



Roma, 01/03/2012

# PROVA DI DURABILITY STUDY

*Francesca Campeis*

Istituto Zooprofilattico delle

Regioni Lazio e Toscana, Sezione di Pisa



REGOLAMENTO (CE) n. 2073/2005 DELLA COMMISSIONE

del 15 novembre 2005

sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari

(Testo rilevante ai fini del SEE)

Articolo 3

## Prescrizioni generali

2. 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. In particolare ciò si applica agli alimenti pronti che costituiscono terreno favorevole alla crescita di *Listeria monocytogenes* e che possono costituire un rischio per la salute pubblica in quanto mezzo di diffusione di tale batterio.

Gli operatori del settore alimentare possono condurre gli studi suddetti in collaborazione tra loro.

## ALLEGATO II

Gli studi di cui all'articolo 3, paragrafo 2, comprendono:

- prove per determinare le caratteristiche fisico-chimiche del prodotto, quali pH,  $a_w$ , 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,
- consultazione della letteratura scientifica disponibile e dei dati di ricerca sulle caratteristiche di sviluppo e di sopravvivenza dei microrganismi in questione.

Se necessario, in base agli studi summenzionati, l'operatore del settore alimentare effettua studi ulteriori, 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,
- 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.

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

- 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

- 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.



DURABILITY STUDIES

EN

SANCO/1628/2008 ver. 9.3 (26112008)



COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES

Brussels,  
C(2008)

COMMISSION STAFF WORKING DOCUMENT

**GUIDANCE DOCUMENT**

on *Listeria monocytogenes* shelf-life studies for ready-to-eat foods, under Regulation  
(EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs



afssa  
AGENCE FRANÇAISE  
DE SÉCURITÉ SANITAIRE  
DES ALIMENTS



EU COMMUNITY REFERENCE 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

Annie BEAUFORT, Marie CORNU, Hélène BERGIS, Anne-Laure LARDEUX, Unit Quantitative

## Documento AFSSA

Propone la possibilità di 3 tipi di studio:

- **Challenge test:** che hanno lo scopo di fornire informazioni sul comportamento di un determinato batterio in esame, inoculato artificialmente in un alimento in determinate condizioni.
  1. Studio del growth potential ( $\delta$ ) valutazione del potenziale di crescita.
  2. Studio del maximum growth rate ( $\mu_{\max}$ ) tasso di crescita massimo
- **Durability studies:** per matrici naturalmente contaminate.

## DURABILITY STUDY

*Come si effettua  
uno  
studio di durability ?*

## Durability study

Permette la valutazione della crescita di *Listeria monocytogenes* in matrici naturalmente contaminate.

E' il test più realistico perché la contaminazione avviene naturalmente.

Il test consiste nell'analizzare, alla fine della shelf-life, un **certo** numero di unità (confezioni) del campione scelte in modo casuale e conservate in condizioni simili a quelle della distribuzione, per quantificare i livelli di *L. monocytogenes* e verificare quante unità superano il limite di 100 UFC/g.

## Durability study

*Quali sono  
i  
punti critici ?*

## Durability study

### Punti critici:

- Bassa probabilità di trovare un'unità contaminata quando il numero iniziale di *L. monocytogenes* naturalmente presente è molto basso.
- Eterogeneità della distribuzione di *L. monocytogenes* nel campione.

## Durability study



EN

SANCO/1628/2008 ~~ver.~~ 6 (23092008)

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES

Brussels,  
C(2008)

WORKING DOCUMENT

Draft

**GUIDANCE DOCUMENT**

**on the shelf-life studies for ready-to-eat foods, under Regulation (EC) No 2073/2005 of  
15 November 2008 on microbiological criteria for foodstuffs**

### 5.4.2. *Durability studies*

#### 5.4.2.1. Interests and limits of durability studies

Durability studies are more realistic than a challenge test, regarding the contamination (strain(s), injury or stress, distribution and initial concentration of *L. monocytogenes*). They are sufficient when *L. monocytogenes* is routinely detected in the tested food at the end of manufacturing (prevalence at least equal to 10%).

## Durability study

- La prevalenza di almeno il 10% è fondamentale per questo tipo di studi affinché si riesca ad osservare l'evoluzione del batterio in esame, altrimenti la probabilità di apprezzarla sarebbe troppo bassa.

Quindi per effettuare un durability study è necessario scegliere una matrice che abbia queste caratteristiche...ad esempio salmone per *Listeria monocytogenes*.

## Durability study

Table 6. Example of estimated proportion of units > 100 *L. monocytogenes* / g after storage period

n number of analysed units	r number of units > 100 cfu/g	p estimated proportion	CI Confidence Interval at 95%
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% ]

Maggiore è il numero di unità analizzate e più stretto è l'intervallo di confidenza.

- *Importanza quindi di analizzare un numero sufficiente di unità campionarie!*

## Durability study

Per il campionamento si utilizza il metodo del “Simple Random Sampling”, una funzione del programma excel che ci aiuta a diminuire il problema dell’eterogenicità del campione.

Questo metodo è basato sul principio dell’equiprobabilità.

[Cartell1.xls](#)

## Il nostro studio

### PRODOTTO PRONTO AL CONSUMO IN ATMOSFERA PROTETTIVA

Campione naturalmente contaminato con *L. monocytogenes*.

Il campione è risultato positivo durante le analisi effettuate presso il nostro laboratorio.


E’ stato deciso di non mettere in commercio le confezioni del lotto risultato positivo, che pertanto sono state utilizzate per l’effettuazione del **DURABILITY STUDY**.



## Il nostro studio

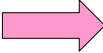
Il prodotto risultava adatto per il nostro studio:

dallo storico delle analisi fornite dal produttore e dallo storico delle analisi effettuate presso il nostro laboratorio, il numero massimo trovato di unità campionarie positive e anche quello più frequente è stato di 2 unità su 5

 quindi la matrice presenta una prevalenza per *L. monocytogenes* > 10%

## Il nostro studio

Analisi ufficiali:

qualitativa in 25g  2 unità positive su 5

analisi di revisione  1 unità positiva su 5

In totale: **3 unità positive su 10**

In base alle modalità di preparazione, ovvero alla buona omogeneizzazione delle materie prime durante la produzione si può considerare la **distribuzione di *L.monocytogenes* uniforme.**

## Il nostro studio

### Scelta della unità da analizzare:

Le confezioni sono state numerate con numeri progressivi da 1 a 120 e scelte tramite i numeri random generati con il programma excel.

[Cartel1.xls](#)

Sono stati selezionati e analizzati 40 campioni.

Analisi effettuate:

- Ricerca qualitativa di *L. monocytogenes*  
(assenza in 25g)
- Ricerca quantitativa di *L. monocytogenes*  
(conteggio su piastra)

## Il nostro studio

Temperature.

Il produttore dichiara di aver conservato le unità ad una temperatura compresa tra 2.5°C e 3.0°C .

Dopo 35 gg sono state scelte le confezioni, portate in laboratorio e stoccate ad una temperatura di 8.0°C , considerata più ragionevole in termini di condizioni di conservazione in fase di distribuzione.

## Il nostro studio

### Parametri dichiarati dal produttore:

- Temperatura: tra 2.5°C e 3.0°C
- % CO<sub>2</sub>: 20%
- Prevalenza: 2 unità campionarie su 5
- pH: 4.8
- AW: 0.955
- Durata della shelf-life: 50 gg

## Il nostro studio

### Durability study

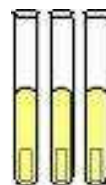
Alla fine della shelf-life sono stati effettuati sia il conteggio che l'assenza in 25g su 40 unità campionarie del prodotto.

### Risultati:

- Tutte le unità campionarie sono risultate  
<10 UFC/g
- Nell'analisi qualitativa sono risultate  
positive 7 unità campionarie su 40.

## Il nostro studio

Calcolo del livello iniziale.



Durante la revisione d'analisi è stato effettuato, al 16° giorno di shelf-life, anche un conteggio MPN a tre provette su un pool delle 5 u.c.

Risultati: *Listeria monocytogenes* < 0.03 MPN/g

Limite inferiore: 0 MPN/g

Limite superiore: 0.094 MPN/g

## Microbiologia predittiva

Si utilizza un programma di predizione di crescita microbiologica per una stima dell'andamento della crescita di *L. monocytogenes* nel prodotto durante il corso della shelf-life:

COMBASE  
*predictor*

Programma gratuito on-line



## Microbiologia predittiva

### WORST SCENARIO



Gli studi di **microbiologia predittiva** ed i **challenge test** sono effettuati nelle **condizioni più favorevoli alla crescita microbica (aw, pH)** relativamente alla variabilità del prodotto considerato .

Si considerano quindi i risultati ottenuti nelle condizioni dello **scenario peggiore**.

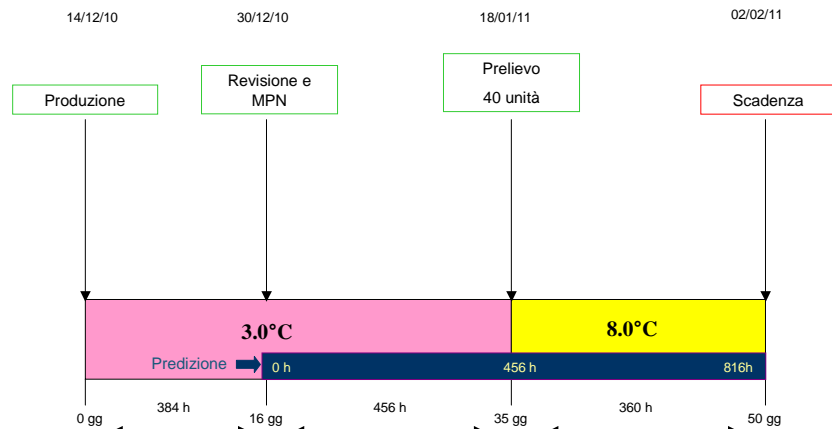
## Microbiologia predittiva

Calcolo del livello iniziale.

Pertanto tramite un foglio di calcolo:

$$0.094 \text{ MPN/g} = -1.03 \text{ LOG}$$

## Microbiologia predittiva

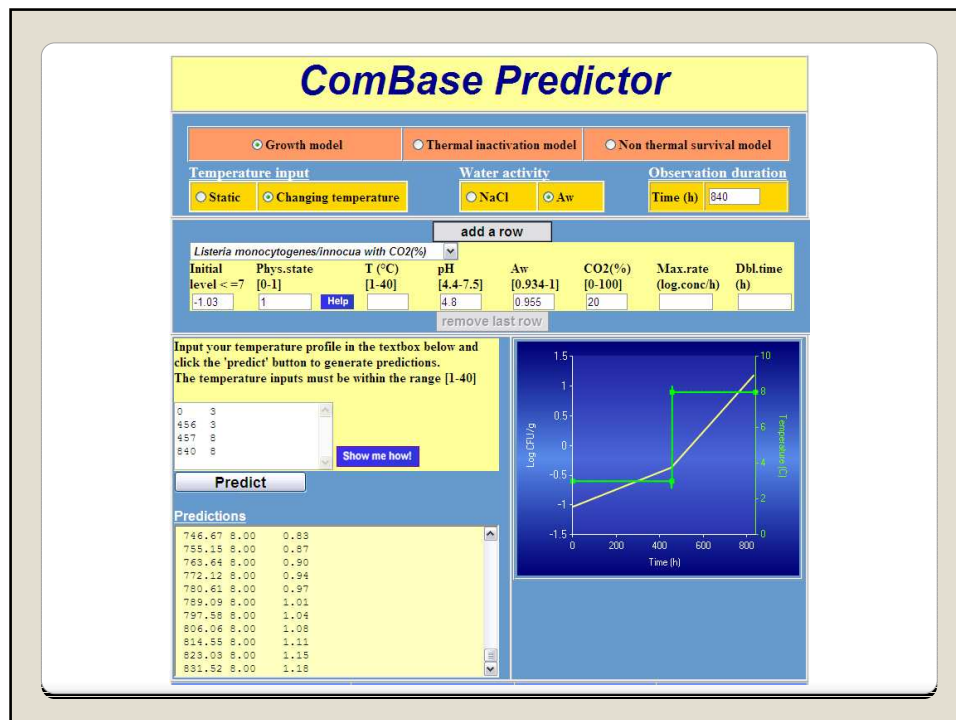


<http://modelling.combase.cc/Login.aspx?ReturnUrl=%2fDefault.aspx>

## Microbiologia predittiva

Parametri utilizzati per predizione:

- Profilo: *Listeria monocytogenes/innocua with CO<sub>2</sub>*
  - CO<sub>2</sub>: 20%
  - Initial level: -1.03 LOG
  - Phys. State: 1 (lo scenario peggiore, senza LAG fase)
  - Temperatura: 3.0°C per 19 gg (456 ore)  
8.0°C per 15 gg (360 ore)
  - pH: 4.8
  - AW: 0.955
- confermati nel  
ns. lab.



## Microbiologia predittiva

[Prediction.doc](#)

Si ottiene un valore = 1.15 LOG

Che equivale a 14.13 listerie alla fine della shelf-life, ampiamente sotto il limite di legge.

## Risultati

MPN (effettuato al 16° giorno della shelf-life)

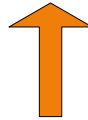
Pool di 5 u.c. = < 0.03 MPN/g

Intervallo di confidenza:

- Limite inferiore = 0 MPN/g
- Limite superiore = 0.094 MPN/g

Predizione = 14.13 UFC/g di Listerie

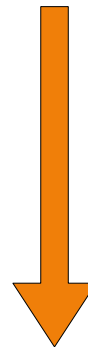
AUMENTO!



## Risultati

Prove qualitative:

- Analisi ufficiale: 3/10 = 30%  
(a 16 gg)
- Fine: 7/40 = 17.5%  
(a 50 gg)





## Risultati

### Analisi quantitative:

- Risultati: 0 su 40 unità > 100 UFC/g

### Intervallo di confidenza:

- Limite inferiore: 0,06%
- Limite superiore: 8,6%

## Osservazioni

I durability studies prevedono solo le prove quantitative alla fine del periodo di conservazione.

Nel nostro caso le prove qualitative aggiunte che abbiamo effettuato sono state molto utili per dimostrare che il livello di listeria *non tende ad aumentare* durante la shelf-life, contrariamente a quanto si evidenzia con la microbiologia predittiva.

Questo può essere dovuto alla presenza di altre componenti che il programma non prevede, per esempio la presenza di *batteri lattici*.

## Osservazioni

- ❑ Il test fornisce solo una valutazione di tipo matematico.
- ❑ Ogni prodotto è unico e diverso da qualsiasi altro.
- ❑ Esperienza dell'operatore che esegue le prove, per valutare:
  - Scelta del numero di campioni in base alla prevalenza.
  - Valutazione dell'eterogeneità del campione.
  - Interpretazione dei risultati (limiti di confidenza).

## Osservazioni

Potrebbero essere associate al test di durability altre prove:

- Prove qualitative iniziali, o MPN più sensibili, per valutare la prevalenza e decidere sulla numerosità del campione.
- Lo studio del prodotto per valutare la sua eterogeneità, ad esempio con il conteggio di una carica presente in abbondanza (carica mesofila o conteggio lattici) su alcune unità per valutare se si ottengono risultati uniformi.

## Osservazioni

→ **Sono sufficienti solo le analisi quantitative?**

Secondo le linee guida le prove quantitative sono sufficienti (in quanto i limiti di confidenza sono accettabili, lo consentono).

MA non forniscono indicazioni sull'andamento del patogeno nell'alimento!

Nello studio che abbiamo effettuato, siamo stati in grado di dettagliare meglio l'andamento di *L. monocytogenes* in quanto sono state effettuate anche le analisi qualitative.

## Osservazioni

Quindi sarebbe meglio integrare con le analisi qualitative che sono più precise e più sicure!!

→ **Sono sufficienti solo le prove qualitative?**

NO, perché si avrebbe garanzia sulla presenza della *Listeria*. Ma non si potrebbe dire se e quante unità superino il limite (100 UFC/g).

## Conclusioni

Secondo i parametri chimico-fisici di pH e aw, l'alimento in esame viene collocato tra gli alimenti che costituiscono terreno favorevole per la crescita di *L. monocytogenes*.

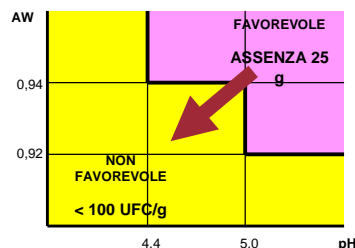
pH = 4.8

Aw = 0.955

## Conclusioni

I test da noi effettuati dimostrano invece che il prodotto NON rappresenta un terreno favorevole alla crescita di *L. monocytogenes*, in quanto alla fine della shelf-life anche se sono state trovate 7 u.c. positive su 40 u.c., nessuna ha superato il limite di 100 UFC/g.

Pertanto l'alimento è stato ricategorizzato come non favorevole alla crescita di *L. monocytogenes*!!



GRAZIE PER  
L'ATTENZIONE!

