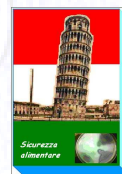




Pisa, 11 Maggio 2011

PROVA DI DURABILITY STUDY

D.ssa Ilaria Fabbri, 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, Héléne BERGIS, Anne-Laure LARDEUX, Unit Quantitative

Documento AFSSA

Propone la possibilità di 3 tipi di studio:

- Challenge test (per matrici da contaminare artificialmente):
 1. Studio del growth potential (δ)
 2. Studio del maximum growth rate (μ_{\max})
- **Durability studies** (per matrici naturalmente contaminate).

Durability Studies

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

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

Durability studies

Il test consiste nell'analizzare, alla fine della shelf-life, in *ragionevoli condizioni* di distribuzione e di conservazione, tutte le unità prese in considerazione, per quantificare i livelli di *L.monocytogenes* e verificare quante unità superano il limite di 100 ufc/g.

Durability studies

Punti critici:

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

Durability studies



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 studies

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%	[0% - 4%]
20	1	5%	[1% - 24%]
100	1	1%	[0.2% - 5%]
20	2	10%	[3% - 30%]
100	2	2%	[0.6% - 7%]

http://www.causascientia.org/math_stat/ProportionCI.html

Durability studies

“Il limite di confidenza più alto (7%) che si ha analizzando 100 unità e trovandone 2 >100 ufc/g, è più basso di quello che si ha analizzando solo 20 unità senza trovarne alcuna > 100 ufc/g (16%)”.

Guide shelf-life studies CRL *L.monocytogenes*

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

Importanza di analizzare un numero sufficiente di unità

Durability studies

Per il campionamento si utilizza il metodo del “**Simple Random Sampling**” che ci aiuta a diminuire il problema dell'eterogenicità del campione.

Questo metodo è basato sul principio dell'equiprobabilità.

[Cartell.xls](#)

Il nostro studio

PRODOTTO PRONTO IN ATMOSFERA PROTETTIVA

Campione naturalmente contaminato con *L.monocytogenes*.

Il campione è risultato positivo durante 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 e dalle nostre analisi il numero massimo trovato e quello più frequente è stato di 2 su 5 unità campionarie positive (40%)



> 10%

Il nostro studio

Sono stati analizzati 40 campioni, scelti con il metodo del “[Simple Random Sampling](#)”.

Analisi effettuate:

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

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](#)

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_2 : 20%
- Prevalenza: 2 unità campionarie su 5
- pH: 4.8
- AW: 0.955
- Durata della shelf-life: 50 gg

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 omogenizzazione delle materie prime durante la produzione si può considerare la distribuzione di *L.monocytogenes* uniforme.

Il nostro studio

Calcolo del livello iniziale.

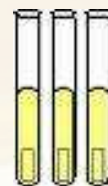
Durante la revisione d'analisi abbiamo effettuato, al 16 gg di shelf-life, anche un conteggio MPN a tre provette in un pool di 5 u.c.

Risultati:

$N < 0.03$ MPN/g

Limite inferiore: 0 MPN/g

Limite superiore: 0.094 MPN/g



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** .

Il nostro studio

Calcolo del livello iniziale.

Pertanto:

[calcoli.xls](#)

0.094 MPN/g = -1.03 LOG

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

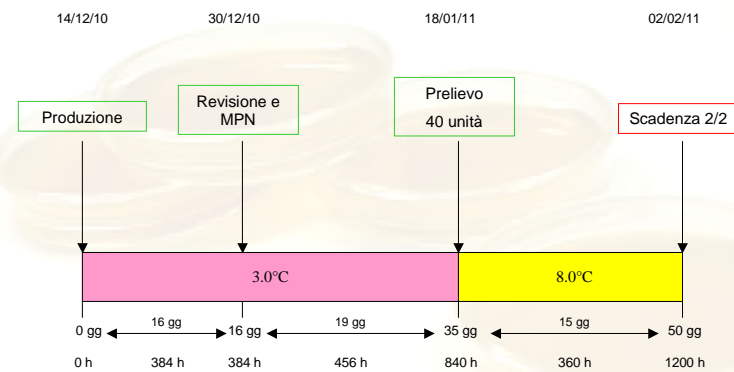


Microbiologia predittiva

Parametri per predizione:

- Profilo: *Listeria monocytogenes/innocua with CO₂*
 - CO₂: 20%
 - Initial level: -1.03 LOG
 - Phys. State: 1 (lo scenario peggiore, senza LAG fase)
 - Temperatura: 3.0°C per 35 gg (840 ore)
8.0°C per 15 gg (360 ore)
 - pH: 4.8
 - AW: 0.955
- } confermati nel
ns. lab.

Microbiologia predittiva



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

Microbiologia predittiva

Si ottiene un valore = 1.15 LOG

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

Il nostro studio

Durability study

Alla fine della shelf-life abbiamo effettuato 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.

Conclusioni

• MPN
effettuato
a 16 gg < 0.03 MPN/g \Rightarrow 0.094 MPN/g
limite
superiore

• Predizione \Rightarrow 14.13 listerie

AUMENTO!



Conclusioni

- Analisi ufficiale: $3/10 = 30\%$
- Fine: $7/40 = 17.5\%$

Decrescita!!!!



Conclusioni

Le prove qualitative effettuate in più (i durability studies prevedono solo le prove quantitative alla fine del periodo di conservazione) sono state molto utili per dimostrare che il livello di listeria si *abbassa* 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*.

Conclusioni

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%]

http://www.causascientia.org/math_stat/ProportionCI.html

Conclusioni

Punti critici:

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

Conclusioni

Sebbene i parametri chimico-fisici (pH e AW) collochino il prodotto tra gli alimenti che costituiscono terreno favorevole per la crescita di *L.monocytogenes*, il Durability Study effettuato dimostra che la listeria in realtà tende a decrescere nell'alimento nel corso della shelf-life.

Conclusioni

