




La scelta delle analisi in autocontrollo

Criteri per la scelta dei parametri utili per le analisi microbiologiche degli alimenti

Dott. Marco Romani



Legislazione

→ **Regolamento 2073/2005**


- Criteri di sicurezza
- Criteri di processo

→ **Regolamento 178/2002**

- Art 14
 - Criteri di sicurezza
 - Criteri di commestibilità

➔ **Il piano di autocontrollo dovrà basarsi su questi 3 criteri:**

- 1) Sicurezza
- 2) Processo
- 3) Commestibilità





Rapporti tra vecchia e nuova normativa

→ **Delibera n.133 del 25/2/2008, Regione Toscana:**

- Vecchia normativa Om 11/10/78 e DPR 54 vengono sostituiti da:
 1. **Regolamento 2074:** Solo controllo ispettivo del latte UHT dopo incubazione a 30° (15 gg) e a 55°(7gg) → Esame microbiologico superfluo
 2. **Regolamento 2073:**
 - Latte pastorizzato – Criterio di processo - solo *Enterobatteriacee* → Psicofili e Coliformi superati
 - Latte in polvere – Criterio di processo - solo *Enterobatteriacee* → No coliformi, CMT 30° non molto utile
 - Prodotti base uova – Criterio di Sicurezza Salmonella - Criteri processo → *Enterobatteriacee*

→ **Resta in vigore:**

Norma	
OM 7 Dicembre 93	Listeria m. su prodotti da cuocere
Circolare ministeriale n.32, 1985 paste alimentari:	Unico parametro valido di processo: Stafilococchi aurei (coagulasi positivi)
Circolare ministeriale n. 21 del 27/04/92	Sostituisce la circolare min 81 del 1978


 a Mérieux NutriSciences Company




Momento in cui fare l' analisi

→ **Il Reg. 2073/2005 indica quando ha senso fare i controlli**

- Criteri di igiene o di processo : fine processo produttivo (Reg. 2073/2005)
- Criteri di sicurezza: in ogni momento della Shelf Life (Reg. 2073/2005)
- Criteri di commestibilità : in ogni momento della Shelf Life (Reg. 178/2002)

→ **Anche leggi precedenti davano indicazioni temporali (DPR 54/1997)**



 a Mérieux NutriSciences Company



Regolamento 2073/2005 Definizioni

Criterio microbiologico

Criterio che definisce l'accettabilità di un prodotto, di una partita di prodotti alimentari o di un processo, in base all'assenza, alla presenza o al numero di microorganismi e/o in base alla quantità delle relative tossine/metaboliti, per unità di massa, volume, area o partita

 **SILLIKER**
a Mérieux NutriSciences Company



Regolamento 2073/2005 Definizioni

Criteri di igiene di processo

- Servono per verificare il processo
- Hanno un compito preventivo
- Devono essere effettuati o alla fine del processo produttivo o nel momento della massima concentrazione del microorganismo
- Le azioni correttive comportano la revisione del piano di autocontrollo
- Non comportano il ritiro del prodotto (solo se l'alimento contiene tossine deve essere ritirato dal mercato)

→ Parametri Reg. 2073/2005:

- CMT, *Enterobatteriaceae*, *Bacillus cereus*, *Stafilococchi coagulasi positivi*, *E. coli*, *Salmonella*

 **SILLIKER**
a Mérieux NutriSciences Company



Regolamento 2073/2005 Definizioni

Criteri di sicurezza alimentare

- Si applicano in ogni momento della shelf life
- Nel caso di *Listeria monocytogenes* possono variare in seguito ad applicazione di studi (Reg. 2073/2005 all. 1 ,cap.1 ,nota 5)
- Il loro superamento comporta il ritiro del prodotto
- Parametri Reg. 2073/2005
 - *Salmonella*, *E. coli*, *Enterobacter sakazakii*, *Listeria monocytogenes*
 - Tossine microbiche (*Enterotossina stafilococcica*, *Istamina*)
- Altri parametri che probabilmente verranno normati in futuro:
 - *Virus enterici*, *Vibrioni*, *E. coli* O157, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*




Regolamento 178/2002 Cap. 14 → Requisiti di sicurezza degli alimenti

Criteri di commestibilità

- Servono per evitare di dover ritirare il prodotto con inevitabili danni commerciali
- Hanno un ruolo preventivo
- Il loro superamento comporta il ritiro del prodotto e la revisione del piano di autocontrollo (Reg.178/2002)
- Devono essere effettuati soprattutto all'inizio della shelf life per evitare che i prodotti vengano scartati prima del termine di conservazione
- Parametri: CMT, *Pseudomonas spp*, Lieviti e muffe.







Alcune precisazioni


In riferimento al Reg. 2073/2005:

- Gli *E. coli* rimarranno come criterio di sicurezza nei molluschi fino a che nella legislazione non verranno sostituiti da *Norovirus* e *Virus Epatite A*.
- La ricerca di *Salmonella* nelle mezzene (bovini, suini) e nelle carcasse del pollame è considerata un criterio di processo.




Come è possibile allora che il Reg. 2073/2005 preveda che salsicce e spiedini siano privi di questo patogeno?





Caratteristiche dei microorganismi

Strain	pH min	pH max	T min (°C)	T max (°C)	Aw min
<i>Listeria monocytogenes</i>	4.39	9.4	-0.4	45	0.92
<i>Staphylococcus aureus</i>	4.0	9.8	7	48	0.85
<i>Escherichia coli</i>	4.0	9.0	7	46	0.95
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	4.4	6.0	7	46	0.95
<i>Clostridium botulinum</i> Proteolytic types	4.6	8.5	10	50	0.935
<i>Clostridium botulinum</i> Non-proteolytic types	4.6	8.5	3.3	50	0.97
<i>Clostridium perfringens</i>	5	9.0	12	50	0.97
<i>Bacillus cereus</i>	5	8.8	4	55	0.93
<i>Salmonella spp</i>	3.8	9.5	5.2	46	0.94





Modalità di scelta dell'analisi


Criterio di processo: la scelta del microorganismo da analizzare è in stretta relazione con la buona riuscita del processo stesso

→ esempio: pastorizzazione latte verificata tramite la ricerca di microorganismi termosensibili (*Enterobacteriaceae* presenti in elevate concentrazione nel prodotto in partenza).

Criterio di sicurezza: la scelta del patogeno da analizzare è fondata su dati epidemiologici e sanitari

Esempi di alcune scelte non corrette o comunque discutibili:

- *E. coli*: ricerca nel macinato alla vendita
- *Enterobacteriaceae*: ricerca nelle preparazioni a base di carne o nel macinato
- *Enterobacteriaceae*: ricerca nel latte alla vendita
- *Enterococchi*: ricerca sulle superfici di lavorazione per verificare le pulizie omettendo la ricerca di CMT
- *Salmonella* e *Listeria monocytogenes*: Ricerca durante le analisi per determinare la shelf life (non confondere la determinazione della shelf life con i Durability test relativi alla sicurezza)



Regolamento 2073/2005 Criteri di igiene di processo


Conteggio colonie aerobiche

→ È da effettuare in:

- Carcasse bovini, ovini, caprini, equini
- Carcasse suini
- Carne macinata (non se prodotta nel luogo di vendita e se con shelf life minore di 24 h)
- Carni separate meccanicamente

→ Parametro di commestibilità

- Al di fuori del Reg. 2073/2005 questo parametro è utile in numerosi alimenti
- E' necessario talvolta discriminare questo parametro dai lattobacilli





Regolamento 2073/2005 Criteri di igiene di processo

Le Enterobatteriacee

→ Hanno sostituito i coliformi:

i coliformi appartengono alla famiglia delle *Enterobatteriacee* ed hanno la prerogativa di fermentare il lattosio

→ Sono da ricercare in:

- Carcasse
- Latte in polvere
- Gelati
- Prodotti base uova (ovoprodotti)
- Latte pastorizzato: prima del 2005 vigeva il DPR 54/2007 secondo il quale non dovevano essere presenti solo i coliformi senza tenere conto delle *Enterobatteriacee* non lattosio fermentanti



Regolamento 2073/2005 Criteri di igiene di processo

E. coli (eccezion fatta per i molluschi → criterio di sicurezza)

Sono da ricercare in:

- Carni macinate
- Carni separate meccanicamente
- Preparazioni a base di carne (preparazioni di carne)
- Formaggi a base di latte sottoposto a trattamento termico (fosfatasi neg.)
- Burro e panna da latte crudo o termizzato (latte con fosfatasi positiva)
- Prodotti sgusciati di crostacei e molluschi cotti
- Frutta e ortaggi pre-tagliati
- Succhi di frutta e ortaggi non pastorizzati



Regolamento 2073/2005 Criteri di igiene di processo

Staffilococchi coagulasi + (salvo che non si evidenzino tossine)

→ Sono da ricercare in:

- Formaggi a base di latte crudo
- Formaggi a base di latte termizzato
- Formaggi stagionati a base di latte pastorizzato (o a temp. più elevata)
- Formaggi a pasta molle freschi a base di latte pastorizzato (o a temp. più elevata)
- Formaggi a pasta molle a base di latte termizzato
- Latte in polvere

→ Non ancora normate:

- Paste dolci farcite alle crema
- Paste all'uovo



Regolamento 2073/2005 Criteri di igiene di processo

Bacillus cereus presunto (salvo che non si evidenzino tossine)

→ È da ricercare in:

- Alimenti in polvere per lattanti e alimenti in polvere a fini medici speciali per bambini di età inferiore a 6 mesi



Regolamento 2073/2005 Criteri di sicurezza alimentare

Listeria monocytogenes

→ È da ricercare in:

- prodotti Ready To Eat

I limiti di accettabilità sono definiti in funzione di:

- data di scadenza
- aw e pH
- studi effettuati

→ Inutile su prodotti non a rischio: es. conserve, prodotti da forno, molluschi vivi, miele, bibite, vino

→ Per i prodotti non RTE:

- crudi, congelati-surgelati, precotti-pastorizzati vale ancora l'OM del 7 Dicembre 1993

 **SILLIKER**
a Mérieux NutriSciences Company




Regolamento 2073/2005 Criteri di sicurezza alimentare

Salmonella (escluso mezzene e carcasse)

→ È da ricercare in:

- Carni macinate e preparazioni di carne RTE
- Carni macinate e preparazioni di carne di pollame da cuocere
- Carni macinate e preparazioni di carne non di pollame da cuocere
- Carni separate meccanicamente, gelatina e collagene, formaggi, latte in polvere, gelati, ovoprodotti, alimenti contenenti uova crude, crostacei e molluschi cotti, molluschi vivi, semi germogliati, frutta e ortaggi pretagliati RTE, alimenti in polvere per lattanti e alimenti in polvere, per fini medici speciali, per bambini con meno di 6 mesi, alimenti di proseguimento in polvere.
- Carni di pollo Reg. 1086 27 ottobre 2011
Assenza di *S. enteritidis* e *S. typhimurium*

 **SILLIKER**
a Mérieux NutriSciences Company




Altri parametri

Parametri di sicurezza

→ **Regolamento 2073/2005**

- **Istamina:** Pesci contenenti elevate quantità di istidina (tonno)
(importante richiederla dove si manipola tonno esempio panini)
- **Enterobacter sakazakii:** Alimenti in polvere per lattanti e alimenti in polvere per fini medici speciali per bambini con età inferiore a 6 mesi
- **Enterotossine stafilococciche:** su formaggi con oltre 100.000 *Stafilococchi Coagulasi +*
- **Altre tossine:** *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus*

 **SILLIKER**
a Mérieux NutriSciences Company



Tamponi

→ **Dopo le pulizie servono per verificare l'esito delle stesse**

- CMT, *Enterobatteriacee*, Lieviti Muffe

→ **Durante la lavorazione possono servire:**

- Per capire qual è la provenienza di una contaminazione
- Per verificare che le operazioni vengono eseguite in modo corretto
- La CMT ha poco senso su tamponi effettuati in lavorazione


→ **Corretta scelta parametri dopo le pulizie:**

Eseguire sempre la CMT perché le pulizie non si prefiggono di eliminare solo alcuni microorganismi ma tutti quelli presenti sulle superfici.

→ **Siccome le Enterobatteriacee sono più labili rispetto ad altri germi ambientali il loro ritrovamento sulle superfici mette in evidenza una carenza più grave rispetto ad una CMT elevata.**

→ **La ricerca di *Listeria monocytogenes* è indispensabile solo dove si producono alimenti con limite: *Listeria monocytogenes* assente su 25g (Reg. 2073/2005)**

 **SILLIKER**
a Mérieux NutriSciences Company



Esempio: *E. coli* in erbe cotte

Esecuzione di tamponi durante il processo produttivo per capire la sorgente della contaminazione:

→ Parametri ricercati:

- *Enterobatteriacee* (ricerca qualitativa-quantitativa)
- *E. coli* (ricerca qualitativa-quantitativa)


Su guanti e altre superfici di contatto

Esecuzione di tamponi con ricerca di :

CMT	ufc/cmq
<i>Enterobatteriacee</i>	ufc/cmq
<i>Enterobatteriacee</i>	presenza su 100 cmq
<i>E. coli</i>	ufc/cmq
<i>E. coli</i>	presenza su 100 cmq

→ La contaminazione di *E. coli* proveniva dalla manipolazione in fase di confezionamento.

*solo aumentando la sensibilità del metodo è stato possibile individuare la sorgente di contaminazione


SILLIKER
 a Mérieux NutriSciences Company



Esempio: *Clostridium perfringens*

→ Prodotti refrigerati → criterio di igiene di processo

- presenza di spore in carne cruda per scarse condizioni igieniche durante la macellazione

→ Prodotti caldi → criterio di igiene di processo

- Prodotti caldi soprattutto se mal conservati

Esempio: cacciucco conservato a temperatura inferiore a 60°C
→ il *Clostridium perfringens* inizia a moltiplicarsi a 50°C

↓

Presenza di elevata concentrazione di *Clostridium perfringens*

L'eventuale presenza di tossine acquisisce un significato di criterio di sicurezza


SILLIKER
 a Mérieux NutriSciences Company



Esempio: Prodotti pastorizzati-refrigerati

→ Prodotto pastorizzato a 90°C per 5 minuti, refrigerato (4-8°C) e conservato in ATM modificata

- Ricerca *Clostridium perfringens*: poco utile, non si moltiplica sotto 12°C
- Ricerca *Clostridium botulinum* non proteolitico (psicrotrofo): poco utile
Le spore di questo microorganismo non resistono a questo trattamento
- Ricerca *Clostridium botulinum* proteolitico (mesofilo): poco utile, non si moltiplica sotto 10°C. A meno che non si voglia simulare un abuso termico oltre i 10°C
- Ricerca *Bacillus cereus*: utile. Le spore resistono a questo trattamento. Questo microorganismo comincia a moltiplicarsi alla temperatura di 5°C

 **SILLIKER**
a Mérieux NutriSciences Company



Esempio: Flora lattica

→ La flora lattica non viene discriminata dalla CMT salvo che non si effettui la ricerca specifica.

→ La flora lattica può avere un ruolo antagonista nei confronti dei patogeni; è quindi opportuno considerare questo importante aspetto.

Si sviluppa nei prodotti:

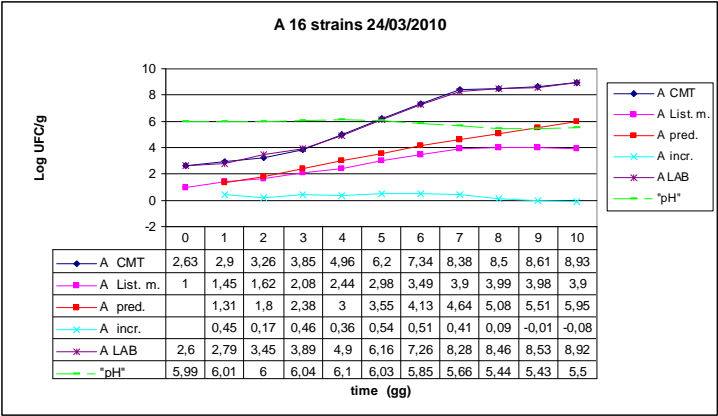
- Sottovuoto
- In ATM priva di ossigeno
- Refrigerati

Esempio: paté per crostini, salse, prosciutto sottovuoto, salmone affumicato, carne sottovuoto

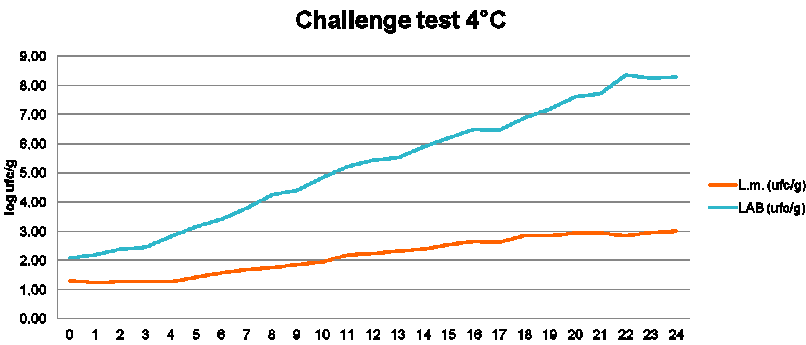
 **SILLIKER**
a Mérieux NutriSciences Company



Esempio: attività anti-Listeria della Flora lattica



Esempio: Challenge test in funzione della temperatura

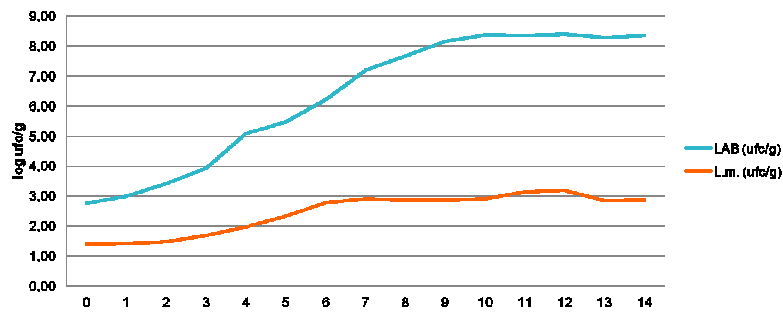


	Lag Fase (gg)	Growth rate (log/gg)	Fase stazionaria (log ufc/g)	Giorno fase stazionaria
LAB	1,07	0,31	8,29	22,56°
L.m.	3,49	0,12	2,93	19,2°



Esempio: Challenge test in funzione della temperatura

Challenge test 8°C

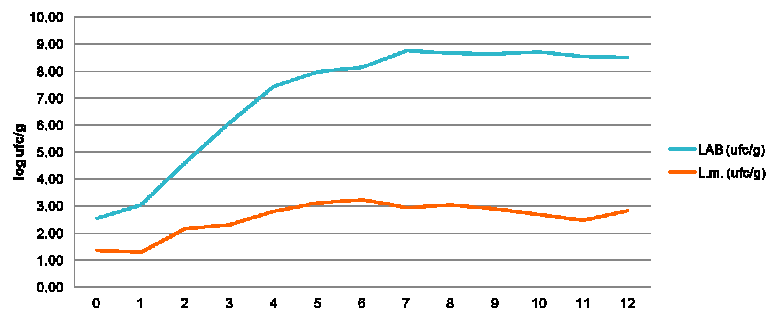


	Lag fase (gg)	Growth rate (log/gg)	Fase stazionaria (log ufc/g)	Giorno fase stazionaria
LAB	1,41	0,78	8,37	8,80°
L.m.	2,49	0,39	2,97	6,72°



Esempio: Challenge test in funzione della temperatura

Challenge test 12 °C



	Lag fase (gg)	Growth Rate (log/gg)	Fase stazionaria (log ufc/g)	Giorno fase stazionaria
LAB	0,59	1,45	8,57	5,28°
L.m.	0,8	0,53	2,91	4,32°



Esempio: Istamina

L'istamina è una sostanza termostabile prodotta da batteri (esempio: *Enterobacteriacee*) a partire da un aminoacido, l'istidina.

Può trovarsi in:

- Sgombro, sardine, acciughe, pesce spada
- conserve di tonno

→ **Casi:**

- panino al tonno
- vasetto di tonno manipolato e conservato a temperatura ambiente

→ **Esempio panino farcito con tonno**

- CMT (oltre 100 milioni)
- Enterobacteriacee (oltre 10 milioni)
- Istamina (1.800 ppm)

 **SILLIKER**
a Mérieux NutriSciences Company



Esempio: mozzarelle colorate (blu, rosse)

→ La ricerca di *Pseudomonas fluorescens* non è sufficiente


- Occorre ricercare anche altre specie di *Pseudomonas*:
aeruginosa, *putida* ecc
- Oppure i seguenti generi:
Bulchoderia, *Aeromonas*

→ Inoltre anche i lieviti possono dare colorazione rosse e marroni

→ Questi microorganismi devono essere in concentrazione molto bassa al tempo zero per ridurre il rischio di avere colorazioni anomale alla fine della shelf life ; non tutti i ceppi (biovar) – sono produttori di pigmento; es. il biovar IV produce indigoidina (blu insolubile in acqua), altri ceppi producono N-metil-1-idrossifenazina (blu, idrosolubile)

→ L'uso improprio da parte del consumatore amplifica la problematica

 **SILLIKER**
a Mérieux NutriSciences Company




Quesito

→ **Prodotti RTE con le seguenti caratteristiche:**

- substrato di crescita per *Listeria monocytogenes*
- scadenza oltre 4 gg
- realizzati da una ditta che vende alla GDO
- messi in vendita dalla GDO in vassoi con scadenza inferiore ai 5 gg

→ **Domanda:**

- Qual è il limite di *Listeria monocytogenes* in questo tipo di prodotti alla vendita?

 **SILLIKER**
a Mérieux NutriSciences Company



Studi sui prodotti refrigerati

→ **Shelf life:** individuare la scadenza dal punto di vista della commestibilità

→ **Durability studies:** osservare il comportamento dei germi patogeni naturalmente presenti nei prodotti

→ **Challenge Test Growth Potential:** osservare il comportamento dei patogeni inoculati. Il Growth Potential si esprime come accrescimento logaritmico durante tutto il periodo di osservazione

→ **Challenge test Maximum Growth Rate:** osservare il comportamento dei patogeni inoculati facendo anche uso della microbiologia predittiva. Il Max. Growth Rate si esprime come accrescimento logaritmico giornaliero.

 **SILLIKER**
a Mérieux NutriSciences Company



Contatti

Silliker Italia S.p.A

**Direttore Scientifico
Dott. Marco Romani
marco.romani@silliker.it**