



IZSAM G. CAPORALE
TERAMO

Test di shelf life per *Listeria monocytogenes* in prodotti RTE

Vincenza Prencipe - LNR *L. monocytogenes*
Teramo 12-13 dicembre 2013



Introduzione

I

(Atti per i quali la pubblicazione è una condizione di applicabilità)

**REGOLAMENTO (CE) n. 2073/2005 DELLA COMMISSIONE
del 15 novembre 2005
sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari
(Testo rilevante ai fini del SEE)**

LA COMMISSIONE DELLE COMUNITÀ EUROPEE,

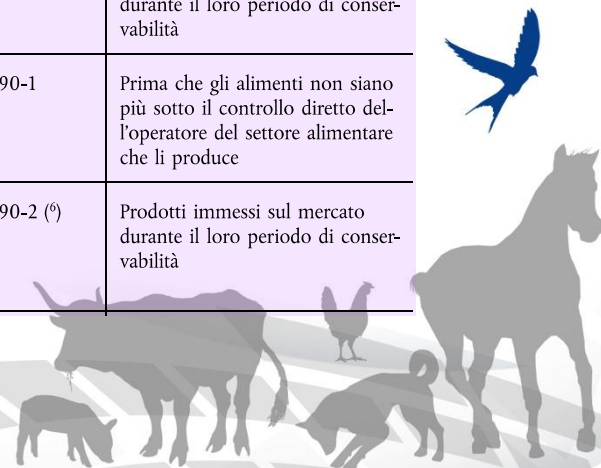
visto il trattato che istituisce la Comunità europea,

visto il regolamento (CE) n. 852/2004 del Parlamento europeo

(4) I criteri microbiologici indicano inoltre come orientarsi nello stabilire l'accettabilità di un prodotto alimentare e dei relativi processi di lavorazione, manipolazione e distribuzione. L'applicazione dei criteri microbiologici deve costituire parte integrante dell'attuazione delle procedure HACCP e di altre misure di controllo dell'igiene.

Il comitato scientifico per le misure veterinarie in relazione con la salute pubblica (CSMVSP) ha emesso allo stesso tempo un parere separato sulla *Listeria monocytogenes*, in cui ha raccomandato di stabilire come obiettivo una concentrazione di *Listeria monocytogenes* negli alimenti inferiore a 100 ufc/g.

2. Alimenti pronti che costituiscono terreno favorevole alla crescita di <i>L. monocytogenes</i> , diversi da quelli destinati ai lattanti e a fini medici speciali	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 ufc/g ⁽⁵⁾	EN/ISO 11290-2 ⁽⁶⁾	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
		5	0	Assente in 25 g ⁽⁷⁾	EN/ISO 11290-1	Prima che gli alimenti non siano più sotto il controllo diretto dell'operatore del settore alimentare che li produce
3. Alimenti pronti che non costituiscono terreno favorevole alla crescita di <i>L. monocytogenes</i> , diversi da quelli destinati ai lattanti e a fini medici speciali ⁽⁴⁾ ⁽⁸⁾	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 ufc/g	EN/ISO 11290-2 ⁽⁶⁾	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità



Introduzione

Reg. (CE) n. 2073/2005:

< 100 UFC/g

- Si applica se il produttore è in grado di dimostrare, con soddisfazione dell'autorità competente, che il prodotto non supererà il limite di 100 UFC/g durante il periodo di conservabilità.
- L'operatore può fissare durante il processo limiti intermedi sufficientemente bassi da garantire che il limite di 100 UFC/g non sia superato al termine del periodo di conservabilità.



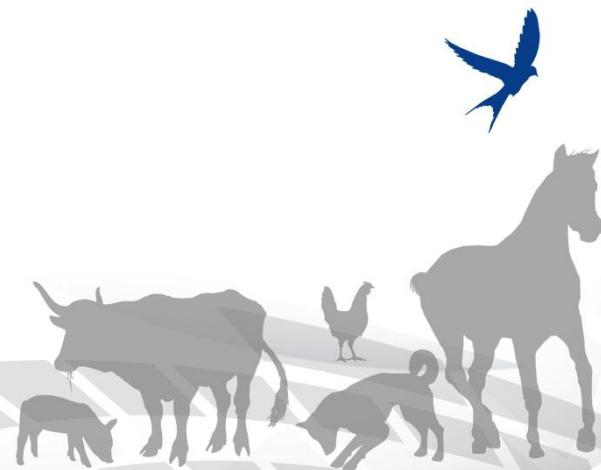
Reg. (CE) n. 2073/2005:

Indicazioni per alcune categorie di alimenti RTE

- ✓ alimenti che sono stati sottoposti a trattamento termico o ad altra trasformazione avente come effetto l'eliminazione di *L. monocytogenes*, quando non è possibile una ricontaminazione dopo tali trattamenti (ad esempio, i prodotti sottoposti a trattamento termico al momento del confezionamento finale),
- ✓ frutta e ortaggi freschi, non tagliati e non trasformati, tranne i semi germogliati, pane, biscotti e prodotti analoghi,
- ✓ acqua, bibite, birra, sidro, vino, bevande spiritose e prodotti analoghi imbottigliati o confezionati,
- ✓ zucchero, miele e dolci, compresi i prodotti a base di cacao e cioccolato,
- ✓ molluschi bivalvi vivi.

I prodotti caratterizzati da:

- $\text{pH} \leq 4,4$ o $\text{aw} \leq 0,92$,
- $\text{pH} \leq 5,0$ e $\text{aw} \leq 0,94$,
- un periodo di conservabilità inferiore a 5 giorni.

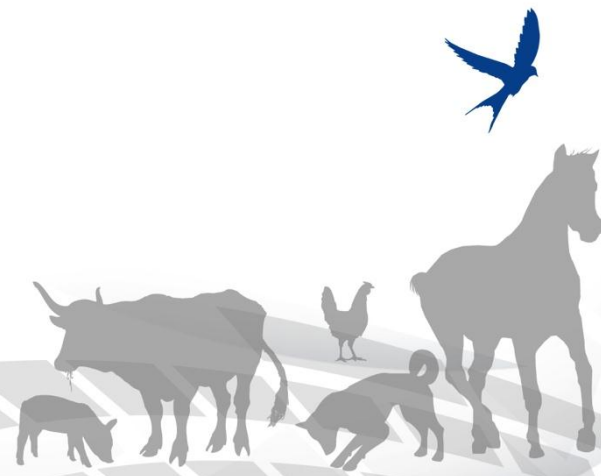


Introduzione

Reg. (CE) n. 2073/2005:

Assente in 25 g

- Si applica ai prodotti **prima che non siano più sotto il controllo diretto dell'operatore del settore alimentare che li produce, se questi non è in grado di dimostrare, con soddisfazione dell'autorità competente, che il prodotto non supererà il limite di 100 ufc/g durante il periodo di conservabilità.**



Introduzione



EURL Lm



Laboratori di prova

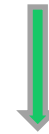


Technical Guidance document for
conducting shelf life studies on *L.*
monocytogenes in RTE foods rev
2 2008

EC/DG SANCO




Operatori del settore
alimentare



Guidance document on *L.*
monocytogenes shelf life studies
for RTE foods under Regulation
(EC) 2073/2005 of 15 november
2005 on microbiological criteria
on food stuffs




Basi del protocollo

- 
- ✓ **Durability test** (valore finale della crescita di Lm) >> proporzione di campioni con > 100 UFC/g alla fine della shelf life
 - ✓ **Challenge test (growth potential)** >> differenza tra concentrazione iniziale e finale di Lm (classificazione RTE)
 - ✓ **Challenge test (maximum growth rate)** >> previsione del valore della concentrazione di Lm in un certo punto della shelf life)



Basi del protocollo



Eterogeneità della composizione nutrizionale e microbiologica del prodotto in studio

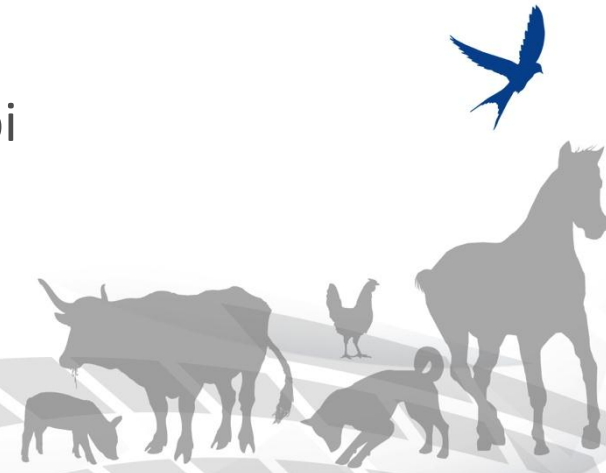


Dati da più lotti di prodotto


Eterogeneità dei ceppi da inoculare



Dati da inoculo con diversi ceppi



Informazioni sul prodotto

- 
- Descrizione del prodotto
 - Composizione
 - Caratteristiche chimico-fisiche e microbiologiche
 - Tipo confezionamento
 - Fasi principali di trasformazione (fasi decontaminanti e fasi in cui può verificarsi ricontaminazione)
 - Condizioni di stoccaggio (fasi della catena del freddo)

Dati storici e bibliografici (prevalenza, dati altri studi e con quali ceppi)



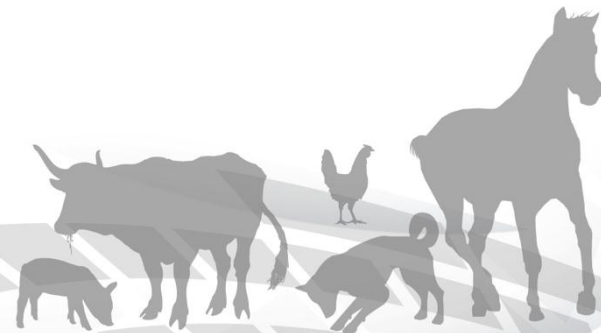
Growth potential

Obiettivo:

- Classificazione degli RTE

0,5 log₁₀ UFC/g >> limite per valutare se sostiene o meno la crescita di LM

- ✓ I ceppi possono essere adattati e quindi la fase lag viene considerata
- ✓ I dati sono strettamente correlati al prodotto / condizioni; ogni modifica deve essere riconsiderata in un nuovo esperimento.



Growth potential

LOTTI

- Numero di lotti in funzione della probabilità di crescita (1 per RTE che non supportano e 3 per gli altri)
- Calcolo del n. di lotti mediante Microb predittiva o programma su sito EURL (valuta la significatività della variabilità pH e aw del prodotto)
- I lotti con caratteristiche più favorevoli per Lm vanno selezionati

CEPPI

- ✓ 2 ceppi per inoculo: 1 a crescita rapida
- ✓ Collezione dell'EURL con ceppi testati e a varie condizioni ambientali
- ✓ Uso di ceppi surrogati
- ✓ Caratteristiche dello stoccaggio e definizione del ceppo



Growth potential

PREPARAZIONE CEPPI

- Crescita in terreno non selettivo per 15-18 ore
- Crescita in condizioni sperimentazione (temperatura: 7 gg a 7°C o 3gg a 10°C)
- Altre procedure “stressanti” devono essere definite perché non incluse nella guida
- Miscela dei ceppi e controllo della concentrazione
- Test all’inizio e fine shelf life di 3 unità + t 1 unità per flora naturalmente contaminante e caratteristiche chimico fisiche



Growth potential

PREPARAZIONE INOCULO

- Volume < 1%
- Tipo di inoculo in relazione a tipo di contaminazione
- Prodotto confezionato
- Prodotto con "strati"
- 100 UFC/g
- Unità non inoculate
- Test in contemporanea alla crescita degli stessi ceppi in brodo non selettivo (effetto condizioni di stoccaggio o matrice)



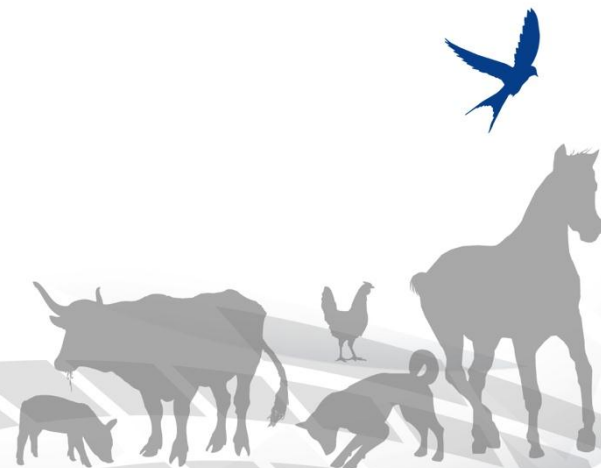
Growth potential

CONDIZIONI DI STOCCAGGIO

- Dati dell'OSA (85% percentile)
- Dati nazionali
- Dati EC SANCO (8°C alla produzione; 12°C al dettaglio e consumatore)

METODI DI ANALISI

- Standard
- In regime di qualità



Growth potential

CALCOLO


- Valutazione dev stand tra i 3 replicati ($< 0,5 \log$ altrimenti si rifiuta il risultato)
- Si considera il valore più alto tra i 3 lotti

DATI SUL REPORT

- Prodotto
- Condizioni sperimentali (preparazione e stoccaggio)
- Metodi di analisi
- Flora contaminante e caratteristiche chimico fisiche

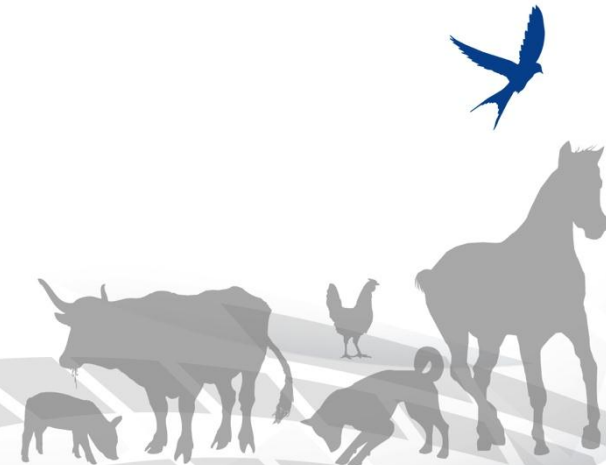


Maximum growth rate

- 
- Valutazione pendenza della curva di crescita
 - Dato utilizzabile per estrapolare comportamento in altre condizioni (es. T°C)

N. CAMPIONI

- 10-15 unità inoculate (5-7 in fase esponenziale)
- 3 unità non inoculate
- 1 per flora e caratteristiche chimico fisiche



Maximum growth rate



CEPPI

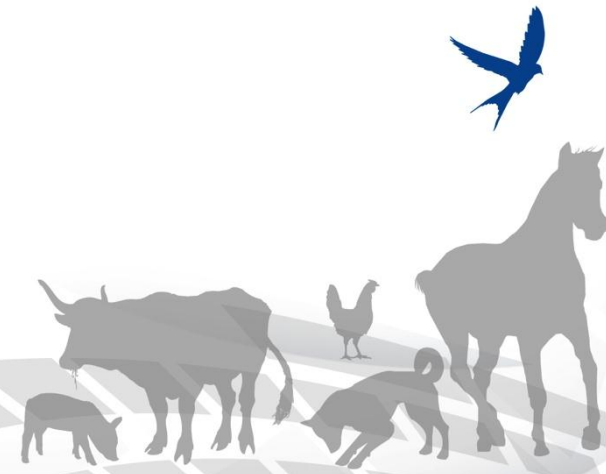
- 2 ceppi
- Valutati separatamente

CONDIZIONI

- 1 temperatura

CALCOLO

- DMFit software

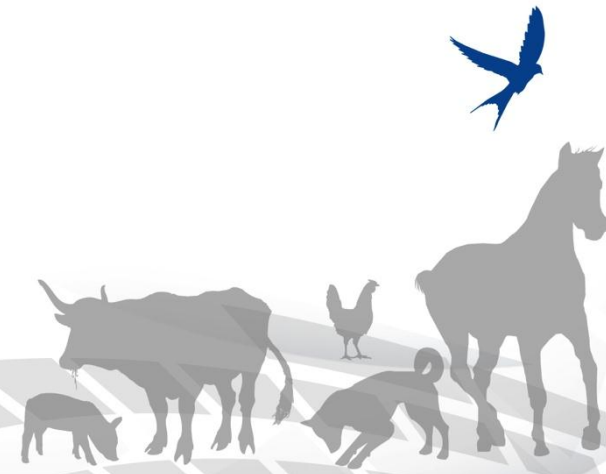



Durability test



CAMPIONAMENTO

- Selezione random delle unità
- Campionamento basato su proporzione unità con > 100 UFC/g
- Supporto statistico



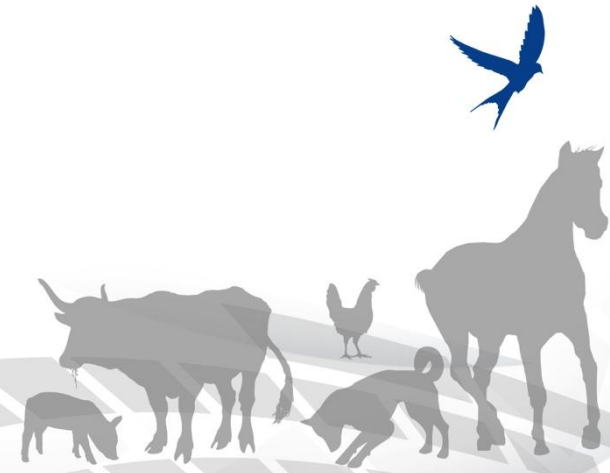


Dati ceppi EURL

Glossario

Preparazione inoculo

Tecniche di contaminazione



CONCLUSIONI

