

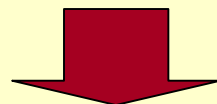


Salmone affumicato e *Listeria monocytogenes*. Presentazione e discussione di casi

Regolamento 2073: Valutazione della documentazione relativa alla shelf-life degli alimenti

Laura Gasperetti - IZSLT Sezione di Pisa 9 Aprile 2013

SALMONE AFFUMICATO



- Alimento **oggettivamente a rischio per *Listeria monocytogenes* (LM)**, perché ne è normalmente contaminato, talvolta anche in quantità superiori ai limiti previsti dal Regolamento 2073/2005 (100 ufc/g).
- I valori di aw e pH e la shelf life lo fanno rientrare nella categoria degli alimenti favorevoli alla crescita per cui LM deve essere assente in 25g; peraltro anche al dettaglio (secondo la circolare del Ministero della Salute del 2007) a meno che il produttore non documenti, in conformità all'allegato II l'art.3 par.2 del Reg. 2073/2005, che LM non supererà 100 ufc/g durante tutta la shelf-life del prodotto

“se necessario, in base agli studi summenzionati, l'OSA effettua ulteriori studi, che possono comprendere:

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

Gli studi summenzionati tengono conto della variabilità intrinseca in funzione del prodotto, dei microrganismi in questione e delle condizioni di lavorazione e conservazione”

Importanza della documentazione.....

Il salmone affumicato è al momento l'unico prodotto
per il quale sono stati presentati
all'Autorità Competente studi ulteriori
per far sì che sia applicabile il limite di 100 ufc/g di LM
(maggiore tolleranza per tale patogeno)

1° CASO a (SFAVOREVOLE)

Si esamina:

A 36 gg dalla scadenza:

- analisi qualitativa (metodo EN/ISO 11290-1): **PRESENTE** in 25 g
 - analisi quantitativa (metodo EN/ISO 11290-2):
 - UC 1 = 60 ufc/g
 - UC 2 = 40 ufc/g
 - UC 3 < 10 ufc/g
 - UC 4 = 10 ufc/g
 - UC 5 = 20 ufc/g
- LM > 10 in 3UC**
a metà shelf life

La ditta importatrice fornisce all'ASL → documentazione per dimostrare che *Listeria monocytogenes* non avrebbe superato le 100 ufc/g nel suo periodo di conservazione (nota (5) al punto 1.2 dell'allegato I del Regolamento 2073/2005).

L'ASL ci invia la documentazione acquisita per una valutazione tecnica.....



Il Laboratorio Alimenti dell'IZS di Pisa all'ASL → visto il livello di *LM* nel prodotto al momento dell'analisi (metà shelf life), effettua una **PREDIZIONE** di **crescita** per *Listeria monocytogenes* per i valori riscontrati sul prodotto al momento dell'analisi ufficiale e sul periodo residuo della sua shelf-life.

Relazione tecnica



Incongruenza tra lo studio presentato e l'esito delle analisi a metà shelf life! Confermando la possibilità di proliferazione (predizione) e attestando che il prodotto non rientrava nei limiti della sperimentazione stessa!



1° CASO b (SFAVOREVOLE)

Il prodotto è stato nuovamente campionato (lotto successivo) e le 9 uc reperite sono state suddivise in 2 aliquote, la prima di 5 uc, da analizzare subito e la seconda di 4 uc, da analizzare alla scadenza.

			UC 1		UC 2		UC 3		UC 4		UC 5	
	giorno della shelf-life	giorni da scadenza	Listeria mono	lattici	Listeria mono	lattici	Listeria mono	lattici	Listeria mono	lattici	Listeria mono	lattici
1° aliq	31°	29	<10	4.2×10^5	110	NON effettuata	10	NON effettuata	<10	NON effettuata	60	NON effettuata
2° aliq	59°	a scadenza	490	9×10^6	<10	3.1×10^8	110	1.1×10^7	40	1.6×10^6	NON effettuata	NON effettuata

Anche in questo caso è stata prodotta una consulenza tecnica dalla quale è scaturita la necessità di porre particolare attenzione su questo prodotto. [Relazione tecnica](#)

Considerazioni:

- Per poter fornire un giudizio sulla sicurezza microbiologica del salmone affumicato confezionato servirebbero dati almeno ad **inizio** e **a fine shelf life**.
- **Effetto dei batteri lattici sull'evoluzione di LM:** la flora lattica presente nel Salmone affumicato ha un effetto inibente sulla crescita di LM quando si trova nella fase stazionaria di crescita (quindi ad alti livelli $>10^8$ ufc/g). Più sono numerosi i lattobacilli all'inizio della vita del prodotto, prima si raggiunge la loro fase stazionaria e prima viene bloccata la crescita di *Listeria monocytogenes*.
- **La prolungata shelf-life** (60 giorni), nonostante la temperatura di conservazione indicata in etichetta (0-4 °C) ➡ un **fattore critico** per la matrice in oggetto, perchè LM può proliferare anche se le temperature di conservazione, al dettaglio e al consumatore, rispettano quanto indicato in etichetta dal produttore, 4°C.

➡ è opportuna un'adeguata valutazione del rischio
per questo prodotto !

2°CASO (Predizione - FAVOREVOLE)

Salmon affumicato risultato positivo per la ricerca di *L.monocytogenes*:

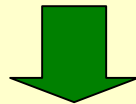
- analisi qualitativa (metodo EN/ISO 11290-1): PRESENTE in 25 g
- analisi quantitativa (metodo EN/ISO 11290-2): < 10 ufc/g
(analisi quantitativa (metodo interno MPN): 0.23 mpn/g)

- a) Il produttore all'ASL ➡ documentazione per dimostrare che *LM* non avrebbe superato le 100 ufc/g nel suo periodo di conservazione (nota (5) al punto 1.2 dell'allegato I del Regolamento 2073/2005).



E' stato presentato uno studio dove sono stati analizzati 3 lotti del solito prodotto **a inizio** e **a fine shelf life** e *LM* è risultata sempre <10 ufc/g; quindi viene dichiarato che in base ai risultati **si può garantire** che **a fine shelf life** del prodotto **non sarà superato il limite dell 100 ufc/g**.

Sottoscritta e approvata dal Ministero della Nazione di provenienza.



- b) Il Laboratorio Alimenti dell'IZS di Pisa all'ASL ➡ **PREDIZIONE** di crescita per *Listeria monocytogenes* per i valori riscontrati sul prodotto al momento dell'analisi ufficiale e sul periodo residuo della sua shelf-life.

PREDIZIONE di crescita per *Listeria monocytogenes*:

- ✓ Periodo residuo della shelf-life dell'alimento → 25 gg su 60 gg di shelf-life totale
- ✓ Valore iniziale ottenuto da un conteggio con metodo MPN (più accurato del conteggio in piastra previsto) → 0.23 mpn/g (Lim. Sup. 0.94 mpn/g)
- ✓ Condizioni della predizione → **“SCENARIO PEGGIORE”**
(più favorevole alla crescita di *LM*)
 - N° listerie iniziali = 0.94 mpn/g (arrotondato ad 1)
 - Batteri lattici (flora competitiva) = 100 ufc/g (inf. al presunto valore reale dopo 35gg)
 - Temperatura di conservazione = 4°C
 - NaCl in fase acquosa = 4.76
 - pH = 5.78
 - * Acido lattico in fase acquosa = 8.499 * Componenti fumo = 5
 - * CO₂ % nello spazio di testa = 0
 - * Diacetato in fase acquosa = 0
 - Lag Fase = 0 gg Periodo di conservazione (residuo) 25 gg

*(dati forniti dalla ditta produttrice)

PREDIZIONE di crescita con: Seafood Spoilage and Safety Predictor (SSSP) software v.3.1



Risultato della predizione:

Il valore di listeria si ricava con un semplice calcolo a partire dal $\mu_{max} \cdot h$ (0.0019) ottenuto col programma SSSP che corrisponde a **3.13 listerie** che è **ampiamente inferiore al limite di 100 ufc/g stabilito dal Regolamento 2073/2005**.

Secondo la predizione il prodotto al termine della sua shelf- life non raggiunge mai il limite previsto. ➡ **In conformità con quanto dichiarato dal produttore.**

* μ_{max} è il tasso di crescita massimo

* $\mu_{max} = \ln(n^\circ \text{cellule})/t$



3°CASO (Challenge δ - FAVOREVOLE)

Si esamina:

pH = 5.92



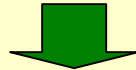
aw = 0.969

Favorevole alla crescita di LM

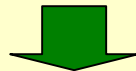
LM - **PRESENTE** in 4 su 5 UC a 31g dalla scadenza (metà shelf-life)

- < 10 ufc/g su 5 UC

Batteri lattici sulle 5 UC con valori da 4.3×10^4 a 1.6×10^5 ufc/g



Si comunica la *possibile non conformità* del campione alla ASL che a sua volta chiede alla Ditta la *eventuale documentazione* relativa al prodotto analizzato.



Si valuta: La ASL invia al nostro laboratorio la **documentazione** fornita dalla ditta produttrice già approvata dagli Ispettori Veterinari della nazione di provenienza, per una **valutazione tecnica**.

La documentazione presentata dalla Ditta produttrice consiste nella presentazione di un **challenge test** condotto attraverso il calcolo del δ (delta) ovvero del “**tasso di crescita potenziale**” di *LM* per tale prodotto, in base al Documento SANCO (Par. 3.5.3) e seguendo le linee guida AFSSA (par.2.2)



Documento Sanco1628/2008 ver. 9.3 Guidance document on Listeria monocytogenes shelf-life studies for ready-to-eat foods, under Regulation (EC) n°20732005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs.

Microbiological challenge tests assessing **growth potential** (δ) allow:



Classification of foods into “**RTE foods able to support the growth of *L. monocytogenes*** other than those intended for infants and for special medical purposes” or “**RTE foods unable to support the growth of *L. monocytogenes*** other than those intended for infants and for special medical purposes”



Quantification of the behaviour of *L.monocytogenes* in a food according to defined reasonably foreseeable conditions between production and consumption (i.e. **calculating the concentration at the end of the shelf-life from the initial concentration, or determining the concentration at the beginning of the shelf-life in order to comply with the limit of 100 cfu/g at the end of the shelf-life).**

Il δ tasso di crescita potenziale” si calcola come differenza tra la mediana della concentrazione di *LM* a fine shelf life e la mediana della concentrazione a inizio shelf life. (log10 cfu/g)

Si effettuano 3 misurazione per ogni lotto e il test si effettua su 3 lotti

Growth potential (d) = maximum of the differences



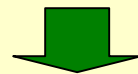
Se δ è inferiore o uguale a 0.5 (log10), si assume che l'alimento non supporti la crescita di *L. monocytogenes*.



Se δ è superiore a 0.5 (log10), si assume che l'alimento supporti la crescita di *L. monocytogenes*.

CONCLUSIONE

Valutazione favorevole della documentazione presentata



Il nostro campione, accettando (ASL) la documentazione presentata (dove era stato ottenuto un δ inferiore a 0.5), risulta **non favorevole alla crescita di *LM***, quindi applicando il limite di 100 ufc/g, **è stato considerato conforme** in quanto all'analisi quantitativa aveva dato un valore < 10 ufc/g in tutte le 5 UC.

4°CASO (Documentazione Discutibile!)

Si esamina:

(pH e aw *NON RICHIESTI!*)

- LM*
- **PRESENTE** in 2 su 5 **UC** a 23g dalla scadenza (metà shelf-life)
 - **< 10 ufc/g** su 5 **UC**

Batteri lattici sulle 5 UC con valori da **10** a c.ca **10² ufc/g**



Si comunica la *possibile non conformità* del campione alla **ASL** che a sua volta chiede alla Ditta la *eventuale documentazione* relativa al prodotto analizzato.



Si valuta: la **documentazione** inviata dalla **ASL** al nostro Laboratorio, fornita dalla ditta produttrice per una **valutazione tecnica**.

La documentazione riporta uno studio di shelf life effettuato a 5°C su 15 unità dello stesso lotto:

Tempo analisi	LM P/A	Flora lattica	LM (ufc/g)
T0	2/5	NE	<10 ufc/g
T(45gg)	0/5	NE	<10 ufc/g
T(55gg)	1/5	NE	<10 ufc/g

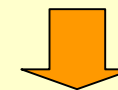


Come interpretare il tipo di test effettuato dalla ditta in questione?

Tra i documenti europei, il test che più si avvicinava al test presentato nella documentazione è il “Durability” (Linee guida AFSSA par.4) che prevedrebbe però un conteggio finale di LM su un numero di confezioni scelte secondo il metodo dei “random numbers” (4.1. linee guida AFSSA) in fase di produzione, incubate possibilmente a temperature variabili tra 8 e 12°C .



Contare le confezioni risultate superiori a 100 ufc/g rispetto al totale delle esaminate.



Valutare attraverso il calcolo dei limiti di confidenza.

Quindi in conclusione: dei dati presentati nella documentazione sono stati considerati solo i risultati di quantificazione di *LM*, quindi i **5 risultati** (**< 10 ufc/g**) ottenuti **a fine shelf life** dallo studio e con un programma disponibile su internet sono stati calcolati i limiti di confidenza.

Enter

- # Successes, k (an integer ≥ 0)
- # Examined, N (an integer > 0)
- Confidence (a.k.a. "degree of belief"), $1 - X$, where $0 < X < 1$ [default confidence is 0.95 -- i.e., a 95-percent confidence interval]

Click Compute. Any previous results will be immediately erased. When th

Calculator:

# Successes =	<input type="text" value="0"/>	Proportion =	<input type="text" value="0"/>
# Examined =	<input type="text" value="5"/>		
Confidence = <input type="text" value="0.95"/>			
<input type="button" value="Reset"/> <input type="button" value="Compute"/>			

Central Confidence Interval:

Lower limit = Upper limit =

L'esiguo numero di analisi (5) effettuate crea limiti di confidenza ampi.

Il risultato infatti per 5 conteggi effettuati (examined), pur con 0 non conformi (successes) fornisce un limite di confidenza superiore al 95% = 0,46

quindi con la probabilità di avere il 46% di campioni non conformi.

Enter

- # Successes, k (an integer ≥ 0)
- # Examined, N (an integer > 0)
- Confidence (a.k.a. "degree of belief"), $1 - X$, where $0 < X < 1$ [default confidence is 0.95 -- i.e., a 95-percent confidence interval]

Click Compute. Any previous results will be immediately erased. When th

Calculator:

# Successes =	<input type="text" value="2"/>	Proportion =	<input type="text" value="0.02"/>
# Examined =	<input type="text" value="100"/>		
Confidence = <input type="text" value="0.95"/>			
<input type="button" value="Reset"/> <input type="button" value="Compute"/>			

Central Confidence Interval:

Lower limit = Upper limit =

Esempio con 100 campioni e 2 positivi

6,7% di campioni non conformi

Sicuramente un numero esiguo di dati non dà molte garanzie su quanto dichiarato; tuttavia non vi sono norme che indichino quanti campioni sono sufficienti per poter fare affermazioni certe!

6°CASO (FAVOREVOLE)

Contestualmente al campione, dove vengono inizialmente richieste le seguenti analisi: pH, aw e *Listeria monocytogenes*, l'ASL ci invia la documentazione della ditta produttrice, che già conosciamo (caso 3), in quanto il prodotto è già stato analizzato in altre occasioni.



Inviando subito il nostro **parere tecnico** (favorevole) all'ASL
➡ accetta la documentazione e rettifica la richiesta analitica nella sola **quantificazione di LM**, oltre ai Batteri lattici mesofili.

LM < 10 ufc/g su 5 UC

Batteri lattici mesofili <10 ufc/g sulle 5 UC

CONCLUSIONI

- Il problema relativo al salmone affumicato è complesso e non basta un solo sistema di valutazione.
- Sebbene non siano molte le documentazioni presentate in poco più di 3 anni, abbiamo riscontrato una discreta variabilità nelle tipologie di studio presentate, quindi nell'approccio al problema *LM* per il prodotto "salmone affumicato".
- La valutazione deve essere fatta ancora caso per caso, fino ad avere dati sufficienti.....per poter fare considerazioni e valutazioni affidabili; inoltre le documentazioni sebbene ultimamente siano sempre più precise e riferibili ai documenti europei, devono comunque sempre essere attentamente valutate da personale esperto.

**Grazie a tutti i colleghi del Laboratorio
Alimenti e a tutti voi per l'attenzione!**