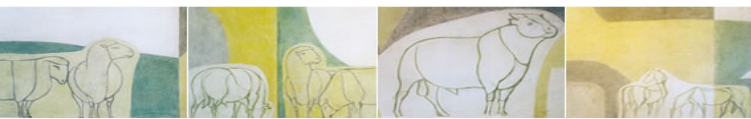


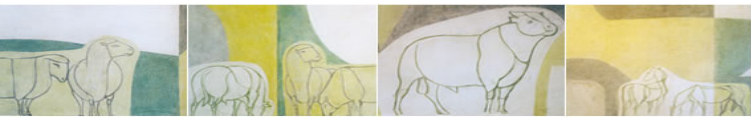
CHALLENGE TEST
PER *Escherichia coli* O157
NELLA SPIANATA DI CERVO E SALSICCIA
STAGIONATA DI CERVO

T. Bogdanova IZS LT

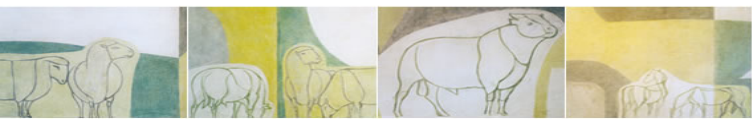


I regolamenti comunitari che costituiscono il "pacchetto igiene" attribuiscono agli OSA un ruolo fondamentale nel garantire la salubrità e le qualità igienico-sanitarie degli alimenti

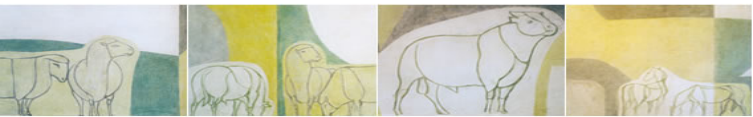
L'OSA deve, applicando degli idonei sistemi di verifica, avere sotto controllo l'intero processo produttivo



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"

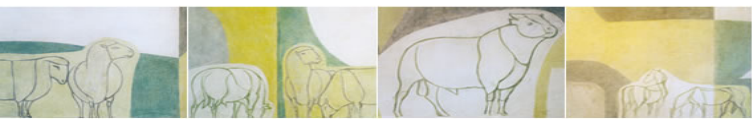


Il Regolamento (CE) 2073/2005 invita gli OSA se necessario ad effettuare gli studi *per verificare se i criteri sono rispettati per l'intera durata del periodo di conservabilità*, in particolare ciò si applica agli alimenti pronti che costituiscono terreno favorevole alla crescita di *Listeria monocytogenes*



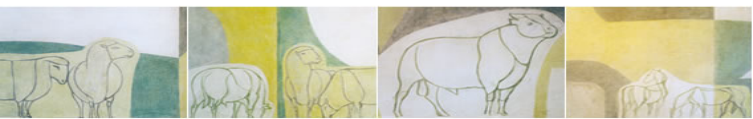
Il Regolamento fissa i criteri di sicurezza alimentare per altri patogeni quali *Salmonella*, *Bacillus cereus*, *Cronobacter sakazakii* e Stafilococchi coagulasi positivi

Per Campylobacter, Yersinia enterocolitica, E. coli verocitotossici (VTEC) non esistono limiti di legge vigenti

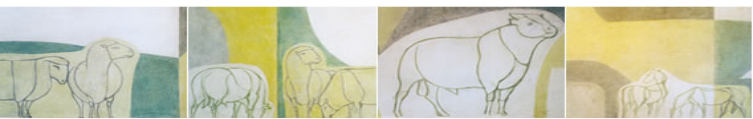


Escherichia coli VTEC, portatori dei geni di virulenza *vtx1*, *vtx2* e *eae*, sono causa di infezioni intestinali sia nell'uomo che negli animali e possono provocare gravi patologie

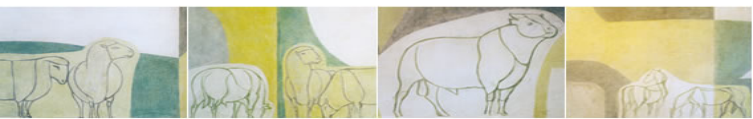
Serbatoio di questa zoonosi è rappresentato dal bovino, ma svolgono un ruolo nella trasmissione anche l'ovino, il caprino e vari erbivori selvatici



La maggior parte dei casi descritti a livello mondiale è attribuibile al sierotipo O157:H7 anche se negli ultimi anni si è registrato un incremento di infezioni sostenute da ceppi appartenenti a diversi sierogruppi, tra i più frequenti: O26, O111, O103, O145 e O104

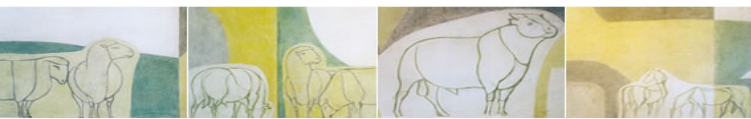


Nell'estate del 2011, è stata attivata un'allerta sanitaria a seguito di una positività per *E. coli* O104 con caratteristiche di patogenicità sia di VTEC che di EAEC (*E. coli* enteroaggregativi), a partire da un salame di cervo prelevato nel corso dell'attività di vigilanza, in un mercato locale austriaco e prodotto presso uno stabilimento toscano



E' stato condotto un challenge test, con l'obiettivo di ottenere i dati relativi al comportamento di *Escherichia coli* del gruppo VTEC, lungo la catena produttiva di 2 salumi prodotti presso la Ditta toscana, precedentemente coinvolta nel sunnominato episodio tossinfettivo

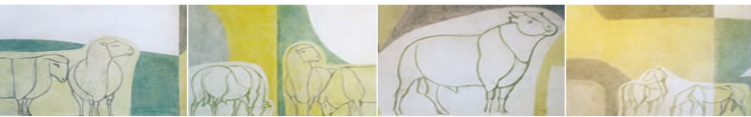
A tal fine è stato scelto come target *E.coli* O157





Ai fini della sperimentazione sono stati selezionati la Salsiccia di cervo e la Spianata di cervo

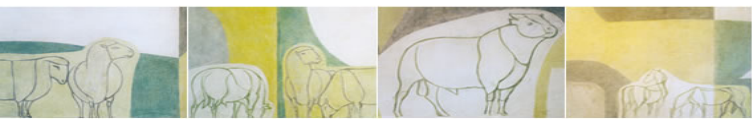
Sono stati raccolti presso il salumificio i processi produttivi di entrambi i salumi



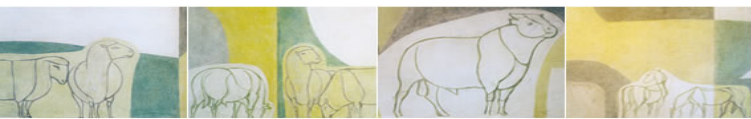
Salsiccia di cervo è un salume stagionato a grana fine, preparato con carne di cervo e carne di suino

Forma cilindrica con diametro di circa 4 cm e lunghezza di 6,5-7 cm

Budello - naturale di suino in salamoia



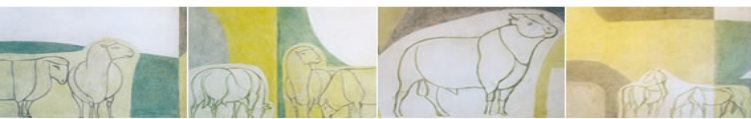
La fase di asciugatura successiva alle fasi di lavorazione è di 5-10 giorni
Dopo 5 giorni dalla produzione la salsiccia può essere ceduta al consumatore



Spianata di cervo è un salume stagionato a grana fine, preparato con carne di cervo e carne di suino

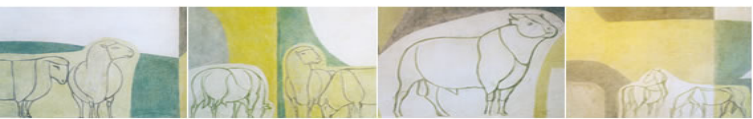
Forma parallelepipedale schiacciata da cui deriva il nome, con larghezza di circa 11 cm e lunghezza di 50 cm

Budello - collagene di bovino forato



Le forme pronte, sono trasferite in cella e posizionate all'interno di una pressa fornita di griglie in acciaio, per alcuni giorni, e poi appesi al carrello fino alla fine di stagionatura

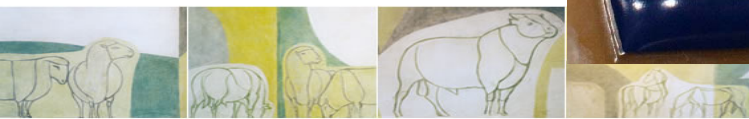
Le fasi di prestagionatura e di stagionatura durano 25 giorni nel caso di vendita del prodotto non confezionato, e di 30 gg per vendita a trancio sotto vuoto



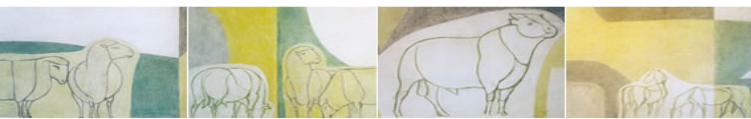
La temperatura in cella all'inizio è di 24°C e viene progressivamente diminuita di 1°C per giorno fino ad arrivare a 19 °C alla fine di prestagionatura/asciugatura

La stagionatura della Spianata avviene a 14-15°C

U.R. passa da quella naturalmente presente in cella a circa 60% nelle 24 h, e poi si stabilizza al 65% al 4° o 5° giorno

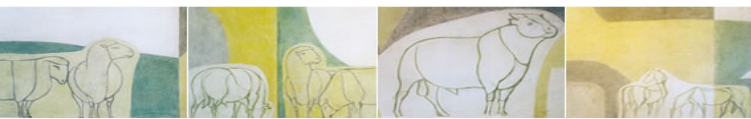


Sono utilizzati due tipi di carne per la
produzione della salsiccia e della spianata :
50% carne di suino e 50% carne di cervo
La carne suina è di provenienza nazionale
La carne di cervo è di provenienza estera
La carne di cervo utilizzata per la produzione
dei lotti sperimentali è stata d'origine spagnola



Il challenge test di valutazione del potenziale di crescita (δ) è uno studio di laboratorio che valuta sviluppo di microrganismi in alimenti artificialmente contaminati e mantenuti in prevedibili condizioni che si verificano realmente lungo tutta la catena di produzione

$$\delta = \log 10 \text{ ufc/g alla fine del test} - \log 10 \text{ ufc/g all'inizio del test}$$



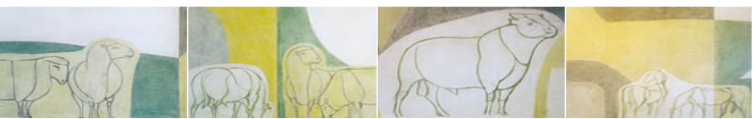
Produzione sperimentale

Tutte le fasi di lavorazione sono state eseguite secondo il processo originale, presso stabilimento della Ditta

200 kg di impasto diviso in 2 parti

All'impasto destinato alla produzione dei lotti contaminati, è stato aggiunto direttamente nell'impastatrice 1 L di sospensione batterica.

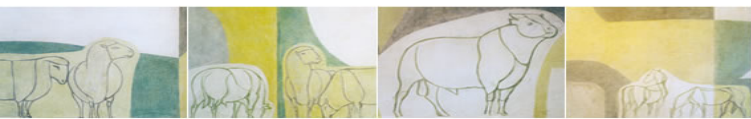
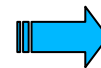
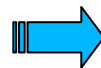
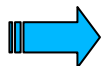
All'impasto destinato alla produzione dei lotti non contaminati, è stata aggiunta la stessa quantità di soluzione fisiologica



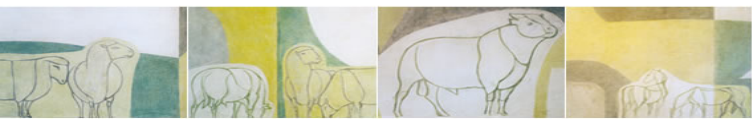
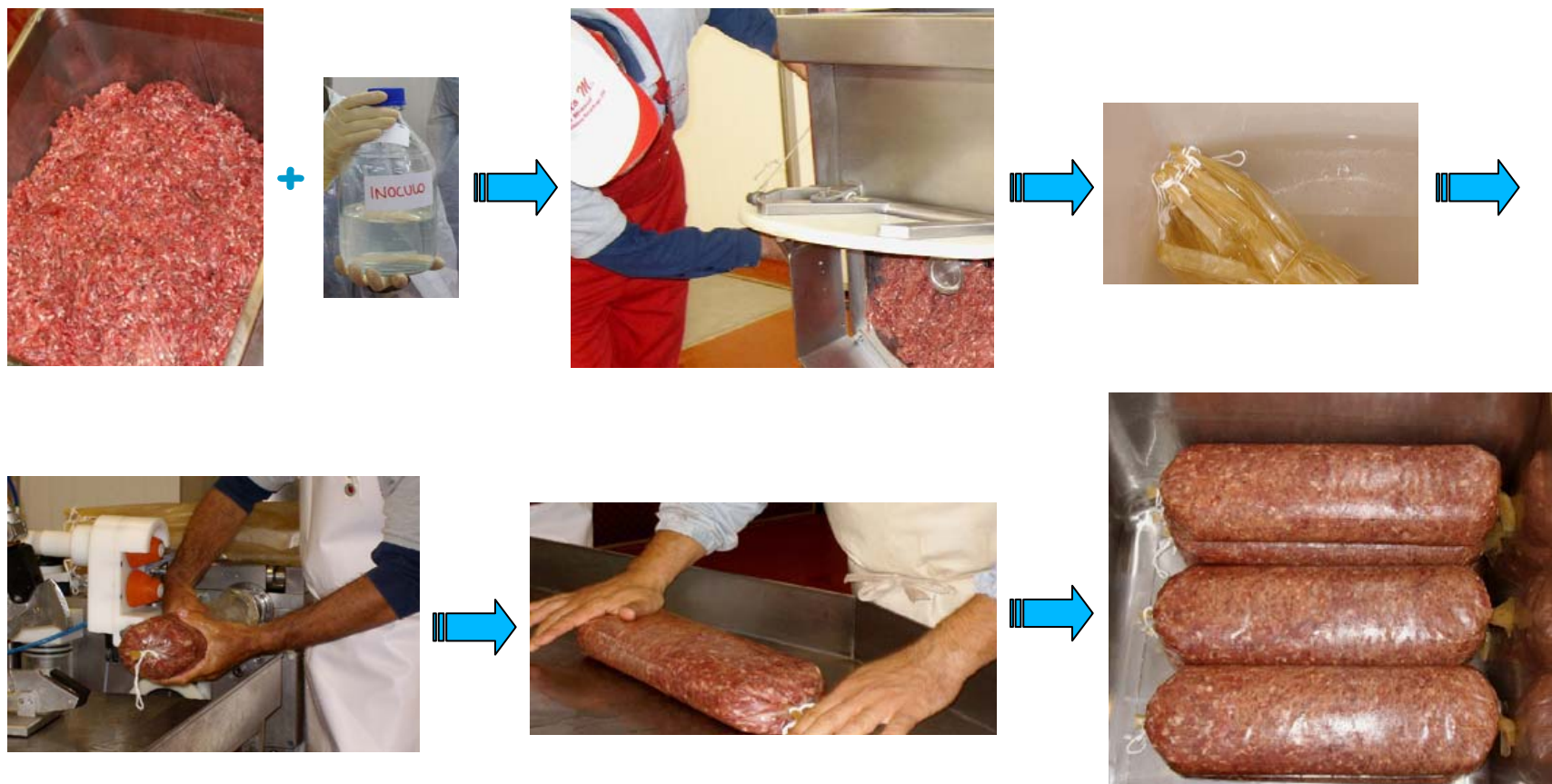
Salsiccia di cervo



+



Spianata di cervo



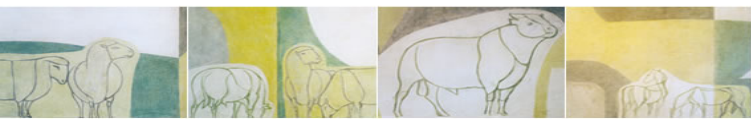
L'inoculo è stato creato con 3 differenti ceppi di *E. coli* O157, di cui uno proviene dalla ceppoteca dell'IZS LT ed altri due isolati da prodotti analoghi

I ceppi sono stati testati per la presenza di fattori di virulenza, con i metodi molecolari:

Ceppo 1 (MR DIG 125) - vtx1, vtx2 assenti; eae presente

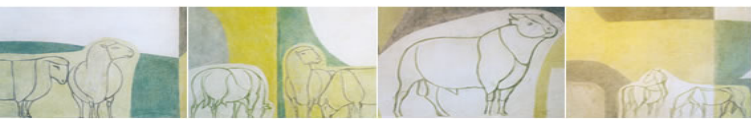
Ceppo 2 (di campo) - vtx1, vtx2, eae assenti

Ceppo 3 (di campo) - vtx1, vtx2 assenti; eae presente



Per ciascuno dei ceppi è stato determinato, attraverso una ripetuta titolazione della brodocoltura in Brain Heart Infusion broth (BHI) nel corso dell'incubazione a 37°C, il tempo di raggiungimento della fase stazionaria

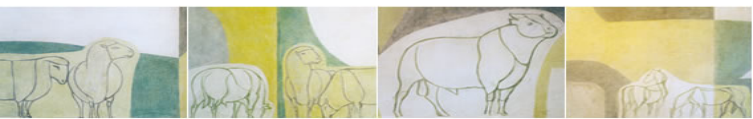
Successivamente, i ceppi nella fase stazionaria sono stati trapiantati nello stesso brodo colturale, ed incubati a 25 gradi, ai fini di adattare i ceppi alla temperatura più vicina a quella dell'ambiente della produzione



E' stata creata una miscela di 3 brodocolture
in BHI titolata a 7×10^9 ufc/g

Subito prima dell'esecuzione del challenge
test è stato creato l'inoculo

10 ml di brodocoltura + 990 ml di SF (7×10^7
ufc/g) + 100 kg di impasto destinato alla
produzione di 15 kg di Salsiccia e di 85 kg di
Spianata (7×10^5)

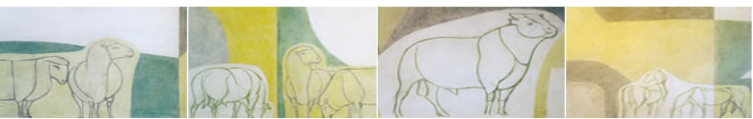


Campionamenti

sono stati eseguiti lungo tutto il processo produttivo dal Servizio Veterinario della ASL 8 di Arezzo e dal personale dell'IZS LT Sede Arezzo

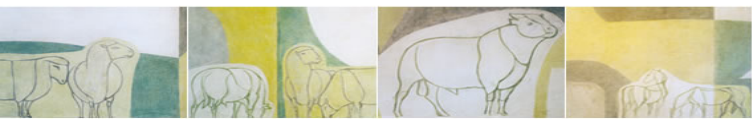
Tutti i campioni sono stati costituiti da 3 unità campionarie (u.c.)

In tutto sono stati prelevati: 42 u.c. di Salsiccia, 48 u.c. di Spianata appartenenti a 4 lotti sperimentali e 27 campioni ambientali



Prove di laboratorio

- CMT - ISO 4833 - 2003;
- *E. coli* β -glucuronidasi positivi - ISO 16649-2: 2001;
- *Enterobacteriaceae* - ISO 21528-2: 2004
- Lattobacilli mesofili - metodo interno
- Lattococchi mesofili - metodo interno
- pH - metodo potenziometrico, strumento da banco Hanna Instruments HI 122
- l'attività dell'acqua libera a_w - metodo capacitivo, strumento da banco HygroLab 3



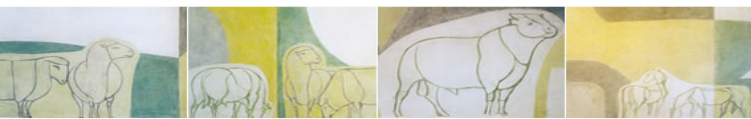
Solo in campioni contaminati:

la ricerca di *E. coli* O157- ISO 16654: 2001,

numerazione di *E.coli* O157 su Sorbitol

MacConkey agar (SMAC) - metodo interno

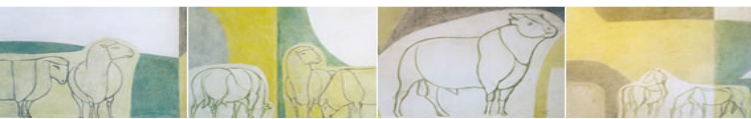
La determinazione di fattori di virulenza vtx1, vtx2 e eae, in ceppi *E.coli* O157 selezionati per l'inoculo è stata eseguita con il metodo PCR



Utensili e attrezzature sono stati lavati e poi disinfettati con Virkon alla concentrazione consigliata dalla ditta produttrice, ripetuta altre 2 volte a distanza di 12 ore

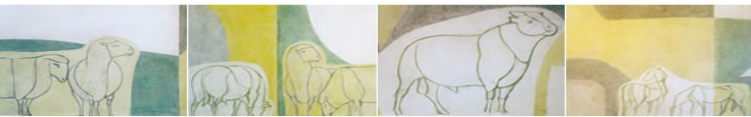
Analizzati per la presenza di *E. coli* O157 con esiti negativi

Dopo 3 giorni dalla produzione sperimentare presso il locale di produzione è stata ripristinata una normale attività lavorativa

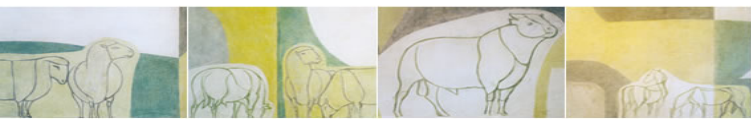


Risultati

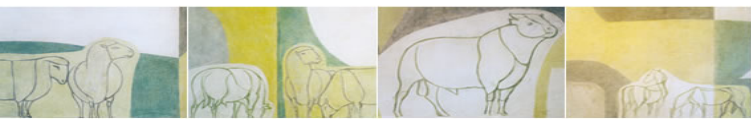
Per ogni parametro è stata calcolata la mediana di 3 valori rilevati in 3 u.c. trasformata poi in \log_{10}



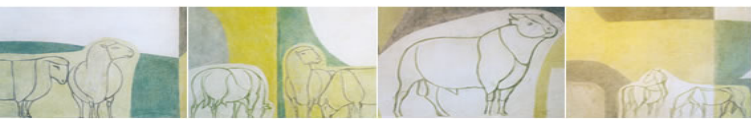
LOTTO 1 SALSICCIA CONTAMINATA							
u.c.	1° giorno Tempo 0	2°giorno Tempo 1	3°giorno Tempo 2	4°giorno Tempo 3	5°giorno Tempo 4	8° giorno Tempo 5	10° giorno Tempo 6
Lattobacilli							
u.c.1	1.800.000	10.000.000	170.000.000	260.000.000	130.000.000	180.000.000	
u.c.2	1.000.000	9.300.000	250.000.000	170.000.000	280.000.000	2.000.000.000	
u.c.3	1.200.000	3.100.000	230.000.000	180.000.000	350.000.000	260.000.000	
Lattococchi							
u.c.1	1.400.000	7.500.000	2.100.000	1.900.000	710.000	2.400.000	
u.c.2	720.000	6.600.000	5.700.000	2.800.000	830.000	1.400.000	
u.c.3	750.000	9.000.000	2.300.000	1.500.000	900.000	1.000.000	
Enterobatteri							
u.c.1	45.000	34.000	15.000	15.000	7.000	300	
u.c.2	31.000	19.000	11.000	10.000	6.000	500	
u.c.3	17.000	17.000	19.000	9.500	5.500	1000	
E.coli							
u.c.1	9.800	11.000	600	1.000	210	91	
u.c.2	13.000	5.300	650	800	400	<40	
u.c.3	11.000	5.100	510	760	230	<10	
E.coli O:157							
u.c.1	70.000	39.000	15.000	20.000	2.600	570	50
u.c.2	46.000	51.000	21.000	9.000	2.000	200	40
u.c.3	54.000	51.000	13.000	5.700	2.400	650	<40
aw							
u.c.1	0,983	0,972	0,968	0,945	0,905	0,856	0,812
u.c.2	0,978	0,971	0,972	0,941	0,911	0,851	0,812
u.c.3	0,970	0,972	0,962	0,934	0,911	0,871	0,787
pH							
u.c.1	5,80	5,68	4,89	4,78	4,89	4,95	4,74
u.c.2	5,85	5,63	4,88	4,86	4,84	4,92	4,75
u.c.3	5,74	5,71	4,91	4,79	4,93	4,93	4,74



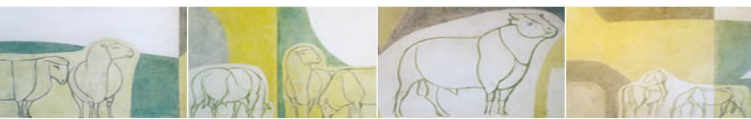
		Tempo 0	2° g	3° g	4° g	5° g	8° g	10° g
Me	Lattobacilli	1.200.000	9.300.000	230.000.000	180.000.000	280.000.000	260.000.000	
Me Log10		6,08	6,97	8,36	8,26	8,45	8,41	
Me								
Me Log10	Lattococchi	750.000	7.500.000	2.300.000	1.900.000	830.000	1.400.000	
		5,88	6,88	6,36	6,28	5,92	6,15	
Me								
Me Log10	Enterobatteri	31.000	19.000	15.000	10.000	6.000	500	
Me		4,49	4,28	4,18	4,00	3,78	2,70	
Me Log10								
Me	E.coli	11.000	5.300	600	800	230	39	
Me Log10		4,04	3,72	2,78	2,90	2,36	1,59	
Me								
Me Log10	E.coli O:157	54.000	51.000	15.000	9.000	2.400	570	40
		4,73	4,71	4,18	3,95	3,38	2,76	1,60
Me	aw	0,978	0,972	0,968	0,941	0,911	0,856	0,812
Me	pH	5,74	5,68	4,88	4,78	4,84	4,92	4,74



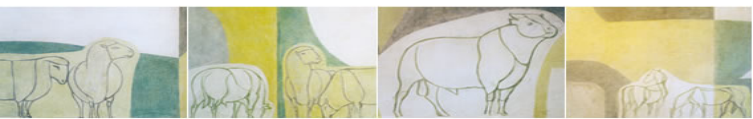
LOTTO 2C SPAINATA CONTAMINATA								
u.c.	1° giorno	2°giorno	4°giorno	7°giorno	10°giorno	15°giorno	25°giorno	32° giorno
	Tempo 0	Tempo 1	Tempo 2	Tempo 3	Tempo 4	Tempo 5	Tempo 6	Tempo 7
Lattobacilli								
u.c.1	1.200.000	4.200.000	190.000.000	200.000.000	330.000.000	350.000.000	260.000.000	320.000.000
u.c.2	2.600.000	4.000.000	160.000.000	250.000.000	200.000.000	430.000.000	290.000.000	170.000.000
u.c.3	1.200.000	10.000.000	180.000.000	320.000.000	240.000.000	290.000.000	290.000.000	110.000.000
Lattococchi								
u.c.1	820.000	1.800.000	1.700.000	10.000.000	780.000	6.800.000	5.100.000	330.000.000
u.c.2	640.000	1.900.000	1.900.000	6.900.000	8.600.000	1.000.000	27.000.000	7.400.000
u.c.3	590.000	1.800.000	2.300.000	4.200.000	65.000.000	8.000.000	72.000.000	4.500.000
Enterobatteri								
u.c.1	45.000	29.000	16.000	5.500	12.000	10.000	6.400	430
u.c.2	35.000	28.000	20.000	5.000	10.000	9.500	8.700	1.000
u.c.3	32.000	24.000	16.000	10.000	9.200	8.900	5.700	1.000
E.coli								
u.c.1	13.000	6.000	1.100	1.300	2.100	1.000	850	1.000
u.c.2	8.700	4.400	1.400	1.400	1.400	960	890	780
u.c.3	11.000	6.300	1.600	1.200	1.600	910	770	470
E.coli O:157								
u.c.1	23.000	36.000	5.800	7.600	34.000	12.000	10.000	1.700
u.c.2	30.000	38.000	55.000	13.000	14.000	14.000	9.400	1.900
u.c.3	25.000	25.000	26.000	12.000	17.000	7.700	13.000	1.600
aw								
u.c.1	0,972	0,982	0,950	0,974	0,956	0,958	0,957	0,946
u.c.2	0,971	0,977	0,966	0,966	0,962	0,962	0,949	0,940
u.c.3	0,968	0,966	0,958	0,963	0,968	0,962	0,948	0,944
pH								
u.c.1	5,70	5,70	4,66	4,73	4,85	4,70	4,84	5,84
u.c.2	5,73	5,74	4,67	4,65	4,63	5,06	5,07	5,68
u.c.3	5,74	5,74	4,68	4,70	4,66	4,84	5,02	5,51



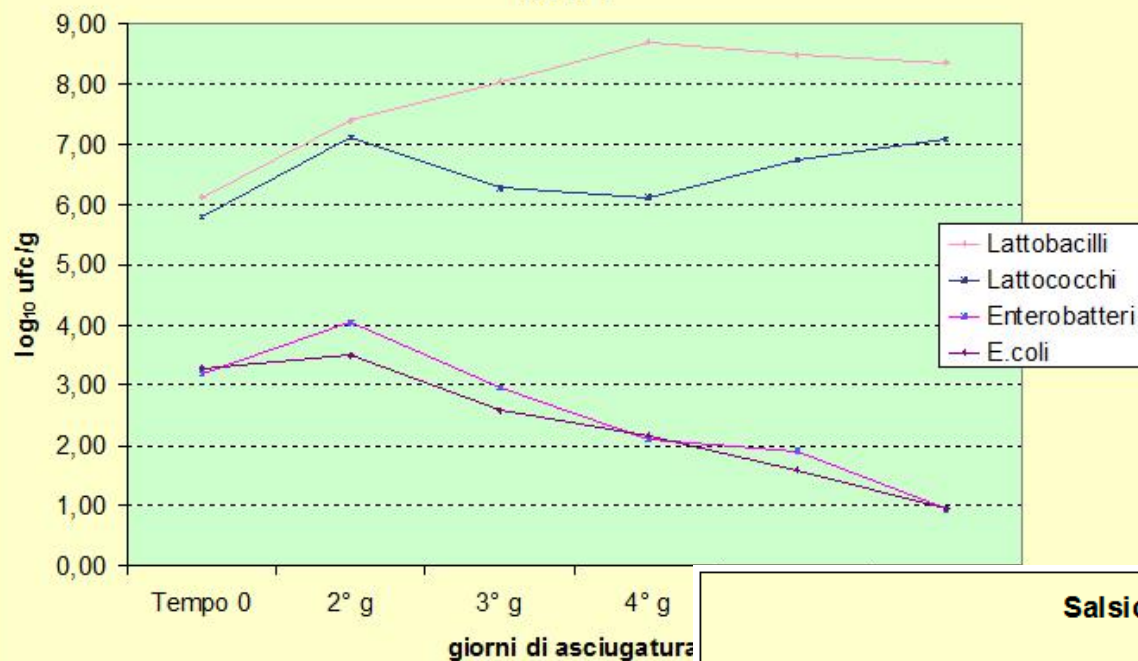
		Tempo 0	2° g	4° g	7° g	10° g	15° g	25° g	32° g
Me	Lattobacilli	1.200.000	4.200.000	180.000.000	250.000.000	240.000.000	350.000.000	290.000.000	170.000.000
Me Log10		6,08	6,62	8,26	8,40	8,38	8,54	8,46	8,23
Me	Lattococchi	640.000	1.800.000	1.900.000	6.900.000	8.600.000	6.800.000	27.000.000	7.400.000
Me Log10		5,81	6,26	6,28	6,84	6,93	6,83	7,43	6,87
Me	Enterobatteri	35.000	28.000	16.000	5.500	10.000	9.500	6.400	1.000
Me Log10		4,54	4,45	4,20	3,74	4,00	3,98	3,81	3,00
Me	E.coli	11.000	6.000	1.400	1.300	1.600	960	850	780
Me Log10		4,04	3,78	3,15	3,11	3,20	2,98	2,93	2,89
Me	E.coli O:157	25.000	36.000	26.000	12.000	17.000	12.000	10.000	1.700
Me Log10		4,40	4,56	4,41	4,08	4,23	4,08	4,00	3,23
Me	aw	0,971	0,977	0,958	0,966	0,962	0,962	0,949	0,944
Me	pH	5,73	5,74	4,67	4,70	4,66	4,84	5,02	5,68



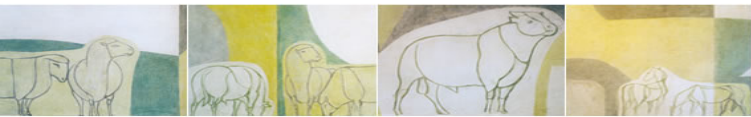
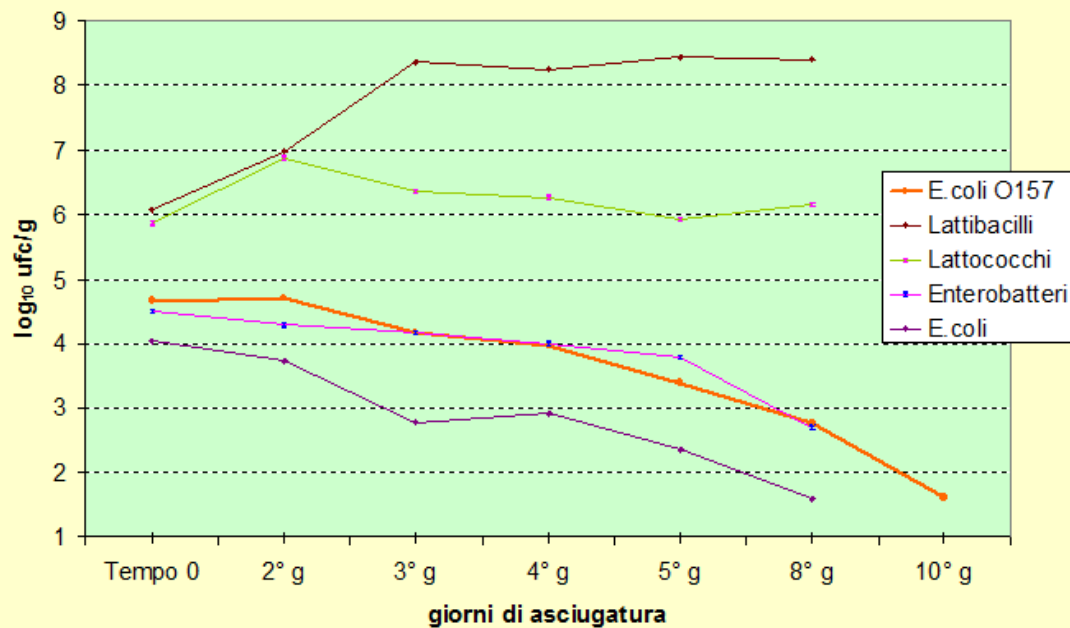
L'analisi dei dati ottenuti su due lotti differenti dello stesso prodotto, uno non contaminato e l'altro contaminato con *E.coli* O157, ha dimostrato che sia le conte batteriche, che i valori aw e pH rilevati su entrambi i lotti sono comparabili



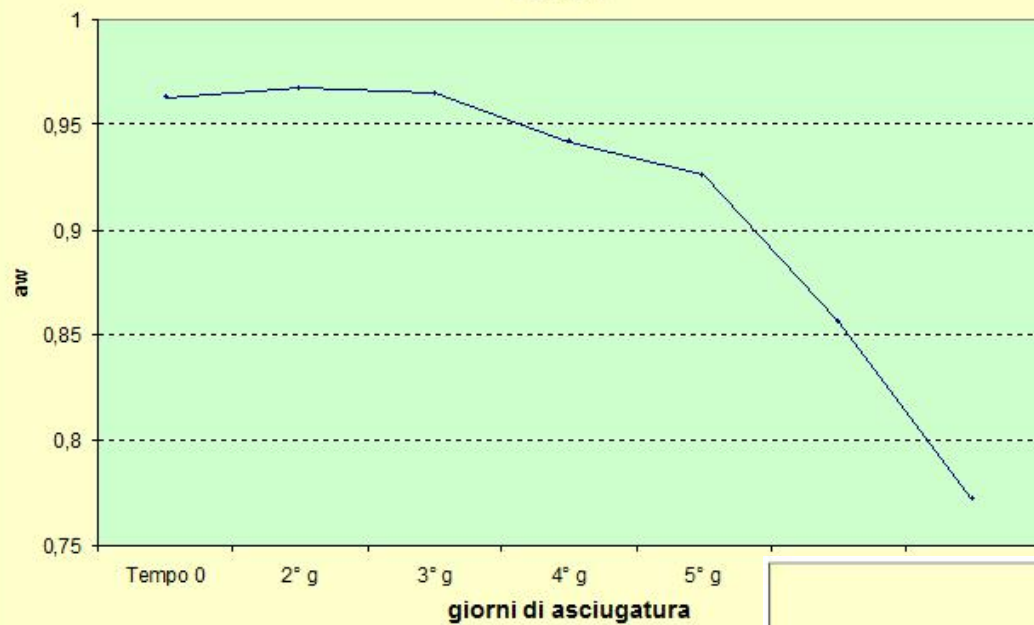
**Salsiccia non contaminata
lotto 1**



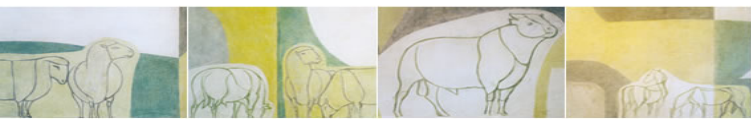
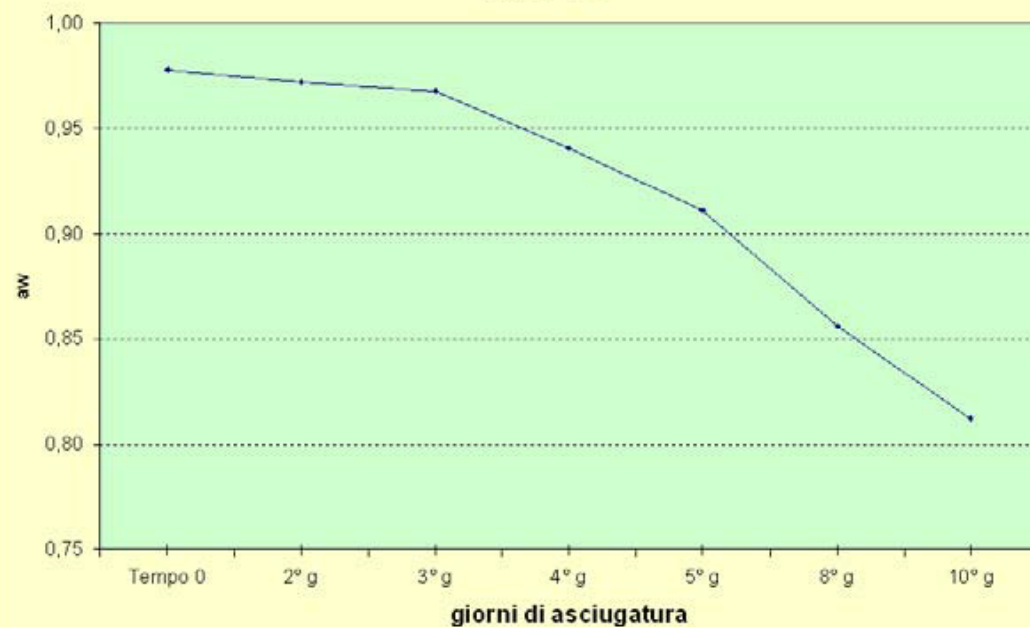
**Salsiccia contaminata
lotto 1C**



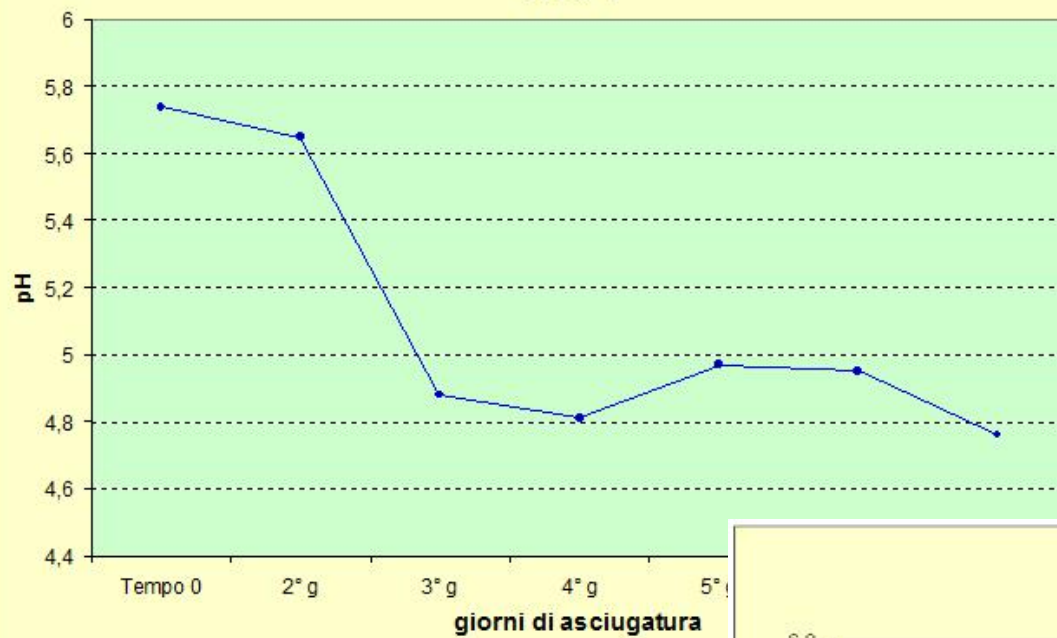
**Salsiccia non contaminata
lotto 1**



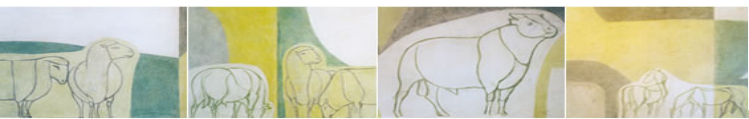
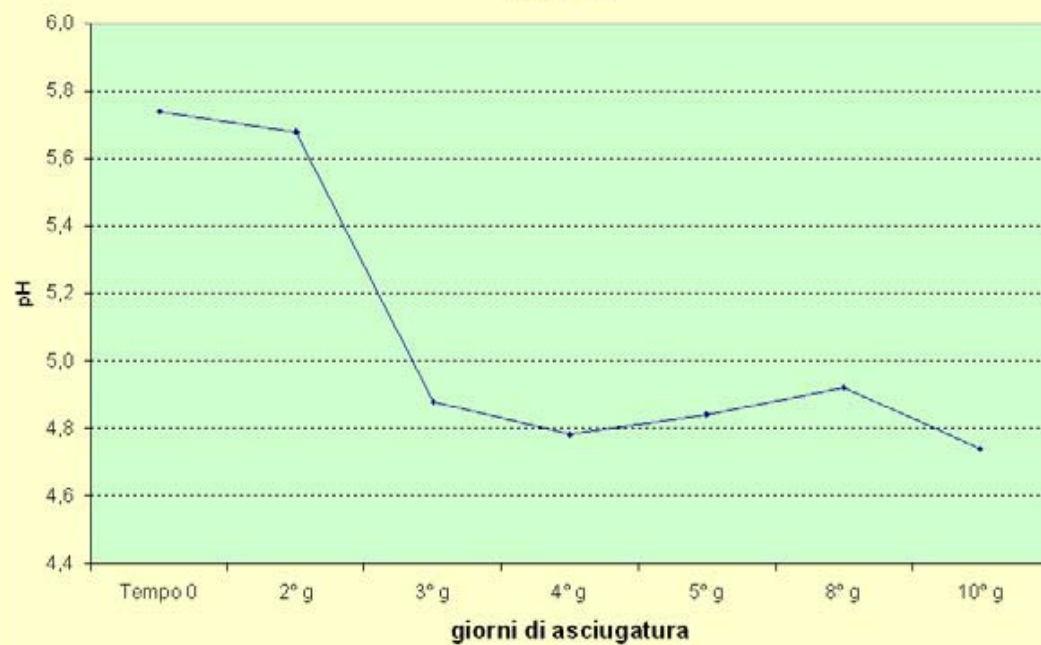
**Salsiccia contaminata
lotto 1C**



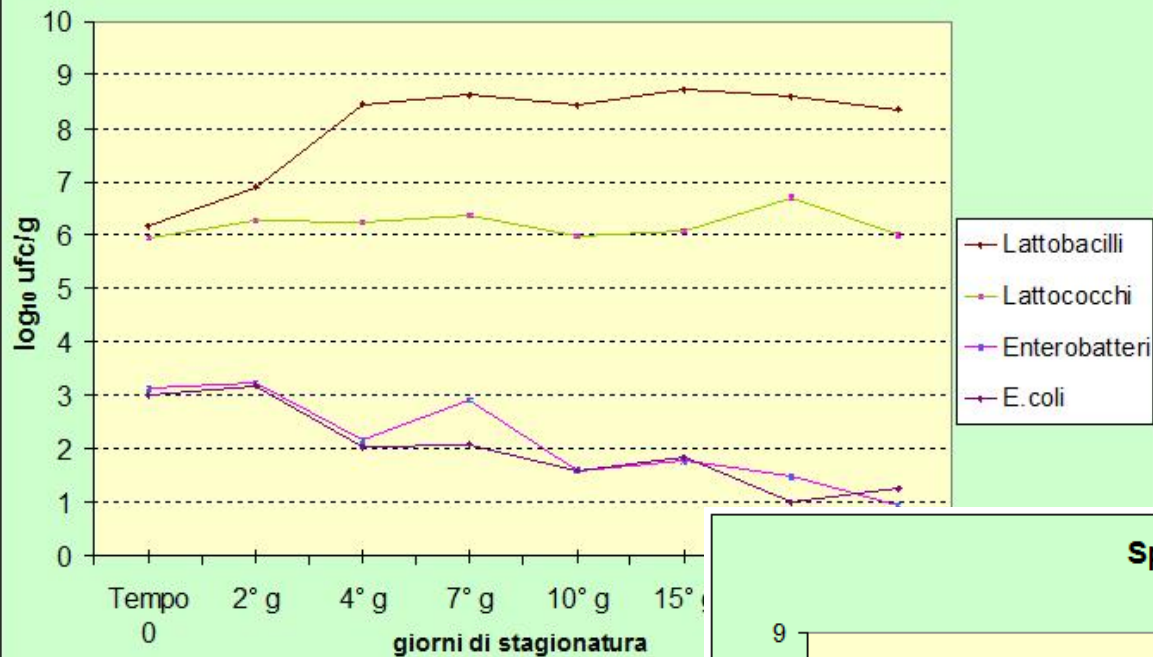
**Salsiccia non contaminata
lotto 1**



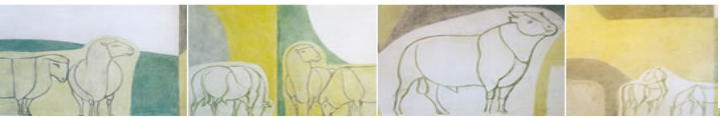
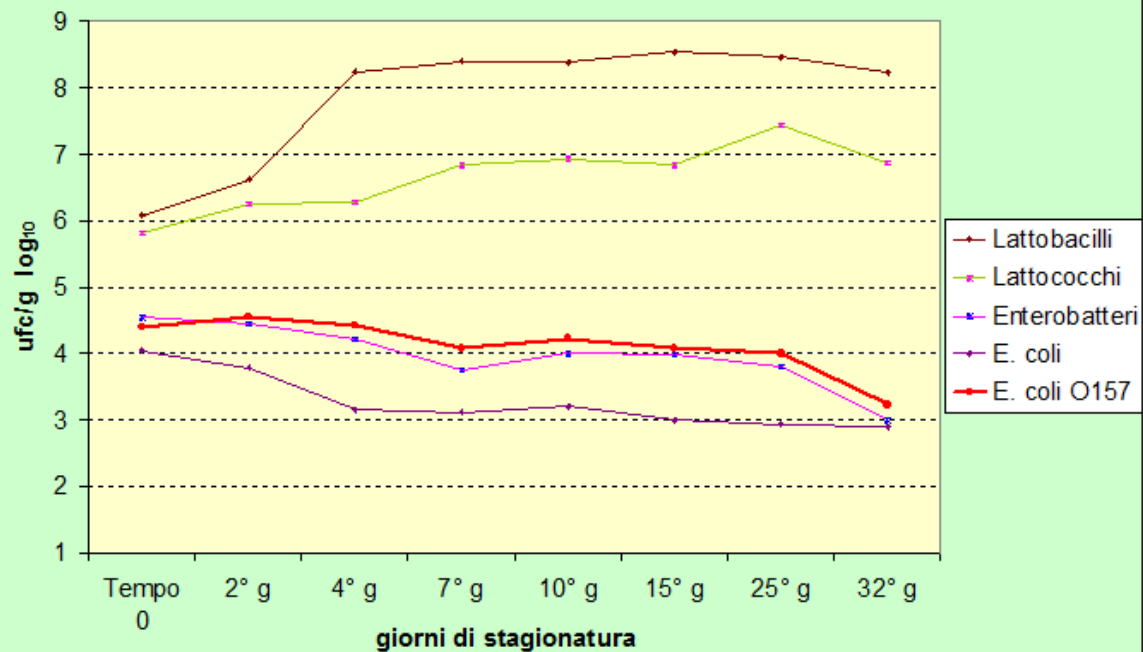
**Salsiccia contaminata
lotto 1C**



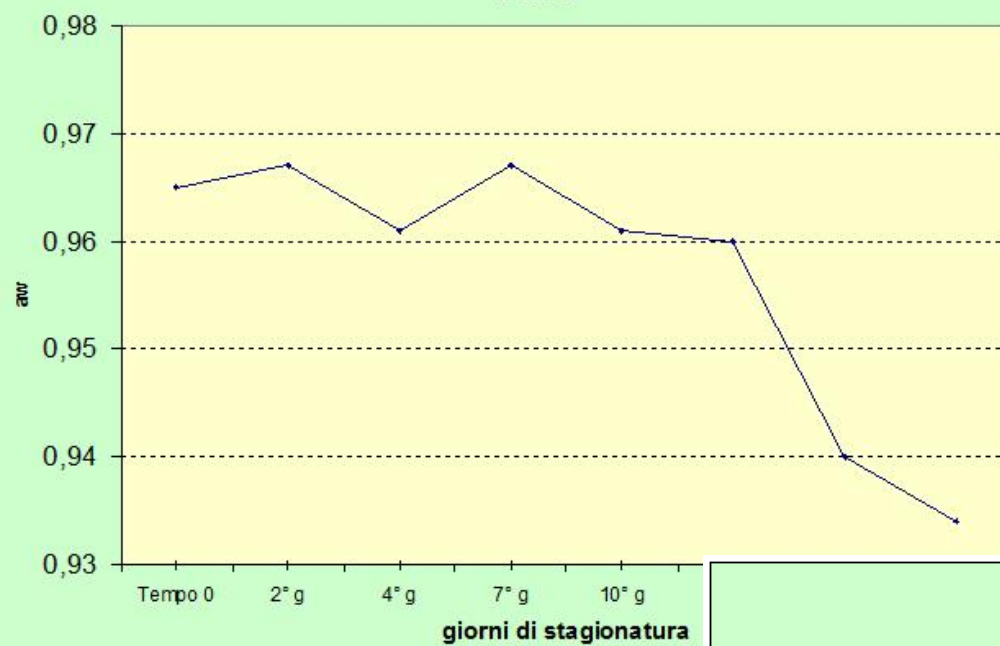
Spianata non contaminata lotto 2



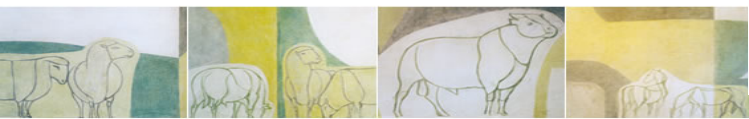
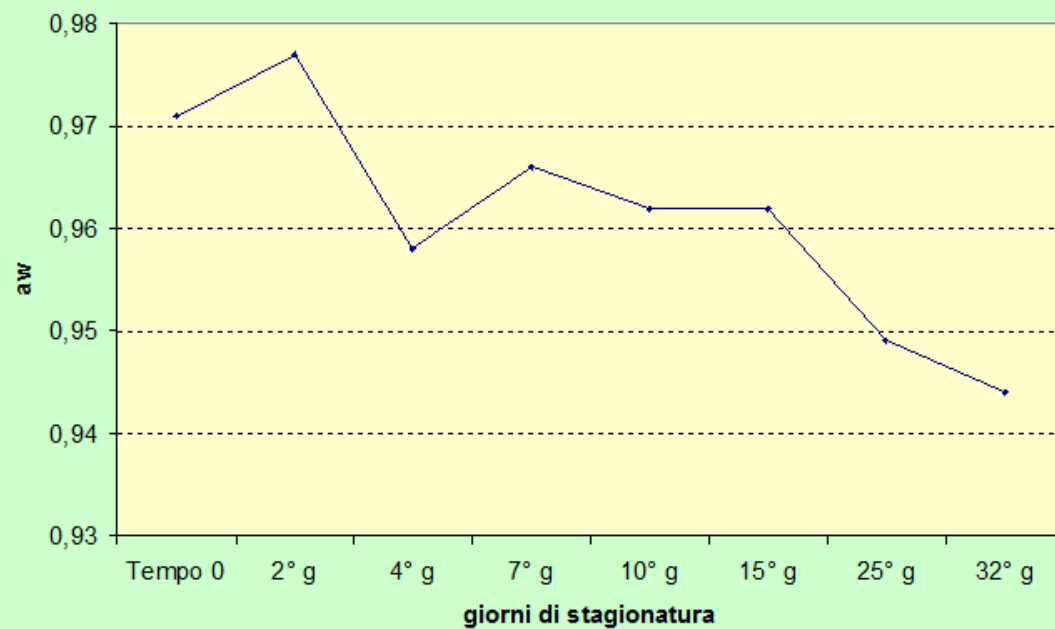
Spianata contaminata lotto 2C



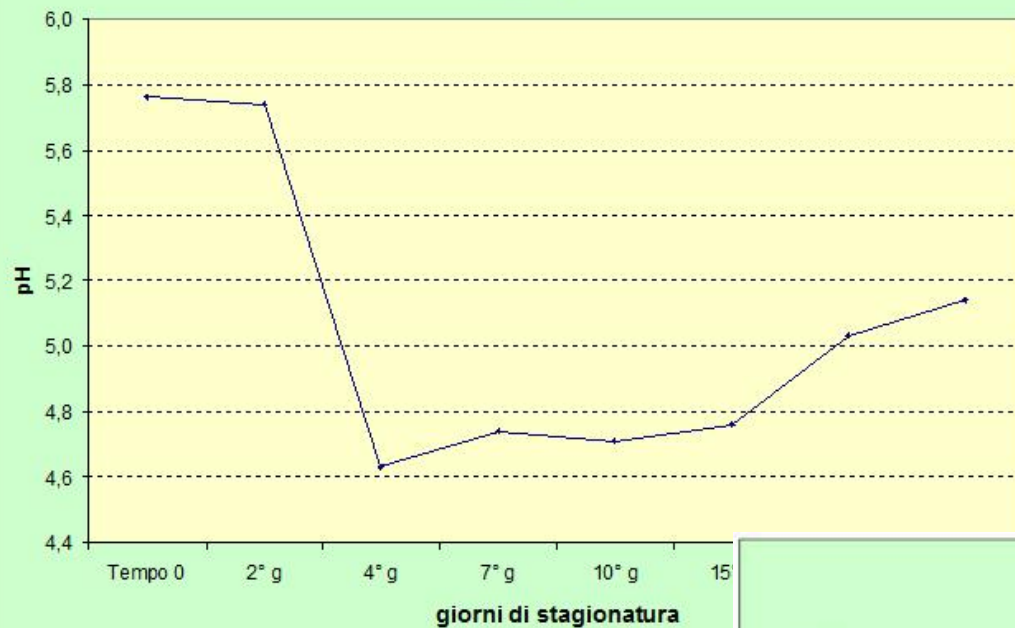
**Spianata non contaminata
lotto 2**



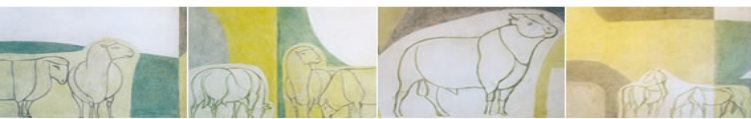
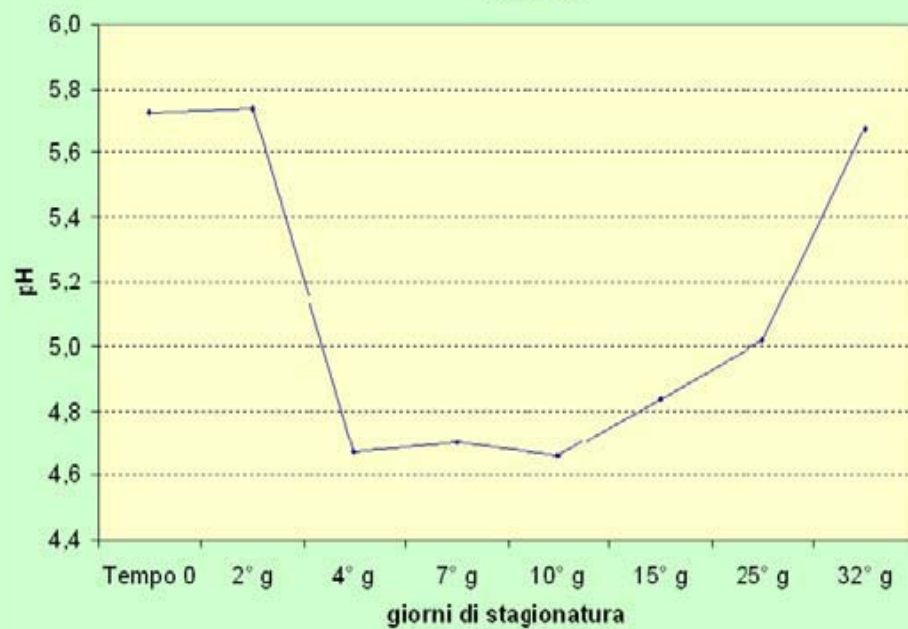
**Spianata contaminata
lotto 2C**



**Spianata non contaminata
lotto 2**



**Spianata contaminata
lotto 2C**



E' stata calcolata la differenza tra \log_{10} della mediana di 3 titoli batterici al "giorno finale" e il \log_{10} della mediana di 3 titoli al "giorno 0", espressa come potenziale di crescita (δ).

Nella Salsiccia:

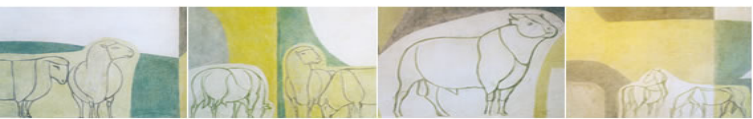
$$\text{a } 10 \text{ gg. } \delta = 1,60 - 4,73 = - 3,13 \log_{10} \text{ ufc/g}$$

$$\text{a } 5 \text{ gg. } \delta = 3,38 - 4,73 = - 1,35 \log_{10} \text{ ufc/g}$$

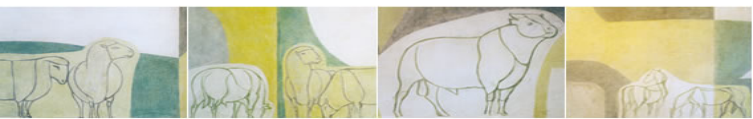
Nella Spianata:

$$\text{a } 32 \text{ gg. } \delta = 3,23 - 4,40 = - 1,17 \log_{10} \text{ ufc/g}$$

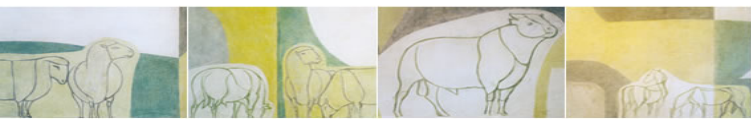
$$\text{a } 25 \text{ gg. } \delta = 4,00 - 4,40 = - 0,40 \log_{10} \text{ ufc/g}$$



Conoscendo il valore δ è possibile calcolare la massima concentrazione iniziale accettabile del patogeno, ovvero il tempo minimo di stagionatura, perché risulti assente al termine del processo produttivo

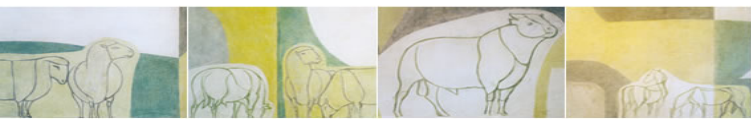


Nella Salsiccia, se la contaminazione del prodotto all'inizio del processo non supera 1.350 ufc/g il patogeno verrà eliminato automaticamente dopo 10 giorni. Nello stesso tempo, secondo le dichiarazioni del produttore la Salsiccia viene venduta e di conseguenza potrebbe arrivare al consumatore finale già dopo 5 giorni dalla produzione, quando il $\delta = -1,35 \log_{10}$



Secondo tale scenario, la concentrazione iniziale non dovrebbe superare 22 ufc/g

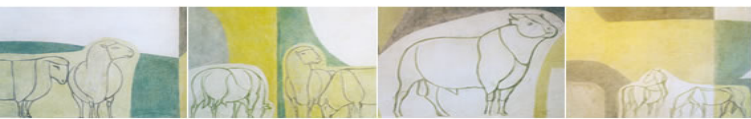
Un ragionevole prolungamento del processo consentirebbe a questo prodotto di arrivare alla tavola del consumatore con un livello maggiore di sicurezza alimentare



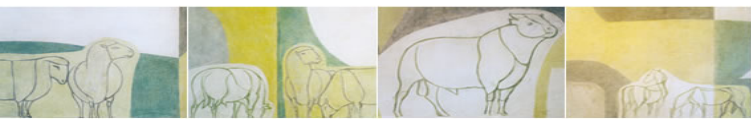
Nella Spianata $\delta = -1,17$, la contaminazione iniziale di *E.coli* O157 dovrebbe essere < 15 ufc/g all'inizio del processo per essere assente a 32 giorni

Per l'eliminazione del patogeno a 25 gg ($\delta = -0,40$) la carica iniziale < 3 ufc/g

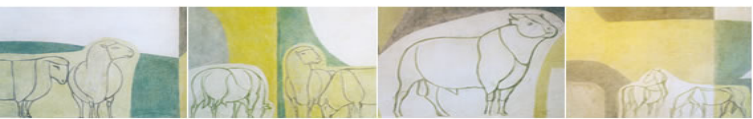
Una lenta inibizione del patogeno è probabilmente dovuta ai valori dell' a_w rilevati lungo tutta la stagionatura tali da poter sostenere la crescita di *E.coli* (a 32° giorno $a_w = 0,944$)



Anche in questo caso è consigliabile una modifica del processo produttivo ai fini di ridurre il tempo di incubazione di *E.coli* O157



I risultati ottenuti sono stati presentati presso il salumificio ed hanno aiutato al produttore a conoscere meglio le caratteristiche del proprio prodotto, e poter applicare consapevoli modifiche al processo produttivo, al fine di migliorare la qualità microbiologica dei salumi oggetto del nostro studio



GRAZIE PER L'ATTENZIONE

