

*Corso ecm: Regolamento 2073: valutazione della  
documentazione relativa alla shelf-life degli alimenti  
presentata dalle ditte  
Pisa, 9 aprile 2013*

# Shelf life: fattori di controllo microbico, microbiologia predittiva, challenge test



Dr Roberto Fischetti - Istituto Zooprofilattico  
Lazio e Toscana – Sezione di



## La durata del prodotto

### 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 durata del prodotto

## Shelf-life

### SITUAZIONE ATTUALE

Sviluppo di nuovi prodotti . LE RAGIONI:

- concorrenza commerciale
- esigenza di prodotti con trattamenti sempre più blandi



Necessità di definire la durata del prodotto con metodi non più empirici:

definiti metodi specifici e complessi (analisi dati, microbiologia predittiva, challenge test).

*Le conoscenze devono essere estese a tutti gli attori, dalla produzione alla vigilanza , anche se a livelli di approfondimento diversi.*

E' necessario perciò precisare gli aspetti principali della microbiologia che fanno parte del bagaglio necessario per lo studio della durata microbiologica degli alimenti.

Affrontiamo quindi specificamente i principali fattori di contenimento della proliferazione microbica.

# Principali fattori agenti sul “controllo” dei microrganismi

## ☐ TEMPO e fattori legati:

- ☐ Temperatura
- ☐  $A_w$
- ☐ pH
- ☐ Flora lattica
- ☐ Agenti conservanti
- ☐ Atmosfera di confezionamento

➤ Stato fisico

➤ Modalità di preparazione

# Modalità di preparazione

Lavaggio

Manipolazione

Cottura

## Stato fisico

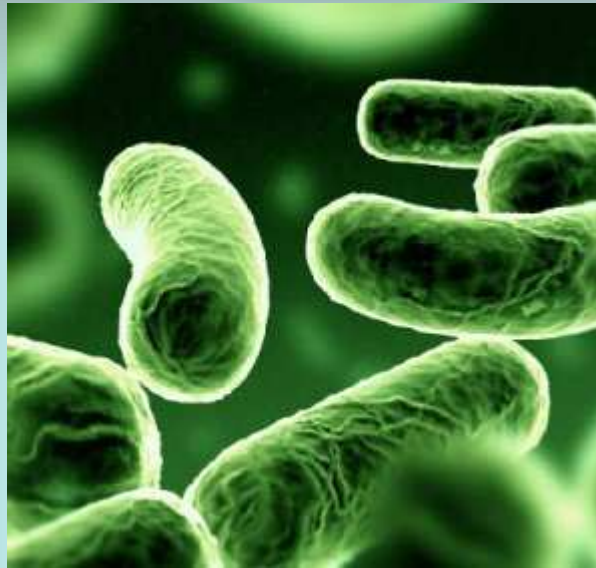
Macinatura rispetto a pezzo intero

Tipo macinatura



Negli alimenti deperibili l'azione di qualsiasi fattore sulla proliferazione microbica è in funzione del tempo

# Agenti conservanti



**I conservanti negli alimenti altamente deperibili sono in genere usati in quantità tale da influire solo parzialmente sulla crescita di molti germi**



# Atmosfera di confezionamento

La riduzione o l'eliminazione dell'ossigeno nelle confezioni



ALIMENTI ALTAMENTE  
DEPERIBILI

ostacolo alla proliferazione  
della **flora microbica  
aerobica**



ALIMENTI NORMALMENTE  
DEPERIBILI

ostacolo anche alla  
proliferazione delle **muffe**



# **Aw e pH**

## **Aw** (activity water)

E' l'acqua contenuta nell'alimento, non legata, per cui è libera per il metabolismo microbico

## **pH**

Indica il valore dell'acidità dell'alimento

**Azione sinergica tra aw , pH e temperatura  
sull'inibizione della crescita microbica,**

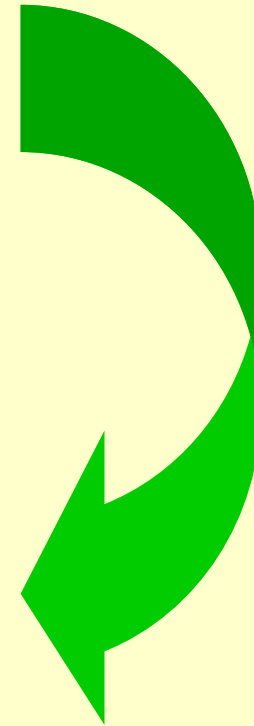
**NON sull'inattivazione col calore**

diminuzione  $a_w$

e / o

abbassamento pH

progressivo aumento della  
stabilità microbiologica  
degli alimenti

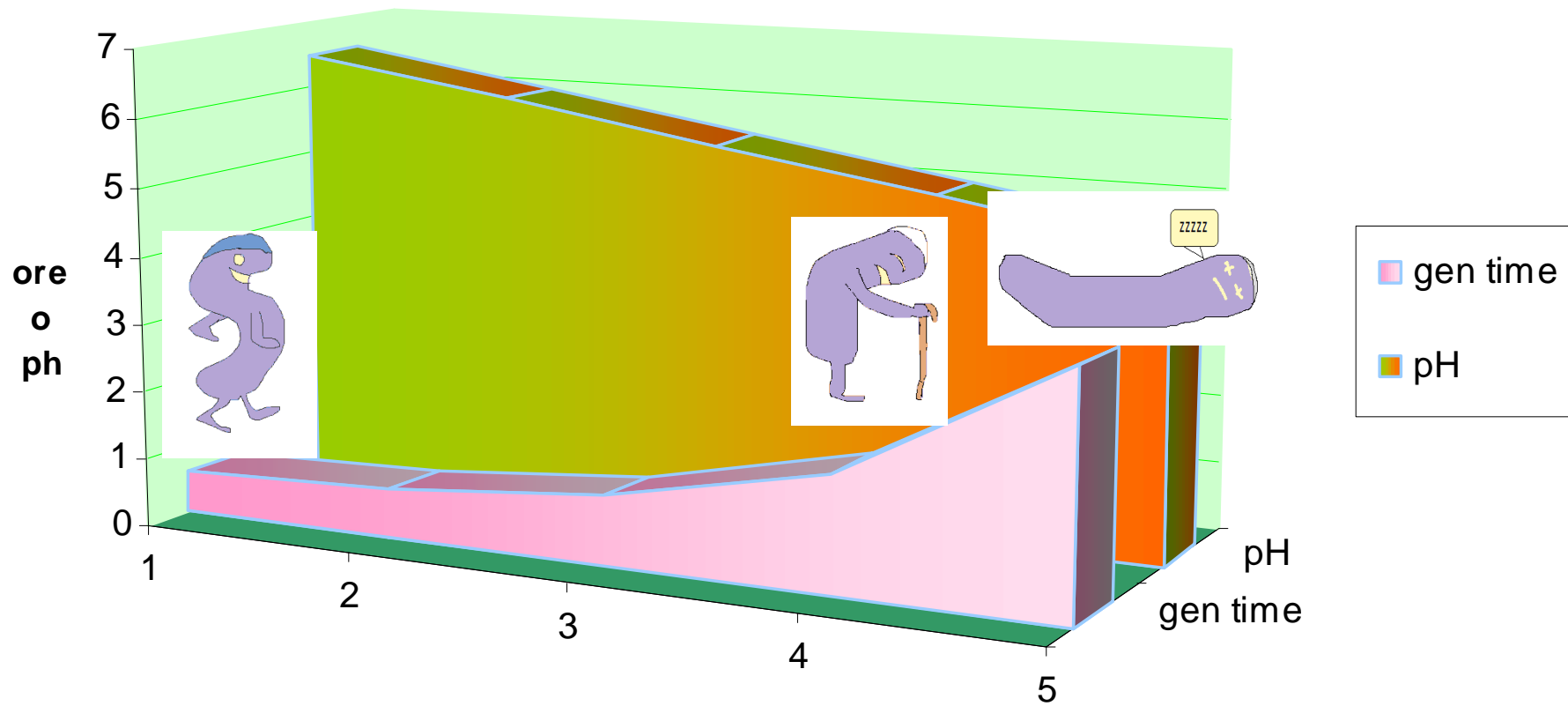


Aw, pH ed eventualmente i conservanti determinano la conservabilità intrinseca dell'alimento.

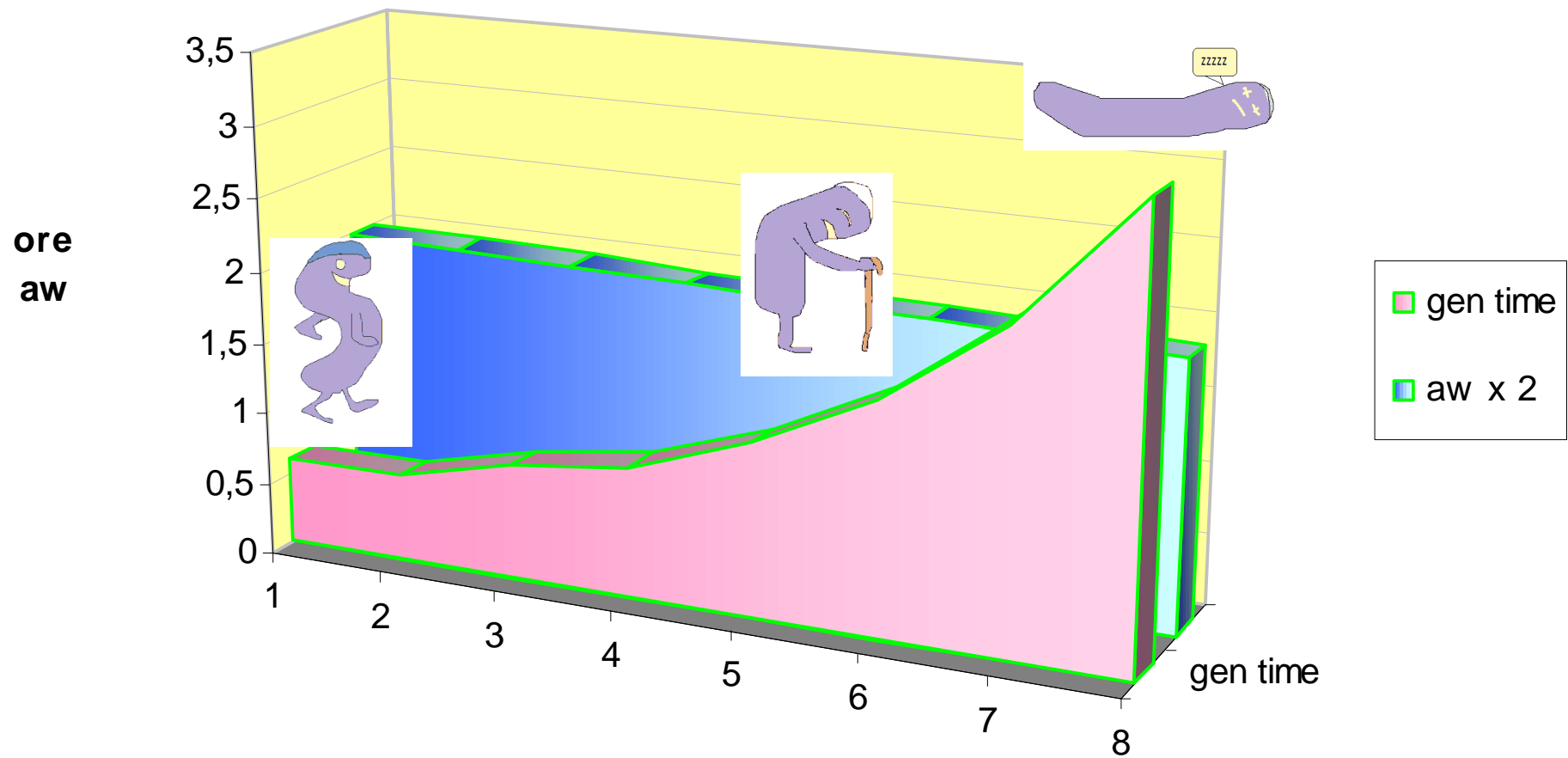
Avvicinandoci ai limiti di crescita batterica per qualunque fattore considerato, la velocità di moltiplicazione diminuisce drasticamente. **L'effetto è ancora complementare**

Il **limite per la produzione di tossine** da parte dei microrganismi è situato, per qualsiasi fattore considerato, in condizioni generalmente più favorevoli di quello per la semplice moltiplicazione.

## Aumento del tempo di generazione con l'abbassamento del pH (da 6.5 a 4.5)

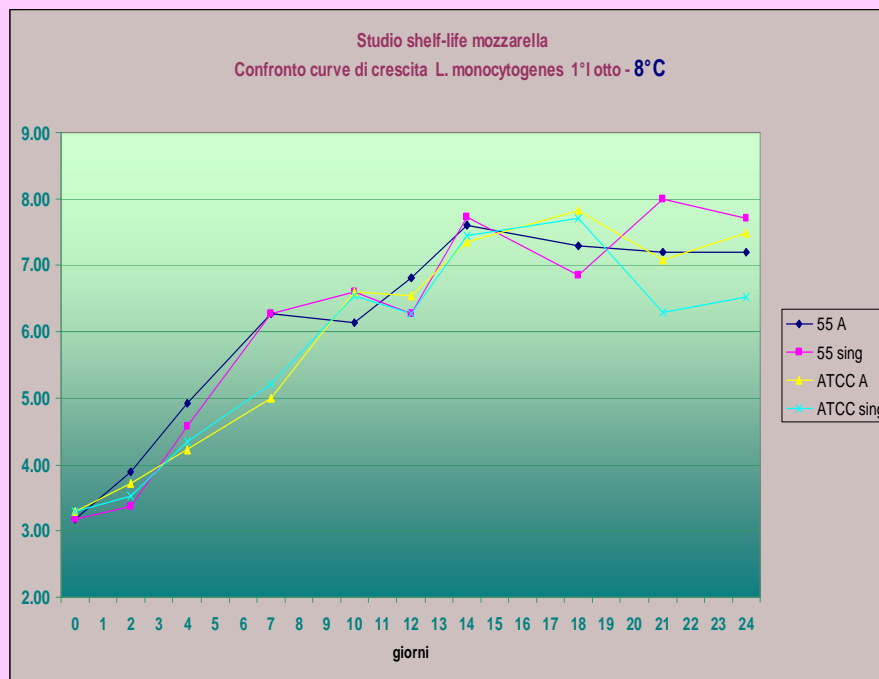


## Aumento del tempo di generazione con l'abbassamento dell'**aw** (da 0.997 a 0.930)



# Temperatura

Crescita *Listeria monocytogenes*  
a 8°C in mozzarella



Crescita *Pseudomonas fluorescens*  
a 5°C in mozzarella



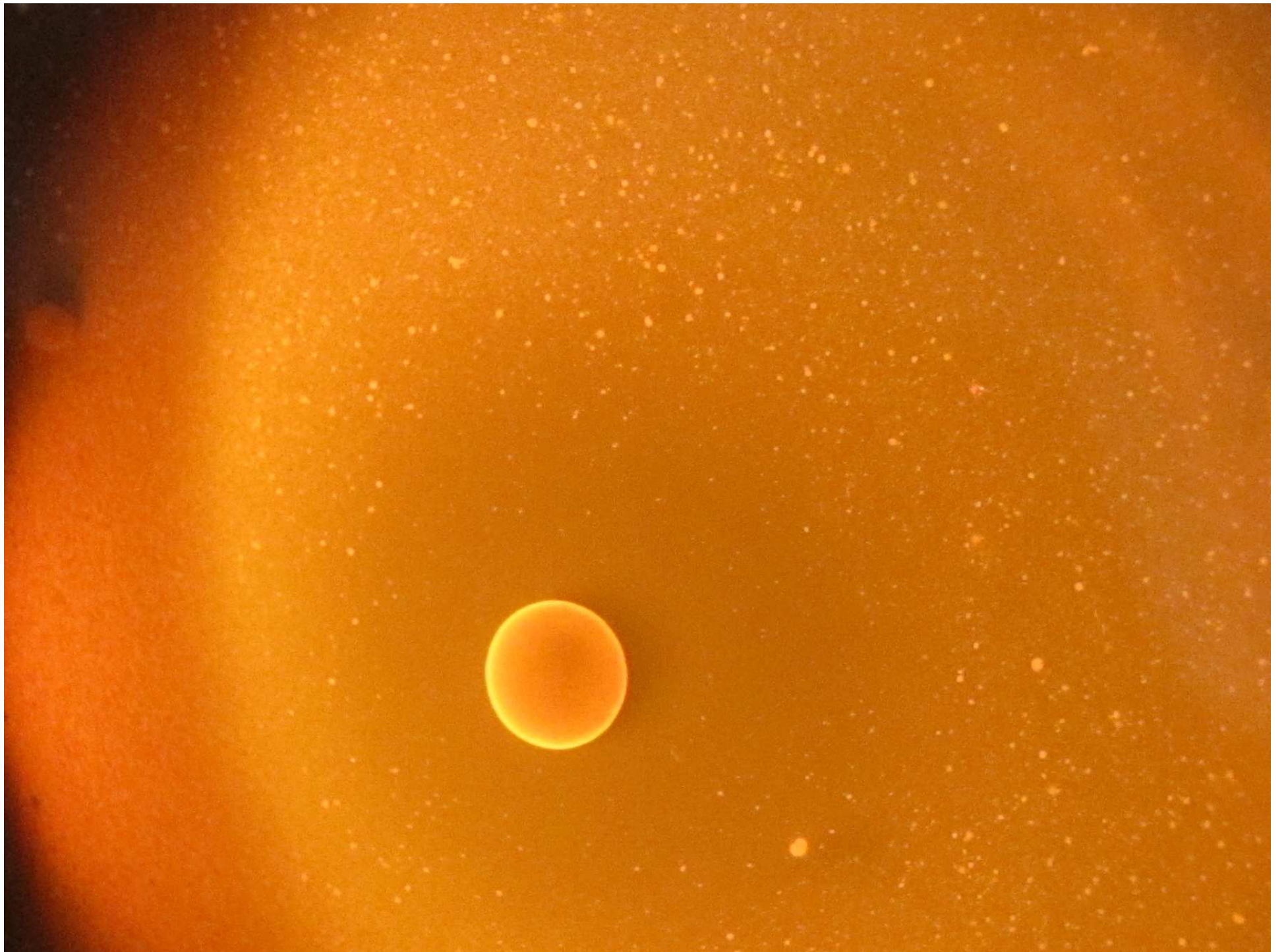
# Flora lattica

Valori limite di **pH** e **aw** sono previsti nel 2073 poiché si possono determinare agevolmente attraverso misurazioni strumentali.

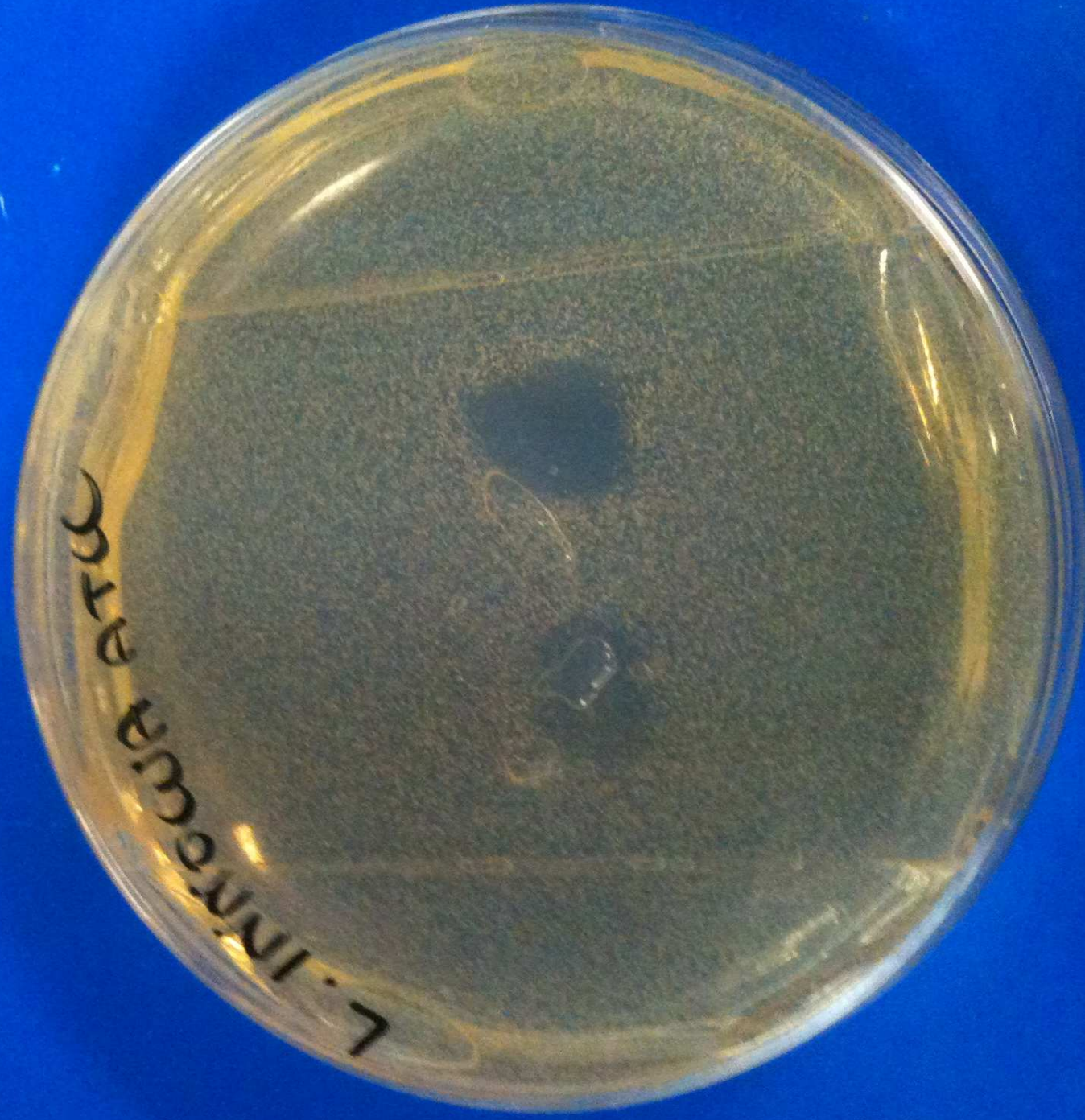
Uno dei fattori più importanti ( **GENERALMENTE IL PRINCIPALE** ) di contenimento della crescita di patogeni **NON ESPLICITAMENTE CONTEMPLATO NELLA NORMA** è l'attività dei **batteri lattici**, il cui impatto può essere anche prevedibile.

Il Regolamento 2073 prevede però che possa essere preso in considerazione dopo attenti studi.









Tutti questi fattori hanno effetto complementare sulla conservazione. Questo vuol dire che due o più fattori applicati contemporaneamente a livelli più blandi forniscono (a dati livelli) lo stesso effetto (comunque progressivo) che si otterrebbe con un solo fattore applicato a livelli più drastici.

(hurdle technology)



Questo effetto è sfruttato regolarmente per produrre alimenti conservabili (con trattamenti delicati), che risultino ancora gradevoli da consumare.

Esempio:

Effetto dell'azione complementare dei vari fattori sulla crescita di *E. coli* O157:H7 .

	Condizioni ottimali	Fattore o fattori limitanti applicati						
		pH	aw	T°	pH+aw	T°+aw	T°+pH	T°+pH+aw
T°	20	20	20	14,7	20	17,8	16,0	18,2
pH	7	4,6	7	7	5,8	7	5,6	6,2
Aw	0,997	0,997	0,970	0,997	0,983	0,983	0,997	0,985
Tempo raddoppio in ore	1,1	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3	2,3

Esempio azione complementare

Salmone affumicato:

Sale, fumo, altri antiproliferativi, temperatura.

Tuttavia a volte alti conteggi di *Listeria monocytogenes*!

*Su quale fattore di quelli precedentemente trattati si può agire?*

TEMPO

AW

PH

*come fattori di  
contenimento  
microbico sono  
incorporati in una  
normativa vigente*

**il Regolamento (CE) 2073/2005**



## Esempio: effetto complementare e conservazione

Le carni di salmone e merluzzo sono ugualmente deperibili

A partire da queste carni si ottengono 2 prodotti conservati:

Quanti fattori di contenimento microbico sono applicati per preparare

Salmone affumicato (breve conservazione)

Stoccafisso (lunga conservazione)

## ALLEGATO II

art. 3

Gli studi di cui all'articolo 3, paragrafo 2, comprendono:

— prove per determinare le caratteristiche fisico-chimiche del prodotto, quali pH, aw, contenuto salino, concentrazione di conservanti e tipo di sistema di confezionamento, tenendo conto delle condizioni di lavorazione e di conservazione.

— **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,

— prove per determinare la capacità dei microrganismi in questione, debitamente inoculati, di svilupparsi o sopravvivere nel prodotto in diverse condizioni di conservazione ragionevolmente prevedibili,  
**(challenge test)**

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



Gli studi di **microbiologia predittiva** (come i challenge tests) sono effettuati nelle **condizioni più favorevoli alla crescita microbica ( $a_w$ , pH, .....)** relativamente alla variabilità del prodotto considerato .

Si considerano quindi i risultati ottenuti nelle condizioni dello

**“scenario peggiore”** .

## ALLEGATO II

*Se necessario, in base agli studi summenzionati, l'operatore del settore alimentare effettua studi ulteriori, che possono comprendere:*

*1*

*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,*  
**"MICROBIOLOGIA PREDITTIVA"**

### Osservazioni.

- Si usano in genere programmi per computer (a volte gratuiti) dove si inseriscono i valori richiesti in apposite finestre per ottenere dati sulla possibilità o meno dei vari microorganismi di svilupparsi.
- A volte l'intervallo valori da inserire è limitato.
- Alcuni forniscono dati eccessivamente pessimistici, anche se di tutta sicurezza ( La velocità di crescita predetta è in genere **MAGGIORE DELLA REALTA'** )

<http://portal.arserrc.gov/>

**PMP**

PMPonline

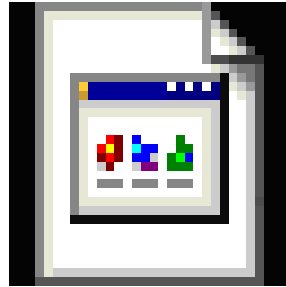
gratuito

and

**ComBase Predictor**

COMBASE

*We are grateful for the predicting softwares : USDA Research Service (USA) for PMP and  
Institute of Food Research (UK) for ComBase Predictor*



gratuito

## SSSP v3.1.Ink

### Range of applicability

Temperature (2-15°C), atmosphere (0-80 % CO<sub>2</sub>), water phase salt (1.5-8.0 %), pH (5.6-7.5), smoke components/phenol (0-20 ppm), lactate in water phase (0 - 30.000 ppm) and diacetate in water phase (0 - 2.000 ppm)

Thanks to DTU ( Technical University of Denmark )

# Seafood Spoilage and Safety Predictor

File Opzioni Aiuto

## Software di integrazione Tempo-Temperatura

- ☒ Seafood Spoilage and Safety Predictor (SSSP)
  - ☒ Modelli del tasso relativo di degradazione (RRS)
    - ☒ Pesce marino fresco da acque temperate
    - ☒ Pesce marino fresco da acque tropicali
    - ☒ Salmone affumicato refrigerato
    - ☒ Gamberetti cotti e salati
    - ☒ Modelli RRS con caratteristiche termiche definite dall'utente
    - ☒ Confronto tra dati RRS osservati e previsti
  - ☒ Modelli di degradazione microbica (MSM)
    - ☒ Photobacterium phosphoreum
      - Filetti merluzzo freschi in atm. protettiva
      - Filetti platessa freschi in atm. protettiva
      - Tranci di salmone fresco in atm. protettiva
    - ☒ Shewanella acido sulfidrico produttore
    - ☒ Modelli MS con valori parametrici definiti dall'utente
    - ☒ Confronto tra dati osservati e previsti
      - Modello primario di crescita a stoccaggio costante
      - Modello primario di crescita a temperature variabili
      - Modello microbico secondario
  - ☒ Modelli di formazione dell'istamina
    - ☒ Morganella psychrotolerans - crescita e formazione istamina
    - ☒ Morganella morganii e M. psychrotolerans - crescita e formazione istamina
  - ☒ Listeria monocytogenes in pesce congelato
  - ☒ Listeria monocytogenes e batteri lattici (LAB)
    - ☒ Crescita di L. monocytogenes e batteri acidi lattici (LAB) in pesci minimamente processati
      - Effetto di temperatura, atmosfera, sale, fumo, pH, diacetato e lattato

## ALLEGATO II

*Se necessario, in base agli studi summenzionati, l'operatore del settore alimentare effettua **studi ulteriori**, che possono comprendere:*

**2**

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

**"CHALLENGE TEST"**

**Osservazioni.**

- **È il metodo migliore.**
- **Richiede buone conoscenze microbiologiche ed è di difficile esecuzione.**

# Quando serve il challenge test ?

Quando i parametri sia estrinseci che intrinseci al prodotto, *anche inseriti in programmi di microbiologia predittiva*, non garantiscono la stabilità microbiologica richiesta



lotto 1

8/11

ATCC

A

1

A

lotto 1

8-11

50178



Secondo la guida tecnica europea:

EU Community 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**

AFSSA (Agence Francaise de securité sanitaire des aliments)

Procedure microbiologiche per determinare la crescita di *Listeria monocytogenes* usando challenge tests , microbiologia predittiva e durability studies

Challenge tests

Studio del ***growth potential*** (  $\delta$  )

Studio del ***maximum growth rate*** (  $\mu_{max}$  )

***Durability studies***



## Growth potential

Il **challenge test microbiologico** per determinare il **growth potential** (  $\delta$  ) si propone di misurare la crescita di *Listeria monocytogenes* in un alimento artificialmente contaminato mantenuto in realistiche (ragionevoli) condizioni.

$\delta$  è la differenza tra il  $\log_{10}$  cfu/g alla fine del test e quello all'inizio.

$$\delta = \log_{10} \text{cfu/g (fine del test)} - \log_{10} \text{cfu/g (tempo "0")}$$

### DIFETTI

Poco flessibile poiché è valido solamente per le condizioni applicate durante il test.

Il  $\delta$  può essere usato per:

1. classificare un alimento

- Se  $\delta > 0.5 \log_{10}$  cfu/g ,l'alimento è favorevole alla crescita di *Listeria monocytogenes* (categoria 1.2) .
- Se  $\delta \leq 0.5 \log_{10}$  cfu/g ,l'alimento NON è favorevole alla crescita di *Listeria monocytogenes* (categoria 1.3) .

2. - quantificare il comportamento di *Listeria monocytogenes* in un alimento favorevole alla crescita (cat. 1.2)

3. - calcolare la concentrazione di *Listeria monocytogenes* al punto di produzione tale che non possa eccedere il livello di 100 cfu/g alla fine della shelf-life.

## DIFETTI

Poco flessibile poiché è valido solamente per le condizioni applicate durante il test.

**Table 3. First example of results obtained from a growth potential test.**

The limit of enumeration is 5 cfu/g.

Batches	Day	Concentration (cfu/g)	Concentration (log <sub>10</sub> cfu/g) <b>In bold: median</b>	Difference between the median concentration at "day end" and the median concentration at "day 0" (log <sub>10</sub> cfu/g)	Growth potential ( <b>δ</b> ) = maximum of the differences
1	"day 0"	30	<b>1.48</b>	1.46-1.48=-0.02	<b>0.42</b>
		50	1.70		
		20	1.30		
	"day end"	43	1.63		
		24	1.38		
		29	<b>1.46</b>		
2	"day 0"	45	1.65	1.46-1.48=-0.02	<b>0.42</b>
		30	1.48		
		30	<b>1.48</b>		
	"day end"	29	<b>1.46</b>		
		43	1.63		
		14	1.15		
3	"day 0"	<5	<0.70	1.72-1.30=0.42	<b>0.42</b>
		25	1.40		
		20	<b>1.30</b>		
	"day end"	52	<b>1.72</b>		
		38	1.58		
		81	1.91		

**Table 4. Second example of results obtained from a growth potential test.**

The limit of enumeration is 5 cfu/g.

Batches	Day	Concentration (cfu/g)	Concentration (log <sub>10</sub> cfu/g) In bold: median	Difference between the median concentration at “day end” and the median concentration at “day 0” (log <sub>10</sub> cfu/g)	Growth potential (δ) = maximum of the differences
1	“day 0“	25	1.40	2.28-1.40 = 0.88	0.88
		20	1.30		
		55	1.74		
	“day end“	100	2.00		
		210	2.33		
		190	2.28		
2	“day 0“	60	1.78	2.54-1.70 = 0.84	
		30	1.48		
		50	1.70		
	“day end“	250	2.40		
		350	2.54		
		390	2.59		
3	“day 0“	20	1.30	1.72-1.30 = 0.42	
		25	1.40		
		20	1.30		
	“day end“	43	1.63		
		52	1.72		
		76	1.88		

**Se  $\delta > 0.5$  LOG si procede con ulteriori calcoli**

## Esempi di risultati ottenuti da test di crescita ( Technical Guidance Document AFSSA)

**Limite *L. monocytogenes* 2 log<sub>10</sub> (= 100)**

**δ**

Nel 2° esempio :  $\delta = 0.88$  (log<sub>10</sub> cfu/g) è > 0.5 per cui la LM cresce. Il valore può essere usato per ulteriori calcoli.

### 2 – quantificare il comportamento di *Listeria monocytogenes*

Se la **concentrazione iniziale** di *L. monocytogenes* è = **1 log<sub>10</sub> cfu/g** (= 10 cfu/g)

Quale sarà la concentrazione alla fine della shelf-life ?

Concentrazione finale = concentrazione iniziale + δ

$$1 + 0.88 = 1.88 \log_{10} \text{ cfu/g} < 2 \log_{10} \text{ cfu/g} (= 76 \text{ cfu/g} < 100 \text{ cfu/g})$$

3 – calcolare la concentrazione di *Listeria monocytogenes* . Quale dovrà essere la concentrazione (massima) all'inizio della shelf-life per rispettare il limite di 100 cfu/g ( 2 log<sub>10</sub> cfu/g ) ?

Concentrazione iniziale = Concentrazione finale - δ

$$2 - 0.88 = 1.12 \log_{10} \text{ cfu/g} (= 13 \text{ cfu/g})$$

## Maximum growth rate

$\mu_{\max}$

E' il tasso massimo di crescita nell'unità di tempo.

**Combina** i modelli di **microbiologia predittiva** con i **challenge tests** .

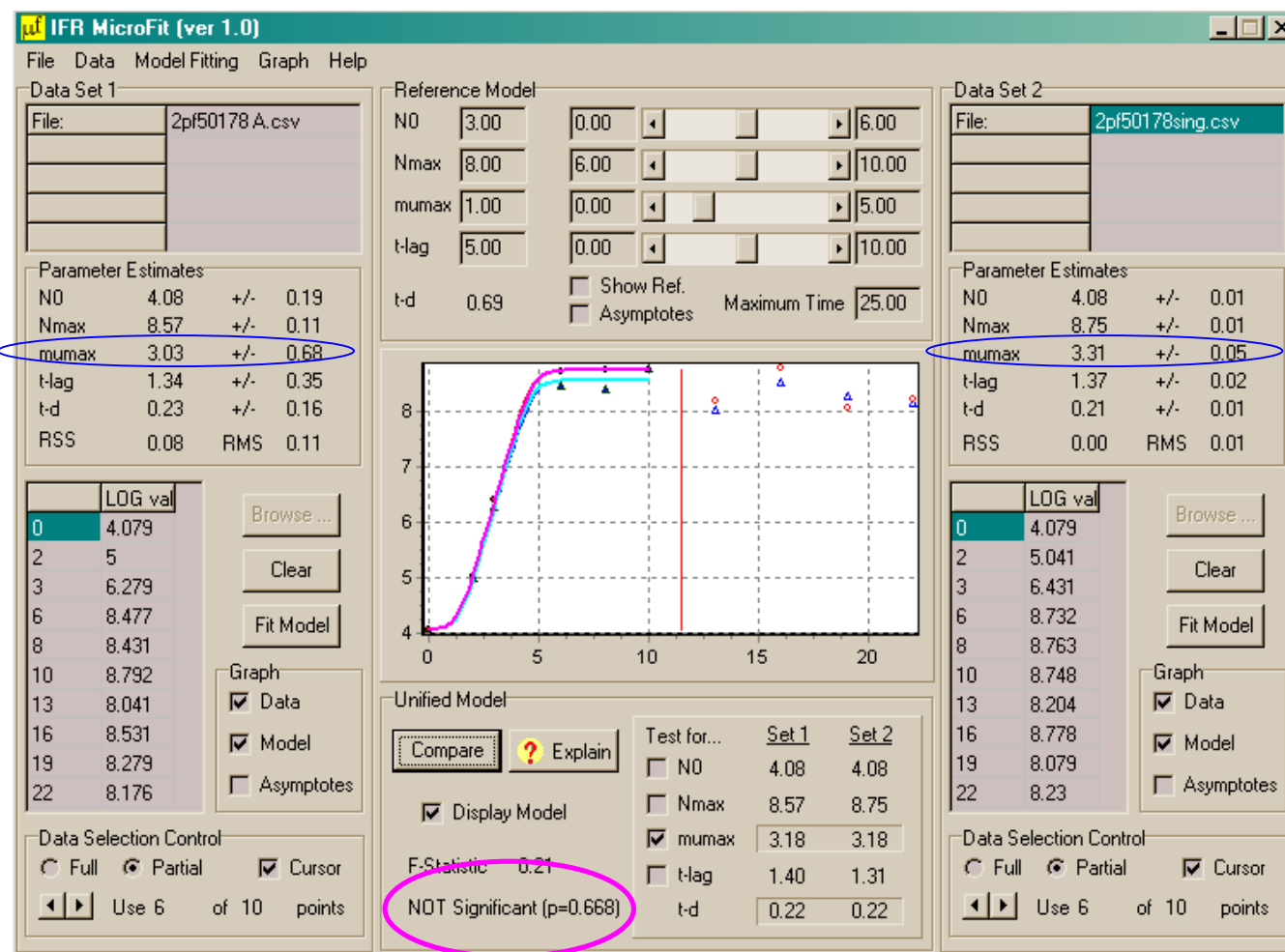
Studio del **maximum growth rate** (  $\mu_{\max}$  ) : si effettua misurando il tasso di crescita di *Listeria monocytogenes* in alimento artificialmente contaminato mantenuto **ad una data temperatura, che non è necessariamente la stessa che si userà per la predizione**. **Sarà quindi possibile predire la crescita di *Listeria monocytogenes* a temperatura diversa o ad un profilo tempo-temperatura diversi da quelli del test.**

Alla fine del test il  $\mu_{\max}$  è calcolato dalla curva di crescita. Mettendo in grafico (plotting), nella fase esponenziale di crescita, il logaritmo naturale ( $\ln$ ) del numero delle cellule contro il tempo si realizza una retta la cui pendenza è il  $\mu_{\max}$  (al giorno) .

Il  $\mu_{\max}$  fornisce:

1. una stima della concentrazione di *Listeria monocytogenes* ad un dato giorno della shelf-life, conoscendo la concentrazione al tempo 0,
2. una stima della massima concentrazione di *Listeria monocytogenes* che può essere tollerata al tempo 0 per rimanere nei limiti di 100 cfu/g alla fine della shelf-life.

**Comparazione tra challenge effettuato su una sola unità e challenge effettuato su 10 unità Lotto 2**  
**Pseudomonas fluorescens ceppo 50178**



**MicroFit**

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



Il  $\mu_{\max}$  si ottiene elaborando i dati del test ( ln cfu/g e giorni ) attraverso il programma

$\mu_{\max}$

## MicroFit



Si sceglie quello col valore massimo, che è espresso in **ln cfu/g . day<sup>-1</sup>** . Da questo, attraverso la formula seguente si può ottenere un altro  $\mu_{\max}$  ad un'altra temperatura **T** ( < 25°C )

$$\text{NUOVO } \mu_{\max} = \mu_{\max_{\text{ref}}} \cdot \frac{(\text{T} - T_{\min})^2}{(T_{\text{ref}} - T_{\min})^2}$$

$\mu_{\max_{\text{ref}}}$  = valore dal test

$T_{\text{ref}}$  = temperatura del test

$T_{\min}$  = temperatura minima di crescita per *Listeria monocytogenes* ( - 2 °C ).

Il valore di  $\mu_{\max}$  deve essere trasformato in **log<sub>10</sub> cfu/g** per calcolare le stime che il  $\mu_{\max}$  può fornire. Procedimento: si divide il  $\mu_{\max}$  per 2.3 .

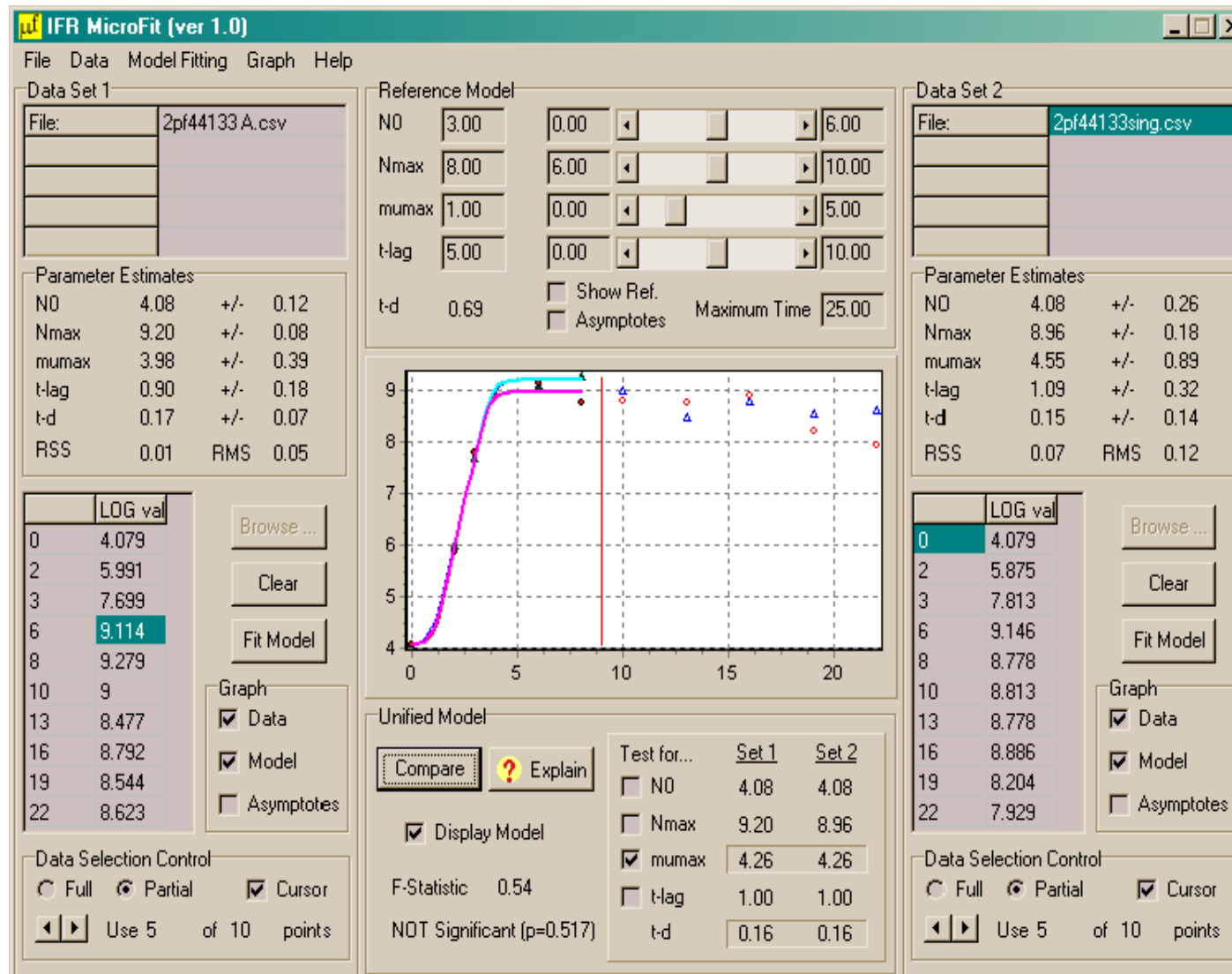
Calcolo della stima di crescita di LM durante la shelf-life che preveda 2 o più temperature diverse.

Si calcolano i singoli contributi moltiplicando il potenziale di crescita per i giorni ad una data temperatura; quindi i singoli contributi sono sommati per ottenere il tempo totale (shelf-life)

### FORMULA

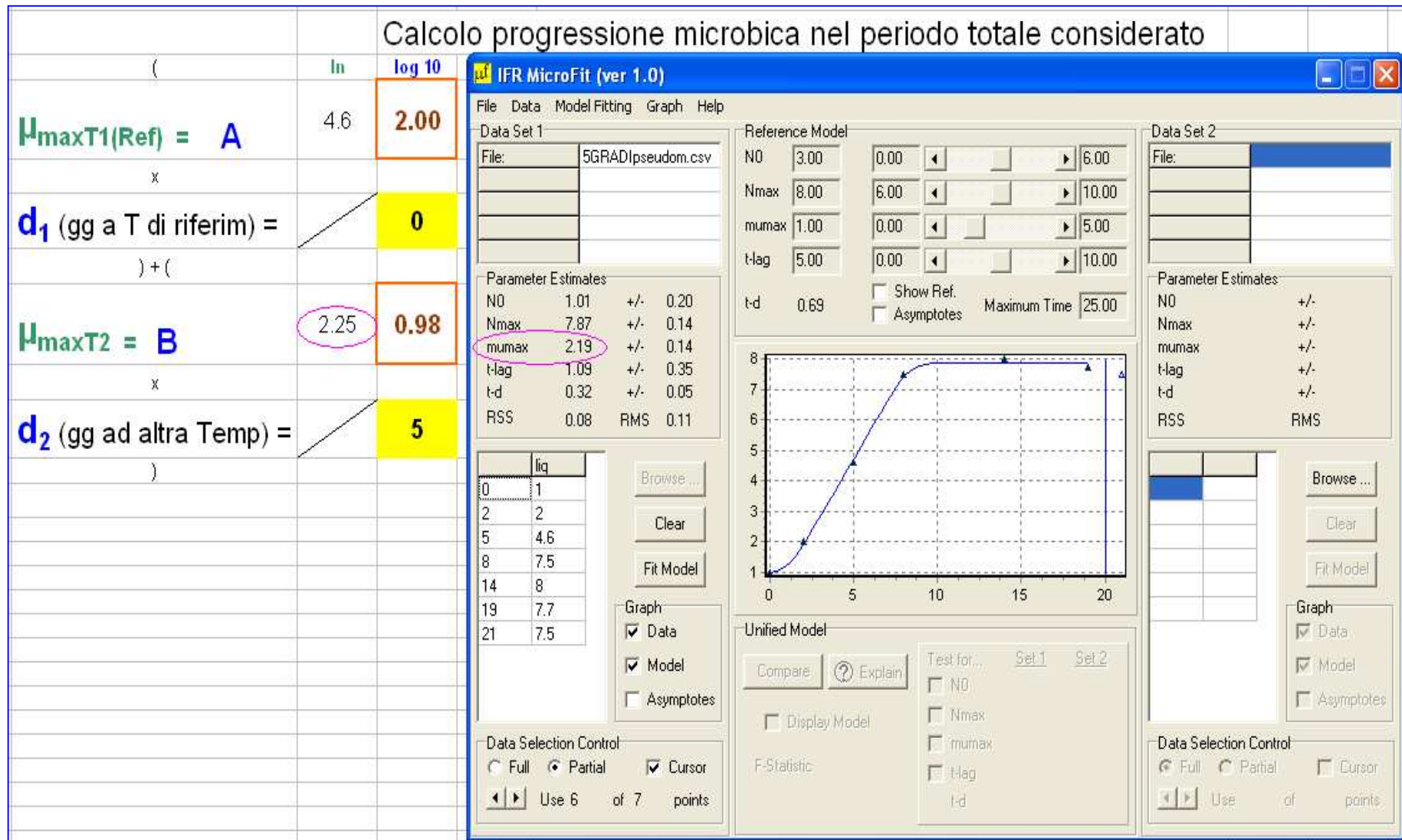
$$(\mu_{\max}^{T1(Ref)} \times d1 \text{ (gg a T di riferim)}) + (\mu_{\max}^{T2} \times d2 \text{ (gg ad altra temp)}) + 3^a \text{ temp. ...}$$

## Test $\mu_{\max}$ con *Pseudomonas fluorescens* in mozzarella



# Test $\mu_{\max}$ con *Pseudomonas fluorescens* in mozzarella

Dimostrazione che test valido anche per *Pseudomonas fluorescens*



## Utilizzazione $\mu_{\max}$ con esempio di calcolo di durata (shelf-life) a 5° C

PROBLEMA: Se accetto un massimo di  $10^2$  (2,00 LOG) *L. monocytogenes* e parto da un massimo iniziale di 1 in 25 g (-1.4 LOG) quanti giorni posso conservare le mozzarelle?

DATI DEL PROBLEMA : Il tasso di crescita è a 5° C = 0,48 LOG/giorno (nostro challenge)

		ln	log 10
8	$\mu_{\max T1(Ref)} = A$	2.26	0.98
°C	x		
	$d_1$ (gg a T di riferim) =		0
	) + (		
5	$\mu_{\max T2} = B$	1.11	0.48
°C	x		
	$d_2$ (gg ad altra Temp) =		0

Si calcola l'incremento massimo tollerato = concentrazione finale – concentrazione iniziale =  $2 - (-1.4) = 3.4 \text{ LOG}$

Si divide l'incremento massimo per il  $\mu_{\max}$  alla relativa temperatura per ottenere la shelf-life (in giorni) a quella temperatura

o, comunque, il contributo alla stessa temperatura se si tratta di una frazione della shelf-life.

$$3.4 / 0.48 = 7.8 \text{ gg}$$

Il tempo massimo di conservazione a 5 ° C è di 7 giorni e 19 ore

La trasformazione del valore da 8°C a 5°C è previsto da guida AFSSA per *Listeria monocytogenes*

# Durability studies

D-stud

Permettono lo studio della crescita di LM durante la conservazione in alimenti **naturalmente contaminati** (*in questi tipi di test l'evoluzione del germe target è la più attendibile*) 

Adatti solo per alimenti in cui la LM sia isolata frequentemente (prevalenza > 10% , come riportato nella [versione 6 , draft , del SANCO/1628/2008 GUIDANCE DOCUMENT on \*Listeria monocytogenes\* shelf-life studies for ready-to-eat foods](#)).

Alla fine del periodo di conservazione (in ragionevoli condizioni) si effettua il **conteggio di LM su tutti i campioni** per valutare **quanti superano il livello di 100 cfu/g** . Il numero di unità in cui considerare che LM supera 100 cfu/g è dato dal **limite superiore dell'intervallo di confidenza (95%)**.

Estimated proportion of units  $> 100$  cfu *L. monocytogenes*/g at the end of the shelf-life.

<b>N</b> number of analysed units	<b>R</b> number of units >100cfu/g	<b>P</b> estimated proportion	<b>CI</b> 95% Confidence Interval
<b>20</b>	0	<b>0%</b>	[ 0% – 16% ]
100		0%	[ 0% – 4% ]
20	1	5%	[ 1% – 24% ]
100		1%	[ 0.2% – 5% ]
20	2	10%	[ 3% – 30% ]
<b>100</b>		<b>2%</b>	[ 0.6% – 7% ]

If more units are analysed, the narrower the confidence interval becomes. For example, we can conclude from this table that the upper limit of the confidence interval for “2 units exceeding 100 cfu/g out of 100 units” is lower than that obtained for “0 units exceeding 100 cfu/g out of 20 units”.

limiti Si sceglie il limite maggiore dell'intervallo di confidenza