

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

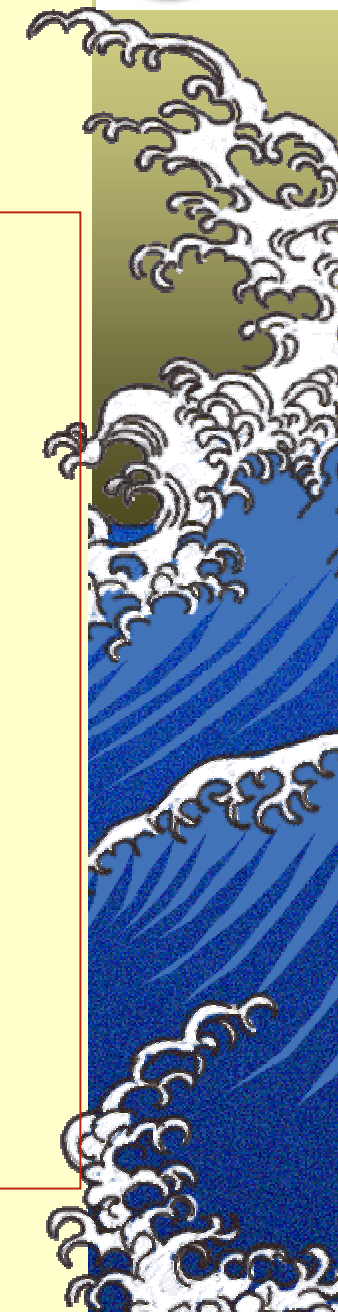
**L'evoluzione di *Listeria monocytogenes*
nel salmone affumicato**

Laura Gasperetti - IZSLT Sezione di Pisa
15-16 Novembre 2011



L'evoluzione di *Listeria monocytogenes* nel salmone affumicato

*La possibilità di proliferazione di *L. monocytogenes* viene valutata nel salmone affumicato*



L'evoluzione di *Listeria monocytogenes* nel salmone affumicato

Secondo i parametri dell'allegato I del Reg. (CE) 2073-1441 (aw; pH e shelf life) il salmone affumicato rientra nella categoria dei "favorevoli alla crescita di Listeria monocytogenes....." l'art.3 par.2 dice che:

"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..... " questi studi come descritto nell'allegato II comprendono: prove per determinare le caratteristiche fisico-chimiche del prodotto, quali pH, aw (water activity), contenuto salino, concentrazione di conservanti e tipo di confezionamento, tenendo conto delle condizioni di lavorazione e di conservazione, delle possibilità di contaminazione e della conservabilità prevista; (.....) inoltre ... "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;*
- *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);*
- *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. (Studi di conservabilità).*

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



L'evoluzione di *Listeria monocytogenes* nel salmone affumicato

Microbiologia Predittiva



E' possibile, grazie alle caratteristiche di composizione del prodotto, far rientrare l'alimento nella categoria dei *non favorevoli alla crescita*?

La scelta del programma predittivo è molto importante e non scontata, infatti può portare a risultati e valutazioni molto diverse tra loro.



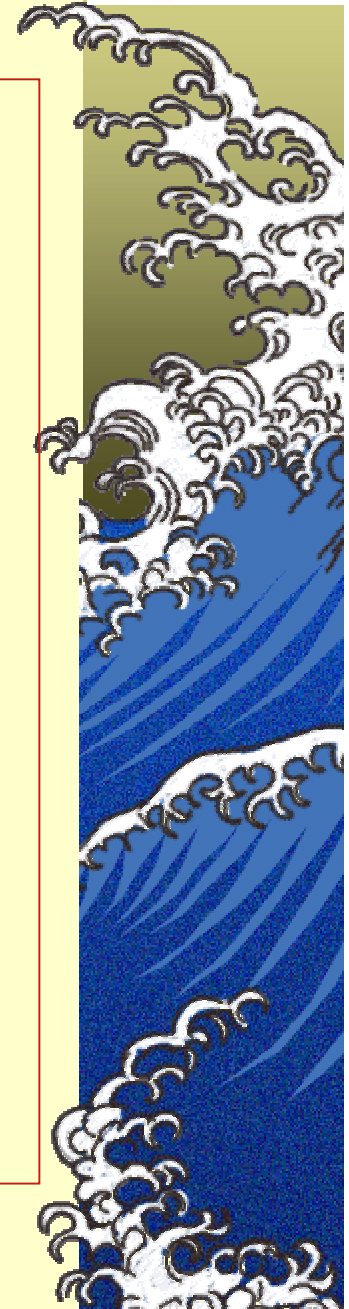
SIMULAZIONE con due diversi programmi predittivi, accessibili gratuitamente su internet, partendo da un caso reale.

➤ **ComBase Modelling Toolbox Login Form**

Data base on-line per la previsione delle crescite batteriche (Institute of Food Research (IFR)-UK, Stati Uniti Agricolo Research Service (USDA-ARS) e il Centro di Eccellenza Australiano per la sicurezza alimentare (AFSCoE).

➤ **Seafood Spoilage and Safety Predictor (SSSP) software v.3.1**

Software sviluppato da Technical University of Denmark (DTU), National Institute of Aquatic Resources (DTU Aqua) as a collaboration between the research group 'Seafood & Predictive Microbiology' (Paw Dalgaard) and the Section for Software Development (Brian James Cowan).

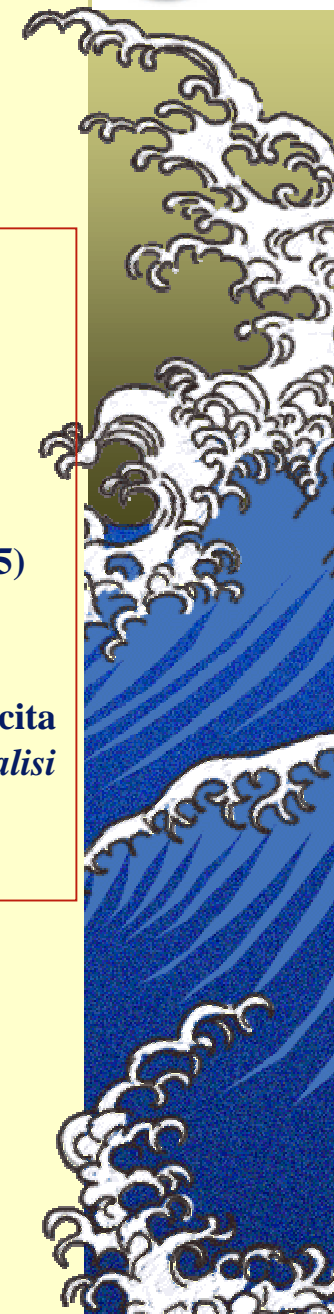


L'evoluzione di *Listeria monocytogenes* nel salmone affumicato

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


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

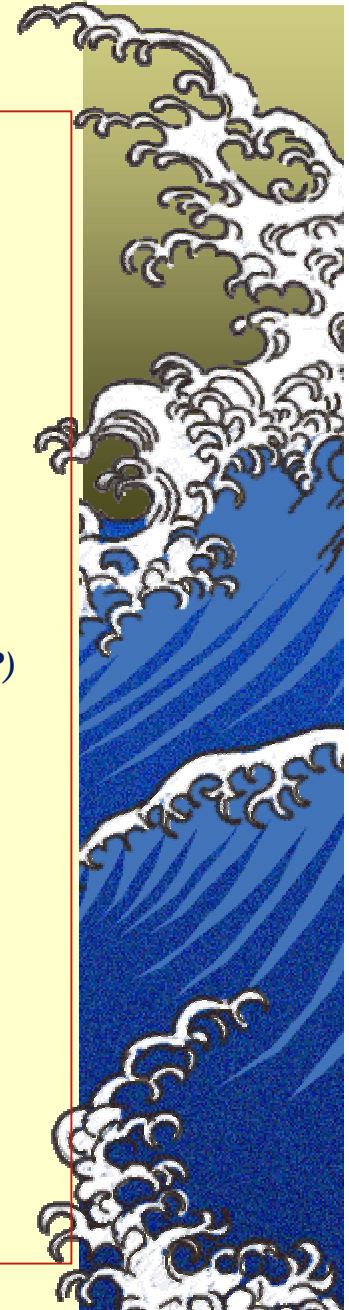
- a) Il produttore all'ASL → documentazione per dimostrare che *Listeria monocytogenes* non avrebbe superato le 100 ufc/g nel suo periodo di conservazione (nota (5) al punto 1.2 dell'allegato I del Regolamento 2073/2005)
- b) Il Laboratorio Alimenti dell'IZS di Pisa all'ASL → PREDIZIONE di crescita per *Listeria monocytogenes* per i valori riscontrati sul prodotto al momento dell'analisi ufficiale e sul periodo residuo della sua shelf-life



L'evoluzione di *Listeria monocytogenes* nel salmone affumicato

PREDIZIONE di crescita per *Listeria monocytogenes*:

- ✓ Periodo residuo della shelf-life dell'alimento ~~25 gg~~ su 60gg 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 *L. monocytogenes*)
- N° listerie iniziali = 0.94 mpn/g (arrotondato ad 1)
- Batteri lattici (flora competitiva) = 100ufc/g (inf. al presunto valore reale dopo 35gg) (SSSP)
- Temperatura di conservazione = 4°C
- $a_w = 0.957$ (per ComBase) * NaCl in fase acquosa = 4.76 (SSSP)
- 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)



L'evoluzione di *Listeria monocytogenes* nel salmone affumicato

PREDIZIONE di crescita con: ComBase Modelling Toolbox Login Form

<http://modelling.combase.cc/Default.aspx>

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

Listeria monocytogenes/innocua with lactic(ppm)

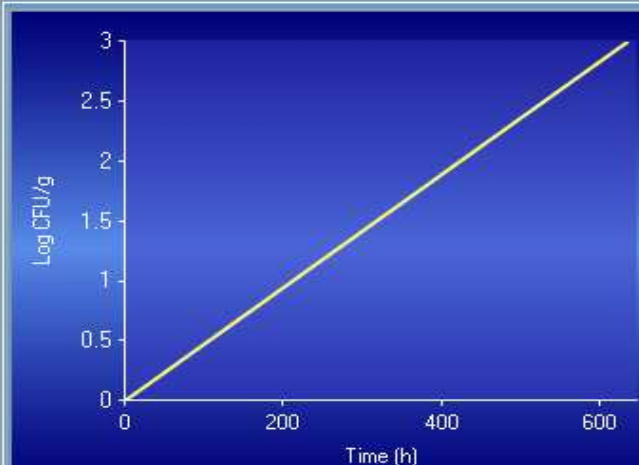
| Initial level | Phys.state | T (°C) | pH | Aw | lactic(ppm) | Max.rate (log.conc/h) | Dbl.time (h) |
|---------------|------------|--------|------|-------|-------------|-----------------------|--------------|
| 0 | 1 | 4 | 5.78 | 0.957 | 8499 | 0.00 | 63.86 |

remove last row

Predict

Predictions

505.44 2.38
 518.40 2.45
 531.36 2.51
 544.32 2.57
 557.28 2.63
 570.24 2.69
 583.20 2.75
 596.16 2.81
 609.12 2.87
 622.08 2.93
 635.04 3.00



[Other ComBase Modelling Tools](#)

[About ComBase Predictor](#)

[ComBase Predictor Help](#)

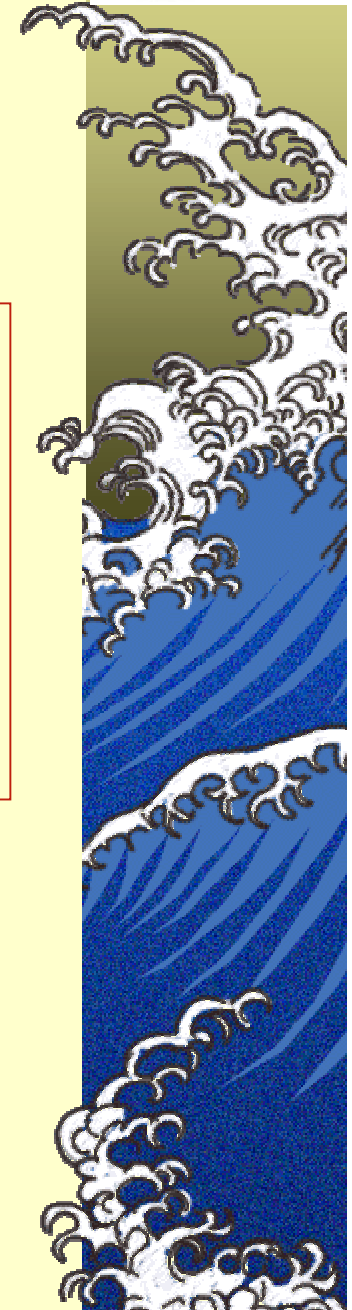
[ComBase Predictor FAQs](#)

L'evoluzione di *Listeria monocytogenes* nel salmone affumicato

PREDIZIONE di crescita con: ComeBase Modelling Toolbox Login Form

Risultato della 1^a predizione:

Il valore ottenuto a 600 h (25gg) è 2.85 (Log) corrispondente a 708 listerie, quindi al termine della shelf-life, secondo questo modello predittivo l'alimento supera largamente il limite stabilito delle 100 ufc/g, per cui il prodotto considerato risulterebbe favorevole alla crescita di listeria.



L'evoluzione di *Listeria monocytogenes* nel salmone affumicato

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

Caratteristiche prodotto

| | Prodotto 1 | Prodotto 2 | | Prodotto 1 | Prodotto 2 |
|--|------------|------------|--|--------------------------|--------------------------|
| Temperatura (°C) | 4.0 | 5.0 | Diacetato in fase acquosa prodotto, mg/l | 0 | 0 |
| NaCl % in fase acquosa | 4.76 | 4 | Iniziale livello cellulare L.monocytogenes | 1 | 1 |
| pH | 5.78 | 5.6 | Conc. iniziale LAB (UFC/g) | 100 | 0 |
| Acido lattico in fase acquosa (ppm) | 8499 | 30000 | Tempo di latenza relativo | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| Componenti fumo - fenolo (ppm) | 5 | 10 | Periodo di stoccaggio (giorni) | 25 | |
| CO2 % nel gas spazio di testa all'equilibrio | 0 | 0 | | | |

Temperatura costante Serie di temperature costanti Profili termici da registratore dati

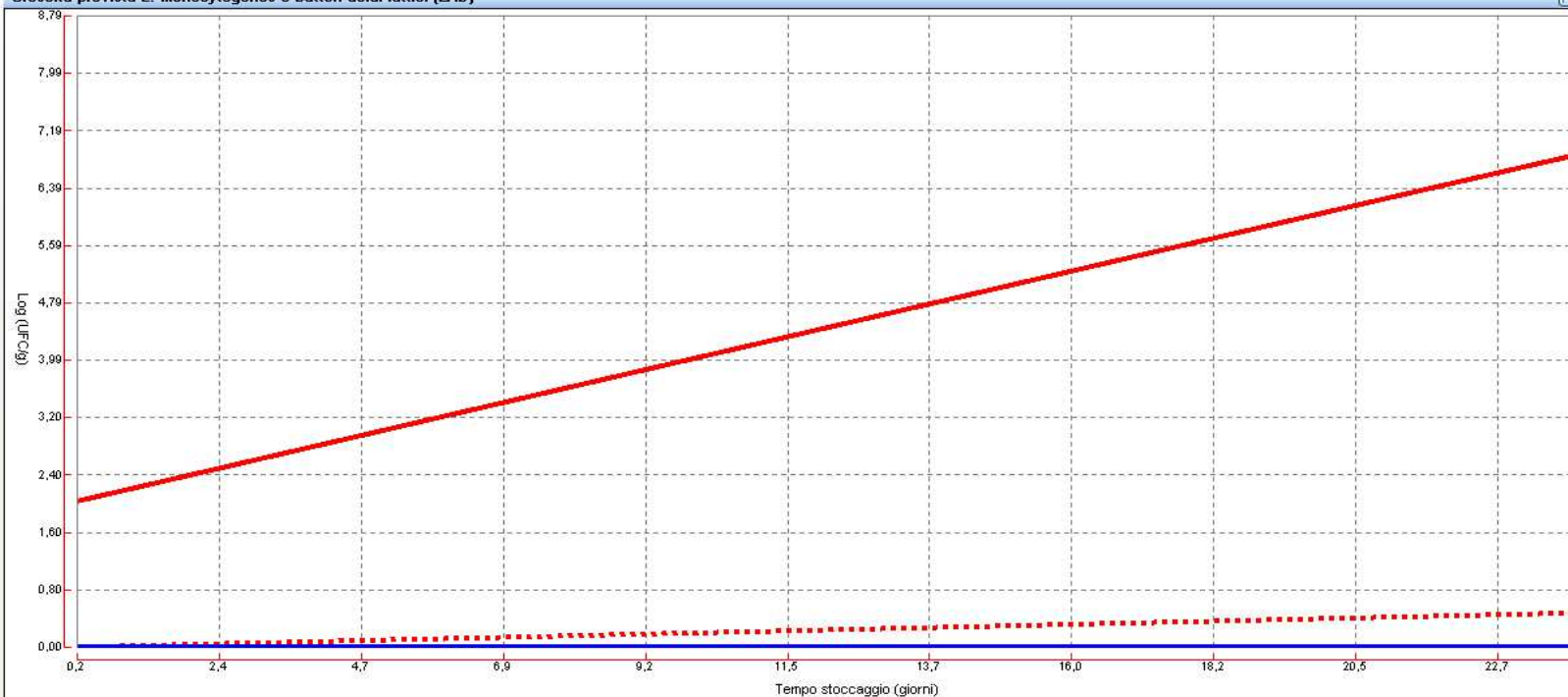
Tasso di crescita e fase latenza

| | Listeria monocytogenes μmax (1/h) | Fase di latenza | Batteri acidi lattici μmax (1/h) |
|------------|--------------------------------------|-----------------|-------------------------------------|
| Prodotto 1 | 0.0019 | 0 | 0.0194 |
| Prodotto 2 | 0 | 0 | 0 |

Tempo per aumento di 100 volte (giorni)

| | L. monocytogenes | Batteri acidi lattici |
|------------|------------------|-----------------------|
| Prodotto 1 | Non raggiunto | 0.55 |
| Prodotto 2 | Non raggiunto | Non raggiunto |

Crescita prevista L. monocytogenes e batteri acidi lattici (LAB)



Tempo (giorni): L. monocytogenes (Log UFC/g) - prodotto 1: LAB (Log UFC/g) - prodotto 1: L. monocytogenes (Log UFC/g) - prodotto 2: LAB (Log UFC/g) - prodotto 2:

L'evoluzione di *Listeria monocytogenes* nel salmone affumicato

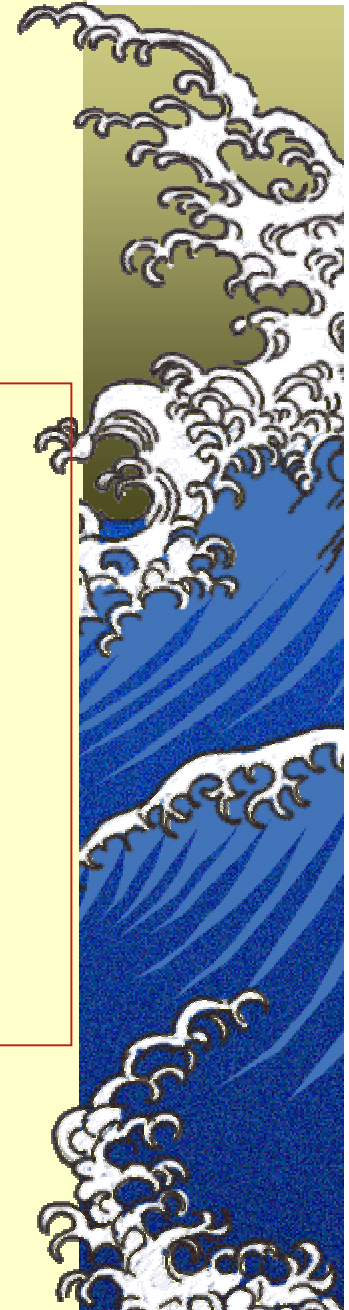
PREDIZIONE di crescita con: Seafood Spoilage and Safety Predictor (SSSP) software v.3.1

Risultato della 2^a predizione:

Il valore di listeria si ricava con un semplice calcolo a partire dal μ_{\max}^*/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.

* μ_{\max} è il tasso di crescita massimo $\mu_{\max} = \ln(n^{\circ} \text{cellule})/t$



L'evoluzione di *Listeria monocytogenes* nel salmone affumicato

CONCLUSIONI sui Modelli Predittivi

Punti di forza:

- ▲ Disponibilità ed accessibilità dei programmi
- ▲ Velocità di risultati rispetto ad altri studi (Challenge test).

Punti critici:

- ▲ Scelta del programma (tipologia del prodotto analizzato, parametri)
- ▲ Condizioni della predizione (dati completi)
- ▲ Attenzione nella valutazione finale

Considerazioni finali: La scelta del programma SSSP per la predizione sul salmone affumicato è dovuta alla specificità del programma stesso per i prodotti ittici processati e alla possibilità di considerare la flora lattica.



Grazie per l'Attenzione!

