

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

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 - Istituto Zooprofilattico Lazio e Toscana – Sezione di Pisa



PRODOTTO USATO Mozzarella confezionata. Shelf-life = 22 giorni. Impiegati 3 lotti.

SCELTI 2 CEPPI di *P. fluorescens* colorante: 44133 isolato da mozzarella 50178 isolato da latte UHT

UNITA' PER IL TEST

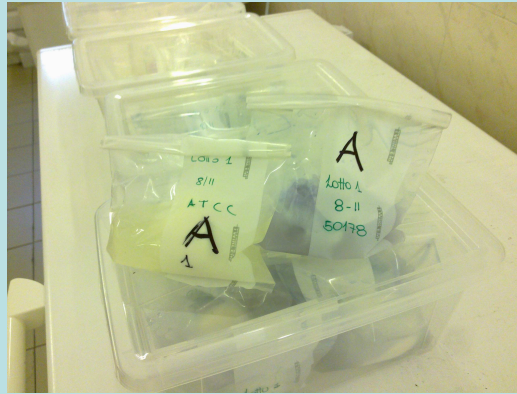
NUMERO UNITA' PER IL TEST

	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 presto-chiuso

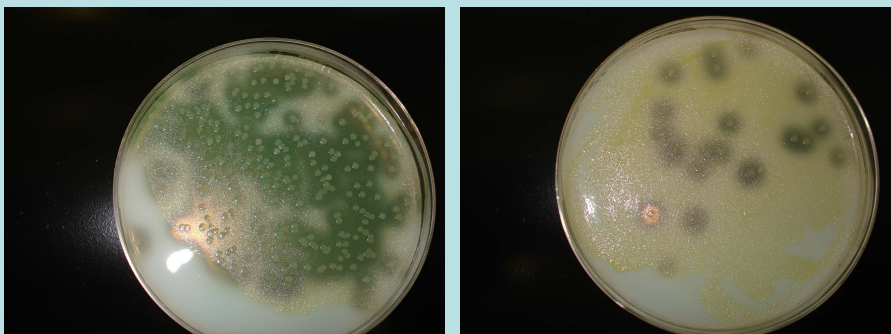
Sono state condotte in parallelo per ogni ceppo prove di conteggio sia sulla unità iniziale che sulle singole.

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'estrapolazione matematica dei dati sperimentali ottenuti col **μ max** corrispondesse alla crescita naturale di *Pseudomonas fluorescens* verificata sperimentalmente sullo stesso lotto.

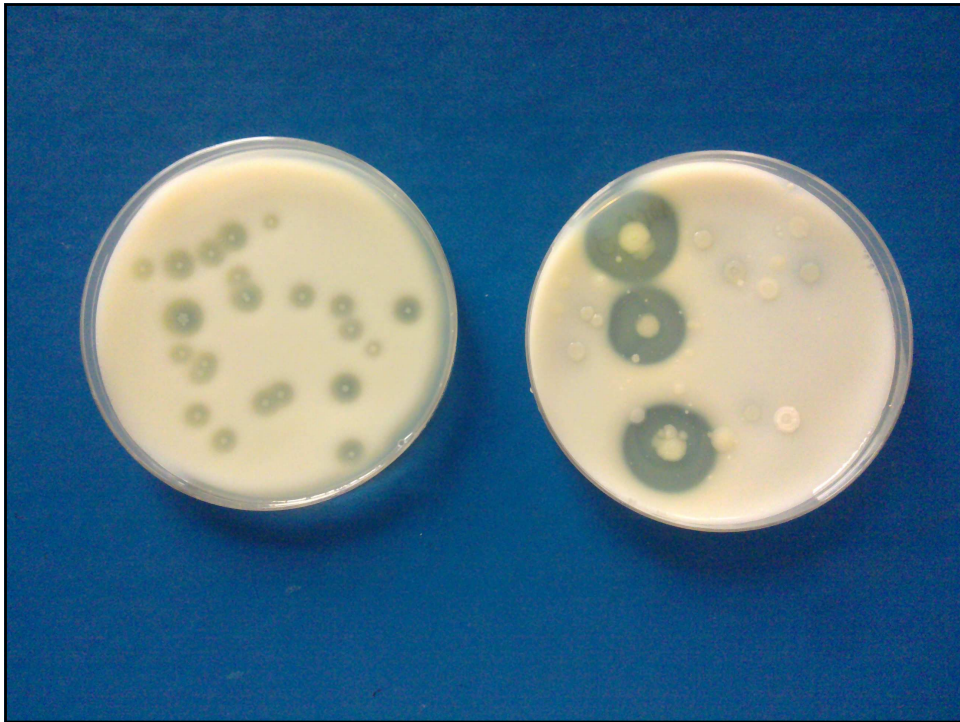


TERRENI USATI

- 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.

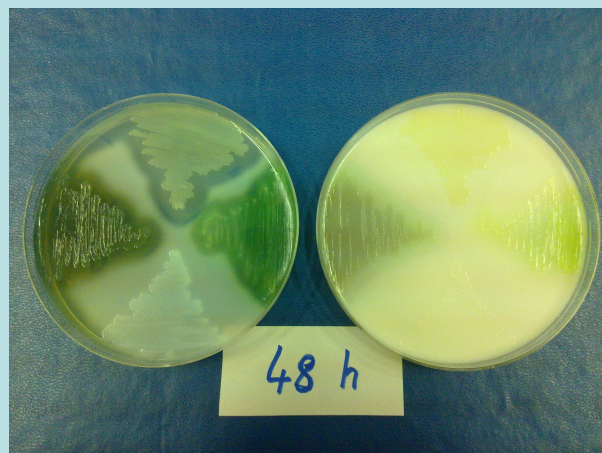


Diluizioni successive su terreno W, le colonie sono circondate da un alone trasparente



3 – E' stato sperimentato un terreno apposito anche per **differentiare 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.



pH nei 3 lotti

diminuito nei primi 5 giorni da **7.06 max** a **5.76 min**

AW nei 3 lotti

variabile da **0.988** (valore più frequente) a **0.983**

GRAFICO OTTENUTO DAL 1° LOTTO

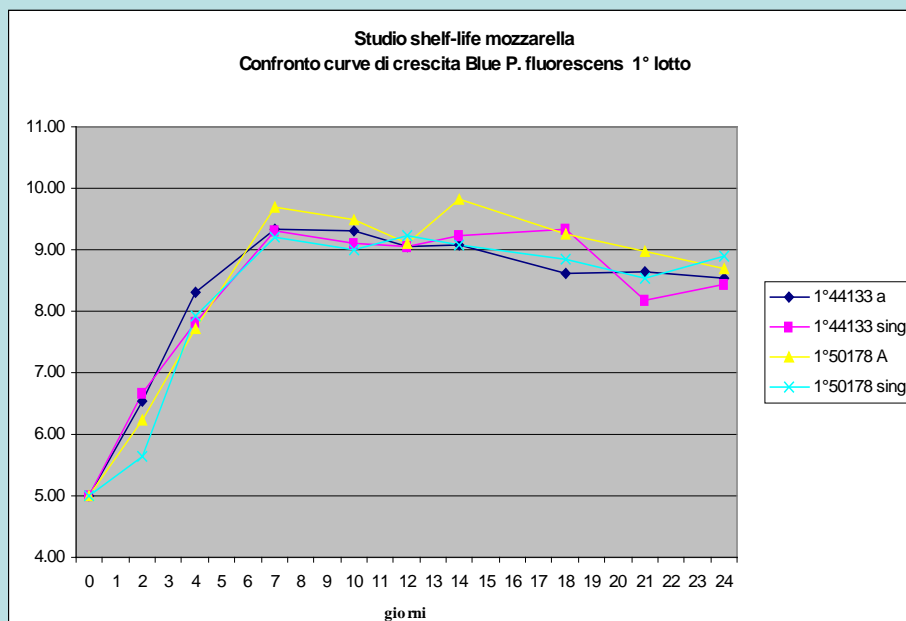


GRAFICO OTTENUTO DAL 2° LOTTO

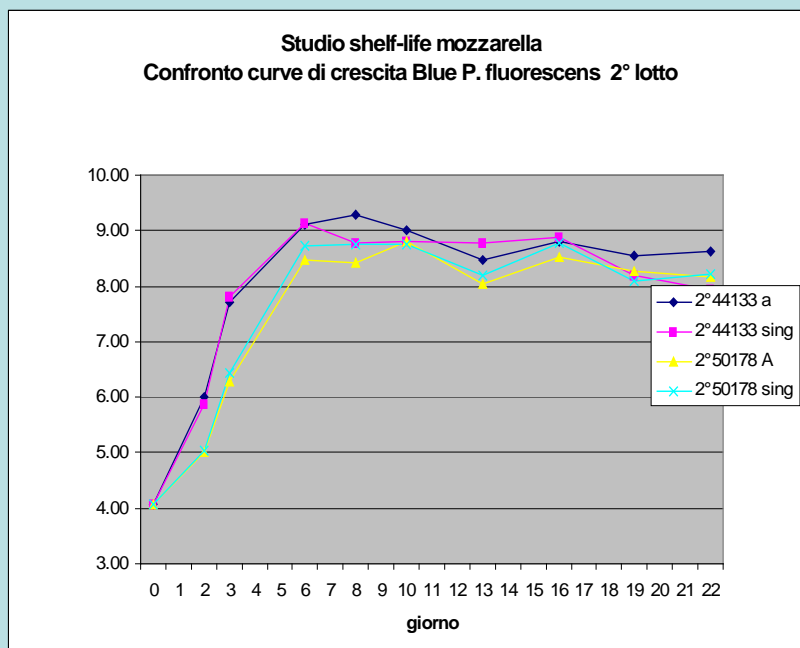
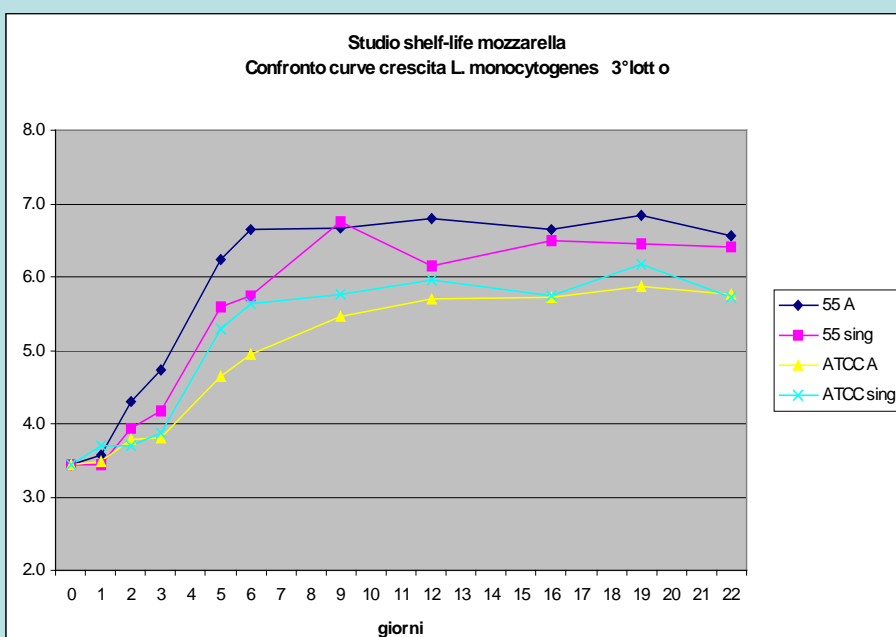


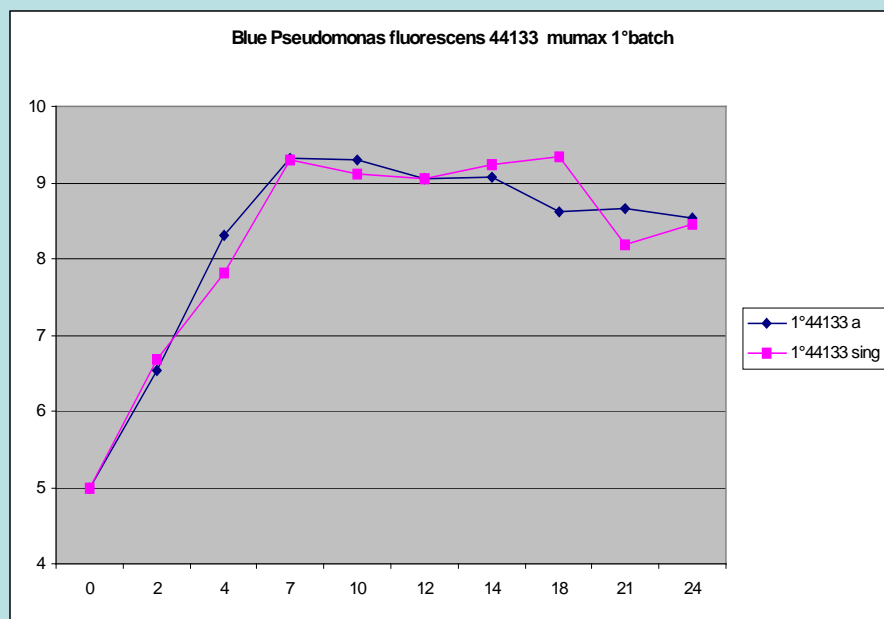
GRAFICO OTTENUTO DAL 3° LOTTO



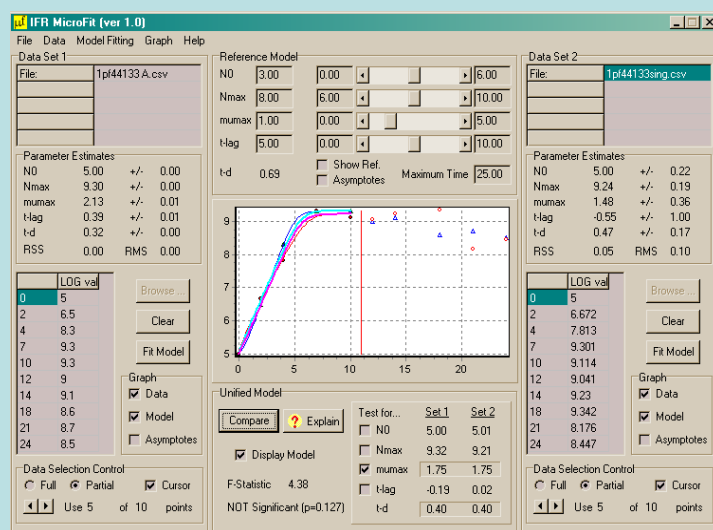
massimo valore ottenuto da 12 curve di
3lotti

$$\mu_{\max} = 4.6 \text{ ln} \cdot \text{giorni}^{-1}$$

Curve da comparare

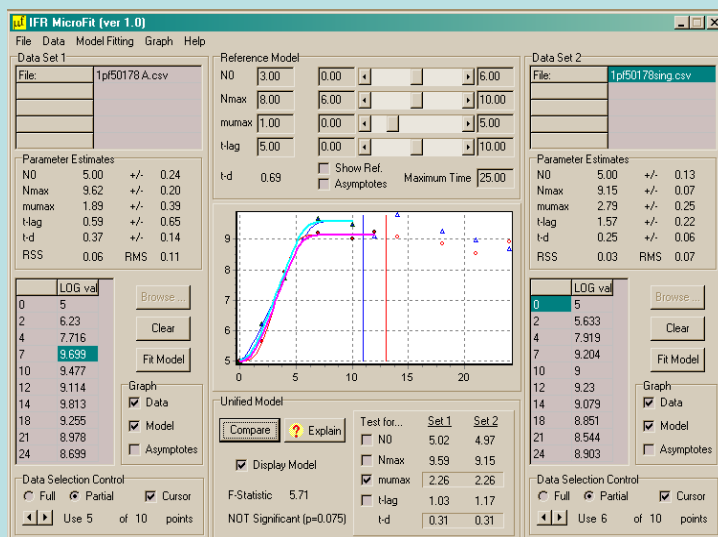


Comparazione tra challenge effettuato su una sola unità e challenge effettuato su 10 unità del lotto 1 - Pseudomonas fluorescens ceppo 44133



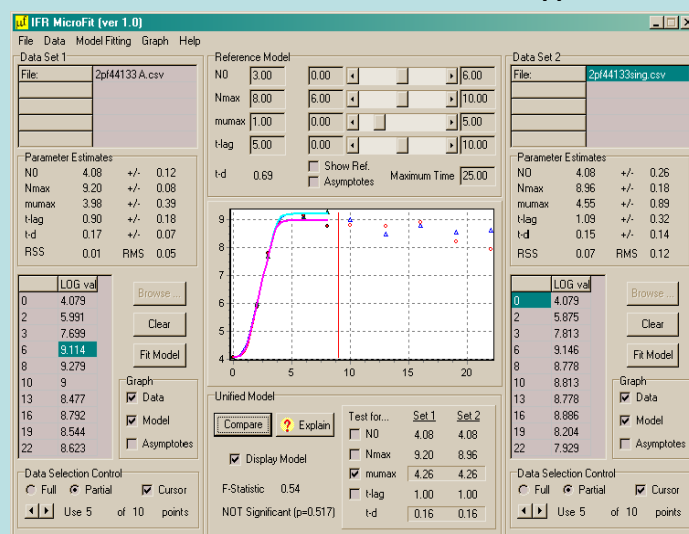
La differenza tra i 2 μ_{\max} non è significativa

Comparazione tra challenge effettuato su una sola unità e challenge effettuato su 10 unità del lotto 1 - Pseudomonas fluorescens ceppo 50178



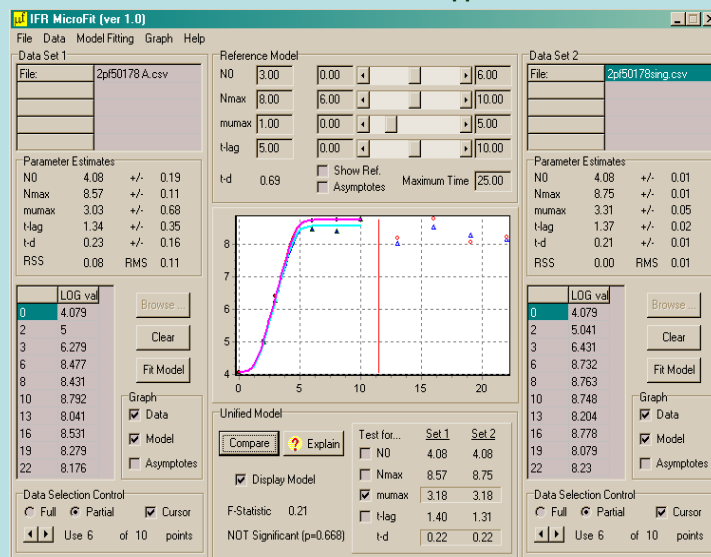
La differenza tra i 2 μ_{\max} non è significativa

Comparazione tra challenge effettuato su una sola unità e challenge effettuato su 10 unità del lotto 2 - Pseudomonas fluorescens ceppo 44133



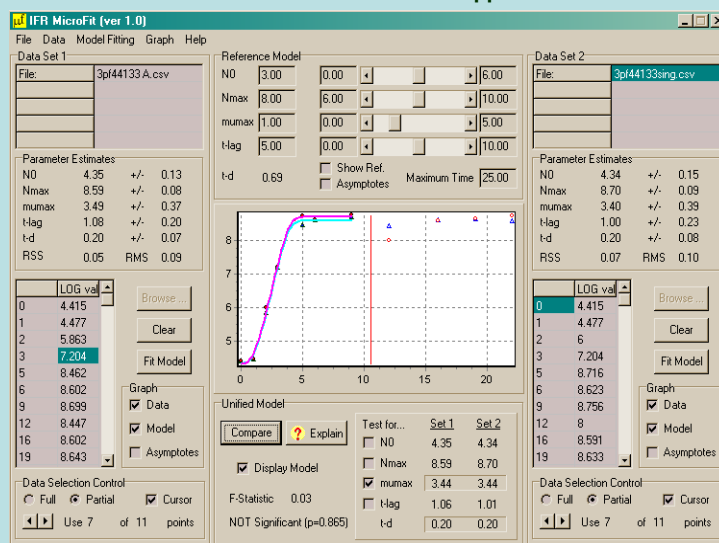
La differenza tra i 2 μ_{\max} non è significativa

Comparazione tra challenge effettuato su una sola unità e challenge effettuato su 10 unità del lotto 2 - 2Pseudomonas fluorescens ceppo 50178



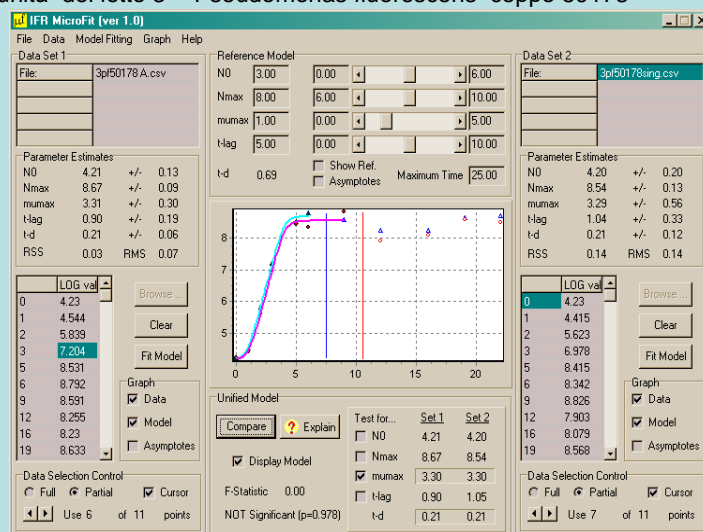
La differenza tra i 2 μ_{\max} non è significativa

Comparazione tra challenge effettuato su una sola unità e challenge effettuato su 10 unità del lotto 3 - *Pseudomonas fluorescens* ceppo 44133



La differenza tra i 2 μ_{\max} non è significativa

Comparazione tra challenge effettuato su una sola unità e challenge effettuato su 10 unità del 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

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

$\mu_{\max} = 2.254$

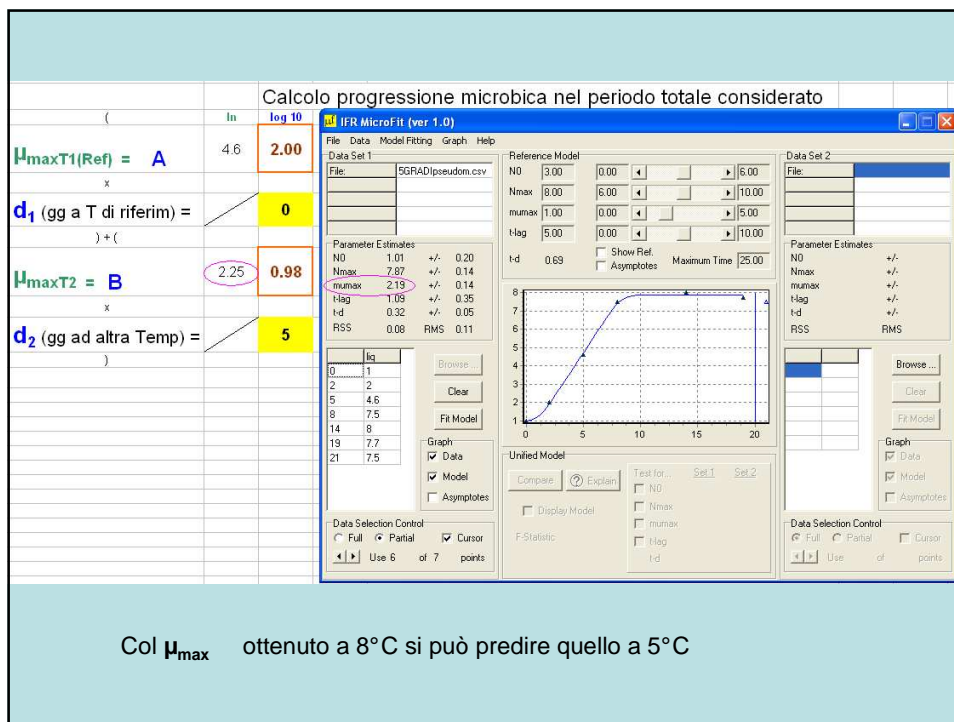
$\mu_{\max_{\text{ref}}} = 4.6$

T = nuova temperatura

T = 5

$T_{\min} = -2$

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



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

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 LOG / μ_{max}
Durata massima

Calcolo progressione microbica nel periodo totale considerato				
8	$\mu_{maxT1(Ref)} = A$	4.6	2.00	
°C	x			
	d_1 (gg a T di riferim) =	2.1	formula $(\mu_{maxT1(Ref)} \times d_1 \text{ (gg a T di riferim)}) + (\mu_{maxT2} \times d_2 \text{ (gg ad altra temp)})$ $(A \times D1) + (B \times D2)$	
5	$\mu_{maxT2} = B$	2.25	0.98	4.20 log10 ufc/g
°C	x			
	d_2 (gg ad altra Temp) =	0	1.6E+04 ufc/g	
			15677.78 ufc/g	

Durata massima a 8° C = 2,1 gg

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:

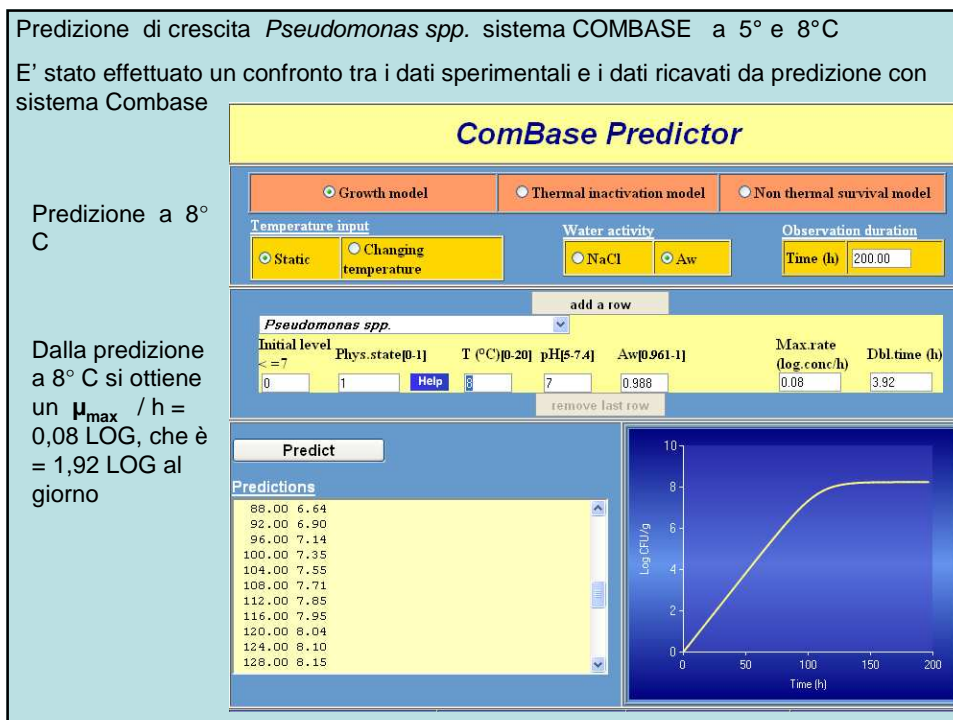
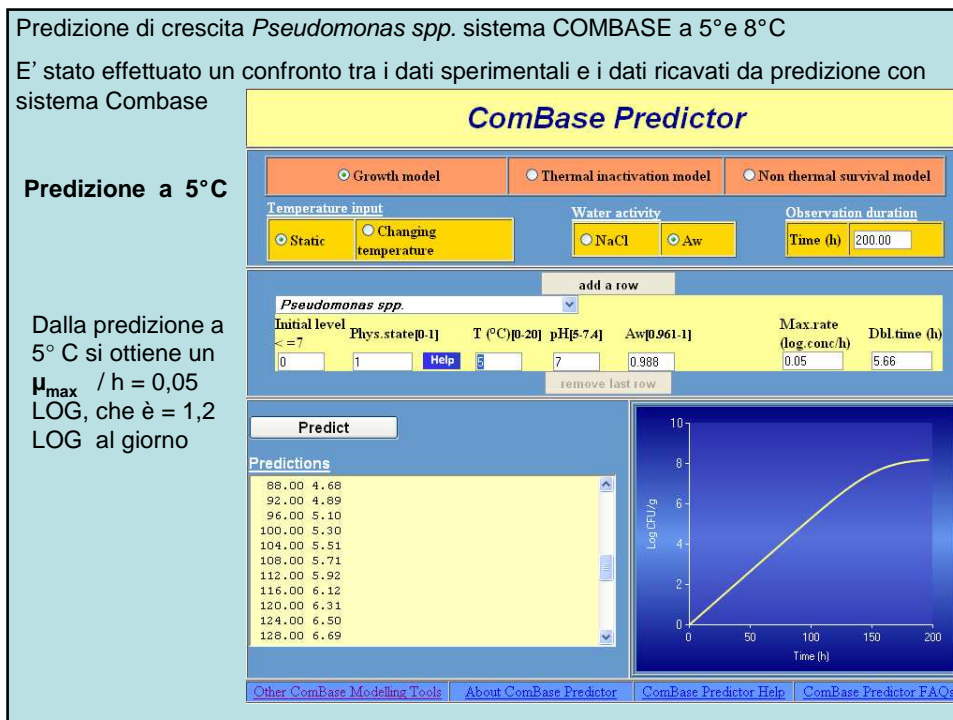
5° C = 0,98 LOG/g

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 LOG / μ_{max}

Calcolo progressione microbica nel periodo totale considerato				
8	$\mu_{maxT1(Ref)} = A$	4.6	2.00	
°C	x			
	d_1 (gg a T di riferim) =	0	formula $(\mu_{maxT1(Ref)} \times d_1 \text{ (gg a T di riferim)}) + (\mu_{maxT2} \times d_2 \text{ (gg ad altra temp)})$ $(A \times D1) + (B \times D2)$	
5	$\mu_{maxT2} = B$	2.25	0.98	4.31 log10 ufc/g
°C	x			
	d_2 (gg ad altra Temp) =	4.4	2.0E+04 ufc/g	
			20284.25 ufc/g	

Durata massima a 5° C = 4,4 gg



	ln	log 10
$\mu_{\max T1(Ref)} = A$	4.6	2.00
d_1 (gg a T di riferim) =		0
) + (
$\mu_{\max T2} = B$	2.25	0.98
d_2 (gg ad altra Temp) =		0
)		

Il μ_{\max} a 8° C = 1,92 si confronta con μ_{\max} sperimentale = 2,00

Il μ_{\max} a 5° 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 funziona come un terreno culturale.