



IZSAM G.CAPORALE
TERAMO


**LABORATORIO SPERIMENTALE DELLE
TRASFORMAZIONI ALIMENTARI:
ATTIVITÀ E OBIETTIVI**

Anna Franca Sperandii

Workshop LNR Lm 12-13 dic 2013




Introduzione


- 
- ✓ La presenza di microorganismi patogeni negli alimenti è un problema sia per la salute umana sia per il commercio delle produzioni alimentari.
 - ✓ garantire **la sicurezza di un prodotto** rappresenta l'obiettivo primario che il produttore si prefigge adottando le misure del proprio sistema di controllo.
 - ✓ All'operatore del settore alimentare, la normativa europea richiede di verificare l'adeguatezza del sistema di controllo attraverso l'applicazione dei criteri microbiologici.



Introduzione

- 
- ✓ Il criterio per *L. monocytogenes* per prodotti RTE ha, però, introdotto la possibilità, mediante protocolli riconosciuti e la produzione di dati scientifici, di documentare il grado di sicurezza di un determinato prodotto nell'arco del periodo di shelf life.
 - ✓ La valutazione degli effetti delle caratteristiche del prodotto così come delle tecnologie di trasformazione applicate sull'evoluzione dei livelli di contaminazione di agenti patogeni, superano la visione statica dell'applicazione criteri microbiologici di sicurezza, a favore di un aspetto dinamico della valutazione di tali criteri.



- 
- ✓ Con l'allestimento di un **Laboratorio sperimentale delle trasformazioni alimentari** si è inteso rispondere alle crescenti richieste che provengono da aziende alimentari.
 - ✓ In relazione a ciò il laboratorio svolge attività d'interesse come LNR per *Listeria monocytogenes*.
 - ✓ Raccolta di dati sperimentali per modelli di microbiologia predittiva



- ✓ E' una struttura di circa 400 metri quadrati, progettata per soddisfare le esigenze di ricerca su temi di **sicurezza alimentare** per quanto riguarda la tecnologia di trasformazione applicata alla produzione di prodotti a base di carne e lattiero-caseari.
- ✓ Struttura ad alto contenimento biologico, consente la produzione degli alimenti contaminati da agenti patogeni, per lo studio del loro comportamento nelle diverse fasi e nel periodo di shelf-life.
- ✓ Sistemi di filtri HEPA con flussi d'aria forzata per creare barriere, per prevenire la trasmissione di agenti inquinanti.







- 
- ✓ La struttura contiene le principali apparecchiature per la **produzione** di alcuni prodotti alimentari.



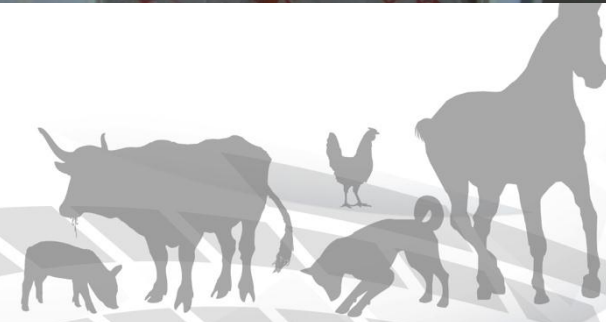
- ✓ In particolare un mini caseificio e le attrezzature per la preparazione di insaccati.



Attrezzature



- ✓ Attrezzatura dedicata, permette di eseguire la fase di stagionatura e il confezionamento in atmosfera protettiva o sottovuoto.



FOSS - FoodScan e MilkoScan

Tecnologia: Analisi Infrarosso con Trasformata di Fourier (FTIR)

FoodScan™



Carne e derivati

- Grasso
- Umidità
- Proteine
- Carboidrati
- Sale

NDAC APPROVED
Mettler 7045100

Formaggio

- Grasso
- Umidità
- Proteine
- Solidi totali
- Sale

Suino

- Grasso
- Umidità
- Solidi non grassi
- Solidi totali
- Sale

Yogurt

- Grasso
- Umidità
- Proteine
- Solidi totali
- pH

Altri parametri realizzando apposite calibrazioni


MilkoScan™ FT1

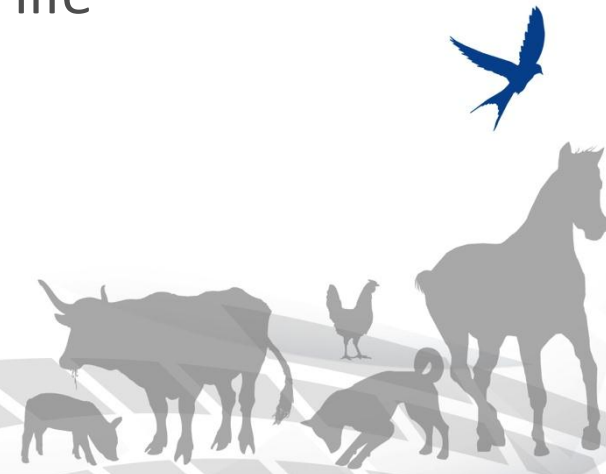


Latte, panna, siero

- Grasso
- Proteine
- Lattosio
- Solidi Totali
- Solidi non grassi
- Acido citrico
- Abbassamento oncoscopico
- Acidi Grassi Liberi
- Densità
- Acidità totale

Disponibili calibrazioni per latte concentrato, yogurt, micio, dessert e gelati.

- 
- ✓ Determinazione del profilo microbiologico e nutrizionale dei prodotti alimentari
 - ✓ Challenge test per valutare il grado di sicurezza dell'alimento rispetto ad agenti patogeni
 - ✓ Valutazione / determinazione della shelf life




Documentazione

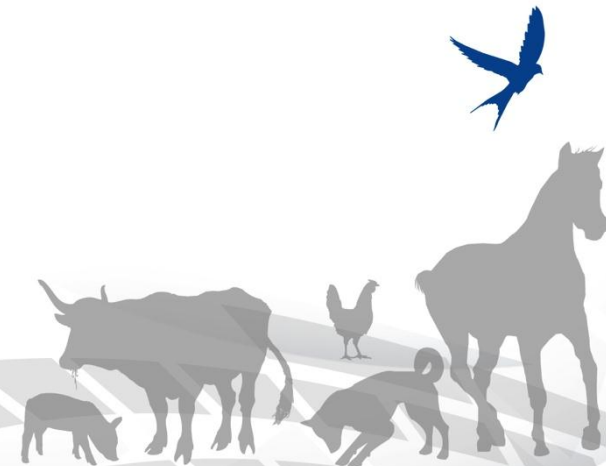
Per garantire che tutte le attività ed i comportamenti siano omogenei e controllati, sono state redatte:

- ✓ Procedure per biocontenimento
- ✓ Selezione dei ceppi
- ✓ Curve di crescita
- ✓ Protocolli di adattamento
- ✓ Protocolli sperimentali per challenge test / shelf life
- ✓ Procedure per tecniche di ricerca e numerazione di altri microrganismi rappresentanti di popolazioni specifiche o indicatori (di igiene, di termoresistenza, ecc)

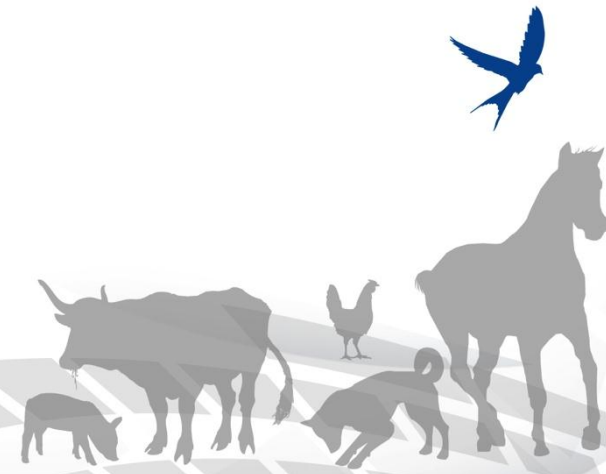


Challenge test

- 
- ✓ Il Challenge test è una prova microbiologica eseguita per valutare la capacità di un **alimento** di sostenere lo sviluppo di microrganismi di riferimento (patogeni o indici di scarsa igiene), o per verificare gli effetti di un **processo** produttivo sulla sopravvivenza o mortalità di tali microrganismi.
 - ✓ Entrando più nel dettaglio, possiamo quindi dire che Il Challenge test è uno studio atto a verificare se, come ed in quali particolari condizioni un determinato microrganismo possa svilupparsi su una certa matrice.



- ✓ In quest'ottica, il challenge test assume un ruolo determinante perché viene a costituire una garanzia di innocuità degli alimenti per la salute umana





Regolata da numerose normative, nazionali ed internazionali

Challenge test

- ✓ EU COMMUNITY REFERENCE LABORATORY FOR L. MONOCYTOGENES Version 2 – November 2008 TECHNICAL GUIDANCE DOCUMENT On shelf-life studies for *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods rev 14/11/2008
- ✓ 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
- ✓ PR NF V01-009 Indice de classement : V01-009PR Hygiène et sécurité des produits alimentaires - Lignes directrices pour la réalisation des tests de croissance microbiologiques

Per la realizzazione delle contaminazioni sperimentali la procedura fa riferimento alle linee guida presentati nel documento della Comunità Europea sulla guida per la contaminazione sperimentale di prodotti RTE con *L.monocytogenes* (SANCO/1628/2008, 2008).






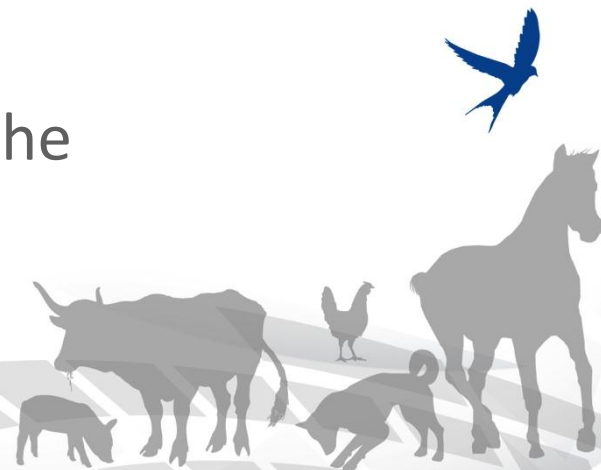
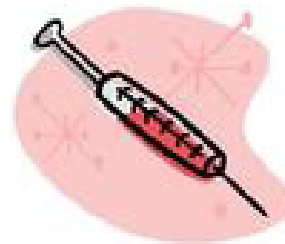
Valutare la permissività di un alimento verso *L. monocytogenes* (o altri batteri).

- $\delta > 0,5 \log_{10} \text{ UFC g}^{-1}$ = PERMISSIVO
 - $\delta \leq 0,5 \log_{10} \text{ UFC g}^{-1}$ = NON PERMISSIVO
-
- Fornire una prima stima del comportamento di *L. monocytogenes* dalla produzione al consumo.
 - Identificare possibili limiti intermedi da utilizzare in produzione.




Fasi dello studio

- 
- ✓ Caratteristiche del prodotto
 - Valutazione della flora microbica tipica
 - Determinazione delle caratteristiche fisico-chimiche
 - ✓ Numero di lotti
 - ✓ Scelta dei ceppi
 - ✓ Preparazione dell'inoculo
 - ✓ Contaminazione
 - ✓ Stoccaggio
 - ✓ Analisi microbiologiche e chimico-fisiche
 - ✓ Analisi dei dati
 - ✓ Elaborazione del report



Selezione dei ceppi




I Challenge test devono essere effettuati inoculando una sospensione costituita da una miscela di almeno 3 ceppi (alla stessa concentrazione), per tener conto delle variazioni di crescita (tra i differenti ceppi).

I ceppi selezionati devono includere sia ceppi di riferimento (ATCC, NCTC, ecc.) sia ceppi isolati da matrici alimentari uguali o di origine riferibile all'alimento in esame .

La sospensione deve essere costituita da batteri che si trovano alla fine della fase esponenziale o all'inizio della fase stazionaria.






A tal fine si è reso opportuno condurre studi preliminari per determinare il tempo necessario per il raggiungimento della **fase stazionaria** di ogni singolo ceppo:

- *L. monocytogenes*: ceppi di riferimento (ATCC 7644) e ceppi di campo
- *E. coli* O157:H7: ceppo di riferimento e ceppi di campo
- *S. typhimurium*: ceppo di riferimento (ATCC 14028) e ceppi di campo
- *Yersinia* Enterocolitica: ceppo di riferimento (NCTC10463) e ceppi di campo
- *Staphylococcus aureus* ceppo di riferimento (ATCC33862) e ceppi di campo



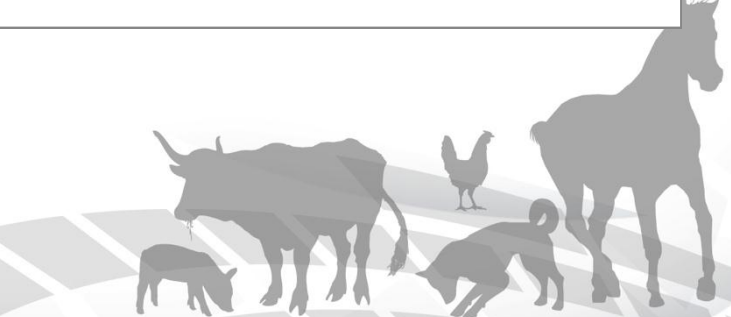
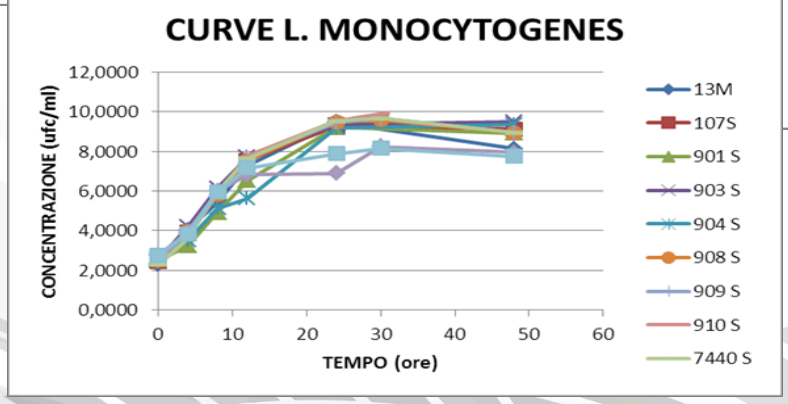
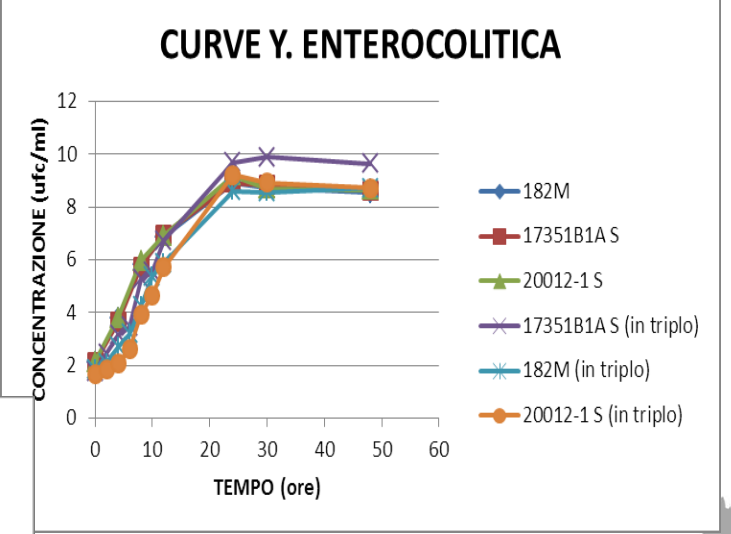
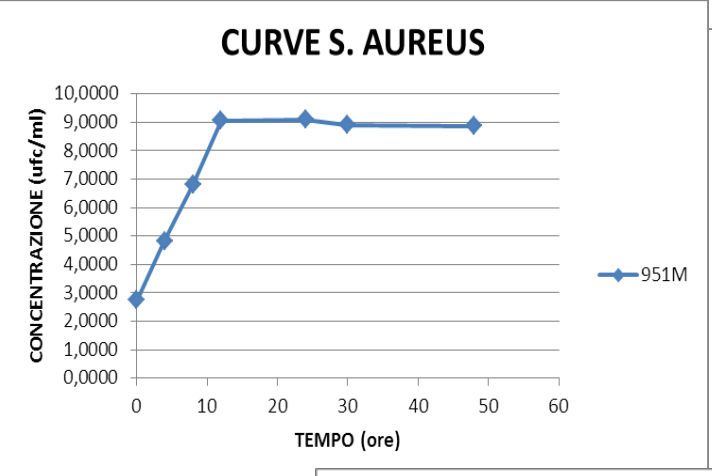
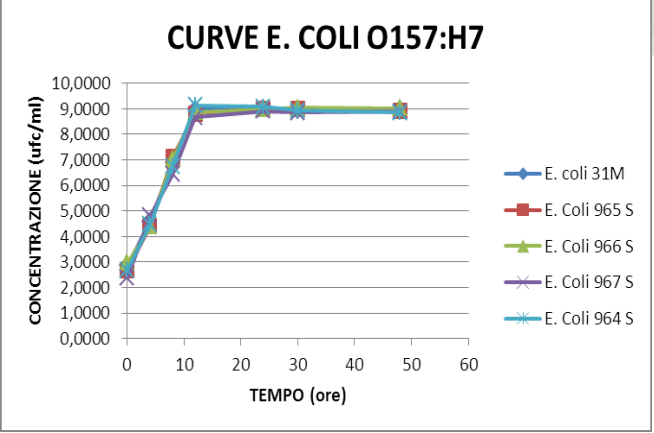
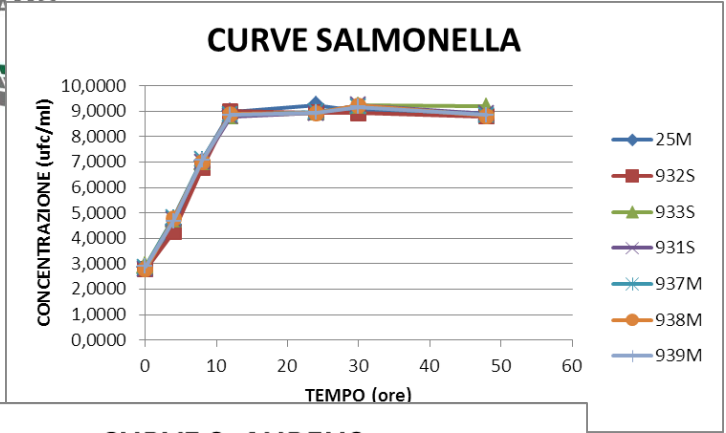


Ogni ceppo selezionato è stato preventivamente sottoposto a prove di identificazione biochimica, identificazione sierologica e determinazione del profilo PFGE

- ✓ Il ceppo è stato successivamente trapiantato su un terreno di arricchimento, incubato ad una temperatura ottimale (riferita al patogeno preso in esame), per un tempo sufficiente a raggiungere l'inizio della **fase stazionaria**.
- ✓ Tale fase è stata individuata effettuando una serie di titolazioni a tempi prestabiliti, dalla sospensione di partenza.



Curve di crescita



Fase di adattamento

- ✓ La fase successiva è quella di **adattamento**, trasferendo il ceppo in terreni variati nella loro composizione e resi «simili» all'alimento in esame (pH, aw, NaCl).
- ✓ Anche le Temperature di incubazione, tengono conto della temperatura di stoccaggio del prodotto previste dalla ditta e dell'eventuale abuso termico a cui il prodotto può essere sottoposto.
- ✓ Il monitoraggio della crescita avviene per un tempo sufficiente alla determinazione della fase esponenziale e dell'inizio della fase stazionaria.
- ✓ Le sospensioni dei 3 ceppi vengono poi miscelate in parti uguali e titolate.



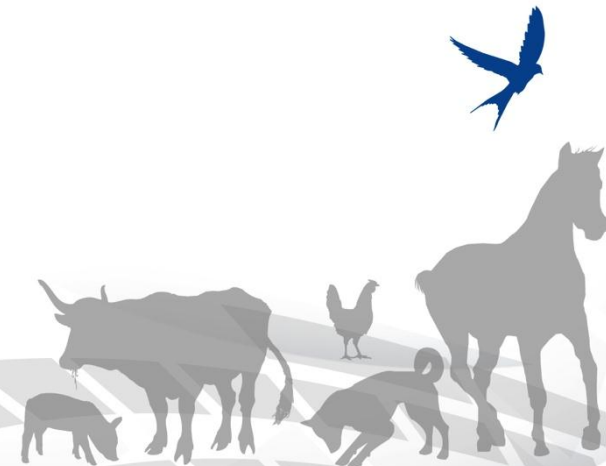
Livello di contaminazione

- ✓ La miscela non deve superare l'1% del volume dell'unità di prova
- ✓ Livello di contaminazione tra 50 e 100 ufc/g

Tipi di contaminazione

- ✓ In profondità (campioni omogenei, es. macinati, emulsioni, oppure particolati, es. insalate di frutta);
- ✓ In superficie (per simulare una contaminazione durante il processo, es. prodotti affettati)

Controlli



SHELF LIFE

Viene definita come «L'intervallo di tempo in cui un alimento mantiene un ACCETTABILE livello di qualità e sicurezza. E' necessario attribuire un limite di ACCETTABILITÀ per ciascun prodotto in base ad un parametro misurabile»



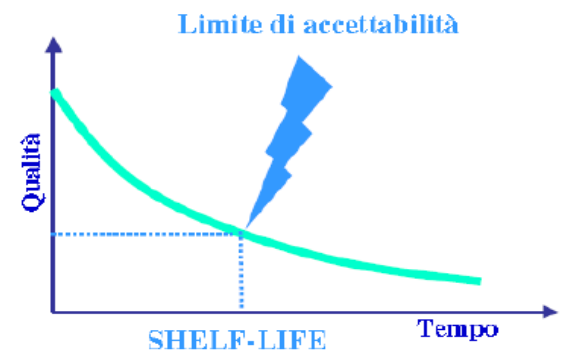
Food&Tec-11/2012

- ✓ Per stabilire la shelf life di un prodotto occorre decidere fino a che livello accettiamo che il prodotto si modifichi nel tempo.



Fasi dello studio

- ✓ Con lo studio di shelf life s'intende la valutazione dell'insieme di analisi sensoriali, chimiche e microbiologiche che vengono testate sui prodotti alimentari, per poter conoscere il comportamento dell'alimento durante la vita commerciale.
- ✓ Le analisi vengono effettuate secondo step stabiliti seguendo le indicazioni riportate nella norma **AFNOR NF V 01-003 2010**.
- ✓ I risultati ottenuti vengono valutati al fine di dare una visione completa delle modificazioni dell'alimento nel periodo di conservazione.



Fasi dello studio

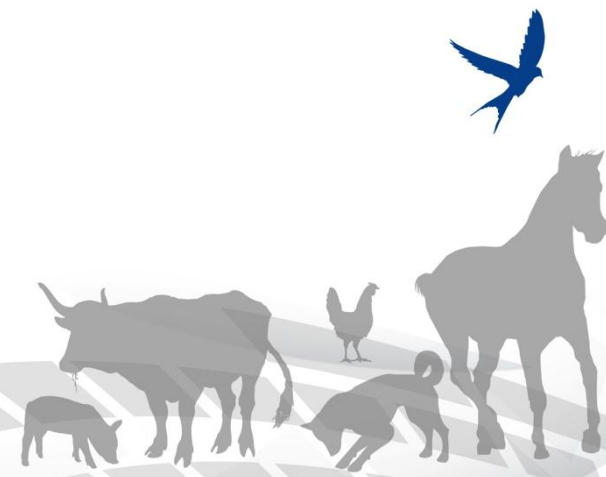


SHELF LIFE

- ✓ Numero lotti e numero campioni da testare
- ✓ Piano di campionamento
- ✓ Condizioni di stoccaggio (tempo-temperatura) delle unità di prova
- ✓ Parametri chimici
- ✓ Parametri microbiologici e metodi di conteggio
- ✓ Valutazione organolettica



- Insalata di mare
- Carni fresche e prodotti di carne
- Prodotti lattiero caseari freschi
- Insaccati freschi-
- Bevande a base di latte



Arricchimento in elementi di funzionalità, sicurezza alimentare e tracciabilità del Pecorino di Farindola” (Acronimo PECOPLUS)

Della valutazione delle variabili di processo

sono state selezionate tre aziende, rappresentative di oltre l'80% dell'intera produzione di Pecorino di Farindola

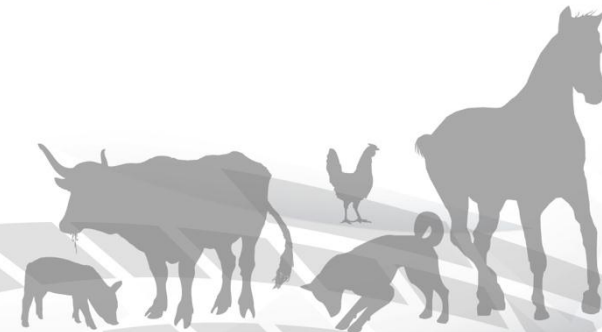
- ✓ Rilevazione delle caratteristiche e delle modalità di trasformazione da parte delle aziende produttrici aderenti al consorzio
- ✓ Studio delle variabili di processo e di prodotto
- ✓ Caratterizzazione dei formaggi in commercio
- ✓ Challenge test
- ✓ Valutazione delle caratteristiche di probiosi



MODELLO DI VALUTAZIONE DEL RISCHIO DI LISTERIOSI DA PARTE DEL CONSUMATORE DI FORMAGGIO GORGONZOLA

Contributo della contaminazione della crosta per effetto del «trascinamento»:

- durante il taglio delle forme vi è la probabilità che le lame trasferiscano *L. monocytogenes* dalla crosta alla pasta.
- in questo caso è possibile teorizzare un effetto di trascinamento da parte della lama sulle cellule batteriche con la loro parziale redistribuzione lungo la superficie di taglio. Questo potrebbe comportare una contaminazione della pasta della porzione ottenuta.





Lo studio quantificherà l'entità di tale fenomeno di trascinamento e dei livelli di contaminazione risultanti sulla pasta.

Il principio di precauzione dato dal Consorzio del Gorgonzola sulla base della dicitura "crosta non edibile" riportata in etichetta, non offre delle garanzie igienico sanitarie sufficienti.

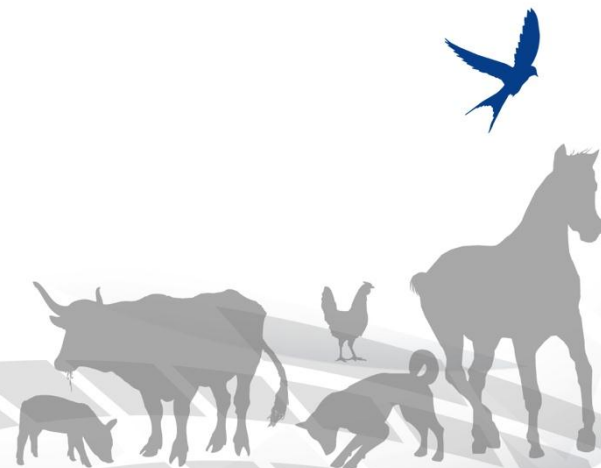


Attività in corso



Valutazione performance di metodi alternativi per il contenimento della contaminazione batterica negli ambienti di stoccaggio degli alimenti

Dimostrare l'efficacia dell'attività fotocatalitica indotta dal TiO_2 presente nel rivestimento interno di una cella di stoccaggio per prodotti alimentari attraverso la determinazione della riduzione della carica di *Listeria monocytogenes* su superfici artificialmente contaminate.

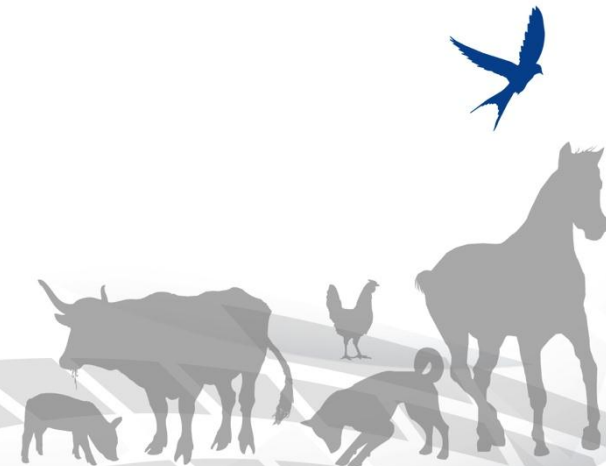



First trial on challenge test to assess the growth potential of *Listeria monocytogenes* in tuna rillettes.

Obiettivo

Valutare le capacità del laboratorio, attraverso la robustezza dei dati, applicando un protocollo standard.

Il circuito è attualmente in corso.



- 
- Completamento documentazione
 - Validazione dei nuovi metodi
 - Integrazione dei protocolli di challenge test con requisiti tecnici necessari per sviluppo di modelli predittivi.
 - Esecuzione di prove di challenge test e shelf life su prodotti RTE preparati in laboratorio e prodotti da aziende





IZSAM C. CAROPALE





GRAZIE