

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

**I risultati della ricerca corrente IZS LT  
06/09: Valutazione dei rischi relativi a  
prodotti alimentari pronti, anche a filiera  
corta. Studio del contenimento dei rischi  
secondo le indicazioni recenti: Regolamenti  
CE**



**Dott.ssa Francesca Novello**

*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*

Istituto Zooprofilattico Sperimentale Lazio e Toscana -  
Sezione di Pisa - \* Tesiste

*Il nostro laboratorio, coinvolto come molti altri laboratori, ha approfondito il problema: il risultato è stato un allenamento inconsueto (nell'era delle procedure standard), che ci ha permesso di spaziare tra le metodiche di conteggio consolidate, la microbiologia predittiva, i challenge tests e lo studio di nuovi terreni di coltura.*



13 aprile 2011



# Laurea in Scienze e Tecnologie delle Produzioni Animali

“Valutazione dell'igiene degli  
alimenti attraverso nuove  
discipline inerenti la  
microbiologia ”

## ATTESTATO PREMIO GIORGIO BIANCHINI

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

Autore/i R. Fischetti, I. Fabbri, F. Campana, F. Marello\*, R. Bazzani\*,  
C. Pace, C. Milioni, L. Gasperetti, R. Forlitta  
Ist. Zootecnico Lario e Toscano - Sez. Pisa \* Tesiste

Motivazione Per la chiarezza metodologica con cui si  
illustra, una delle prove di laboratorio che  
negli ultimi anni ha assunto un'importanza  
capitale



Presentato alla

XVIII CONFERENZA NAZIONALE

LA SICUREZZA MICROBIOLOGICA  
NELLA PRODUZIONE DI ALIMENTI  
PER IL 21° SECOLO

**Il deterioramento microbico  
di alimenti e bevande:  
interventi di prevenzione,  
sorveglianza e controllo**

svoltasi a

BOLOGNA, 31 MAGGIO 2011

Comitato Scientifico

ORGANIZZATA DA Facoltà di Chimica Industriale,  
Dipartimento di Chimica Industriale e dei Materiali,  
Università di Bologna

CON IL SUPPORTO DI



Part of Thermo Fisher Scientific



# Mozzarelle Blu

- All'inizio di giugno 2010 sono iniziate segnalazioni, riguardo alla presenza sul mercato italiano di mozzarelle con colorazione anomala blu che hanno generato in principio un allarmismo, con impatti socialmente rilevanti nella popolazione.
- La Sezione di Pisa dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Regioni Lazio e Toscana ha ricevuto durante il corso dell'estate numerosi campioni di mozzarella in seguito a reclami presentati da privati cittadini o indagini da parte dell'Azienda Sanitaria Locale, relativi alla colorazione blu.

# *Pseudomonas fluorescens*

- La causa della colorazione blu è stata agevolmente ricondotta alla proliferazione di un germe Gram negativo *Pseudomonas fluorescens*, il quale è sempre presente nelle mozzarelle confezionate dove si sviluppa facilmente alle temperature di refrigerazione.
- I ceppi isolati da tutti i campioni sono stati identificati con metodi colturali, biochimici e sperimentali. La Sezione di Pisa è stata il punto di riferimento anche per gli altri laboratori dell'Istituto Zooprofilattico Lazio e Toscana.

# PSEUDOMONAS FLUORESCENS

Pseudomonas fluorescens appartiene all'ordine Pseudomonadales, famiglia Pseudomonadaceae, genere Pseudomonas. La famiglia riveste una notevole importanza per i seguenti motivi:

- comprende specie patogene per l'uomo e i mammiferi come Ps. mallei e occasionalmente patogene come Ps. pseudo-mallei e Ps. aeruginosa; quest'ultima è in grado di provocare infezioni respiratorie in pazienti con problemi polmonari,
- comprende molte specie psicrotrofe responsabili di processi alterativi degli alimenti refrigerati che possono causare danni economici notevoli agli operatori del settore alimentare.



Lo scopo è stato quello di studiare l'evoluzione di *Pseudomonas fluorescens* colorante nelle mozzarelle per mezzo di un test sperimentale  $\mu_{Max}$  , che combina i modelli di microbiologia predittiva con il challenge test.

Il test è contemplato nel manuale AFSSA per sperimentazioni su *Listeria monocytogenes*.

Nel nostro caso è stata sperimentata l'applicazione su *Pseudomonas fluorescens* .





# MICROBIOLOGIA PREDITTIVA

- La microbiologia predittiva è una branca della microbiologia (in particolare della microbiologia degli alimenti) che si occupa di formulare modelli matematici che descrivono la crescita, la produzione di metaboliti e la morte dei microrganismi in una varietà di condizioni diverse, rilevanti per la conservazione e/o per la sicurezza igienica degli alimenti.
- Il processo di modellazione si svolge a vari livelli in modo strutturato, utilizzando disegni sperimentali adeguati.

# CHALLENGE TEST

- Effettuare un challenge test microbiologico significa contaminare l'alimento con una determinata quantità di un organismo in condizioni ambientali controllate e poi seguire analiticamente l'evoluzione nelle successive fasi.



## $\mu_{\max}$ MAXIMUM GROWTH RATE 1

- E' il tasso massimo di crescita nell'unità di tempo.
- Combina i modelli di microbiologia predittiva con i challenge test.
- Lo studio del  $\mu_{\max}$  si effettua misurando il tasso di crescita del microrganismo target in un alimento artificialmente contaminato, mantenuto ad una data temperatura, che non è necessariamente la stessa che si userà per la predizione.

# $\mu_{\max}$ MAXIMUM GROWTH RATE

## 2

- Ognuno di 3 lotti è saggiato separatamente con ceppi a più rapida crescita, per cui si ottengono 6 curve
- Per la determinazione del  $\mu_{\max}$  servono da 10 a 15 unità per ognuna delle 6 curve
- Il  $\mu_{\max}$  si ottiene elaborando i dati del test. Nel nostro caso attraverso il programma MicroFit. L'unità di misura è ln/giorno .

## $\mu_{\max}$ MAXIMUM GROWTH RATE 3

- Si sceglie il tasso massimo delle 6 curve (2 curve per 3 lotti) per gli ulteriori calcoli.
- Attraverso una formula è possibile calcolare il  $\mu_{\max}$  ad altre temperature, così da poter avere i valori a varie diverse temperature stabilite per una determinata shelf-life.

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

# $\mu_{\max}$ MAXIMUM GROWTH RATE 4

- Considerando un modello senza lag fase né fase stazionaria, si calcolano i singoli contributi di crescita alle diverse temperature e si sommano
- $$\left( \mu_{\max T1(Ref)} \times d1 \text{ (gg a T di riferim)} \right) + \left( \mu_{\max T2} \times d2 \text{ (gg ad altra temp)} \right) + \dots$$

Dopo aver trasformato i valori in  $\text{Log}_{10}$  .
- Si ottiene così l'incremento totale di crescita nel periodo considerato (shelf-life).

# PRESTAZIONI DEL TEST

Questo tipo di challenge test permette di fornire:

- una stima della concentrazione del germe ad un dato giorno della shelf-life conoscendo la concentrazione iniziale
- una stima della massima concentrazione iniziale se ci si impone di non superare un dato limite ad un certo tempo o alla fine della shelf-life. (Ricordando che non vi sono limiti di norme per *Pseudomonas*)



# SPERIMENTAZIONE

## PRODOTTO USATO

Mozzarella confezionata. Shelf-life = 22 giorni. Impiegati 3 lotti.

SCELTI 2 CEPPI di *P. fluorescens* colorante: 44133 isolato da mozzarella 50178  
isolato da latte UHT

## UNITA' PER IL TEST

	Unità testate
Determinazione curve di crescita per $\mu_{\max}$	10 per curva
Numero <i>P. fluorescens</i> coloranti prima del test e alla fine	3 iniziali + 3 finali
Determinazione caratteristiche fisico-chimiche ( AW e pH )	3 iniziali + 3 finali
Conteggio microflora associata ( lattici )	3 ( 2 o 1 )

## METODO DI INOCULAZIONE

Contaminata la parte liquida dopo aver trasferito la mozzarella col suo liquido in busta presto-chiuso

Sono state condotte in parallelo per ogni ceppo prove di conteggio sia sulla unità iniziale che sulle singole.

Per simulare ragionevoli condizioni di conservazione il test è stato effettuato a 8° C. Uno dei 3 lotti di mozzarella è stato mantenuto a 5° C per verificare se l'estrapolazione matematica dei dati sperimentali ottenuti col  $\mu_{\max}$  corrispondesse alla crescita naturale di *Pseudomonas fluorescens* verificata sperimentalmente sullo stesso lotto.



# TERRENI USATI

1 - La differenziazione tra genere è stata effettuata tramite terreno *Pseudomonas Selective Agar (PSA)*.

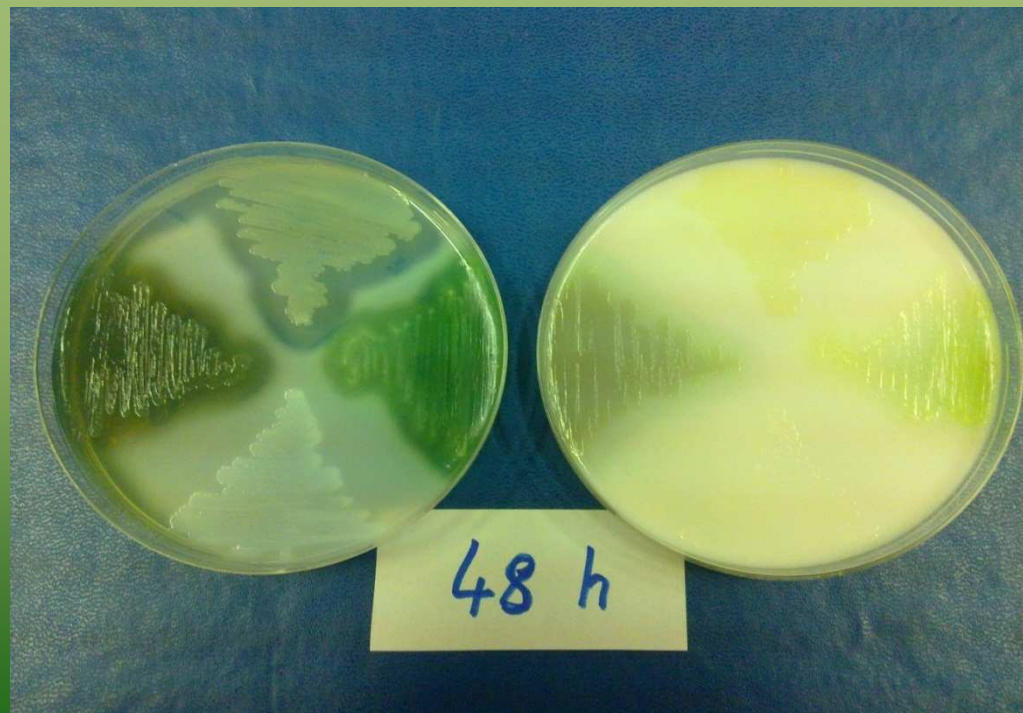
2 - La differenziazione tra *Pseudomonas fluorescens* e gli altri *Pseudomonas* è stata effettuata con un terreno apposito ( siglato con W ) messo a punto nel laboratorio.



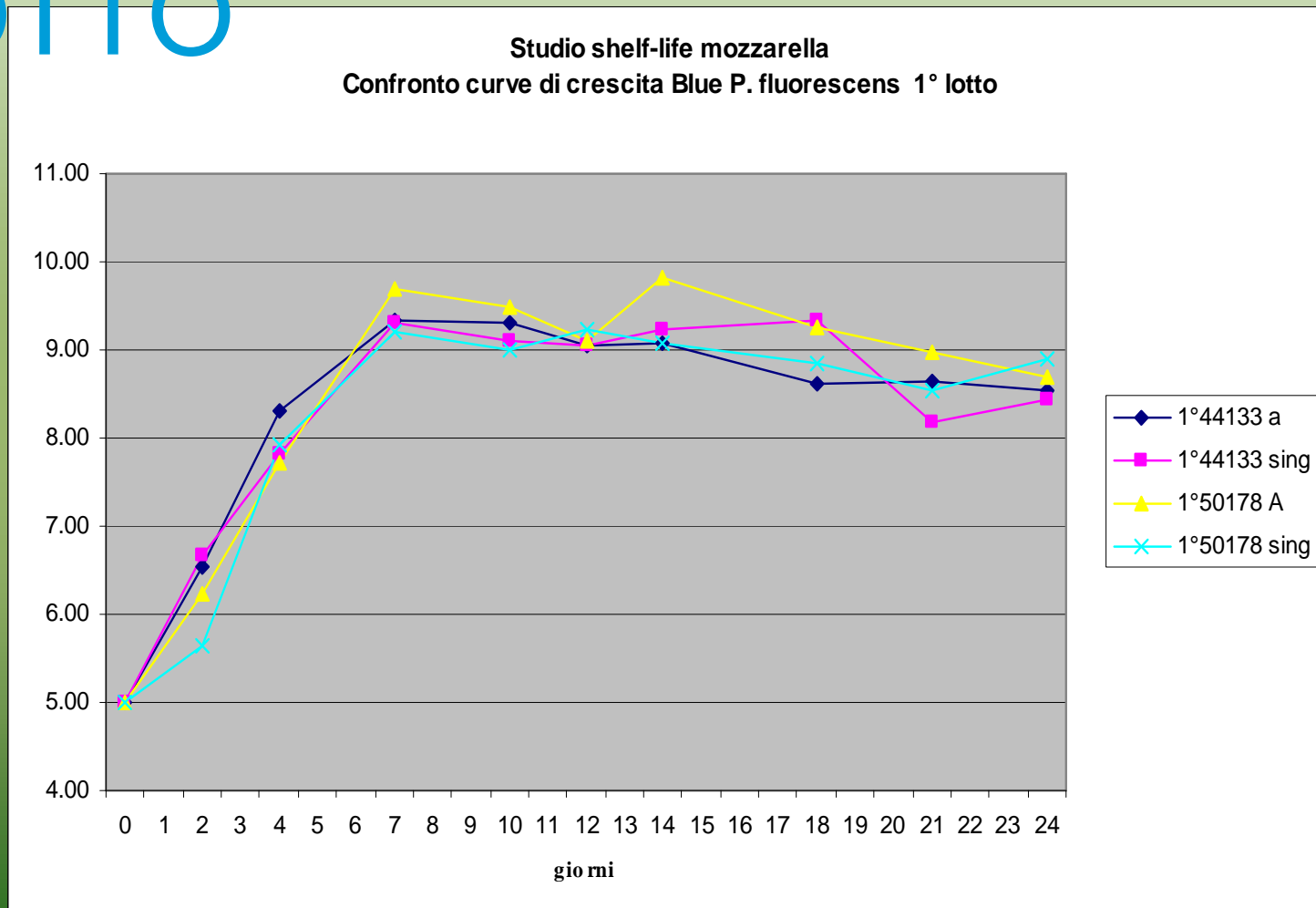
Diluizioni successive su terreno W, le colonie sono circondate da un alone trasparente

3 - E' stato sperimentato un terreno apposito anche per differenziare i ceppi coloranti da quelli non coloranti, ( siglato con Y ) messo a punto nel laboratorio. Il carattere differenziale è rappresentato da una pigmentazione blu-grigia del terreno intorno alle colonia di *Pseudomonas fluorescens* coloranti in blu, assente invece negli *Pseudomonas fluorescens* non coloranti in blu ed in altri *Pseudomonas* spp..

Queste reazioni si ottengono, a volte in misura minore sul terreno W.

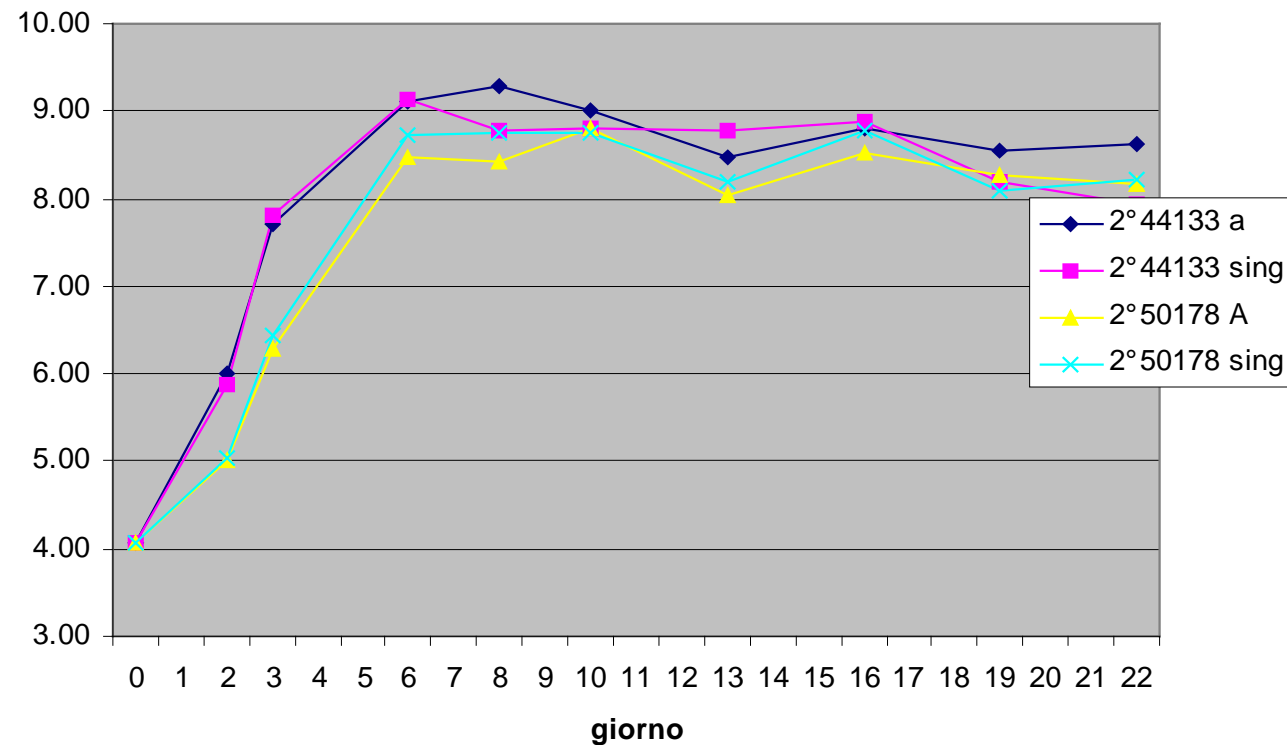


# GRAFICO OTTENUTO DAL 1° LOTTO

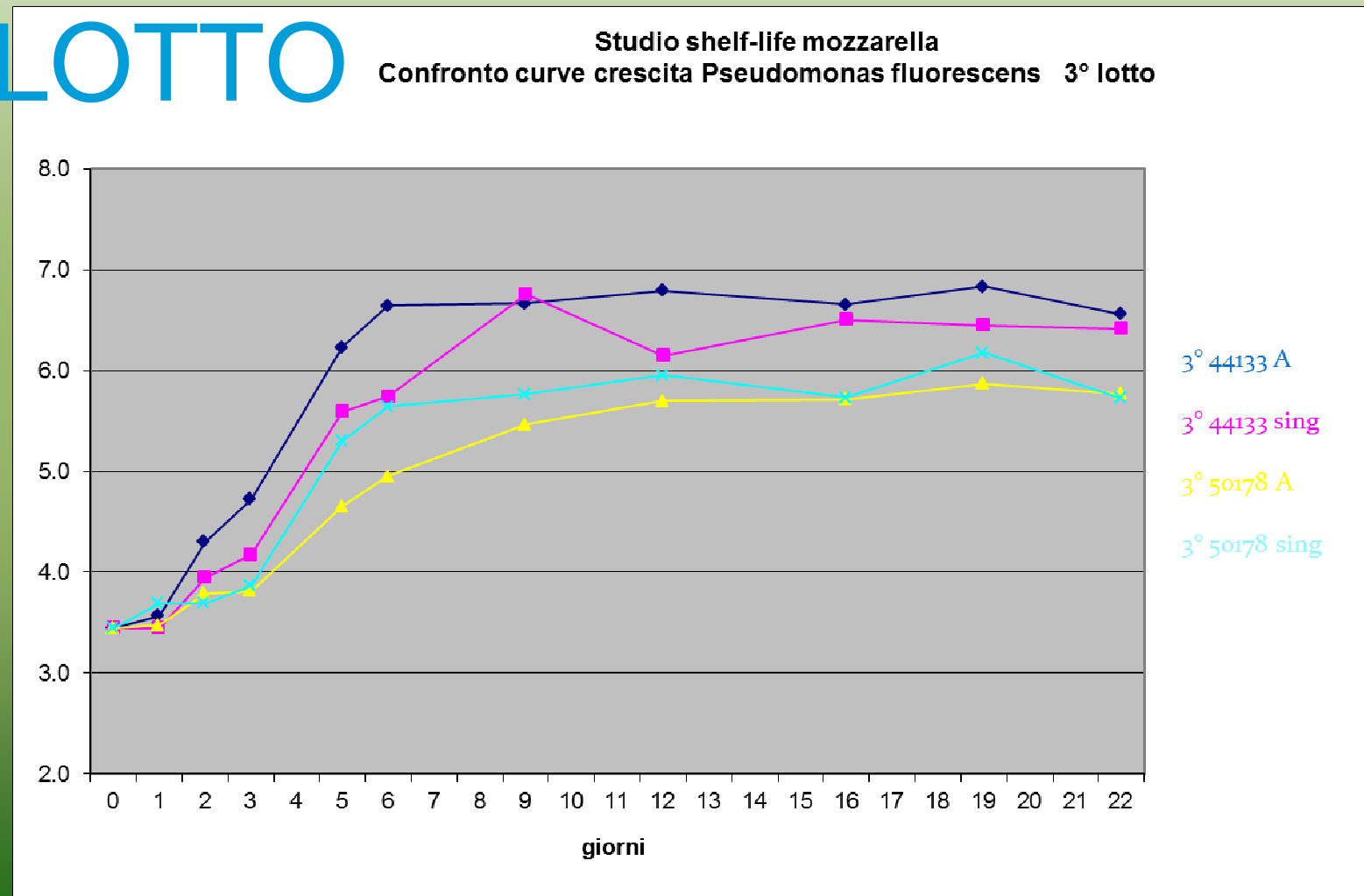


# GRAFICO OTTENUTO DAL 2° LOTTO

Studio shelf-life mozzarella  
Confronto curve di crescita Blue P. fluorescens 2° lotto

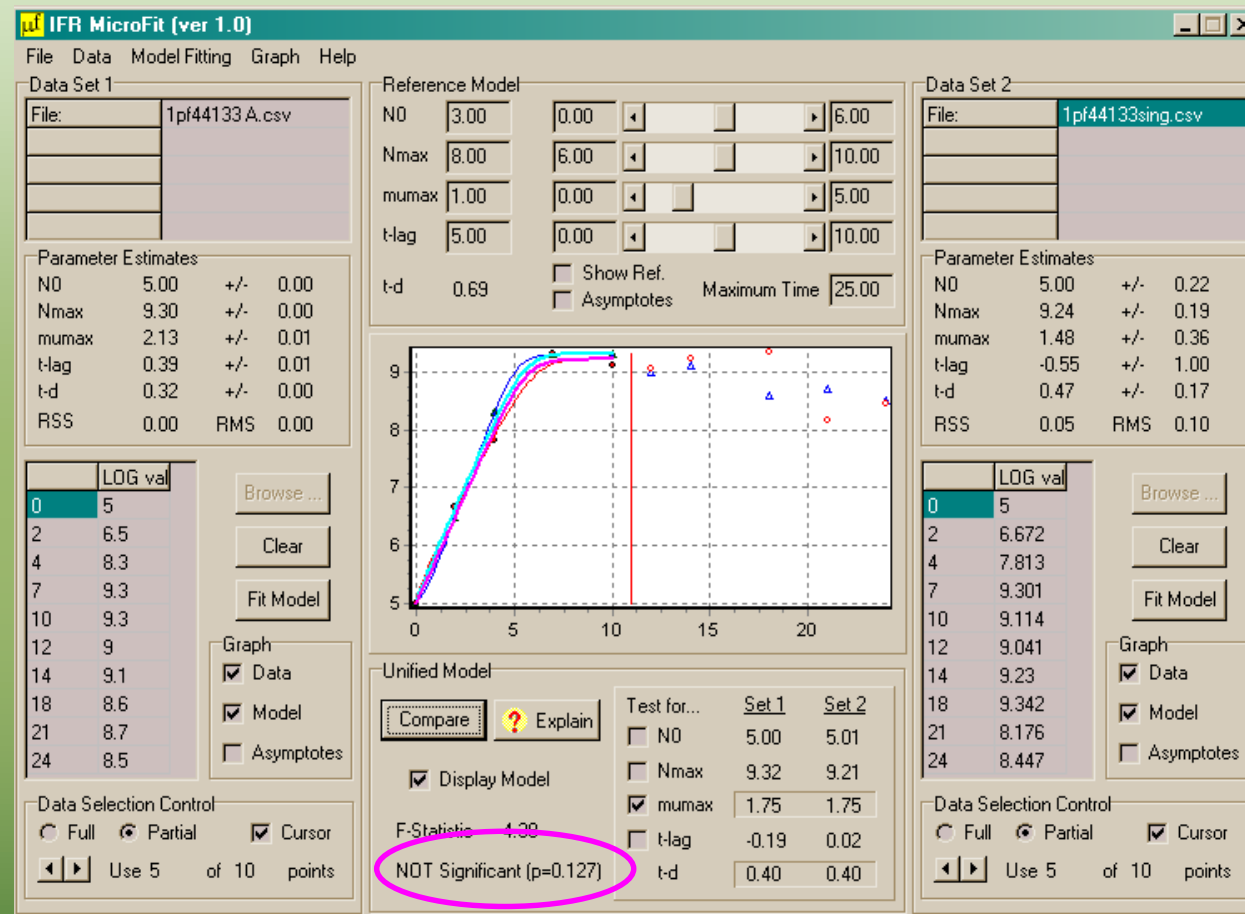


# GRAFICO OTTENUTO DAL 3° LOTTO



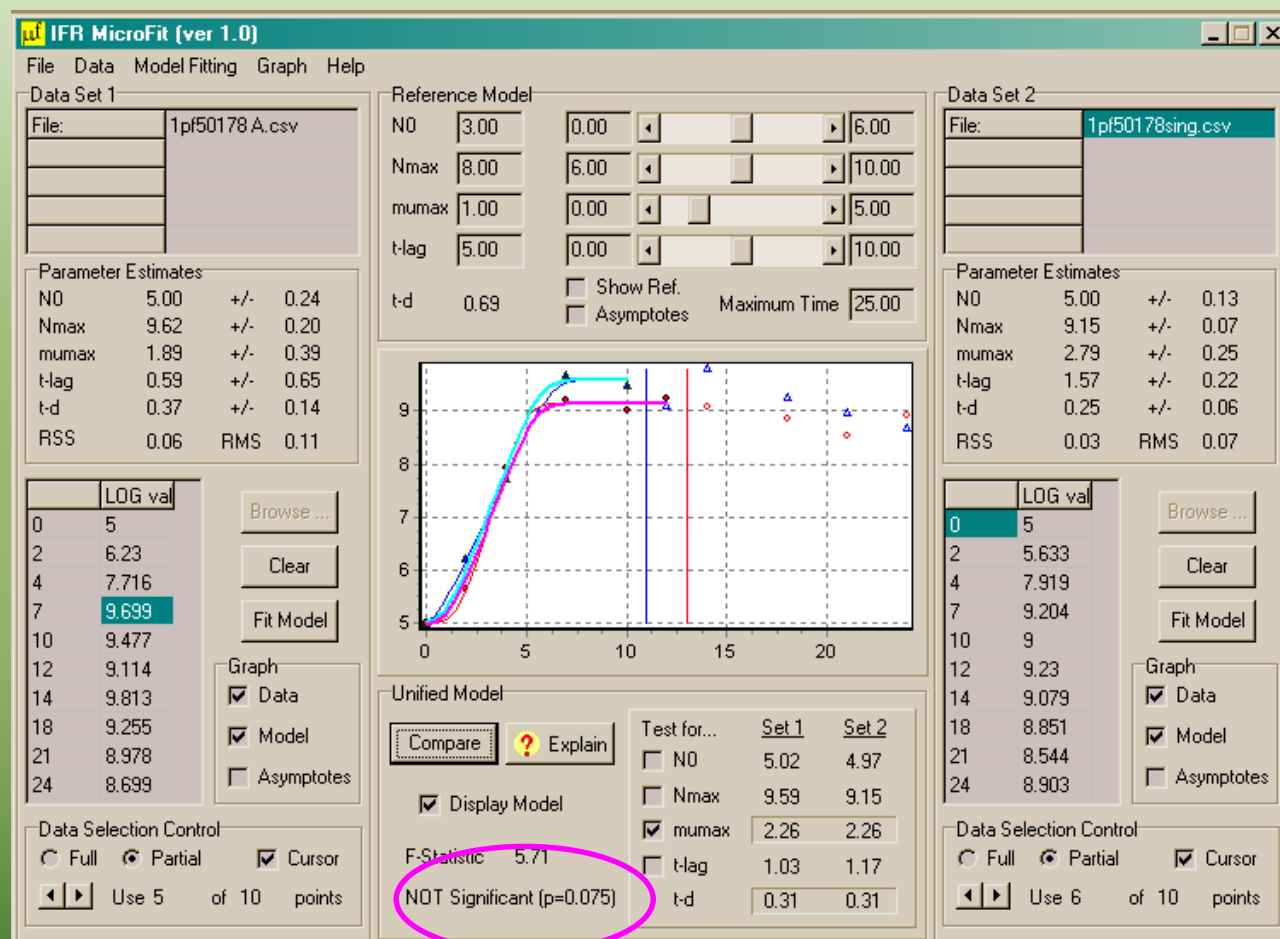


**Comparazione tra challenge effettuato su una sola unità e challenge effettuato su 10 unità**  
**Lotto 1**  
**Pseudomonas fluorescens ceppo 44133**



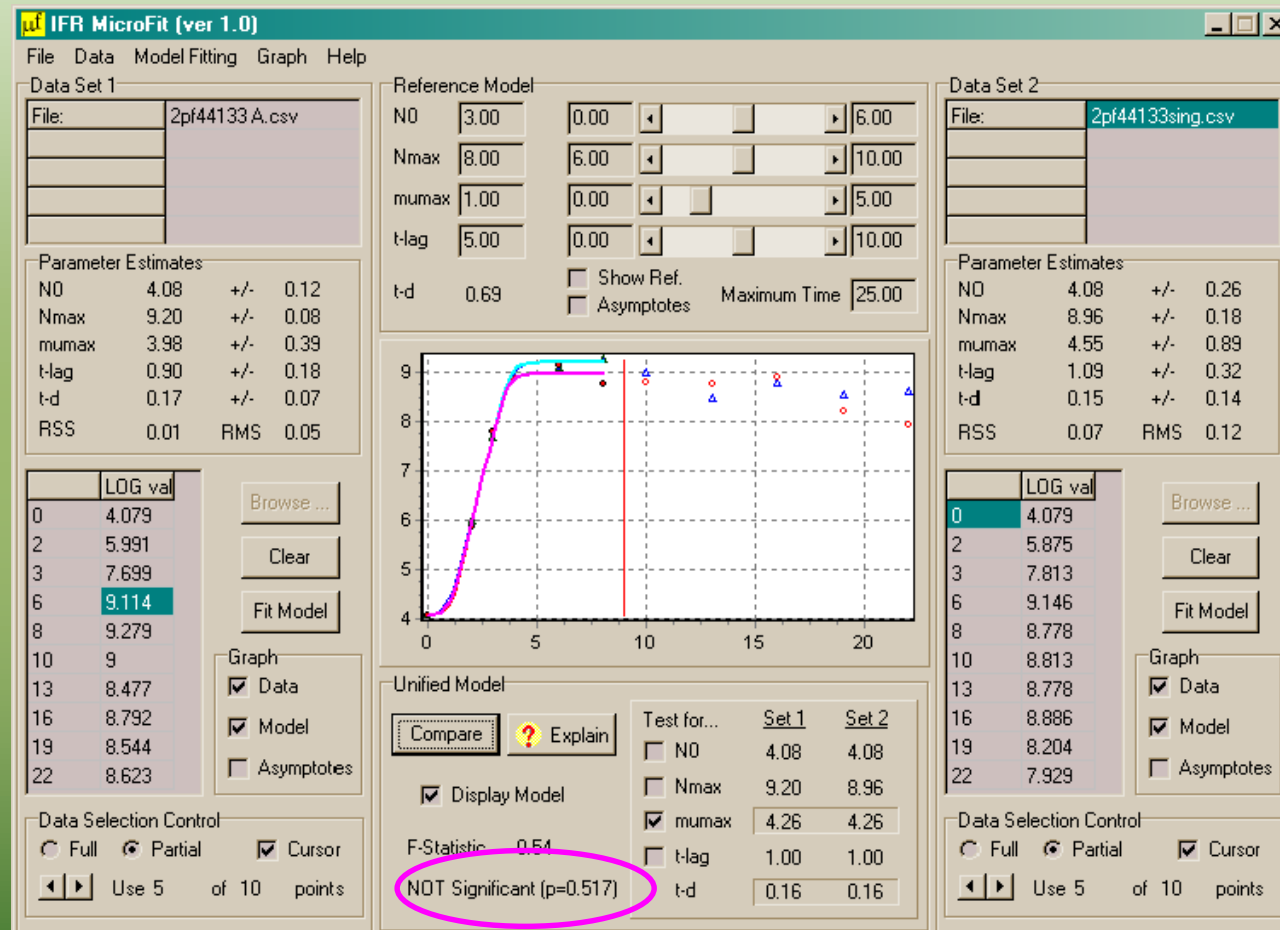
**La differenza tra i 2  $\mu_{\max}$  non è significativa, per cui i risultati dei 2 modelli di challenge sono sovrapponibili**

**Comparazione tra challenge effettuato su una sola unità e challenge effettuato su 10 unità Lotto 1**  
**Pseudomonas fluorescens ceppo 50178**



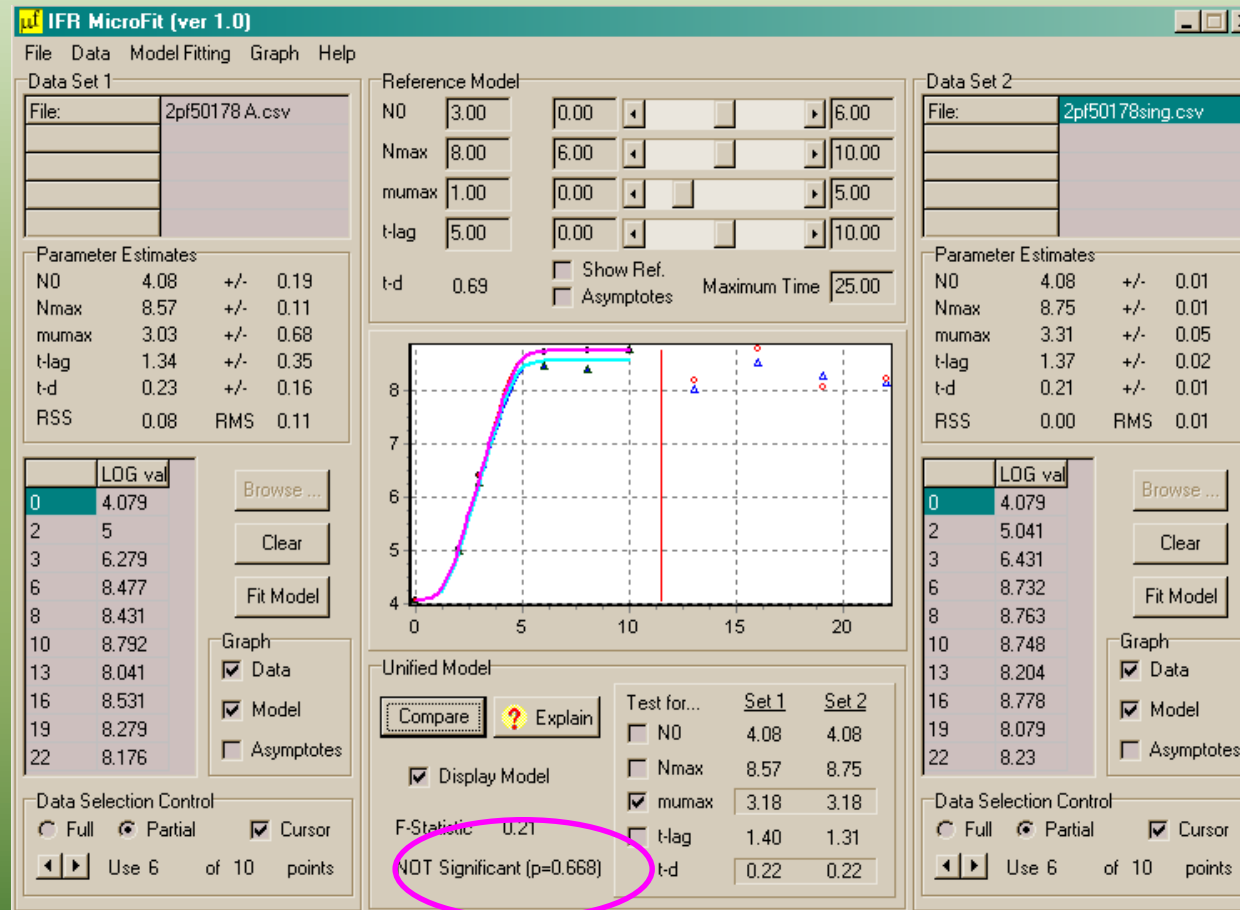
La differenza tra i 2  $\mu_{\max}$  non è significativa, per cui i risultati dei 2 modelli di challenge sono sovrapponibili

**Comparazione tra challenge effettuato su una sola unità e challenge effettuato su 10 unità Lotto 2**  
***Pseudomonas fluorescens* ceppo 44133**



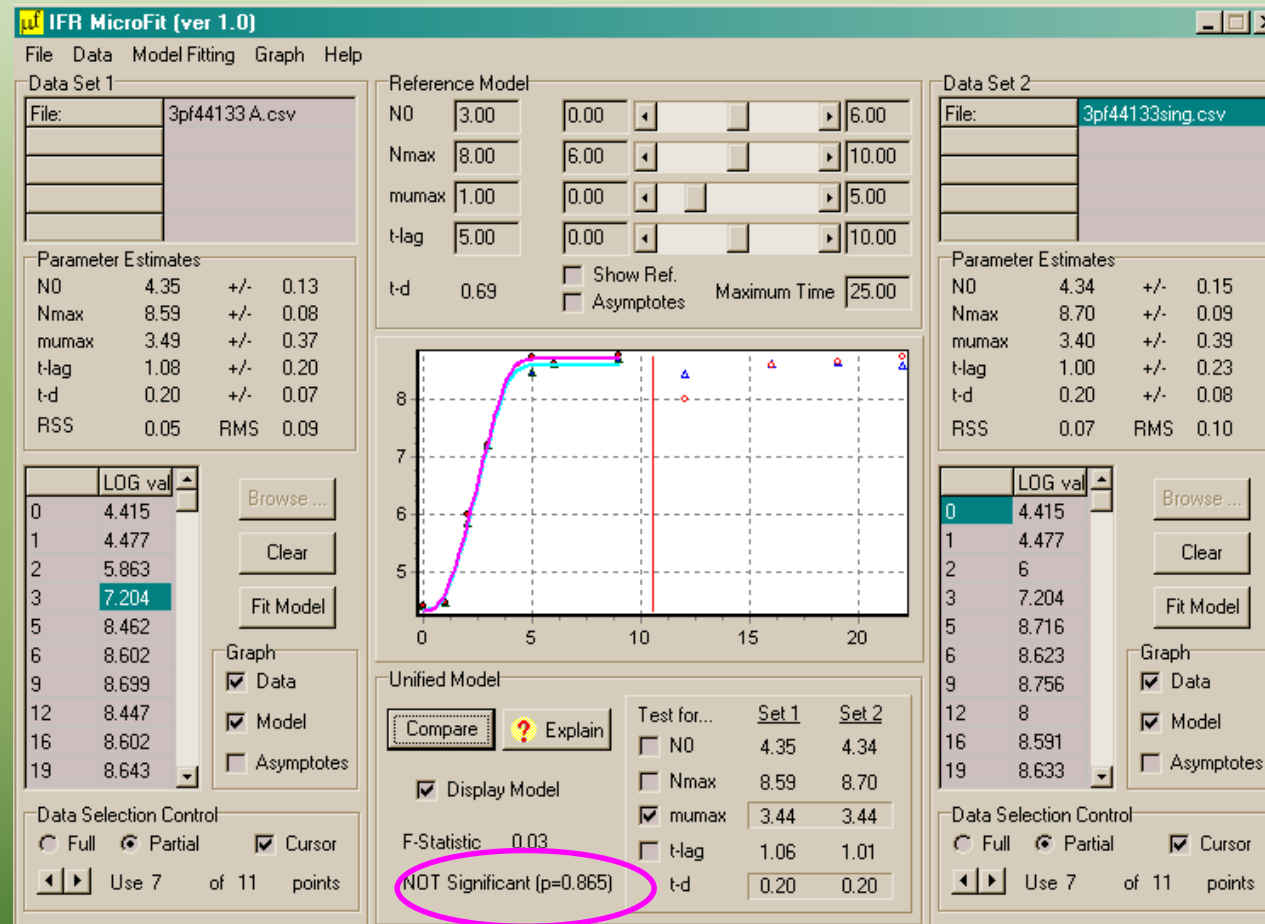
**La differenza tra i 2  $\mu_{\max}$  non è significativa, per cui i risultati dei 2 modelli di challenge sono sovrapponibili**

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



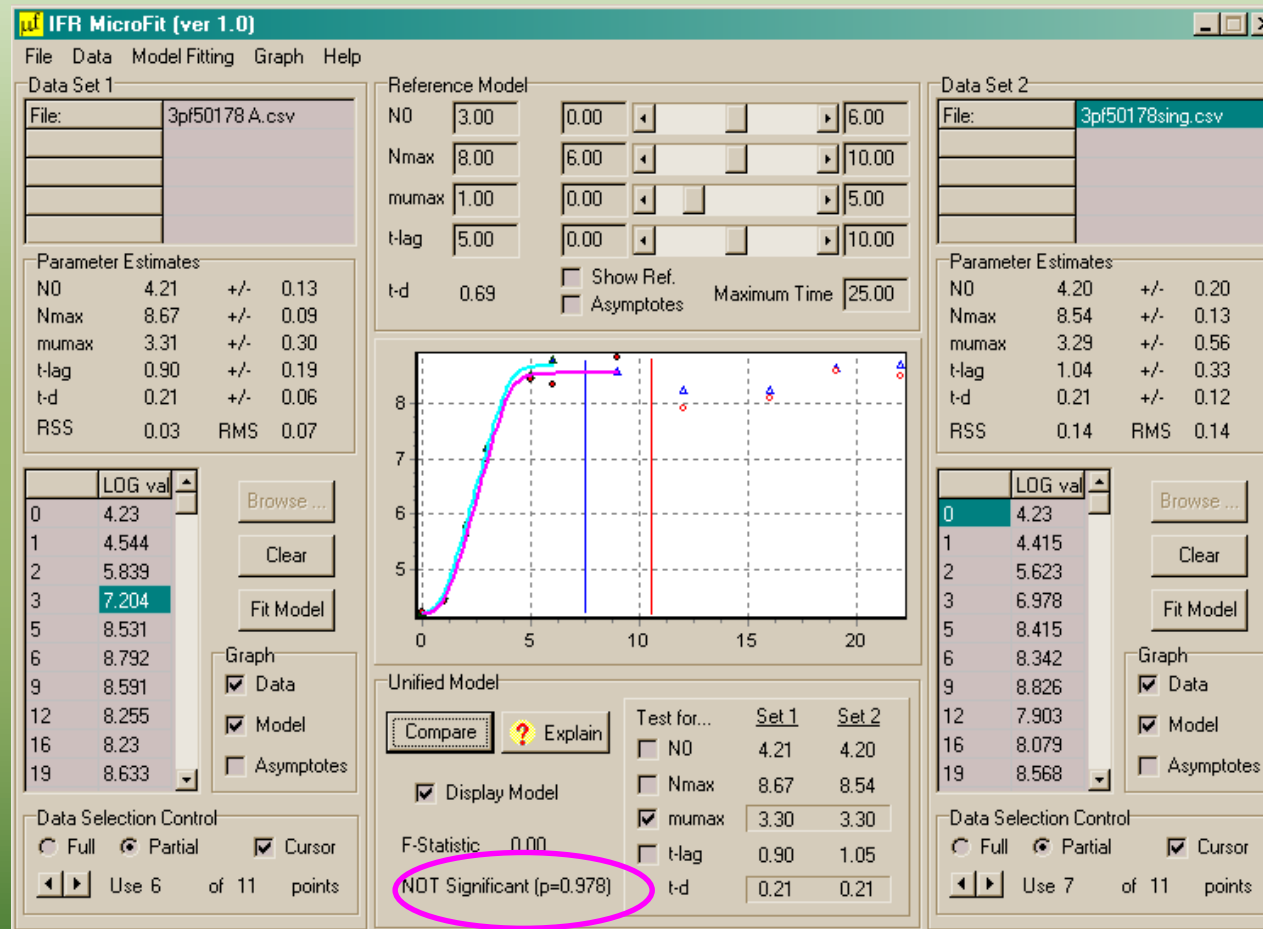
**La differenza tra i 2  $\mu_{max}$  non è significativa, per cui i risultati dei 2 modelli di challenge sono sovrapponibili**

**Comparazione tra challenge effettuato su una sola unità e challenge effettuato su 10 unità Lotto 3**  
***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**

**Comparazione tra challenge effettuato su una sola unità e challenge effettuato su 10 unità Lotto 3**  
***Pseudomonas fluorescens* ceppo 50178**



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

Confronto fra predizione  $\mu_{\max}$  effettuata con Microfit su dati  $\mu_{\max}$  ottenuti da challenge test a 8° C e calcolo  $\mu_{\max}$  *P. fluorescens* normalmente presenti in mozzarella mantenuta a 5° C

Calcolo del  $\mu_{\max}$  ( maximum growth rate ) a temperatura diversa da quella usata nel challenge test

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

$$\mu_{\max} = 2.254$$

$$\mu_{\max_{\text{ref}}} = 4.6$$

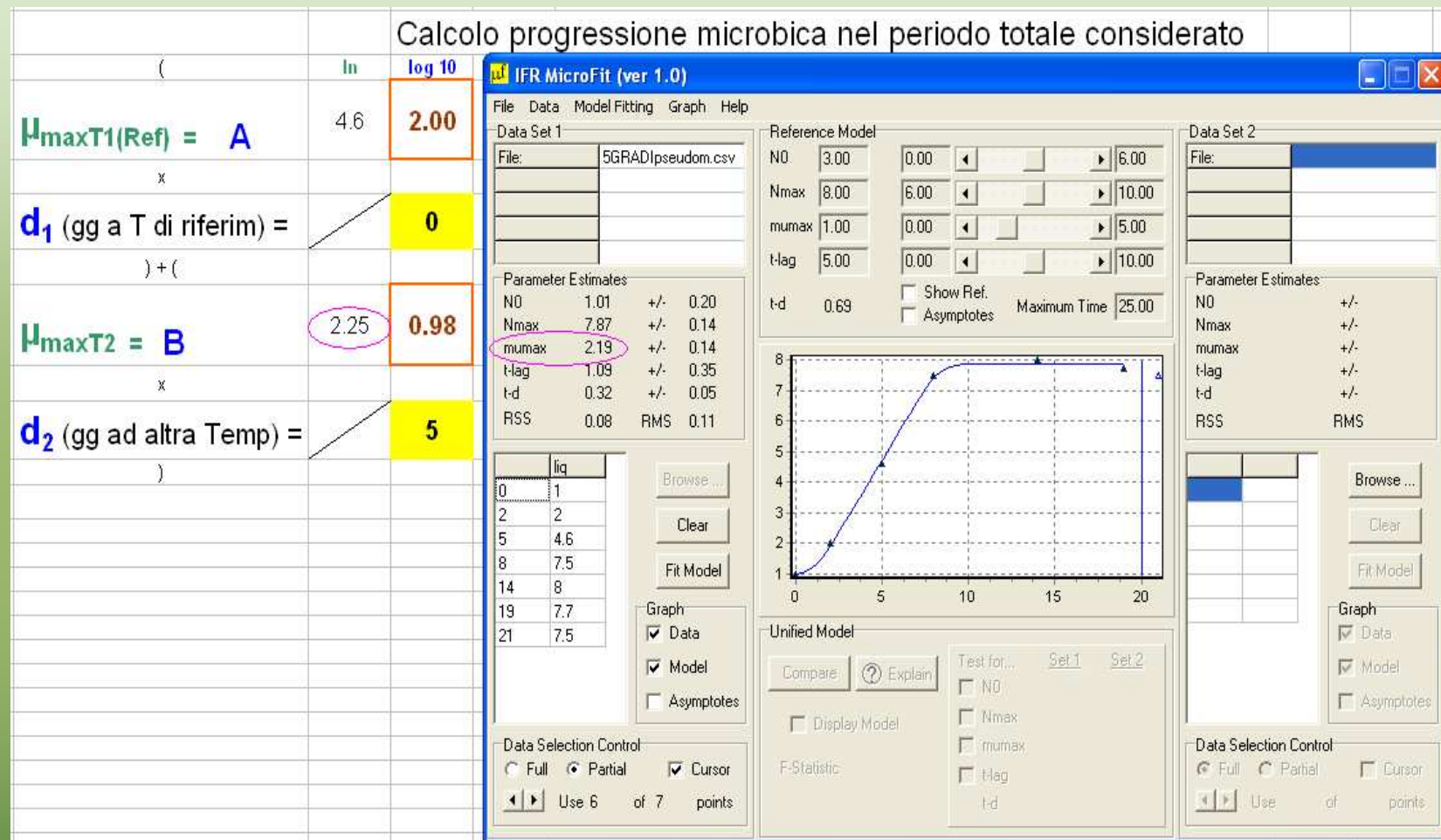
T = nuova temperatura

$$T = 5$$

$$T_{\min} = -2$$

$$T_{\text{ref}} = 8$$





Col  $\mu_{\max}$  ottenuto a 8°C si può predire quello a 5°C

## UTILIZZAZIONE $\mu_{\max}$

## ESEMPIO DI CALCOLO DI DURATA(shelf-life)

**PROBLEMA:** Se accetto un livello massimo di  $10^7$  (7,00 LOG) *P. fluorescens* e parto da un massimo iniziale di  $5 \times 10^2$  (2,70 LOG) quanti giorni posso conservare le mozzarelle?

**DATI DEL PROBLEMA :** Il tasso di crescita è a:

8° C = 2,00 LOG/g

5° C = 0,98 LOG/g

Si calcola l'incremento massimo tollerato = concentrazione finale - concentrazione iniziale = 7 - 2,7 = 4,3 LOG

Col foglio di calcolo già usato calcolo i giorni per raggiungere l'incremento di 4,3 LOG (si è calcolato, fino al decimale del giorno, il n° giorni più prossimo a 4,3 LOG di incremento). Giorni =  $4.3 \text{ LOG} / \mu_{\max}$

Durata massima a 8° C = 2,1 gg

Calcolo progressione microbica nel periodo totale considerato					
	(	ln	log 10		
8 °C	$\mu_{\max T1(\text{Ref})} = A$	4.6	2.00		
	x			formula	
	$d_1$ (gg a T di riferim) =		2.1	$(\mu_{\max T1(\text{Ref})} \times d_1 \text{ (gg a T di riferim)}) + (\mu_{\max T2} \times d_2 \text{ (gg ad altra temp)})$	
	) + (			$(A \times D1) + (B \times D2)$	
5 °C	$\mu_{\max T2} = B$	2.25	0.98		4.20 log10 ufc/g
	x				
	$d_2$ (gg ad altra Temp) =		0		1.6E+04 ufc/g
	)				
					15677.78 ufc/g

## UTILIZZAZIONE $\mu_{\max}$

## ESEMPIO DI CALCOLO DI DURATA(shelf-life)

**PROBLEMA:** Se accetto un livello massimo di  $10^7$  (7,00 LOG) *P. fluorescens* e parto da un massimo iniziale di  $5 \times 10^2$  (2,70 LOG) quanti giorni posso conservare le mozzarelle?

**DATI DEL PROBLEMA :** Il tasso di crescita è a:

8° C = 2,00 LOG/g

5° C = 0,98 LOG/g

Si calcola l'incremento massimo tollerato = concentrazione finale - concentrazione iniziale = 7 - 2,7 = 4,3 LOG

Col foglio di calcolo già usato calcolo i giorni per raggiungere l'incremento di 4,3 LOG (si è calcolato, fino al decimale del giorno, il n° giorni più prossimo a 4,3 LOG di incremento). Giorni = 4.3 LOG /  $\mu_{\max}$

Calcolo progressione microbica nel periodo totale considerato						
		ln	log 10			
8	$\mu_{\max T1(Ref)} = A$	4.6	2.00			
°C	x				formula	
	$d_1$ (gg a T di riferim) =		0		$(\mu_{\max T1(Ref)} \times d_1 \text{ (gg a T di riferim)}) + (\mu_{\max T2} \times d_2 \text{ (gg ad altra temp)})$	
	) + (				$(A \times D1) + (B \times D2)$	
5	$\mu_{\max T2} = B$	2.25	0.98			4.31 log10 ufc/g
°C	x					
	$d_2$ (gg ad altra Temp) =		4.4		2.0E+04 ufc/g	
	)					
					20284.25 ufc/g	

Durata massima a 5° C = 4,4 gg

## Predizione di crescita *Pseudomonas spp.* sistema COMBASE a 5° e 8° C

E' stato effettuato un confronto tra i dati sperimentali e i dati ricavati da predizione con sistema Combase

**ComBase Predictor**

☒ Growth model    ☐ Thermal inactivation model    ☐ Non thermal survival model

Temperature input: ☒ Static    ☐ Changing temperature

Water activity: ☐ NaCl    ☒ Aw

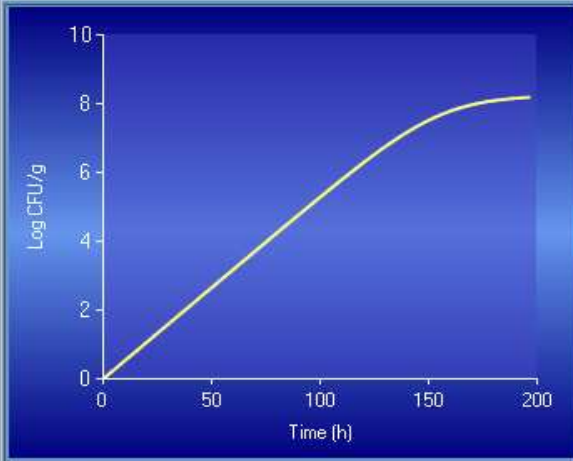
Observation duration: Time (h)

*Pseudomonas spp.*

Initial level	Phys.state[0-1]	T (°C)[0-20]	pH[5-7.4]	Aw[0.961-1]	Max.rate (log.conc/h)	Dbl.time (h)
<input type="text" value="0"/>	<input type="text" value="1"/>	<input type="text" value="5"/>	<input type="text" value="7"/>	<input type="text" value="0.988"/>	<input type="text" value="0.05"/>	<input type="text" value="5.66"/>

**Predictions**

88.00	4.68
92.00	4.89
96.00	5.10
100.00	5.30
104.00	5.51
108.00	5.71
112.00	5.92
116.00	6.12
120.00	6.31
124.00	6.50
128.00	6.69



Other ComBase Modelling Tools    About ComBase Predictor    ComBase Predictor Help    ComBase Predictor FAQs

Predizione a 5°C

Dalla predizione a 5° C si ottiene un  $\mu_{\max}$  / h = 0,05 LOG, che è = 1,2 LOG al giorno

## Predizione a 8°C

### ComBase Predictor

☒ Growth model
☐ Thermal inactivation model
☐ Non thermal survival model

Temperature input

☒ Static
☐ Changing temperature

Water activity

☐ NaCl
☒ Aw

Observation duration

Time (h)

add a row

*Pseudomonas spp.*

Initial level  
<=7

0

Phys.state[0-1]

1

Help

T (°C)[0-20]

8

pH[5-7.4]

7

Aw[0.961-1]

0.988

Max.rate  
(log.conc/h)

0.08

Dbl.time (h)

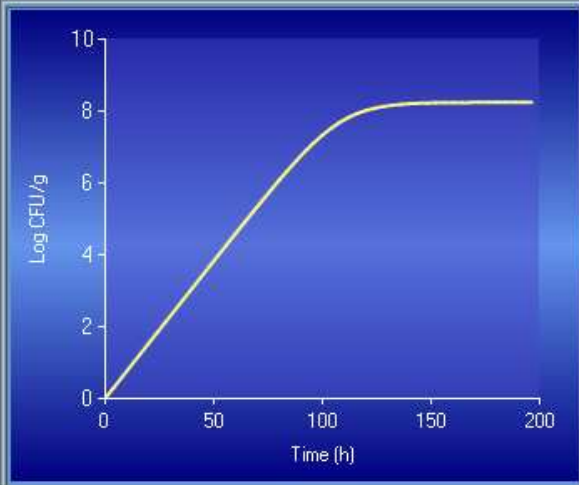
3.92

remove last row

Predict

Predictions

88.00	6.64
92.00	6.90
96.00	7.14
100.00	7.35
104.00	7.55
108.00	7.71
112.00	7.85
116.00	7.95
120.00	8.04
124.00	8.10
128.00	8.15



Dalla predizione a 8° C si ottiene un  $\mu_{\max}$  / h = 0,08 LOG, che è = 1,92 LOG al giorno



	ln	log 10
$\mu_{\max T1(Ref)} = A$	4.6	2.00
$\times$		
$d_1$ (gg a T di riferim) =		0
) + (		
$\mu_{\max T2} = B$	2.25	0.98
$\times$		
$d_2$ (gg ad altra Temp) =		0
)		

Il  $\mu_{\max}$  a 8° C = 1,92 si confronta con  $\mu_{\max}$  sperimentale = 2,00

Il  $\mu_{\max}$  a 5° C = 1,2 si confronta con  $\mu_{\max}$  sperimentale = 0,98

I valori sono simili . I dati della predizione si avvicinano a quelli sperimentali.

In genere le predizioni sono più pessimistiche dei risultati sperimentali, ma in questo caso il liquido delle mozzarelle sembra funzionare come un terreno colturale.

**GRAZIE PER LA  
CORTESE  
ATTENZIONE**