

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

Le basi della microbiologia predittiva e del challenge test



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

La ***microbiologia predittiva*** : predizione dell'evoluzione microbica attraverso supporti informatici

riesce a presentare un'evoluzione microbica **più o meno** attendibile calibrando i fattori critici per la proliferazione microbica, oppure valutando la bontà di curve di crescita ottenute attraverso prove sperimentali.

I ***challenge test*** : prove sperimentali di contaminazione dell'alimento) servono per verificare se una strategia di contenimento dei germi sia efficace o se la durata del prodotto alimentare sia troppo lunga.

Gli studi di **microbiologia predittiva** ed i **challenge test** 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** .

E' indiscutibile che per effettuare studi e sperimentazioni sulla deperibilità microbiologica degli alimenti si devono possedere solide basi sull'argomento

VIRGINIA N. SCOTT et al. (2005)

Guidelines for Conducting *Listeria monocytogenes* Challenge Testing of Foods

The design (progettazione) , implementation (attuazione) , and assessment (valutazione) of microbiological challenge studies requires an

expert microbiologist to consider all relevant factors related to how the product is formulated, manufactured, packaged, distributed, prepared, and consumed.

(e quindi conoscenza dei processi produttivi !)



ALLEGATO II

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, delle possibilità di contaminazione e della conservabilità prevista

Osservazioni.

• Sono prove abbastanza semplici che potrebbero non richiedere una sperimentazione.

*- consultazione della **letteratura scientifica disponibile e dei dati di ricerca** sulle caratteristiche di sviluppo e di sopravvivenza dei microrganismi in questione.*

Osservazioni.

• Si basano su dati esistenti. Si sfrutta spesso la sperimentazione di altri. **Possono rivelarsi risolutivi !**

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 programmi per computer, più o meno complessi, dove si inseriscono i valori richiesti dalle maschere 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 predizione di crescita è quasi sempre MAGGIORE DELLA REALTA')**

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

PMP

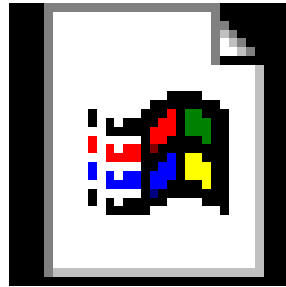
PMOnline

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*



SSSP v3.1.Ink

Range of applicability

Temperature (2-15°C), atmosphere (0-80 % CO₂), 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)

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.**
- **Il sistema è complesso e solo alcuni laboratori sono in grado di approntare simili sperimentazioni.**



Quando serve il challenge test ?

Quando i parametri sia estrinseci che intrinseci al prodotto non garantiscono la stabilità microbiologica richiesta

Challenge Test 1

Consulenza di esperti

Identificazione del problema:

- Studi di **controllo crescita** o di inattivazione

Identificazione del prodotto:

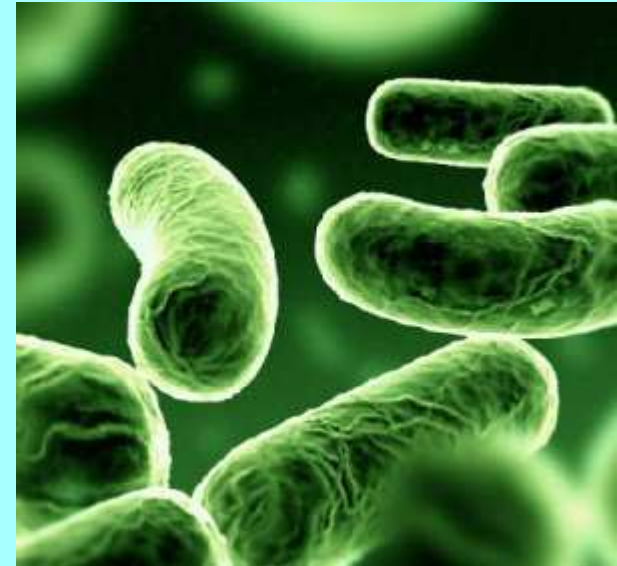
- Preparazione
- Variabilità: aw e pH più elevati
- Microflora competitiva
- Storico esistente
- Bibliografia o studi azienda esistenti anche su prodotti simili
- **Microbiologia predittiva**

Challenge Test 2

Studio dei microorganismi

- Microorganismo/i target
 - Uso di surrogati? *Listeria* , *E. coli*
 - Tipo e numero di ceppi usati
(tolleranti l'acido, isolati da tossinfezioni, ATCC ...)
- Si inoculano 2 o piu' ceppi

- Misurazione flora competitiva



Challenge Test

3

Livelli di inoculo

Superiore al numero normalmente rilevato: si inoculano da 50 a 1000 germi per grammo di prodotto



Challenge Test 4

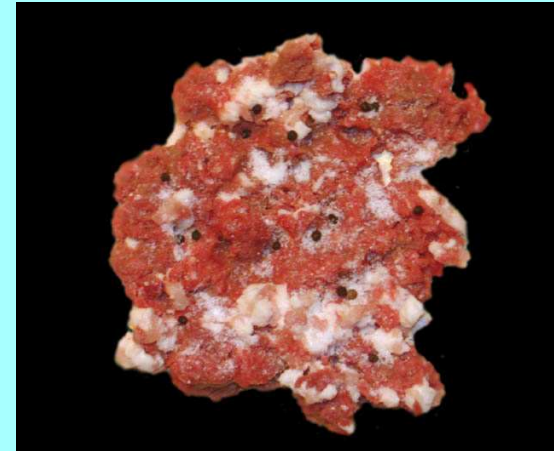
Preparazione dell'inoculo



- I ceppi dovrebbero essere conservati congelati e stoccati in varie unità per evitare eccessivi passaggi
- I ceppi dovrebbero essere coltivati adattandoli a condizioni più vicine a quelle del prodotto : acido, sale, temperatura ...
- Lo stesso vale per il liquido di sospensione che servirà da supporto per l'inoculo . Inoculando 1% di sospensione, no problemi .

Challenge Test 5

Metodo di inoculazione
E' la parte più complessa !



Il problema è ottenere una distribuzione uniforme della sospensione

- **Latte** : è garantita
- **Salse** : si ottiene facilmente
- **Salame-salsiccia** : Si deve distribuire la già ridotta quantità di sospensione nella massa macinata già con gli ingredienti. Deve seguire una miscelazione manuale lunga ed accurata , 1-10 minuti , prima di insaccare .
- **Formaggio**: il modo migliore sarebbe l'inoculazione in caldaia prima del caglio . Considerare la concentrazione successiva nella cagliata (ovino , bovino) .

lotto 1

8/11

ATCC

A

1

A

lotto 1

8-11

50178

Challenge Test 6 (A)

Conservazione e confezionamento



- Le condizioni di confezionamento (anche atmosfera) devono essere quelle del prodotto che viene commercializzato.
- La temperatura deve essere tra 8 e 12° C . Le ditte non dovrebbero scrivere + 4° C come massima temperatura di conservazione, poiché regolamenti e documenti parlano di ragionevoli condizioni di conservazione! Tuttavia succede per cui ai valutatori si richiede una certa elasticità .

Challenge Test 6 (B)

Conservazione e confezionamento

Prodotti fermentati:

- L'inoculo è eseguito prima che il prodotto sia pronto (salagione , stufatura) : le **temperature** saranno **quelle previste dal processo produttivo**, altrimenti la riduzione dei patogeni inoculati, **che avviene in questa fase** , potrebbe essere inferiore .
- Temperature più basse non garantiscono in questi casi maggiore sicurezza



Challenge Test 6 (C)

Conservazione e confezionamento

Si dovrebbero seguire le temperature ed i tempi seguenti (se non conosciuti) nelle 3 fasi :

Combinazioni tempo-temperatura per i challenge test per SHELF-LIFE			
fasi	Frazione shelf-life		temperatura
Ditta produttrice	1/3 (<21 gg)	7gg (>21gg)	8° C
Dettaglio	1/3 (<21 gg)	½ (>21gg)	12° C
Consumatore	1/3 (<21 gg)	½ (>21gg)	12° C

Challenge Test 7

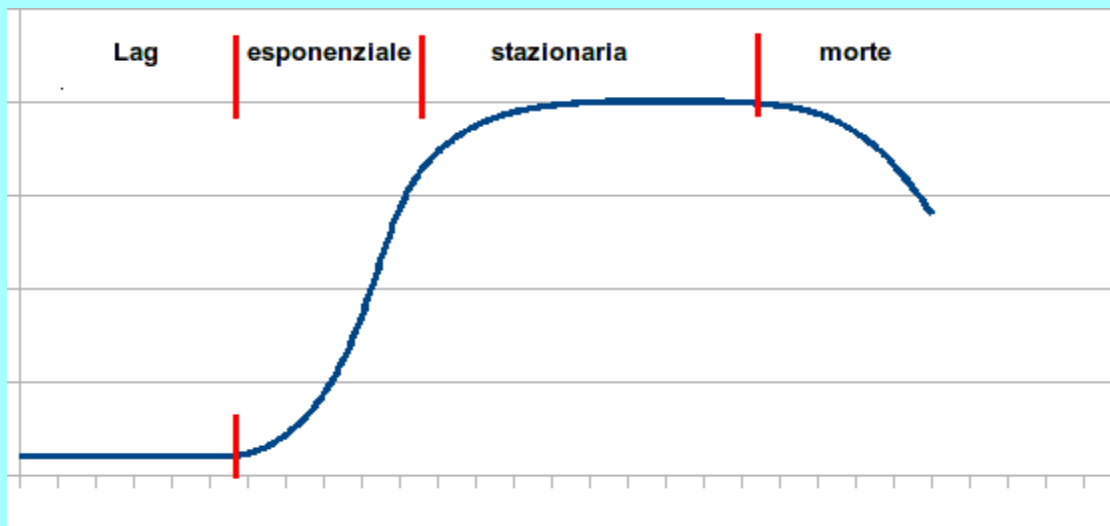
Campionamento

Può succedere che per ogni seduta di campionamento si esaminino più campioni

Nelle prime fasi (circa 30 % durata) campionamenti ravvicinati per misurare la lag fase .

Devono essere misurati i parametri chimico fisici principali anche su campioni non inoculati .

Si effettuano numerosi conteggi microbici !



Challenge Test 8

Durata studio

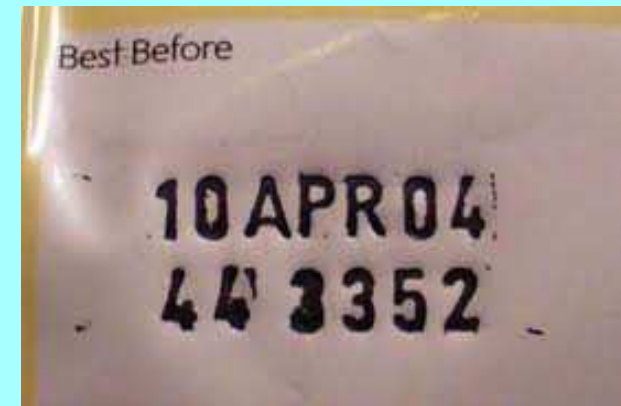
Il periodo dello studio deve essere maggiore o uguale alla shelf-life (secondo il tipo di test) :

Se shelf-life = max 10 gg 50% in più
del previsto

Se shelf-life = > 10 gg 25 - 30% in più
del previsto

E' vero anche il contrario!

La shelf-life deve essere ridotta delle stesse percentuali se lo studio è diretto a determinarla (misurarla) .



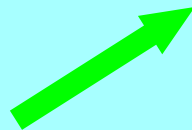
Challenge Test 8

Valutazione

Es. : per *Listeria monocytogenes* un incremento $< 0,5 \text{ Log}$ è considerato di sicurezza

Altrimenti:

- Rivedere la formulazione del prodotto
- Abbreviare la shelf-life
- Scartare l'idea di produrlo



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 (δ)

Studio del maximum growth rate (μ_{\max})

Durability studies

Growth potential

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

δ 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 δ 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.

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

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

Limite *L. monocytogenes* 2 log₁₀ (= 100)

δ

Nel 2° esempio : $\delta = 0.88$ (log₁₀ 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 **$= 1 \log_{10} \text{ cfu/g}$ (= 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 ($2 \log_{10} \text{ cfu/g}$) ?

Concentrazione iniziale = Concentrazione finale - δ

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

DIFETTI

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

Guide Shelf-life studies CRL *L. monocytogenes*

Maximum growth rate

μ_{\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** (μ_{\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 μ_{\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 μ_{\max} (al giorno) .

Il μ_{\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.

Maximum growth rate

μ_{\max}

Ognuno di 3 lotti è saggiato separatamente con 2 ceppi a più rapida crescita di cui uno di riferimento (ATCC), per cui si ottengono 6 curve di crescita

Per la determinazione del μ_{\max} servono da 10 a 15 unità per costruire ognuna delle 6 curve.

LM deve essere assente altrimenti il test non è valido (poiché il ceppo in esame deve essere singolo)

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

μ_{\max}

MicroFit

μ_f

Si sceglie quello col valore massimo, che è espresso in **ln cfu/g . day⁻¹** . Da questo, attraverso la formula seguente si può ottenere un altro μ_{\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_{ref} = temperatura del test

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

Il valore di μ_{\max} deve essere trasformato in **log₁₀ cfu/g** per calcolare le stime che il μ_{\max} può fornire. Procedimento: si divide il μ_{\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

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

Utilizzazione μ_{\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/g (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 μ_{\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



ALLEGATO II

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

3

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.

"DURABILITY STUDIES"

Osservazioni.

- In genere sono applicabili a germi presenti in una certa quantità e con una certa frequenza nella matrice alimentare .

Durability studies

D-stud

Permettono lo studio della crescita di LM durante la conservazione in alimenti **naturalmente contaminati**

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](#)).

Ma se , come nella maggior parte dei casi, il numero iniziale di LM è molto basso, è comunque difficile che siano attendibili.

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.

D-stud

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

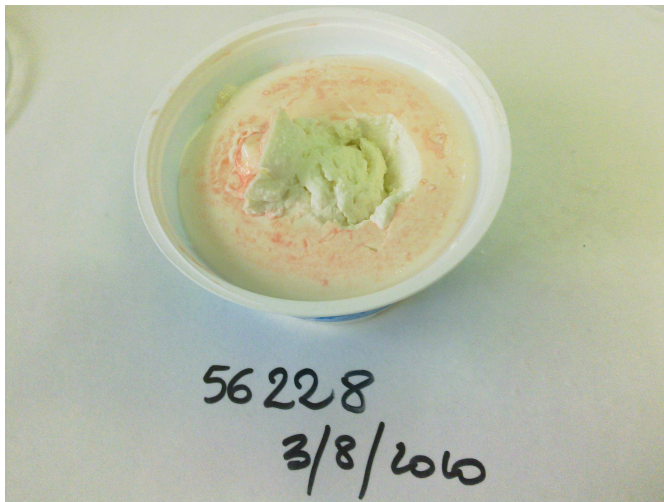
If more units are analysed, the narrower the confidence interval becomes. For example, we can conclude from this table that the upper limit of the confidence interval for “2 units exceeding 100 cfu/g out of 100 units” is lower than that obtained for “0 units exceeding 100 cfu/g out of 20 units”.

limiti

Si sceglie il limite maggiore dell’intervallo di confidenza

durata del prodotto

COLORI, MICROBIOLOGIA e SHELF-LIFE



INFORMAZIONI

Recapito relatore: **Roberto Fischetti** – Istituto Zooprofilattico Lazio e Toscana
– Sezione di Pisa – S.S. dell'Abetone e del Brennero, 4 – Pisa tel 050 553563
roberto.fischetti@izslt.it

Accesso **ComBase**: <http://www.combase.cc/>

Accesso **dati ComBase** :
<http://browser.combase.cc/BrowserHome/SearchOptions/Search.aspx>

Accesso per programma danese predizione prodotti della pesca (**Seafood Spoilage and Safety Predictor (SSSP) software v. 3.1** (*Revised August 2009*) The SSSP software is available free of charge.

Consultabile al sito <http://www.dfu.min.dk/micro/sssp/> del Ministero della Pesca del Regno di Danimarca