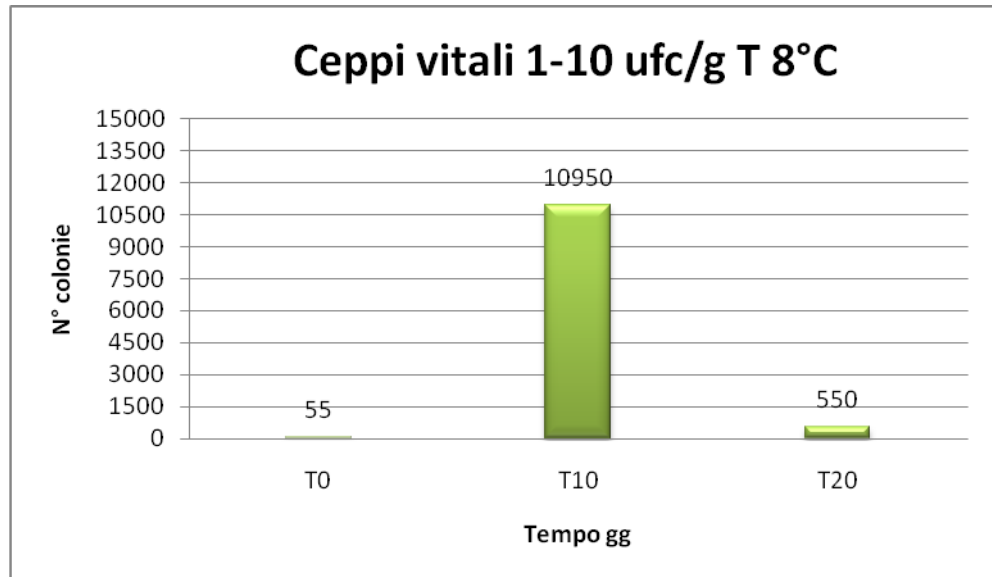


Fig. 8 A-B: Numero delle colonie contate sui campioni di salmone affumicato inoculato con di *Listeria monocytogenes* (ceppi vitali) con diluizione iniziale 1-10 ufc/g ai tempi T=0gg, T=10gg, T=20gg, T=30gg, T=40gg, T=50gg conservati a 4°C .

A



B

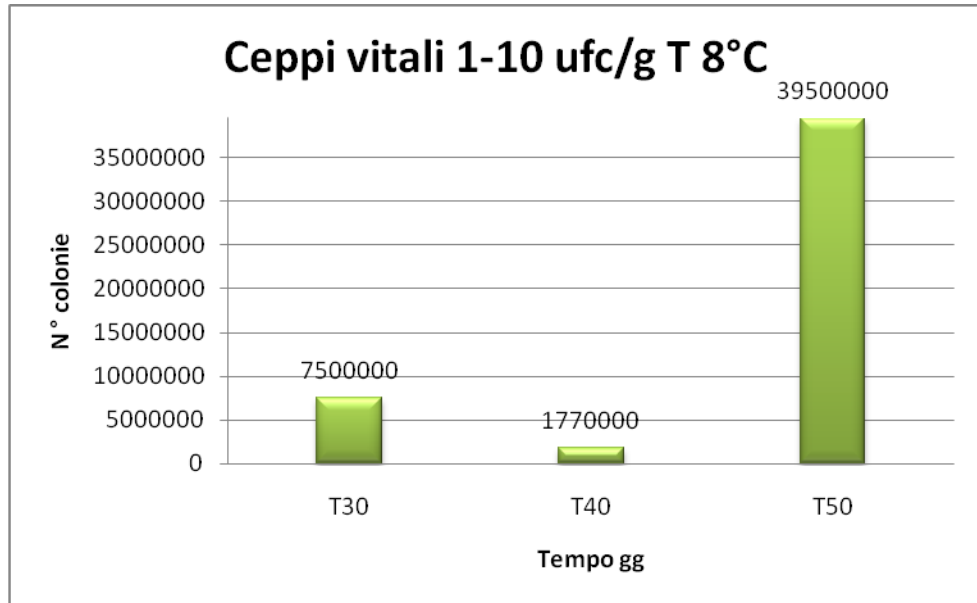
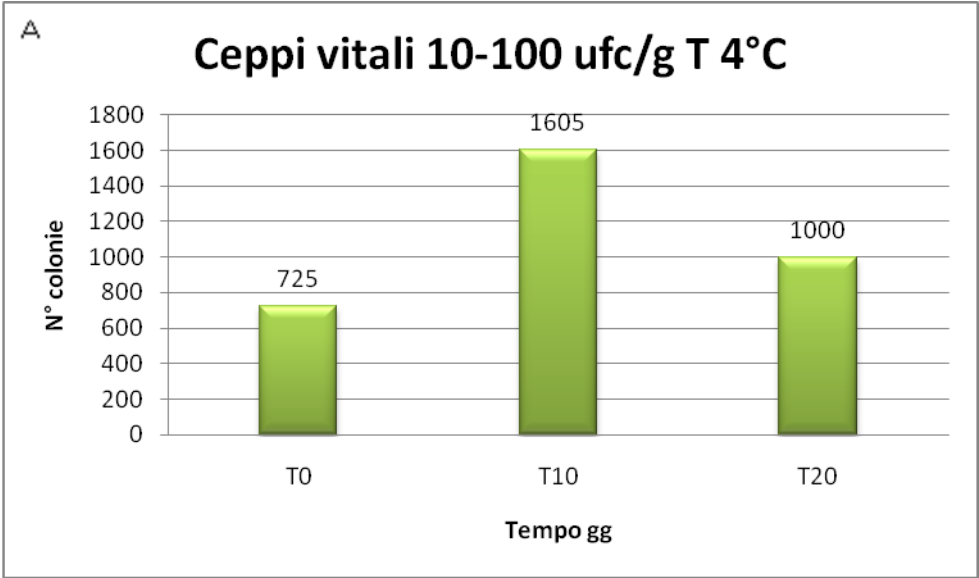


Fig. 9 A-B : Numero delle colonie contate sui campioni di salmone affumicato inoculato con di *Listeria monocytogenes* (ceppi vitali) con diluizione iniziale 1-10 ufc/g ai tempi T=0gg, T=10gg, T=20gg, T=30gg, T=40gg, T=50gg conservati a 8°C .



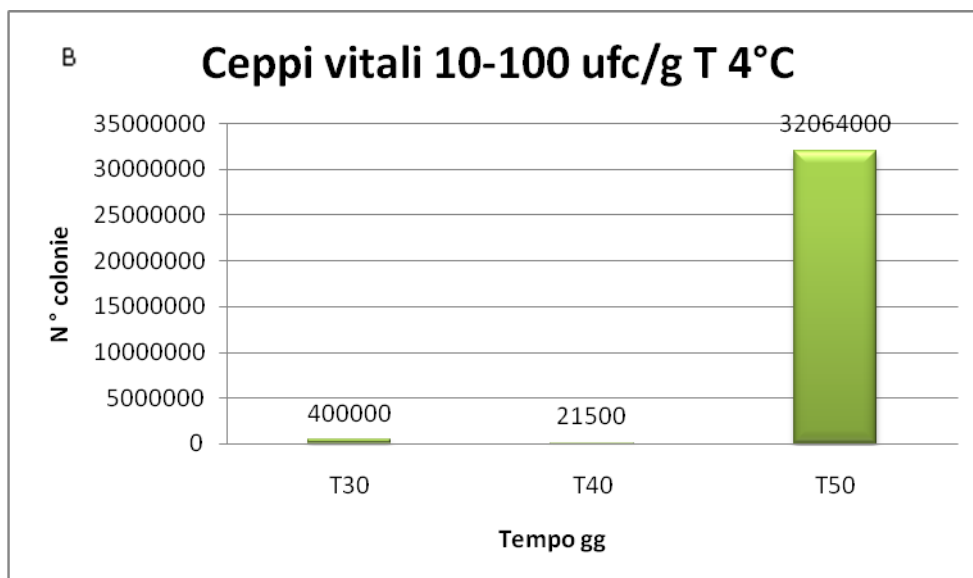
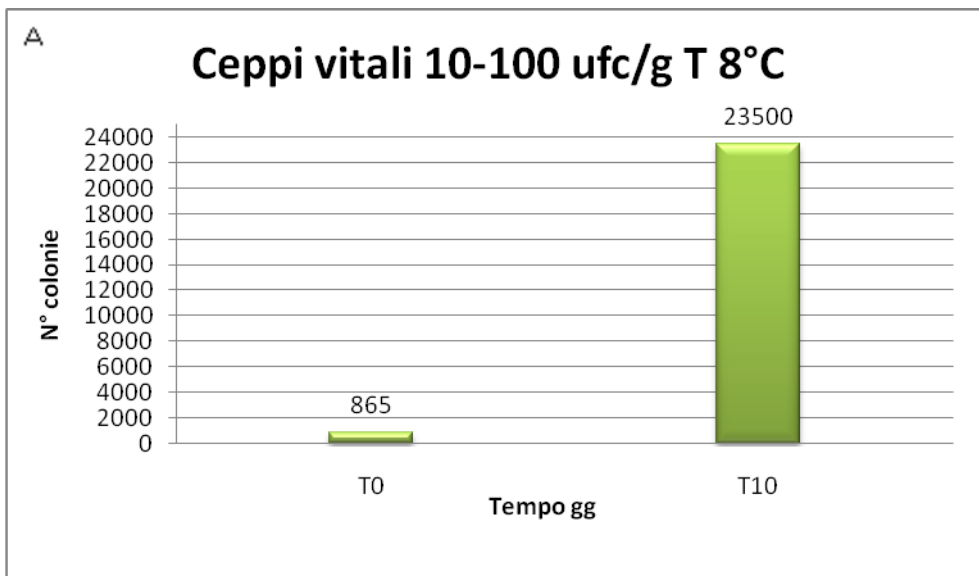


Fig. 10 A-B : Numero delle colonie contate sui campioni di salmone affumicato inoculato con di *Listeria monocytogenes* (ceppi vitali) con diluizione iniziale 10-100 ufc ai tempi T=0gg, T=10gg, T=20gg, T=30gg, T=40gg, T=50gg conservati a 4°C .



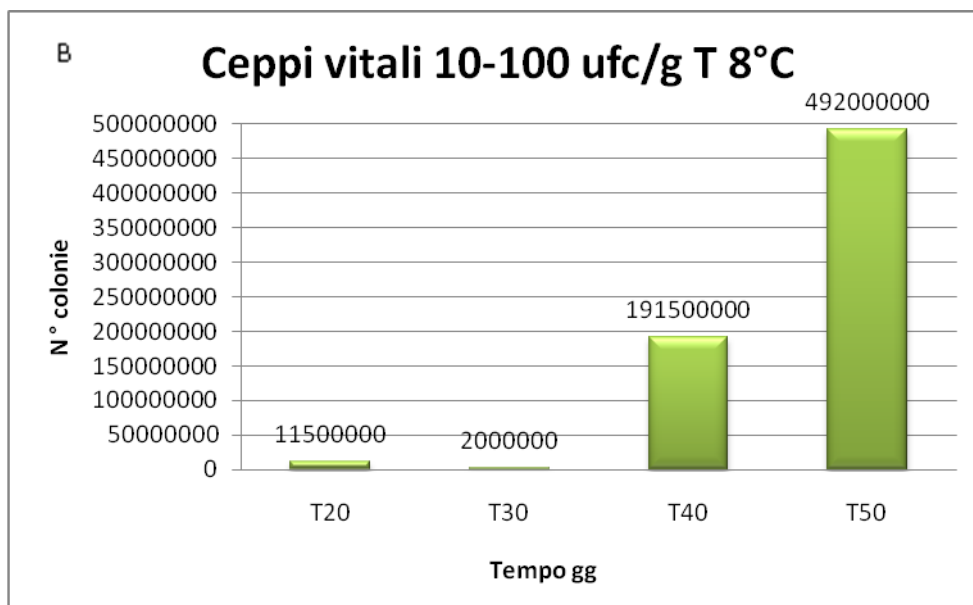


Fig. 11 A-B: Numero delle colonie contate sui campioni di salmone affumicato inoculato con di *Listeria monocytogenes* (ceppi vitali) con diluizione iniziale 10-100 ufc ai tempi T=0gg, T=10gg, T=20gg, T=30gg, T=40gg, T=50gg conservati a 8°C .

Nella conta effettuata sui campioni di salmone affumicato inoculato con ceppi non vitali di *Listeria monocytogenes* con diluizione iniziale 1-10 ufc/g è stato riscontrato un aumento del numero delle colonie rispettivamente da 85 ufc/g a T=0gg a 13.450 ufc/g a T=50gg con un picco pari a 17.800 ufc/g a T=40gg per i campioni conservati a temperatura di 4°C (fig. 12 A-B) e da 65 ufc/g a T=0 a 30.400.000 ufc/g a T=50gg per quelli conservati a 8°C (fig. 13 A-B). Nei campioni inoculati con diluizione pari a 10-100 ufc/g invece il numero delle



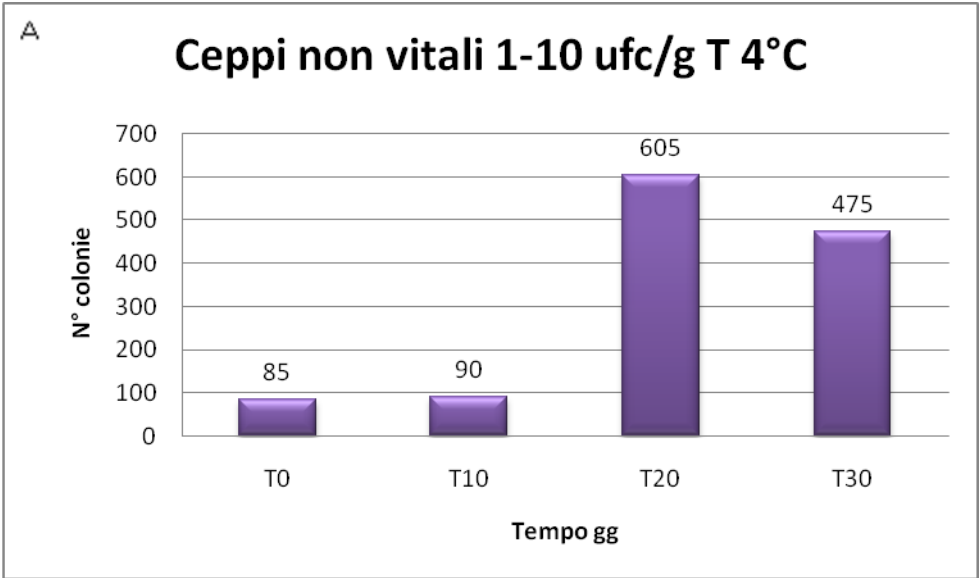
colonie è aumentato da 690 ufc/g a T=0gg a 25.300 ufc/g a T=50gg per i campioni conservati a 4°C (fig. 14 A-B) e da 750 ufc/g a T=0 a 65.000.000 ufc/g a T=50gg con un picco a T=30gg pari a 257.500.000 ufc/g per i campioni conservati a 8°C (fig.15 A-B), (tabelle 4-5).

Tab.4: Numero di colonie contate di *Listeria monocytogenes* nello stato non vitale (sviluppo a 4°C e, rispettivamente, 8°C )

CEPPO	DILUIZIONE	TEMPERATURA	CAMPIONE	N° COLONIE A T0	N° COLONIE A T10	N° COLONIE A T20	N° COLONIE A T30	N° COLONIE A T40	N° COLONIE A T50
NV	1-10	4 °C	A	110	100	900	130	33000	18600
NV	1-10	4 °C	B	60	80	310	820	2600	8300
NV	1-10	8 °C	A	90	570	160	33200000	340000	25800000
NV	1-10	8 °C	B	40	7600	480	2900000	3080000	35000000
NV	10-100	4 °C	A	650	280	410	4290	48100	6400
NV	10-100	4 °C	B	730	330	580	1180	700	44200
NV	10-100	8 °C	A	890	21900	8200000	404000000	20000000	44000000
NV	10-100	8 °C	B	610	26200	10100000	111000000	70000000	86000000

Tab.5: Valori medi delle colonie contate di *Listeria monocytogenes* nello stato non vitale (sviluppo a 4°C e, rispettivamente, 8°C )

CEPPO	DILUIZIONE	TEMPERATURA	CAMPIONE	N° COLONIE A T0	N° COLONIE A T10	N° COLONIE A T20	N° COLONIE A T30	N° COLONIE A T40	N° COLONIE A T50
NV	1-10	4 °C	A	85	90	605	475	17800	13450
NV	1-10	8 °C	A	65	4085	320	18050000	1710000	30400000
NV	10-100	4 °C	A	690	305	495	2735	24400	25300
NV	10-100	8 °C	A	750	24050	9150000	257500000	45000000	65000000



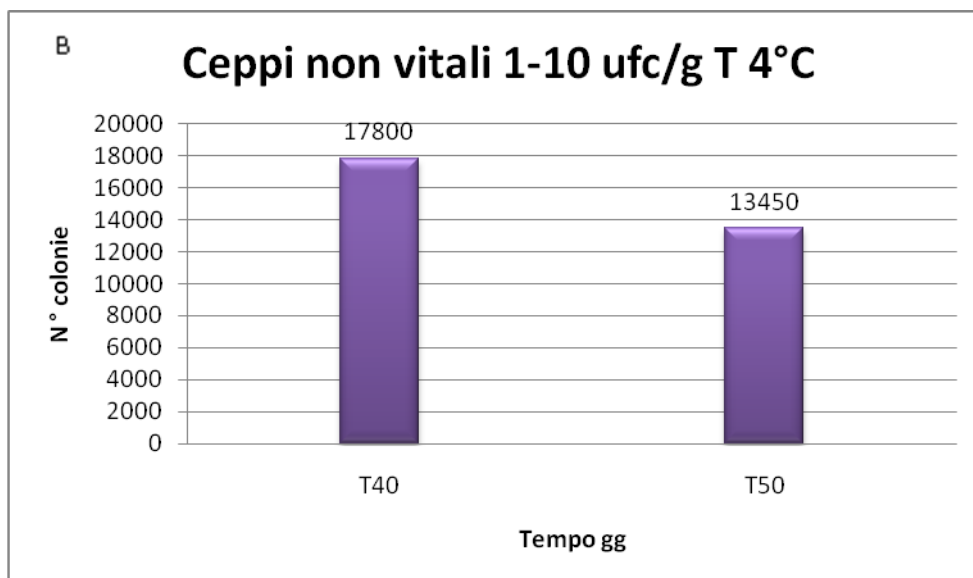
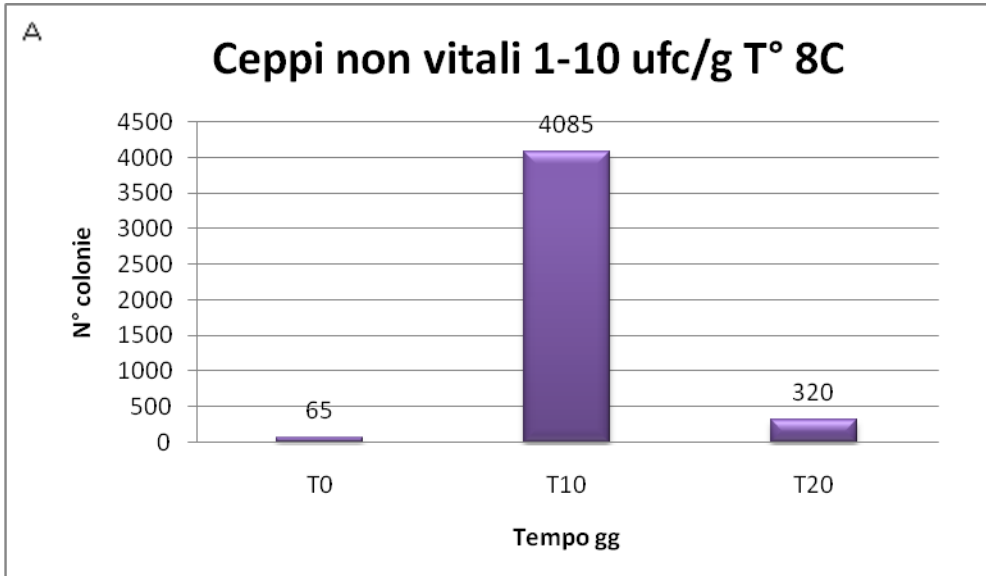


Fig. 12 A-B : Numero delle colonie contate sui campioni di salmone affumicato inoculato con di *Listeria monocytogenes* (ceppi non vitali) con diluizione iniziale 1-10 ufc/g ai tempi T=0gg, T=10gg, T=20gg, T=30gg, T=40gg, T=50gg conservati a 4°C .



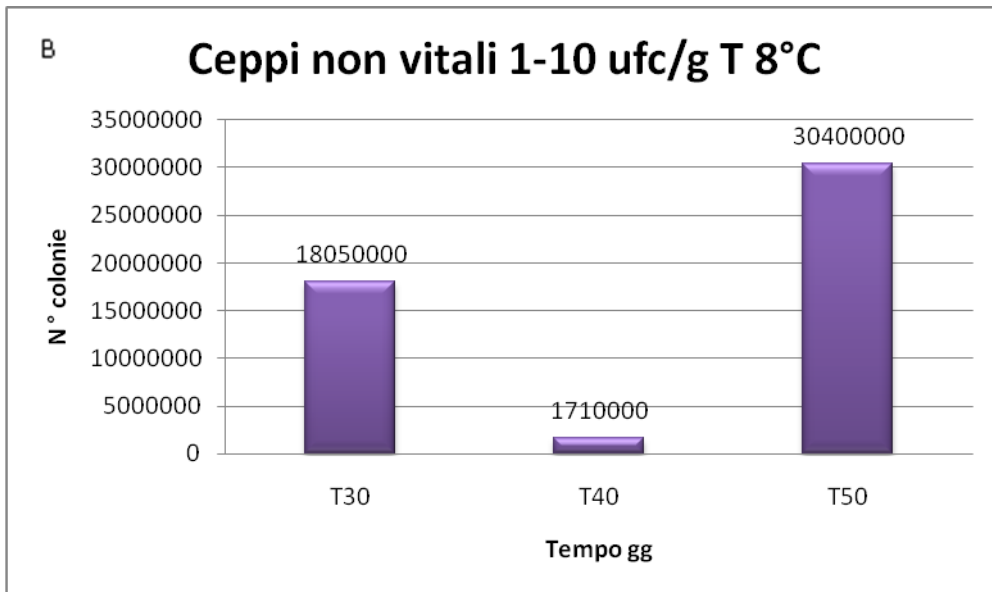
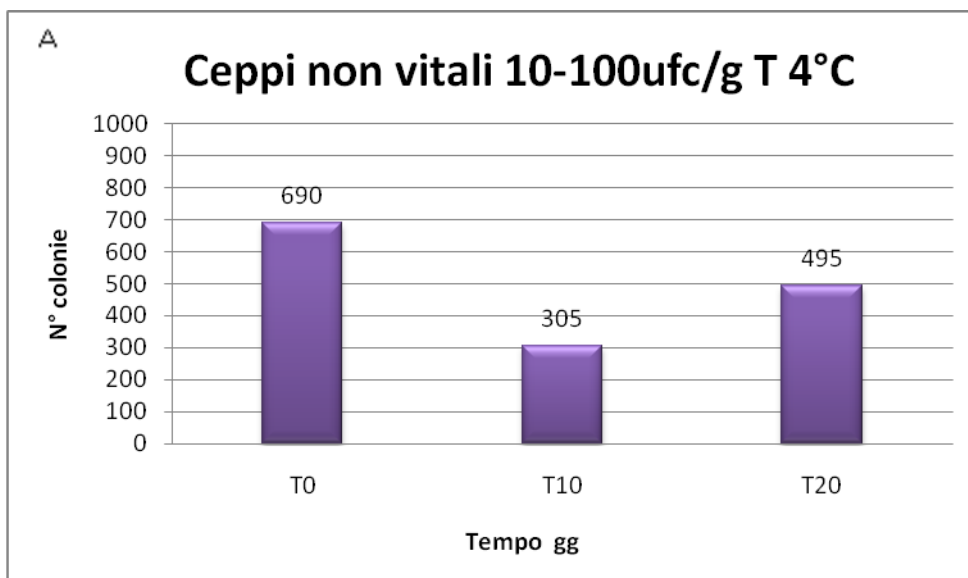


Fig. 13 A-B : Numero delle colonie contate sui campioni di salmone affumicato inoculato con di *Listeria monocytogenes* (ceppi non vitali) con diluizione iniziale 1-10 ufc/g ai tempi T=0gg, T=10gg, T=20gg, T=30gg, T=40gg, T=50gg conservati a 8°C .



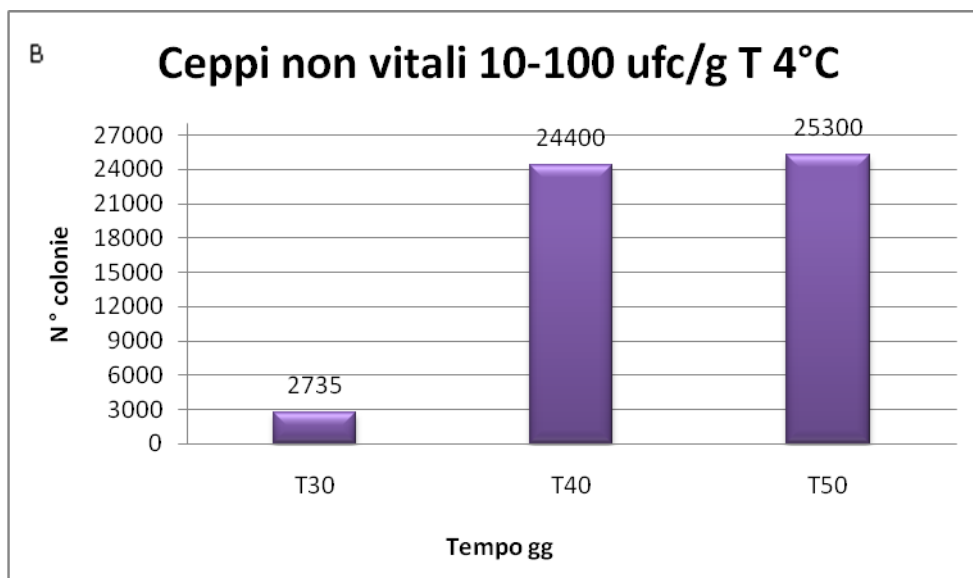
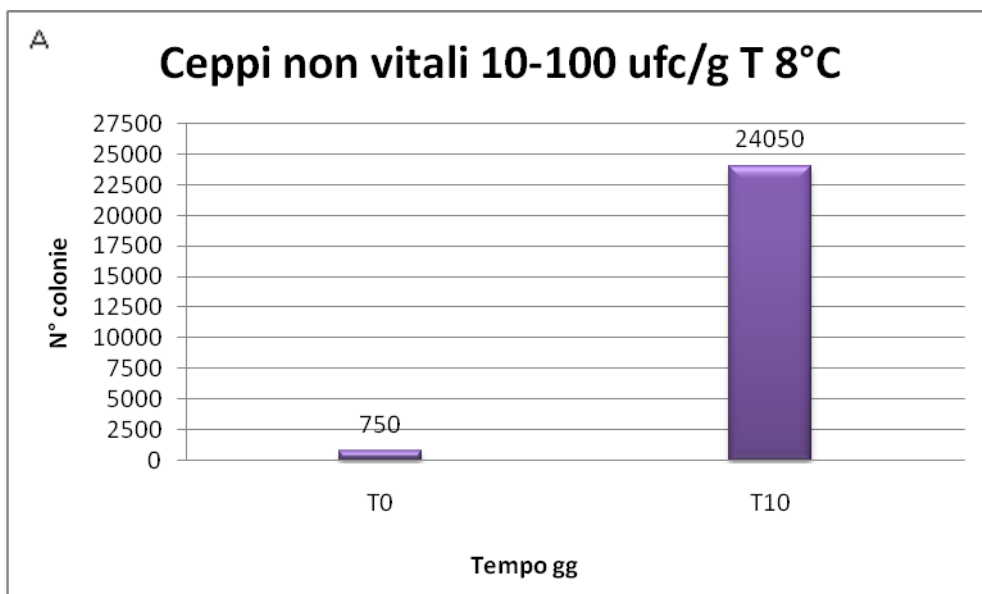


Fig. 14 A-B : Numero delle colonie contate sui campioni di salmone affumicato inoculato con di *Listeria monocytogenes* (ceppi non vitali) con diluizione iniziale 10-100 ufc/g ai tempi T=0gg, T=10gg, T=20gg, T=30gg, T=40gg, T=50gg conservati a 4°C .





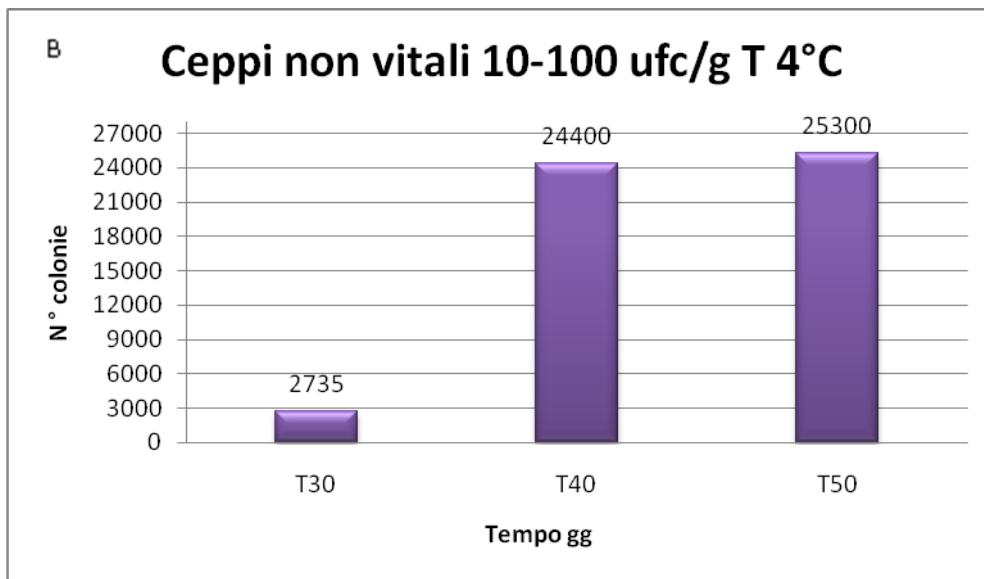
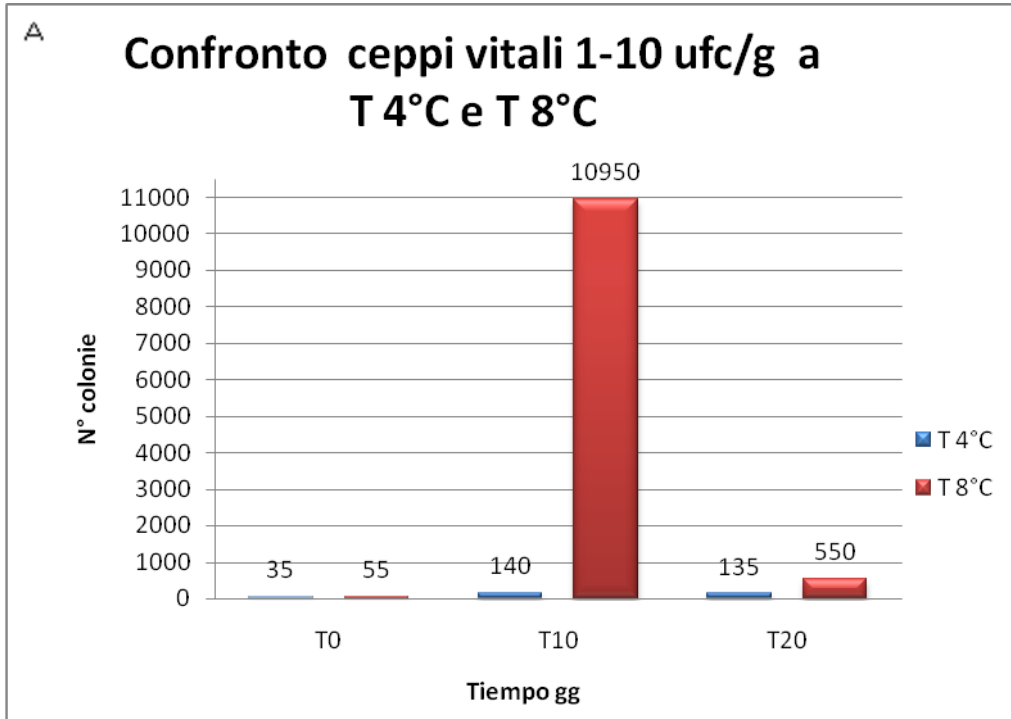


Fig. 15 A-B : Numero delle colonie contate sui campioni di salmone affumicato inoculato con di *Listeria monocytogenes* (ceppi non vitali) con diluizione iniziale 10-100 ufc/g ai tempi T=0gg, T=10gg, T=20gg, T=30gg, T=40gg, T=50gg conservati a 8°C .



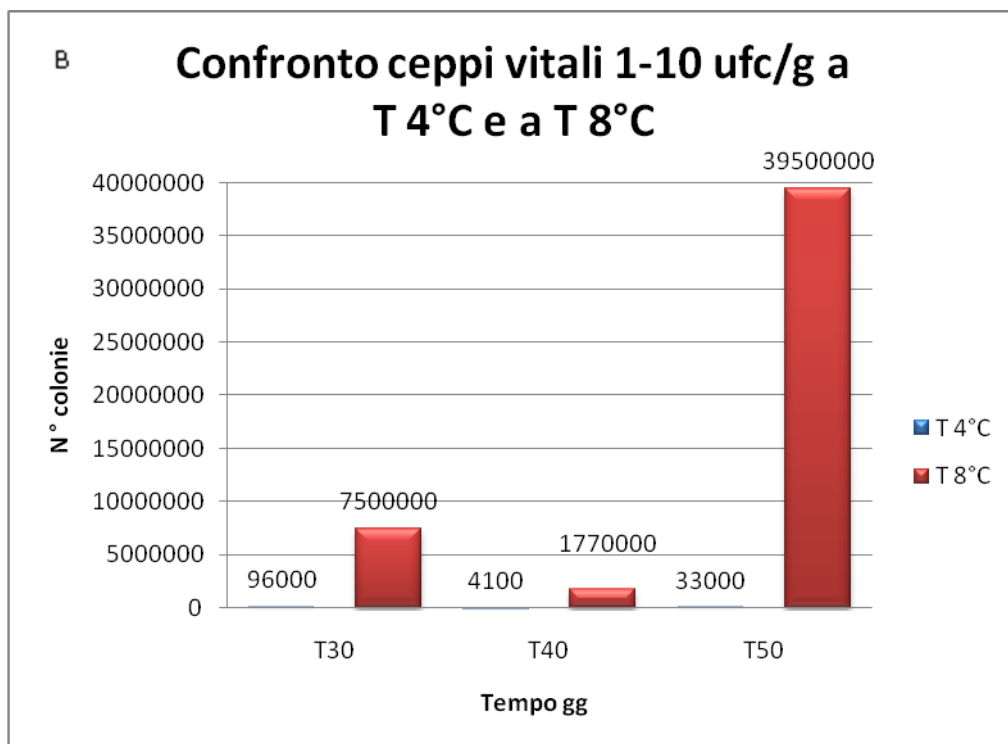
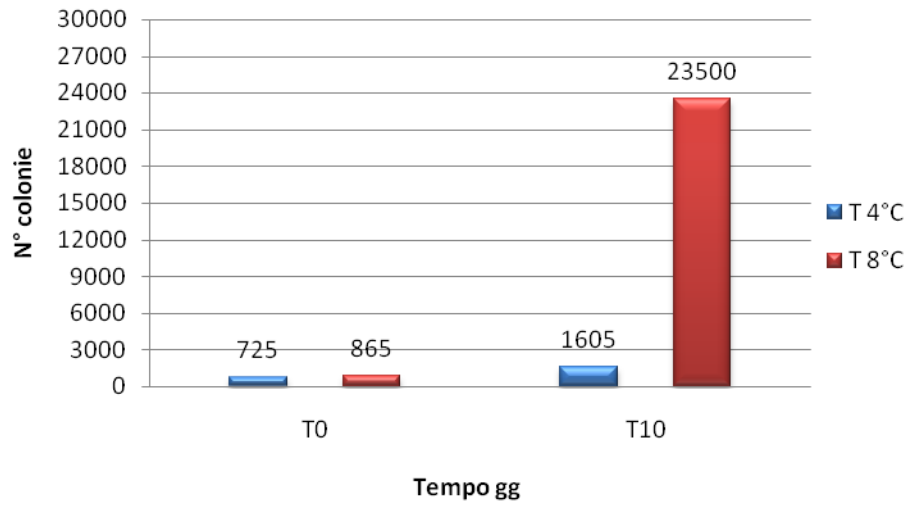


Fig 16 A-B: Confronto tra il numero di colonie contate sui campioni di salmone affumicato inoculato con *Listeria monocytogenes* (ceppi vitali) con diluizione iniziale 1-10 ufc/g ai tempi T=0gg, T=10gg, T=20gg, T=30gg, T=40gg, T=50gg conservati rispettivamente a 4°C e a 8°C.

A

### Confronto ceppi vitali 10-100 ufc/g a T 4°C e T 8°C



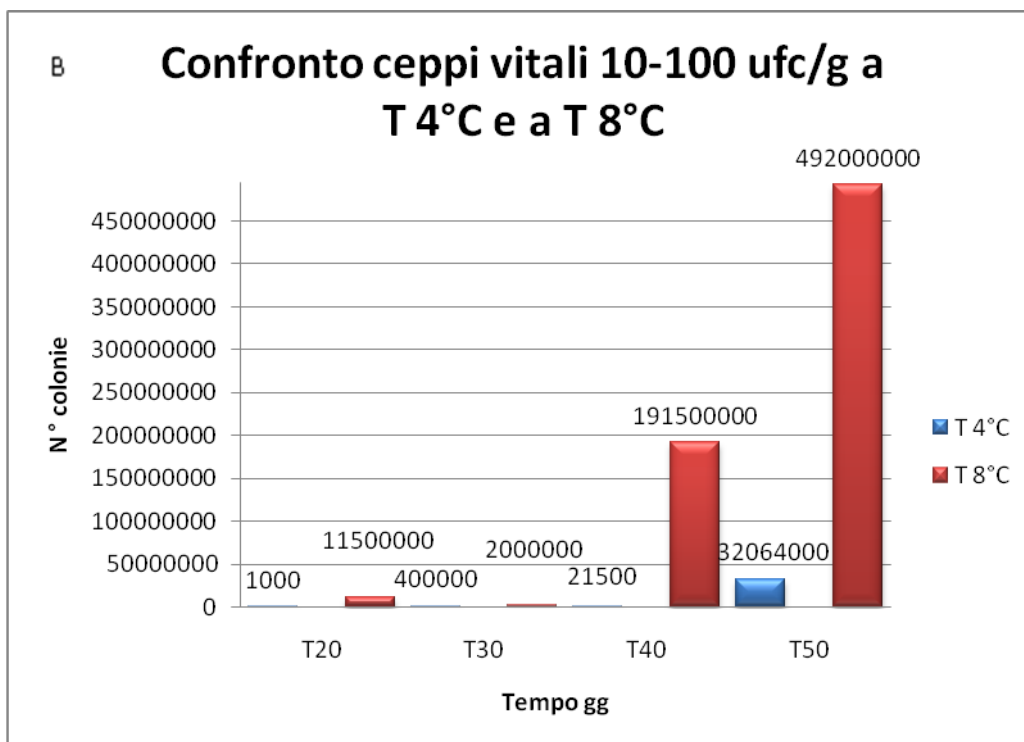
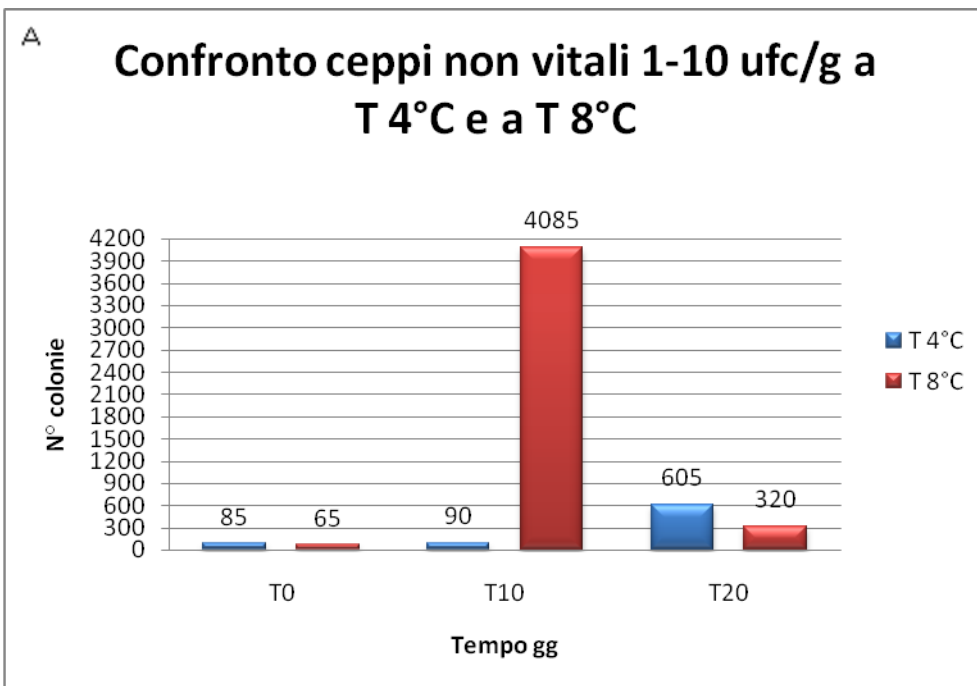


Fig 17 A-B: Confronto tra il numero di colonie contate sui campioni di salmone affumicato inoculato con *Listeria monocytogenes* (ceppi vitali) con diluizione iniziale 10-100 ufc/g ai tempi T=0gg, T=10gg, T=20gg, T=30gg, T=40gg, T=50gg conservati rispettivamente a 4°C e a 8°C.



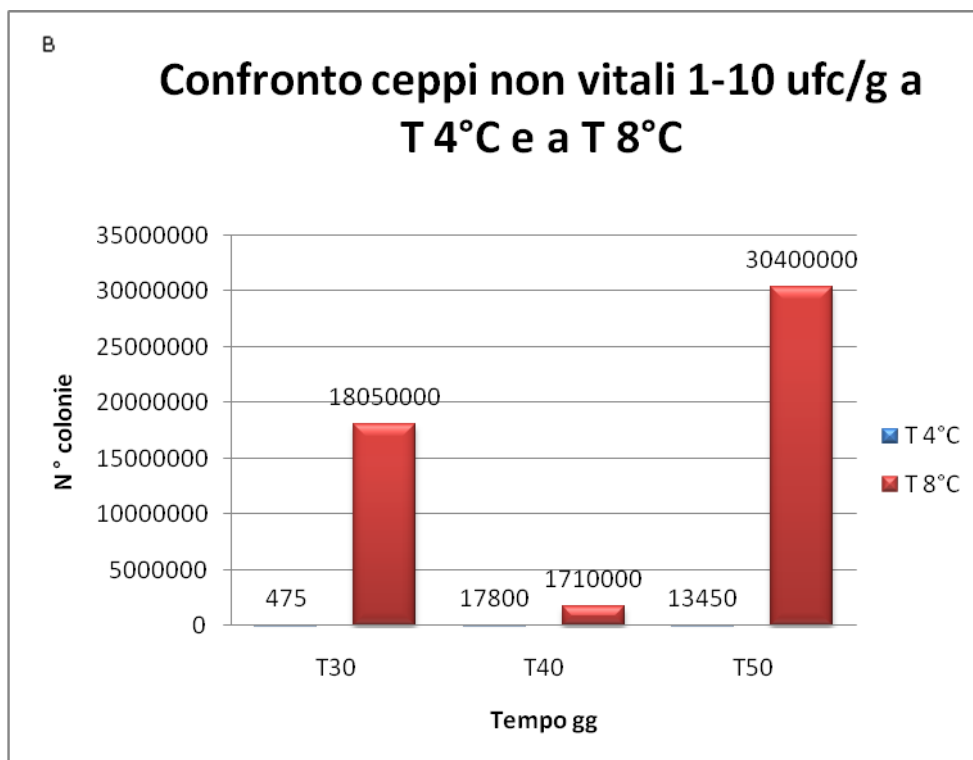
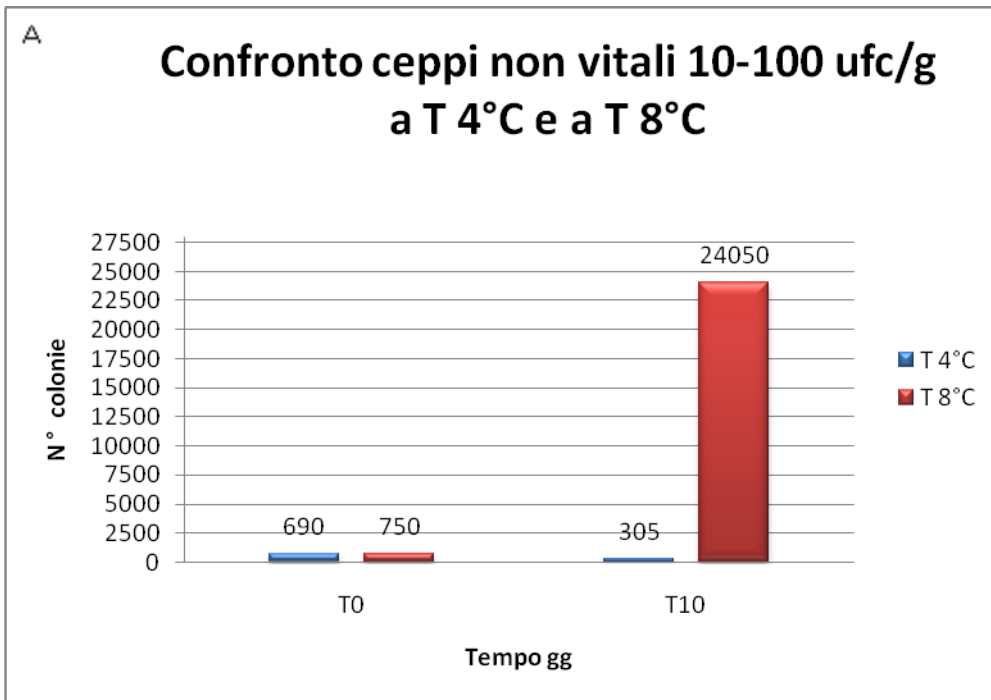


Fig 18 A-B: Confronto tra il numero di colonie contate sui campioni di salmone affumicato inoculato con *Listeria monocytogenes* (ceppi non vitali) con diluizione iniziale 1-10 ufc/g ai tempi T=0gg, T=10gg, T=20gg, T=30gg, T=40gg, T=50gg conservati rispettivamente a 4°C e a 8°C.





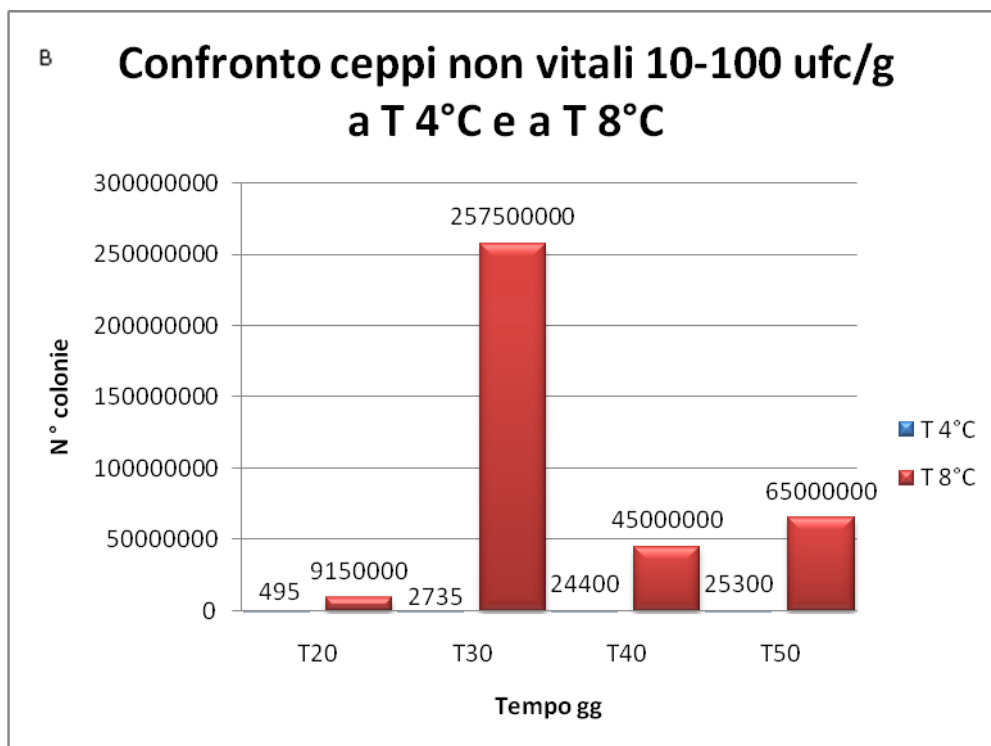


Fig 19 A-B: Confronto tra il numero di colonie contate sui campioni di salmone affumicato inoculato con *Listeria monocytogenes* (ceppi non vitali) con diluizione iniziale 10-10 ufc/g ai tempi T=0gg, T=10gg, T=20gg, T=30gg, T=40gg, T=50gg conservati a 4°C e a 8°C.

## 4.2 DISCUSSIONE

Analizzando i risultati ottenuti si può evidenziare che, come dimostrato in altri studi (Dalgaard *et al.*, 1997) *Listeria monocytogenes* è un batterio che cresce facilmente nel salmone affumicato. Lo studio, che è stato condotto a due diverse temperature per mettere in evidenza il comportamento del batterio sia a temperatura corretta di conservazione del

salmone affumicato (4°C) sia in condizioni di abuso termico (8°C), ha evidenziato che il batterio è in grado di moltiplicare in entrambi i casi, più lentamente a temperatura di refrigerazione, più velocemente in condizioni di abuso termico.

In particolar modo a temperatura di 8°C, partendo da una diluizione di 1-10 ufc/g sia per i ceppi vitali che per i ceppi non vitali, il numero di colonie si è portato a un valore superiore a decine di milioni di ufc/g, (rispettivamente 39.500.000 per i ceppi vitali e 30.400.000 per i ceppi non vitali) dopo 40-50 gg di conservazione del prodotto. Anche a temperatura pari a 4°C il numero delle colonie di *Listeria monocytogenes*, sia per i ceppi vitali che per quelli non vitali, partendo da una diluizione 1-10 ufc/g è aumentato raggiungendo valori molto elevati. I ceppi vitali hanno raggiunto il valore di 33.000 ufc/g e i ceppi non vitali il valore di 13.450 ufc/g.

Se si considerano poi i dati ottenuti dai campioni inoculati con una diluizione pari a 10-100 ufc/g, si nota che i valori ottenuti sono ancora più elevati raggiungendo a temperatura di 4°C per i ceppi vitali 32.064.000 ufc/g e per i ceppi non vitali 25.300 ufc/g e a temperature di 8°C rispettivamente 492.000.000 ufc/g e 65.000.000 ufc/g.

Mettendo a confronto le due diverse temperature di conservazione si evidenzia che, nonostante ci sia una notevole crescita sia a 4°C che a 8 °C dopo 40-50 giorni di conservazione, i valori raggiunti in condizioni di abuso termico partendo dalla stessa diluizione iniziale sono decisamente più elevati. A 8°C nelle diluizioni 1-10 ufc/g rispetto ai 4°C c'è un aumento di 3 gradi Log raggiungendo 39.500.000 ufc/g per i ceppi vitali e di 3 gradi Log per i ceppi non vitali raggiungendo 30.400.000 ufc/g; nelle diluizioni 10-100 ufc/g rispetto ai 4°C c'è un aumento di 1 grado Log per i ceppi vitali raggiungendo 492.000.000 ufc/g e un aumento di 3 gradi Log per i ceppi non vitali raggiungendo 6.500.000 ufc/g.

In alcuni casi si è rilevato un progressivo calo delle cariche microbiche specifiche del batterio, verso la fine del periodo di conservazione.

Potrebbe sembrare, questo, un aspetto paradossale ma può essere giustificato da due fatti:

- 1) la progressiva riduzione di qualche elemento nutritivo essenziale nel substrato, che ha frenato la crescita dei batteri;

- 2) la contemporanea crescita di batteri lattici che, con la loro produzione di acidi organici e di batterio cine, possono influenzare la dinamica di popolazione di *Listeria monocytogene*.

## CAPITOLO 5 - CONCLUSIONI

Il fatto di avere riscontrato un elevato aumento del numero di colonie sia nei campioni conservati a 4°C sia in quelli conservati a 8 °C porta ad una serie di conclusioni:

1. il salmone affumicato è un terreno favorevole alla crescita di *Listeria monocytogenes*;
2. *Listeria monocytogenes* nel salmone affumicato è in grado di moltiplicare anche in condizioni di crescita stazionaria (VBNC), condizioni in cui il batterio si trova maggiormente nell'ambiente;
3. la temperatura di refrigerazione, consigliata per la conservazione del salmone affumicato, non è sufficiente ad arrestare lo sviluppo di *Listeria monocytogenes*;
4. il salmone affumicato non deve essere sottoposto a condizioni di abuso termico.

Di conseguenza, sotto il profilo igienico, le considerazioni ulteriori che si possono trarre da questi risultati possono essere le seguenti:

1. il salmone affumicato è un alimento che, dal punto di vista del Reg. (CE) 2073/05, si classifica come "alimento pronto". Pertanto il produttore è tenuto a rispettare uno specifico criterio di sicurezza alimentare che è costituito dall'assenza nel prodotto di *Listeria monocytogenes* o, per essere più precisi, dalla presenza nell'alimento di un numero molto limitato del microrganismo e dalla sua impossibilità a moltiplicare;
2. a questo proposito, i risultati da me ottenuti con questo *challenge test* hanno dimostrato che, purtroppo, il salmone affumicato è un substrato che consente la crescita di *Listeria monocytogenes*;
3. di conseguenza, a questo prodotto si deve applicare il criterio di sicurezza previsto dal punto 1.2. dell' allegato I del Reg. (CE) 2073/05, vale a dire che chi produce salmone affumicato si deve assumere la responsabilità che in ciascun lotto di prodotto *Listeria monocytogenes* sia inferiore a 1ufc in 125g di alimento (assente in 25g di ben 5 unità campionarie);
4. questo risultato è raggiungibile, ma solo a patto che:

- a) si utilizzino materie prime di ottima qualità microbiologica;
- b) si rispettino stringenti misure di igiene nella lavorazione del prodotto;
- c) il prodotto finito sia mantenuto il più possibile a T° di refrigerazione;
- d) al prodotto salmone affumicato si diano tempi di vita commerciale non estremamente lunghi, in considerazione della possibile proliferazione nel prodotto di *Listeria monocytogenes* in cariche potenzialmente pericolose per la salute umana.

## RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

### ARTICOLI

1. Bartholomew M.J., Vose D.J., Tollefson L.R., Travis C.C., (2005) “A linear model for managing the risk of antimicrobial resistance originating in food animals”. *Risk Analysis*, 25, 99-107.
2. Beaufort A., Rudelle S., Besse G. N., Toquin M.T., Kerouanton, A., Bergis, H., Salva G., Cornu M., (2007) “Prevalence and growth of *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated cold-smoked salmon”. *Letters in Applied Microbiology*, 44, 406-411.
3. Ben Embarek P.K., Huss H.H., (1993) “Heat resistance of *Listeria monocytogenes* in vacuum packaged pasteurized fish fillets”. *Int. J. Food Microbiol.* 20, 85-95.
4. Besse G.N., Audinet N., Beaufort A., Colin P., Cornu M., Lombard B., (2004) “A contribution to the improvement of *Listeria monocytogenes* enumeration in cold smoked salmon”. *Int. J. Food Microbiol* 91, 119-127.
5. Besse N. G., Beaufort A., Rudelle S., Denis C., Lombard B., (2008) “Evaluation of an enumeration method for *Listeria monocytogenes* at low contamination levels in cold-smoked salmon”. *Int. J. Food Microbiol* 124, 271–274.
6. Borucki M.K., Peppin J.D., White D., Loge F., Call D.R. (2003) “Variation in biofilm formation among strains of *Listeria monocytogenes*”. *Appl. Environm. Microbiol.*, 69, 7336-7342 .
7. Cole M.B., Jones M.V., Holyoak C., (1990) “The effect of pH, salt concentration and temperature on the survival and growth of *Listeria monocytogenes*”. *J. Appl. Bacteriol.* 69, 63-72.

8. Cornu M., Beaufort A., Rudelle S., Laloux L., Bergis H., Miconnet N., Serot T., Delignette-Muller ML., (2006) "Effect of temperature, water-phase salt and phenolic contents on *Listeria monocytogenes* growth rates on cold-smoked salmon and evaluation of secondary models". *Int. J. Food Microbiol.* 106, 159-168.
9. Dalgaard P., Jørgensen L. V., (1998) "Predicted and observed growth of *Listeria monocytogenes* in seafood challenge tests and in naturally contaminated cold-smoked salmon". *Int. J. Food Microbiol.* 40, 105-115.
10. Duffes F., (1999) "Improving the control of *Listeria monocytogenes* in cold smoked salmon". *Trends in Food Science & Technology* 10, 211-216.
11. Faith N.G., Yousef A.E., Luchansky J.B., (1992) "Inhibition of *Listeria monocytogenes* by liquid smoke and isoeugenol, a phenolic component found in smoke". *J. Food Safety* 12, 303-314.
12. Farber J.M., Coates F., Daley E., (1992) "Minimum water activity requirements for the growth of *Listeria monocytogenes*". *Lett. Appl. Microbiol.* 15, 103-105.
13. Fernandez P.S., George S.M., Peck M.W., (1997) "Predictive model of the effect of CO<sub>2</sub>, pH, temperature and NaCl on the growth of *Listeria monocytogenes*". *Int. J. Food Microbiol.* 37, 37-45.
14. Francois K., Valero A., Geeraerd A.H., Van Impe J.F., Debevere J., Gardia-Gimeno R.M., Zurera G., Devlieghere F. (2007) "Effect of preincubation temperature and pH on the individual cell lag phase of *Listeria monocytogenes* cultured at refrigeration temperatures". *Food Microbiol.*, 24, 32-43.

15. Gandhi M., Chikindas M.L. (2007) “*Listeria*: a foodborne pathogen that knows how to survive”. *Int. J. Food Microbiol.*, 113, 1-15.
16. George S.M., Lund B.M., Brocklehurst T.F., (1988) “The effect of pH and temperature on initiation of growth of *Listeria monocytogenes*”. *Lett. Appl. Microbiol.* 6, 153-156.
17. George S.M., Richardson L.C.C., Peck M.W., (1996) “Predictive models for the effect of temperature, pH and acetic and lactic acids on the growth of *Listeria monocytogenes*”. *Int. J. Food Microbiol.* 32, 73-90.
18. Grau F.H., Vanderlinde P.B., (1992) “Occurrence, numbers, and growth of *Listeria monocytogenes* on some vacuum-packaged processed meats”. *J. Food Prot.* 55, 4-7.
19. Gudmundsdóttir S., Roche S.M., Kristinsson K.G., Kristjánsson M., (2006) “Virulence of *Listeria monocytogenes* isolates from humans and smoked salmon, peeled shrimp, and their processing environments”. *J. Food. Prot.* 69, 2157-2160.
20. Hitchins A.D., (1996) “Assessment of alimentary exposure to *Listeria monocytogenes*”. *Int. J. Food Microbiol.* 30, 71-85.
21. Hof H. (2003) “History and epidemiology of listeriosis”. *FEMS Immunology and Microbiology*, 35, 199-202.
22. Hu Y., Gall K., Ho A., Ivanek R., Gröhn Y.T., Wiedman M., (2006) “Daily variability of *Listeria* contamination patterns in a cold-smoked salmon processing operation”. *J. Food Prot.* 69, 2123-2133.
23. Klaeboe H., Rosef O., Saebø M., (2005) “Longitudinal studies on *Listeria monocytogenes* and other *Listeria* species in two salmon processing plants”. *Int. J. Environ Health Res.* 15, 71-77.



24. Koutsoumanis K.P., Patricia A.K., John N. S. (2004) "A comparative study on growth limits of *Listeria monocytogenes* as affected by temperature, pH and  $a_w$  when grown in suspension or on a solid surface". Int J. Food Microbiol., 62, 231-245.
25. Koutsoumanis K., Sofos J.N. (2005) "Effect of inoculum size on the combined temperature, pH and  $a_w$  limits for growth of *Listeria monocytogenes*". Int. J. Food Microbiol., 104, 83-91.
26. Lakshmanan R., Parkinson J. A., Piggott J. R., (2007) "High-pressure processing and water-holding capacity of fresh and cold-smoked salmon (*Salmo salar*)". Science direct LWT 40, 544-551.
27. Leroi F., Joffraud J.J., Chevalier F., Cardinal M., (1998) "A study of the microbial ecology of cold-smoked salmon during storage at 8°C". Int. J. Food Microbiol. 39, 111-121.
28. Macrae M., Millar I.G., Gibson D.M., (1990) "The survival and growth of *Listeria monocytogenes* in smoked salmon". Proceedings of the Commission C2, International Institute of Refrigeration, Aberdeen, UK, p. 249.
29. McLauchlin J., Mitchell R.T., Smerdon W.J., Jewell K. (2004) "*Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterization for use in microbiological risk assessment of foods". Int. J. Food Microbiol., 92, 15-33.
30. Midelet-Bourdin G., Beaufort A., leroi F., Cardinal M., Rudelle S., Leleu G., Copin S., Malle P., (2008) "Impact of -2 degrees C superchilling before refrigerated storage (4 and 8 degrees C) on the microbiological and sensory qualities of cold-smoked salmon". J. Food Prot. 71, 2198-2207.

31. Neetoo H., Ye M., Chen H., (2008) “ Potential antimicrobials to control *Listeria monocytogenes* in vacuum-packaged cold-smoked salmon pâté and fillets”. Int. J. Food Microbiol., 123, 220-227.
32. Neunlist M.R., Ralazamahaleo M., Cappelier J.M., Besnard V., Federighi M., Leroi F., (2005) “ Effect of salting and cold-smoking process on the culturability viability, and virulence of *Listeria monocytogenes* strain Scott A”. J. Food Prot. 67, 85-91.
33. Nicholson F.A., Groves S.J., Chambers B.J. (2005) “Pathogen survival during livestock manure storage and following land application”. Bioresour. Technol., 96, 135-143.
34. Pelroy, G.A., Peterson, M.E., Paranjpye, R.N., Almond, J., Eklund, M.W., (1994) “Inhibition of *Listeria monocytogenes* in cold-process (smoked) salmon by sodium nitrite and packaging method”. J. Food Prot. 57, 114-119
35. Porsby C.H., Vogel B.F., Mohr M., Gram L. (2008) “Influence of processing steps in cold-smoked salmon production on survival and growth of persistent and presumed non-persistent *Listeria monocytogenes*”. Int. J. of Food Microbiol., 122, 287-295.
36. Pouillot R., Goulet V., Delignette-Muller ML., Mahè A., Cornu M., (2009) “Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in French cold-smoked salmon: II. Risk characterization”. Risk. Anal. 29, 806-819.
37. Pouillot R., Miconnet N., Delignette-Muller ML., Beaufort A., Rosso L., Denis J.B., Cornu M., (2007) “Quantitative risk assessment of *Listeria monocytogenes* in French cold-smoked salmon: I. Quantitative exposure assessment”. Risk. Anal. 27, 683-700.
38. Ritz M., Jugiau F., Federighi M., Chapleau N., De Lamballerie M., (2008) “Effects of high pressure, subzero temperature, and pH on survival of *Listeria monocytogenes* in buffer and smoked salmon”. J. Food Prot. 71, 1612-1618.

39. Rørvik L.M. (2000) “*Listeria monocytogenes* in the smoked salmon industry”. Int. J. Food Microbiol., 62, 183-190.
40. Ross T., Dalgaard P., Tienungooc S. (2000) “Predictive modelling of the growth and survival of *Listeria* in fishery products”. Int. J. of Food Microbiol., 62, 231-245.
41. Scott V.N., Swanson K.M.J., Freier T.A., Pruett P. Jr., Svelim V.H., Hall P.A., Smoot L.A., Brown D.G. (2005) “Guidelines for conducting *Listeria monocytogenes* challenge testing of foods”. Food Protection Trends, 25, 818-825.
42. Thurette, J., Membre, J.M., Ching, L.H., Tailliez, R., Catteau, M., (1998) “Behaviour of *Listeria* spp. in smoked fish products affected by liquid smoke, NaCl concentration, and temperature”. J. Food Prot. 61, 1475–1479.
43. Walls I. (2006) “Role of quantitative risk assessment and food safety objectives in managing *Listeria monocytogenes* on ready-to-eat meats”. Meat science, 74, 66-75.
44. Codex alimentarius commission “Proposed draft code of practice for fish and fishery products (other sections)”. Add. 1, 29/06/2008.

#### REGOLAMENTI E NORME

45. Reg. (CE) 178/2002 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 28 gennaio 2002.
46. Reg. (CE) 852/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004.
47. Reg. (CE) 2073/2005 della Commissione del 15 novembre 2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari.
48. Norma UNI ISO 11290-2:1998

#### SITI INTERNET

49. <http://www.albanesi.it/dietaitaliana/BLU/Articoli/116salmaffum.htm> (04/08/2009)

50. [http://www.gdoweeek.it/whitepaper\\_library/146\\_16.pdf](http://www.gdoweeek.it/whitepaper_library/146_16.pdf) (17/08/09)

51. <http://www.assoittica.it/Quadro-Nazionale/i-consumi.html> (20/08/09)

## RINGRAZIAMENTI

I miei ringraziamenti vanno in primo luogo allo Stimatissimo Prof. Valerio Giaccone che mi ha permesso di effettuare questa esperienza di tesi e per il tempo dedicatomi fino all'ultimo weekend per la stesura della tesi stessa. Un ringraziamento va al Sig. Riccardo Miotti Scapin per la cortesia e la disponibilità dimostratami e ad Alessandro che mi ha seguito nell'attività di laboratorio.

Ringrazio inoltre tutti gli amici dell'università Alessandra, Chiara, Claudia, Daniele, Elisa, Patrizio, Riccardo, Valentina, Vincenzo: sicuramente senza di loro sarebbe stata molto più dura. In particolar modo ringrazio Chiara e Daniele che, nell'ultimo anno, con il loro carisma mi hanno sostenuta nei momenti più difficili.

Passo ora a ringraziare le persone a me più care che mi hanno permesso di raggiungere questo traguardo. In primo luogo i miei genitori che sempre mi sono stati vicini in questo lungo cammino di studio, sostenendomi nei periodi più critici e dimostrandomi quanto fosse importante anche per loro quello che era il mio obiettivo. Un grazie di cuore a mia sorella Tatiana ed al marito Marco, i quali hanno sempre saputo cogliere i miei momenti di bisogno e mi hanno sempre spronato e incitato ad andare avanti.

Non posso non ringraziare tutta la famiglia di Roberto per aver sempre capito i miei momenti più difficili e per il calore dimostratomi in ogni occasione.

Infine un grazie speciale e di cuore va a Roberto per essermi sempre stato accanto in tutti questi anni anche nei momenti di tensione e per avermi aiutato nel raggiungere questa meta importante.