

VALUTAZIONE CRITICA DEI RISULTATI DELLE ANALISI  
MICROBIOLOGICHE SUGLI ALIMENTI: INTERAZIONE TRA  
LABORATORI DI ANALISI PRODUTTORI E AUTORITA' SANITARIA  
Pisa 11/05/2011

## La valutazione della shelf life negli alimenti: esempi pratici



Finazzi Guido  
IZSLER - Reparto Microbiologia



## Determinazione shelf-life

- ✓ determinazione della vita commerciale
- ✓ protocolli interni
- ✓ protocolli AFFSA

3



## Determinazione shelf-life

- ✓ imitazione dei concorrenti;
- ✓ imposta dal cliente;
- ✓ basata su vantaggi commerciali;
- ✓ basata solo su alterazioni organolettiche dei prodotti

4



## Determinazione shelf-life

Durata vita commerciale:

Tempo durante il quale l'alimento mantiene caratteristiche organolettiche accettabili per il consumatore malgrado le progressive alterazioni a cui va incontro durante la conservazione

5



## Determinazione shelf-life

Corretta determinazione della shelf-life



Basata primariamente sul  
comportamento dei patogeni

6



## Regolamento 2073/2005

In conformità all'allegato II, gli operatori del settore alimentare effettuano studi per verificare se i criteri sono rispettati per l'intera durata del periodo di conservabilità (art.3 par 2):

- ✓ Prove per determinare caratteristiche chimico-fisiche (ph, Aw, presenza Sali o conservanti);
- ✓ Consultazione letteratura scientifica disponibile
- ✓ Utilizzo di modelli di microbiologia predittiva
- ✓ Effettuazione di challenge test per valutare la sopravvivenza di patogeni inoculati durante il periodo di conservabilità e in condizioni prevedibili di distribuzione, conservazione ed uso

7



## Reparto Microbiologia

Dotazioni Laboratorio Trasformazioni sperimentali

- ✓ minicaseificio
- ✓ 6 celle di stagionatura
- ✓ insaccatrice, miscelatrice, tritacarne
- ✓ 8 frigotermostati
- ✓ macchina per confezionamento (sv, atm)
- ✓ Forno + piano cottura, forno a microonde
- ✓ Materiale vario (stampi, lira, ecc.)

8



## Laboratorio di Trasformazioni sperimentali

- Caratterizzazione di prodotti
- Challenge tests
  - ✓ in corso di trasformazione
  - ✓ valutazione di shelf life
  - ✓ validazione trattamenti termici in azienda
  - ✓ prove di cottura
  - ✓ prove di decontaminazione
- Microbiologia predittiva

9



## Challenge test

- ✓ Consorzi o singoli produttori
- ✓ ASL
- ✓ Collaborazioni con altri Enti
- ✓ Prove interne

10



## Challenge test

- ✓ Salumi e prodotti a base di carne
- ✓ Formaggi e derivati del latte
- ✓ Prodotti di gastronomia pronti
- ✓ Alimenti da cuocere

11



## Challenge test

- ✓ Effettuati in laboratorio (Lab. di Trasformazioni sperimentali del Reparto di Microbiologia dell'IZSLER)
- ✓ In collaborazione con produttori
- ✓ Con ceppi patogeni o equivalenti (ATCC e isolati in campo) su cui sono state eseguite prove di caratterizzazione



## Challenge test: sostenibilità scientifica

Il processo produttivo deve essere replicato in laboratorio in modo da minimizzare le differenze con quanto avviene nello stabilimento di produzione

13



## Quali parametri?

Microrganismi criteri di sicurezza alimentare:

- ✓ *Listeria monocytogenes* (100 ufc/ g o ml)
- ✓ *Bacillus cereus*
- ✓ *Staph. aureus*
- ✓ *Cl. perfringens*
- ✓ *Cl. botulinum*

14



## Valutazione shelf life

Documento tecnico (AFFSA 2008) per gli studi di vita commerciale degli alimenti pronti al consumo inerenti a *L. monocytogenes*:

- ✓ Challenge tests
  - Valutazione del potenziale di crescita ( $\delta$ )
  - Valutazione del tasso di crescita massimo ( $\mu_{max}$ )
- ✓ Studi di conservabilità

15



## Challenge tests

- ✓ Valutazione del potenziale di crescita
  - valuta capacità del microrganismo di crescere in un alimento
  - considera tutta la catena del freddo
- ✓ Valutazione del tasso di crescita massimo ( $\mu_{max}$ )
  - stima parametri di crescita ad una temperatura fissa
  - applicazione modelli matematici microbiologia predittiva

16





## Contaminazioni sperimentali

- ✓ Informazioni preliminari sulle caratteristiche dell'alimento
- ✓ Numero di lotti
- ✓ Scelta dei ceppi
- ✓ Preparazione dell'inoculo
- ✓ Preparazione ed inoculazione unità di prova
- ✓ Condizioni conservazione dell'alimento
- ✓ Determinazioni caratteristiche chimico fisiche
- ✓ Analisi microbiologiche
- ✓ Calcolo  $\delta$  oppure di  $\mu$  max
- ✓ Elaborazione dati e refertazione

17



## Valutazione del potenziale di crescita

- ✓ Dati preliminari sulle caratteristiche dell'alimento
- ✓ Numero di lotti :
  - 3 diversi lotti per ogni alimento
- ✓ Scelta dei ceppi:
  - miscela di almeno 3 ceppi
  - almeno 1 ceppo di riferimento
  - almeno 3 ceppi di campo isolati da matrici compatibili

18



## Valutazione del potenziale di crescita

- ✓ Preparazione dell'inoculo:

- adattamento dei ceppi

- livello di contaminazione atteso 50 -100 ufc/ g o ml

- volume dell'inoculo < 1% volume unità di prova



19



## Valutazione del potenziale di crescita

- ✓ Preparazione ed inoculazione unità di prova

- inoculazione in superficie o in profondità

- rispettare condizioni di confezionamento



20



## Valutazione del potenziale di crescita

### ✓ Condizioni conservazione dell'alimento:

Tabella 2. Diagramma di flusso delle condizioni di incubazione

Fase della catena del freddo	Temperatura d'incubazione		Durata dello stoccaggio (incubazione)			
			Vita commerciale ≤ 21 giorni		Vita commerciale > 21 giorni	
Dalla produzione fino all'arrivo nel banco vendita	Temperatura giustificata da informazioni dettagliate*	oppure se non nota 8 °C	Durata giustificata da informazioni dettagliate	oppure se non nota	un terzo della vita commerciale	7 giorni
Commercio al dettaglio: banco vendita	Temperatura giustificata da informazioni dettagliate*	oppure se non nota 12 °C	Durata giustificata da informazioni dettagliate	oppure se non nota	un terzo della vita commerciale	½ (un terzo della vita commerciale - 7 giorni)
Stoccaggio domestico	Temperatura giustificata da informazioni dettagliate*	oppure se non nota 12 °C	Durata giustificata da informazioni dettagliate	oppure se non nota	un terzo della vita commerciale	½ (un terzo della vita commerciale - 7 giorni)

\* Temperatura giustificata da informazioni dettagliate: il 75° percentile delle osservazioni per il paese dove si svolge la fase della catena del freddo

21



## Valutazione del potenziale di crescita

### ✓ Analisi microbiologiche (patogeno e flore endogene) e chimico fisiche:

determinazione	Tempo zero	1/3 shelf life	2/3 shelf life	Fine shelf life
Parametri microbiologici per unità di prova contaminate	3	3	3	3
Parametri microbiologici per unità di prova di controllo	3			3
Parametri fisico-chimici unità di prova di controllo	3 (1)			3 (1)

22



## Valutazione del potenziale di crescita

### ✓ Calcolo $\delta$ :

differenza tra log ufc/ g o ml a fine shelf life quello a tempo zero

mediana dei 3 valori

calcolare per ogni lotto

$\delta$  = valore più alto

23



## Valutazione del potenziale di crescita

### ✓ Elaborazione dati e estrapolazione risultati

$\delta \leq 0,5$  alimento non supporta crescita microrganismo

$\delta > 0,5$  alimento supporta crescita microrganismo

capacità del microrganismo di produrre tossina nell'alimento

concentrazione iniziale +  $\delta$  = concentrazione finale (> 100 ufc ?)

(es 10 ufc =  $1 \log_{10}$  ufc)

$2 - \delta$  = concentrazione iniziale per non superare 100 ufc

24



## Valutazione del potenziale di crescita

- ✓ La prova non è ritenuta valida
  - 2 risultati al tempo zero < al limite del metodo
  - deviazione standard tra i 3 log al tempo zero  $\geq 0,3$



Ripetere la prova su un altro lotto

25



## Valutazione del tasso di crescita massimo

- ✓ Dati preliminari sulle caratteristiche dell'alimento
- ✓ Numero di lotti :
  - 3 diversi lotti per ogni alimento
- ✓ Scelta dei ceppi:
  - 1 ceppo di riferimento
  - 1 ceppo di campo 3 ceppi di campo isolati da matrici compatibili
  - ceppi usati separatamente

26



## Valutazione del tasso di crescita massimo

- ✓ Preparazione dell'inoculo:
  - i ceppi non devono essere adattati
  - livello di contaminazione atteso 100 – 1000 ufc/ g o ml
  - volume dell'inoculo < 1% volume unità di prova
- ✓ Preparazione ed inoculazione unità di prova
  - come per prova precedente
- ✓ Condizioni conservazione dell'alimento
  - temperatura fissa: ad esempio 8-10°C

27



## Valutazione del tasso di crescita massimo

- ✓ Analisi microbiologiche (patogeno e flore endogene) e chimico fisiche:

	Unità di prova (x2)
Parametri microbiologici per unità di prova contaminate	Da 10 a 15
Valutazione del microrganismo aggiunto nelle unità di prova di controllo (giorno zero e giorno finale)	3 + 3
Parametri fisico-chimici unità di prova di controllo (giorno zero e giorno finale)	3 + 3 (1 + 1)
Conteggio flore associate per unità di prova di controllo	2 (o da 10 a 15)

28



## Valutazione del tasso di crescita massimo

- ✓ Calcolo  $\mu$  max :

- trasformare i dati di concentrazione microbica in log

- inserire i dati nel programma MicroFit

- calcolo del tasso di crescita, T lag, Td per ogni curva

- $\mu$  max = valore più alto tra i 6 ottenuti

- ✓ Elaborazione dati e estrapolazione risultati

- $\mu$  max ref: tasso di crescita alla temperatura applicata (T ref)

- possibile calcolare  $\mu$  max ad altre temperature

- possibile calcolare  $\mu$  max per giorno (dividendo per 2,3)

29



## Valutazione del tasso di crescita massimo

- ✓ Elaborazione dati e estrapolazione risultati

- $\mu$  max ref: tasso di crescita alla temperatura applicata (T ref)

- possibile calcolare

- $\mu$  max ad altre temperature

- $\mu$  max per giorno (dividendo per 2,3)

- concentrazione a fine vita commerciale sapendo andamento T°

- concentrazione iniziale per non superare 100 ufc

- concentrazione finale sapendo concentrazione intermedia

30



## Valutazione del tasso di crescita massimo

- ✓ La prova non è ritenuta valida  
quando l'alimento risulta naturalmente contaminato con il  
microrganismo



Ripetere la prova su un altro lotto

31



## Valutazione shelf life: protocolli interni

Temperatura di conservazione degli  
alimenti:

- ✓ 4-5°C = temperatura ideale ma teorica
- ✓ 8-10°C = temperatura che facilmente si può verificar e  
nella grande distribuzione o nei frigo domestici
- ✓ 12-15°C = temperatura di blando abuso termico
- ✓ 20-30°C = temperatura di abuso termico



## Valutazione shelf life: protocolli interni

### Quando fare i campioni?

- ✓ In funzione della durata della shelf-life prevista
- ✓ In funzione della temperatura di conservazione
- ✓ In funzione della previsione di crescita/ morte del microrganismo usato per la contaminazione (micro-pre)



## Valutazione shelf life: protocolli interni

### Quanti campioni fare?

- ✓ 3 aliquote contaminate per ogni campionamento
- ✓ 1 aliquota di controllo per ogni campionamento
- ✓ Almeno 6-8 campioni per ogni valutazione di shelf-life

## Studi di shelf-life: Insalata di mare

Prova effettuata su 4 diversi produttori

Durata indicata dal produttore:

Produttore 1: 9 giorni di shelf life a 4°C

Produttore 2: 15 giorni di shelf life a 4°C

Produttore 3: 11 giorni di shelf life a 4°C

Produttore 4: 10 giorni di shelf life a 4°C

## Studi di shelf-life: insalata di mare

Produttore 1:

Seppie, polpo, gamberi, sale, pepe, aceto di vino, succo di limone concentrato, E 330 (acido citrico), E621 (glutammato di sodio), E202 (sorbato di potassio) E 211 (benzoato di potassio), olio di semi di girasole  
eventuale aggiunta di cetrioli e peperoni sott'aceto

Produttore 2:

Seppie, calamari, polpo, gamberi, cozze, sale, pepe, succo di limone concentrato, E202 (sorbato di potassio) E 575 (glucone delta lattone), olio di semi di girasole, olio di oliva, prezzemolo, carote, zucchine

## Studi di shelf-life: Insalata di mare

Produttore 3:

Seppie, calamari, polpo, gamberi, cozze, sale, pepe, succo di limone concentrato, E202 (sorbato di potassio) E 575 (glucone delta lattone), olio di semi di girasole, olio di oliva, prezzemolo, carote, zucchine

Produttore 4:

Seppie, totani, polpo, gamberi, cozze, sale, pepe, succo di limone concentrato, olio di semi di girasole, prezzemolo, peperoni sott'aceto

## Studi di shelf-life: Insalata di mare

pH verificato ad inizio sperimentazione:

Produttore 1: 4,89 (senza verdure), 4,84 (con verdure)

Produttore 2: 5,99

Produttore 3: 4,82

Produttore 4: 4,05

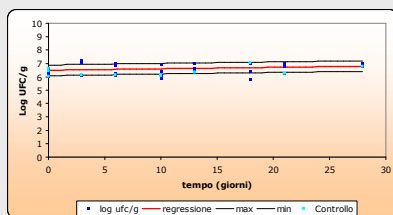
Aw superiore a 0,940 in tutti i produttori

## Studi di shelf-life: Insalata di mare

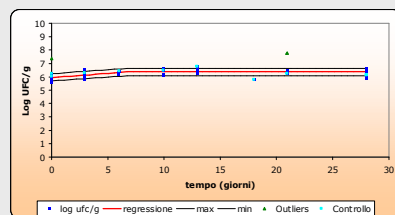
- ✓ Contaminazione dei prodotti con miscela di 3 ceppi di *L. monocytogenes* isolati da prodotti a base di pesce in modo da ottenere una contaminazione iniziale di  $10^2$ - $10^3$  ufc/g.
- ✓ Confezionamento “al naturale”
- ✓ Conservazione aliquote a 5, 10, 15 e 20°C

## Studi di shelf-life: Insalata di mare

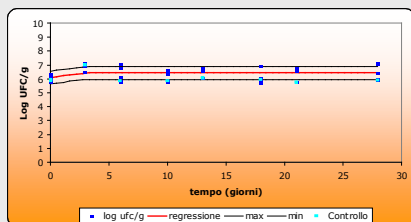
produttore 1: CBT a 5°C (con verdure)



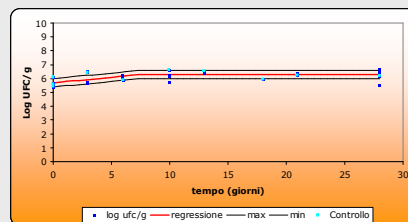
produttore 1: CBT a 5°C (senza verdure)



produttore 1: LA a 5°C (con verdure)



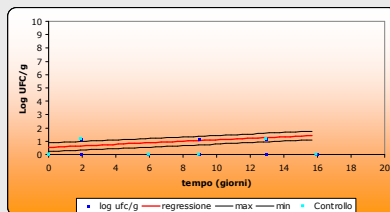
produttore 1: LA a 5°C (con verdure)



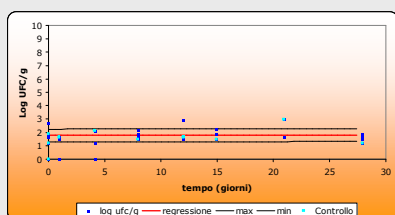
## Studi di shelf-life: Insalata di mare

produttore 2: non evidenziata  
presenza di lattobacilli mesofili a 5°C

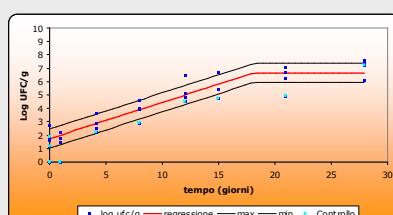
produttore 4: LA a 5°C



produttore 3: LA a 5°C

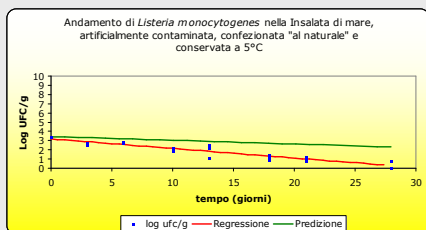


produttore 3: LA a 10°C

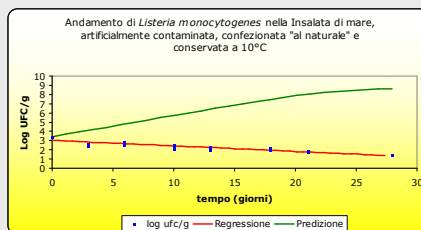


## Studi di shelf-life: Insalata di mare

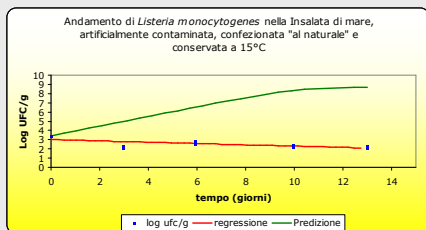
produttore 1: D a 5°C = 9gg 16hh ± 21 hh



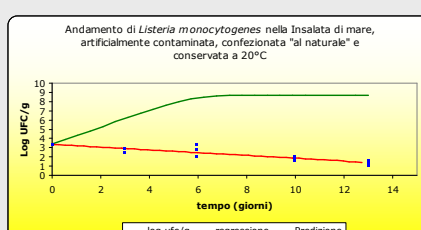
produttore 1: D a 10°C = 16gg 16hh ± 1 gg 13 hh



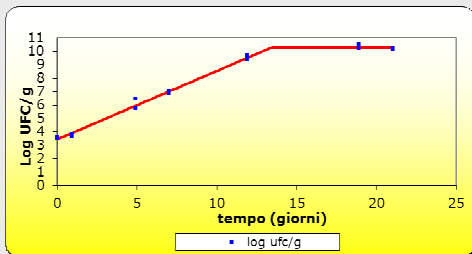
produttore 1: D a 15°C = 14gg 2hh ± 4 gg 5 hh



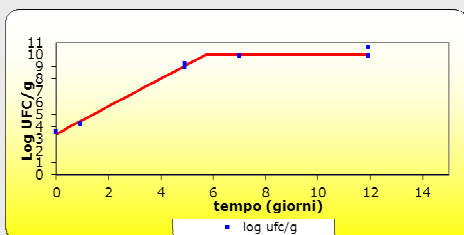
produttore 1: D a 20°C = 6gg 14hh ± 21 hh



## Studi di shelf-life: Insalata di mare



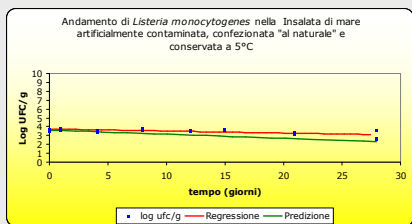
Produttore 2  
Td a 5°C: 14 ore  
tempo per arrivare a 100 ufc/g  
da 1 ufc/g = 3gg e 22 ore



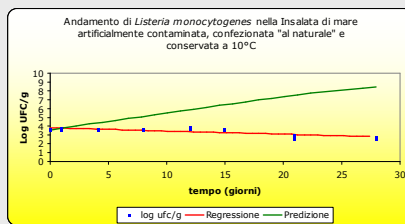
Produttore 2  
Td a 10°C: 6 ore  
tempo per arrivare a 100 ufc/g  
da 1 ufc/g = 1gg e 18 ore

## Studi di shelf-life: Insalata di mare

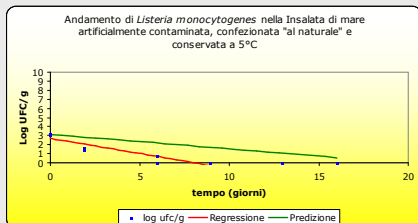
produttore 3: D a 5°C = 44gg 15hh ± 10gg 18 hh



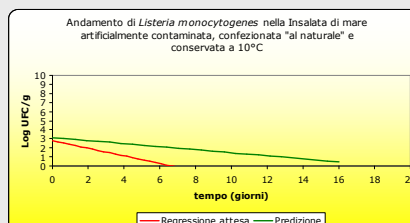
produttore 3: D a 10°C = 28gg 2hh ± 4 gg 9 hh



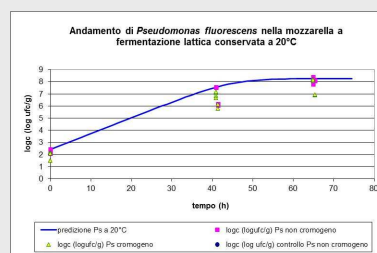
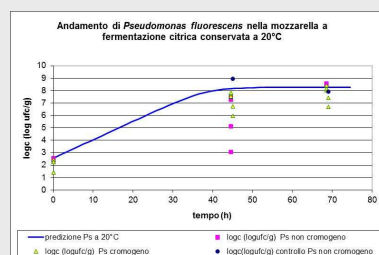
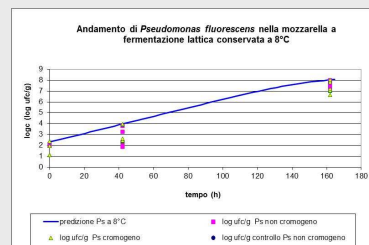
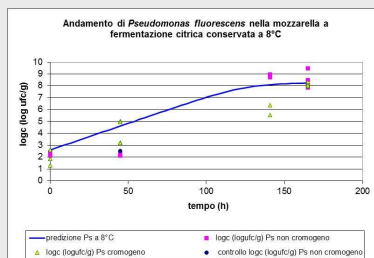
produttore 4: D a 5°C = 2gg 23hh ± 13 hh



produttore 4: D a 10°C = 2gg 9hh ± 14 hh



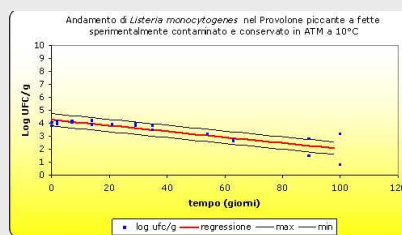
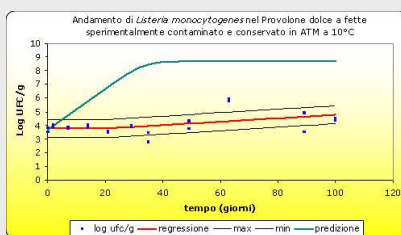
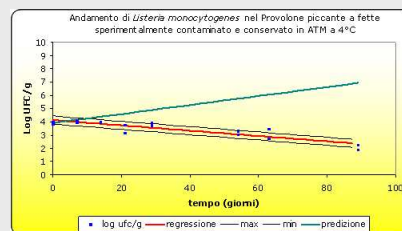
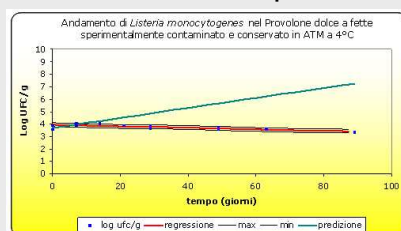
## Confronto tra processi / prodotti



45

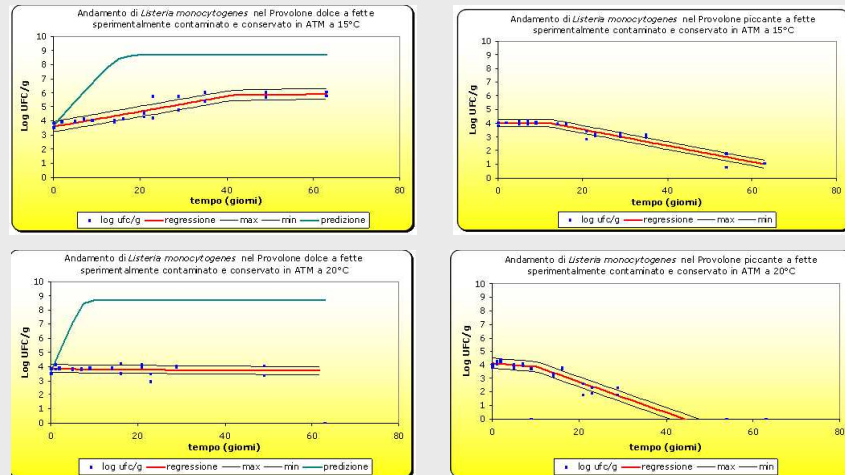
## Studi di shelf-life

### Mezzelune di provolone confezionate in ATM



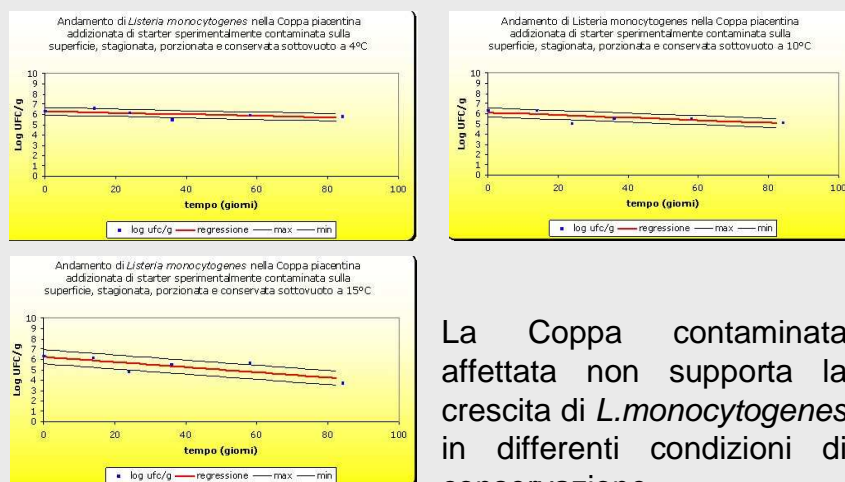
## Studi di shelf-life

### Mezzelune di provolone confezionate in ATM



## Studi di shelf-life

### Coppa affettata: *L. monocytogenes*

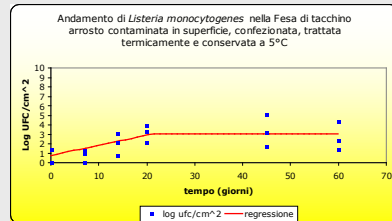


La Coppa contaminata affettata non supporta la crescita di *L.monocytogenes* in differenti condizioni di conservazione



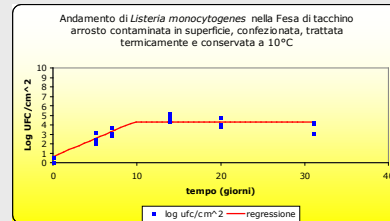
## Studi di shelf-life

### Fesa di tacchino: *L. monocytogenes*



$T_d = 2 \text{ gg } 19 \text{ hh } \pm 1 \text{ gg e } 13 \text{ hh}$

Tempo per arrivare a 100 ufc/cm²  
partendo da 1 ufc/cm² = 18 gg 14 hh

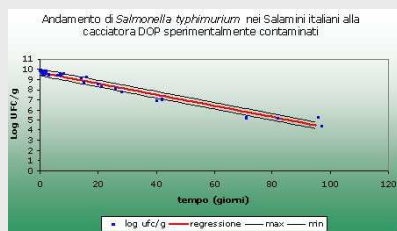


$T_d = 19 \text{ hh } \pm 5 \text{ hh}$

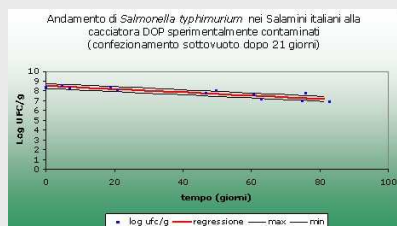
Tempo per arrivare a 100 ufc/cm²  
partendo da 1 ufc/cm² = 5 gg 7 hh

49

## Valutazione modalità di confezionamento



*Salmonella typhimurium* nei Salamini alla cacciatora DOP (stagionatura):  
 $D = 9 \text{ gg e } 17 \text{ hh}$



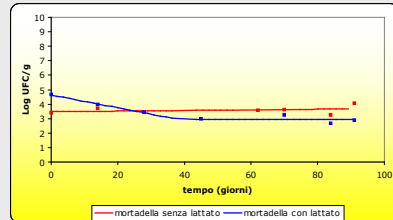
*Salmonella typhimurium* nei Salamini alla cacciatora DOP (sottovuoto):  
 $D = 60 \text{ gg e } 10 \text{ hh}$

50

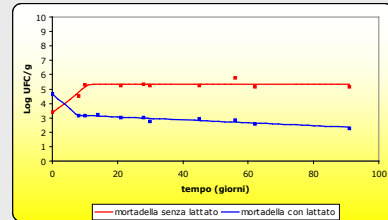
## Valutazione utilizzo conservanti

### Mortadella affettata: *L. monocytogenes*

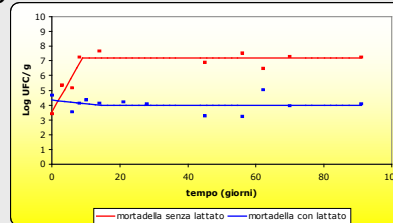
5°C



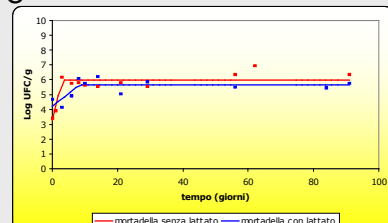
10°C



15°C



20°C



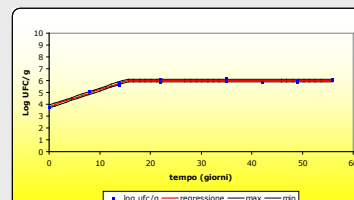
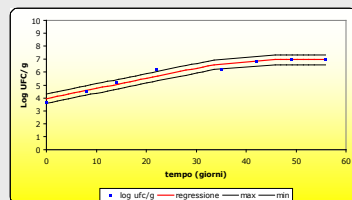
## Valutazione utilizzo conservanti

### Nervetti cubettati: *L. monocytogenes*

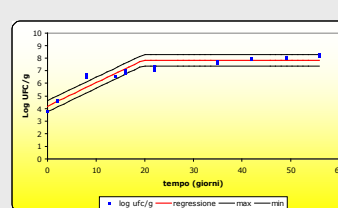
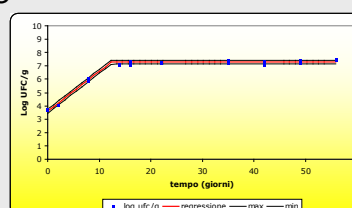
Con conservante (E262)

Senza conservante

4°C



10°C





## Challenge test per determinare shelf-life

- ✓ conoscenza dell'alimento
- ✓ valutazione dei rischi
- ✓ pianificazione della prova
- ✓ locali per eseguire contaminazioni
- ✓ rielaborazione ed interpretazione risultati

53

GRAZIE PER L'ATTENZIONE



Dr. Guido Finazzi  
Tel 0302290335 fax 0302290556  
[guido.finazzi@izsler.it](mailto:guido.finazzi@izsler.it)