

*Corso ecm: Regolamento 2073: valutazione della documentazione relativa  
alla shelf-life degli alimenti presentata dalle ditte*

*Pisa, 9 aprile 2013*

# I risultati della ricerca come supporto per la valutazione di documentazione: challenge test su salami e formaggi



Dr Roberto Fischetti - Istituto Zooprofilattico  
Lazio e Toscana – Sezione di Pisa

Ricerca corrente Ministero della Salute LT 06/09 1

**Valutazione dei rischi relativi a prodotti alimentari tradizionali pronti, anche a filiera corta. Studio del contenimento dei rischi secondo le indicazioni recenti: Regolamenti CE**

La ricerca è chiusa ed è stata presentata la relazione finale al Ministero. Parte dei risultati saranno oggetto delle presentazioni odierne .

Ricerca corrente Ministero della Salute LT 11/10

**Valutazione del rischio microbiologico nella filiera agroalimentare tradizionale del pecorino a latte crudo**

Ricerca corrente Ministero della Salute LT 10/11 1

**Metodiche di recente introduzione per la valutazione della sicurezza degli alimenti. Microbiologia predittiva e challenge test**

- Dati bibliografia e nostri dati storici su salmonella e listeria formaggi e salami

- Perché sono sicuri?

- Esempio modalità di crescita *Salmonella* e *Listeria* in prodotti fermentati

- Importanza quindi dei dati della ricerca

Con la ricerca corrente del Ministero Salute (LT 06/09) abbiamo dimostrato anche sperimentalmente quello che sembra evidente dai **dati pregressi**: che la *Listeria monocytogenes* non è un problema di sicurezza alimentare nei salami ( e probabilmente anche nelle salsicce) e nei formaggi tradizionali dell'Italia centrale, dato che in bibliografia non sembra che esistano segnalazioni di malattia alimentare da *Listeria monocytogenes* in tali prodotti.

**I risultati delle nostre ricerche possono essere ora considerati dati pregressi**

Gli studi di cui all'articolo 3, paragrafo 2, comprendono:

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

E' fondamentale raccogliere i dati storici delle analisi per disporre di valori reali di partenza

Per uno studio completo, dei positivi in particolare, è inevitabile un'ulteriore raccolta dati su supporto elettronico in modo da poter effettuare vari tipi di statistiche: **prevalenza, quantità patogeni, aw, pH** ecc.

I **DATI** possono essere fondamentali per la valutazione della shelf-life.



# Salmonella formaggi

## Dati tossinfezioni bibliografia 1

Database(s): CAB Abstracts 1973 to 2012 Week 40, Food Science and Technology Abstracts 1969 to 2012 October Week 3, Ovid MEDLINE(R) 1946 to October Week 1 2012, Ovid MEDLINE(R) In-Process & Other Non-Indexed Citations October 16, 2012

10. Epidemic salmonellosis from **Cheddar cheese**: surveillance and prevention.
18. Investigation of multidrug-resistant Salmonella serotype typhimurium DT104 infections linked to **raw-milk cheese in Washington State**.
23. Two outbreaks of Salmonella enteritidis phage type 8 linked to the consumption of **Cantal cheese** made with raw milk, France, 2001.
27. Outbreak of Salmonella enterica serotype Montevideo infections in **France** linked to consumption of cheese made from raw milk.
28. A prolonged outbreak of Salmonella Typhimurium infection related to an uncommon vehicle: hard cheese made from raw milk. ... In 2006, in **The Netherlands**, an outbreak of Salmonella Typhimurium phage type 561 .....
29. Outbreak of Salmonella enterica serotype Muenster infections associated with goat's cheese, **France**, March 2008.
30. Outbreak of multidrug-resistant Salmonella enterica serotype Newport infections associated with consumption of unpasteurized Mexican-style aged cheese--**Illinois**, March 2006-April 2007.
33. Large outbreak of Salmonella enterica serotype paratyphi B infection caused by a goats' milk cheese, **France**, 1993: a case finding and epidemiological study.
34. A multistate outbreak of Salmonella javiana and Salmonella oranienburg infections due to consumption of contaminated cheese. ... One hundred thirty-six culture-confirmed cases of S javiana infection and 11 cases of S oranienburg infection were associated with the outbreak in **Minnesota**. Outbreak-associated cases were also identified in **Wisconsin** (15 cases), and in **Michigan and New York** (one case each). Cases were more likely than controls to have consumed mozzarella cheese manufactured at a single cheese plant (plant X) or cheese that had been shredded at processing plants that also shredded cheese manufactured at plant X ....
47. A community outbreak of Salmonella berta associated with a soft cheese product. ... Laboratory Centre for Disease Control, Health **Canada**, Ottawa, Ontario. ....
48. An outbreak of Salmonella dublin infection in **England** and Wales associated with a soft unpasteurized cows' milk cheese.
60. Laboratory studies on salmonella-contaminated cheese involved in a major outbreak of gastroenteritis. ... A major outbreak of gastroenteritis in **Canada** in 1984 was traced to Cheddar cheese contaminated with Salmonella typhimurium ....

## Listeria salami

Nessun episodio

## Salmonella salami

1 - *Epidemiol. Infect.* (1998), **120**, 209±214. Printed in the United Kingdom # 1998 Cambridge University Press **A community-based outbreak of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium associated with salami consumption in Northern Italy**

An outbreak of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium .... 1995 and involved 83 individuals in a large area of Northern Italy .....Insufficient ripening of the salami had allowed the salmonella to survive...

2. An easter outbreak of *Salmonella* Typhimurium DT 104A associated with traditional pork salami in **Italy**. .. **No food samples were available for testing** .....

3. *Salmonella* Montevideo infections associated with salami products made with contaminated imported black and red pepper  
**-United States**, July 2009-April 2010. ..

6. An outbreak of *Salmonella* Typhimurium traced back to salami, **Denmark**, April to June 2010.

10. A national outbreak of *Salmonella* typhimurium DT 124 caused by contaminated salami sticks. . (**UK**)

11. Outbreak of *Salmonella* Kedougou in **Norway** associated with salami, April-June 2006.

I dati della bibliografia sulla sicurezza dei nostri prodotti fermentati documentano quindi un livello molto buono . . .





# Formaggi in genere a latte crudo

	<i>Salmonella</i> *			
	Campioni		Unità campionarie	
	totali	positivi	totali	positive
1999 - 2008	-	0	472	0
2009 - 2012	127	3	596	11

\* *Salmonella diarizonae*

# Formaggi in genere a latte crudo

	<i>Listeria monocytogenes</i>			
	Campioni		Unità campionarie	
	totali	positivi	totali	positive
1999 - 2008	-	0	514	0
2009 - 2012	183	1	816	2

# Salami

	<i>Salmonella</i>			
	Campioni		Unità campionarie	
	totali	positivi	totali	positive
2009 - 2012	85	1	382	1

# Salami

	<i>Listeria monocytogenes</i>			
	Campioni		Unità campionarie	
	totali	positivi	totali	positive
2009 - 2012	107	9	503	33

## Esempio di ricerca effettuata

**WP1 = Consultazione della bibliografia e acquisizione dei dati storici :**

**Non esistono segnalazioni di tossinfezione da *Listeria monocytogenes* in salami**

**Dati Sezione IZSLT di Pisa su:**

***Listeria monocytogenes***

***Salmonella spp.***

**WP2 = Contatti con produttori, studi analitici di prodotto, raccolta ceppi batterici per sperimentazione, studi di microbiologia predittiva, challenge tests :**

**E' stata creata una collaborazione con 4 ditte produttrici toscane:**

**DITTA (A) ditta piccola, che produce salumi tradizionali;**

**DITTA (B) ditta media, che produce salumi tradizionali;**

**DITTA (C) media, che produce formaggi tradizionali anche a latte crudo;**

**DITTA (D) media, che produce mozzarelle fresche.**

## Prova 1

Sono stati selezionati, per le successive prove di challenge, **7 ceppi di *Listeria monocytogenes* e 7 di *Listeria innocua*** (nell'ottica della possibilità di usare germi surrogati invece del patogeno) della nostra collezione (di cui 1 ATCC per specie).

E' stato approntato un pool per *Listeria monocytogenes* ed uno per *Listeria innocua* .

Di ognuno dei 2 pool è stata studiata la dinamica della crescita in brodo **a 8°C** .

Queste indicazioni provengono prevalentemente da linee guida statunitensi:  
*Parameters for Determining Inoculated Pack/Challenge Study Protocols*  
(ADOPTED 20 MARCH 2009, WASHINGTON, D.C.)

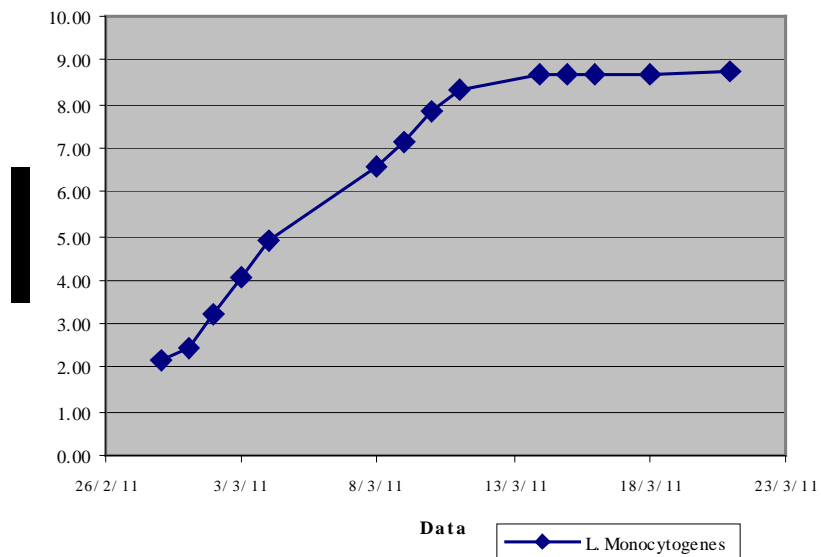
NATIONAL ADVISORY COMMITTEE ON MICROBIOLOGICAL CRITERIA  
FOR FOODS

NACMCF Executive Secretariat, \* U. S. Department of Agriculture, Food  
Safety and Inspection Service.

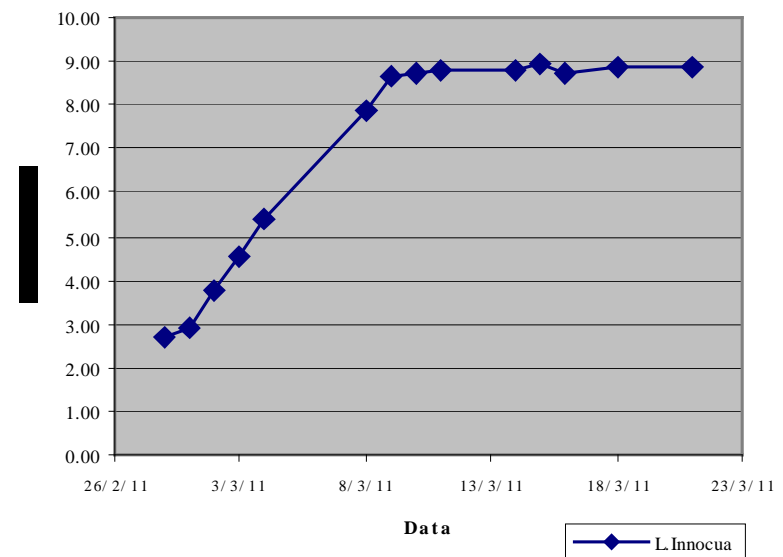
## WP3 = Valutazione risultati :

Prova 1 . Grafici e mumax prove *Listeria monocytogenes* e *innocua* in provetta a 8°

Curva di crescita *Listeria Monocytogenes* a +8°C

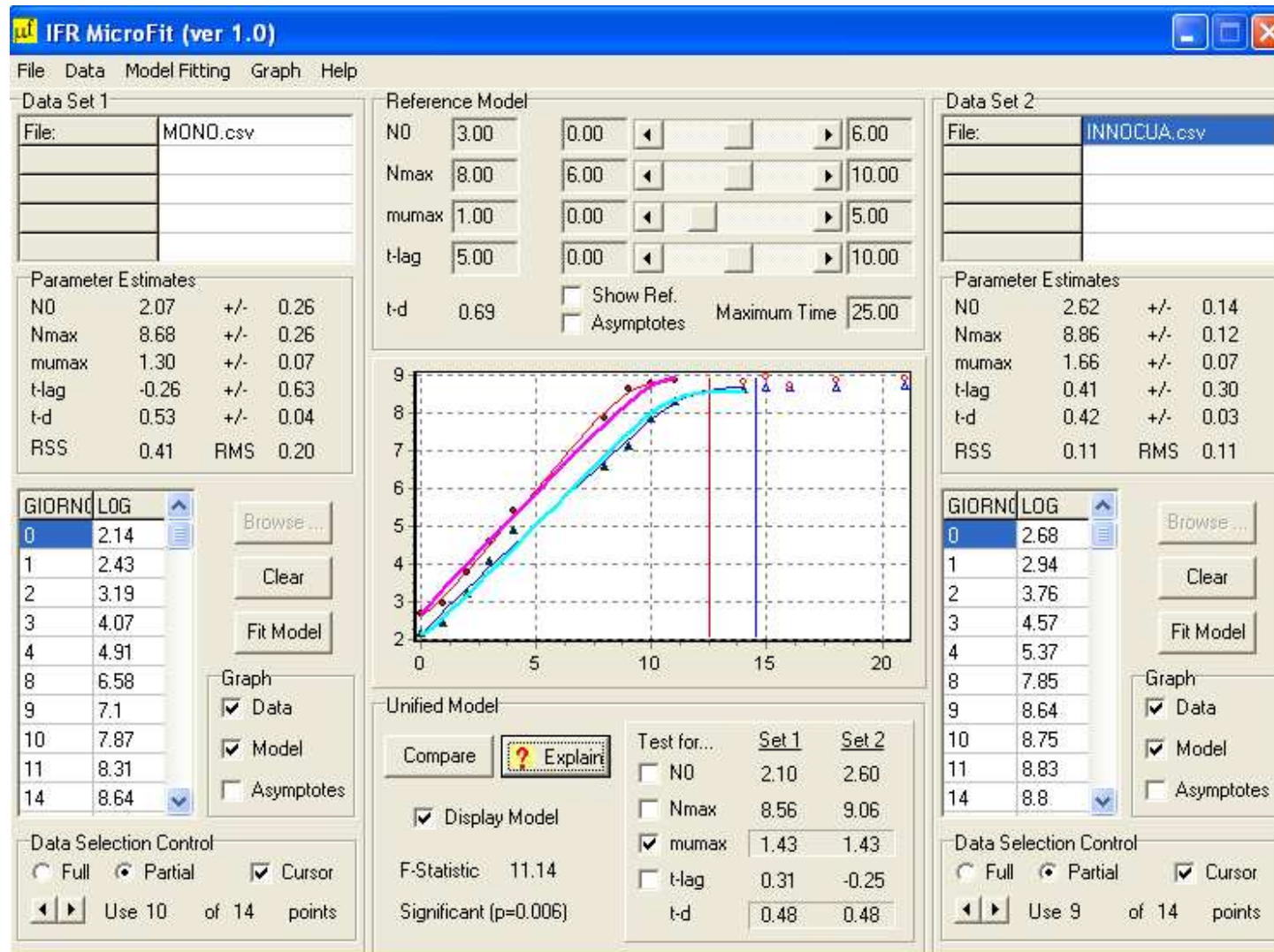


Curva di crescita *Listeria Innocua* a +8°C





## Prova crescita *Listeria monocytogenes* e *innocua* in provetta 8° C. Determinazione $\mu_{\max}$ tramite programma Microfit



La **differenza** fra i tassi massimi di crescita è **significativa**, per cui la *Listeria innocua* cresce più velocemente della *Listeria monocytogenes*.

La **DITTA (A)** ditta piccola, che produce **salumi tradizionali**, ha fornito materiale e conoscenze per le seguenti prove:

- Salami la cui stufatura è stata effettuata in laboratorio con frigo-termostato per lo studio della **flora lattica** (naturalmente presente): conteggio e identificazione all'inizio, a metà produzione e nel prodotto appena pronto per il consumo. Valutazione inoltre della produzione di batteriocine.

- Impasto degli stessi salami sul quale è stata sperimentata una **nuova prova (challenge test) in vitro** , in buste presto-chiuso nelle quali l'impasto è stato diluito con appropriata soluzione aggiustata per avere nel complesso parametri (AW e pH) simili a quelle del salame in budello in condizioni naturali: le buste sono state contaminate con sospensioni note di *Listeria monocytogenes* .

E' stato valutato l'andamento di *Listeria monocytogenes* e della flora lattica.

- E' stato effettuato un challenge test con **Salmonella**

**DITTA (B)** media, che produce **salumi tradizionali**:

ha il problema di due prodotti tradizionali con valori di pH e AW che fanno ricadere i prodotti nella categoria dei favorevoli alla crescita di *Listeria monocytogenes* , secondo il Regolamento (CE) 2073/2005; tali valori sono tuttavia vicini ai limiti. Molte ditte locali si trovano in questa situazione; risolvendola ne trarrebbero tutti vantaggio.

E' stato effettuato lo studio di vari parametri (tra cui l'andamento della **flora lattica ed il contenuto di batteriocine**) su prodotti forniti dalla ditta, ed effettuato un challenge test.

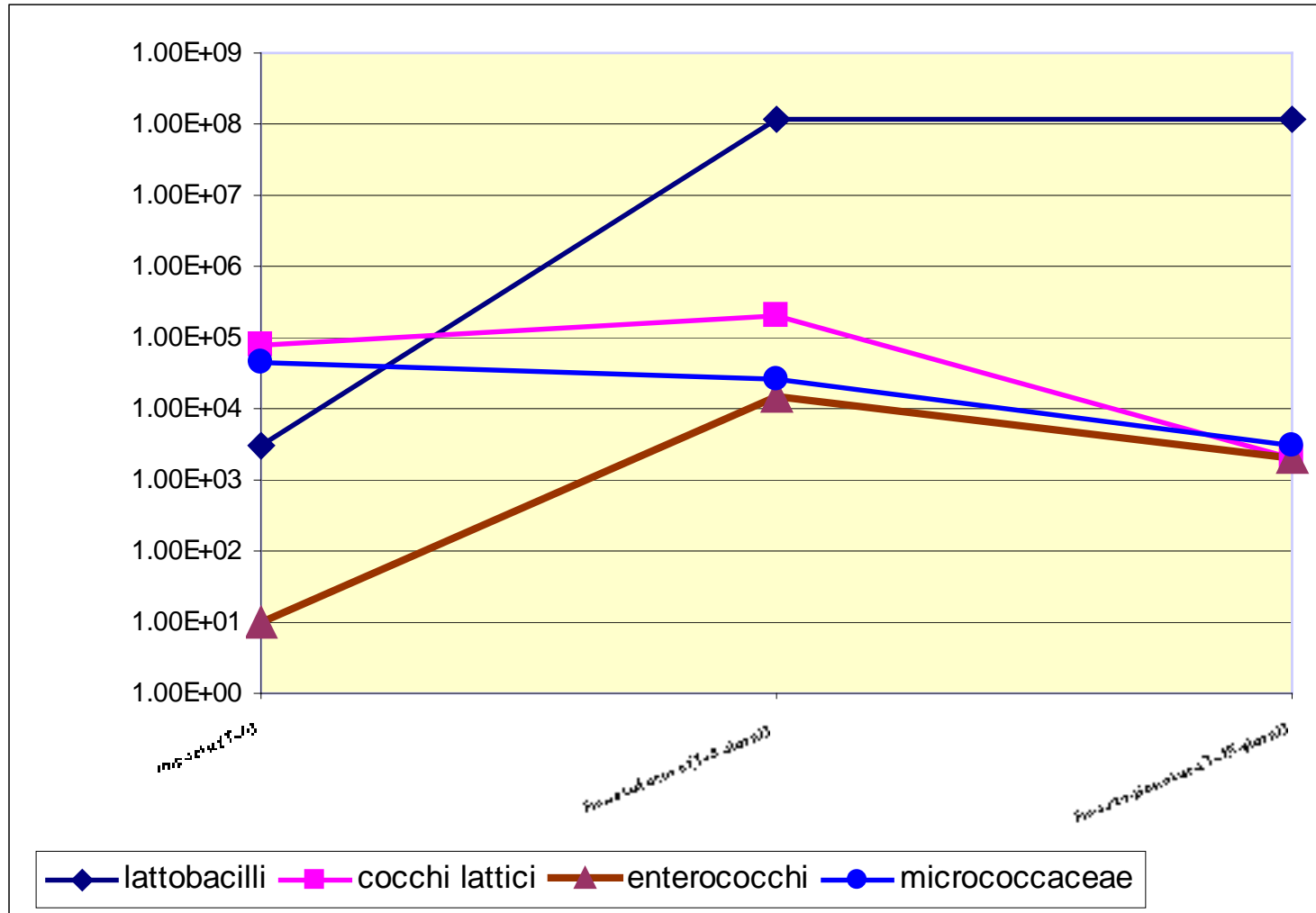
**DITTA (C)** media, che produce **formaggi tradizionali anche a latte crudo**. La collaborazione è anch'essa iniziata con la preparazione di un piano col titolare e con la misura di alcuni parametri. Formaggio pecorino a latte crudo è stato sottoposto a challenge test per *Listeria monocytogenes*

.

## DITTA (A)

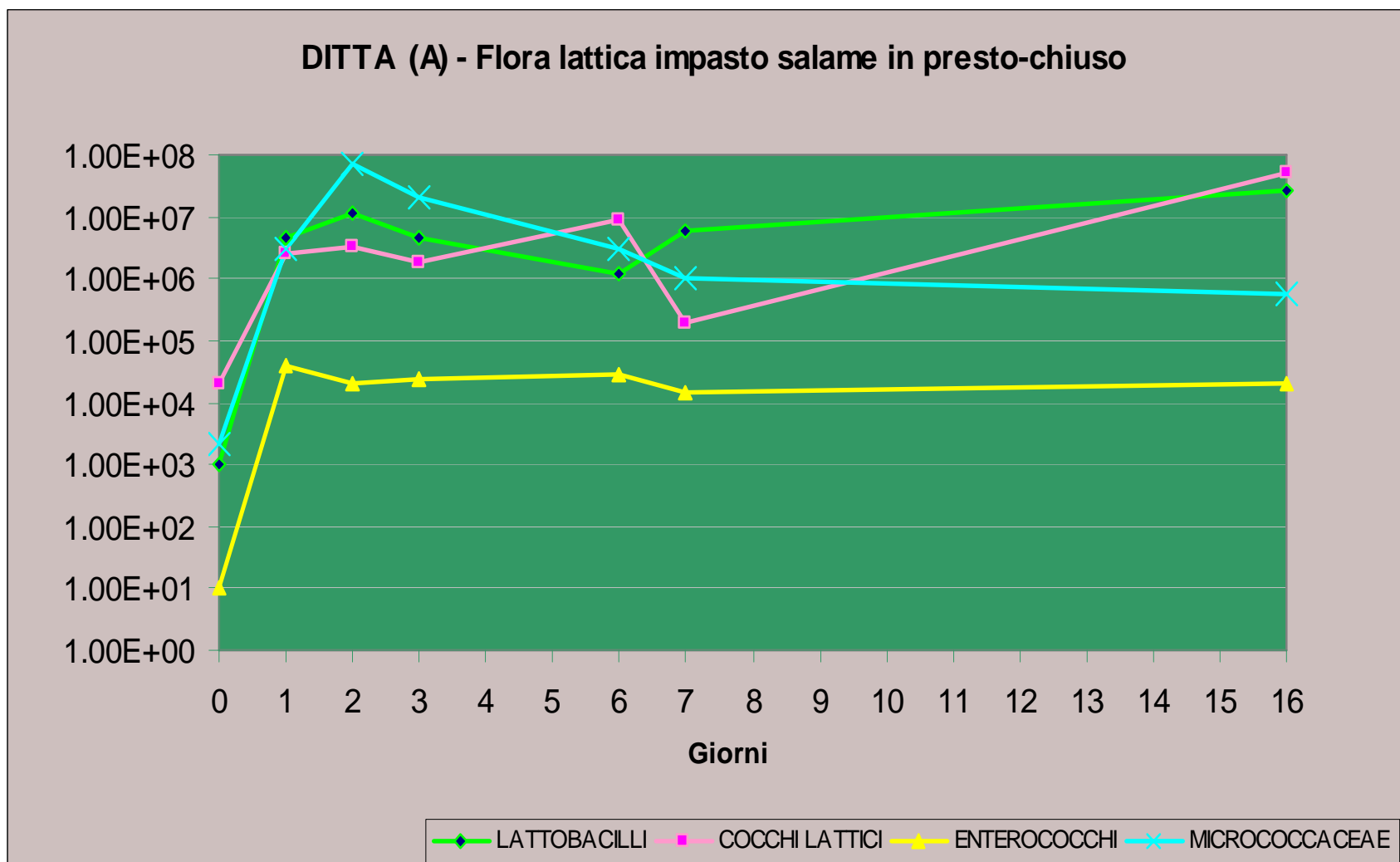
### 1° prova - Andamento flora lattica nei salami

Ditta (A) salame stufato e stagionato IZS Pisa 2011

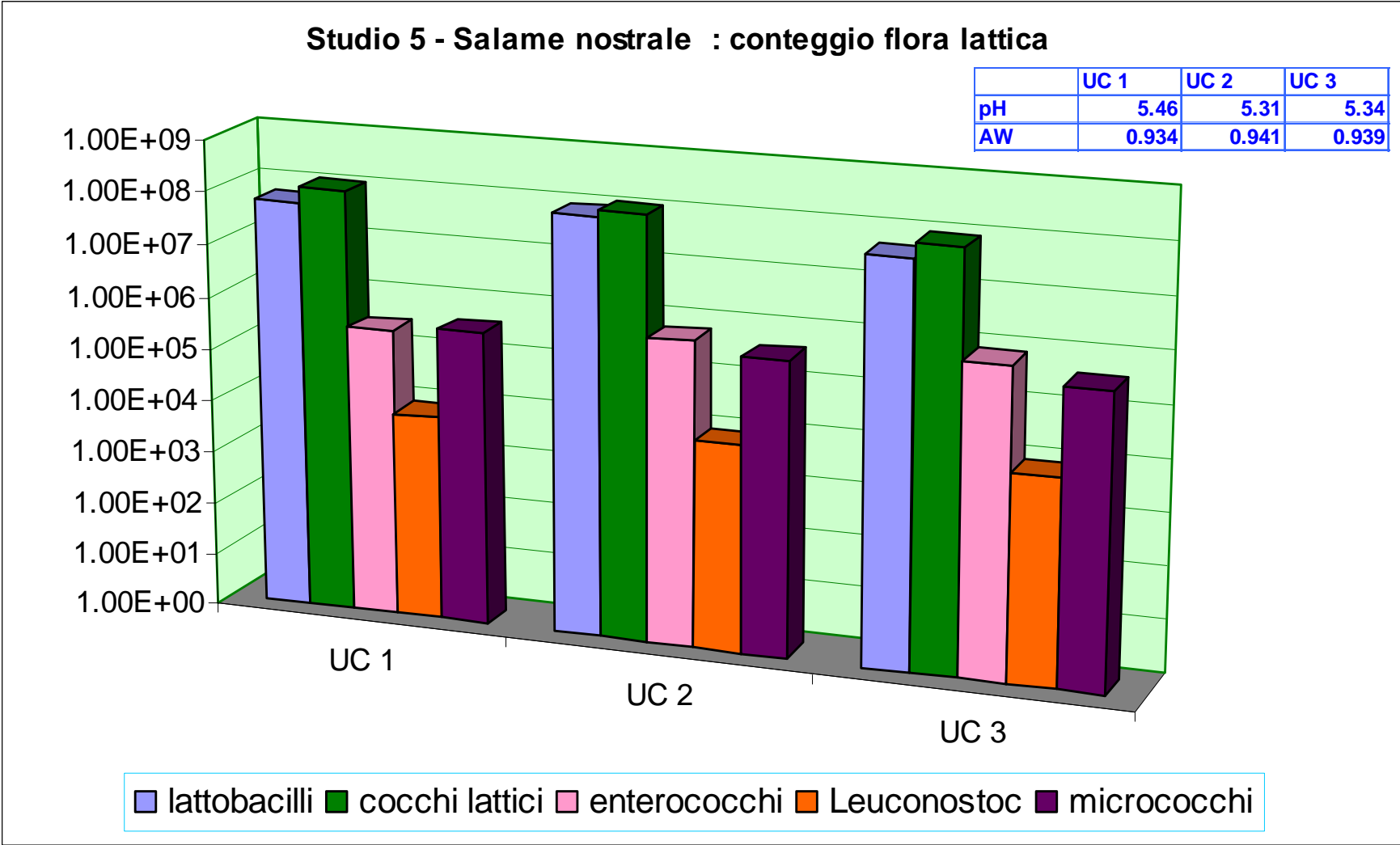


## DITTA (A)

Test in vitro: batteri lattici: evoluzione singoli gruppi



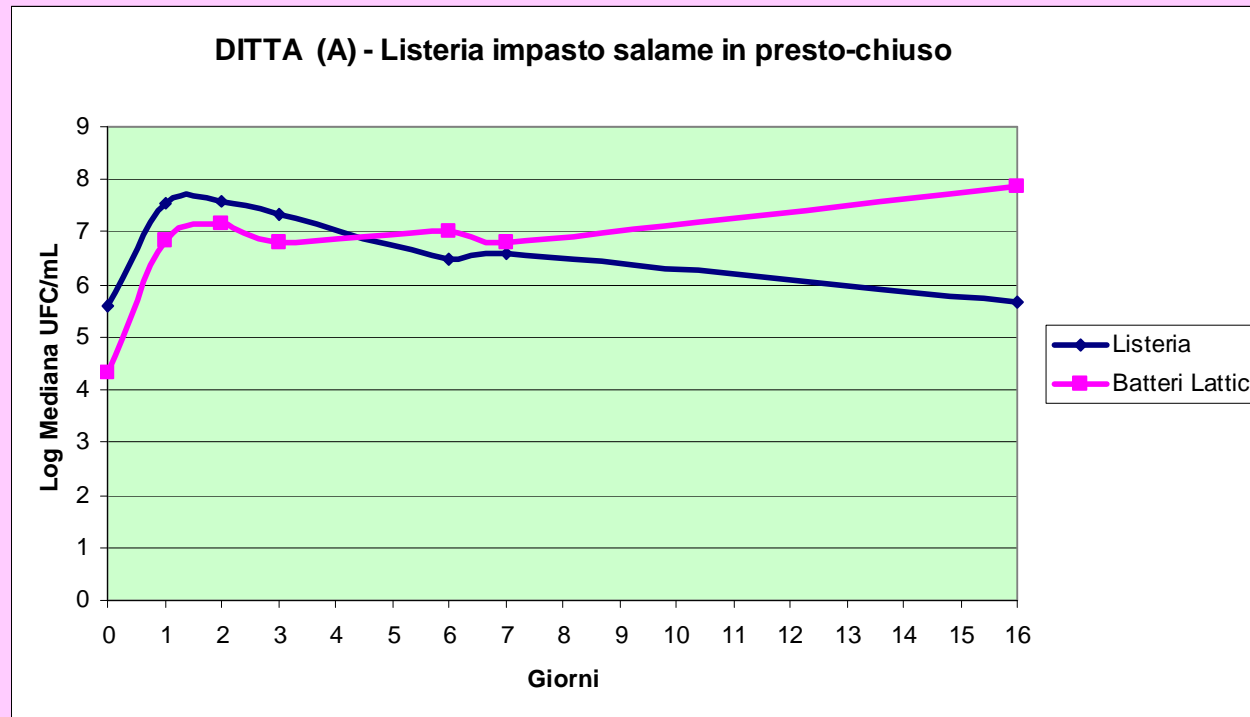
DITTA (B) ditta media, che produce salumi tradizionali:



Perchè molti  
alimenti fermentati  
sono sicuri?

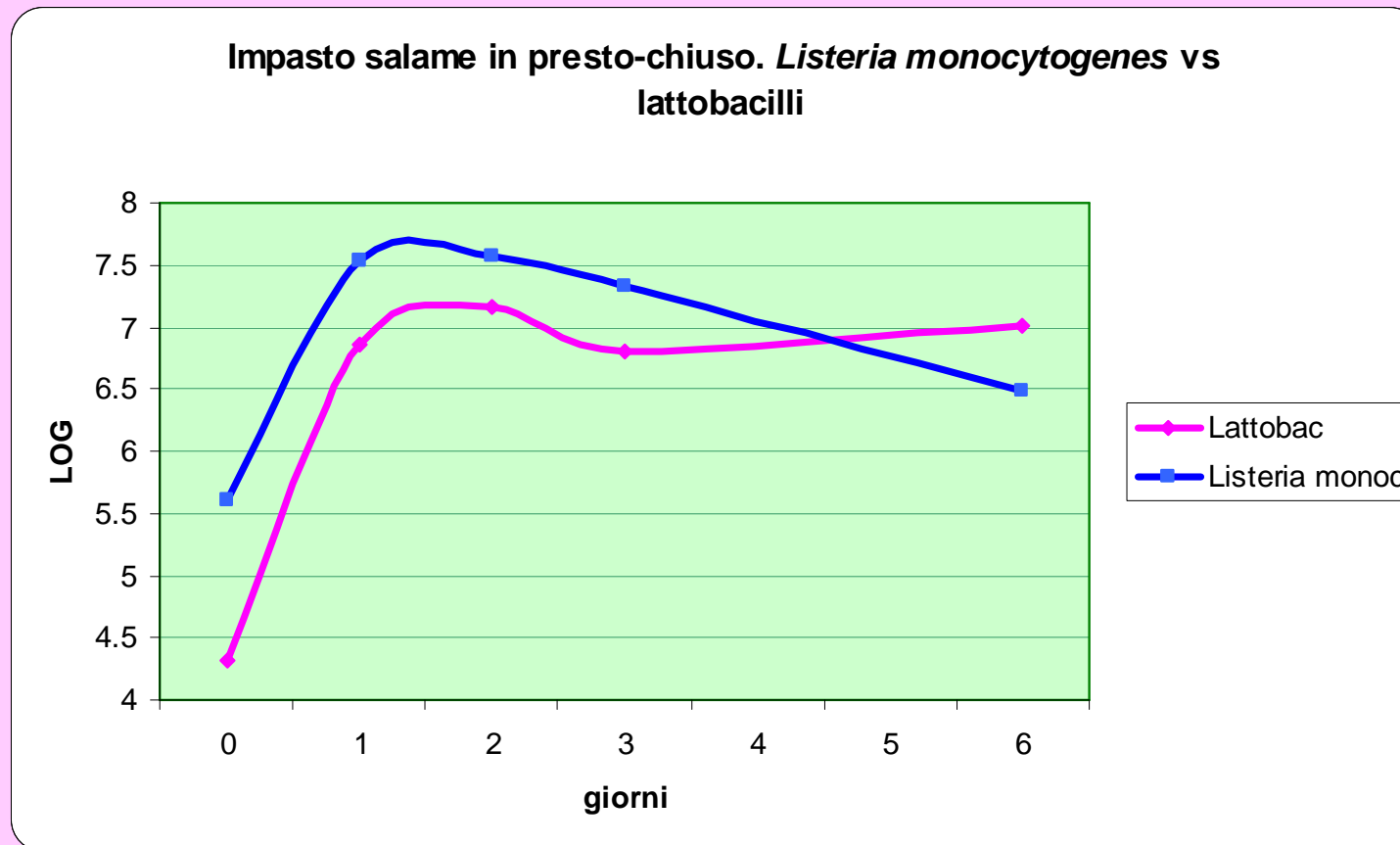
Dall'insieme degli studi emerge che **la**  
**ragione principale è l'attività**  
**della flora lattica**

Challenge test in vitro (prova). Impasto di salame toscano diluito 1:5 e contaminato con *Listeria monocytogenes*. Evoluzione di *Listeria monocytogenes* e batteri lattici (naturalmente presenti)



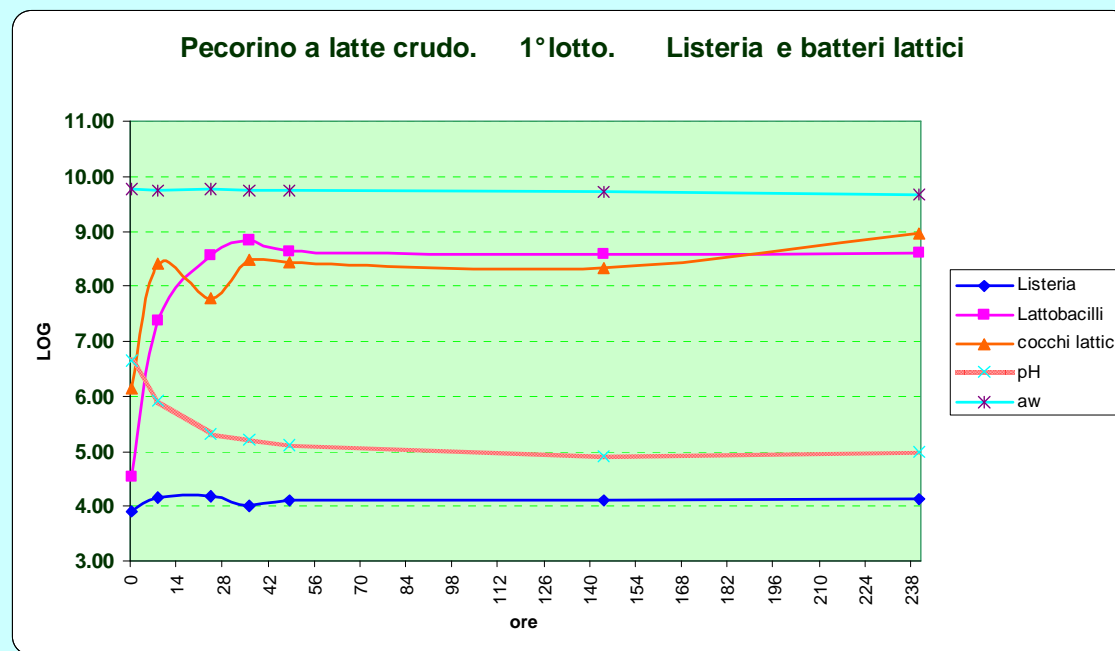


Challenge test in vitro (prova). Impasto di salame toscano diluito 1:5 e contaminato con *Listeria monocytogenes*. Evoluzione di *Listeria monocytogenes* e batteri lattici (naturalmente presenti). **DETTAGLIO**



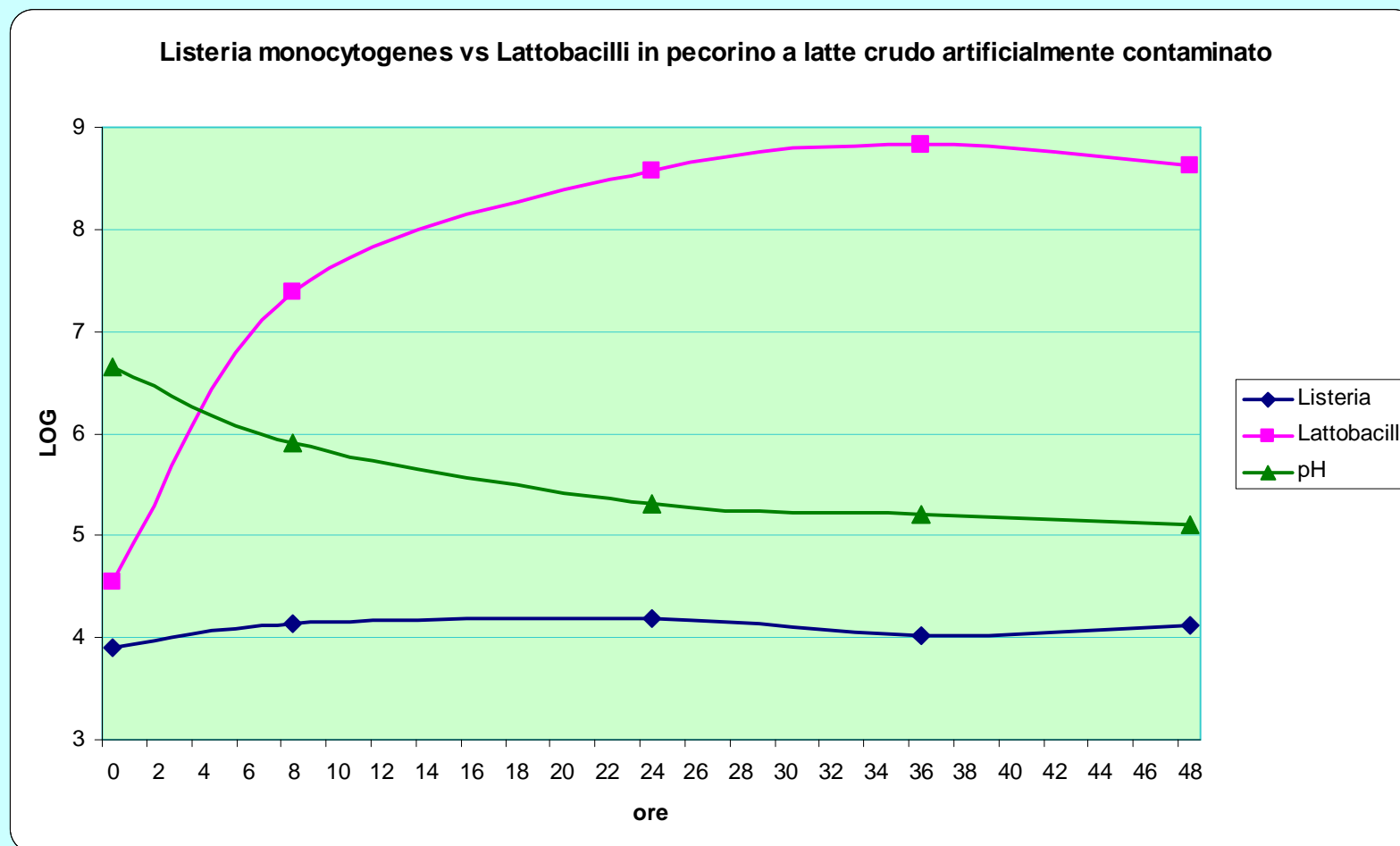
Challenge test. Evoluzione di *Listeria monocytogenes* e batteri lattici (naturalmente presenti) in formaggio pecorino a latte crudo artificialmente contaminato con *Listeria monocytogenes* . 3 diversi lotti

Lotto  
1



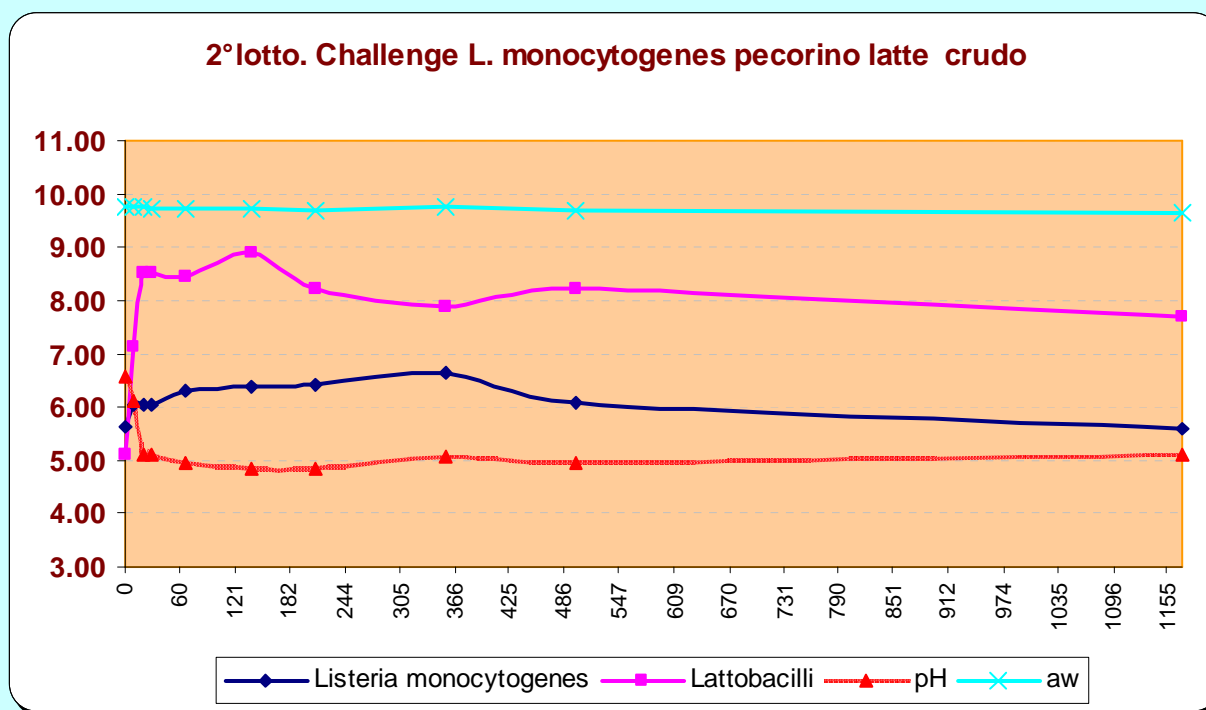
Challenge test. Evoluzione di *Listeria monocytogenes* e batteri lattici (naturalmente presenti) in formaggio pecorino a latte crudo artificialmente contaminato con *Listeria monocytogenes* . 3 diversi lotti. **DETTAGLIO**

Lotto  
1



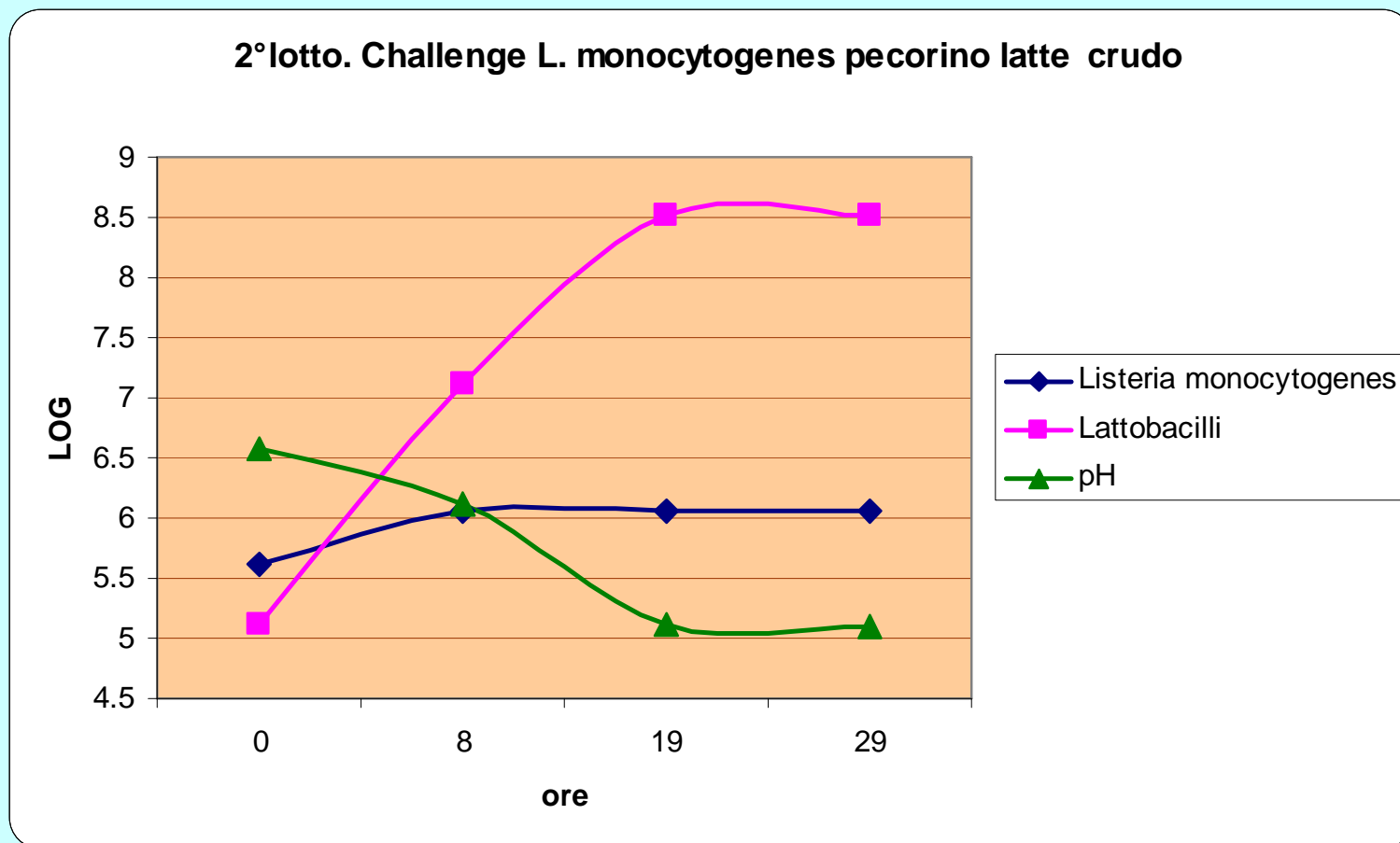
Challenge test. Evoluzione di *Listeria monocytogenes* e batteri lattici (naturalmente presenti) in formaggio pecorino a latte crudo artificialmente contaminato con *Listeria monocytogenes* . 3 diversi lotti

Lotto  
2



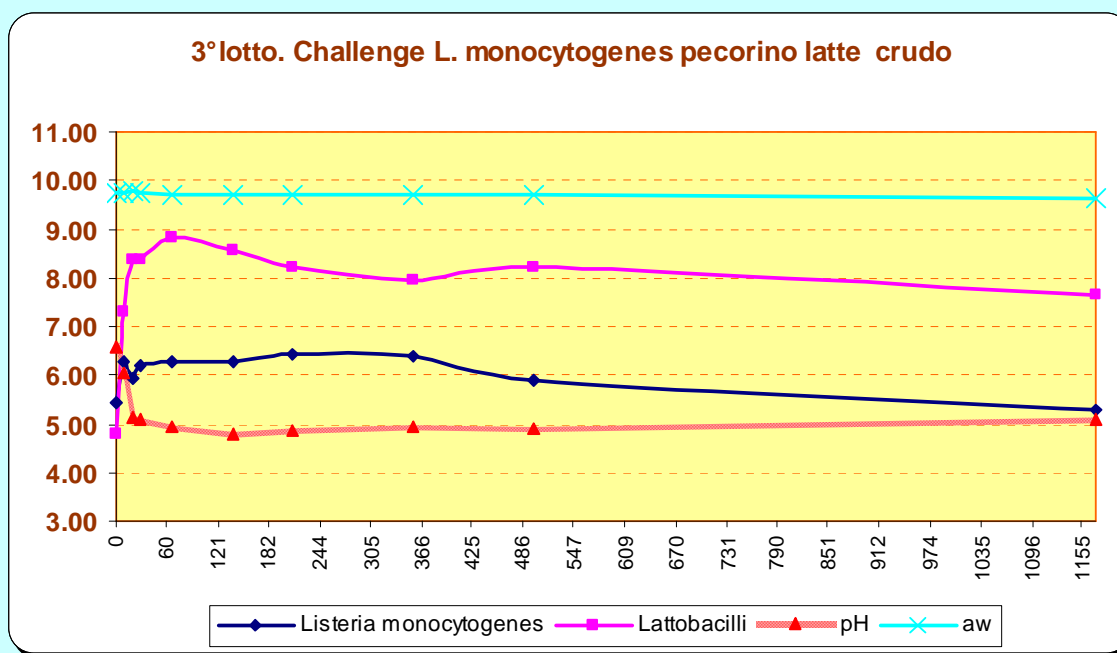
Challenge test. Evoluzione di *Listeria monocytogenes* e batteri lattici (naturalmente presenti) in formaggio pecorino a latte crudo artificialmente contaminato con *Listeria monocytogenes* . 3 diversi lotti. DETTAGLIO

Lotto  
2



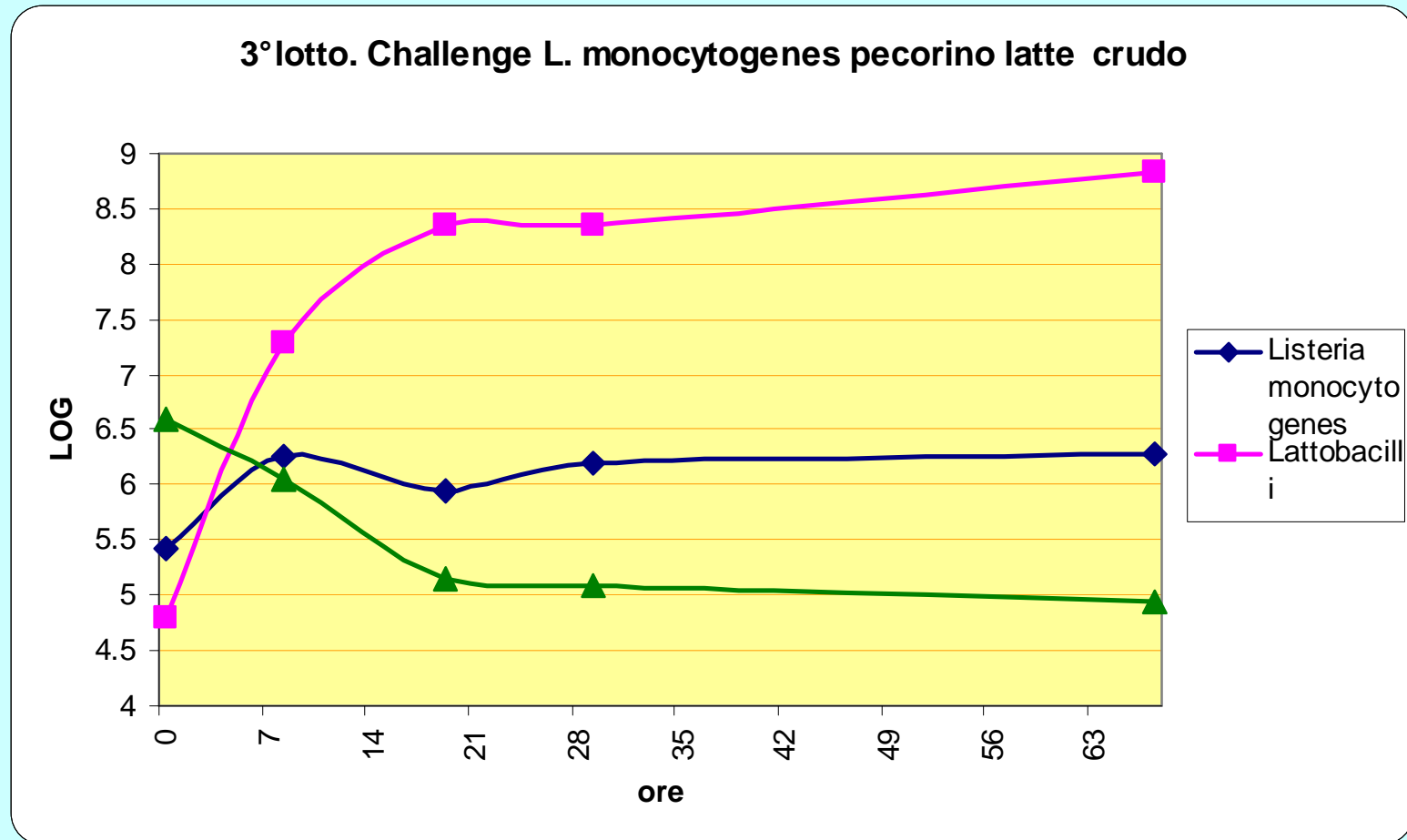
Challenge test. Evoluzione di *Listeria monocytogenes* e batteri lattici (naturalmente presenti) in formaggio pecorino a latte crudo artificialmente contaminato con *Listeria monocytogenes* . 3 diversi lotti

Lotto  
3

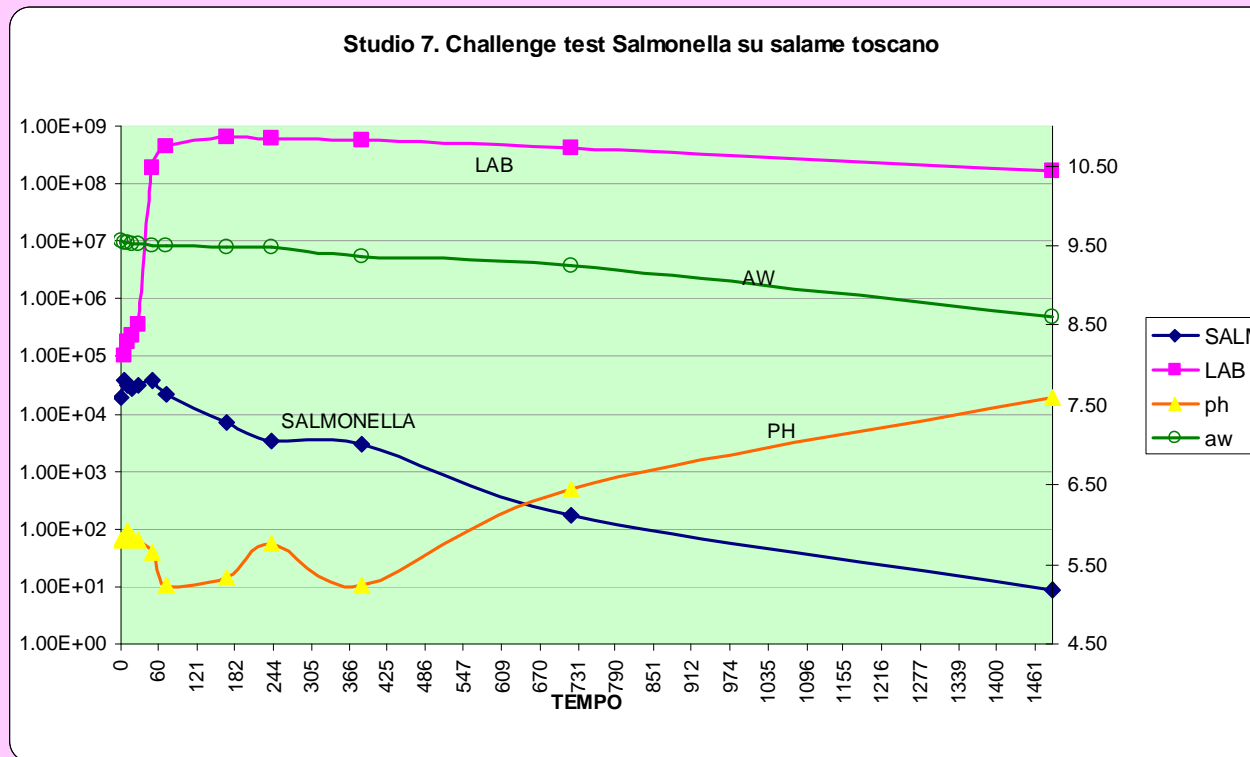


Challenge test. Evoluzione di *Listeria monocytogenes* e batteri lattici (naturalmente presenti) in formaggio pecorino a latte crudo artificialmente contaminato con *Listeria monocytogenes* . 3 diversi lotti. DETTAGLIO

Lotto  
3

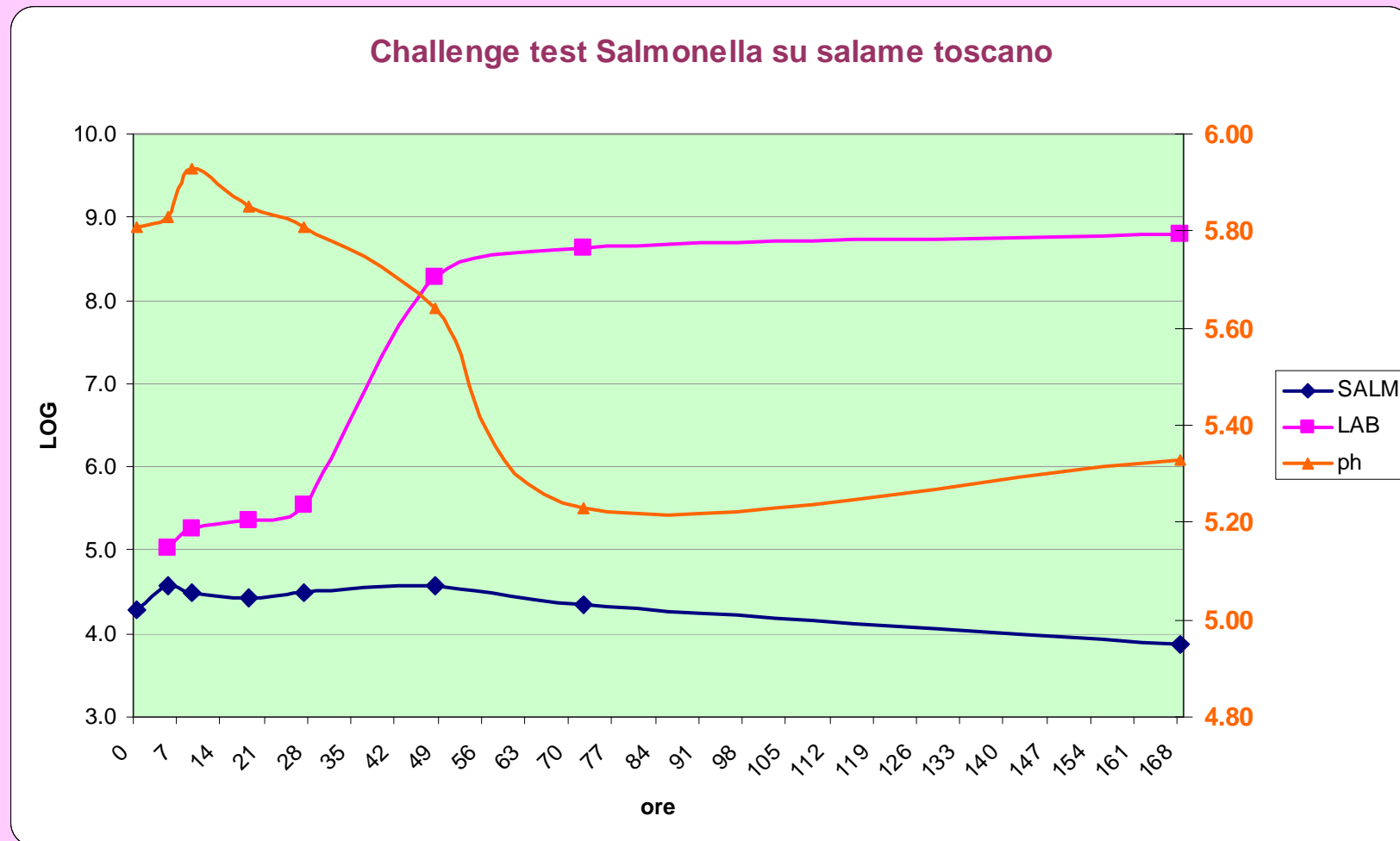


Challenge test. Evoluzione di *Salmonella* e batteri lattici (naturalmente presenti) in salame toscano artificialmente contaminato con *Salmonella*.





Challenge test. Evoluzione di *Salmonella* e batteri lattici (naturalmente presenti) in salame toscano artificialmente contaminato con *Salmonella* .                      DETTAGLIO



## Conclusioni

- Come evidenziato, in modo molto evidente per **Salmonella**, la modalità di inattivazione è **progressiva**
- Un campionamento che risulta regolamentare in qualsiasi fase della shelf-life di salami e formaggi tradizionali fornisce ottime garanzie di sicurezza fino alla scadenza del prodotto

## Esempio: **I dati sulla sicurezza dei prodotti fermentati**

I dati acquisiti sui prodotti fermentati dimostrano che i germi patogeni possono proliferare nelle prime fasi produttive, arrestando la moltiplicazione quando i batteri lattici raggiungono il massimo sviluppo.

*Se vogliamo ad esempio che LM non superi mai la quantità di 10 ufc/g e sappiamo che il massimo incremento è di 3 LOG, con quale metodologia riusciamo a calcolare quante ufc/g di LM si possono tollerare nell'impasto iniziale del salame o nella cagliata?*

Si usano programmi di microbiologia predittiva ?

Si deve effettuare un ulteriore test sperimentale ?

Si può utilizzare un altro metodo con i soli numeri ricavati dai dati ?

## **Studio 7 . Fine shelf-life**

**A SX**

**Salame  
prodotto in  
laboratorio e  
contaminato**

**A DX**

**Salame di  
controllo  
prodotto  
dalla ditta**

