

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

Roma, 29 febbraio - 1 marzo 2012

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



Dr Roberto Fischetti



13 aprile 2011



**Laurea in Scienze e Tecnologie delle
Produzioni Animali
*d.ssa Francesca Novello***

**"Valutazione dell'igiene degli
alimenti attraverso nuove
discipline inerenti la
microbiologia "**

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.

ATTESTATO PREMIO
GIORGIO BIANCHINI

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

Autore/i: *R. Fischetti, I. Fabbri, F. Campeis, F. Novello*, R. Bozzi Colonna*,
C. Pace, C. Milioni, L. Gasperetti, R. Forletta*
Ist. Zooprofilattico Lazio e Toscana - 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

Chiaro
Carlo Scatena

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.

Lo scopo è stato quello di studiare l'evoluzione di *Pseudomonas fluorescens* colorante nelle mozzarelle per mezzo di un test sperimentale μ_{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.



μ_{\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 μ_{\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.

μ_{\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 μ_{\max} servono da 10 a 15 unità per ognuna delle 6 curve
- Il μ_{\max} si ottiene elaborando i dati del test. Nel nostro caso attraverso il programma MicroFit. L'unità di misura è ln/giorno .

μ_{\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 μ_{\max} ad altre temperature, così da poter avere i valori a varie diverse temperature stabilite per una determinata shelf-life.

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

μ_{\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
- $(\mu_{\max T1(\text{Ref})} \times d1 \text{ (gg a T di riferim)}) + (\mu_{\max T2} \times d2 \text{ (gg ad altra temp)}) + \dots$
Dopo aver trasformato i valori in 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 CEPI di *P. fluorescens* colorante: isolato da mozzarella e isolato da latte UHT

UNITA' PER IL TEST

	Unità testate
Determinazione curve di crescita per μ_{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 pre-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'extrapolazione matematica dei dati sperimentali ottenuti col μ_{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.

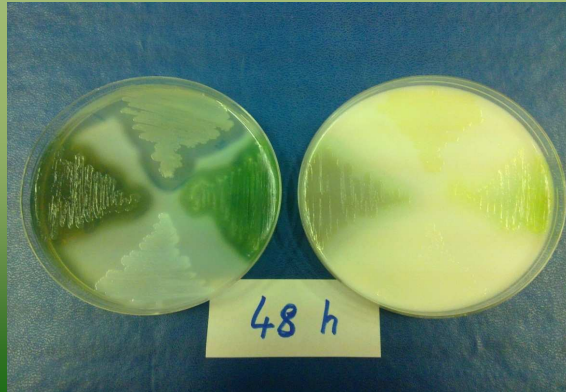


GRAFICO OTTENUTO DAL 1° LOTTO

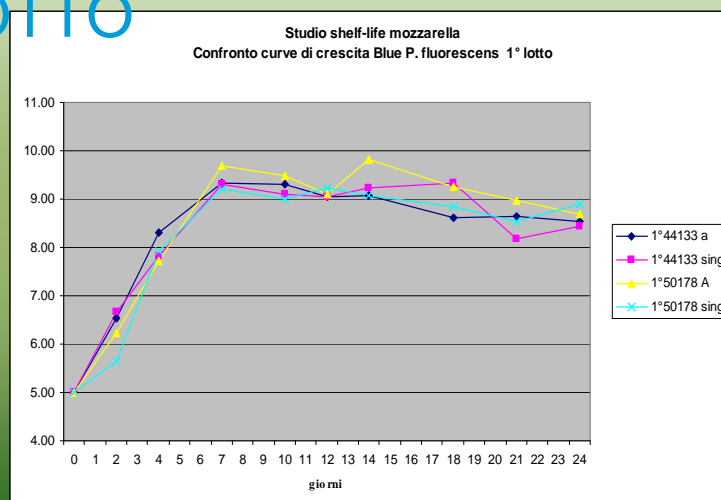


GRAFICO OTTENUTO DAL 2° LOTTO

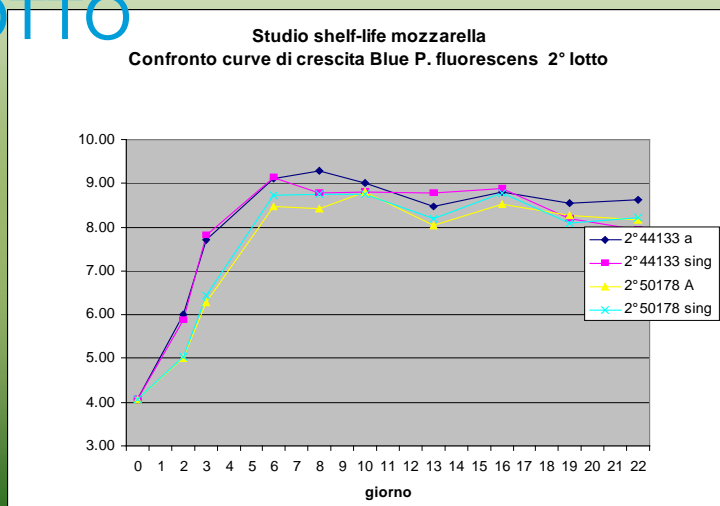
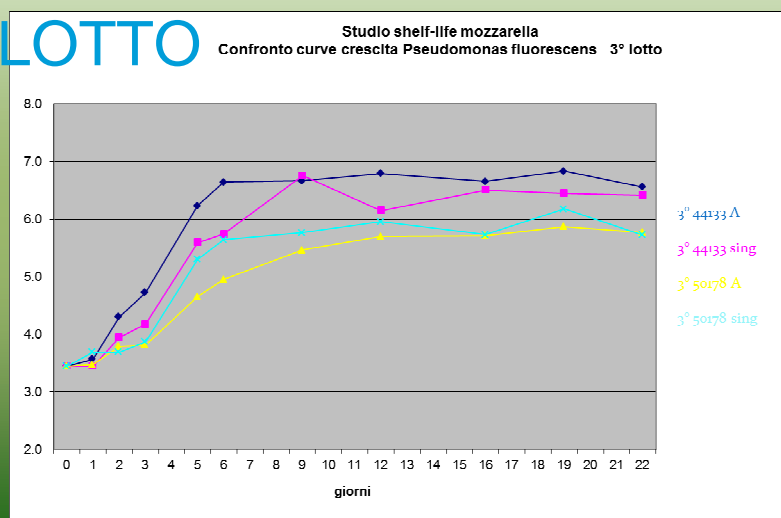
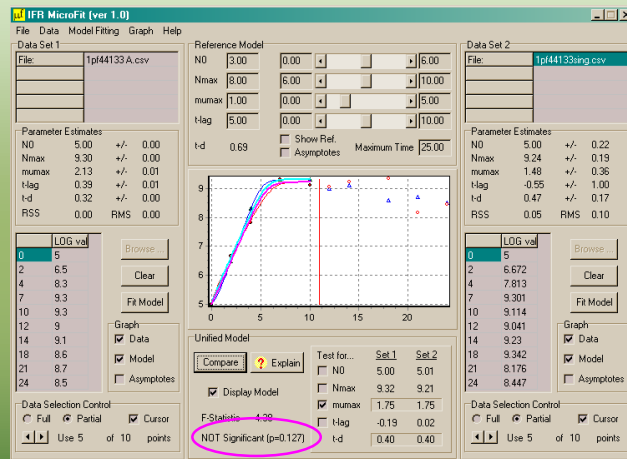


GRAFICO OTTENUTO DAL 3° LOTTO

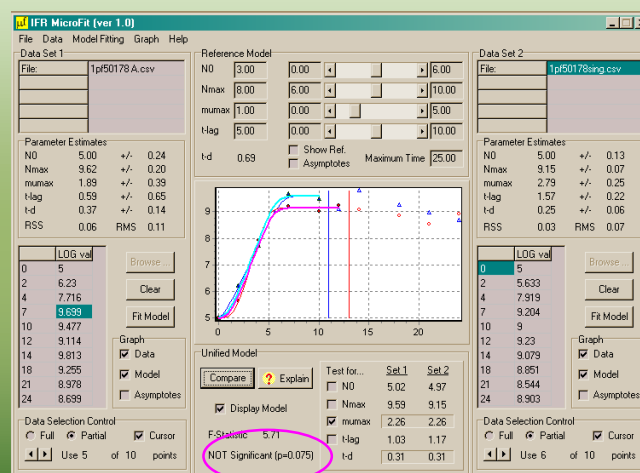


Comparazione tra challenge effettuato su una sola unità e challenge effettuato su 10 unità
Lotto 1
Pseudomonas fluorescens ceppo 44133



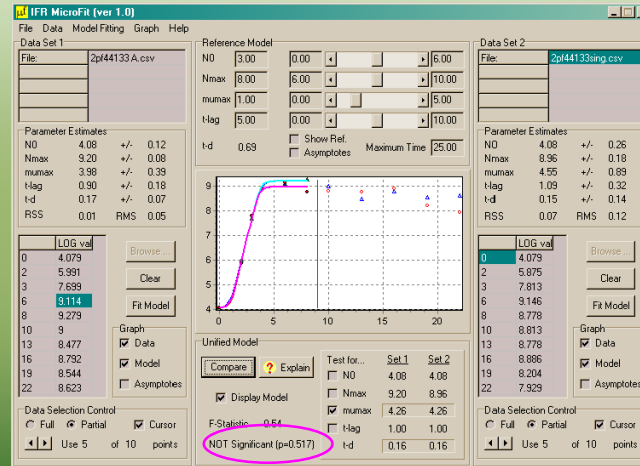
La differenza tra i 2 μ_{max} non è significativa, per cui i risultati dei 2 modelli di challenge sono sovrapponibili

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



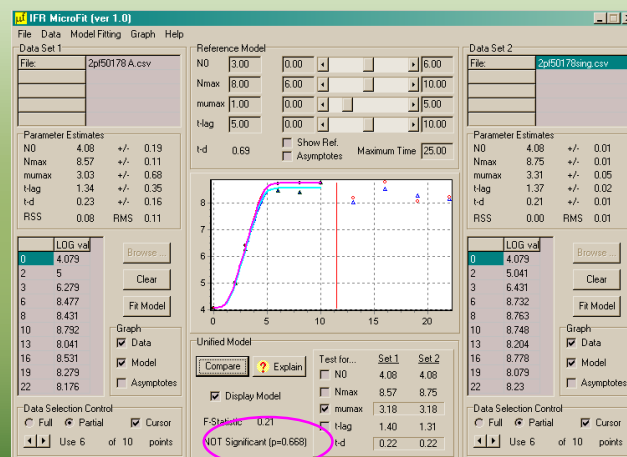
La differenza tra i 2 μ_{max} non è significativa, per cui i risultati dei 2 modelli di challenge sono sovrapponibili

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



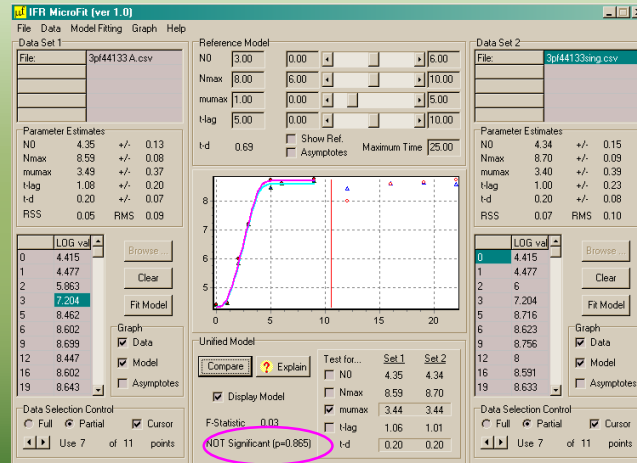
La differenza tra i 2 μ_{max} non è significativa, per cui i risultati dei 2 modelli di challenge sono sovrapponibili

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



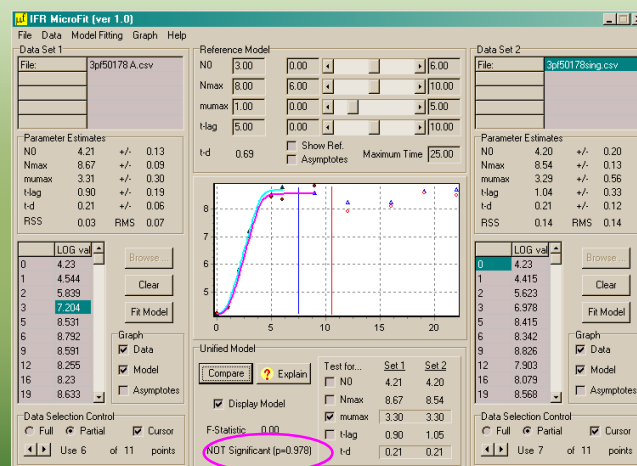
La differenza tra i 2 μ_{max} non è significativa, per cui i risultati dei 2 modelli di challenge sono sovrapponibili

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 μ_{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 μ_{max} non è significativa, per cui i risultati dei 2 modelli di challenge sono sovrapponibili

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

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

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

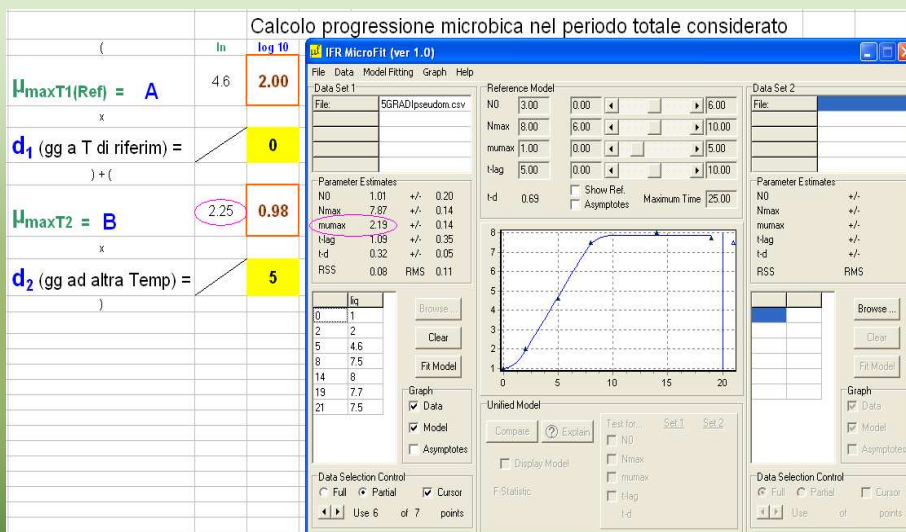
$\mu_{\max} = 2.254$

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

T = nuova temperatura T = 5

$T_{\min} = -2$

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



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

UTILIZZAZIONE μ_{\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 5×10^2 (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
	d_1 (gg a T di riferim) =	2.1	
		formula	
		$(\mu_{\max T1(\text{Ref})} \times d_1 \text{ (gg a T di riferim)}) + (\mu_{\max T2} \times d_2 \text{ (gg ad altra temp)})$	
		$(A \times D1) + (B \times D2)$	
5 °C	$\mu_{\max T2} = B$	2.25	0.98
	d_2 (gg ad altra Temp) =	0	
			4.20 log10 ufc/g
			1.6E+04 ufc/g
			15677.78 ufc/g

UTILIZZAZIONE μ_{\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 5×10^2 (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 = $4.3 \text{ LOG} / \mu_{\max}$

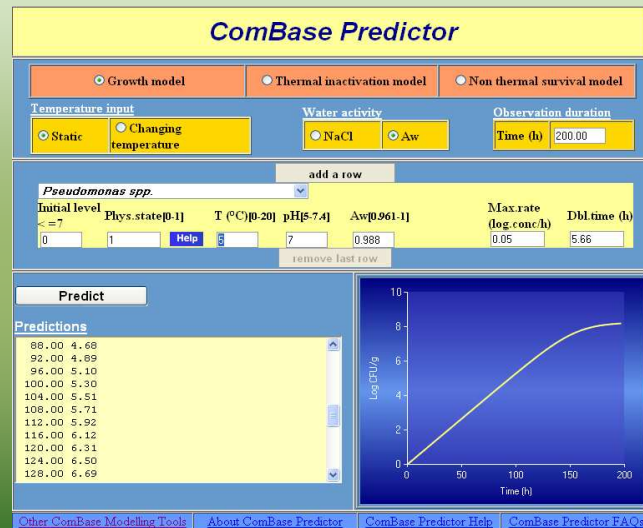
		Calcolo progressione microbica nel periodo totale considerato	
		ln	log 10
8 °C	$\mu_{\max T1(\text{Ref})} = A$	4.6	2.00
	d_1 (gg a T di riferim) =	0	
		formula	
		$(\mu_{\max T1(\text{Ref})} \times d_1 \text{ (gg a T di riferim)}) + (\mu_{\max T2} \times d_2 \text{ (gg ad altra temp)})$	
		$(A \times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

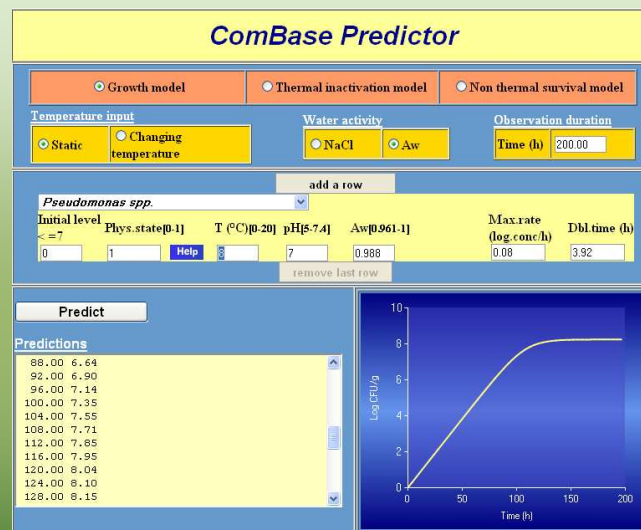
E' stato effettuato un confronto tra i dati sperimentali e i dati ricavati da predizione con sistema Combase

Predizione a 5°C



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

Predizione a 8°C



Dalla predizione a 8° C si ottiene un μ_{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 μ_{\max} a $8^\circ C$ = 1,92 si confronta con μ_{\max} sperimentale = 2,00

Il μ_{\max} a $5^\circ C$ = 1,2 si confronta con μ_{\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.