IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Studio di shelf life e challenge test di *Listeria monocytogenes* in vegetali di IV gamma

PROGETTO: IZS AM 02/11 RC

Patrizia Tucci

I risultati della ricerca corrente condotte dall'IZSAM. Anno 2015

Teramo, 15 giugno 2016

Progetto

Nell'ambito del progetto di RICERCA CORRENTE IZS AM 02/11 RC "***Valutazione delle dinamiche di contaminazione da agenti patogeni, dell'efficacia dei controlli e del rischio finale per il consumatore per alcune categorie di prodotti alimentari"***, presso il Laboratorio di Trasformazioni Sperimentali, sono stati effettuati studi di shelf life e challenge test per *Listeria monocytogenes* in un prodotto di IV gamma, lattuga iceberg (**fase 4**).

Oltre alla dinamica di comportamento del microrganismo patogeno (*L. monocytogenes*) sono stati valutati anche l'andamento nel tempo dei parametri chimico-fisici e microbiologici delle lattughe, come risposta a condizioni ambientali di abuso termico.

Introduzione

Negli ultimi due decenni si è assistito ad un significativo cambiamento nello stile di vita delle persone, che sempre più spesso consumano pasti fuori casa o hanno poco tempo a disposizione per cucinare.

Questa tendenza si è riflessa sul settore ortofrutticolo, portando i consumatori a richiedere e ad indirizzarsi verso nuove tipologie di prodotti di origine vegetale: i prodotti di IV gamma, pronti all'uso e al consumo, detti anche fresh cut o minimally processed foods.

convenience foods

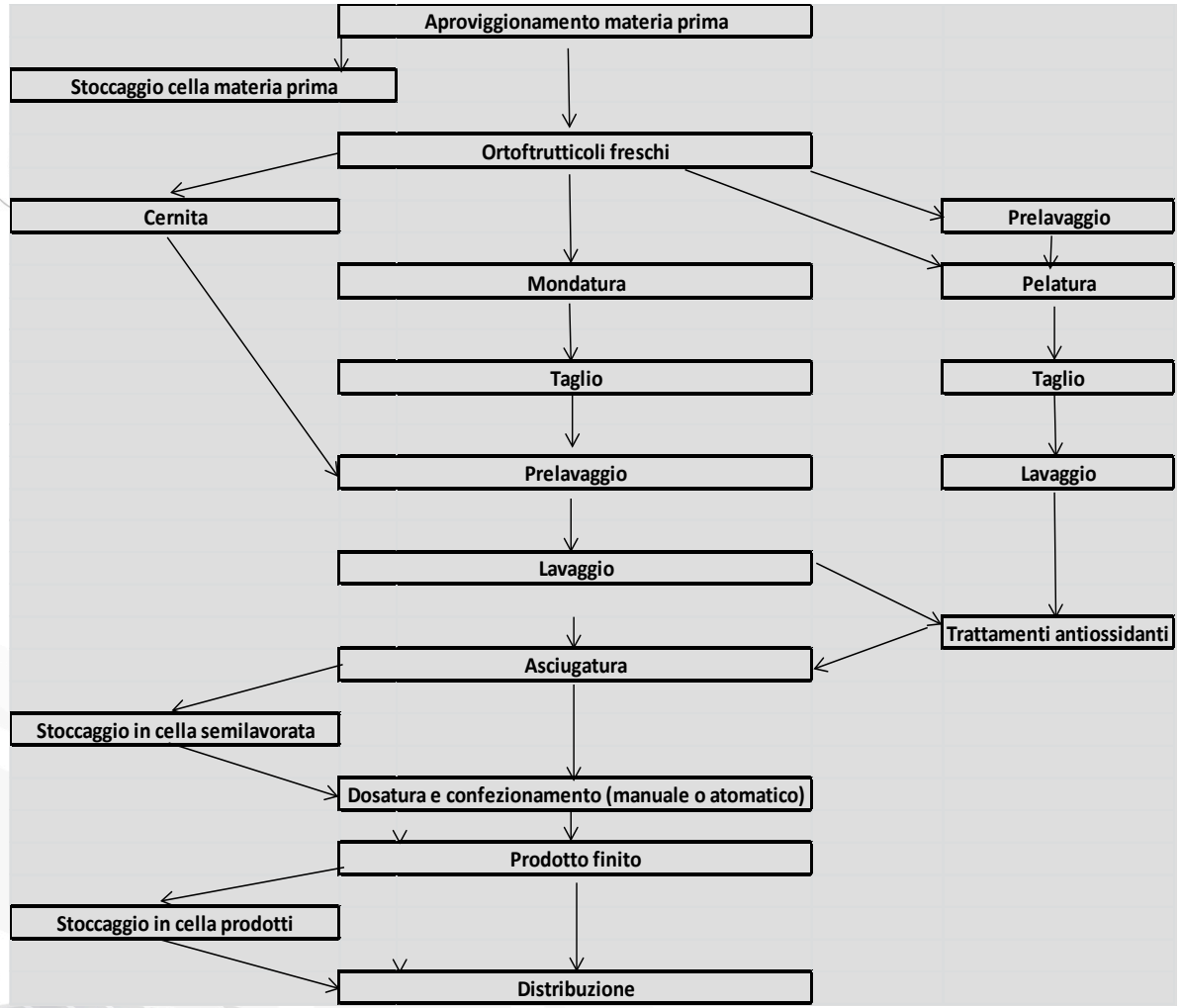
Introduzione

Definizione di prodotti ortofrutticoli di IV gamma
(Legge 13 maggio 2011 n 77 art. 2 - G.U. n 126 1/06/2011)

Art. 2 – Definizione

Prodotti ortofrutticoli freschi, confezionati e pronti per il consumo che dopo la raccolta sono sottoposti a processi tecnologici di minima entità atti a valorizzarli seguendo le buone pratiche di lavorazione articolate nelle seguenti fasi: selezione, cernita, eventuale monda e taglio, lavaggio, asciugatura e confezionamento in buste o in vaschette sigillate, con eventuale utilizzo di atmosfera protettiva.

Processo



La qualità della materia prima, il controllo degli aspetti igienico-sanitari e la gestione della catena del freddo rivestono un ruolo fondamentale per la riduzione della carica microbica iniziale.

Prodotto

Lattuga iceberg
Confezioni da 100 g
Shelf life mediamente di 6 giorni
Temperatura di conservazione <8°C

VALORI NUTRIZIONALI	100 g DI PRODOTTO	PER PORZIONE (80 g)
ENERGIA	95 kJ – 23 kcal	75 kJ – 18 kcal
GRASSI	0,4 g	0,3 g
di cui acidi grassi saturi	0,02 g	0,01 g
CARBOIDRATI	2,2 g	1,8 g
di cui ZUCCHERI	2,2 g	1,8 g
FIBRE	1,5 g	1,2 g
PROTEINE	1,8 g	1,4 g
SALE	0,02 g	0,02 g

Materiali e metodi

Per la sperimentazione sono state acquistate 94 confezioni in busta di lattuga iceberg da 100 g ciascuna da unico lotto produttivo

La sperimentazione ha previsto:

- campioni di controllo (senza organismo target)
- campioni contaminati con *L. monocytogenes*, conservati a due temperature diverse.

I campioni sono stati così suddivisi:

<u>Contaminati</u>

- 34 confezioni conservate a 8 ±2°C;
- 34 confezioni conservate a 12±2°C.

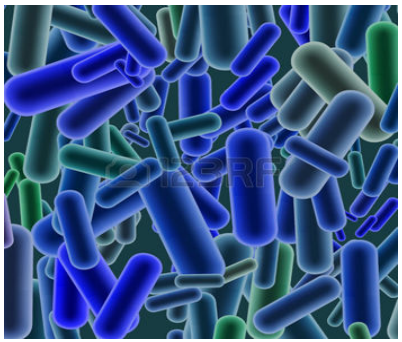
<u>Controllo</u>

- 13 confezioni conservate a 8 ±2°C;
- 13 confezioni conservate a 12±2°C.

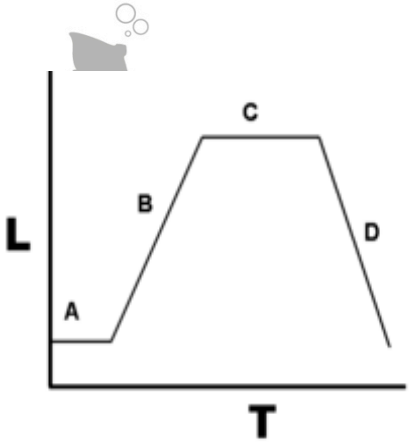
Ceppi batterici

- La sospensione per la contaminazione è stata preparata con una miscela di 2 ceppi di *L. monocytogenes:*
  - ✓ ATCC 13M ATCC 7644
  - ✓ EURL 12MOB098LM

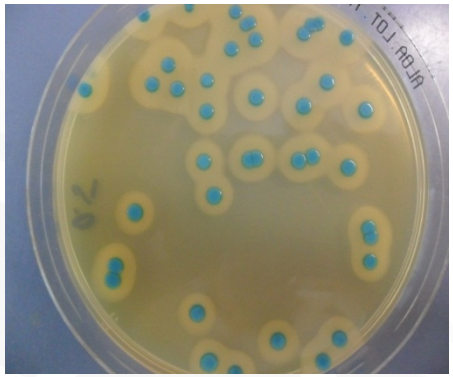
- La procedura seguita per la preparazione della sospensione di inoculo (criteri di selezione, curve di crescita, adattamento) ha fatto riferimento alle linee guida del Laboratorio Europeo di Riferimento per *L. monocytogenes.*



Inoculo



- Preparazione delle brodocolture con ogni singolo ceppo.
- Adattamento dei 2 ceppi alle temperature di conservazione del prodotto (8°C e 12°C), fino al raggiungimento della fase stazionaria di crescita.
- Preparazione (unione in parti uguali delle sospensioni dei 2 ceppi di *Lm*).
- Concentrazione di 10^3 ufc/g nel prodotto.



Il livello di contaminazione scelto in funzione **"worst-case scenario** (contaminazione iniziale materia prima).

In considerazione dei prodotti a scadenza breve Reg CE 2073/2005

Modalità di Contaminazione

- Sulle confezioni sono stati individuati 3 punti di inoculo.
- Su ogni punto è stato collocato un apposito setto in materiale gommoso.
- La contaminazione è stata effettuata con una siringa, distribuendo sui 3 punti, 1ml di mix (l'1% del volume del prodotto, riducendo così al minimo le modifiche alle proprietà chimico fisiche).

- Successivamente ogni setto è stato sigillato per assicurare maggiore permeabilità alla busta.
- Per garantire una contaminazione omogenea le confezioni sono state agitate manualmente per 1 minuto.

Modalità di contaminazione (EURL *Lm* TECHNICAL GUIDANCE DOCUMENT) (mantenimento delle condizioni atmosferiche interne)

Campionamento

CONTROLLO

	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
8°C	X		X	X		X		X		X	X
12°C	X		X	X		X		X		X	X

CONTAMINATI

	T0	T1	T2	T3	T4	T5	T6	T7	T8	T9	T10
8°C	2X	2X	2X	2X	2X	2X	2X	X	X	X	X
12°C	2X	2X	2X	2X	2X	2X	2X	X	X	X	X

Durata T10 gg ⟶ +25% della shelf life

Ad ogni tempo di prelievo sono state analizzate 2 buste (escluso al T0).

Metodi analitici

Accertamento	Metodo	Materia prima	Lotti contaminati	Lotti di controllo
Ricerca di *L. monocytogenes*	ISO 11290-1:96/Amendment 1:2004 (7, 14)	x		
Determinazione dell'attività dell'acqua	ISO 21807:2004 (17)			x
Determinazione del pH	Potenziometrico (pHmeter Seven Easy Mettler Toledo)			x
Carica batterica mesofila totale	ISO 4833:2003 (11)			x
Numerazione delle *Enterobatteriaceae*	ISO 21528-2:2004 (16)			x
Numerazione dei Lattobacilli a 30°C in aerobiosi	ISO 15214:1998 (9)			x
Numerazione di lieviti e muffe in campioni con aw > 0,95	ISO 21527-1:2008 (19)			x
Numerazione delle *Micrococcaceae*	Metodo interno (Baird Parker agar, 37 ± 1°C per 48 ± 2 h)			x
Numerazione di stafilococchi coagulasi positivi (SCP)	ISO 6888-2:1999/Amendament 1:2003 (10, 12)			x
Numerazione di *Pseudomonas spp.*	AFNOR NF V 04-504-2006 (1).			x
Numerazione di *Bacillus cereus*	ISO 7932:2004 (13)			x
Numerazione di *L. monocytogenes*	ISO11290-2:98/ Amendment 1:2004 (8, 15)		x	

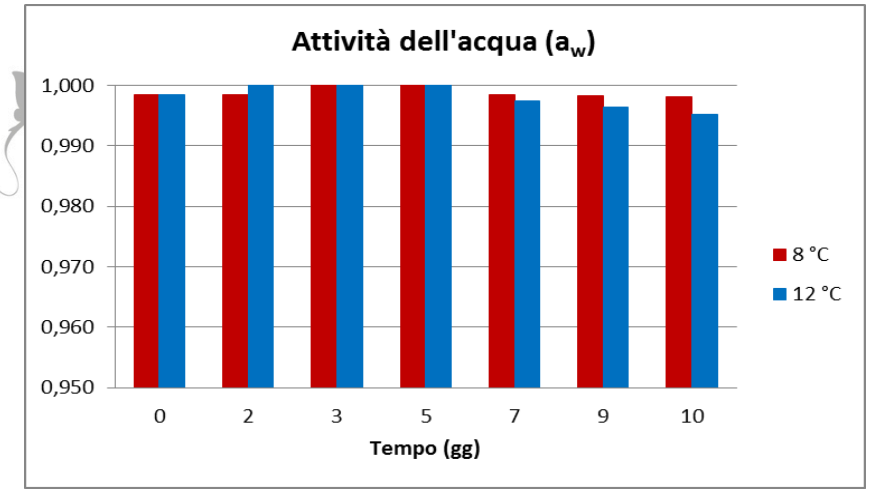
Calcolo del potenziale di crescita (δ) per valutare la permissività di un alimento verso *L. monocytogenes*.

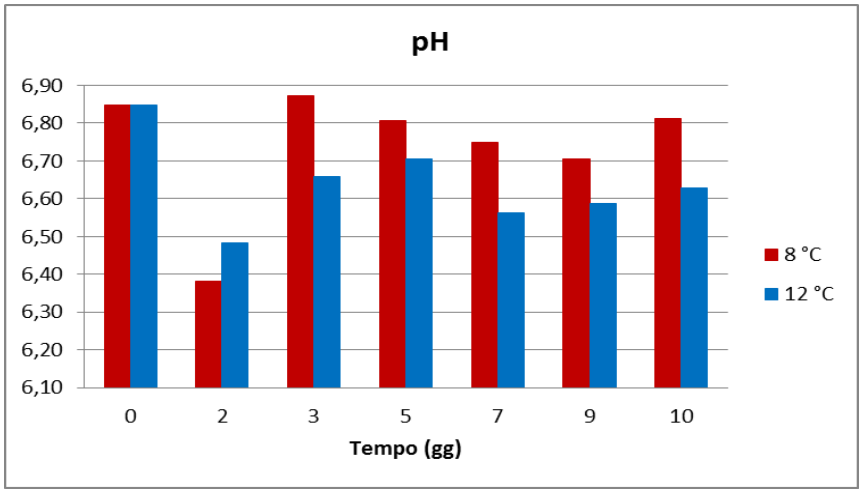
δ> 0,5 log_{10}UFC/g = PERMISSIVO

δ≤ 0,5 log_{10}UFC/g = NON PERMISSIVO

il μ_{max} calcolato in log_{10} UFC/g/h (incremento orario in log_{10} UFC/g)

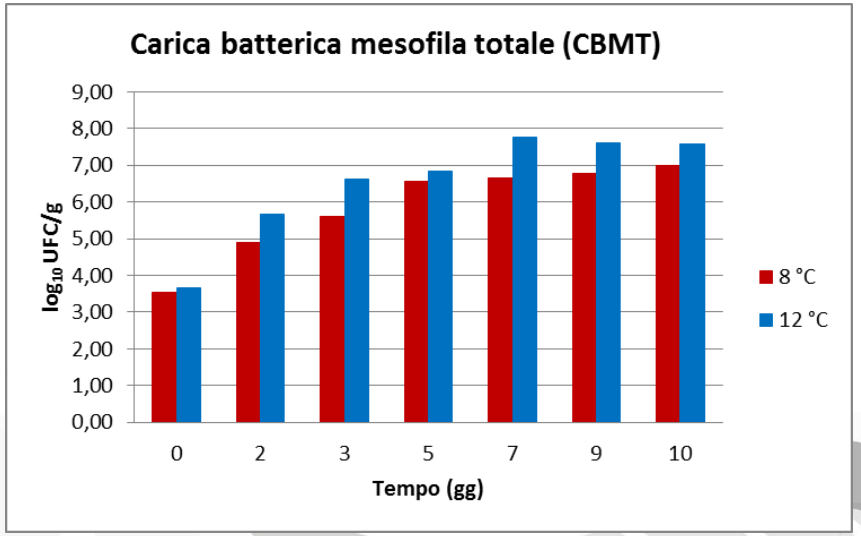
Risultati





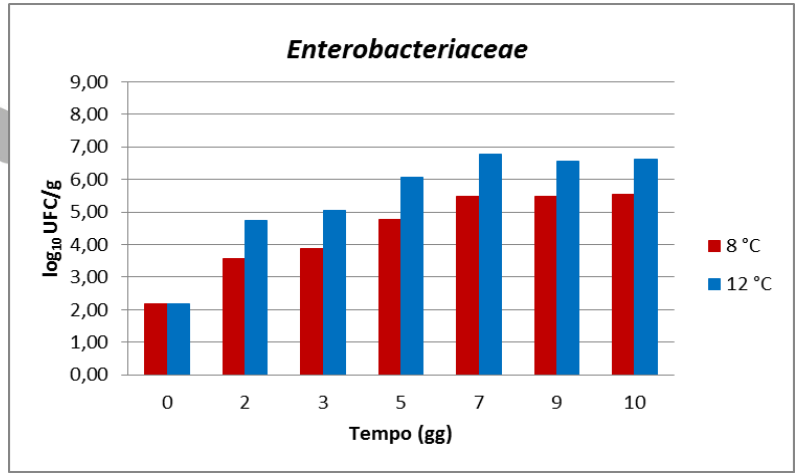
aw: circa 1
pH: valori medi 6,71

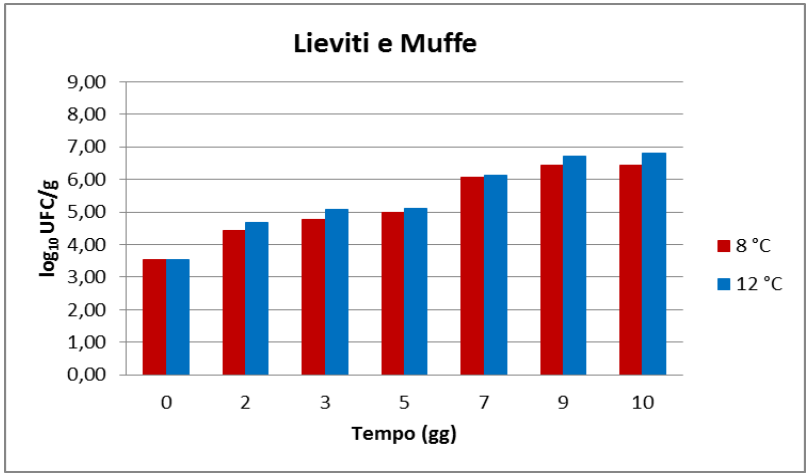
Condizioni favorevoli per la crescita di *L. monocytogenes*

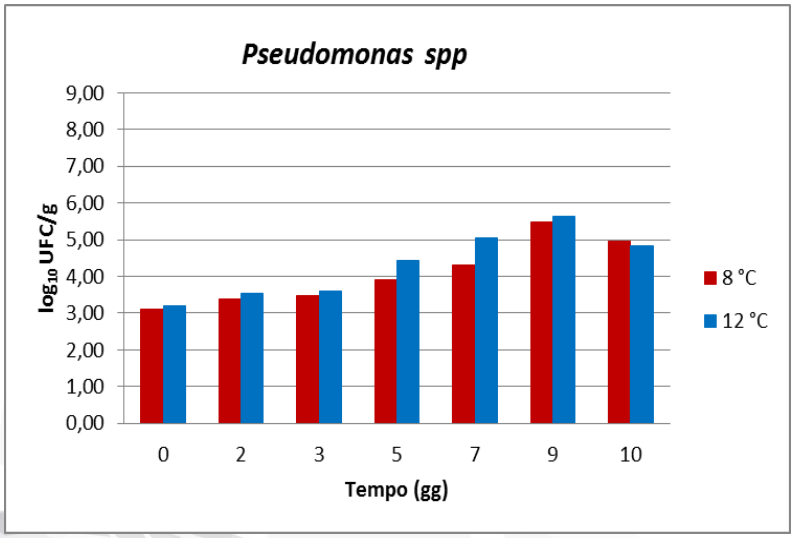


Incremento della **CBMT**

Risultati







Flora alterante:

Incremento graduale delle ***Enterobacteriaceae***, di **Lieviti e Muffe** e di ***Pseudomonas spp.***

Micrococcaceae, **Stafilococchi coagulasi positivi** e ***Bacillus cereus*** (<10 UFC/g).

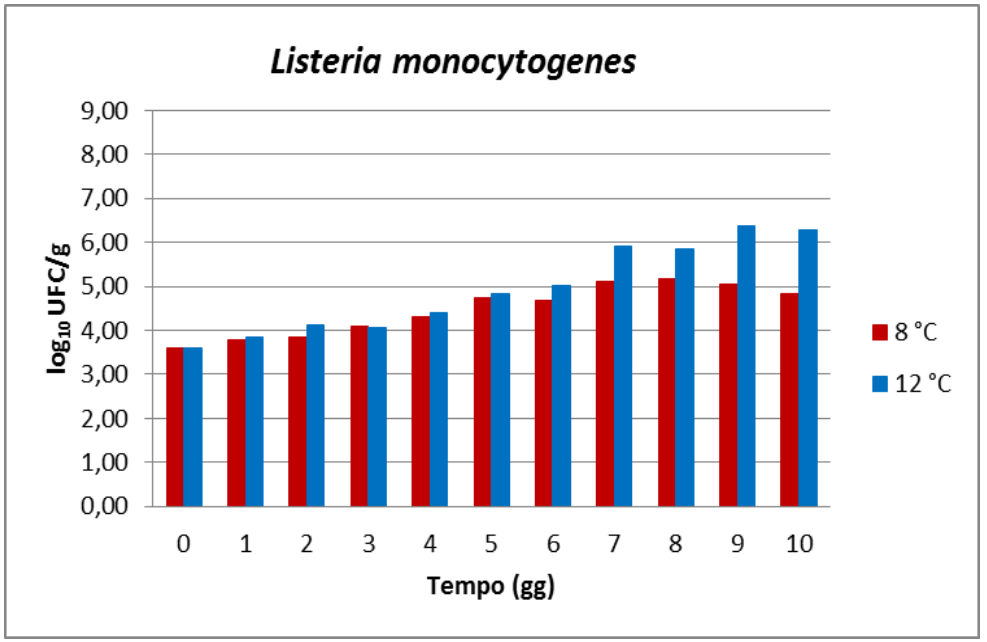
Risultati

Graduale incremento di ***L. monocytogenes***

Valore massimo:

8°C = 5,20 log_{10}UFC/g (T8)

12°C = 6,43 log_{10}UFC/g (T9)



8° gradi il μ_{max}

0.0104 ± 0.00184 log_{10}UFC/g

12° gradi il μ_{max}

0.018 ± 0.00223 log_{10}UFC/g

L'incremento orario in log_{10} UFC/g

Giorni	*L. monocytogenes* (δ)			
	8°C		12°C	
	log10UFC/g	δ	log10UFC/g	δ
T0	3,29		3,29	
T6	4,67	1,38	5,02	1,73
T10	5,02	1,73	6,29	3,00

Potenziale di crescita (δ) di *Listeria monocytogenes* durante il periodo di conservazione a T6 (shelf life) e a T10 (fine sperimentazione) nei lotti contaminati

Conclusioni

- Lo studio condotto contribuisce sia alla definizione delle caratteristiche della microflora che identifica le prassi igieniche di lavorazione del prodotto di IV gamma, sia a valutare l'andamento di *L. monocytogenes* durante la conservazione a due diverse T (8°C e 12°C).

- La lattuga iceberg supporta la crescita di *L. monocytogenes* (δ>0.5) ed è auspicabile che tale prodotto sia conservato a non più di 8°C (inclusa la fase di vendita), per un periodo non superiore a 6 giorni (sua shelf life) dalla data di produzione (imbrunimenti).

- Effettuare studi di challenge test relativi a prodotti RTE permette di generare dati per la produzione e la validazione di modelli predittivi che rappresentano un valido strumento da impiegare nelle attività di analisi del rischio.

IZSAM G.CAPORALE TERAMO

Grazie per l'attenzione