



Istituto Zooprofilattico Sperimentale  
delle Regioni Lazio e Toscana

Pisa, 9 aprile 2013

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

## STUDIO DI DIVERSI METODI DI VALUTAZIONE DELLA SHELF-LIFE

*Francesca Campeis*

Istituto Zooprofilattico delle

Regioni Lazio e Toscana, Sezione di Pisa



REGOLAMENTO (CE) n. 2073/2005 DELLA COMMISSIONE

del 15 novembre 2005

sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari

Articolo 3

Prescrizioni generali

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.

Gli operatori del settore alimentare possono condurre gli studi suddetti in collaborazione tra loro.

Studi applicabili:

➤ MICROBIOLOGIA PREDITTIVA

modelli matematici predittivi stabiliti per il prodotto alimentare in esame, utilizzando fattori critici di sviluppo o di sopravvivenza per i microrganismi in questione presenti nel prodotto.

➤ CHALLENGE TEST

prove per determinare la capacità dei microrganismi in questione, debitamente inoculati, di svilupparsi o sopravvivere nel prodotto in diverse condizioni di conservazione ragionevolmente prevedibili.

➤ DURABILITY STUDIES

studi per valutare lo sviluppo o la sopravvivenza dei microrganismi in questione che possono essere presenti nel prodotto durante il periodo di conservazione, in condizioni ragionevolmente prevedibili di distribuzione, conservazione e uso.

EN

SANCO/1628/2008 ver. 9.3 (26112008)



COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES

Brussels,  
C(2008)

COMMISSION STAFF WORKING DOCUMENT

GUIDANCE DOCUMENT

on *Listeria monocytogenes* shelf-life studies for ready-to-eat foods, under Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs



AGENCE FRANÇAISE  
DE SÉCURITÉ SANITAIRE  
DES ALIMENTS



EU COMMUNITY REFERENCE LABORATORY FOR  
*LISTERIA MONOCYTOGENES*

**WORKING DOCUMENT**

Version 2 – November 2008

**TECHNICAL GUIDANCE DOCUMENT**

**On shelf-life studies for *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods**

**Annie BEAUFORT, Marie CORNU, Hélène BERGIS, Anne-Laure LARDEUX, Unit Quantitative**



# DURABILITY STUDY

*Come si effettua uno  
studio di durability ?*

## Durability study

Uno studio di durability permette la valutazione della crescita di *Listeria monocytogenes* in matrici naturalmente contaminate (test più realistico).

Il test consiste nell'analizzare, alla fine della shelf-life, un determinato numero di unità campionarie del prodotto scelte in modo casuale e conservate in condizioni simili a quelle della distribuzione, per quantificare i livelli di *L. monocytogenes* e verificare se e quante unità superano il limite di 100 UFC/g.

*Quali sono i punti critici ?*



### Punti critici:

- Eterogenea distribuzione di *L. monocytogenes* nel campione (necessità di una buona omogeneità della matrice).
- Quando il numero iniziale di *L. monocytogenes* naturalmente presente è molto basso si ha di conseguenza una bassa probabilità di trovare un'unità contaminata.



EN

SANCO/1628/2008 ver. 6 (23092008)

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES

Brussels,  
C(2008)

WORKING DOCUMENT

Draft

GUIDANCE DOCUMENT

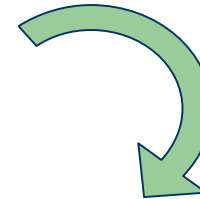
on the shelf-life studies for ready-to-eat foods, under Regulation (EC) No 2073/2005 of  
15 November 2008 on microbiological criteria for foodstuffs

#### 5.4.2. *Durability studies*

##### 5.4.2.1. Interests and limits of durability studies

Durability studies are more realistic than a challenge test, regarding the contamination (strain(s), injury or stress, distribution and initial concentration of *L. monocytogenes*). They are sufficient when *L. monocytogenes* is routinely detected in the tested food at the end of manufacturing (prevalence at least equal to 10%).

## Durability study



Per questo tipo di studi è fondamentale avere una prevalenza di almeno il 10% affinché si riesca ad osservare l'evoluzione del batterio in esame, altrimenti la probabilità di apprezzarla sarebbe troppo bassa.

Quindi per effettuare un durability study è necessario scegliere una matrice che abbia queste caratteristiche...ad esempio salmone per *Listeria monocytogenes*.

## Durability study

Table 6. Example of estimated proportion of units > 100 *L. monocytogenes* / g after storage period

n number of analysed units	r number of units > 100 cfu/g	p estimated proportion	CI Confidence Interval at 95%
20	0	0%	[ 0% – 16% ]
100		0%	[ 0% – 4% ]
20	1	5%	[ 1% – 24% ]
100		1%	[ 0.2% – 5% ]
20	2	10%	[ 3% – 30% ]
100		2%	[ 0.6% – 7% ]

Maggiore è il numero di unità analizzate e più stretto è l'intervallo di confidenza.

*Importanza quindi di analizzare un numero sufficiente di unità campionarie!*

### Il nostro caso:

- Prodotto pronto al consumo conservato in atmosfera protettiva
- Prodotto risultato positivo durante le analisi ufficiali effettuate nel nostro laboratorio



*Quindi naturalmente contaminato con  
L. monocytogenes.*

E' stato deciso di non mettere in commercio le confezioni del lotto risultato positivo, che pertanto sono state utilizzate per l'effettuazione di studi.

## Il nostro studio

Il prodotto risultava adatto per il nostro studio:

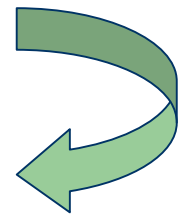
- in base alle modalità di preparazione durante la produzione, è stata considerata buona la omogeneizzazione delle materie prime



*si può considerare la distribuzione di *L. monocytogenes* uniforme*

- dallo storico delle analisi fornite dal produttore e dallo storico delle analisi effettuate presso il nostro laboratorio, il numero massimo e più frequente trovato di UC positive è stato di 2 unità su 5

*quindi una prevalenza per *L. monocytogenes* > 10%*



Dalle analisi ufficiali:

- analisi qualitativa in 25g = 2 UC positive su 5
- analisi di revisione = 1 UC positiva su 5  
(3 unità positive su 10)

Durante la revisione d'analisi (16° giorno di shelf-life) è stato effettuato anche un conteggio MPN a tre provette su un pool delle 5 UC

Risultato: *Listeria monocytogenes* < 0.03 MPN/g

Limite inferiore: 0 MPN/g

Limite superiore: 0.094 MPN/g

Sono stati selezionate e analizzate 40 confezioni

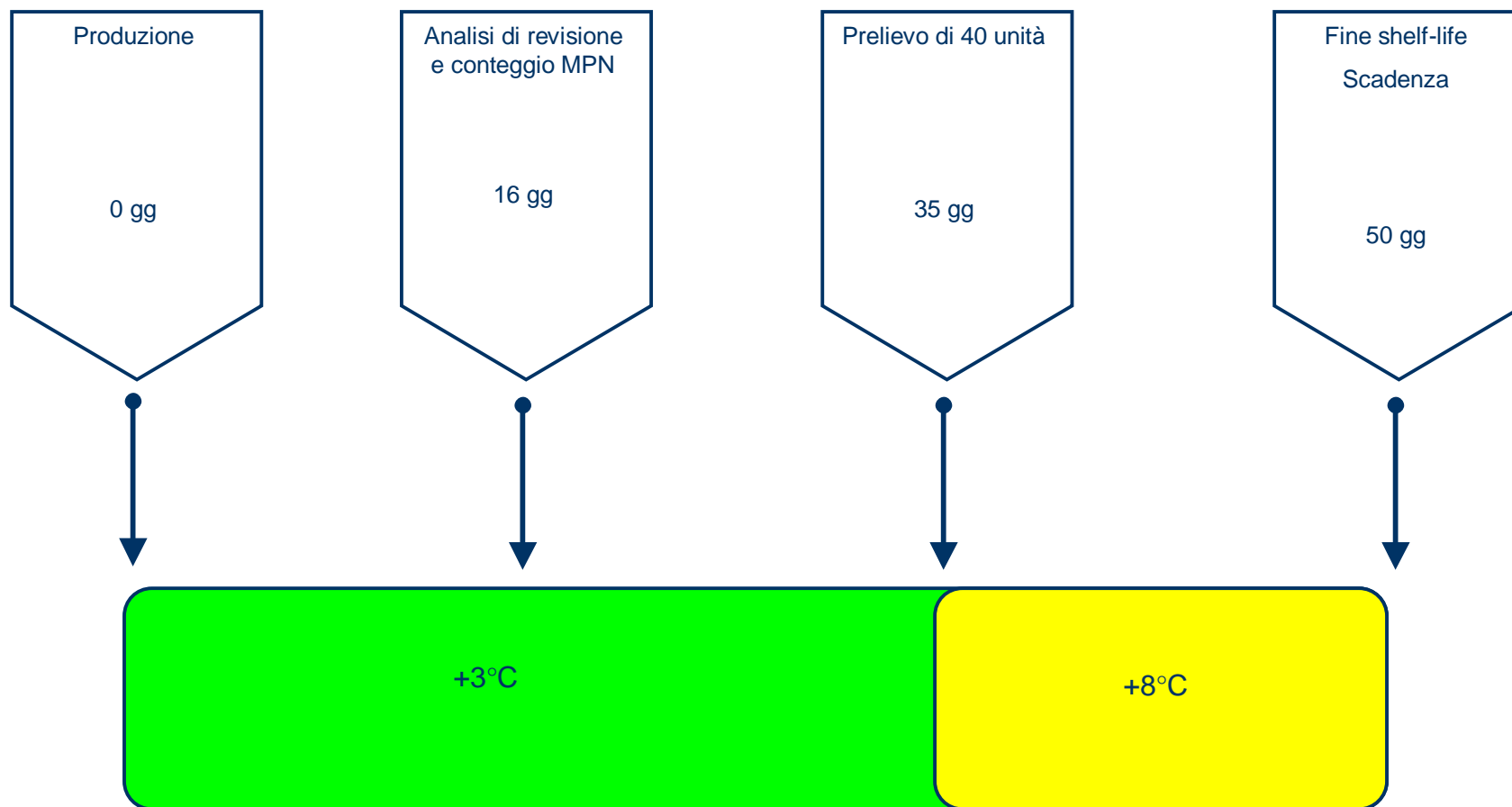
- ❖ Le confezioni sono state numerate con numeri progressivi da 1 a 120 e scelte tramite una funzione di excel che si basa sul principio dell'equiprobabilità (numeri random).
- ❖ Dopo 35 gg sono state scelte le confezioni, portate in laboratorio e stoccate ad una temperatura di 8.0°C, considerata più ragionevole in termini di condizioni di conservazione in fase di distribuzione.
- ❖ Analisi effettuate alla fine della shelf-life:
  - Ricerca qualitativa di *L. monocytogenes* (assenza in 25g)
  - Ricerca quantitativa di *L. monocytogenes* (conteggio su piastra)

## Risultati:

- Tutte le unità campionarie sono risultate  
<10 UFC/g
- Nell'analisi qualitativa sono risultate  
positive 7 unità campionarie su 40.



## Il nostro studio

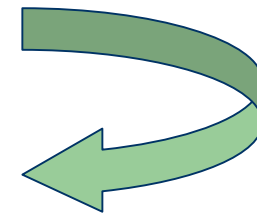


E' stato utilizzato un programma gratuito on-line per effettuare una predizione di crescita microbiologica, per avere una stima dell'andamento della crescita di *L. monocytogenes* nel prodotto durante il corso della shelf-life

Combase predictor

Questo tipo di studi (challenge test, microbiologia predittiva, ...) sono effettuati nelle condizioni più favorevoli alla crescita microbica

Si considerano quindi i risultati ottenuti nelle condizioni dello scenario peggiore.



### Parametri utilizzati per predizione:

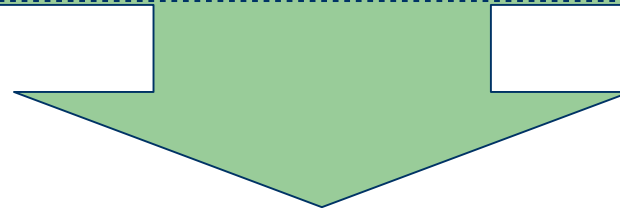
Profilo	Listeria monocytogenes/innocua with CO <sub>2</sub>
% CO <sub>2</sub>	20%
Initial level	-1.03 LOG
Physiological state	1 (senza LAG fase)
Temperature	+3.0°C per 19 gg (456h) +8.0°C per 15 gg (360h)
pH	4.8
AW	0.955

16° giorno di shelf-life **conteggio MPN** a tre provette su un pool delle 5 UC

Risultato: *Listeria monocytogenes* < 0.03 MPN/g

Limite inferiore: 0 MPN/g

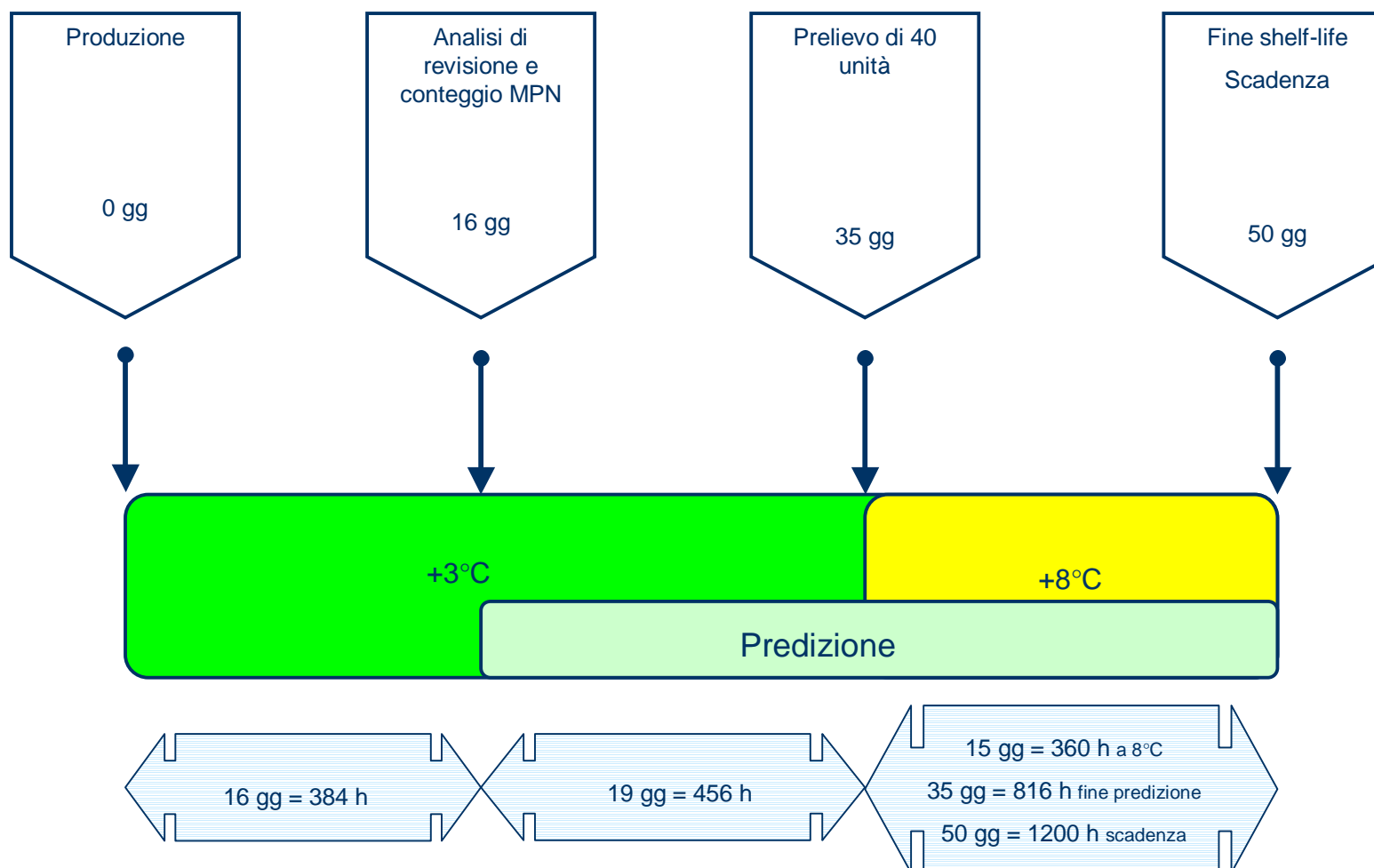
Limite superiore: 0.094 MPN/g



Quindi tramite un foglio di calcolo:

$$0.094 \text{ MPN/g} = -1.03 \text{ LOG}$$

## Il nostro studio



# ComBase Predictor

☒ Growth model

☐ Thermal inactivation model

☐ Non thermal survival model

Temperature input

☐ Static

☒ Changing temperature

Water activity

☐ NaCl

☒ Aw

Observation duration

Time (h)

840

add a row

*Listeria monocytogenes/innocua with CO2(%)*

Initial level <=7	Phys.state [0-1]	T (°C) [1-40]	pH [4.4-7.5]	Aw [0.934-1]	CO2(%) [0-100]	Max.rate (log.conc/h)	Dbl.time (h)
-1.03	1		4.8	0.955	20		

Help

remove last row

Input your temperature profile in the textbox below and click the 'predict' button to generate predictions.  
The temperature inputs must be within the range [1-40]

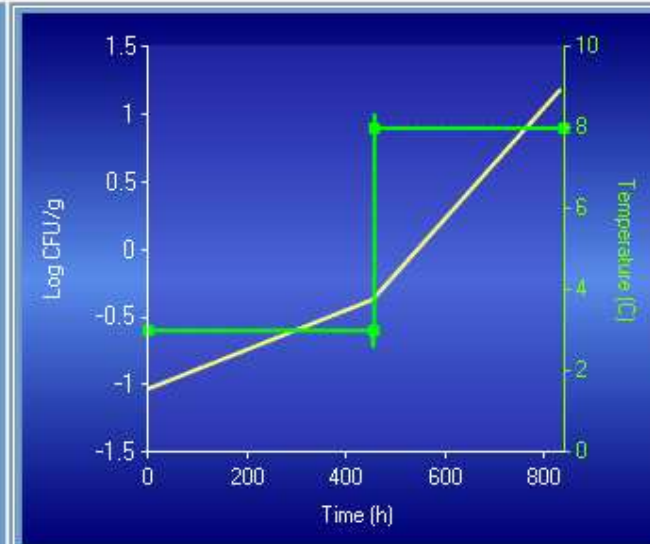
0 3  
456 3  
457 8  
840 8

Show me how!

Predict

Predictions

746.67	8.00	0.83
755.15	8.00	0.87
763.64	8.00	0.90
772.12	8.00	0.94
780.61	8.00	0.97
789.09	8.00	1.01
797.58	8.00	1.04
806.06	8.00	1.08
814.55	8.00	1.11
823.03	8.00	1.15
831.52	8.00	1.18



Alla fine della shelf-life considerata (ossia dopo 34gg = 816h)

si ottiene un valore = 1.15 LOG

che trasformato in UFC equivale a 14.13 listerie

ampiamente sotto il limite di legge.

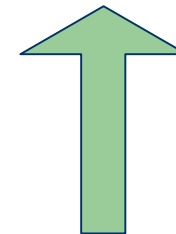
MPN (effettuato al 16° giorno della shelf-life)

Pool di 5 UC :  $< 0.03$  MPN/g

Intervallo di confidenza:

- Limite inferiore = 0 MPN/g
- Limite superiore = 0.094 MPN/g

Predizione = 14.13 UFC/g di Listerie





### Analisi quantitative:

- Risultati: 0 su 40 UC > 100 UFC/g (tutte < 10 UFC/g)

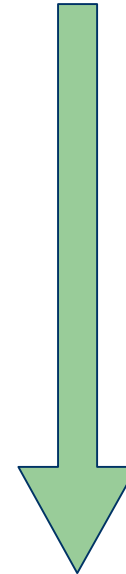
### Intervallo di confidenza:

- Limite inferiore: 0,06%
- Limite superiore: 8,6%

Anche se il test non indica un numero minimo di unità da analizzare, il campione dovrebbe essere rappresentato da un numero maggiore di unità.

### Prove qualitative:

- Analisi ufficiale (16° gg) :  $3/10 = 30\%$
- Fine (50° gg):  $7/40 = 17.5\%$



Statisticamente però non si può parlare di diminuzione perché la differenza non è significativa, ma ci sono i dati per presupporre una diminuzione e quindi l'affrontare il test arricchito dalle analisi qualitative

### Il durability study:

- fornisce unicamente una valutazione di tipo matematico facendo il conteggio di UFC alla fine della shelf-life, senza alcuna valutazione dell'andamento delle listerie durante la conservazione.
- ogni test è specifico per il prodotto in esame e strettamente legato alle condizioni utilizzate.
- il test si può effettuare anche con un numero casuale di campioni provenienti da lotti diversi ma dello stesso processo tecnologico. Quindi applicabile a grandi produzioni standardizzate.
- è necessario che sia eseguito da operatori esperti (valutazione: numerosità campione con prevalenza, omogeneità di distribuzione nella matrice, interpretazione dei risultati).

Differenze tra il nostro studio e uno studio di durability:

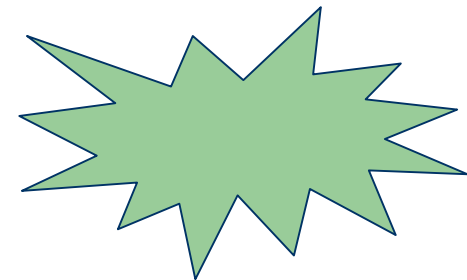
- ✓ temperature di incubazione corrette, in quanto nel nostro studio abbiamo tenuto le confezioni in condizioni di abuso di temperatura come riportato nelle linee guida
- ✓ non è stata effettuata la scelta iniziale casuale delle confezioni (come è stato fatto dopo)
- ✓ il numero di confezioni del prodotto iniziale non è lo stesso di quelle analizzate alla fine della shelf-life

Lo studio simil durability è stato effettuato con le confezioni ritirate dal mercato. La ditta non era interessata ad effettuare un durability study completo.



Importanza della documentazione!!

Ma anche se non esaustivo e preciso  
il nostro studio potrebbe essere  
usato come documentazione di  
supporto nella valutazione del  
prodotto!!



Infatti...

Nel nostro caso le prove qualitative aggiunte che abbiamo effettuato sono state molto utili per dimostrare che il livello di listeria *non tende ad aumentare* durante la shelf-life, contrariamente a quanto si evidenzia con la microbiologia predittiva.

Questo può essere dovuto alla presenza di altre componenti che il programma non prevede, per esempio la presenza di *batteri lattici*.

### → **Sono sufficienti solo le analisi quantitative?**

Secondo le linee guida le prove quantitative sono sufficienti (in quanto i limiti di confidenza sono accettabili, lo consentono).

MA non forniscono indicazioni sull'andamento del patogeno nell'alimento!

### → **Sono sufficienti solo le prove qualitative?**



NO, perché si avrebbe garanzia sulla presenza della *Listeria*. Ma non si potrebbe dire se e quante unità superino il limite (100 UFC/g).

Potrebbero essere associate al test di durability altre prove:

- Prove qualitative iniziali, o MPN, per confermare una sufficiente prevalenza, decidere sulla numerosità del campione ed eventualmente confrontare il numero di positivi iniziali con altrettante analisi effettuate a scadenza.
- Se lo studio viene effettuato su un grande numero di UC, magari per più lotti diversi in momenti diversi allora le analisi qualitative possono non essere necessarie se tutto è negativo!
- Lo studio del prodotto per valutare la sua eterogeneità, ad esempio con il conteggio di una carica presente in abbondanza (carica mesofila o conteggio lattici) su alcune unità per valutare se si ottengono risultati uniformi.



## Conclusioni

- il durability stabilisce se l'alimento supera le 100 UFC/g (1.2 del 2073)  quindi se esito negativo, i controlli successivi si fanno con analisi quantitative e non qualitative nonostante i valori di AW e pH.
- se invece si riesce a dimostrare che la *L. monocytogenes* nel prodotto diminuisce  si può ricategorizzare l'alimento da favorevole a non favorevole alla crescita (1.3 del 2073).

Secondo i parametri chimico-fisici di pH e  $a_w$ , l'alimento in esame viene collocato tra gli alimenti che costituiscono terreno favorevole per la crescita di *L. monocytogenes*.

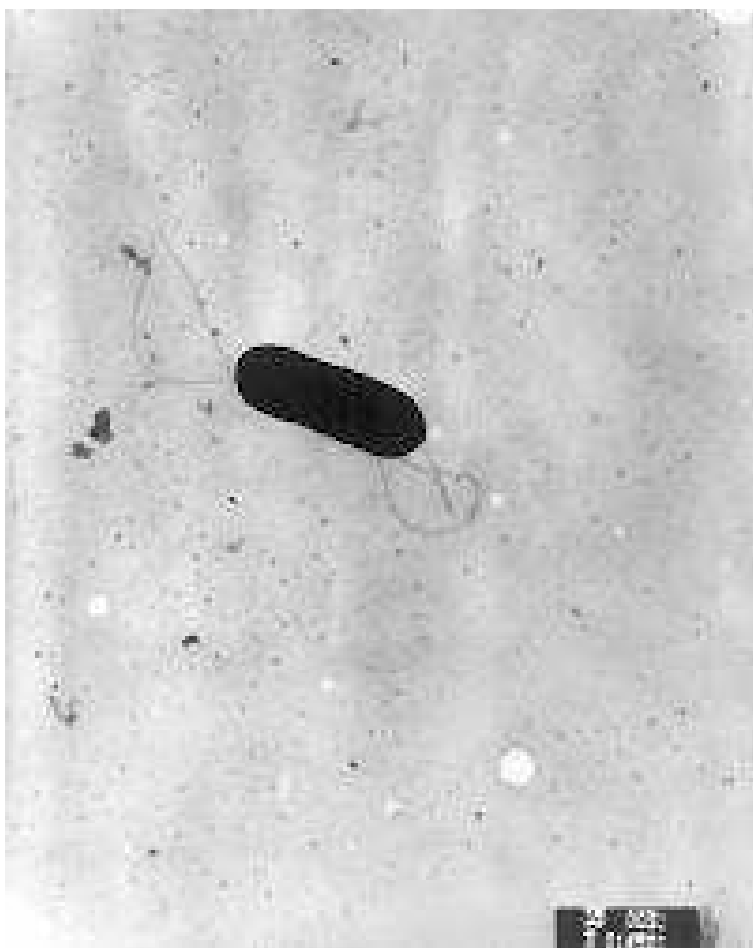
$$\text{pH} = 4.8$$

$$A_w = 0.955$$

## Conclusioni

I test da noi effettuati dimostrano però che *L. monocytogenes* non ha mai superato il limite di 100 UFC/g:

- dalla predizione: abbiamo ottenuto un incremento pari a 2.2 log, ossia l'alimento era da considerarsi favorevole alla crescita e quindi da analizzare con prova qualitativa.
- dopo il nostro test secondo metodo AFSSA: alla fine della shelf-life nessuna UC analizzata supera il limite dei UFC/g e quindi andrebbe analizzato secondo analisi quantitative.
- dal nostro test integrato: alla fine della shelf-life il prodotto non superava i limiti del regolamento e con le analisi qualitative si ipotizza che la listeria presente non tende ad aumentare. In caso di campionamento statisticamente valido l'alimento si potrebbe classificare come non favorevole.



GRAZIE PER  
L'ATTENZIONE!