Efficacia della stagionatura nell'inattivazione del virus della Peste suina africana in salami Italiani

M.S. Beato[1], G. Costantino[1*], A. Fulmini[1], S. Mrabet[1], S. Pavone[1], C. Montagnin[2], D. Lelli[2], G. Merialdi[2], L. Ceglie[3], A. Cereser[3], F. Furlan[3], M.L. Danzetta[4], A. Brutti[7], R. Ortenzi[5], A. Valiani[5], C. Casciari[1], P. Catarci[6], F. Feliziani[1]

[1] Centro di Referenza Nazionale Pesti Suine (CEREP), Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche (IZSUM),
[2] Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna (IZSLER), [3] Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie (IZSVe),
[4] Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e Molise (IZSAM), [5] Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Umbria e delle Marche (IZSUM)
[6] Ministero della Salute, [7] Stazione Sperimentale per l'Industria delle Conserve Alimentari – Fondazione di Ricerca (SSICA)

INTRODUZIONE

Background: L'introduzione della Peste suina africana (PSA) in Italia nel 2022 ha imposto severe restrizioni commerciali all'export di salumeria verso numerosi Paesi terzi, penalizzando pesantemente il comparto suinicolo.
Il progetto: Per rispondere a questa emergenza, il progetto *African Swine Fever free M.e.a.t.* (*Meet Export Agreement on Trading*) mira a produrre evidenze sperimentali sulla persistenza e inattivazione del virus nei prodotti di salumeria (fermentati e non), valutando l'efficacia della stagionatura e l'impatto sinergico del trattamento ad alta pressione (HPP).
L'approccio sperimentale: L'architettura del progetto prevede una fase di contaminazione artificiale dei salami e una successiva sperimentazione *in vivo* su suini per la produzione di salami e prosciutti stagionati.
Obiettivo del lavoro: Il presente lavoro illustra specificamente i dati generati sulla persistenza del virus della PSA durante la fase di contaminazione artificiale dei prodotti fermentati.

MATERIALI E METODI

Fase 1. Selezione dei prodotti fermentati e produzione di salami non contaminati.

Per la fase di contaminazione artificiale sono stati selezionati 5 tipi di salame rappresentativi delle tipologie maggiormente esportate (Tabella 1). Sono stati inoltre prodotti salami di controllo, contaminati esclusivamente con il terreno di coltura virale (MEM con antibiotici), al fine di valutare la riproducibilità del processo di stagionatura in condizioni controllate.

Fase 2. Produzione e titolazione del virus della PSA

La titolazione del ceppo virale BA71/V, adattato alla linea cellulare continua VERO, è stata effettuata presso il Laboratorio BSL-3 del CEREP. Per questa prima fase dell'esperimento, sono stati prodotti cira 3-6 litri di virus. Sono stati condotti test di citotossicità su colture cellulari VERO (ATCC-CL81) utilizzando carne suina stagionata destinata alla produzione di salame dei diversi tipi di salame.

Tabella 1. Tipologie di salame selezionate, giorni di stagionatura, diametro e peso.

Tipologia di salame	*Durata stagionatura*	*Diametro*	*Peso**
Felino	30 giorni	5,5 cm	0,5 - 1 Kg
Milano	55 giorni	~10 cm	~2,5 Kg
Spianata	55 giorni	5 x 15 cm (pressato)	~2,5 Kg
Cacciatore	30 giorni	4,7 cm	0,4 - 0,45 Kg
Napoli	34 giorni	~7 cm	0,8 - 1 Kg

***Peso medio dei salami contaminati con PSA.**

Fase 3. Produzione e contaminazione artificiale dei salami

Per ciascuna tipologia di salame, sono stati realizzati 3 lotti di almeno 20 salami ciascuno (Figura 1), contaminati sperimentalmente con BA71/V all'1% p/v, secondo le linee guida FSIS, e sottoposti a stagionatura. Di questi:

- 12 unità sono state utilizzate come «sentinelle» del processo di stagionatura, mediante prese di saggio calendarizzate da 3 unità ciascuna;
- 5 unità sono state sottoposte a trattamento HPP a fine stagionatura, in caso di positività alle prove molecolari e di isolamento virale;
- 3 unità sono state conservate come stock.

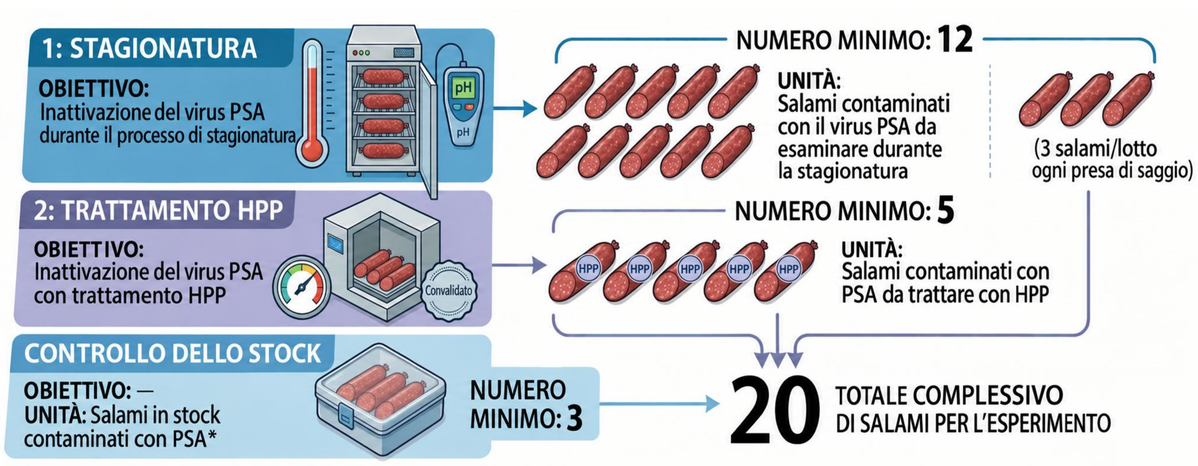


Figura 1. Disegno sperimentale relativo alla fase di contaminazione artificiale di salami.

Fase 4.1. Verifica del processo produttivo

Il processo di stagionatura è stato monitorato mediante valutazioni programmate della perdita di peso, dell'attività dell'acqua (Aw) e del pH.
La quantificazione dei batteri lattici mesofili è stata effettuata su terreni solidi selettivi, secondo la norma ISO 15214:1998.

Fase 4.2. Verifica della persistenza del virus della PSA nei salami

A 1/3, 2/3, al termine della stagionatura e dopo il trattamento HPP sono stati effettuati dei prelievi per la ricerca del virus della PSA mediante Real-Time PCR nei salami e per prove di isolamento virale (Figura 2).

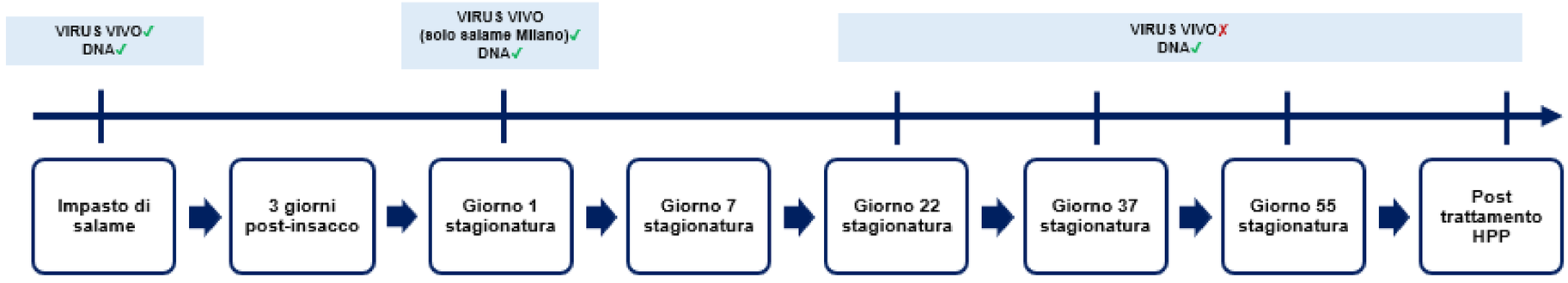


Figura 2. Fasi di verifica della persistenza del virus della PSA nei salami.

Il DNA è stato estratto a partire da un omogenato di salame al 10% p/v ed amplificato con kit ID Gene™ ASF Duplex (IDASF-100) e due protocolli raccomandati dal WOAH (King *et al.,* 2003; Fernández-Pinero *et al.,* 2013). Per l'isolamento, 1 gr di salame è stato omogeneizzato in MEM addizionato con antibiotici (1:10 p/v) ed incubato a +37 °C per 2 ore e filtrato (0,45 µm). Il surnatante è stato inoculato su cellule VERO a +37°C ±1 a 5% CO_2 per 4-5 giorni, fino alla comparsa dell'effetto citopatico (CPE).

RISULTATI E DISCUSSIONI

Le prove di isolamento virale hanno dimostrato assenza di virus vivo e vitale in tutte le tipologie di salami a fine stagionatura.
Inoltre, i dati finora ottenuti indicano che il virus della PSA non è più vitale già dopo 14 giorni di stagionatura nei salami Milano e Spianata.



Il nostro studio dimostra che il processo di stagionatura rappresenta una misura efficace per ridurre l'infettività del virus della PSA al di sotto del limite di rilevazione nei salami Italiani prodotti secondo metodi tradizionali. Questi risultati supportano il potenziale ruolo della stagionatura come misura aggiuntiva di mitigazione del rischio associato alla presenza del virus nei prodotti a base di carne suina, contribuendo ad una migliore comprensione della sua persistenza nei prodotti a base di carne stagionata e fornendo informazioni utili alla valutazione del rischio associato alla movimentazione e al consumo di prodotti suini trasformati.

BIBLIOGRAFIA

1. McKercher, P. D, et al. Residual viruses in pork products. *Applied and Environmental Microbiology*, 1978;35(1), 142–145. https://doi.org/10.1128/aem.35.1.142-145.1978
2. McKercher, P. D. Survival of swine vesicular disease virus in "Prosciutto di Parma" (Parma Ham). *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 1985;18(2), 163–167.
3. McKercher, P. D, et al. Survival of viruses in 'Prosciutto di Parma' (Parma Ham). *Canadian Institute of Food Science and Technology Journal*, 1987;20(4), 267–272.
4. Mebus, C, et al. Survival of several porcine viruses in different Spanish dry-cured meat products. *Food Chemistry*, 1997;59(4), 555–559.
5. Petrini, S, et al. Survival of African swine fever virus (ASFV) in various traditional Italian dry-cured meat products. *Preventive Veterinary Medicine*, 2019;162, 126–130.