



IZSAM G. CAPORALE
TERAMO



Listeria monocytogenes

Laboratorio Nazionale di Riferimento

Nuovo Documento Tecnico EURL Lm per l'esecuzione di studi di shelf life

Luigi Iannetti

Workshop dei LNR per *Listeria monocytogenes* e *Campylobacter*
25 e 26 novembre 2014 - Teramo





 *Listeria monocytogenes*
Laboratorio Nazionale di Riferimento

Il documento

- Titolo: **EURL Lm Technical Document for conducting shelf-life studies on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods**
- **Versione 3**, pubblicato il **6 giugno 2014**
- Sostituisce la precedente versione del 2008
- Viene sottolineata la **COMPLEMENTARITA'** col documento **SANCO** «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»
- Disponibile sul sito del Laboratorio Nazionale di Riferimento per Lm al link http://lnr.izs.it/listeria/common/mostra_articolo.do?id=97





 *Listeria monocytogenes*
Laboratorio Nazionale di Rifer



Food safety laboratory
Maisons-Alfort, France



EURL Lm

European Union Reference Laboratory for
Listeria monocytogenes

Il documento

EURL Lm TECHNICAL GUIDANCE DOCUMENT

for conducting shelf-life studies on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods

Version 3 – 6 June 2014

Annie Beaufort, H el ene Bergis, Anne-Laure Lardeux, Unit Modelling of Bacterial Behaviour, Bertrand Lombard, Manager EU Reference Laboratory for *Listeria monocytogenes* Anses-Food Safety Laboratory, Maisons-Alfort, France

In collaboration with representatives of 10 National Reference Laboratories (NRLs) for *Listeria monocytogenes* and 1 associated National Reference Laboratory for *Listeria monocytogenes*:

- Marie Polet and Nadine Botteldoorn, Scientific Institute of Public Health, Belgium;
- George Papageorgiou, State General Laboratory, Cyprus;
- Jens Kirk Andersen and Jeppe Boel, National Food Institute, Danish Technical University, Denmark;
- Bernadette Hickey, Dairy Science Laboratory, Republic of Ireland;
- Vincenza Prencipe, Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell' Abruzzo e del Molise "G. Caporale", Italy;
- Wilma Jacobs-Reitsma, National Institute for Public Health and the Environment (RIVM), The Netherlands (NL-NRL);
- Ife Fitz-James, Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority (NVWA), The Netherlands (associated NL-NRL);
- Celcidina Maria Pires Gomes, Instituto Nacional De Investiga o Agr ria e Veterin ria (INIAV), Portugal;
- Lenka Cabanova, State Veterinary and Food Institute, Slovakia;
- Cristina Acebal Sarabia, Institute for Hygiene and Veterinary Public Health, Spain;
- Taran Skjerdal, Norwegian Veterinary Institute, Norway.





 *Listeria monocytogenes*
Laboratorio Nazionale di Riferimento

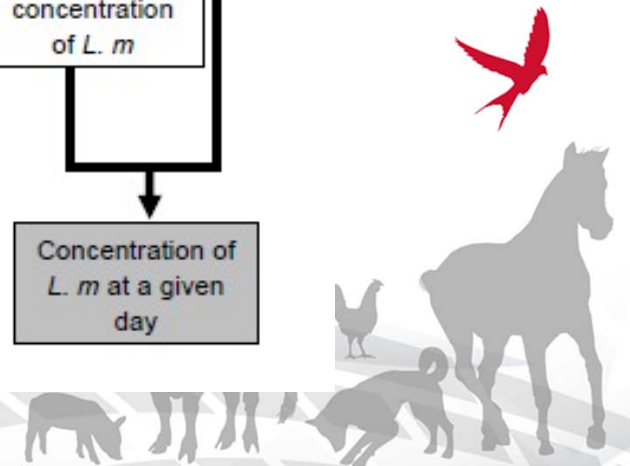
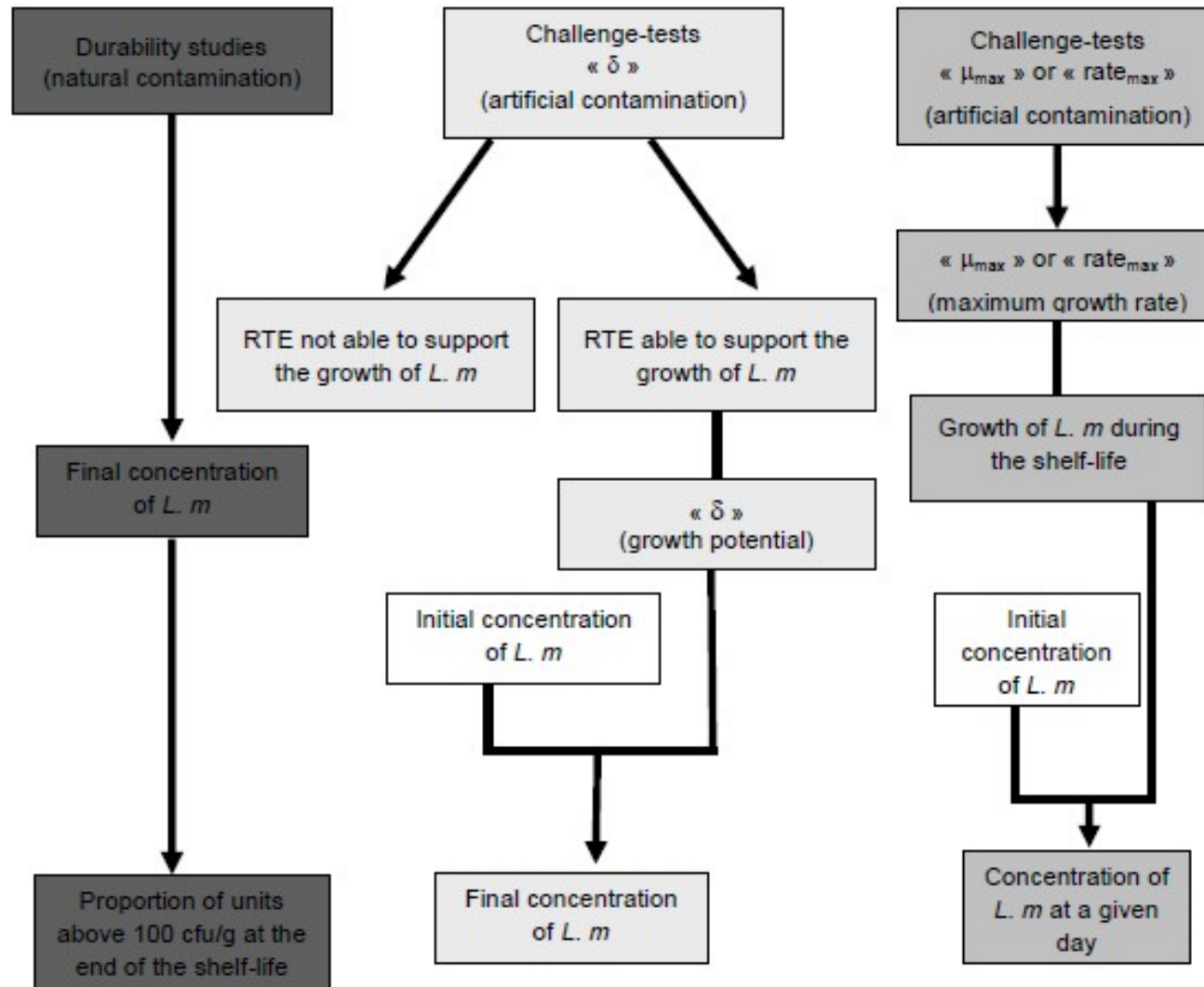
Il documento

Scopo

- Documento tecnico che indica le **modalità di esecuzione dei challenge test** (due tipologie: calcolo del potenziale di crescita δ e del tasso di crescita massimo μ_{max}) e **degli studi di durabilità negli alimenti pronti al consumo**
- Soprattutto dedicato ai **prodotti confezionati**
- Per i **prodotti non confezionati** è necessario **adattare il protocollo** considerando le condizioni ambientali (in precedenza non era specificato)




Il documento





 *Listeria monocytogenes*
Laboratorio Nazionale di Riferimento

Principali novità

- 
- Documento molto più dettagliato, ricco di esempi
 - Nuove responsabilità OSA
 - Temperature di conservazione/incubazione
 - Confezionamento in atmosfera modificata
 - Numero e scelta dei lotti
 - Modalità di contaminazione e preparazione delle unità di controllo (Non inoculate)
 - Set di ceppi messi a disposizione dall'EURL

Per gli studi di durabilità, non ci sono differenze sostanziali rispetto al precedente documento



Maggior dettaglio



- Ampia introduzione iniziale sulle caratteristiche di *Listeria monocytogenes*

- Numerosi esempi in diverse parti del documento
- In particolare allegato finale con 7 pagine di esempi, numerose immagini

7.3.1 Preparation of subcultures for strain 1

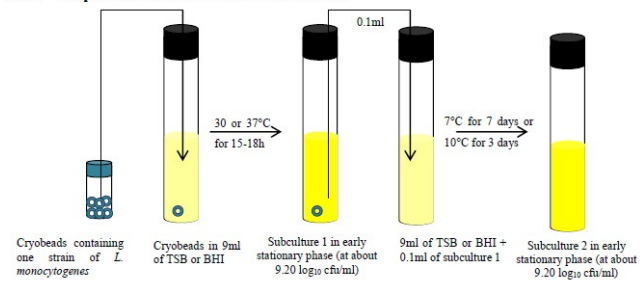


Figure 9: Preparation of the 2 subcultures for each strain

Process is repeated for strain 2 and other strains if used. Values given are for EURL Lm strains.

7.5 Some examples of contamination techniques

Test units can be contaminated in depth or on surface.

This paragraph gives some examples of a couple of matrix and inoculation technique.

- In depth: a semi-liquid product in small quantity (20 g) in a sterile bag for example 20 g of custard contaminated by a pipetted volume



- At the surface: a sliced product

for example a slice of smoked salmon contaminated with 5 spots of 20 μ l on half of the disk's surface and then the disk is folded over. A spreader is used to improve the distribution of the inoculum.






 *Listeria monocytogenes*
Laboratorio Nazionale di Riferimento

Nuove responsabilità OSA

Operatori del Settore Alimentare più responsabilizzati

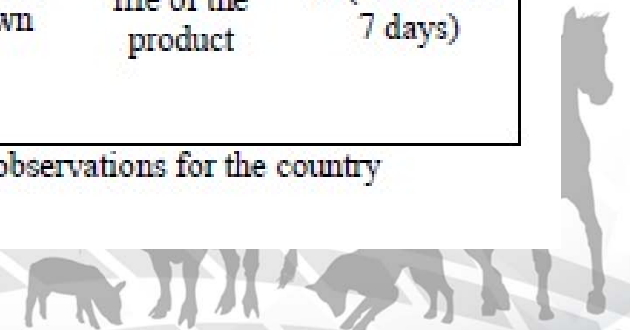
- Le temperature di conservazione impiegate negli studi devono essere **adeguatamente giustificate e documentate dall'OSA**. In precedenza era «responsabilità comune di lab e OSA» fornire giustificazione
- **L'OSA deve fornire al laboratorio** tutte le **informazioni** in suo possesso, ed è responsabile dell'applicazione dei risultati dei test
- **E' preferito l'uso delle informazioni in possesso dell'OSA** per quel che riguarda la temperatura di conservazione che ci si aspetta debba essere utilizzata fino alla vendita al dettaglio 
- **Solo in assenza di informazioni dall'OSA**, si utilizzano le temperature indicate in **tabella**



Temperature di conservazione

Stage of cold chain	Storage (incubation) temperature		Storage (incubation) duration				
					Shelf life ≤ 21 days	Shelf life > 21 days	
From the manufacture until the arrival to the display cabinet	Temperature justified by detailed information*	Or if not known	8°C	Duration justified by detailed information	Or if not known	One third of the total shelf life of the product	7 days
Retail: Display cabinet	Temperature justified by detailed information*	Or if not known	12°C	Duration justified by detailed information	Or if not known	One third of the total shelf life of the product	½ (shelf life – 7 days)
Consumer storage	Temperature justified by detailed information*	Or if not known	12°C	Duration justified by detailed information	Or if not known	One third of the total shelf life of the product	½ (shelf life – 7 days)

* Temperature justified by detailed information: the 75th percentile of the observations for the country where the stage of the cold chain is located.





 *Listeria monocytogenes*
Laboratorio Nazionale di Riferimento

Confezionamento in atmosfera modificata (potenziale di crescita)

 Per i prodotti confezionati in ATM modificata è necessario prendere in considerazione:

- Composizione gassosa al giorno 0 e all'ultimo giorno della sperimentazione
- Permeabilità al gas della confezione e performance della macchina che effettua il confezionamento, utilizzata in laboratorio





 *Listeria monocytogenes*
Laboratorio Nazionale di Riferimento


Numero e scelta dei lotti

- La versione precedente indicava solo la necessità di utilizzare 3 lotti dello stesso prodotto
- **La nuova versione permette di ridurre ad 1 il numero dei lotti in caso di:**
 - **Probabilità di crescita $\leq 10\%$** (calcolabile con un software di microbiologia predittiva)
 - **Bassa variabilità inter-lotto** (calcolabile con uno specifico calcolatore messo a disposizione dall'EURL al sito: <https://eurl-listeria.anses.fr/>)

Attenzione: il link al calcolatore indicato sul documento è stato modificato



Modalità di contaminazione

- 
- Nella nuova versione sono forniti **numerosi esempi**, con fotografie e disegni, di **possibili modalità di contaminazione**
 - Viene specificato che **qualsiasi tecnica di contaminazione può essere utilizzata, purché non alteri aw e caratteristiche intrinseche dell'alimento**
 - **Il livello di contaminazione** per il calcolo del **growth potential** è di circa **100 UFC/g** (in precedenza era 50-100 UFC/g)
 - Le modalità di preparazione dell'inoculo non sono cambiate, ma viene specificato che **l'inoculo deve essere usato immediatamente** dopo la preparazione





 *Listeria monocytogenes*
Laboratorio Nazionale di Riferimento

Unità di controllo (campioni non inoculati)



- La nuova versione specifica che, in caso di reperimento di *Listeria monocytogenes* nelle unità di controllo (non inoculate: «blank samples») il test va considerato non valido
- In precedenza il test era considerato valido anche se *Listeria monocytogenes* era reperita nei «blank samples», dovendo solo fornire informazioni sulla presenza di *Listeria monocytogenes* «naturale» nel prodotto in aggiunta a quella inoculata artificialmente





 *Listeria monocytogenes*
Laboratorio Nazionale di Riferimento

Set EURL Lm di ceppi per l'esecuzione di challenge test

 Set di ceppi con note caratteristiche di crescita in diverse matrici e condizioni ambientali

- La nuova versione richiede di impiegare, oltre a ceppi scelti liberamente, anche ceppi con caratteristiche di crescita note, come quelli del set EURL
- Inoculo per **growth potential**: cocktail di 2 ceppi liberamente scelti e di 1 ceppo con caratteristiche note
- Inoculo per **growth rate**: 2 ceppi testati separatamente, di cui uno con caratteristiche note





Set EURL Lm di ceppi per l'esecuzione di challenge test

Origin	Meat products		
Genoserothype	Low a_w ($a_w = 0.95$)	Low pH (pH = 5)	Low temperature (T = 8°C)
II	12MOB045LM	12MOB045LM	12MOB045LM
	12MOB046LM	12MOB046LM	12MOB046LM
IV	12MOB085LM	12MOB112LM	12MOB085LM
	12MOB089LM	12MOB089LM	12MOB089LM
Origin	Fish products		
Genoserothype	Low a_w ($a_w = 0.95$)	Low pH (pH = 5)	Low temperature (T = 8°C)
II	12MOB101LM	12MOB101LM	12MOB099LM
	12MOB100LM	12MOB100LM	12MOB101LM
IV	12MOB103LM	12MOB103LM	12MOB102LM
	12MOB102LM	12MOB102LM	12MOB107LM
Origin	Dairy products		
Genoserothype	Low a_w ($a_w = 0.95$)	Low pH (pH = 5)	Low temperature (T = 8°C)
II	12MOB098LM	12MOB118LM	12MOB098LM
	12MOB118LM	12MOB098LM	12MOB079LM
IV	12MOB053LM	12MOB053LM	12MOB096LM
	12MOB106LM	12MOB096LM	12MOB105LM
Origin	Other products		
Genoserothype	Low a_w ($a_w = 0.95$)	Low pH (pH = 5)	Low temperature (T = 8°C)
II	12MOB048LM	12MOB051LM	12MOB049LM
	12MOB047LM	12MOB047LM	12MOB047LM/ 12MOB051LM
IV	12MOB050LM	12MOB050LM	12MOB052LM
	12MOB052LM	12MOB052LM	12MOB050LM

- Il set di ceppi è stato inviato a tutti gli LNR per Lm europei, compreso quello italiano, che devono metterli a disposizione dei laboratori del proprio territorio che ne fanno richiesta





 *Listeria monocytogenes*
Laboratorio Nazionale di Riferimento

Set EURL Lm di ceppi per l'esecuzione di challenge test

- Il documento EURL «Development of a set of *Listeria monocytogenes* strains for conducting challenge tests», che fornisce ulteriori specifiche sulle caratteristiche dei ceppi del set, è disponibile sul sito del LNR all'indirizzo http://lnr.izs.it/listeria/common/mostra_articolo.do?id=97



Development of a set of *Listeria monocytogenes* strains for conducting challenge tests

Version 0 – 20/12/2013

Laurent Guillier, Anne-Laure Lardeux, Damien Michelon and Patricia Ng
Unit Modelling of Bacterial Behaviour, ANSES-Food Safety Laboratory, Maisons-Alfort





 *Listeria monocytogenes*
Laboratorio Nazionale di Riferimento

Set EURL Lm di ceppi per l'esecuzione di challenge test



Per ricevere il set di ceppi EURL, i laboratori italiani dovranno effettuare richiesta al LNR con sede all'IZSAM di Teramo, inviando una email all'indirizzo listeria@izs.it





 *Listeria monocytogenes*
Laboratorio Nazionale di Riferimento



Problemi o dubbi

In caso di problemi o dubbi relativi all'applicazione del documento, è possibile inviare una e-mail all'indirizzo listeria@izs.it

Provvederemo a darvi indicazioni o, se necessario, inoltreremo richiesta specifica di chiarimenti all'EURL Lm





Grazie per l'attenzione!