

VALUTAZIONE CRITICA DEI RISULTATI DELLE ANALISI
MICROBIOLOGICHE SUGLI ALIMENTI: INTERAZIONE TRA
LABORATORI DI ANALISI PRODUTTORI E AUTORITA' SANITARIA
Pisa 16/11/2011

La valutazione della shelf life negli alimenti: esempi pratici



Finazzi Guido
IZSLER - Reparto Microbiologia



Determinazione shelf-life

- ✓ determinazione della vita commerciale
- ✓ protocolli interni
- ✓ protocolli AFFSA



Determinazione shelf-life

- ✓ imitazione dei concorrenti;
- ✓ imposta dal cliente;
- ✓ basata su vantaggi commerciali;
- ✓ basata solo su alterazioni organolettiche dei prodotti



Determinazione shelf-life

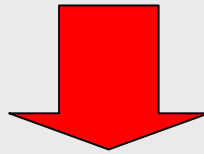
Durata vita commerciale:

Tempo durante il quale l'alimento mantiene caratteristiche organolettiche accettabili per il consumatore malgrado le progressive alterazioni a cui va incontro durante la conservazione



Determinazione shelf-life

Corretta determinazione della shelf-life



Basata primariamente sul
comportamento dei patogeni



Regolamento 2073/2005

In conformità all'allegato II, gli operatori del settore alimentare effettuano studi per verificare se i criteri sono rispettati per l'intera durata del periodo di conservabilità (art.3 par 2):

- ✓ Prove per determinare caratteristiche chimico-fisiche (ph, Aw, presenza Sali o conservanti);
- ✓ Consultazione letteratura scientifica disponibile
- ✓ Utilizzo di modelli di microbiologia predittiva
- ✓ Effettuazione di challenge test per valutare la sopravvivenza di patogeni inoculati durante il periodo di conservabilità e in condizioni prevedibili di distribuzione, conservazione ed uso



Reparto Microbiologia

Dotazioni Laboratorio Trasformazioni sperimentali

- ✓ minicaseificio
- ✓ 6 celle di stagionatura
- ✓ insaccatrice, miscelatrice, tritacarne
- ✓ 8 frigotermostati
- ✓ macchina per confezionamento (sv, atm)
- ✓ Forno + piano cottura, forno a microonde
- ✓ Materiale vario (stampi, lira, ecc.)



Laboratorio di Trasformazioni sperimentali

- Caratterizzazione di prodotti
- Challenge tests
 - ✓ in corso di trasformazione
 - ✓ valutazione di shelf life
 - ✓ validazione trattamenti termici in azienda
 - ✓ prove di cottura
 - ✓ prove di decontaminazione
- Microbiologia predittiva



Challenge test

- ✓ Consorzi o singoli produttori
- ✓ ASL
- ✓ Collaborazioni con altri Enti
- ✓ Prove interne



Challenge test

- ✓ Salumi e prodotti a base di carne
- ✓ Formaggi e derivati del latte
- ✓ Prodotti di gastronomia pronti
- ✓ Alimenti da cuocere



Challenge test

- ✓ Effettuati in laboratorio (Lab. di Trasformazioni sperimentali del Reparto di Microbiologia dell'IZSLER)
- ✓ In collaborazione con produttori
- ✓ Con ceppi patogeni o equivalenti (ATCC e isolati in campo) su cui sono state eseguite prove di caratterizzazione



Challenge test: sostenibilità scientifica

Il processo produttivo deve essere replicato in laboratorio in modo da minimizzare le differenze con quanto avviene nello stabilimento di produzione



Quali parametri?

Microrganismi criteri di sicurezza alimentare:

- ✓ *Listeria monocytogenes* (100 ufc/ g o ml)
- ✓ *Bacillus cereus*
- ✓ *Staph. aureus*
- ✓ *Cl. perfringens*
- ✓ *Cl. botulinum*



Valutazione shelf life

Documento tecnico (AFFSA 2008) per gli studi di vita commerciale degli alimenti pronti al consumo inerenti a *L. monocytogenes*:

- ✓ Challenge tests
 - Valutazione del potenziale di crescita (δ)
 - Valutazione del tasso di crescita massimo (μ max)
- ✓ Studi di conservabilità



Challenge tests

- ✓ Valutazione del potenziale di crescita
 - valuta capacità del microrganismo di crescere in un alimento
 - considera tutta la catena del freddo

- ✓ Valutazione del tasso di crescita massimo (μ max)
 - stima parametri di crescita ad una temperatura fissa
 - applicazione modelli matematici microbiologia predittiva



Contaminazioni sperimentali

- ✓ Informazioni preliminari sulle caratteristiche dell'alimento
- ✓ Numero di lotti
- ✓ Scelta dei ceppi
- ✓ Preparazione dell'inoculo
- ✓ Preparazione ed inoculazione unità di prova
- ✓ Condizioni conservazione dell'alimento
- ✓ Determinazioni caratteristiche chimico fisiche
- ✓ Analisi microbiologiche
- ✓ Calcolo δ oppure di μ max
- ✓ Elaborazione dati e refertazione



Valutazione del potenziale di crescita

- ✓ Dati preliminari sulle caratteristiche dell'alimento

- ✓ Numero di lotti :

3 diversi lotti per ogni alimento

- ✓ Scelta dei ceppi:

miscela di almeno 3 ceppi

almeno 1 ceppo di riferimento

almeno 3 ceppi di campo isolati da matrici compatibili



Valutazione del potenziale di crescita

- ✓ Preparazione dell'inoculo:

 - adattamento dei ceppi

 - livello di contaminazione atteso 50 -100 ufc/ g o ml

 - volume dell'inoculo < 1% volume unità di prova





Valutazione del potenziale di crescita

- ✓ Preparazione ed inoculazione unità di prova
inoculazione in superficie o in profondità
rispettare condizioni di confezionamento





Valutazione del potenziale di crescita

✓ Condizioni conservazione dell'alimento:

Tabella 2. Diagramma di flusso delle condizioni di incubazione

Fase della catena del freddo	Temperatura d'incubazione	Durata dello stoccaggio (incubazione)	
		Vita commerciale ≤ 21 giorni	Vita commerciale > 21 giorni
Dalla produzione fino all'arrivo nel banco vendita	Temperatura giustificata da informazioni dettagliate* oppure se non nota 8 °C	Durata giustificata da informazioni dettagliate oppure se non nota un terzo della vita commerciale	7 giorni
Commercio al dettaglio: banco vendita	Temperatura giustificata da informazioni dettagliate* oppure se non nota 12 °C	Durata giustificata da informazioni dettagliate oppure se non nota un terzo della vita commerciale	½ (un terzo della vita commerciale - 7 giorni)
Stoccaggio domestico	Temperatura giustificata da informazioni dettagliate* oppure se non nota 12 °C	Durata giustificata da informazioni dettagliate oppure se non nota un terzo della vita commerciale	½ (un terzo della vita commerciale - 7 giorni)

* Temperatura giustificata da informazioni dettagliate: il 75° percentile delle osservazioni per il paese dove si svolge la fase della catena del freddo



Valutazione del potenziale di crescita

- ✓ Analisi microbiologiche (patogeno e flore endogene) e chimico fisiche:

determinazione	Tempo zero	1/3 shelf life	2/3 shelf life	Fine shelf life
Parametri microbiologici per unità di prova contaminate	3	3	3	3
Parametri microbiologici per unità di prova di controllo	3			3
Parametri fisico-chimici unità di prova di controllo	3 (1)			3 (1)



Valutazione del potenziale di crescita

✓ Calcolo δ :

differenza tra log ufc/ g o ml a fine shelf life quello a tempo zero

mediana dei 3 valori

calcolare per ogni lotto

δ = valore più alto



Valutazione del potenziale di crescita

- ✓ Elaborazione dati e estrapolazione risultati

$\delta \leq 0,5$ alimento non supporta crescita microrganismo

$\delta > 0,5$ alimento supporta crescita microrganismo

capacità del microrganismo di produrre tossina nell'alimento

concentrazione iniziale + δ = concentrazione finale (> 100 ufc ?)

(es $10 \text{ ufc} = 1 \log_{10} \text{ ufc}$)

$2 - \delta$ = concentrazione iniziale per non superare 100 ufc

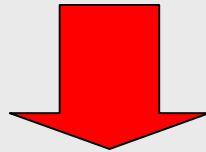


Valutazione del potenziale di crescita

✓ La prova non è ritenuta valida

2 risultati al tempo zero < al limite del metodo

deviazione standard tra i 3 log al tempo zero $\geq 0,3$



Ripetere la prova su un altro lotto



Valutazione del tasso di crescita massimo

- ✓ Dati preliminari sulle caratteristiche dell'alimento

- ✓ Numero di lotti :

3 diversi lotti per ogni alimento

- ✓ Scelta dei ceppi:

1 ceppo di riferimento

1 ceppo di campo 3 ceppi di campo isolati da matrici compatibili

ceppi usati separatamente



Valutazione del tasso di crescita massimo

- ✓ Preparazione dell'inoculo:

 - i ceppi non devono essere adattati

 - livello di contaminazione atteso 100 – 1000 ufc/ g o ml

 - volume dell'inoculo < 1% volume unità di prova

- ✓ Preparazione ed inoculazione unità di prova

 - come per prova precedente

- ✓ Condizioni conservazione dell'alimento

 - temperatura fissa: ad esempio 8-10°C



Valutazione del tasso di crescita massimo

- ✓ Analisi microbiologiche (patogeno e flore endogene) e chimico fisiche:

	Unità di prova (x2)
Parametri microbiologici per unità di prova contaminate	Da 10 a 15
Valutazione del microrganismo aggiunto nelle unità di prova di controllo (giorno zero e giorno finale)	3 + 3
Parametri fisico-chimici unità di prova di controllo (giorno zero e giorno finale)	3 + 3 (1 + 1)
Conteggio flore associate per unità di prova di controllo	2 (o da 10 a 15)



Valutazione del tasso di crescita massimo

- ✓ Calcolo μ max :

- trasformare i dati di concentrazione microbica in log

- inserire i dati nel programma MicroFit

- calcolo del tasso di crescita, T lag, Td per ogni curva

- μ max = valore più alto tra i 6 ottenuti

- ✓ Elaborazione dati e estrapolazione risultati

- μ max ref: tasso di crescita alla temperatura applicata (T ref)

- possibile calcolare μ max ad altre temperature

- possibile calcolare μ max per giorno (dividendo per 2,3)



Valutazione del tasso di crescita massimo

- ✓ Elaborazione dati e estrapolazione risultati

μ max ref: tasso di crescita alla temperatura applicata (T ref)

possibile calcolare

μ max ad altre temperature

μ max per giorno (dividendo per 2,3)

concentrazione a fine vita commerciale sapendo andamento T°

concentrazione iniziale per non superare 100 ufc

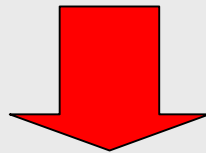
concentrazione finale sapendo concentrazione intermedia



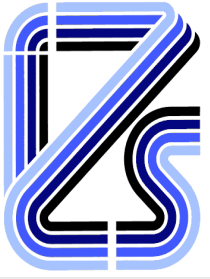
Valutazione del tasso di crescita massimo

- ✓ La prova non è ritenuta valida

quando l'alimento risulta naturalmente contaminato con il
microrganismo



Ripetere la prova su un altro lotto



Valutazione shelf life: protocolli interni

Temperatura di conservazione degli alimenti:

- ✓ 4-5°C = temperatura ideale ma teorica
- ✓ 8-10°C = temperatura che facilmente si può verificar e nella grande distribuzione o nei frigo domestici
- ✓ 12-15°C = temperatura di blando abuso termico
- ✓ 20-30°C = temperatura di abuso termico

Valutazione shelf life: protocolli interni

Quando fare i campioni?

- ✓ In funzione della durata della shelf-life prevista
- ✓ In funzione della temperatura di conservazione
- ✓ In funzione della previsione di crescita/ morte del microrganismo usato per la contaminazione (micro-pre)



Valutazione shelf life: protocolli interni

Quanti campioni fare?

- ✓ 3 aliquote contaminate per ogni campionamento
- ✓ 1 aliquota di controllo per ogni campionamento
- ✓ Almeno 6-8 campioni per ogni valutazione di shelf-life

Studi di shelf-life: Insalata di mare

Prova effettuata su 4 diversi produttori

Durata indicata dal produttore:

Produttore 1: 9 giorni di shelf life a 4°C

Produttore 2: 15 giorni di shelf life a 4°C

Produttore 3: 11 giorni di shelf life a 4°C

Produttore 4: 10 giorni di shelf life a 4°C

Studi di shelf-life: insalata di mare

Produttore 1:

Seppie, polpo, gamberi, sale, pepe, aceto di vino, succo di limone concentrato, E 330 (acido citrico), E621 (glutammato di sodio), E202 (sorbato di potassio) E 211 (benzoato di potassio), olio di semi di girasole
eventuale aggiunta di cetrioli e peperoni sott'aceto

Produttore 2:

Seppie, calamari, polpo, gamberi, cozze, sale, pepe, succo di limone concentrato, E202 (sorbato di potassio) E 575 (glucone delta lattone), olio di semi di girasole, olio di oliva, prezzemolo, carote, zucchine

Studi di shelf-life: Insalata di mare

Produttore 3:

Seppie, calamari, polpo, gamberi, cozze, sale, pepe, succo di limone concentrato, E202 (sorbato di potassio) E 575 (glucone delta lattone), olio di semi di girasole, olio di oliva, prezzemolo, carote, zucchine

Produttore 4:

Seppie, totani, polpo, gamberi, cozze, sale, pepe, succo di limone concentrato, olio di semi di girasole, prezzemolo, peperoni sott'aceto

Studi di shelf-life: Insalata di mare

pH verificato ad inizio sperimentazione:

Produttore 1: 4,89 (senza verdure), 4,84 (con verdure)

Produttore 2: 5,99

Produttore 3: 4,82

Produttore 4: 4,05

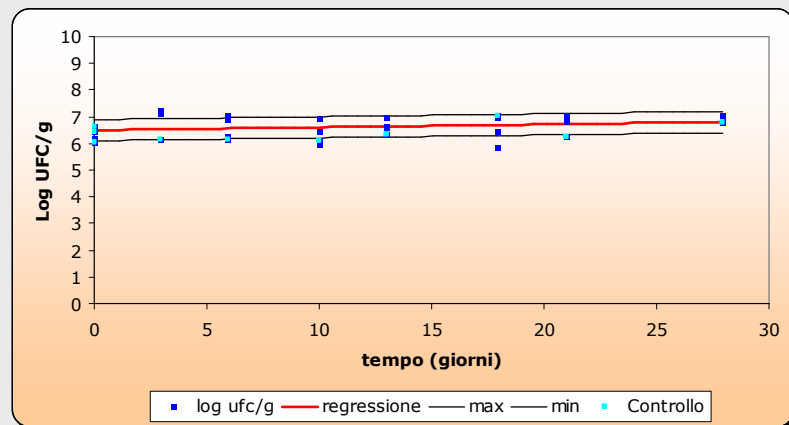
Aw superiore a 0,940 in tutti i produttori

Studi di shelf-life: Insalata di mare

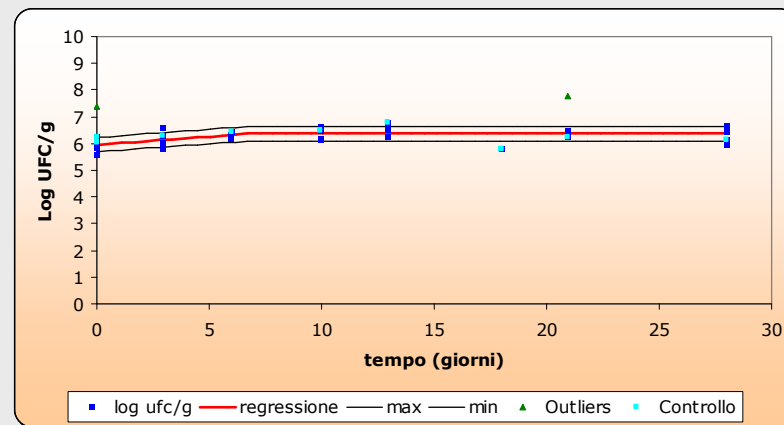
- ✓ Contaminazione dei prodotti con miscela di 3 ceppi di *L. monocytogenes* isolati da prodotti a base di pesce in modo da ottenere una contaminazione iniziale di 10^2 - 10^3 ufc/g.
- ✓ Confezionamento “al naturale”
- ✓ Conservazione aliquote a 5, 10, 15 e 20°C

Studi di shelf-life: Insalata di mare

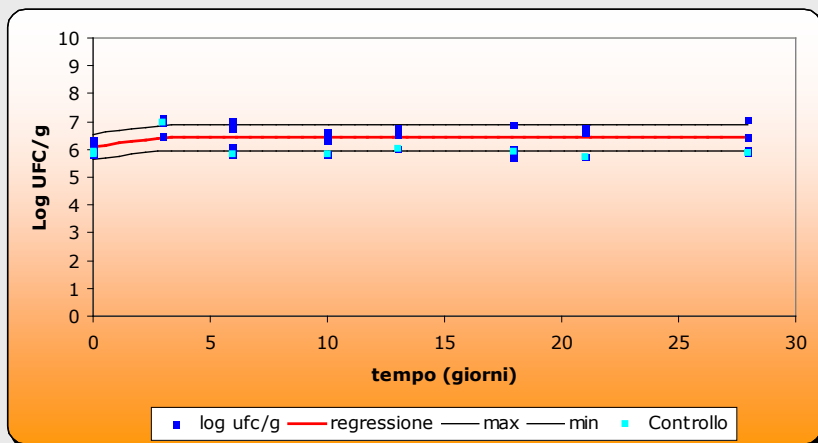
produttore 1: CBT a 5°C (con verdure)



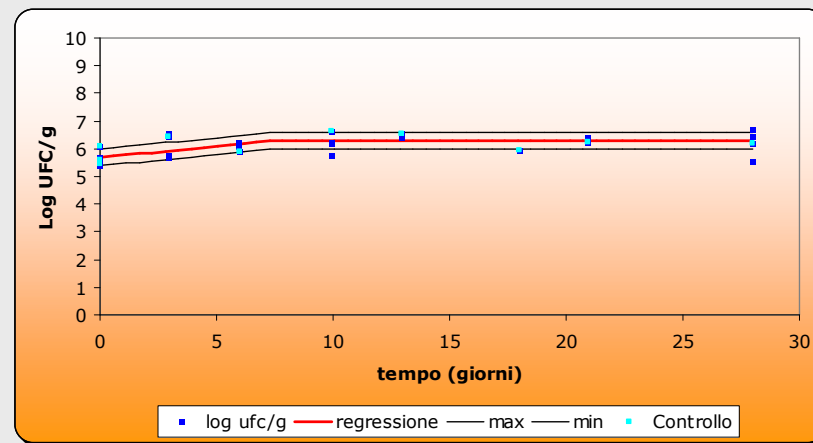
produttore 1: CBT a 5°C (senza verdure)



produttore 1: LA a 5°C (con verdure)



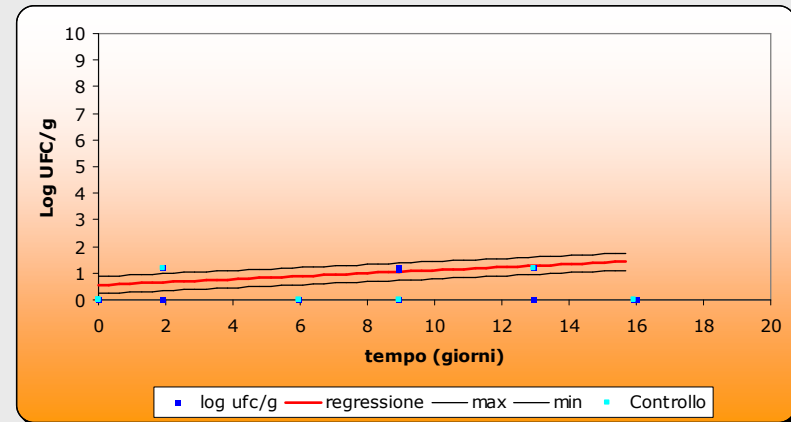
produttore 1: LA a 5°C (con verdure)



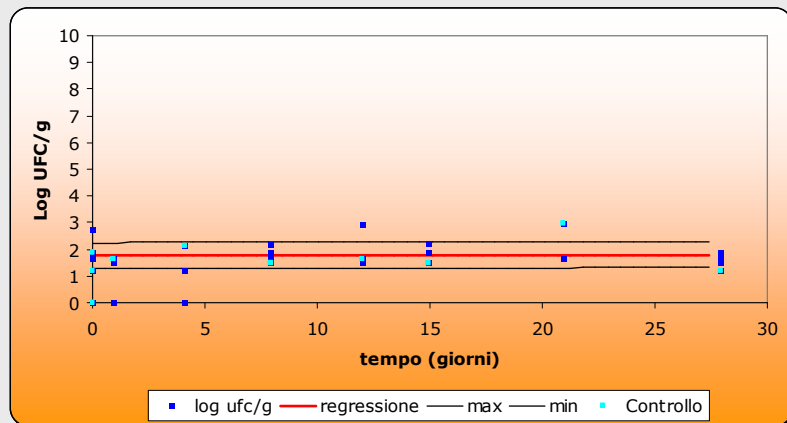
Studi di shelf-life: Insalata di mare

produttore 2: non evidenziata
presenza di lattobacilli mesofili a 5°C

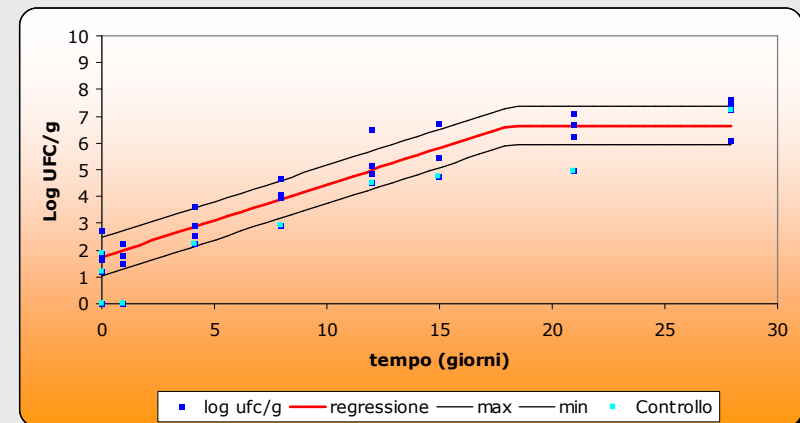
produttore 4: LA a 5°C



produttore 3: LA a 5°C

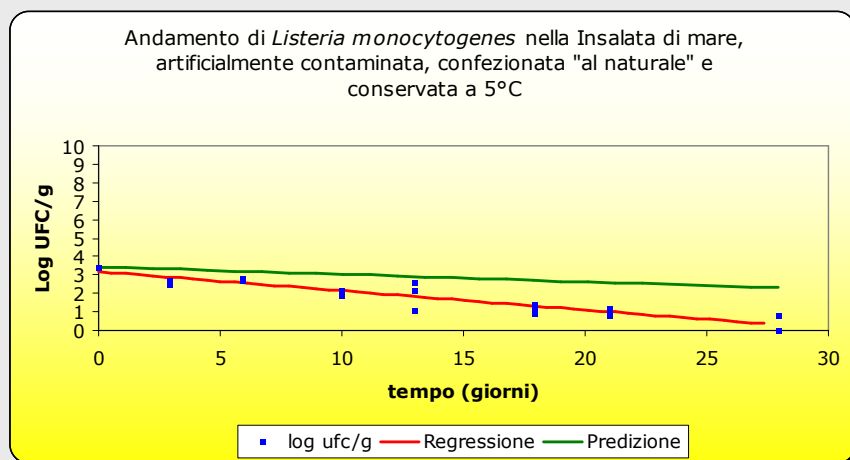


produttore 3: LA a 10°C

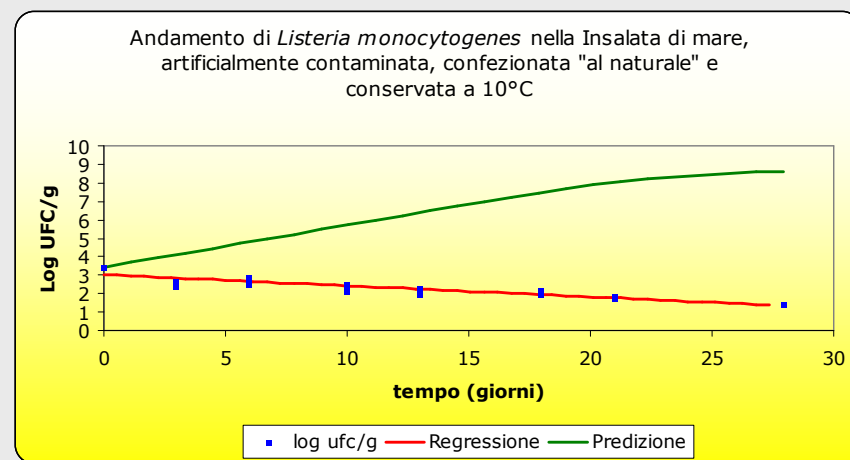


Studi di shelf-life: Insalata di mare

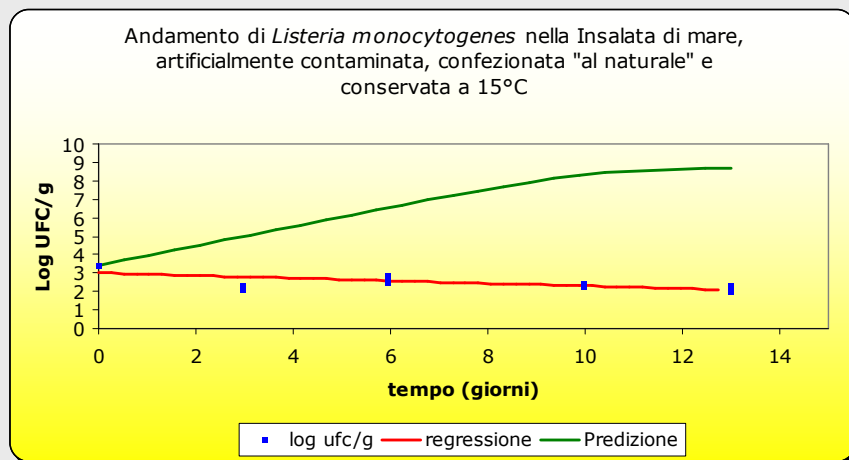
produttore 1: D a 5°C = 9gg 16hh ± 21 hh



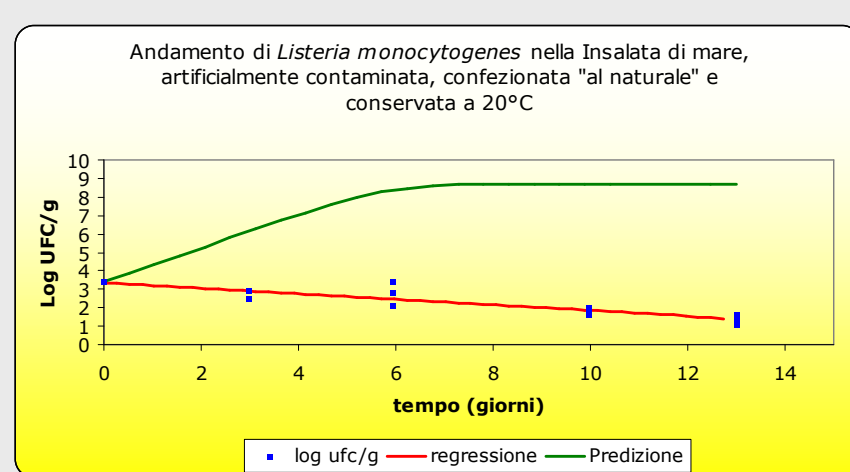
produttore 1: D a 10°C = 16gg 16hh ± 1 gg 13 hh



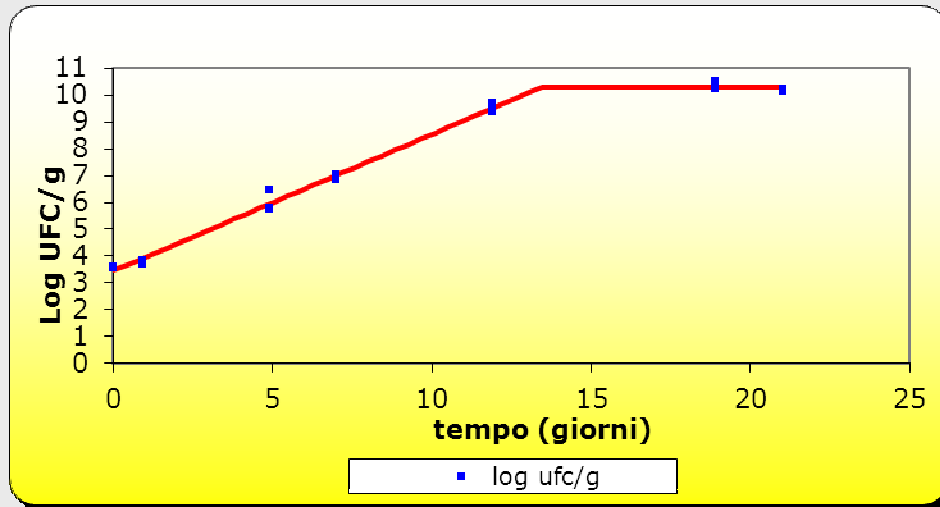
produttore 1: D a 15°C = 14gg 2hh ± 4 gg 5 hh



produttore 1: D a 20°C = 6gg 14hh ± 21 hh



Studi di shelf-life: Insalata di mare

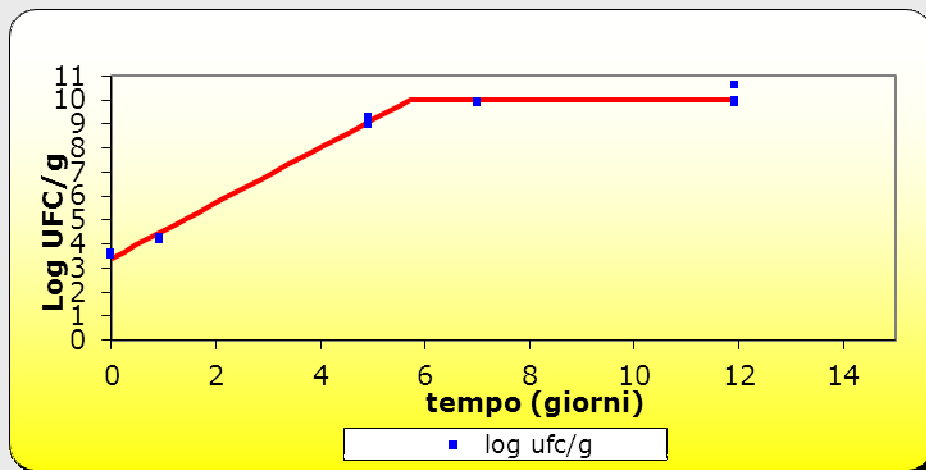


Prodotto 2

Td a 5°C: 14 ore

tempo per arrivare a 100 ufc/g

da 1 ufc/g = 3gg e 22 ore



Prodotto 2

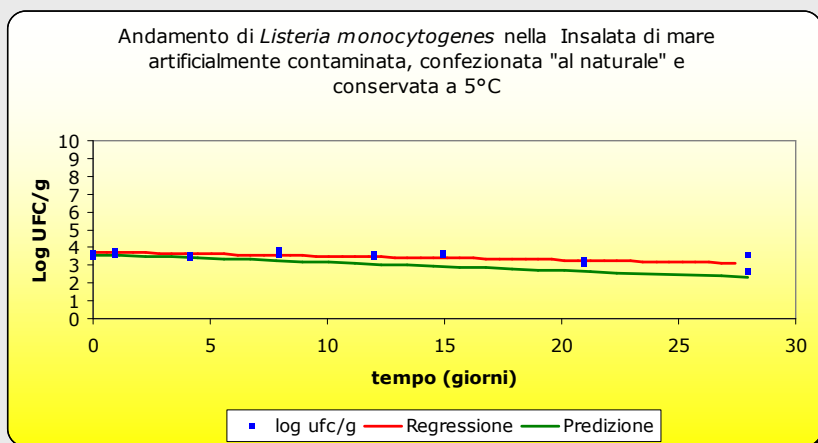
Td a 10°C: 6 ore

tempo per arrivare a 100 ufc/g

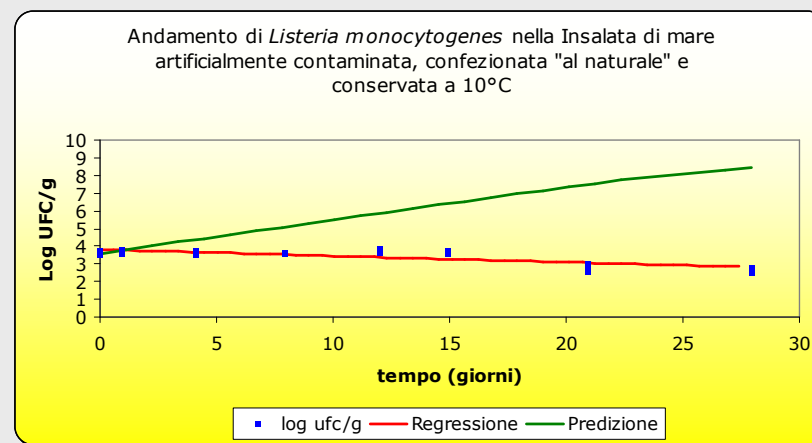
da 1 ufc/g = 1gg e 18 ore

Studi di shelf-life: Insalata di mare

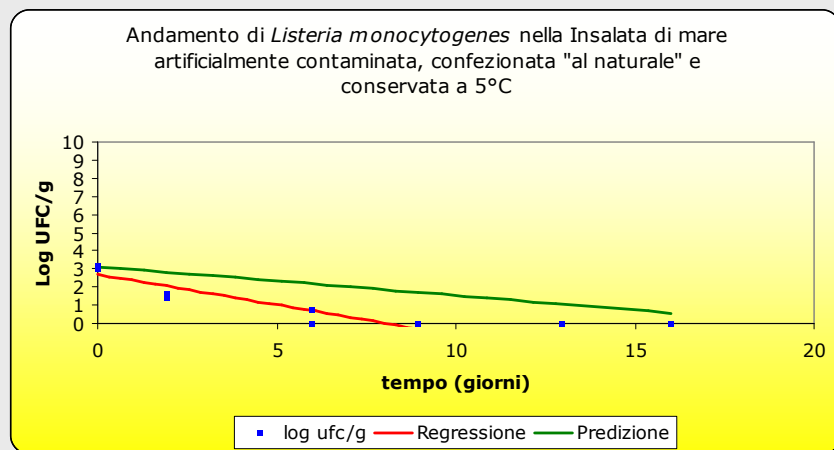
produttore 3: D a 5°C = 44gg 15hh ± 10gg 18 hh



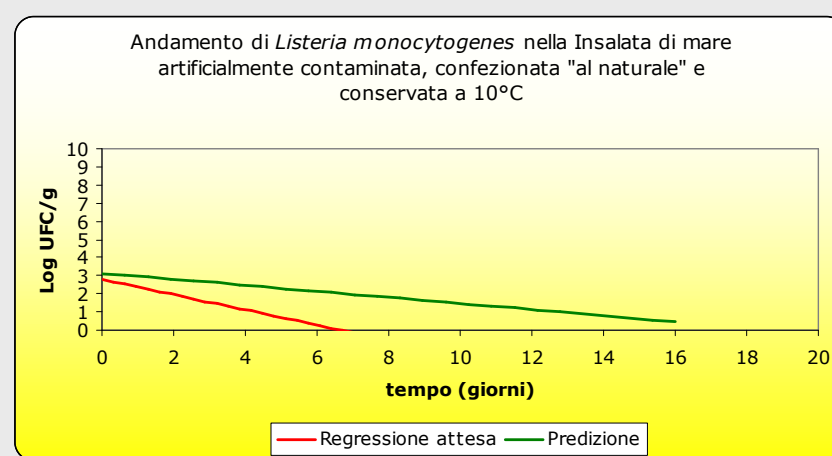
produttore 3: D a 10°C = 28gg 2hh ± 4 gg 9 hh



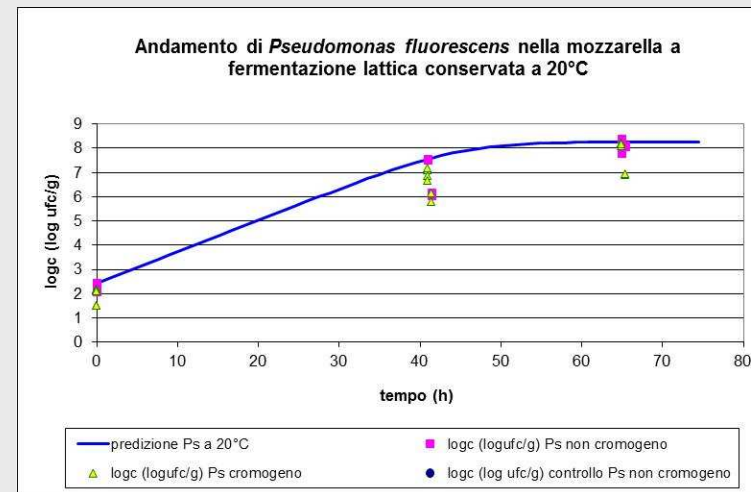
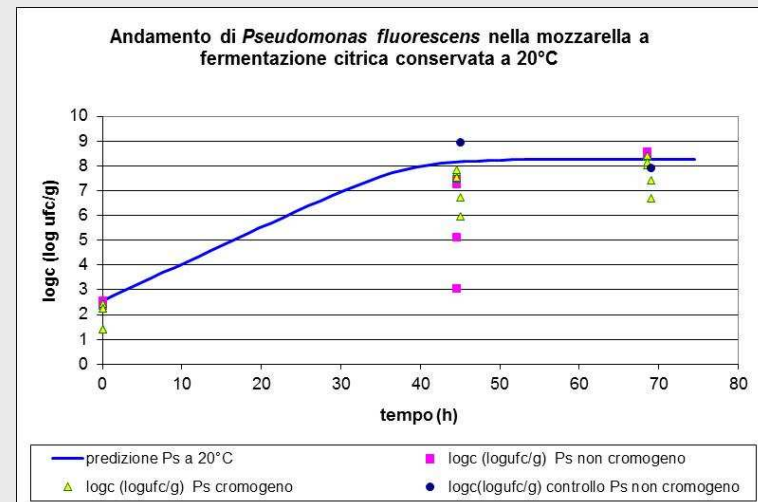
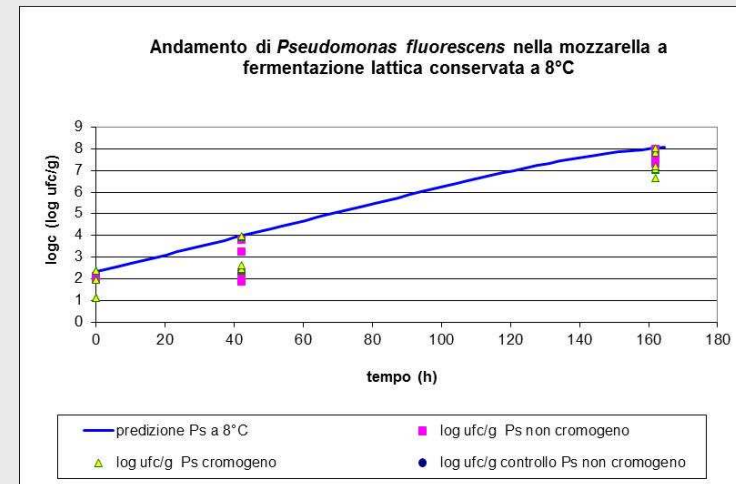
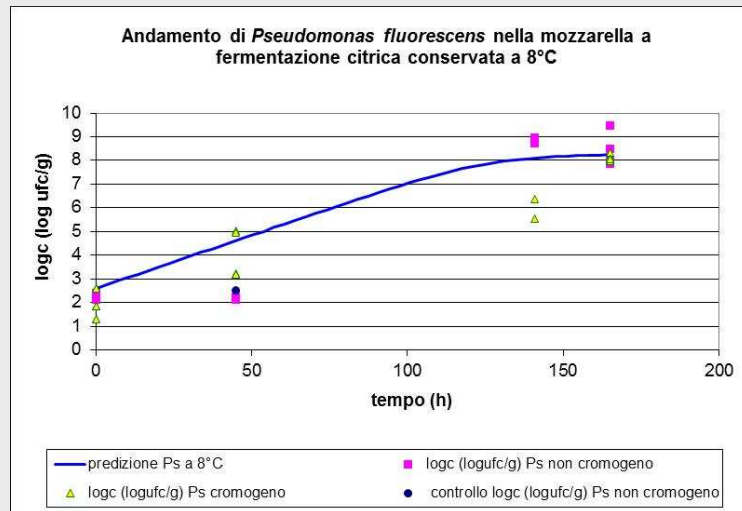
produttore 4: D a 5°C = 2gg 23hh ± 13 hh



produttore 4: D a 10°C = 2gg 9hh ± 14 hh

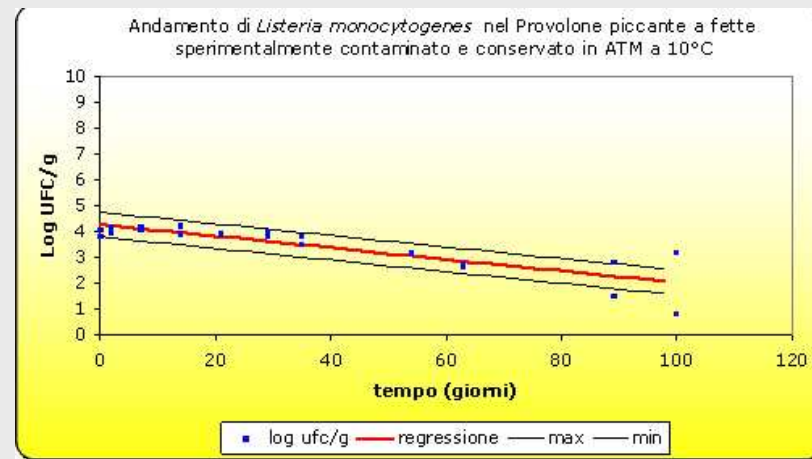
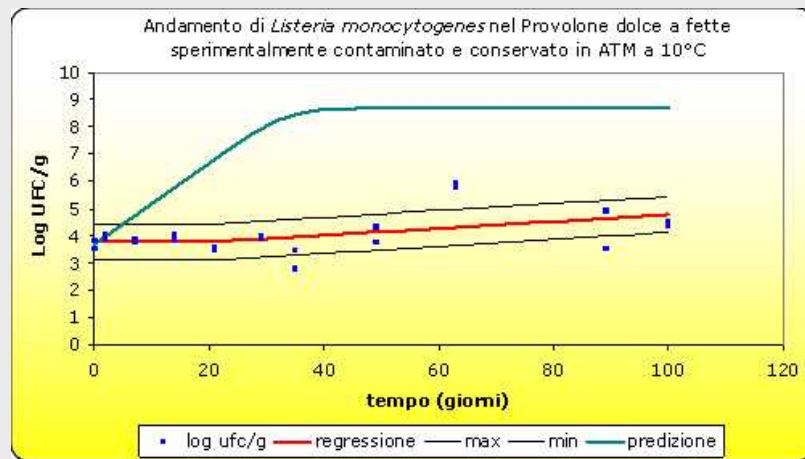
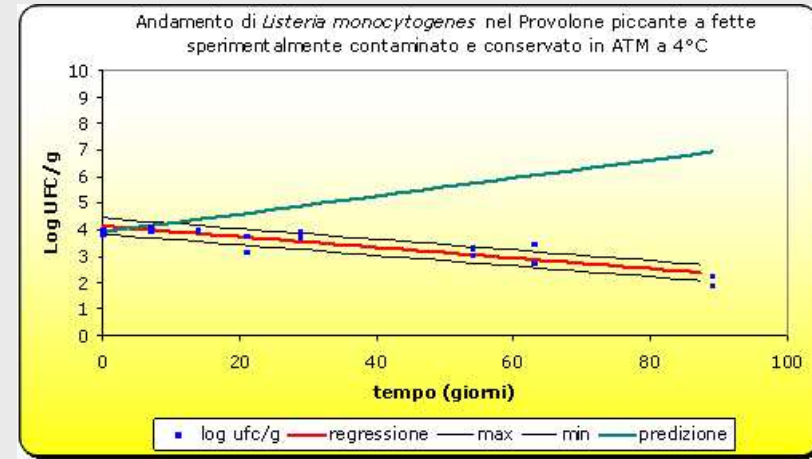
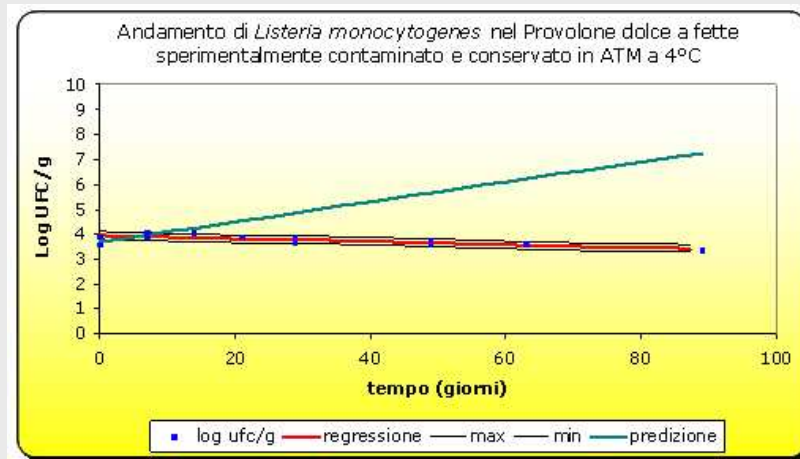


Confronto tra processi / prodotti



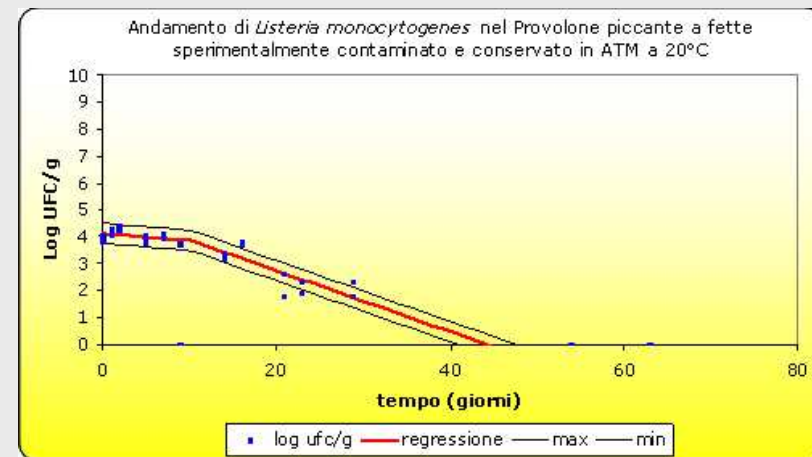
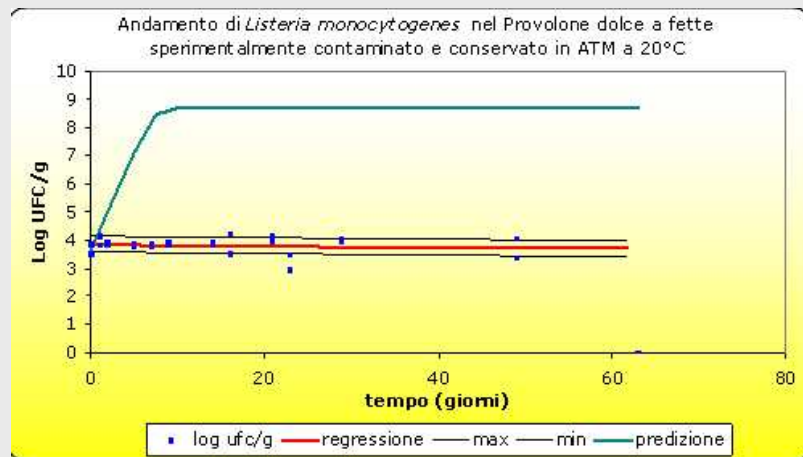
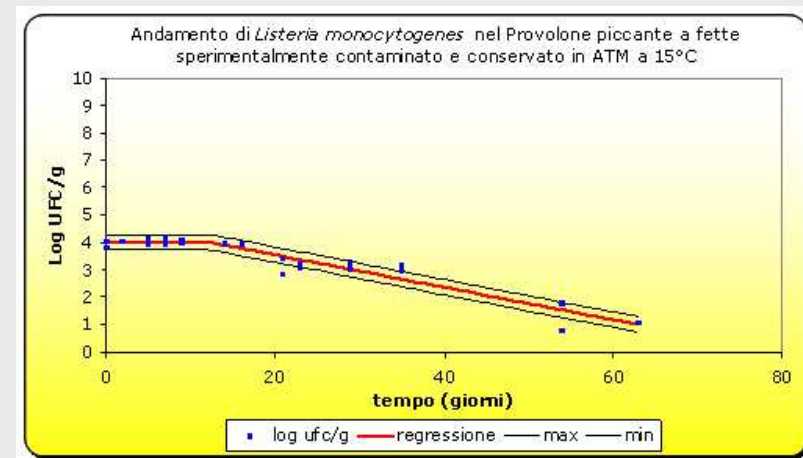
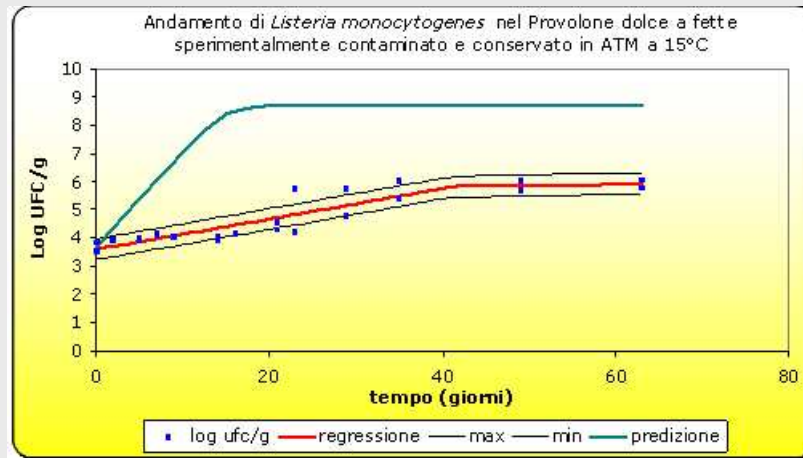
Studi di shelf-life

Mezzelune di provolone confezionate in ATM



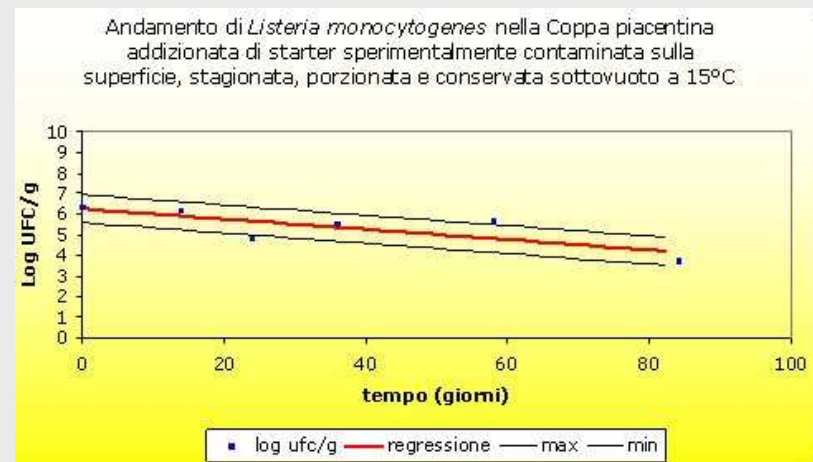
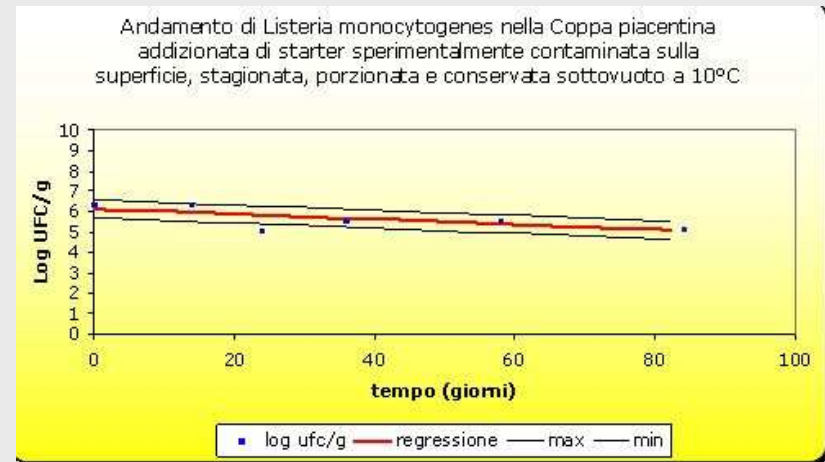
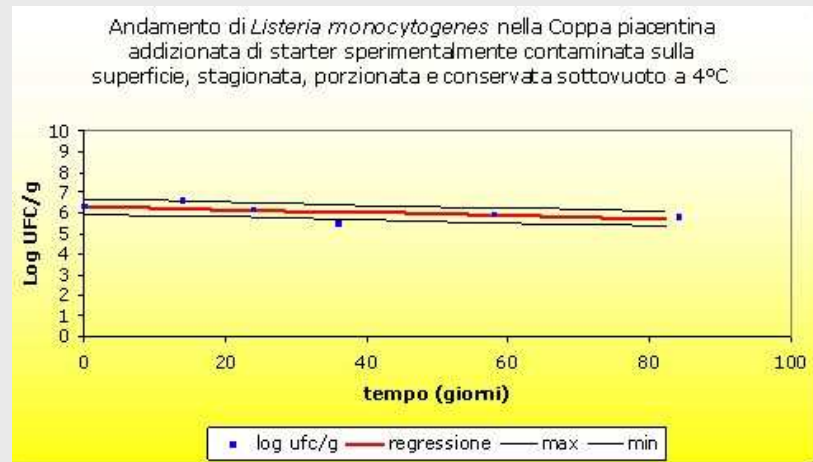
Studi di shelf-life

Mezzelune di provolone confezionate in ATM



Studi di shelf-life

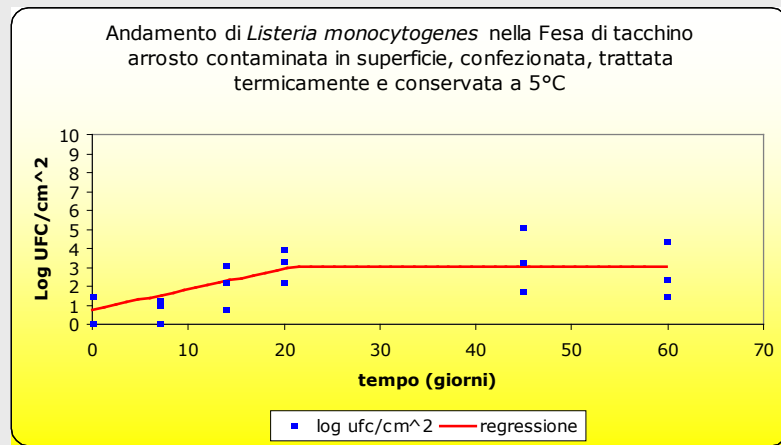
Coppa affettata: *L. monocytogenes*



La Coppa contaminata affettata non supporta la crescita di *L.monocytogenes* in differenti condizioni di conservazione

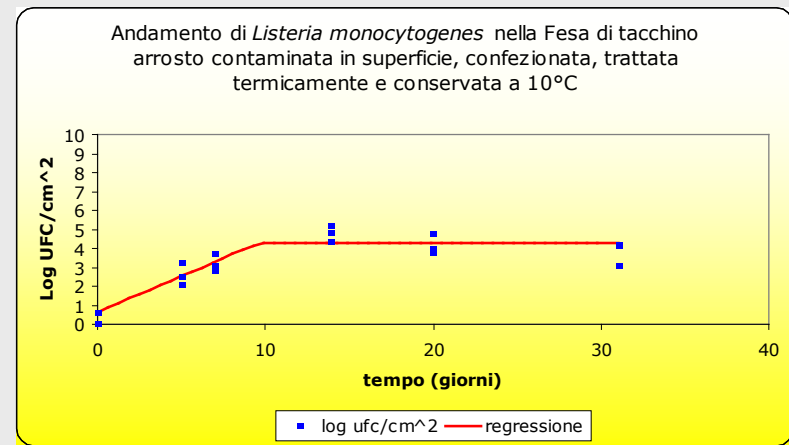
Studi di shelf-life

Fesa di tacchino: *L. monocytogenes*



Td = 2 gg 19 hh ± 1 gg e 13 hh

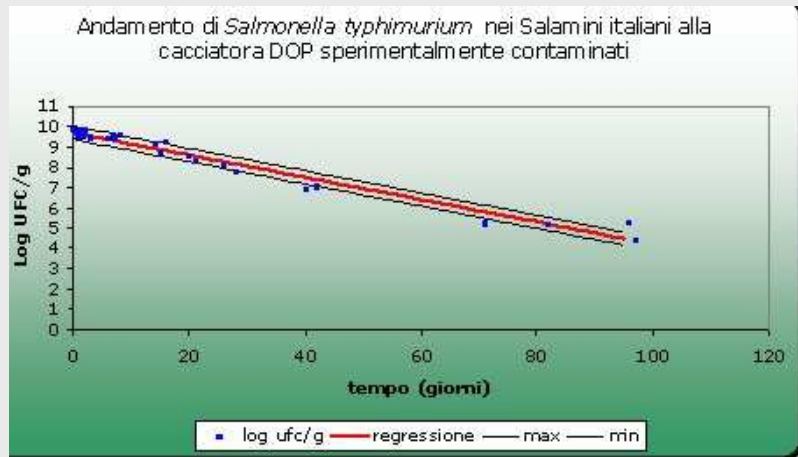
Tempo per arrivare a 100 ufc/cm²
partendo da 1 ufc/cm² = 18 gg 14 hh



Td = 19 hh ± 5 hh

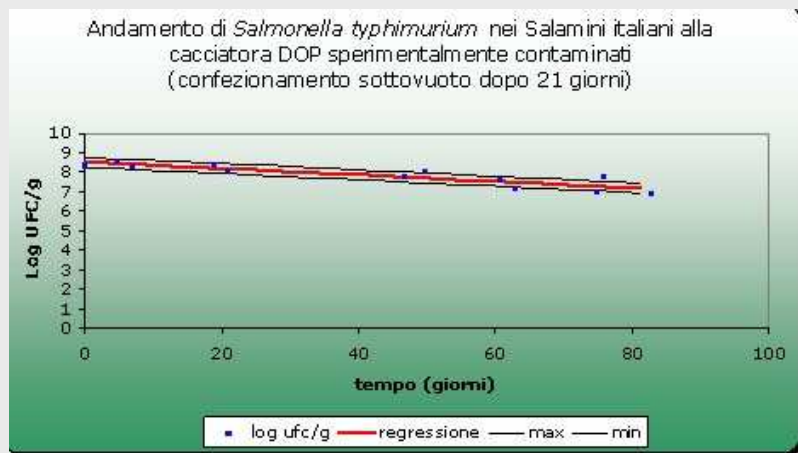
Tempo per arrivare a 100 ufc/cm²
partendo da 1 ufc/cm² = 5 gg 7 hh

Valutazione modalità di confezionamento



Salmonella typhimurium nei Salamini alla cacciatora DOP (stagionatura):

D = 9gg e 17hh



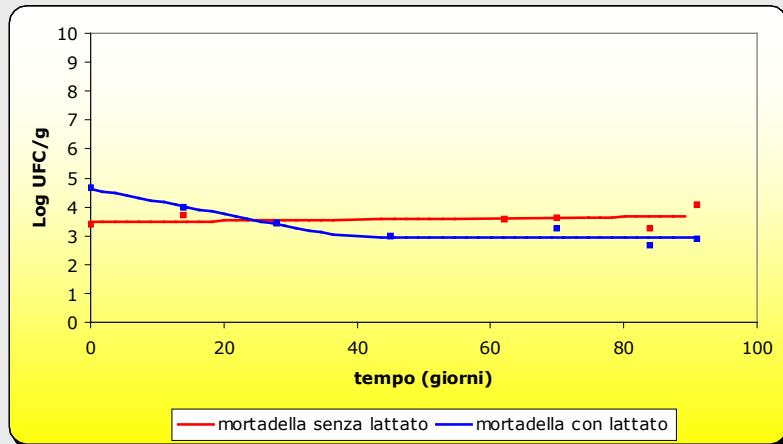
Salmonella typhimurium nei Salamini alla cacciatora DOP (sottovuoto):

D = 60gg e 10hh

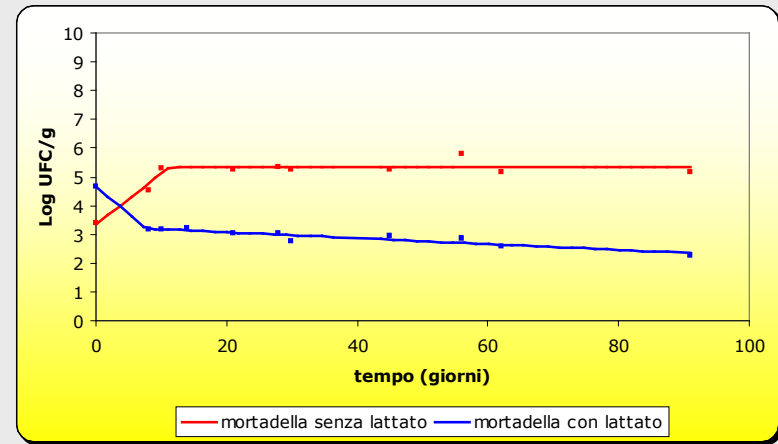
Valutazione utilizzo conservanti

Mortadella affettata: *L. monocytogenes*

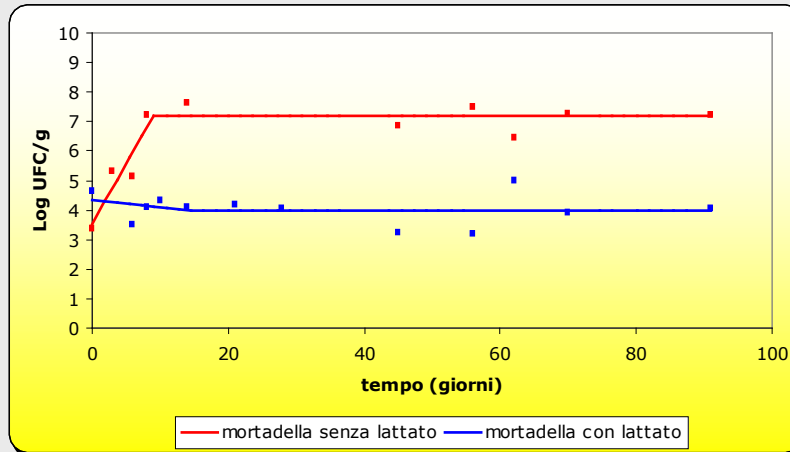
5°C



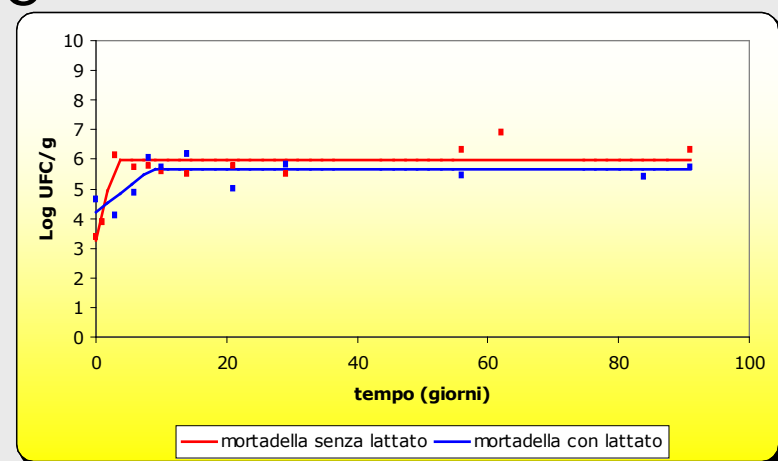
10°C



15°C



20°C



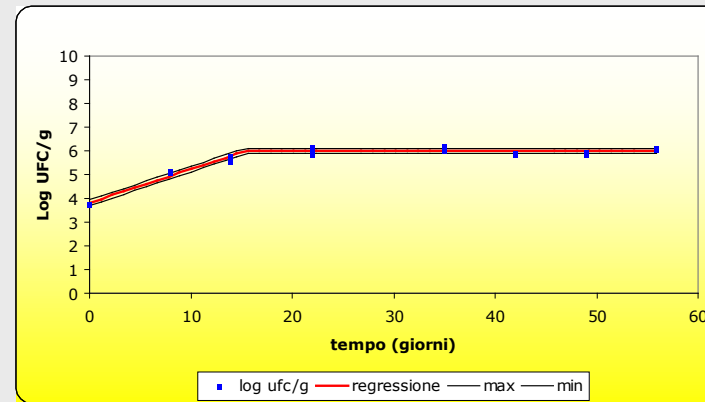
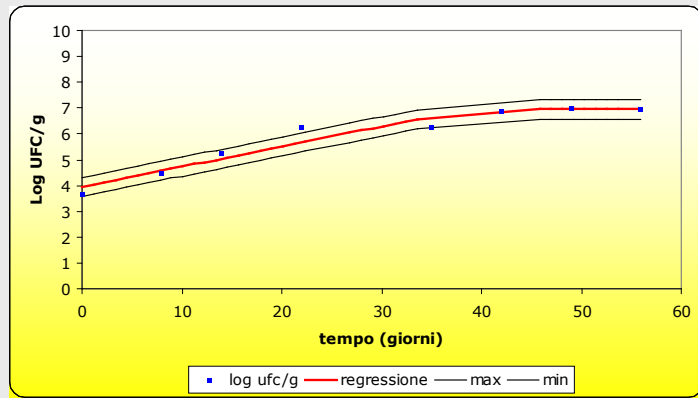
Valutazione utilizzo conservanti

Nervetti cubettati: *L. monocytogenes*

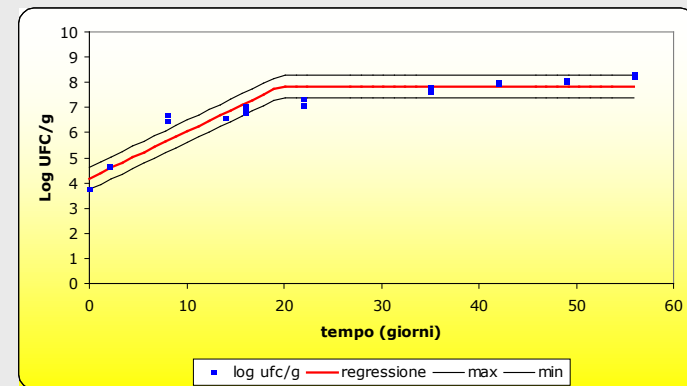
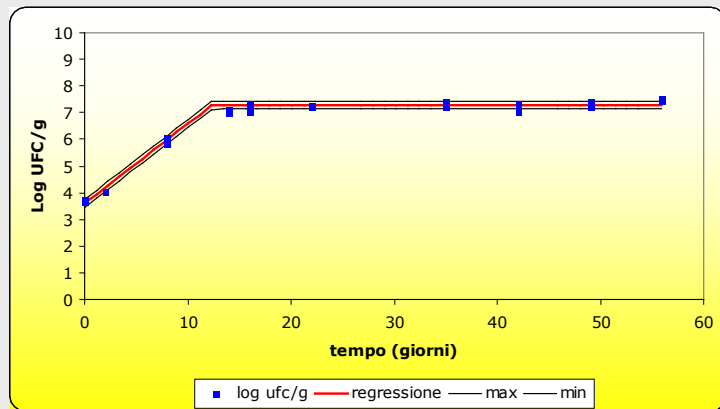
Con conservante (E262)

Senza conservante

4°C



10°C





Challenge test per determinare shelf-life

- ✓ conoscenza dell'alimento
- ✓ valutazione dei rischi
- ✓ pianificazione della prova
- ✓ locali per eseguire contaminazioni
- ✓ rielaborazione ed interpretazione risultati

GRAZIE PER L'ATTENZIONE



Dr. Guido Finazzi

Tel 0302290335 fax 0302290556

guido.finazzi@izsler.it