

Challenge test

Valerio Giaccone
Università di Padova

Cos'è
il challenge?

A che serve
fare challenge?

Come va
impostato
un challenge?

Fine ultimo

Conoscere il **corretto
approccio** tecnico ...

... ad un argomento
igienico-sanitario

Perché ?

I “patogeni alimentari”
danno il meglio di sé ...

... quando sono nella
loro **matrice naturale**

Perché ?

La **dinamica** dei
patogeni alimentari ...

... deve essere
studiata **in vivo**

Definizione

EURL Lm 2014

European Union Reference Laboratory
for *Listeria monocytogenes*

TECHNICAL GUIDANCE DOCUMENT

For conducting shelf-life studies
on *Listeria monocytogenes*
in Ready-To-Eat foods

Challenge test

Study of the evolution of
microorganisms populations
artificially inoculated
in a food



Il challenge

Permette di delineare ...

... una **dinamica**
di popolazione microbica

Il challenge

Comporta il principio
basilare di ...

... inoculazione volontaria
del germe nell'alimento

A che serve ?

In generale ...

... per scoprire la
vera dinamica di ...

... qualunque
microrganismo

Perché ?

La vera dinamica
di un microrganismo ...

... si ha quando esso
è nell'alimento

In pratica ...

... al momento ci si
limita alla dinamica ...

... di pochi microrganismi
patogeni alimentari

In particolare

Si usa il **challenge**
per determinare ...

... la dinamica di
L. monocytogenes **in RTE**

Però ...

... un challenge serve
anche per ...

... la dinamica di
altri microrganismi

Gli "altri"

Challenge per prevedere
la dinamica di ...

... Salmonella o E. coli
STEC in salumi crudi

Altro spunto

Challenge per
studiare la dinamica ...
... di *Pseudomonas*
in mozzarella

La legge UE

Qui entra in gioco ...
... il Regolamento CE
n.2073/2005

Reg. 2073 – art. 3

Se necessario, gli OSA responsabili della fabbricazione del prodotto effettuano studi (...) per verificare se i criteri sono rispettati per l'intera durata del periodo di conservabilità

Reg. 2073 – art. 3

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

Reg. 2073 – All. II

Gli studi di cui all'art. 3 comprendono ...

... prove per determinare le caratteristiche fisico-chimiche del prodotto, quali pH, aw, 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

Reg. 2073 – art. 3

Se necessario, in base agli studi summenzionati, l'OSA effettua studi ulteriori, che possono comprendere ...

... prove per determinare la capacità dei microrganismi in questione, debitamente inoculati, di svilupparsi o sopravvivere nel prodotto in diverse condizioni di conservazione ragionevolmente prevedibili

Il problema

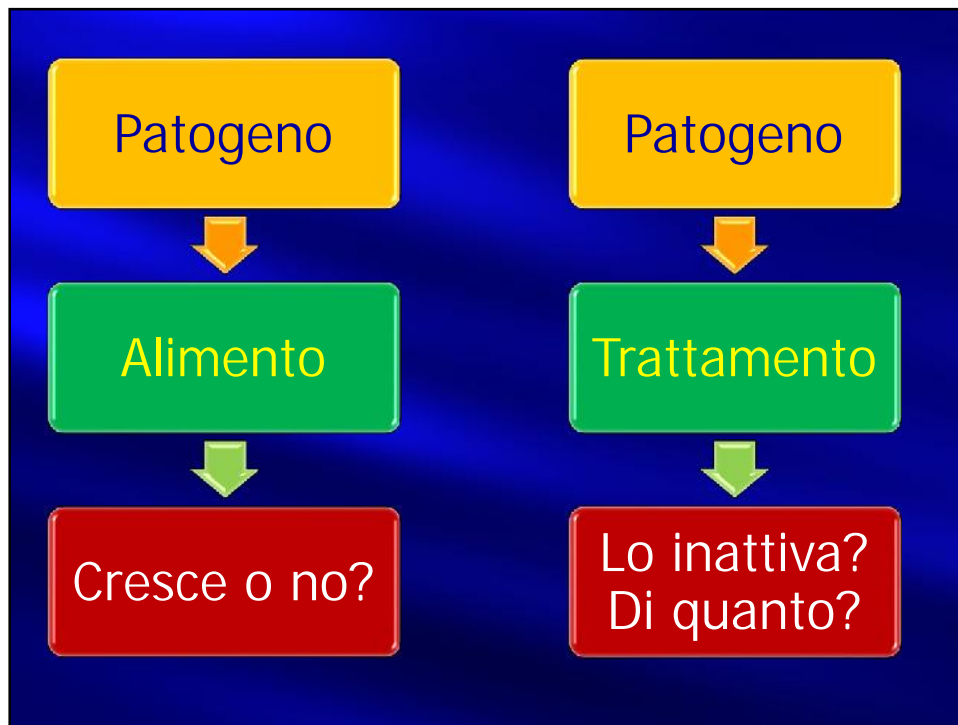
Sapere come
va impostato ...

... un **corretto e valido**
challenge test

Due finalità

Un challenge
può servire per ...

... delineare meglio
due tipi di funzioni



Esempi

Listeria o *Salmonella*
in passata di pomodoro

Ci crescono oppure no?

Esempi

E. coli STEC in salame
durante stagionatura

La maturazione di quanto
riduce la sua carica ?

Esempi

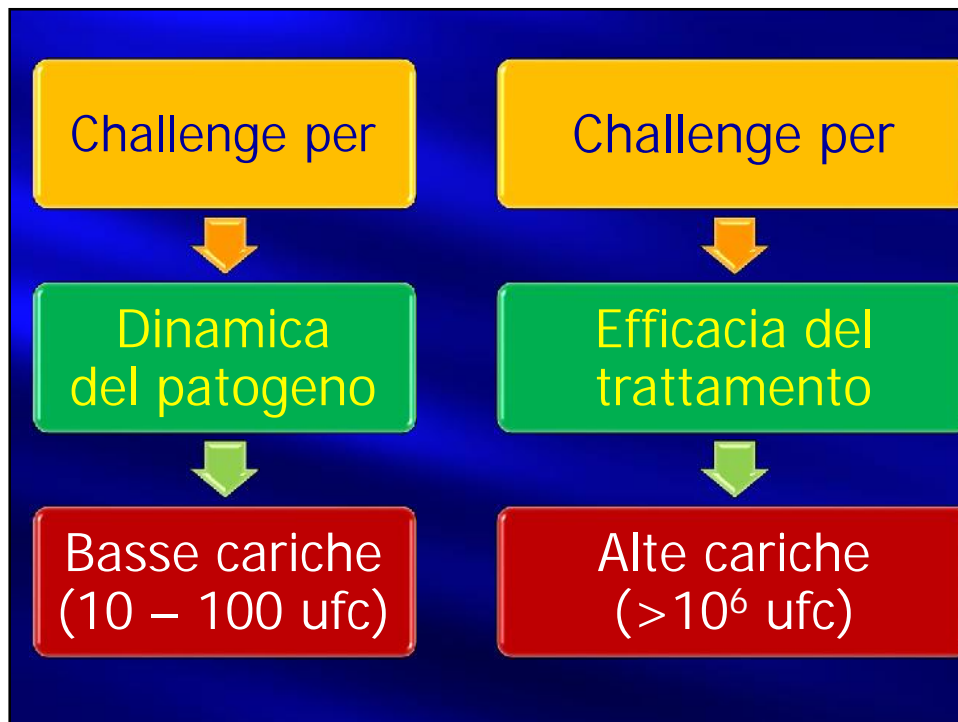
Myc. paratuberculosis
in latte, pastorizzato

Di quanti gradi Log_{10}
si abbassa la carica ?

Pro memoria

Secondo la **finalità**
del challenge ...

... bisognerà variare
la **dose inoculata**



Come va
impostato?

In teoria ...

... ognuno può impostare
il challenge ...

... come meglio crede

In pratica ...

... è bene seguire
precise linee guida ...

... per avere un
challenge 'validabile'

Linee guida

Le matrici

Alimenti destinati al
consumatore finale

NO ad alimenti in
grosse pezzature

Quindi ...

OK challenge su
piccole confezioni ...

... nelle condizioni
di vendita previste

Indispensabile

Se il prodotto è
sotto vuoto o in MAP ...

... **mantenere** o
riprodurre le condizioni

La shelf life

Il challenge
si impernia sulla ...

... **"vita commerciale"**
dell'alimento

Quindi ...

Prima stima la shelf life



Poi imposta
il challenge test

A rigore ...

... c'è una shelf life ...

... e una service life

Quindi ...

Ci vorrà un challenge
per la shelf life ...

... e un challenge
per la service life

Essenziale

Il challenge deve
imitare il più possibile ...

... le condizioni reali
dell'alimento

I punti essenziali

Livello di contaminazione

Eterogeneità della contaminazione

Stato fisiologico del germe test

Modalità di contaminazione

Prodotti
analoghi

Opportuno

Tra gli analoghi scegli
il più sensibile ...

... quello più incline a
far crescere il germe test

Il fine

Calcolare la differenza
(valore) tra ...

... la carica finale del
germe e la carica iniziale

I valori

T_{start} = carica del
germe a inizio challenge

T_{end} = carica del germe
a fine challenge

$$T_{\text{end}} - T_{\text{start}} = < 0,5 \text{ Log}_{10}$$



Alimento che
non fa crescere
Listeria

$$T_{\text{end}} - T_{\text{start}} = > 0,5 \text{ Log}_{10}$$



Alimento che
fa crescere
Listeria

Quanti lotti
si saggiano?

Dipende ...

... dai valori
di pH, A_w e da ...

... altre caratteristiche
del prodotto

In sostanza

L'alimento ha pH e A_w
molto uniformi ?



Sufficiente fare il
challenge su un lotto

In sostanza

L'alimento non ha pH e
 A_w uniformi ?



Impostare il challenge
su almeno 3 lotti

Per lotto

Inoculare almeno
3 campioni per il T_{start} ...

... e 3 campioni per il T_{end}

Consigliabile

Inoculare altri campioni
da saggiare ...

... in fasi intermedie
del challenge

I ceppi test

I ceppi vanno
mescolati insieme ...

... al momento di iniziare
il challenge

I ceppi test

Badare allo
stato fisiologico ...

... dei germi test
(**vitali vs non vitali**)

La vitalità conta

Un ceppo non vitale
è più resistente ...
... alle **condizioni avverse**
dell'alimento

Quindi ...

Imposta il challenge
mettendo a confronto ...



... le forme vitali e non
vitali del germe test

Dove facciamo
il challenge?

Ovvio ...

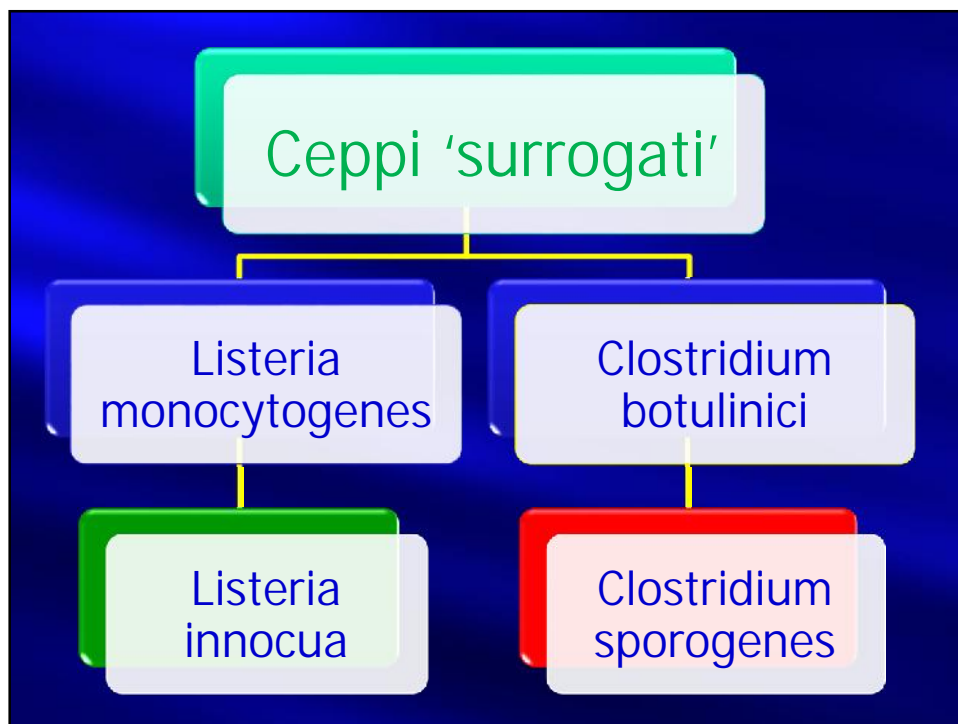
In un laboratorio
attrezzato ...

... in ambiente
biologicamente confinato

E se ...

... volessimo **avviarlo**
in uno stabilimento ?

NO a germi patogeni,
solo ceppi 'surrogati'



Come faccio
l'inoculo

L'inoculazione

È un'azione decisiva ...

... per il challenge

L'inoculo

Sempre in **piccoli volumi**
(**<1%** del campione)

Così **non si variano**
pH e **A_w** della matrice

Alimenti
omogenei o a
più ingredienti



Inoculazione
nella massa

Per mimare una
fase di processo



Inoculazione
sulla superficie

Quale carica ?

Per valutare la **dinamica**
del germe test ...

... non superare
10 – 100 ufc/g campione

Quale carica ?

Per valutare l'**efficacia**
di un **trattamento** ...

... non meno di
 10^5 - 10^6 ufc/g campione

In più ...

... bene allestire altre
"unità di supporto"

Utili per valutare pH,
 A_w e altri microrganismi

Materie prime

Verificare che
non contengano ...

... in origine il germe test

Come tengo
i campioni?

Giusto clima

Per prodotti refrigerati,
oltre che a 4°C ...

... opportuno prevedere
prove in **abuso termico**

Abuso termico

Condotta a 12°C per ...

... i **giusti tempi**
(calcolati secondo EURL)

Confezione

Per prodotti
sotto vuoto o in MAP ...

... prevedere lo
stesso confezionamento

Però ...

... attenzione
alla miscela gassosa ...

... e alla qualità
del film plastico

L'ultimo sforzo ...

Report finale

Il challenge
va documentato ...

... con un valido
documento finale

Report finale

Il report deve contenere
tutte le indicazioni ...

... relative all'esecuzione
del challenge

Per ...
... chiudere

Troppo difficile ?

Sì, può essere ...
quando si affronta ...
... per la prima volta
un vero challenge

Però ...

... vi assicuro
che è fattibile

Basta avere
un buon laboratorio ...

... e ...

... un buon
tecnico che ti aiuti ...

Miei consigli

Per i produttori ...
date grande attenzione ...
... a qualità di materie
prime e igiene di lavoro

Miei consigli

Per le Autorità
Sanitarie Competenti ...
... sviluppare procedura di
valutazione dei challenge