



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

(RC LT 06/09 *Roberto Fischetti*)

***L'ATTIVITÀ DI RICERCA CORRENTE PRESSO L'IZS LAZIO E TOSCANA: RICADUTA
APPLICATIVA NELLE REALTÀ TERRITORIALI - SICUREZZA DI FILIERA NELLE
PRODUZIONI ALIMENTARI***

Laura Gasperetti

Sezione di Pisa

Roma, 07/05/2014



Razionale del progetto

La sicurezza dei prodotti alimentari pronti al consumo è oggetto di notevole attenzione.

Tuttavia mancano informazioni sulla salubrità dei prodotti tradizionali, basate su concetti moderni ed incontestabili.

Il variopinto panorama dei prodotti tradizionali ha probabilmente scoraggiato forti impegni nello studio di singole tipologie di prodotti, certamente fabbricate in quantità limitata, ma ormai riconosciute come prodotti tipici di una tradizione culturale e produttiva di forte impatto “sociale” .



Si è ritenuto di presentare un progetto sulla sicurezza alimentare individuando **4** diversi settori uniti dal comune obiettivo di **migliorare le conoscenze sulla prevenzione dei rischi associati al consumo di alimenti.**

1 Tra le novità contemplate nel Regolamento CE 2073/2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari vi è senz' altro il **superamento di una visione statica dei criteri microbiologici a favore di una aspetto dinamico della loro valutazione in rapporto al tipo di prodotto ed al processo associato.**

In particolare l'**art.3 punto 2: se necessario, gli operatori del settore alimentare effettuano studi (anche in collaborazione tra loro), in conformità all'allegato II, per verificare se i criteri sono rispettati per l'intera durata del periodo di conservabilità.** L'allegato I prevede il ricorso all'art.3 in tre punti: 1.2 (Listeria) , 1.8 (Salmonella, prodotti di carne) e 1.11 (Salmonella, formaggi non pastorizzati).

L'effettuazione di questi studi è onerosa per le aziende che producono alimenti tradizionali, aziende spesso a carattere familiare.

Il documento SANCO 1628/2008 prevede che i risultati degli studi effettuati su un prodotto possano essere trasferiti ad altri simili, con le dovute considerazioni.

Il progetto si propone di definire la salubrità e la durata commerciale dei prodotti (shelf-life) effettuando studi in conformità all'allegato II del Regolamento CE 2073/2005 compresa l'inoculazione sperimentale delle matrici alimentari (challenge test) secondo le linee guida europee AFSSA 2007 e statunitensi NACMCF 20 marzo 2009.

2 - La valutazione dei rischi associati a prodotti ittici tipici etnici, il cui consumo è assai diffuso ed in crescita, integra l'argomento principale su una parte importante della cucina "etnica". Alla luce dei dati e delle normative più recenti, il settore merita e richiede riflessioni con approfondimenti utili ad una valutazione dei rischi associati a questi prodotti tipici di origine non nazionale, ma che entrano sempre più a far parte delle abitudini alimentari.

3 I risultati saranno elaborati al fine di preparare linee guida e corsi specifici in modo da fornire informazioni da utilizzarsi **sia nella verifica dei processi** che nell'effettuazione di **valutazioni sul prodotto**.

4 Si propone di valutare il contenimento della crescita microbica in formaggi ovicaprini per mezzo di sostanze naturali.

Responsabile scientifico del progetto:
Fischetti Roberto

Unità operative impegnate nel progetto:

- a) n. identif. U.O.:1..... Responsabile U.O.: Roberto Fischetti**
- b) n. identif. U.O.:2..... Responsabile U.O.: Massimo Mari**
- c) n. identif. U.O.:3..... Responsabile U.O.: Tiziana Zottola**
- d) n. identif. U.O.:4..... Responsabile U.O.: Tatiana Bogdanova**
- e) n. identif. U.O.:5..... Responsabile U.O.: Luigi Lanni**
- f) n. identif. U.O.:6..... Responsabile U.O.: Roberto Condoleo**
- g) n. identif. U.O.:7..... Responsabile U.O.: Simonetta Amatiste**
- h) n. identif. U.O.:8..... Responsabile U.O.: Rita Marcianò**
- i) n. identif. U.O.:9..... Responsabile U.O.: Claudio Di
Giovannantonio**

Breve introduzione tecnica.....

Shelf-life

La durata degli alimenti deperibili è condizionata dalla proliferazione microbica.

La misura della **shelf-life** è quindi fondamentale per stabilire una scadenza del prodotto alimentare entro **margini che garantiscano sicurezza e qualità** per il consumatore.

Per molti anni (in alcuni casi secoli) la durata dell'alimento è stata ricavata empiricamente.

La ***microbiologia predittiva*** : predizione dell'evoluzione microbica attraverso supporti informatici è **più o meno** attendibile calibrando i fattori critici per la proliferazione microbica, oppure valutando la bontà di curve di crescita ottenute attraverso prove sperimentali.

I ***challenge test*** : prove sperimentali di contaminazione dell'alimento) servono per verificare se una strategia di contenimento dei germi sia efficace o se la durata del prodotto alimentare è troppo lunga.

Principali fattori agenti sul “controllo” dei microrganismi

☐ TEMPO e fattori legati:

- ☐ Temperatura
- ☐ Aw
- ☐ pH
- ☐ Flora lattica
- ☐ Agenti conservanti
- ☐ Atmosfera di confezionamento

➤ **Stato fisico**

➤ **Modalità di preparazione**

Challenge Test Fase 1

Consulenza di esperti

- 1) Identificazione del problema:
 - Studi di **controllo crescita** o di inattivazione

- 2) Identificazione del prodotto:
 - Preparazione
 - Variabilità: aw e pH più elevati
 - Microflora competitiva
 - Storico esistente
 - Bibliografia o studi azienda esistenti anche su prodotti simili
 - Microbiologia predittiva

Challenge Test Fase 2

Studio dei microrganismi

- Microrganismo/i target
- Uso di surrogati? Listeria , E. coli
- Tipo e numero di ceppi usati
(tolleranti l'acido, isolati da tossinfezioni, ATCC ...)

Si inoculano 2 o piu' ceppi

- **Valutare il livello della flora competitiva**

Challenge Test Fase 3

Livelli di inoculo

Superiore al numero normalmente rilevato: si inoculano da 50 a 1000 germi per grammo di prodotto

Challenge Test Fase 4

Preparazione dell'inoculo

Sia i ceppi che il liquido di sospensione (supporto per l'inoculo)

- dovrebbero essere **conservati congelati** e **stoccati in varie unità** per evitare eccessivi passaggi.
- ed essere **coltivati adattandoli** a condizioni più vicine a quelle del prodotto : acido, sale, temperatura ...

Challenge Test Fase 5

Metodo di inoculazione: E' la parte più complessa !

Il problema è ottenere una distribuzione uniforme della sospensione.

- **Latte** : è garantita
- **Salse** : si ottiene facilmente
- **Insaccati** : Si deve distribuire la già ridotta quantità di sospensione nella massa macinata già con gli ingredienti. Deve seguire una miscelazione manuale lunga ed accurata, 1-10 minuti , prima di insaccare .
- **Formaggio**: il modo migliore sarebbe l'inoculazione in caldaia prima del caglio e si deve considerare la concentrazione successiva nella cagliata.

Challenge Test Fase 6

Conservazione e confezionamento

- Le condizioni di confezionamento (anche atmosfera) devono essere quelle del prodotto commercializzato.
- La temperatura deve essere tra **8 e 12° C**.

La temperatura di conservazione indicata in etichetta non dovrebbe essere + 4° C, poiché regolamenti e documenti parlano di **ragionevoli condizioni di conservazione!**

Si chiede quindi ai valutatori una certa elasticità .

* Per i Prodotti fermentati:

- L'inoculo è eseguito prima che il prodotto sia pronto (salagione , stufatura) : le **temperature** saranno quelle **previste dal processo produttivo**, altrimenti la riduzione dei patogeni inoculati, **che avviene in questa fase** , potrebbe essere inferiore .
- Si dovrebbero seguire le temperature ed i tempi seguenti (se non noti) nelle 3 fasi :

Combinazioni tempo-temperatura per i challenge test per SHELF-LIFE		
fasi	Frazione shelf-life	temperatura
Ditta produttrice	1/3 (<21 gg) 7gg (>21gg)	8° C
Dettaglio	1/3 (<21 gg) ½ (>21gg)	12° C
Consumatore	1/3 (<21 gg) ½ (>21gg)	12° C

Challenge Test Fase 7

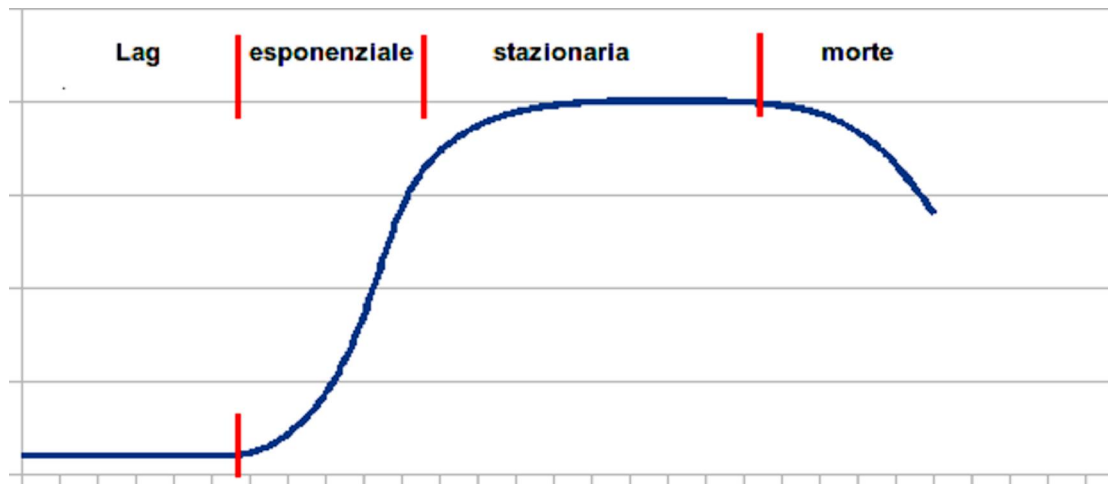
Campionamento

- Per ogni seduta di campionamento dovrebbero essere esaminati più campioni.

Nelle prime fasi (circa 30 % durata del test)
campionamenti ravvicinati per misurare la lag fase.

- Devono essere misurati i parametri chimico fisici principali anche su campioni non inoculati .

Servono numerosi conteggi microbici !



Challenge Test Fase 8

Durata studio

Il periodo dello studio deve essere maggiore o uguale alla shelf-life (secondo il tipo di test) :

Se shelf-life = max 10 gg 50% **in più** del previsto

Se shelf-life = > 10 gg 25 - 30% **in più** del previsto

E' vero anche il contrario!

La shelf-life deve essere ridotta delle stesse percentuali se lo studio è diretto a determinarla (misurarla) .



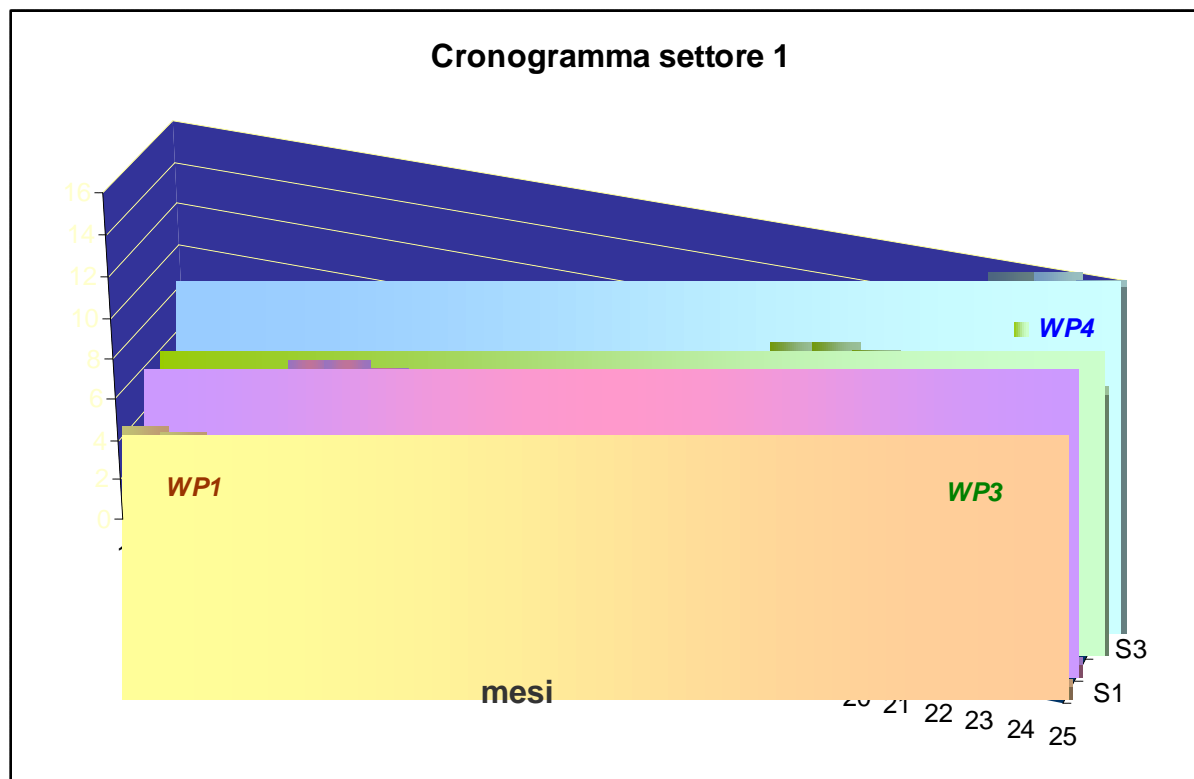
Challenge Test Fase 9

Valutazione dei risultati

Es. : per *Listeria monocytogenes* un incremento $< 0,5 \text{ Log}$ è considerato di sicurezza

Altrimenti:

- Rivedere la formulazione del prodotto
- Abbreviare la shelf-life
- Non produrlo



WP1 = Consultazione della bibliografia e acquisizione dei dati storici :

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

WP3 = Valutazione risultati

WP4 = Divulgazione risultati, documenti, corsi

WP1 = Consultazione della bibliografia e acquisizione dei dati storici :

- Non esistevano segnalazioni di tossinfezione da *Listeria monocytogenes* in salami
- Dati Sezione IZSLT di Pisa

Listeria monocytogenes

Salmonella spp.

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

Sono state contattate 4 ditte produttrici toscane:

DITTA piccola, che produce salumi tradizionali;

DITTA media, che produce salumi tradizionali;

DITTA che produce formaggi tradizionali anche a latte crudo;

DITTA media, che produce mozzarelle fresche.

Complessivamente sono stati effettuati 7 studi

WP3 = Valutazione risultati

Studio 1 (UO 1)

Sono stati selezionati e studiati 7 ceppi di *Listeria monocytogenes* e 7 di *Listeria innocua* (in entrambi i casi 6 da nostra collezione + 1 ATCC) per confrontare il tasso di crescita a 8° C mediante conteggio in piastra (ISO 11290-2) tramite programma Microfit (nell'ottica di poter usare germi surrogati anziché il patogeno) .

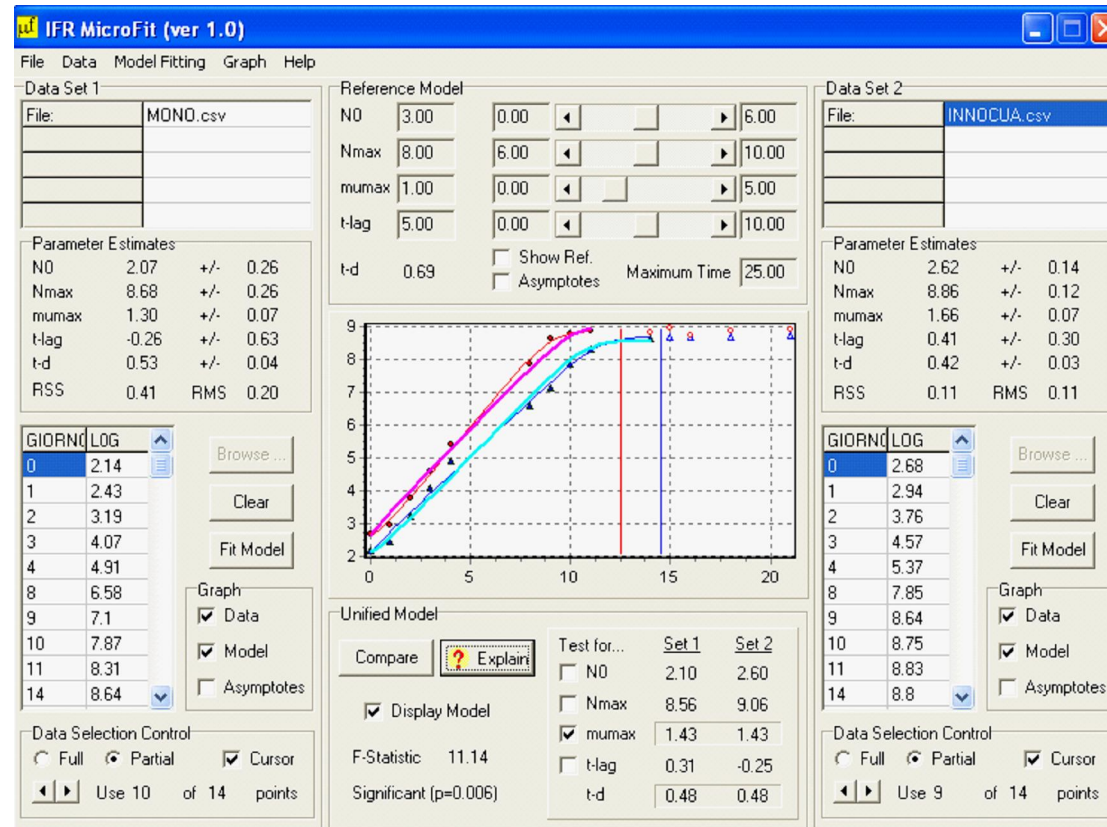
E' stato approntato un pool per *Listeria monocytogenes* ed uno per *Listeria innocua* e di entrambi è stata studiata la dinamica della crescita in brodo a 8° C.

➡ Seguendo le indicazioni di 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.)

Risultati

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

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



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

Studio 2 (A e B)

2 studi di inoculazione sperimentale (challenge test) in **mozzarella di latte vaccino**, confezionata in busta chiusa insieme al liquido di governo (sono stati saggiati tre lotti, ciascuno dei quali costituito da circa 50 mozzarelle (alcune di scorta), la cui shelf-life stabilita dal produttore è di 22 giorni.

Il primo (**studio 2A**) è stato condotto secondo quanto previsto dalla guida AFSSA per *Listeria monocytogenes*, denominato “Maximum growth rate” (μ_{\max}) o tasso massimo di crescita.

Il secondo (**studio 2B**) è stato condotto sempre secondo la guida AFSSA e SANCO 2008, ma sperimentato con *Pseudomonas fluorescens* colorante blu su mozzarella a 8° C.

In parallelo il test μ_{\max} è stato condotto anche sulla singola confezione iniziale sia per *Listeria monocytogenes* che per *Pseudomonas fluorescens*.

Dopo aver ottenuto 12 curve di crescita per *Listeria monocytogenes* e 12 curve di crescita per *Pseudomonas fluorescens* sono stati **calcolati i μ_{\max}** attraverso programma “Microfit” (situazione più sfavorevole)

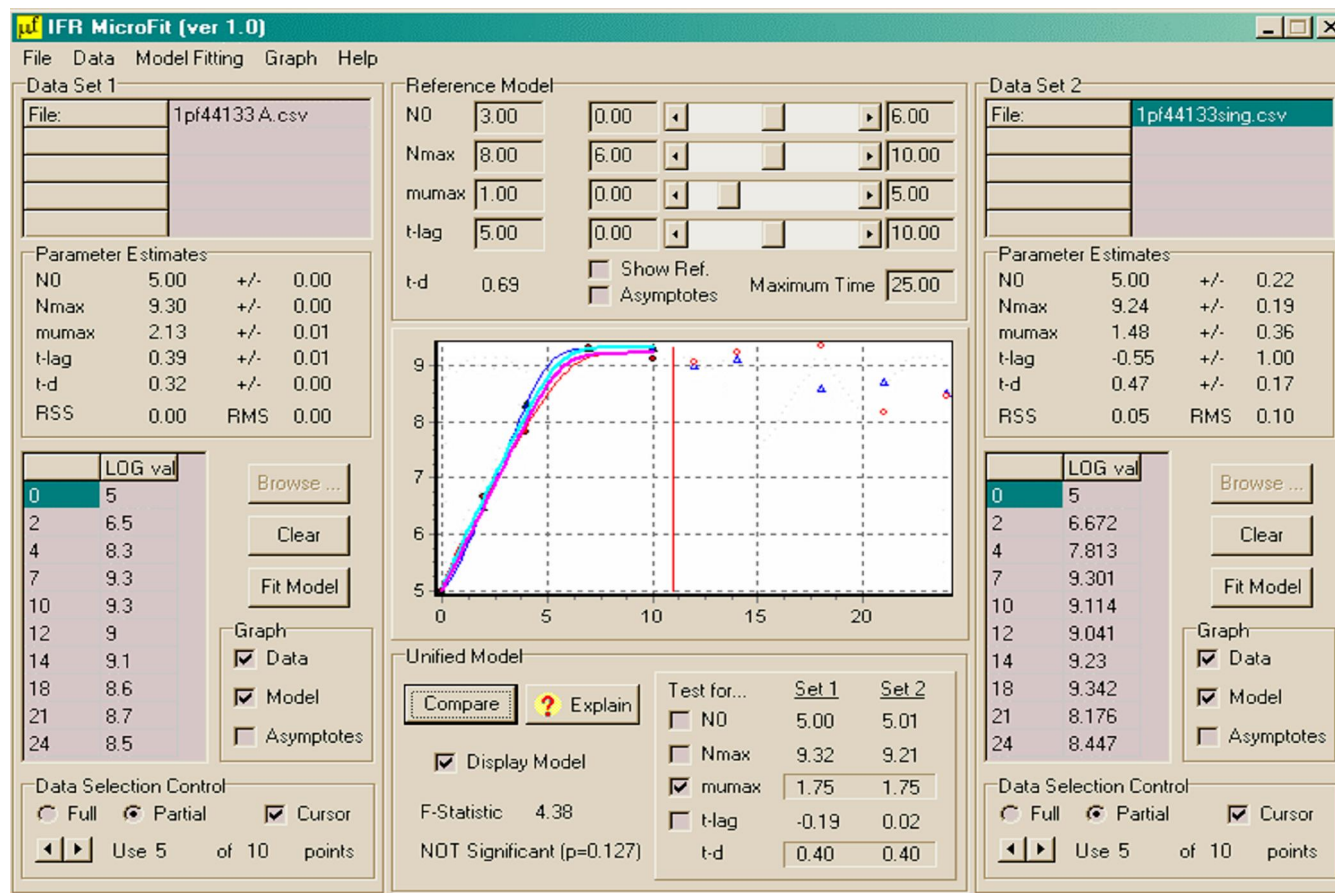
μ_{\max} 8° *Listeria monocytogenes* = 0.98 LOG/giorno

μ_{\max} 8° *Pseudomonas fluorescens* = 2 LOG/giorno

Il nostro metodo di contaminazione (mozzarella singola) è risultato sovrapponibile con quello previsto AFSSA (confronto statistico con “Microfit”).

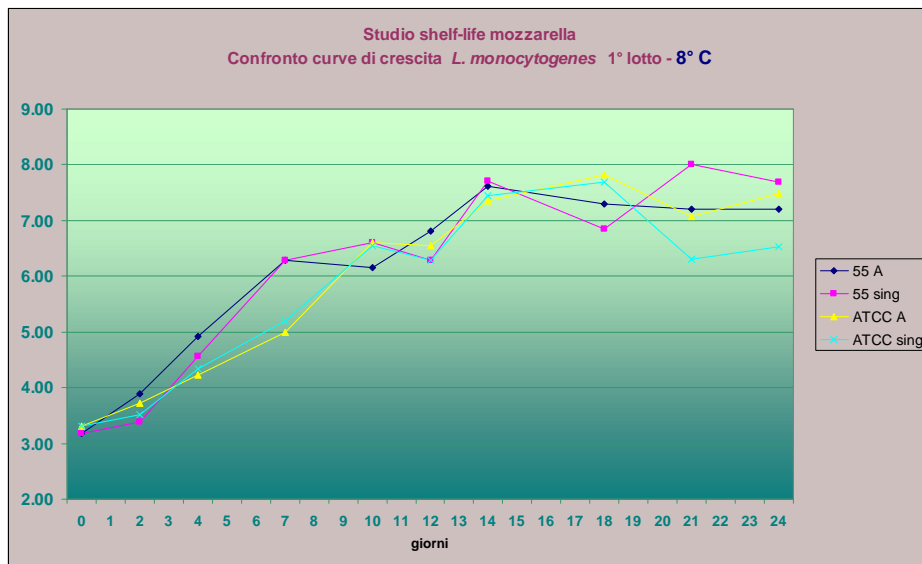
Comparazione tra challenge effettuato su una sola unità e challenge effettuato su 10 unità Lotto 1

Pseudomonas fluorescens ceppo 44133

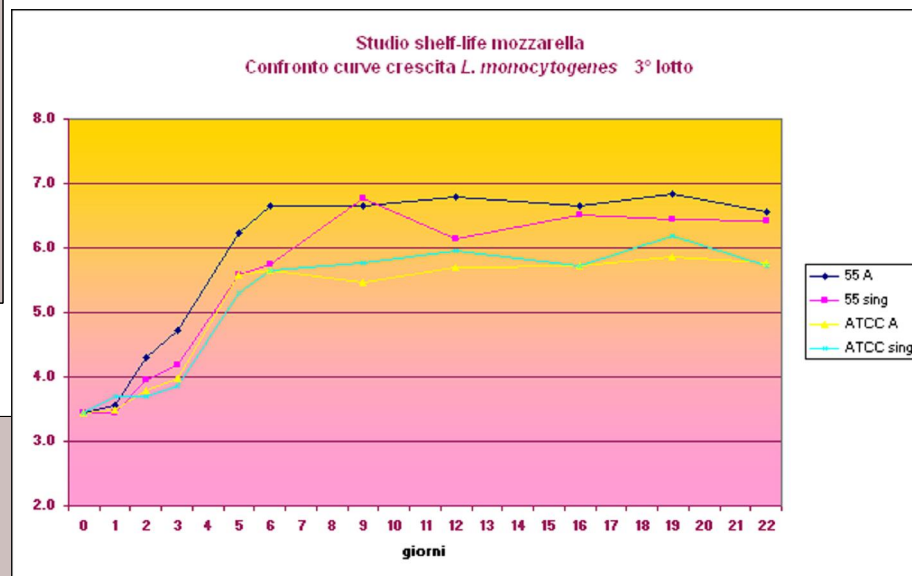


La differenza tra i $2\mu_{max}$ non è significativa, per cui i risultati dei 2 modelli di challenge sono sovrapponibili.

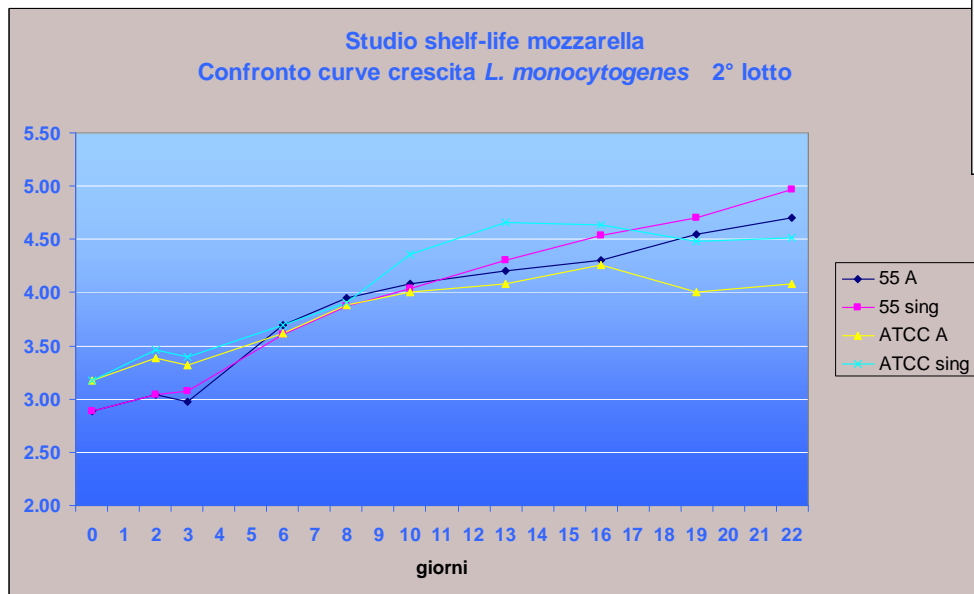
Studio 2 A – Curve di crescita *Listeria monocytogenes* 1° lotto



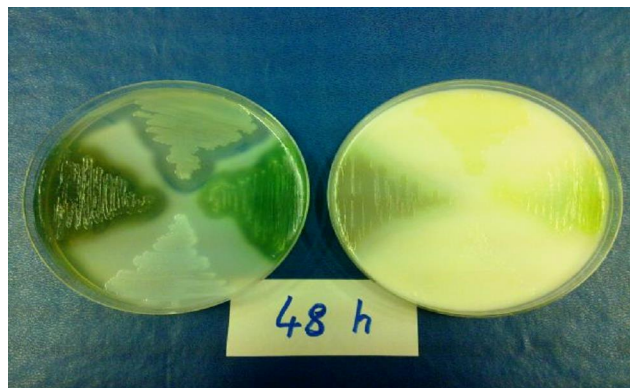
Studio 2 A – Curve di crescita *Listeria monocytogenes* 3° lotto



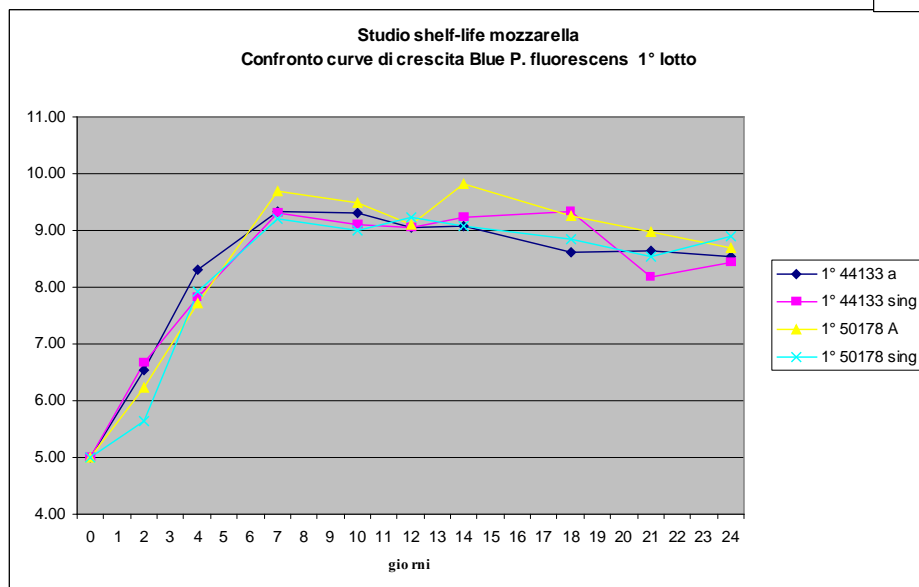
Studio 2 A – Curve di crescita *Listeria monocytogenes* 2° lotto



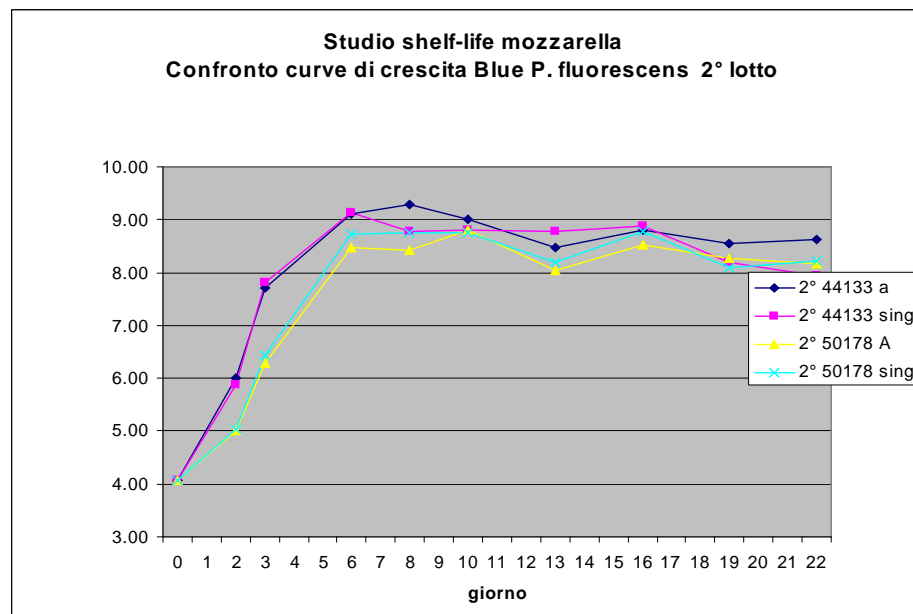
Terreni differenziali ideati IZSLT Pisa



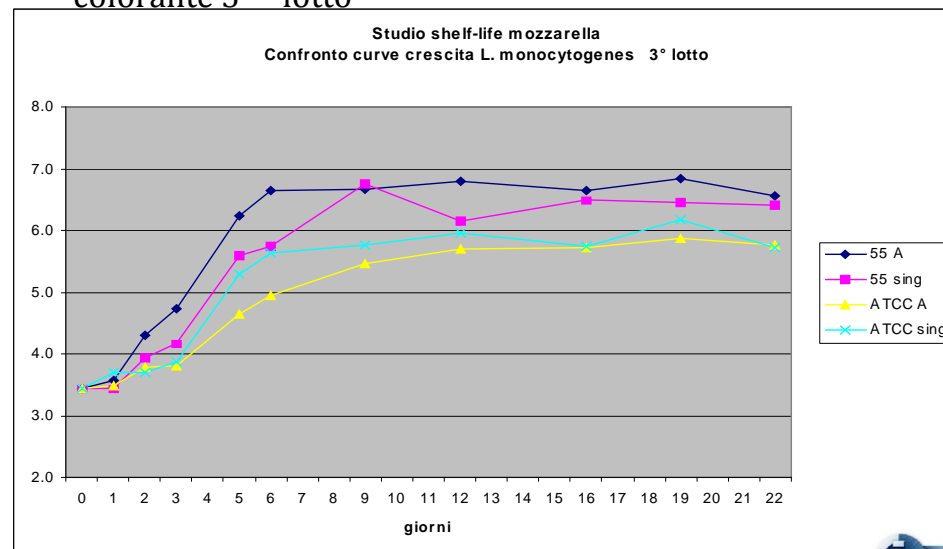
Curve di crescita *Pseudomonas fluorescens*
colorante 1° lotto



Studio 2 B – Curve di crescita *Pseudomonas fluorescens* colorante 2° lotto



Curve di crescita *Pseudomonas fluorescens* colorante 3° lotto



Conclusioni dello studio 2

Studio A

Listeria monocytogenes In pochi giorni raggiungerebbe il limite di 100 ufc/g. La mancanza di voci bibliografiche che riportino la presenza di *Listeria monocytogenes* in mozzarelle nazionali dimostra che il processo produttivo annulla il rischio; si rinforza l'importanza dei dati bibliografici e storici.

Studio B

Pseudomonas fluorescens coloranti e non . Crescono più velocemente di *Listeria monocytogenes*; abbiamo ipotizzato di tollerare fino a 10^7 ufc/g, tuttavia la durata dell'alimento di 22 giorni prevista dal produttore (durata che è ritenuta media) si dimostra eccessiva riferita ai caratteri organolettici.

Studio 3 (UO 4)

E' stato condotto un challenge test su **salame di cervo** in seguito ad una positività per ***E. coli* 0104** con caratteristiche di patogenicità sia di VTEC che di EaggEC, durante attività di vigilanza in un mercato locale austriaco e prodotto presso uno stabilimento toscano.

L'**obiettivo** era quello di **ottenere dati relativi al comportamento di *Escherichia coli* del gruppo VTEC**, nel processo produttivo di 2 prodotti di salumeria prodotti presso la stessa Ditta toscana: **Salsiccia di cervo** e **Spianata di cervo**, col metodo del growth potential (δ) o potenziale di crescita, contaminati artificialmente con una miscela di 3 differenti ceppi di *E. coli* O157 non produttori di tossine.

Nella Salsiccia è stato registrato il seguente potenziale di crescita: $\delta = 1,60 - 4,73 = - 3,13 \log_{10}$.

Nella Spianata il potenziale di crescita è stato: $\delta = 3,23 - 4,40 = - 1,28 \log_{10}$

Come per altri enterobatteri si dimostra che i 2 prodotti non sono favorevoli alla crescita di *E. coli* O157.

Studio 4

Una ditta toscana di piccole dimensioni, che produce **salumi tradizionali**, ha fornito materiale e conoscenze per le seguenti prove:

A) Salami la cui stufatura è stata effettuata in laboratorio con frigoriferi 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.**

B) Impasto degli stessi salami sul quale è stata sperimentata una nuova **prova in vitro** (challenge test), in buste pre-chiuso nelle quali l'impasto è stato diluito 1:5 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* mediante conteggio in piastra (ISO 11290-2) e della flora lattica con metodo interno a 37° C

Risultati

Si evidenzia che *Listeria monocytogenes* può proliferare solo finché la flora lattica termina la LOG fase.

Studio 5

Salame nostrale toscano Risultato naturalmente contaminato con *Listeria monocytogenes* e *Listeria innocua*, ne è stata studiata l'evoluzione durante la shelf-life mediante il conteggio in piastra (ISO 11290-2) e metodo MPN (USDA: *Laboratory Guidebook. Notice of Change. Most Probable Number and Tables*, 01/28/08) a 14° C e 4° C.

Lo studio è stato articolato in una parte preliminare ed una sperimentale



- a) Acquisizione di notizie relative alla tecnologia di produzione (metodo produttivo, materie prime utilizzate, conservanti, utilizzo di eventuali starter) e della scheda tecnica del prodotto.
- b) Analisi dei dati storici rispetto al criterio in questione (ditta).
- c) Acquisizione di eventuali studi sulla vita commerciale (ditta).

Studio delle caratteristiche del prodotto pronto al consumo (aw, ph, caratterizzazione microflora lattica competitiva, dosaggio acido lattico) su **due lotti** differenti.

Per **valutare l'uniformità della tecnologia di produzione LM è stata contata** in alcuni lotti preparati espressamente dalla ditta per il test; il lotto oggetto dello studio è quello che ha fornito un risultato positivo (LM > 10 ufc/g).

E' stato approfondito lo studio della flora lattica, che è ritenuta **il fattore fondamentale per l'inibizione di LM**, studiandola sia nello studio preliminare al challenge test, sia durante il test sperimentale.

La flora lattica è stata quindi anche caratterizzata.

Prova Sperimentale:

- **numero osservazioni** 9 —→ (da T_0 a T_6 con cadenza settimanale, T_7 dopo 15 gg da T_6 e T_8 a 149 gg dall'immissione in commercio)
- **condizioni di stoccaggio** —→ 16 salami stoccati a 4° C presso il laboratorio, il resto stoccati isolati a 14° C in apposita zona all'interno di una cella di stagionatura della ditta
- **numero uc testate per ogni prova** —→ 5 tranne che a T_0 (10 uc) e T_8 (11 uc) per i salami stoccati a 14° C , 2 per i salami stoccati a 4° C .
- **metodo analisi utilizzato per numerazione *Listeria spp*** —→ MPN USDA (sensibilità 0.03 mpn/g), mpn metodo interno (sensibilità 0.3 mpn/g), ISO 11290-1 (sensibilità 10 ufc/g)
- **totale uc esaminate** —→ 72

Ad ogni osservazione valutati inoltre:

- aw
- ph
- flora lattica competitiva

Al tempo zero e al tempo finale è stata ricercata anche *Salmonella*, risultata sempre assente.

RISULTATI STUDIO SPERIMENTALE

➡ Lo studio effettuato ha dimostrato una sostanziale uniformità nel processo produttivo.

aw: tra 0.934 e 0.946 (mediana 0.941)

ph: tra 5.22 e 5.46 (mediana 5.37).

Acido lattico: tra 8300 ppm e 11800 ppm (mediana 9900 ppm)

➡ La microflora lattica competitiva si è mantenuta ad livelli alti per tutto il periodo di osservazione ed è

risultata composta da:

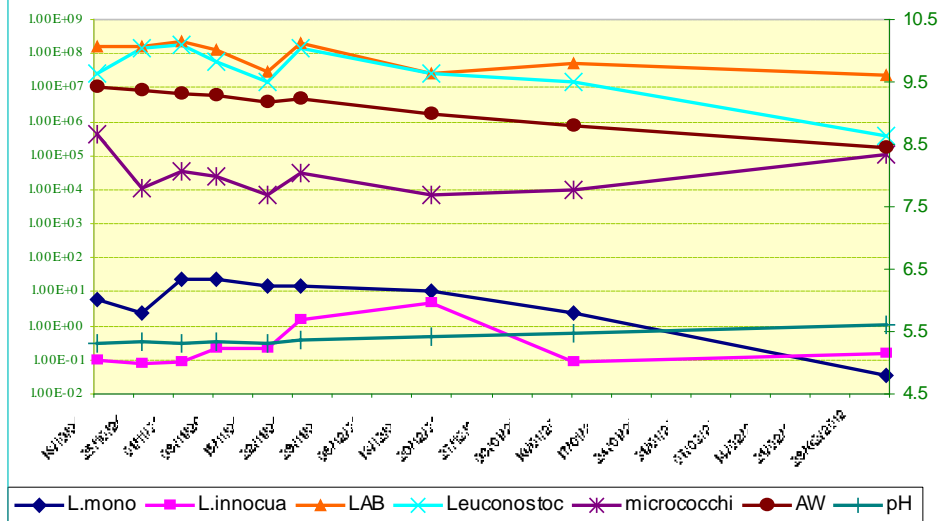
- **Lattobacilli:** 4.7×10^7 ufc/g - 2.8×10^8 ufc/g.
(*L. plantarum* 1, *L. plantarum* 2, *L. paracasei* sub *paracasei* 1, *L. paracasei* sub *paracasei* 2, *L. paracasei* sub *paracasei* 3, *L. salivarius*).
Sono in corso prove per verificare l'eventuale produzione di batteriocine da parte di questi batteri.
- **Leuconostoc:** 1.5×10^7 ufc/g - 3.3×10^7 ufc/g.
(*L. mesenteroides* sub *dextranicum* e *L. mesenteroides* sub *dextranicum*/mesenteroides)
- **Micrococcacee:** 6.7×10^3 ufc/g - 4.2×10^6 ufc/g.
(*Staphylococcus xilosus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus auricularis*)
- **Enterococchi:** 7×10^4 ufc/g - 8×10^6 ufc/g. Isolati (*E. faecalis* ed *E. faecium*)

➡ Nel corso della prova effettuata, nessuna delle unità testate sia a 14° C che a 4° C ha superato il valore limite di 100 ufc/g ed i livelli di *Listeria monocytogenes* hanno mostrato un decremento soprattutto nei prodotti mantenuti a 14° .

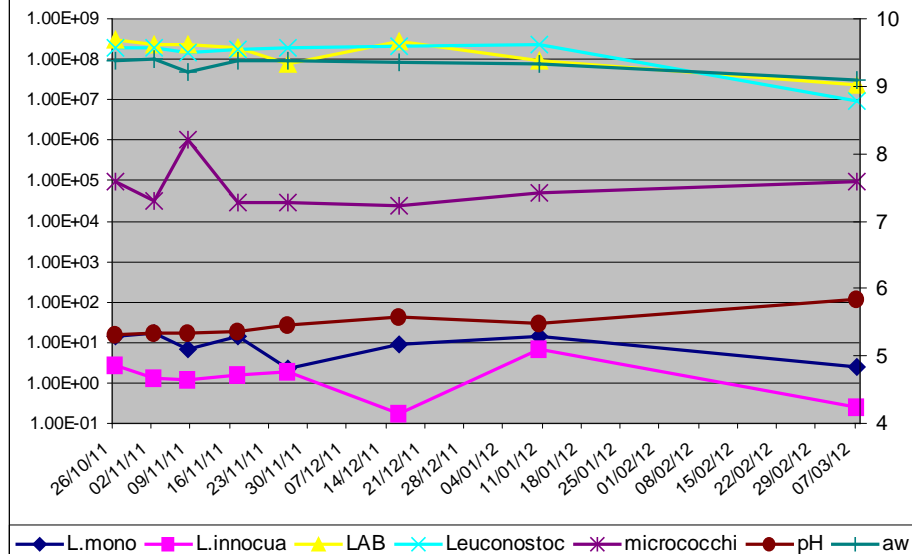
Tale decremento è riconducibile alla costante diminuzione dell'aw

Mantenendo gli stessi standard di produzione possiamo definire quindi, il prodotto "Salame nostrale" oggetto di studio, come **NON favorevole alla crescita di *Listeria monocytogenes*.**

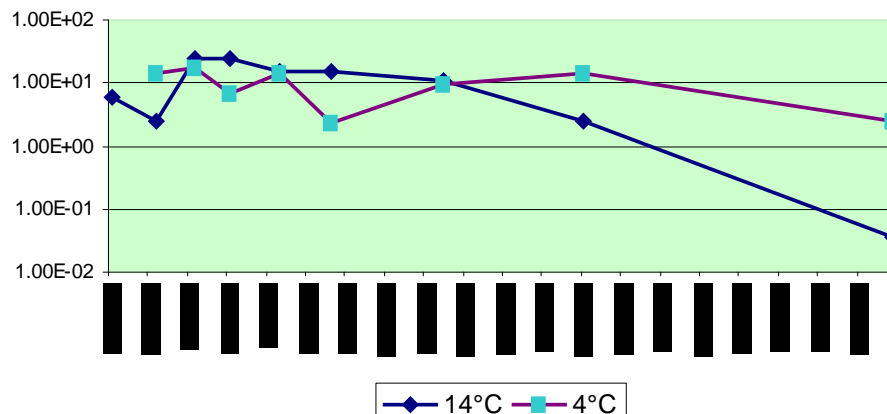
Studio 5. Andamento *Listeria salame nostrale* a 14°C



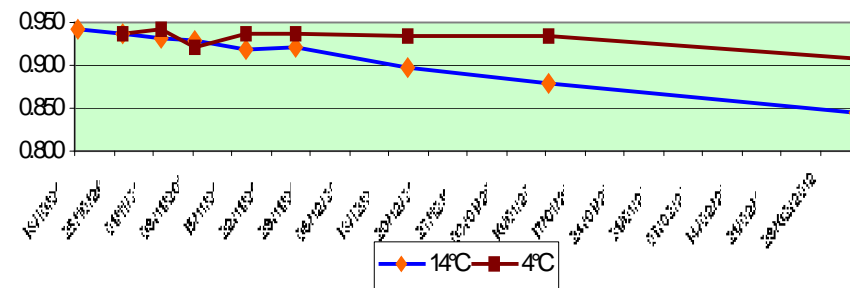
Studio 5. Andamento *Listeria salame nostrale* a 4°C



Studio 5. Salame nostrale: *L. monocytogenes* 14°C vs 4°C



Studio 5. Salame nostrale: aw 14°C vs 4°C



Studio 6

Challenge test **Formaggio pecorino a latte crudo.**

Sono stati contaminati 3 diversi lotti con 7 ceppi di *Listeria monocytogenes* ed è stata seguita l'evoluzione in fase di preparazione (stufatura) e di conservazione, in condizioni naturali di processo, mediante conteggio in piastra.

La contaminazione artificiale è stata effettuata presso un caseificio in dismissione, in locali opportunamente sanificati ed esclusivamente adibiti alla prova sperimentale. Il test è stato effettuato seguendo in parte le linee guida AFSSA.

Tutti e tre i lotti risultano sostanzialmente uniformi nel processo produttivo

Lotto 1

aw: da 0.976 a 0.966 (valore medio)

ph: da 6.66 a 4.98 (valore medio)

Batteri lattici: da 3.5×10^4 ufc/g (T_0) ad un valore di 4.2×10^8 ufc/g (mediana) -fase stazionaria-

Listeria monocytogenes: da 7.9×10^3 ufc/g (mediana) (T_0) a 1.4×10^4 ufc/g (T_7) (mediana).

Quindi *L. monocytogenes* non si moltiplica durante il periodo di osservazione di 240h.

Lotto 2

aw: da 0.976 a 0.966

ph: da 6.58 a 5.10

Batteri lattici: da un valore iniziale di 1.3×10^5 ufc/g (T_0) ad un valore di 2.3×10^8 ufc/g (mediana) da T_3 a T_{10} .

Listeria monocytogenes: da un valore di 4.2×10^5 ufc/g (mediana) (T_0) ad un valore (mediana) di 1.1×10^6 ufc/g (T_2), in una prima fase iniziale (8h) che rimane costante fino a T_9 (499h) per tutto il periodo di osservazione, con un valore finale di 3.9×10^5 ufc/g (mediana) al T_{10} (1171h).

Lotto 3

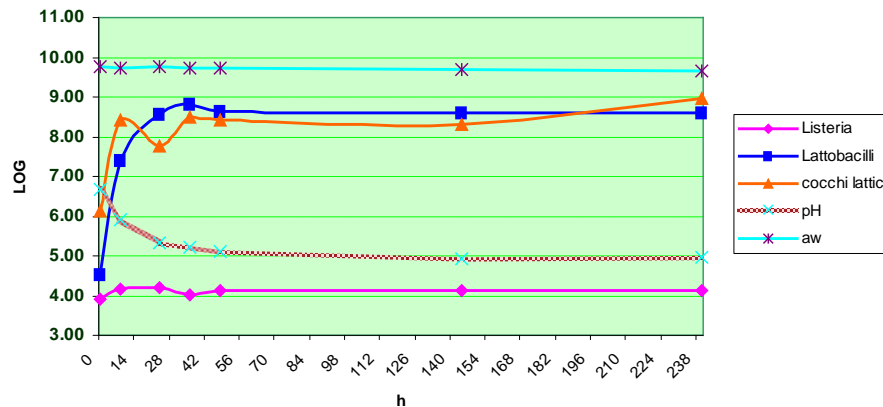
aw: da 0.974 a 0.963

ph: da 6.59 a 5.09

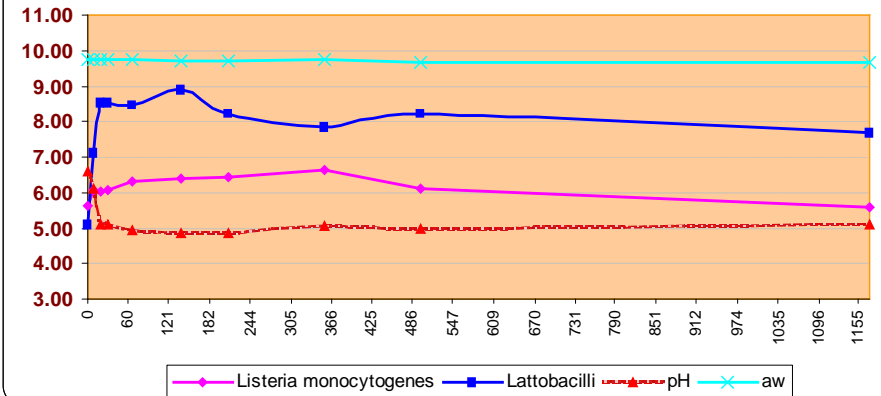
Batteri lattici: da un valore iniziale di 6.2×10^4 ufc/g (T_0) ad un valore di 1.9×10^8 ufc/g (mediana) più o meno costante da T_3 a T_{10} .

Listeria monocytogenes: da 2.7×10^5 ufc/g (T_0) ad un valore di 1.8×10^6 ufc/g (T_2), in una prima fase iniziale (8h) che rimane costante fino a T_9 (499h), con un valore finale di 1.9×10^5 ufc/g al T_{10} (1171h).

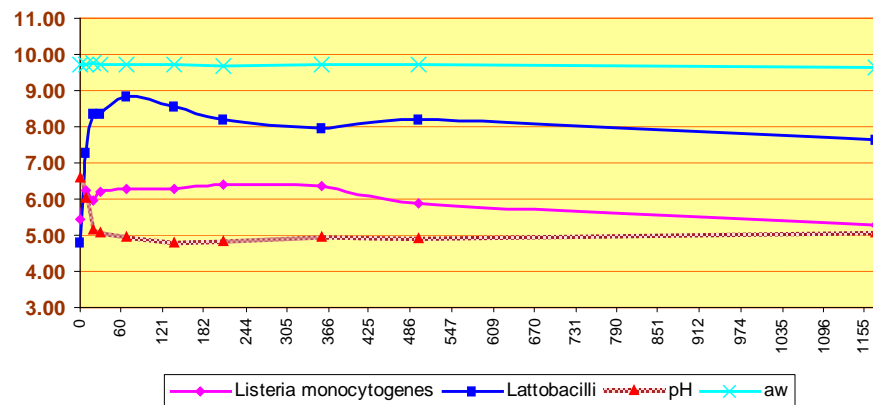
Studio 6: Pecorino a latte crudo.
1° lotto. Listeria e batteri lattici



Studio 6: Pecorino a latte crudo
2° lotto. L. monocytogenes e batteri lattici



Studio 6: Pecorino a latte crudo
3° lotto. L. monocytogenes e batteri lattici



Conclusioni

Nei tre lotti della sperimentazione, nonostante una fase iniziale di crescita, il patogeno *Listeria monocytogenes*, non si moltiplica durante tutta la sua shelf-life.

Il processo produttivo associato ad una bassissima contaminazione con *Listeria monocytogenes*, rende questo prodotto particolarmente sicuro per il consumatore.

Studio 7

Challenge test su salame tradizionale toscano prodotto da un piccolo salumificio locale.

L'impasto pronto per l'insacco è stato contaminato con 5 ceppi di *Salmonella* ed è stata seguita l'evoluzione sia durante la preparazione (stufatura), che durante la conservazione, nelle condizioni naturali di processo, mediante conteggio in piastra.

Il prodotto non risulta favorevole alla crescita di salmonella.

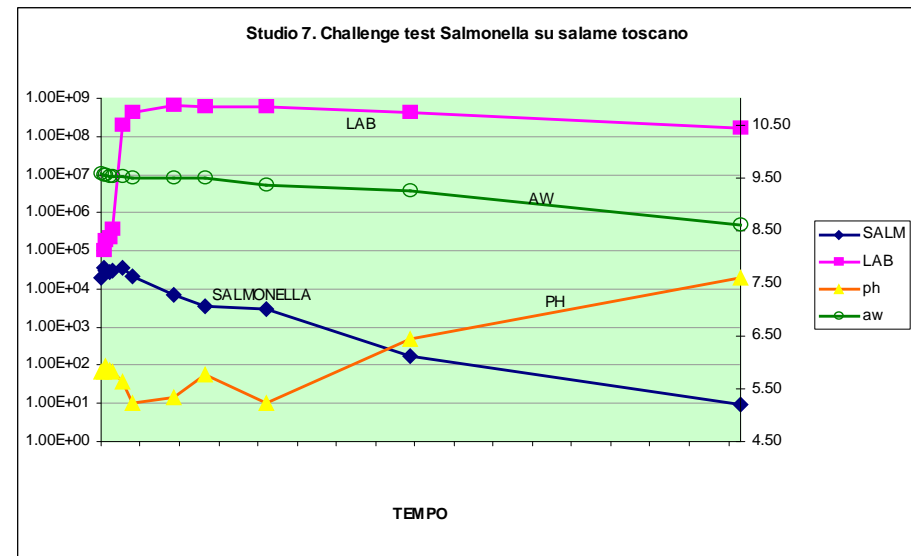


Risultati

Si è osservato un costante e progressivo decremento dei livelli di *Salmonella*:

Da $4.4 \cdot 10^4$ ufc/g si è arrivati in 30 giorni a 10^2 ufc/g ed in 60 giorni ad un livello inferiore al limite di rilevanza del metodo utilizzato (10 ufc/g).

Tale decremento, soprattutto nei primi 30 giorni (visti i livelli di aw e pH), è da imputarsi alla flora lattica mesofila, che si rivela essere un fattore limitante essenziale alla proliferazione del patogeno.



UO 2

Sono stati studiati i **dati di prevalenza sui patogeni con valutazione statistica.**

UO 6

Studio di caratterizzazione delle più frequenti deroghe concesse per i PAT e identificazione dei pericoli igienico sanitari associati.

Proposta di Manuale di Corretta Prassi Igienica per lavorazione di Formaggi tradizionali

UO 7

E' stato studiato **l'effetto di oli essenziali sia in vitro che su formaggio.**, confermando l'effetto inibente in vitro.

S. aureus nel formaggio tende a rimanere numericamente stabile.

Conclusioni

I principali prodotti tradizionali (salame, formaggi a latte crudo e mozzarella) si sono dimostrati a **bassissimo rischio** per germi patogeni, sia consultando la bibliografia internazionale, sia effettuando prove sperimentali.

In seguito ai risultati della ricerca è stato fornito alla Regione Toscana, nel 2011, un **indirizzo per la stesura del piano triennale 2012-2014 di controllo degli alimenti**.

Inoltre è stato effettuato uno **studio di caratterizzazione delle più frequenti deroghe concesse per i PAT (Prodotti Agroalimentari Tradizionali) e identificazione dei pericoli igienico sanitari associati** e preparata una **proposta di Manuale di Corretta Prassi Igienica per lavorazione di formaggi tradizionali**.

WP4 = Divulgazione risultati, documenti, corsi

TESI

Sono state elaborate e discusse 2 tesi di laurea magistrale nel 2011 (STPA – Facoltà di Veterinaria di Pisa) ed un Project work

(1) - Valutazione dell'igiene degli alimenti attraverso nuove discipline inerenti la microbiologia

(2) - La verifica dei criteri microbiologici di sicurezza alimentare per Listeria monocytogenes: applicazione di “challenge test” su mozzarella.

Laurea triennale:

-Alterazioni delle colorazioni e prevalenza dello Pseudomonas fluorescens nelle mozzarelle

CONVEGNO

Il lavoro relativo alla tesi (1) è stato presentato a Bologna il 31 maggio 2011 alla XVIII conferenza nazionale “La sicurezza microbiologica nelle produzioni di alimenti per il 21° secolo: Il deterioramento microbico di alimenti e bevande: interventi di prevenzione, sorveglianza e controllo, (**ha ricevuto il premio**) col titolo:

Pseudomonas fluorescens: il challenge test come coach per il microbiologo alimentare

R. Fischetti, I. Fabbri, F. Campeis, F. Novello, R. Bozzi Colonna*, C. Pace*, C. Milioni, L. Gasperetti, R. Forletta*

3 CORSI ECM

Valutazione critica dei risultati delle analisi microbiologiche sugli alimenti: interazione tra laboratori di analisi, produttori e autorità sanitaria.

(2 Ed. a Pisa nel 2011 e 1 a Roma nel 2012)

Grazie per l'attenzione