



 *Listeria monocytogenes*
Laboratorio Nazionale di Riferimento

Il Laboratorio Nazionale di Riferimento per la *Listeria monocytogenes*

Teramo, 14 dicembre 2017

Centro Internazionale per la Formazione e l'Informazione Veterinaria "Francesco Gramenzi"

Listeria monocytogenes in salmone affumicato:
Valutazione della dinamica di concentrazione nel
corso di challenge test



Damiano Comin
SCS 8 – Valorizzazione delle Produzioni Alimentari

IZS delle Venezie

Sicurezza alimentare

SCS1 – Analisi del rischio e sorveglianza in sanità pubblica

- Laboratorio controlli ufficiali
- Laboratorio patogeni alimentari e antibiotico-resistenza
- Piattaforma biomolecolare (Biofood)
- U.O. Analisi del rischio
- U.O. Ecologia microbica
- U.O. Piattaforma nanofood

SCS8 – Valorizzazione delle Produzioni Alimentari

- Laboratorio Tecnologie Alimentari (Vicenza)
- Laboratorio Tecnologie Alimentari (San Donà di Piave)
- Centro Servizi alla Produzione (Legnaro)
- Laboratorio Chimica Sperimentale (Vicenza)

► B **REGOLAMENTO (CE) N. 2073/2005 DELLA COMMISSIONE**
del 15 novembre 2005
sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari
(Testo rilevante ai fini del SEE)
(GU L 338 del 22.12.2005, pag. 1)

Modificato da:

		Gazzetta ufficiale		
		n.	pag.	data
► <u>M1</u>	Regolamento (CE) n. 1441/2007 della Commissione del 5 dicembre 2007	L 322	12	7.12.2007
► <u>M2</u>	Regolamento (UE) n. 365/2010 della Commissione del 28 aprile 2010	L 107	9	29.4.2010
► <u>M3</u>	Regolamento (UE) n. 1086/2011 della Commissione del 27 ottobre 2011	L 281	7	28.10.2011
► <u>M4</u>	Regolamento (UE) n. 209/2013 della Commissione dell'11 marzo 2013	L 68	19	12.3.2013
► <u>M5</u>	Regolamento (UE) n. 1019/2013 della Commissione del 23 ottobre 2013	L 282	46	24.10.2013
► <u>M6</u>	Regolamento (UE) n. 217/2014 della Commissione del 7 marzo 2014	L 69	93	8.3.2014

Rettificato da:

- C1 Rettifica, GU L 278 del 10.10.2006, pag. 32 (2073/2005)

ALLEGATO I

Criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari

Capitolo 1.	Criteri di sicurezza alimentare
Capitolo 2.	Criteri di igiene del processo
2.1.	Carne e prodotti a base di carne
2.2.	Latte e prodotti lattiero-caseari
2.3.	Prodotti a base di uova
2.4.	Prodotti della pesca
2.5.	Ortaggi, frutta e prodotti derivati
Capitolo 3.	Norme per il campionamento e per la preparazione dei campioni da analizzare
3.1.	Norme generali per il campionamento e la preparazione dei campioni da analizzare
3.2.	Campionamento batteriologico nei macelli e nei luoghi di produzione di carne macinata e preparazioni a base di carne
3.3.	Norme di campionamento per germogli

REGOLAMENTO (CE) N. 2073/2005 DELLA COMMISSIONE

del 15 novembre 2005

sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari

(Testo rilevante ai fini del SEE)

(GU L 338 del 22.12.2005, pag. 1)

Capitolo 1. Criteri di sicurezza alimentare

Categoria alimentare	Microrganismi/loro tossine, metaboliti	Piano di campionamento (1)		Limiti (2)		Metodo d'analisi di riferimento (3)	Fase a cui si applica il criterio
		n	c	m	M		
1.1. Alimenti pronti per lattanti e alimenti pronti a fini medici speciali (4)	<i>Listeria monocytogenes</i>	10	0	Assente in 25 g		EN/ISO 11290-1	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
1.2. Alimenti pronti che costituiscono terreno favorevole alla crescita di <i>Listeria 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
1.3. Alimenti pronti che non costituiscono terreno favorevole alla crescita di <i>Listeria 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

- (9) Prove regolari relative a questo criterio non sono richieste in circostanze normali per i seguenti alimenti pronti:
- 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 dolciumi, compresi i prodotti a base di cacao e cioccolato,
 - molluschi bivalvi vivi,
- M2 — sale alimentare. ◀

(5) Questo criterio 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.

(6) 1 ml di inoculo viene posto su una piastra di Petri di 140 mm di diametro o su tre piastre di Petri di 90 mm di diametro.

(7) Questo criterio 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.

(8) I prodotti con $\text{pH} \leq 4,4$ o $a_w \leq 0,92$, i prodotti con $\text{pH} \leq 5,0$ e $a_w \leq 0,94$, i prodotti con un periodo di conservabilità inferiore a 5 giorni sono automaticamente considerati appartenenti a questa categoria. Anche altri tipi di prodotti possono appartenere a questa categoria, purché vi sia una giustificazione scientifica.

Regolamento (CE) 2073/2005

Listeria monocytogenes

Prodotti pronti per il consumo

$\text{pH} \leq 4.4$ o $a_w \leq 0.92$
 $\text{pH} \leq 5.0$ e $a_w \leq 0.94$
Shelf-life < 5 giorni



Alimenti Ready-to-eat che **NON costituiscono** terreno favorevole alla crescita di *L. monocytogenes*
Limite di 100 cfu/g

$\text{pH} > 4.4$ o $a_w > 0.92$
 $\text{pH} > 5.0$ e $a_w > 0.94$



Alimenti Ready-to-eat che **costituiscono** terreno favorevole alla crescita di *L. monocytogenes*
a) assenza in 25g
b) 100 cfu/g

Regolamento (CE) 2073/2005

Listeria monocytogenes

Prodotti pronti per il consumo

Alimenti Ready-to-eat
che **costituiscono**
terreno favorevole
alla crescita di
Listeria
monocytogenes

$n = 5$ $c = 0$
assenza in 25g

$n = 5$ $c = 0$
100 cfu/g

Questo criterio si applica se l'OSA è in grado di dimostrare, con soddisfazione dell'autorità competente, che il prodotto non supererà il limite di 100 cfu/g per tutta la durata della sua shelf-life.

del 15 novembre 2005

sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari

(Testo rilevante ai fini del SEE)

▼B

Articolo 3

Prescrizioni generali

1. Gli operatori del settore alimentare provvedono a che i prodotti alimentari siano conformi ai relativi criteri microbiologici fissati nell'allegato I del presente regolamento. A tal fine, gli operatori del settore alimentare adottano provvedimenti, in ogni fase della produzione, della lavorazione e della distribuzione, inclusa la vendita al dettaglio, nell'ambito delle loro procedure HACCP e delle loro prassi corrette in materia d'igiene, per garantire che:

a) la fornitura, la manipolazione e la lavorazione delle materie prime e dei prodotti alimentari che dipendono dal loro controllo si effettuino nel rispetto dei criteri di igiene del processo;

b) i criteri di sicurezza alimentare applicabili per l'intera durata del periodo di conservabilità dei prodotti possano essere rispettati a condizioni ragionevolmente prevedibili di distribuzione, conservazione e uso.

2. Se necessario, gli operatori del settore alimentare responsabili della fabbricazione del prodotto effettuano studi, in conformità all'allegato II, per verificare se i criteri sono rispettati per l'intera durata del periodo di conservabilità. 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.

Gli operatori del settore alimentare possono condurre gli studi suddetti in collaborazione tra loro.

Linee guida per la realizzazione di tali studi possono essere incluse nei manuali di buona prassi igienica di cui all'articolo 7 del regolamento (CE) n. 853/2004.

del 15 novembre 2005

sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari

(Testo rilevante ai fini del SEE)

(GU L 338 del 22.12.2005, pag. 1)

2005R2073 — IT — 01.06.2014 — 005.001 — 37

▼B

ALLEGATO II

Gli studi di cui all'articolo 3, paragrafo 2, comprendono:

- prove per determinare le caratteristiche fisico-chimiche del prodotto, quali pH, a_w , 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,
- consultazione della letteratura scientifica disponibile e dei dati di ricerca sulle caratteristiche di sviluppo e di sopravvivenza dei microrganismi in questione.

Se necessario, in base agli studi summenzionati, l'operatore del settore alimentare effettua studi ulteriori, che possono comprendere:

- modelli matematici predittivi stabiliti per il prodotto alimentare in esame, utilizzando fattori critici di sviluppo o di sopravvivenza per i microrganismi in questione presenti nel prodotto,
- prove per determinare la capacità dei microrganismi in questione, debitamente inoculati, di svilupparsi o sopravvivere nel prodotto in diverse condizioni di conservazione ragionevolmente prevedibili,
- studi per valutare lo sviluppo o la sopravvivenza dei microrganismi in questione che possono essere presenti nel prodotto durante il periodo di conservabilità, in condizioni ragionevolmente prevedibili di distribuzione, conservazione e uso.

Gli studi summenzionati tengono conto della variabilità intrinseca in funzione del prodotto, dei microrganismi in questione e delle condizioni di lavorazione e conservazione.

EN

SANCO/1628/2008 ver. 4 (26062008)

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES

Brussels,

C(2008)

WORKING DOCUMENT

Draft

Guidance document

on conducting studies in order to investigate the compliance of ready-to-eat foods that are able to support the growth of *Listeria monocytogenes* with the criteria for *L. monocytogenes* throughout their shelf-life

This document does not necessarily represent the opinion of the Commission

This document has been established for information purposes only. It has not been adopted or in any way approved by the European Commission.

The European Commission does not guarantee the accuracy of the information provided, nor does it accept responsibility for any use made thereof. Users should therefore take all necessary precautions before using this information, which they use entirely at their own risk.

PURPOSE OF THIS DOCUMENT

This document is mainly directed at Food Business Operators who produce ready-to-eat foods and conduct *Listeria* shelf-life studies for them in accordance with Article 3(2) and Annex II of Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs.



Bruxelles, XXXX
SANCO/11510/2013
(POOL/G4/2013/11510/11510-EN.doc)
[...] (2013) XXXX draft

DOCUMENTO DI LAVORO DEI SERVIZI DELLA COMMISSIONE

DOCUMENTO DI ORIENTAMENTO

concernente gli studi sulla durata di vita della *Listeria monocytogenes* negli alimenti pronti, in applicazione del regolamento (CE) n. 2073/2005, del 15 novembre 2005, sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari



AGENCE FRANÇAISE
DE SÉCURITÉ SANITAIRE
DES ALIMENTS



EU COMMUNITY REFERENCE LABORATORY FOR
LISTERIA MONOCYTOGENES

WORKING DOCUMENT

Version 2 – November 2008

TECHNICAL GUIDANCE DOCUMENT

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

Annie BEAUFORT, Marie CORNU, Hélène BERGIS, Anne-Laure LARDEUX, Unit Quantitative Microbiology and Risk Assessment, Bertrand LOMBARD, CRL Coordinator AFSSA-LERQAP, CRL for *Listeria monocytogenes*, Maisons-Alfort, France

In collaboration with representatives of 6 National Reference Laboratories for *Listeria monocytogenes*:

Caroline DE BACKER, National Reference Laboratory for Food Microbiology, University of Liège, Belgium;
Ife FITZ-JAMES, Laboratory of the Food and Consumer Product Safety Authority (VWA), Zutphen, The Netherlands;
Bernadette HICKEY, Department of Agriculture, Fisheries & Food Laboratories (Dairy Science Laboratory), Co Kildare, Ireland;
Taran SKJERDAL and Semir LONCAREVIC, National Veterinary Institute, Oslo, Norway;
Andrei NICOLAU, Institute for Hygiene and Veterinary Public Health, Bucharest, Romania;
Suzanne THISTED-LAMBETZ, National Food Administration, Livsmedelsverket (SLV), Uppsala, Sweden;
and of a 7th laboratory:
Roy BETTS, Campden & Chorleywood Food Research Association, Gloucestershire, United Kingdom.



EURL Lm
European Union Reference Laboratory for
Listeria monocytogenes

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, Hélène 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 Prencepe, 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);
- Celcídima Maria Pires Gomes, Instituto Nacional De Investigação Agrária e Veterinária (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.

And in collaboration with a representative of another laboratory: Gail Betts, Campden & Chorleywood Food Research Association, Gloucestershire, United Kingdom (for the UK-NRL).

1/47

TGD Lm shelf-life studies
EURL *Listeria monocytogenes*

06/06/2014



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

TABLE OF CONTENT

1	Introduction.....	3
1.1	Context	3
1.2	Growth comparison.....	4
1.2.1	Strain variability at low temperature.....	4
1.2.2	Strain variability at low pH.....	6
1.2.3	strain variability at low water activity.....	7
2	Constitution of a set of <i>Listeria monocytogenes</i> strains for conducting challenge test....	8
2.1	Criteria for the selection of the strains	8
2.2	Characterisation of the set	8
2.3	Comparison of the set of <i>Listeria monocytogenes</i> strains to standard <i>Listeria monocytogenes</i> strains.....	13
2.4	Challenge tests assessing maximum growth rate of <i>Listeria monocytogenes</i> strains in food matrices.....	16
2.4.1	Material and method	16
2.4.2	Results for Challenge tests assessing maximum growth rate of <i>Listeria monocytogenes</i> strains in French custard.....	17
2.4.3	Results for Challenge tests assessing maximum growth rate of <i>Listeria monocytogenes</i> strains in tuna rillettes.....	18
3	Conclusion.....	20
4	References.....	21



Teramo,

17 DIC. 2014

SETTORE LAOA

PROTOCOLLO 17263

Dott. Damiano Comin
Istituto Zooprofilattico Sperimentale
delle Venezie
Sezione Territoriale di San Donà di
Piave Via Calvecchia, 10
30027 San Donà di Piave (VE)

OGGETTO: Invio ceppi di *Listeria monocytogenes*

In seguito alla richiesta pervenuta per le vie brevi, si inviano 25 ceppi di *Listeria monocytogenes* selezionati dal Laboratorio Europeo di Riferimento per *Listeria monocytogenes* (EURL Lm), da utilizzare nell'esecuzione di studi di challenge test secondo quanto previsto dal documento tecnico "EURL Lm Technical Document for conducting shelf-life studies on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods, version 3, June 2014" (<http://nr.izs.it/listeria/>). Le informazioni per ogni ceppo, comunicate dall'EURL, sono riportate in allegato.

Si invia altresì l'elenco dei ceppi inviati, con le caratteristiche comunicate dall'EURL Lm. Eventuali richieste e chiarimenti possono essere indirizzati al Laboratorio Nazionale di Riferimento per *Listeria monocytogenes*, all'attenzione del Dott. Francesco Pomilio, e-mail listeria@izs.it, tel. 0861/332462-465.

Distinti saluti

GM/

IL DIRETTORE SANITARIO

Giovanni Savini

Data sheet related to the EURL Lm set of *Listeria monocytogenes* strains

Strain reference	Number of stock culture agar tubes
12MOB045LM	1
12MOB046LM	1
12MOB047LM	1
12MOB048LM	1
12MOB049LM	1
12MOB050LM	1
12MOB051LM	1
12MOB052LM	1
12MOB053LM	1
12MOB079LM	1
12MOB085LM	1
12MOB089LM	1
12MOB096LM	1
12MOB098LM	1
12MOB099LM	1
12MOB100LM	1
12MOB101LM	1
12MOB102LM	1
12MOB103LM	1
12MOB104LM	1
12MOB105LM	1
12MOB106LM	1
12MOB107LM	1
12MOB112LM	1
12MOB118LM	1

Stock culture agar tubes are stored at 3°C after reception.

Strains set: EURL		Genoserotype: II	
Name: <i>Listeria monocytogenes</i>		Date of isolation: 21/06/2011	
Type of microorganism: bacteria		Culture medium: agar <i>Listeria</i> according to Ottaviani and Agosti	
Strain reference: 12MOB045LM		Temperature: 37°C	
Origin: meat products		Atmosphere of incubation: air	
Geographical origin: France			
Growth parameters	At 8°C pH 7 a _w 0.98	At 20°C pH 5 a _w 0.98	At 20°C pH 7 a _w 0.95
Maximum growth rate (h ⁻¹)	0.092±0.000	0.184±0.010	0.137±0.170
Bibliography: Begot et al, 1997 (strain named Lm P.1)			

Strains set: EURL		Genoserotype: II	
Name: <i>Listeria monocytogenes</i>		Date of isolation: 21/06/2011	
Type of microorganism: bacteria		Culture medium: agar <i>Listeria</i> according to Ottaviani and Agosti	
Strains set reference: 12MOB046LM		Temperature: 37°C	
Origin: meat products		Atmosphere of incubation: air	
Geographical origin: France			
Growth parameters	At 8°C pH 7 a _w 0.98	At 20°C pH 5 a _w 0.98	At 20°C pH 7 a _w 0.95
Maximum growth rate (h ⁻¹)	0.089±0.000	0.176±0.010	0.132±0.090
Bibliography: Begot et al, 1997 (strain named Lm 27795)			

Strains set: EURL		Genoserotype: II	
Name: <i>Listeria monocytogenes</i>		Date of isolation: 21/06/2011	
Type of microorganism: bacteria		Culture medium: agar <i>Listeria</i> according to Ottaviani and Agosti	
Strains set reference: 12MOB047LM		Temperature: 37°C	
Origin: other products		Atmosphere of incubation: air	
Geographical origin: France			
Growth parameters	At 8°C pH 7 a _w 0.98	At 20°C pH 5 a _w 0.98	At 20°C pH 7 a _w 0.95
Maximum growth rate (h ⁻¹)	0.089±0.000	0.184±0.010	0.123±0.119
Bibliography: Begot et al, 1997 (strain named Lm 4)			

Valutazione degli studi di shelf-life

Con soddisfazione dell'autorità competente....



Maisons-Alfort laboratory for
food safety



EURL Lm
European Union Reference Laboratory for
Listeria monocytogenes

Guidance document to evaluate the competence of laboratories implementing challenge tests on the growth potential of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods

Version 0 – 03/02/2012

Annie BEAUFORT, H el ene BERGIS, Laurent GUILLIER, Anne-Laure LARDEUX (Unit Modelling of bacterial behaviours),

Bertrand LOMBARD, EURL Manager

Guidance document to evaluate the competence of laboratories implementing challenge tests on the growth potential of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods

Version 0 – 03/02/2012

Annie BEAUFORT, H  l  ne BERGIS, Laurent GUILLIER, Anne-Laure LARDEUX (Unit
Modelling of bacterial behaviours),

Bertrand LOMBARD, EURL Manager

In collaboration with the representatives of 12 National Reference Laboratories for
Listeria monocytogenes:

Marie POLET	Institute of Public Health, Belgium;
Nadine BOTTELDOORN	Institute of Public Health, Belgium;
George PAPAGEORGIOU	Food Microbiology Laboratory – State General Laboratory, Cyprus;
Hana BULAWOVA	Department of Food – State Veterinary Institute, Czech Republic;
Jens KIRK ANDERSEN	National Food Institute – Technical University of Denmark;
Bernadette HICKEY	Dairy Science Laboratory, Ireland;
Gita TUPE	Institute of Food Safety – Animal Health and Environment, Latvia;
Taran SKJERDAL	Norwegian Veterinary Institute – Section Feed and Food Microbiology, Norway;
Celc��dina PIRES GOMES	Laborat��rio Nacional de Investiga��o Veterin��ria, Portugal;
Majda BIASIZZO	University of Ljubljana – Veterinary faculty – National Veterinary Institute, Slovenia;
Cristina ACEBAL SARABIA	Agencia Espa��ola de Seguridad Alimentar y Nutrici��n – Centro Nacional de Alimentaci��n, Spain;
Susanne THISTED-LAMBERTZ	National Food Administration, Sweden;
Ife FITZ-JAMES	Laboratory of Food and Consumer Product Safety Authority, the Netherlands.

EURL Lm Guidance Document to evaluate the competence of laboratories implementing challenge tests and durability studies related to *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods

Version 2 – 17 January 2017

H  l  ne BERGIS, Unit Salmonella, *E. coli*, *Listeria*

Bertrand LOMBARD, EURL Lm Manager

ANSES- Laboratory for Food Safety, Maisons-Alfort location,

EURL for *Listeria monocytogenes*, France

In collaboration with representatives of 7 National Reference Laboratories for *Listeria monocytogenes*:

Marie Polet	Institute of Public Health, Belgium
Jens Kirk Andersen	National Food Institute – Technical University of Denmark
Bernadette Hickey	Dairy Science Laboratory, Department of Agriculture, Food and the Marine, Ireland
Francesco Pomilio	Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise, Italy
Taran Skjerdal	Norwegian Veterinary Institute – Section Feed and Food Microbiology, Norway
Elzbieta Mackiewicz	National Institute of Public Health - National Institute of Hygiene, Poland
Paul in't Veld	Food and Consumer Product Safety Authority, The Netherlands.

Le possibili strategie di gestione di *Listeria monocytogenes*...

Brussels, XXXX
SANCO/11510/2013
(POOL/G4/2013/11510/11510-EN.doc)
[...](2013) XXXX draft

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

EN

EN

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, Hélène 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 Investigação Agrária e Veterinária
(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.

And in collaboration with a representative of another laboratory: Gail Betts, Campden & Chorleywood
Food Research Association, Gloucestershire, United Kingdom (for the UK-NRL).

1/47

TGD Lm shelf-life studies
EURL *Listeria monocytogenes*

06/06/2014

Contents

1.	Introduction and purpose	5
2.	EU legislation and existing national or industry guidance documents	6
2.1.	Microbiological food safety criteria for <i>Listeria monocytogenes</i>	6
2.2.	Microbiological criteria in relation to the hygiene control measures and HACCP	7
2.3.	Relationship between this guidance document and other established guidance	8
3.	Principles and procedures for shelf-life studies	9
3.1.	General	9
3.2.	Product characteristics and scientific literature.....	12
3.2.1.	Product characteristics	12
3.2.2.	Scientific literature	12
3.3.	Historical data	13
3.4.	Predictive microbiology (modelling)	14
3.4.1.	General	14
3.4.2.	Practical application of predictive microbiology	15
3.5.	Specific laboratory shelf-life studies to investigate the compliance with the criteria for <i>Listeria monocytogenes</i> in ready-to-eat foods throughout the shelf-life.....	16
3.5.1.	General	16
3.5.2.	Durability studies	16
3.5.3.	Challenge tests	17
3.6.	Shelf-life evaluation combining the different tools available	20
3.7.	Collaboration between food businesses	22
4.	Documentation of the shelf-life studies	23
5.	Annexes	24
5.1.	Definitions	24
5.2.	Examples for the necessary steps for decision of the shelf-life studies	26
5.3.	Example on the use of predictive microbiology	29
5.4.	Examples for the shelf-life evaluation using the approach combining different tools available	30
5.5.	Reference list to some existing guidance documents.....	36

Caratteristiche del prodotto e letteratura scientifica

Table 1. Selected factors having impact on the growth and survival of *L. monocytogenes*^a

Factor	Can Grow ^b			Can Survive (But No Growth) ^c
	Lower growth limit	Optimum	Upper growth limit	
Temperature (°C)	-1.5 to +3.0	30.0 to 37.0	45.0	-18.0
pH ^d	4.2 to 4.3	7.0	9.4 to 9.5	3.3 to 4.2
Water Activity (a _w)	0.90 to 0.93	0.99	> 0.99	< 0.90
Salt Concentration (%) ^e	< 0.5	0.7	12 – 16	≥ 20
Atmosphere	Facultative anaerobe (it can grow in the presence or absence of oxygen, e.g. in a vacuum or modified atmosphere package)			
Heat treatment during food processing	A temperature/time combination e.g. of 70 °C and 2 min is required for a D-6 (i.e. 10 ⁶ or 6 decimal) reduction in numbers of <i>L. monocytogenes</i> cells. Other temperature/time combinations may also provide the same reduction.			

^a The limits for growth and survival of *L. monocytogenes* presented in this table are based on research carried out primarily in laboratory media under optimum conditions and should only be used as estimates for the impact in foods.

^b Optimum indicates when the growth of *L. monocytogenes* is fastest.

^c Survival period will vary depending on nature of food and other factors.

^d Inhibition of *L. monocytogenes* is dependent on type of acid present.

^e Based on percent sodium chloride, water phase.

Dati storici

I dati storici sono l'insieme delle registrazioni che un'impresa alimentare conserva come parte della sua attività corrente.

- **indicano i livelli di *L. monocytogenes* trovati** nell'ambiente di produzione, nelle materie prime e nei prodotti alimentari pronti, nelle correnti pratiche GHP e HACCP utilizzate dagli operatori,
- **possono essere utilizzati per valutare il potenziale di crescita** di *L. monocytogenes* in alimenti simil-pronti con caratteristiche intrinseche comparabili (pH, aw, microflora, ecc) prodotti in condizioni praticamente identiche,
- **consentono di verificare la conservabilità del prodotto** confermare che la vita commerciale fissata resti adeguata durante lo stoccaggio, la manipolazione e l'uso ragionevoli,

Dati storici

Lo storico dei dati generati nel corso di un periodo di tempo per alimenti pronti comparabili e che continua ad essere generato su basi evolutive può essere **utilizzato per l'analisi delle tendenze**.

Laddove i livelli di *L. monocytogenes* in alimenti pronti alla fine della vita commerciale sono considerevolmente bassi o assenti e non sono stati ottenuti risultati superiori ai 100 ufc/g, **tali dati possono essere utilizzati in combinazione con i dati derivanti dai campionamenti effettuati nelle aree di lavorazione e sulle attrezzature e sulla qualità delle materie prime per dare un sufficiente livello di sicurezza** che tali alimenti pronti non rappresentano un rischio per la salute pubblica.

Dati storici

Il livello di fiducia aumenta con la **quantità** di dati disponibili. Più prodotti vengono testati più i dati storici diventano affidabili.

L'OSA deve soddisfare l'autorità competente (AC) in modo che i suoi dati storici siano sufficienti a dimostrare che il limite di 100 ufc/g non sarà superato durante la vita commerciale. **L'AC può richiedere che tali dati siano integrati con ulteriori studi, ad esempio, con studi di laboratorio sulla conservabilità**

Microbiologia Predittiva (modellizzazione)

- Alcuni modelli sono basati su dati ottenuti dai terreni liquidi impiegati in microbiologia e sono utilizzati per descrivere il possibile impatto di diversi fattori.
- Alcuni di questi modelli possono sbagliare nel descrivere accuratamente il comportamento microbico negli alimenti, anche se i modelli di questo tipo più convincenti sono stati convalidati sui prodotti alimentari.
- I modelli relativi agli alimenti possono descrivere efficacemente l'impatto delle condizioni di magazzinaggio su un determinato alimento, **ma è discutibile** la loro capacità di descrivere l'impatto della variabilità delle caratteristiche fisico-chimiche dell'alimento o di fare previsioni in altri alimenti.
- Alcuni approcci intermedi sono stati elaborati cercando di superare i limiti dei due approcci principali.

Microbiologia Predittiva (modellizzazione)

- A dispetto delle limitazioni, i modelli predittivi restano **validi strumenti** di valutazione della crescita di *L. monocytogenes* negli alimenti, **se le condizioni sono note**.
- **Modelli di crescita/non crescita** che prevedono la probabilità di crescita di *L. monocytogenes* negli alimenti possono aiutare gli OSA a classificare i loro prodotti alimentari.
- **Modelli di previsione dei tempi di latenza e del tasso di crescita** microbica negli alimenti possono aiutare gli OSA a valutare la crescita di *L. monocytogenes* negli alimenti durante la loro conservazione, tenendo conto della variabilità del ceppo, della lavorazione attinente, della variabilità nei prodotti alimentari e delle condizioni di stoccaggio.
- **modelli di microbiologia predittiva devono essere usati con cautela e utilizzati solo da personale formato ed esperto che ne comprenda le limitazioni e le condizioni d'uso.**

Microbiologia Predittiva (modellizzazione)

Alcuni modelli ampiamente riconosciuti, comunemente utilizzati e liberamente disponibili sono:

➤ **Growth predictor**

Liberamente disponibile presso l'Institute of Food Research, Regno Unito

www.lfr.ac.uk/safety/growthpredictor

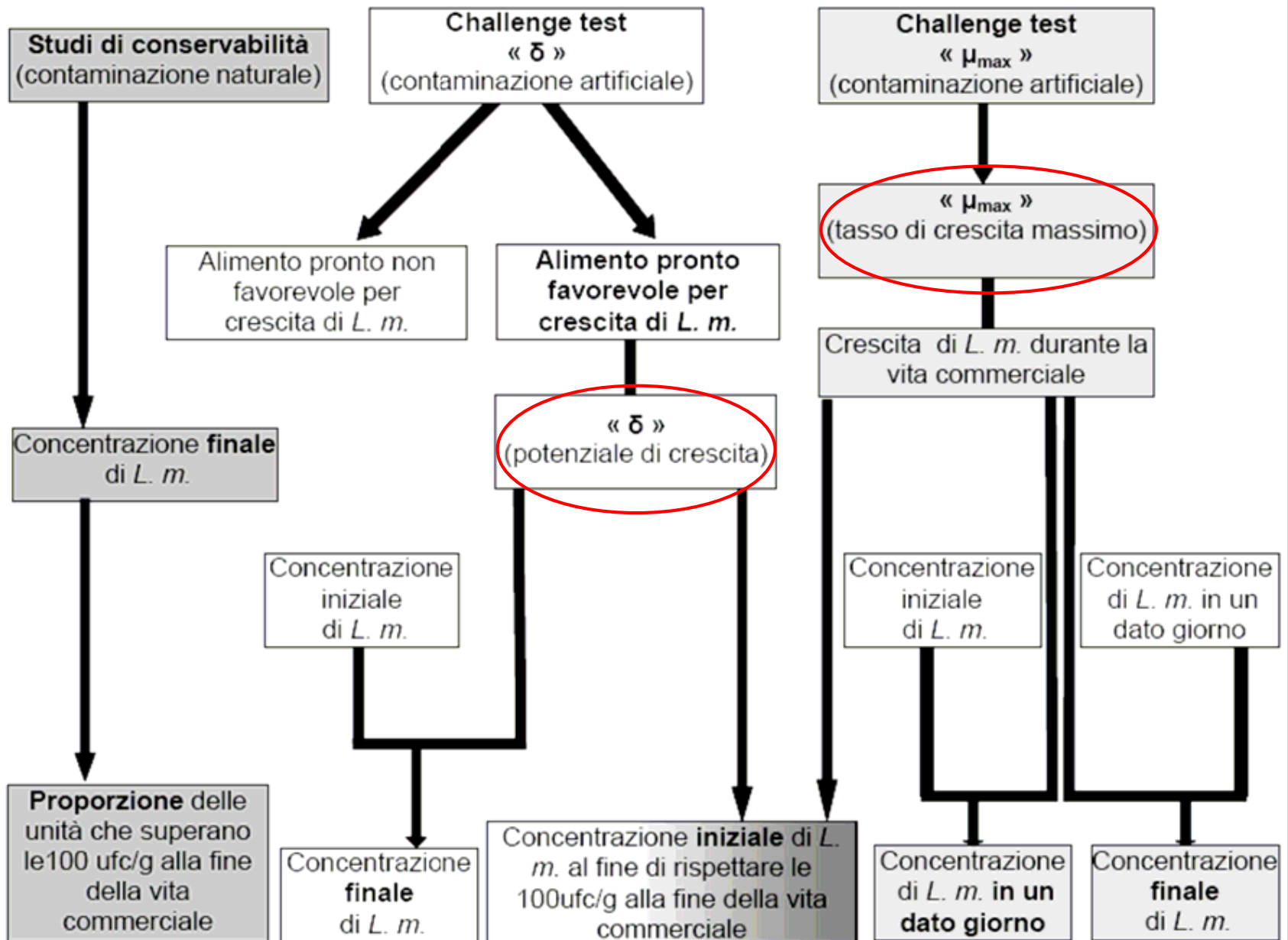
➤ **Pathogen Modelling Programme**

Liberamente disponibile da parte del Dipartimento dell'agricoltura degli Stati Uniti, Servizio di ricerca

<http://ars.usda.gov/Services/docs.htm?docid=6786>).

Altri software sono disponibili in commercio.

Studi di Shelf-life (conservabilità e challenge tests)



Studi di conservabilità

Scopo e limiti degli studi di conservabilità

- Gli studi di conservabilità consentono la **valutazione della crescita di *L. monocytogenes* in un alimento contaminato naturalmente** durante il suo stoccaggio nelle condizioni ragionevolmente prevedibili.
- Gli studi di conservabilità sono **più realistici dei challenge tests** in quanto la contaminazione è naturale (possono essere uno o più ceppi), tiene conto dei danni o delle sollecitazioni, della distribuzione e della concentrazione iniziale della *L. monocytogenes*.
- Il numero relativamente basso di prodotti alimentari contaminati con *L. monocytogenes*, il basso grado di contaminazione iniziale e la sua distribuzione non uniforme, rendono **difficile l'interpretazione dei risultati** degli studi di conservabilità.
- Pertanto, **può essere necessario l'uso di altri strumenti, come il challenge test.**

Challenge tests

I challenge tests hanno lo scopo di fornire informazioni sul comportamento di *L. monocytogenes* inoculata artificialmente in un prodotto alimentare prima dello stoccaggio in determinate condizioni.

Questi test possono essere attuati per due scopi:

- per valutare il potenziale di crescita
- per stimare i parametri di crescita (es: tasso di crescita massimo).

I challenge tests possono prendere in considerazione la variabilità dei prodotti alimentari (utilizzando diverse partite), la specifica contaminazione dell'alimento (inoculando ceppi isolati dall'alimento), anche se il livello di contaminazione, l'eterogeneità della contaminazione e lo stato fisiologico dei batteri sono difficili da imitare

Challenge tests

valutazione del potenziale di crescita (δ)

Il potenziale di crescita (δ) è la differenza tra il \log_{10} ufc/g alla fine del prova e il \log_{10} ufc/g all'inizio della prova.

valutazione del tasso di crescita massimo (μ_{max})

Per la crescita esponenziale, interpolando il logaritmo naturale del numero di cellule con il tempo si produce una linea retta. La pendenza di questa linea è il tasso di crescita massimo (μ_{max}) del batterio

Challenge tests

valutazione del potenziale di crescita (δ)

consentono:

- la **classificazione** degli alimenti in "Alimenti pronti che **costituiscono** terreno favorevole alla crescita di *L. monocytogenes*, "o" "alimenti pronti che **non costituiscono** terreno favorevole alla crescita di *L. monocytogenes*"
- **quantificazione del comportamento** di *L. monocytogenes* in un prodotto alimentare in rispondenza alle condizioni ragionevolmente prevedibili, **tra la produzione e il consumo** (es. il calcolo della concentrazione alla fine della vita commerciale rispetto alla concentrazione iniziale, o la determinazione della concentrazione all'inizio della vita commerciale al fine di rispettare il limite di 100 ufc/g al termine della vita commerciale).

Challenge tests

valutazione del tasso di crescita massimo (μ_{max})

consentono:

- la determinazione della concentrazione di *L. monocytogenes* in un determinato giorno della vita commerciale, se la concentrazione iniziale è nota
- la determinazione della massima concentrazione di *L. monocytogenes* che può essere presente nella fase di produzione al fine di ripetere il limite di 100 ufc/g al termine della vita commerciale.

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 Investigação Agr aria e Veterin aria (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.

And in collaboration with a representative of another laboratory: Gail Betts, Campden & Chorleywood Food Research Association, Gloucestershire, United Kingdom (for the UK-NRL).

Challenge test

Il presente documento descrive le procedure microbiologiche per determinare la crescita di *L. monocytogenes* utilizzando **challenge test** e **studi di conservabilità** nel quadro applicativo del Regolamento (CE) n. 2073/2005.

Le procedure microbiologiche descritte sono le seguenti:

➤ challenge tests

-valutazione del potenziale di crescita (δ)

-valutazione del tasso di crescita massimo (μ_{max})

➤ studi di conservabilità

L'uso delle informazioni fornite dalle caratteristiche del prodotto, dalla letteratura scientifica e dai dati storici è dettagliato nel documento di orientamento destinato agli OSA.

Challenge test di valutazione del potenziale di crescita (δ)

Il potenziale di crescita (δ) è la differenza tra il log10 delle ufc/g alla fine della prova e il log10 delle ufc/g all'inizio della prova.

Il potenziale di crescita (δ) δ può essere utilizzato:

➤ per classificare un prodotto alimentare:

$\delta > 0,5 \log_{10} \text{ ufc/g}$: Alimenti pronti che **costituiscono terreno favorevole** crescita di *L. monocytogenes* (..) (categoria 1.2)

$\delta \leq 0,5 \log_{10} \text{ ufc/g}$: Alimenti pronti che **non costituiscono** crescita di *L. monocytogenes*, (categoria 1.3)

➤ per quantificare il comportamento di *L. monocytogenes* in un prodotto alimentare di categoria 1.2 definito in base alle condizioni ragionevolmente prevedibili tra produzione e consumo.

➤ per consentire il calcolo di una concentrazione di *L. monocytogenes* in un punto qualsiasi della produzione, **tale da non portare al superamento del livello di 100 ufc/g al termine della vita commerciale**

Challenge test di valutazione del potenziale di crescita (δ)

I principali vantaggi di questo metodo sono:

- è relativamente **semplice da attuare** e
- i **risultati possono essere usati direttamente**

Svantaggi:

- **mancanza di flessibilità in sede di interpretazione:** i risultati sono validi solo per il alimento studiato nelle condizioni allestite, cosicché nuovi esperimenti devono essere eseguiti ogni qualvolta c'è un cambiamento (ad esempio, il ricevimento è cambiato, sono utilizzati diversi profili tempo-temperatura , ...).
- il **potenziale di crescita in genere copre un lungo periodo di tempo** (ad esempio l'intero periodo della vita commerciale) e quindi non può essere usato per predire la crescita nel corso di una frazione di tale periodo di tempo.

Challenge tests di valutazione del tasso di crescita massimo (μ_{max})

- Gli inconvenienti del precedente approccio possono essere risolti mediante la **combinazione dei modelli predittivi di microbiologia e i challenge test di valutazione del tasso di crescita massimo μ_{max}** (tassi di crescita).
- Questi esperimenti sono **più costosi e richiedono più tempo** rispetto al challenge test di valutazione del potenziale di crescita. Essi sono **limitati ai casi in cui la microbiologia predittiva è applicata da laboratori con una formazione specifica.**
- **La temperatura usata per l'esperimento non è (necessariamente) quella utilizzata nelle previsioni** poiché è possibile prevedere la crescita a un'altra temperatura diversa da quella di prova.

Studi di conservabilità

- Gli studi di conservabilità consentono una valutazione della crescita di *L. monocytogenes* negli alimenti contaminati naturalmente durante lo stoccaggio in base alle condizioni ragionevolmente prevedibili.
- Gli studi di conservabilità possono essere considerati **più realistici** per i singoli alimenti **rispetto al challenge test** perché la contaminazione è naturale.
- L'interpretazione dei risultati degli studi di conservabilità può essere difficile a causa della **bassa probabilità** di analizzare un campione contaminato, del **numero molto ridotto inizialmente presente** di *L. monocytogenes* e della **eterogeneità della distribuzione** nell'alimento. In queste situazioni **può essere necessario utilizzare il challenge test per raccogliere le informazioni necessarie a stabilire la vita commerciale e garantire il rispetto di mantenere un livello < 100 ufc/g fino alla fine della vita commerciale del prodotto.**
- Gli studi di conservabilità possono essere utilizzati quando *L. monocytogenes* è **sistematicamente rilevata** nelle verifiche sui prodotti finiti.

Studi di Shelf-life

La scelta delle prove da effettuare dovrebbe essere fatta dall'OSA, con la collaborazione del laboratorio che li condurrà:

- **challenge test di valutazione del δ** potrebbe essere la prova di "prima scelta" nella maggior parte dei casi, soprattutto quando si devono distinguere i prodotti capaci o meno di sostenere la crescita di *L. monocytogenes*.
- l'esecuzione del **challenge test per valutare il μ_{max}** dovrebbe essere considerata soprattutto come prova di "seconda scelta", cioè nei casi specifici in cui possono essere molto utili le informazioni supplementari che si prevede di ottenere. Per interpretare i risultati sono necessarie conoscenze di base sulla microbiologia predittiva.
- gli **studi di conservabilità** sono particolarmente appropriati quando la prevalenza di *L. monocytogenes* è alta.

Challenge test

Per condurre un challenge test devono essere presi in considerazione come minimo i seguenti fattori:

- **caratteristiche del prodotto**
- **vita commerciale** del prodotto,
- numero di **lotti**
- scelta del **ceppo**,
- preparazione dell'**inoculo**
- **preparazione e inoculazione** dell'unità di prova,
- condizioni di **stoccaggio**
- **misurazione delle caratteristiche fisico-chimiche**,
- **analisi microbiologiche**
- **calcolo del potenziale (δ) o del tasso massimo (μ_{max}) di crescita**

Challenge test

3.1 Review of data

Primarily, the FBO is responsible for setting the shelf-life under defined conditions, which should take into account reasonably foreseeable conditions during transportation², storage at retail and at consumer levels.

The FBO should be able to provide the laboratory with the following relevant product information in order to define the experimental challenge testing procedure when a challenge test is needed:

- Description of the product.
- Composition of the RTE food.
- Product characteristics; it is important to note if the values of certain characteristics change during the shelf-life.
- Packaging condition of the end-product.
- The main steps of the production process.
- Characterisation of the cold chain.

Challenge test

➤ Numero di lotti

Studiare 3 diversi lotti di prodotto, e assumere il valore (δ o μ_{max}) più sfavorevole tra quelli ottenuti. Possibile operare su 1 solo lotto se la variabilità interlotto non è significativa

3.2.1.2 Protocol of a challenge test to assess growth potential

a. Number and choice of batches

- Use of a growth/no growth boundary module of a predictive microbiology software

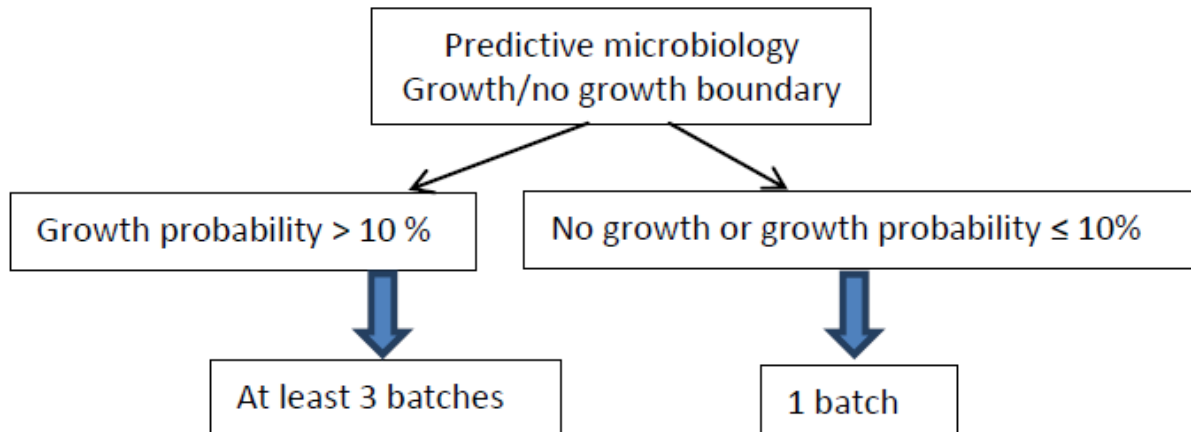


Figure 2: Decision tree for the number of batches in the implementation of a challenge test by using predictive microbiology

Challenge test

➤ Numero di lotti

Studiare 3 diversi lotti di prodotto, e assumere il valore (δ o μ_{\max}) più sfavorevole tra quelli ottenuti. Possibile operare su 1 solo lotto se la variabilità interlotto non è significativa

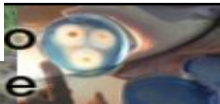
3.2.1.2 Protocol of a challenge test to assess growth potential

a. Number and choice of batches

➤ Use of a calculator to determine the inter-batch variability

The calculator “inter-batch variability” developed by EURL *Lm* and available at <http://www.ansespro.fr/eurl-listeria/index.htm> (see Figure 3) enables one to test the inter-batch variability of the physico-chemical characteristics of the product related to *L. monocytogenes*. It is based on:

- physico-chemical characteristics (pH, a_w) of at least 3 batches;
- storage temperatures;
- cardinal values of the strains: T_{\min} (minimum growth temperature), T_{opt} (optimum growth temperature), pH_{\min} (minimum growth pH), pH_{opt} (optimum growth pH), $a_{w_{\min}}$ (minimum growth a_w), $a_{w_{\text{opt}}}$ (optimum growth a_w).



Laboratory for food safety
Maisons-Alfort location

Circular letter addressed to:

- the Heads of the National Reference Laboratories of the European Union for *Listeria monocytogenes*;

and for information to:

- Pamina SUZUKI and
Eric THÉVENARD
(EC/DG SANTE Unit G4)

Maisons-Alfort, 14/11/2016

EURL Coordination:

- Bertrand LOMBARD, EURL Manager
bertrand.lombard@anses.fr
+33 149 772 000
- Adrien ASSÉRÉ, Deputy EURL Manager
adrien.assere@anses.fr
+33 149 772 749

Subject: Calculator of the Inter-batch physico-chemical variability of the EURL Lm technical guidance document for challenge testing

Dear Colleagues,

We would like to inform you about the changes in the use of the calculator "Inter-batch variability" to determine the number of batches to be tested in a challenge test. This calculator is referred to in the EURL Lm Technical Guidance Document for conducting shelf-life studies on *Listeria monocytogenes* in RTE foods (Version 3 – 6 June 2014).

In the framework of the development of the ISO Standard ISO/DIS 20976-1 "Microbiology of the food chain- Guideline for conducting challenge test of food and feed products- Part 1: Challenge tests to study the growth potential, lag time and maximum growth rate", this calculator has been evaluated by WG 2 « Statistics » of ISO/TC 34/SC9 and minor modifications were made to the Excel calculator following WG 2 comments.

But the main change is the following. When writing a user's guide of this calculator, it has highlighted that the use of this calculation tool is limited to estimating the impact of the inter-batch variability of the physico-chemical parameters (pH and a_w) on the maximum growth rate and not on the growth potential.

The reason is that the proposed method of calculation was not designed to measure the impact of this variability on the growth potential. Other experimental parameters should be considered for this, such as the duration of the experiment and the lag time (physiological state).

Please note that you can find the last version of the calculator (Excel file) and the user's guide in the [homepage](#) of the EURL Lm website.

Don't hesitate to contact Héléne BERGIS for more information.

With best regards,

Bertrand LOMBARD
c/o Laurent LALOIX, Laboratory Director

File followed by:
Hélène BERGIS

Unit:
Salmonella, E. coli, Listeria

Direct line:
+33 149 772 753

E-mail address:
Helene.BERGIS@anses.fr

Ref.:
LIS-Cr-201621L

Challenge test

➤ Scelta dei ceppi

Eseguire il challenge test con almeno 2 ceppi per tener conto delle variazioni di crescita tra i ceppi. Tra i ceppi selezionati uno deve essere un ceppo di riferimento (EURLm), o comunque un ceppo di cui devono essere note le caratteristiche di crescita. Gli altri ceppi devono essere isolati dalla medesima matrice alimentare o da una analoga.



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

Version 0 – 20/12/2013

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

Challenge test

➤ Scelta dei ceppi

Eseguire il challenge test con almeno 2 ceppi per tener conto

Development of a set of *Listeria*

Note: If it is necessary to conduct a challenge test at a pilot scale, non-pathogenic surrogate organisms have to be used. The surrogate being used should demonstrate growth characteristics equal to that of *L. monocytogenes*. For example, *Listeria innocua* can be used as a surrogate for *L. monocytogenes*.

○ Strain storage and characteristics

L. monocytogenes should be stored in the laboratory by a method which minimises or eliminates mutations which may affect their growth or survival characteristics.

Growth, biochemical and serogenotypic characteristics should be checked occasionally.

Challenge test

➤ Preparazione dell'inoculo:

- ✓ coltivare i ceppi come da linea guida
- ✓ limitare il numero di subcolture (stabilità genetica)
- ✓ adattarli alla temperatura di conservazione dei campioni
- ✓ **potenziale di crescita:** miscelare i ceppi in parti uguali
- ✓ **tasso massimo di crescita** non mescolare i ceppi, studiarli indipendentemente

➤ Livello atteso di contaminazione: circa 100 ufc/g

➤ Preparazione e inoculazione delle unità di prova

Preparare almeno il numero di unità di prova indicato nelle tabelle.

L'intero esperimento richiede il **campionamento distruttivo**.

L'inoculazione deve simulare il più possibile le condizioni naturali; per non modificare le proprietà chimicofisiche del prodotto, **l'innesto non deve superare l'1% del volume** delle unità di prova

Challenge test di valutazione del potenziale di crescita (δ)

Table 2: Minimum number of test units to be prepared per batch

	“day 0” ^{a)}	“day end” ^{b)}
Enumeration of <i>L. monocytogenes</i> in inoculated test units	3	3
Detection of <i>L. monocytogenes</i> in non-inoculated test units	3	3
Measurement of physico-chemical characteristics in non-inoculated test units		
Measurement of gas atmosphere (for product under gas atmosphere) in non-inoculated test units	1	1
Enumeration of the associated microflora in non-inoculated test units		

a) “day 0”: the day of inoculation

b) “day end”: the end of the shelf-life

Challenge test di valutazione del potenziale di crescita (δ)

7.4 Examples of total number of test units required per batch in the frame of a challenge test to assess a growth potential

Table 10. Total number of test units to be prepared per batch depending on the number of days of analysis in the frame of a challenge tests to assess a growth potential

		“day 0”	Optional intermediate days			“day end”
Enumeration of <i>L. monocytogenes</i> in inoculated test units		3	3	3	3	3
Detection of <i>L. monocytogenes</i> in non-inoculated test units		3	0	0	0	3
Measurement of physico-chemical characteristics		1	0	0	0	1
Enumeration of the associated microflora						
Total number required per batch	at “day 0” and “day end”					14
	with “day 0”, 1 intermediate day and “day end”					17
	with “day 0”, 2 intermediate days and “day end”					20
	with “day 0”, 3 intermediate days and “day end”					23

Challenge test di valutazione del potenziale di crescita

➤ Durata e temperatura di stoccaggio

Tabella 2. Diagramma di flusso delle condizioni di incubazione

Fase della catena del freddo	Temperatura d'incubazione		Durata dello stoccaggio (incubazione)				
			Vita commerciale ≤ 21 giorni		Vita commerciale > 21 giorni		
Dalla produzione fino all'arrivo nel banco vendita	Temperatura giustificata da informazioni dettagliate*	oppure se non nota	8 °C	Durata giustificata da informazioni dettagliate	oppure se non nota	un terzo della vita commerciale	7 giorni
Commercio al dettaglio: banco vendita	Temperatura giustificata da informazioni dettagliate*	oppure se non nota	12 °C	Durata giustificata da informazioni dettagliate	oppure se non nota	un terzo della vita commerciale	½ (un terzo della vita commerciale - 7 giorni)
Stoccaggio domestico	Temperatura giustificata da informazioni dettagliate*	oppure se non nota	12 °C	Durata giustificata da informazioni dettagliate	oppure se non nota	un terzo della vita commerciale	½ (un terzo della vita commerciale - 7 giorni)

* Temperatura giustificata da informazioni dettagliate: il 75° percentile delle osservazioni per il paese dove si svolge la fase della catena del freddo

Challenge test di valutazione del potenziale di crescita

➤ Durata e temperatura di stoccaggio

Retail outlet temperatures



EURL Lm
European Union Reference Laboratory for
Listeria monocytogenes
<http://eur-lex.europa.eu>

Laboratory for Food Safety, Maisons-Alfort location

Report

Temperature distribution of ready-to-eat food at retail level in Europe

Version 1 – 16/12/2015

Hélène BERGIS, Véronique NOEL, Annie BEAUFORT

Team MOD-AQR, Laboratory for Food Safety, Maisons-Alfort location,
ANSES

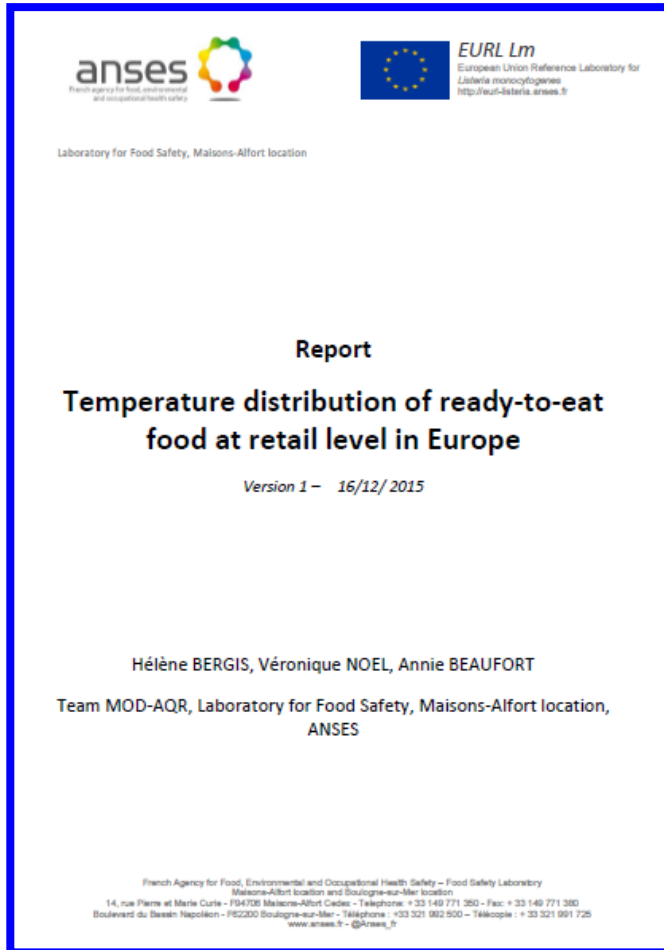
French Agency for Food, Environmental and Occupational Health Safety – Food Safety Laboratory
Maisons-Alfort location and Boulogne-sur-Mer location
14, rue Pierre et Marie Curie – F94708 Maisons-Alfort Cedex – Telephone: +33 1 49 771 350 – Fax: +33 1 49 771 300
Boulevard du Général Napoléon – F52200 Boulogne-sur-Mer – Telephone: +33 321 982 500 – Télécopie: +33 321 991 726
www.anses.fr – @Anses_fr

TABLE OF CONTENT

1	INTRODUCTION	3
2	METHODS	4
2.1	Sampling design	4
2.1.1	Sampling plan	4
2.1.2	Selection of retail outlet categories	4
2.1.3	Selection of RTE food categories	4
2.1.4	Temperature measurement	5
3	RESULTS	6
3.1	Analysis of RTE Food storage temperature dataset at retail level	6
3.1.1	temperatures by RTE food categories	6
3.1.2	temperatures by retail outlet categories	10
3.1.3	temperatures by season	16
3.1.4	temperatures by geoclimatic division	19
4	CONCLUSION	23
	Bibliography	24

Challenge test di valutazione del potenziale di crescita

➤ Durata e temperatura di stoccaggio



The image shows the cover of a report. At the top left is the ANSES logo (French Agency for Food, Environmental and Occupational Health Safety) and at the top right is the EURL Lm logo (European Union Reference Laboratory for *Listeria monocytogenes*). Below the logos, it says 'Laboratory for Food Safety, Maisons-Alfort location'. The title of the report is 'Report Temperature distribution of ready-to-eat food at retail level in Europe' with 'Version 1 – 16/12/2015' below it. The authors are 'Hélène BERGIS, Véronique NOEL, Annie BEAUFORT' and the team is 'Team MOD-AQR, Laboratory for Food Safety, Maisons-Alfort location, ANSES'. At the bottom, there is contact information for the French Agency for Food, Environmental and Occupational Health Safety – Food Safety Laboratory, Maisons-Alfort location and Boulogne-sur-Mer location.

4 CONCLUSION

The baseline survey has been conducted to assess the prevalence and the level of contamination of *Listeria monocytogenes* in three categories of RTE food. It also provided interesting data on the distribution of RTE food temperatures at retail level in Europe.

The statistical analyses of the temperatures recorded at the surface of the packaging of the considered products show that in supermarkets and small shops (the largest retail outlet category represented in this survey), RTE food products were sold at an average temperature of 4°C all over Europe.

Thus one can be confident that RTE food sold in supermarkets and small shops are maintained at low refrigerated temperatures. The storage conditions in this outlet category seem appropriate to preserve the food quality and the food safety. However, we may regret that small shops were not considered separately from supermarkets.

This study shows also that the RTE products investigated were sold at an average temperature of 4.06°C for cheese products, of 3.45°C for fish products and for 3.71°C for meat products. This study also points out that these products are sold between 0°C and 8°C with 95% chance, and in the worst case, have only 0.2% chance to be sold over or at the abuse temperature of 12°C.

The knowledge on storage temperatures of RTE food at retail acquired in this study could be used by DG SANTE together with Member States to improve the implementation of durability studies and challenge testing, by better simulating the cold chain and submit products to the foreseeable conditions of RTE distribution, as recommended in EC Regulation 2073/2005.

More precisely, the outcome of this study could be taken into consideration to redefine the temperature profile at retail level to conduct challenge tests, as defined in Table 3 of the "EURL Lm technical guidance document for conducting RTE shelf-life studies relating to *Listeria monocytogenes*" (2014).

Challenge test di valutazione del potenziale di crescita

➤ Durata e temperatura di stoccaggio



EURL Lm
European Union Reference Laboratory for
Listeria monocytogenes
<http://eur-lex.europa.eu>

4 CONCLUSION

The baseline survey has been conducted to assess the prevalence and the level of

This study shows also that the RTE products investigated were sold at an average temperature of 4.06°C for cheese products, of 3.45°C for fish products and for 3.71°C for meat products. This study also points out that these products are sold between 0°C and 8°C with 95% chance, and in the worst case, have only 0.2% chance to be sold over or at the abuse temperature of 12°C.

food at retail level in Europe

Version 1 – 16/12/2015

at low refrigerated temperatures. The storage conditions in this outlet category seem appropriate to preserve the food quality and the food safety. However, we may regret that small shops were not considered separately from supermarkets.

More precisely, the outcome of this study could be taken into consideration to redefine the temperature profile at retail level to conduct challenge tests, as defined in Table 3 of the “EURL *Lm* technical guidance document for conducting RTE shelf-life studies relating to *Listeria monocytogenes*” (2014).

foreseeable conditions of RTE distribution, as recommended in EC Regulation 2073/2005.

More precisely, the outcome of this study could be taken into consideration to redefine the temperature profile at retail level to conduct challenge tests, as defined in Table 3 of the “EURL *Lm* technical guidance document for conducting RTE shelf-life studies relating to *Listeria monocytogenes*” (2014).

French Agency for Food, Environmental and Occupational Health Safety – Food Safety Laboratory
Malesme-Alfort location and Boulogne-sur-Mer location
14, rue Pierre et Marie Curie – F94708 Malesme-Alfort Cedex – Telephone: +33 1 49 771 350 – Fax: +33 1 49 771 350
Boulevard du Saatchi Napoléon – F82200 Boulogne-sur-Mer – Telephone: +33 321 982 900 – Télécopie: +33 321 991 726
www.anses.fr – @Anses_fr



Contents lists available at ScienceDirect

Food Research International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodres



Analysis of domestic refrigerator temperatures and home storage time distributions for shelf-life studies and food safety risk assessment



Anna Roccató ^{a,*}, Mieke Uyttendaele ^b, Jeanne-Marie Membré ^c

^a Risk Analysis and Public Health Department, Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, Viale dell'Università 10, 35020 Legnaro (PD), Italy

^b Laboratory of Food Microbiology and Food Preservation, Faculty of Bioscience Engineering, Ghent University, Coupure links 653, B-9000 Ghent, Belgium

^c INRA, UMR1014 SECALIM, Oniris - La Chantrerie, Route de Gachet, CS40706, 44 307 Nantes Cedex 3, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 16 November 2016

Received in revised form 17 February 2017

Accepted 26 February 2017

Available online 6 March 2017

ABSTRACT

In the framework of food safety, when mimicking the consumer phase, the storage time and temperature used are mainly considered as single point estimates instead of probability distributions. This singlepoint approach does not take into account the variability within a population and could lead to an overestimation of the parameters. Therefore, the aim of this study was to analyse data on domestic refrigerator temperatures and storage times of chilled food in European countries in order to draw general rules which could be used either in shelf

life studies. Analysis of temperature distributions revealed that the countries were separated into two groups: northern European countries and southern European countries. The overall variability of European domestic refrigerators is described by a normal distribution: $N(7.0, 2.7)$ °C for southern countries, and, $N(6.1, 2.8)$ °C for the northern countries. Concerning storage times, seven papers were pertinent. Analysis indicated that the storage time was likely to end in the first days or weeks (depending on the product use-by-date) after purchase.

k. Test report

Include in the test report at least the following information:

Challenge test di valutazione del potenziale di crescita

- ◇ Report number,
- ◇ Purpose of the study
- ◇ Type of challenge test
- ◇ Information concerning full identification of the food:
 - Name of the product,
 - The characteristics of the RTE food (pH, a_w , associated microflora, ...),
 - The intended shelf-life of the product
 - Identification of the batches and dates of the beginning of the shelf-life.
- ◇ Data relating to the challenge test:
 - Number of batches tested and justification,
 - Number of test units used per batch and per day of analysis,
 - Mass or volume of the test units inoculated,
 - Strains used, strains characteristics (if possible) and justification of the choice,
 - Preparation of the inoculum,
 - Inoculum concentration,
 - Volume of the inoculum introduced per test unit,
 - Contamination method,
 - Date of inoculation,
 - Duration of the test and sampling intervals
 - Storage temperature and justification,
 - Storage duration and justification,
 - Enumeration and detection methods used,
 - Limit of the enumeration,
 - Physico-chemical values at the beginning and at the end of the test,
 - Gas atmosphere,
 - Concentration of associated microflora at the beginning and at the end of the test,
 - Concentration of *L. monocytogenes* at the beginning and at the end of the test,
 - Growth potential per batch,
 - Conclusion.

The results of the challenge test apply only to the product tested. Any change to the product recipe, the process, ... would invalidate the results of the shelf-life study and would require it to be conducted again.

ANNEX 2 - Example of a check list to assess the technical competence of the laboratory performing a challenge test

The following items, identified in the “EURL *Lm* Technical guidance document for conducting shelf-life studies on *Listeria monocytogenes* in ready to eat foods”, version 3 – 6 June 2014, should be specified in experimental design for challenge test.

	Specifications of EURL <i>Lm</i> Technical Guidance Document	Information provided		Comment
		Yes	No	
Number and choice of the batches				
Determining the number of batches to be tested	Use of a predictive µbio software. Growth/No growth boundary.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Use of the inter-batch variability calculator.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Number of batches to be tested	• At least 3 batches.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	• 1 batch, if growth probability ≤10%.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	• 1 batch, if inter-batch variability insignificant for <i>Lm</i> .	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
Selection of the batches (if at least 3 batches tested).	Batches with the physico-chemical characteristics the most favorable to growth.	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	
	Batches spread over time	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	

Listeria monocytogenes in salmone affumicato: esperienze in IZSVe

- Esecuzione di challenge tests per la valutazione del potenziale di crescita
- Verifica di documenti esibiti dagli OSA

Listeria monocytogenes in salmone affumicato: esperienze in IZSVe

OSA n° 1: filetti di trota affumicati *Challenge test*

Background:

- **Controllo Ufficiale:** ✓ 2 campionamenti a fine shelf-life
 - ✓ presenza in 25 gr (2-3/5 ufc)
 - ✓ <10 ufc/gr
- **Autocontrollo:**
 - ✓ rare positività (presenza in 25 gr, <10 ufc/gr)
 - ✓ *assenza di documentazione*

Listeria monocytogenes in salmone affumicato: esperienze in IZSVe

OSA n° 1: filetti di trota affumicati

Challenge test

Carica contaminazione 60 ufc/gr;

Conservazione +4° C

Numero prelievo	Data	Numero registro	Aw	pH	Carica <i>Listeria monocytogenes</i>	Carica batterica totale	Batteri lattici
1	12/11/2010	10As/292	0.96	6.4	60 ufc/g	1,7x10 ³ ufc/g	<10 ufc/gr
2	22/11/2010	10As/297	0.96	6.5	1.500 ufc/g	5,5x10 ⁵ ufc/gr	1,3x10 ⁴ ufc/gr
3	03/12/2010	10As/300	0.95	6.6	87.000 ufc/gr	2,8x10 ⁷ ufc/gr	8,7x10 ⁴ ufc/gr
4	12/12/2010	10As/306	0.96	6.5	12.000.000 ufc/gr	3x10 ⁷ ufc/gr	1,5x10 ⁵ ufc/gr
5	12/01/2011	11As/1	0.95	6.5	44.000.000 ufc/gr	3,5x10 ⁷ ufc/gr	1,8x10 ⁵ ufc/gr

Listeria monocytogenes in salmone affumicato:

esperienze in IZSVe

OSA n° 1: filetti di trota affumicati

Challenge test

Carica contaminazione 60 ufc/gr;

Conservazione +8° C

Numero prelievo	Data	Numero registro	Aw	pH	Carica <i>Listeria monocytogenes</i>	Carica batterica totale	Batteri lattici
1	12/11/2010	10As/292	0.96	6.4	60 ufc/g	1,7x10 ³ ufc/g	<10 ufc/gr
2	22/11/2010	10As/298	0.96	6.6	50.000 ufc/g	3,2x10 ⁵ ufc/gr	1x10 ⁴ ufc/gr
3	03/12/2010	10As/301	0.96	6.5	2.500.000 ufc/gr	7,2x10 ⁷ ufc/gr	1x10 ⁶ ufc/gr
4	12/12/2010	10As/307	0.96	6.5	300.000.000 ufc/gr	1,1x10 ⁸ ufc/gr	6,1x10 ⁶ ufc/gr
5	12/01/2011	11As/2	0.95	6.4	500.000.000 ufc/gr	1.6x10 ⁸ ufc/gr	9.7x10 ⁶ ufc/gr

Listeria monocytogenes in salmone affumicato:

esperienze in IZSVe

OSA n° 1: filetti di trota affumicati

Challenge test

Carica contaminazione 6 ufc/gr;

Conservazione +4° C

Numero prelievo	Data	Numero registro	Aw	pH	Carica <i>Listeria monocytogenes</i>)	<i>Listeria monocytogenes</i> Prova qualitativa	Carica batterica totale	Batteri lattici
1	21/01/2011	11As/4	0.98	6.5	<10 ufc/g	Assente in 25g	500 ufc/gr	<10 ufc/gr
2	31/01/2011	11As/12	0.98	6.5	<10 ufc/g	Presente in 25g	15x10 ³ ufc/gr	2,8x10 ³ ufc/gr
3	10/02/2011	11As/18	0.96	6.4	<40 ufc/g	Presente in 25g	35x10 ⁶ ufc/gr	40x10 ³ ufc/gr
4	22/02/2011	11As/28	0.97	6.5	<40 ufc/g	Presente in 25g	9,1x10 ⁶ ufc/gr	9,1x10 ³ ufc/gr
5	04/03/2011	11As/37	0.95	6.5	12.000 ufc/gr	Presente in 25g	5x10 ⁶ ufc/gr	180x10 ³ ufc/gr
6	23/03/2011	11As/46	0.95	6.5	400.000 ufc/gr	Presente in 25g	150x10 ⁶ ufc/gr	200x10 ³ ufc/gr

Listeria monocytogenes in salmone affumicato: esperienze in IZSVe

OSA n° 1: filetti di trota affumicati Challenge test

Carica contaminazione 6 ufc/gr;
Conservazione +8° C

Numero prelievo	Data	Numero registro	Aw	pH	Carica <i>Listeria monocytogenes</i>)	<i>Listeria monocytogenes</i> Prova qualitativa	Carica batterica totale	Batteri lattici
1	21/01/2011	11As/6	0.97	6.5	<10 ufc/g	Presente in 25g	450 ufc/gr	<10 ufc/gr
2	31/01/2011	11As/13	0.97	6.5	<10 ufc/g	Presente in 25g	3,5x10 ⁶ ufc/gr	3x10 ³ ufc/gr
3	10/02/2011	11As/20	0.96	6.4	70 ufc/g	Presente in 25g	81x10 ⁶ ufc/gr	80x10 ⁴ ufc/gr
4	22/02/2011	11As/30	0.96	6.5	500.000 ufc/g	Presente in 25g	10x10 ⁶ ufc/gr	3,5x10 ⁴ ufc/gr
5	04/03/2011	11As/39	0.95	6.4	280.000 ufc/g	Presente in 25g	50x10 ⁶ ufc/gr	30x10 ⁴ ufc/gr
6	23/03/2011	11As/48	0.96	6.5	400.000 ufc/g	Presente in 25g	180x10 ⁶ ufc/gr	25x10 ⁴ ufc/gr

Listeria monocytogenes in salmone affumicato:

esperienze in IZSVe

OSA n° 1: filetti di trota affumicati

Challenge test

Carica contaminazione 0,06 ufc/gr;

Conservazione +4° C

Numero prelievo	Data	Numero registro	Aw	pH	Carica <i>Listeria monocytogenes</i>)	<i>Listeria monocytogenes</i> Prova qualitativa	Carica batterica totale	Batteri lattici
1	21/01/2011	11As/3	0.98	6.5	<10 ufc/g	Assente in 25g	460 ufc/gr	<10 ufc/gr
2	31/01/2011	11As/10	0.98	6.5	<10 ufc/g	Assente in 25g	13x10 ³ ufc/gr	2,5x10 ³ ufc/gr
3	10/02/2011	11As/17	0.96	6.4	<10 ufc/g	Assente in 25g	33x10 ⁶ ufc/gr	46x10 ³ ufc/gr
3	22/02/2011	11As/27	0.97	6.5	<10 ufc/g	Assente in 25g	14x10 ⁶ ufc/gr	14x10 ³ ufc/gr
5	04/03/2011	11As/36	0.96	6.5	<10 ufc/g	Assente in 25g	14x10 ⁶ ufc/gr	150x10 ³ ufc/gr
6	23/03/2011	11As/45	0.96	6.5	<10 ufc/g	Assente in 25g	110x10 ⁶ ufc/gr	130x10 ³ ufc/gr

Listeria monocytogenes in salmone affumicato: esperienze in IZSVe

OSA n° 1: filetti di trota affumicati Challenge test

Carica contaminazione 0,06 ufc/gr;
Conservazione +8° C

Numero prelievo	Data	Numero registro	Aw	pH	Carica <i>Listeria monocytogenes</i>)	<i>Listeria monocytogenes</i> Prova qualitativa	Carica batterica totale	Batteri lattici
1	21/01/2011	11As/5	0.97	6.4	<10 ufc/g	Presente in 25g	500 ufc/gr	<10 ufc/gr
2	31/01/2011	11As/11	0.97	6.5	<10 ufc/g	Assente in 25g	3,2x10 ⁶ ufc/gr	4x10 ³ ufc/gr
3	10/02/2011	11As/19	0.96	6.4	<10 ufc/g	Presente in 25g	80x10 ⁶ ufc/gr	75x10 ⁴ ufc/gr
4	22/02/2011	11As/29	0.97	6.5	<10 ufc/g	Presente in 25g	7,3x10 ⁶ ufc/gr	3,1x10 ⁴ ufc/gr
5	04/03/2011	11As/38	0.95	6.4	<10 ufc/g	Assente in 25g	5x10 ⁶ ufc/gr	33x10 ⁴ ufc/gr
6	23/03/2011	11As/47	0.96	6.5	<10 ufc/g	Assente in 25g	140x10 ⁶ ufc/gr	15x10 ⁴ ufc/gr

Listeria monocytogenes in salmone affumicato: esperienze in IZSVe

OSA n° 1: filetti di trota affumicati

Challenge test

Carica contaminazione 0,06 ufc/gr;

- 0,064 ufc/gr = 8 ufc/125gr
- 0,080 ufc/gr = 10 ufc/125gr
- 0,1 (0,096) ufc/gr = 12 ufc/125gr
- 0,040 ufc/gr = 5 ufc/125gr
- 0,024 ufc/gr = 3 ufc/125gr
- 0,016 ufc/gr = 2 ufc/125gr
- 0,008 ufc/gr = 1 ufc/125gr

Listeria monocytogenes in salmone affumicato: esperienze in IZSVe

**OSA n° 2: salmone affumicato decongelato
S.V.**

Challenge test

Background:

- Challenge test eseguito in subappalto per conto di un laboratorio privato
- Controllo Ufficiale: non disponibile
- Autocontrollo: non disponibile

Listeria monocytogenes in salmone affumicato: esperienze in IZSVe

OSA n° 2: salmone affumicato decongelato S.V.

Challenge test
Carica contaminazione 50 ufc/gr;
Conservazione +4° C

Prelievo (fase indicativa)	Data	Numero Registro	Aw	pH	Carica bat- terica totale (ufc/g)	Batteri lattici (ufc/g)	Conta <i>Listeria monocytogenes</i> (ufc/g)	<i>Listeria monocytogenes</i> in 25 grammi
Immissione sul mercato	29/02/2012	12As/ 210	0,96	6,15	210	<10	50	presente
1/4 shelf-life	20/03/2012	12As/ 260	0,96	5,90	21000	15000	2800	presente
metà shelf- life	05/04/2012	12As/ 322	0,96	6,20	2.000.000	3.300.000	240.000	presente
3/4 shelf-life	26/04/2012	12As/ 422	0,96	6,10	20.000.000	22.000.000	400.000	presente
fine shelf-life	14/05/2012	12As/ 561	0,93	5,95	22.000.000	15.000.000	7.600.000	presente
5/4 shelf-life	30/05/2012	12As/ 677	0,97	5,95	11.000.000	1.600.000	11.000.000	presente

Listeria monocytogenes in salmone affumicato: esperienze in IZSVe

OSA n° 2: salmone affumicato decongelato S.V.

Challenge test
Carica contaminazione 50 ufc/gr;
Conservazione +8/12° C

Prelievo (fase indicativa)	Data	Numero Registro	Aw	pH	Carica bat- terica totale (ufc/g)	Batteri lattici (ufc/g)	Conta <i>Listeria monocytogenes</i> (ufc/g)	<i>Listeria monocytogenes</i> in 25 grammi
Immissione sul mercato	29/02/2012	12As/ 210	0,96	6,15	210	<10	50	presente
1/4 shelf-life	20/03/2012	12As/ 263	0,95	6,05	22.000	11.000	260.000	presente
metà shelf- life	05/04/2012	12As/ 325	0,96	6,00	140.000.000	96.000.000	6.000.000	presente
3/4 shelf-life	26/04/2012	12As/ 423	0,97	6,20	220.000.000	240.000.000	64.000.000	presente
fine shelf-life	14/05/2012	12As/ 564	0,94	6,20	170.000.000	150.000.000	140.000.000	presente
5/4 shelf-life	30/05/2012	12As/ 680	0,94	6,20	230.000.000	160.000.000	160.000.000	presente

Listeria monocytogenes in salmone affumicato: esperienze in IZSVe

OSA n° 2: salmone affumicato decongelato s.v. Challenge test

Carica contaminazione 5 ufc/gr;

Conservazione +4° C

Prelievo (fase indicativa)	Data	Numero Registro	Aw	pH	Carica bat- terica totale (ufc/g)	Batteri lattici (ufc/g)	Conta <i>Listeria monocytogenes</i> (ufc/g)	<i>Listeria monocytogenes</i> in 25 grammi
Immissione sul mercato	29/02/2012	12As/ 209	0,96	6,1	190	<10	<10	presente
1/4 shelf-life	20/03/2012	12As/ 259	0,95	5,9	17.000	15.000	2.300	presente
metà shelf- life	05/04/2012	12As/ 321	0,96	6,20	2.200.000	2.800.000	10.000	presente
3/4 shelf-life	26/04/2012	12As/ 421	0,96	6,10	21.000.000	20.000.000	23.000	presente
fine shelf-life	14/05/2012	12As/ 560	0,94	5,95	18.000.000	12.000.000	2.500.000	presente
5/4 shelf-life	30/05/2012	12As/ 676	0,93	5,95	20.000.000	2.000.000	9.000.000	presente

Listeria monocytogenes in salmone affumicato: esperienze in IZSVe

OSA n° 2: salmone affumicato decongelato

S.V.

Challenge test

Carica contaminazione 5 ufc/gr;

Conservazione +8/12° C

Prelievo (fase indicativa)	Data	Numero Registro	Aw	pH	Carica bat- terica totale (ufc/g)	Batteri lattici (ufc/g)	Conta <i>Listeria monocytogenes</i> (ufc/g)	<i>Listeria monocytogenes</i> in 25 grammi
Immissione sul mercato	29/02/2012	12As/ 209	0,96	6,1	190	<10	<10	presente
1/4 shelf-life	20/03/2012	12As/ 262	0,95	6,05	24.000	11.000	130.000	presente
metà shelf- life	05/04/2012	12As/ 324	0,96	6,00	130.000.000	96.000.000	3.000.000	presente
3/4 shelf-life	26/04/2012	12As/ 423	0,97	6,20	240.000.000	24.000.000	36.000.000	presente
5/6 shelf-life	14/05/2012	12As/ 563	0,94	6,15	170.000.000	20.000.000	130.000.000	presente
7/8 shelf-life	30/05/2012	12As/ 679	0,94	6,20	220.000.000	100.000.000	140.000.000	presente

Listeria monocytogenes in salmone affumicato: esperienze in IZSVe

OSA n° 2: salmone affumicato decongelato S.V.

Challenge test
Carica contaminazione 0,1 ufc/gr;
Conservazione +4° C

Prelievo (fase indicativa)	Data	Numero Registro	Aw	pH	Carica bat- terica totale (ufc/g)	Batteri lattici (ufc/g)	Conta <i>Listeria monocytogenes</i> (ufc/g)	<i>Listeria monocytogenes</i> in 25 grammi
Immissione sul mercato	29/02/2012	12As/ 208	0,95	6,15	200	<10	<10	presente
1/4 shelf-life	20/03/2012	12As/ 258	0,95	5,90	17000	15000	<10	presente
metà shelf- life	05/04/2012	12As/ 320	0,96	6,20	2.300.000	3.500.000	1.200	presente
3/4 shelf-life	26/04/2012	12As/ 420	0,96	6,10	17.000.000	19.000.000	1.500	presente
fine shelf-life	14/05/2012	12As/ 559	0,93	6,00	22.000.000	1.500.000	6.100	presente
1/4 shelf-life	30/05/2012	12As/ 675	0,93	5,95	32.000.000	2.000.000	9.000	presente

Listeria monocytogenes in salmone affumicato: esperienze in IZSVe

OSA n° 2: salmone affumicato decongelato S.V.

Challenge test
Carica contaminazione 0,1 ufc/gr;
Conservazione +8/12° C

Prelievo (fase indicativa)	Data	Numero Registro	Aw	pH	Carica bat- terica totale (ufc/g)	Batteri lattici (ufc/g)	Conta <i>Listeria monocytogenes</i> (ufc/g)	<i>Listeria monocytogenes</i> in 25 grammi
Immissione sul mercato	29/02/2012	12As/ 208	0,95	6,15	200	<10	<10	presente
1/4 shelf-life	20/03/2012	12As/ 261	0,95	6,05	23.000	11.000	160	presente
metà shelf- life	05/04/2012	12As/ 323	0,96	6,00	140.000.000	92.000.000	2.900.000	presente
3/4 shelf-life	26/04/2012	12As/ 423	0,97	6,25	200.000.000	240.000.000	1.900.000	presente
fine shelf-life	14/05/2012	12As/ 562	0,94	6,20	170.000.000	120.000.000	92.000.000	presente
1/4 shelf-life	30/05/2012	12As/ 678	0,94	6,20	210.000.000	110.000.000	100.000.000	presente


Studio della dinamica di *Listeria monocytogenes* in salmone affumicato decongelato:

Conclusioni:

Alla luce dei risultati ottenuti, si raccomanda l'implementazione di tutte le buone pratiche di lavorazione al fine di prevenire contaminazioni significative del prodotto, di non assegnare al prodotto una shelf-life eccessiva, e di rispettare il più scrupolosamente possibile la catena del freddo

Legnaro, 16 luglio 2012




Dr. Damiano Comin

Laboratorio Tecnologie Alimentari

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie

Listeria monocytogenes in salmone affumicato: esperienze in IZSVe

OSA n° 3: salmone affumicato danese

Ministry of Food, Agriculture and Fisheries
Danish Veterinary and Food Administration



To whom it may concern

The Danish Veterinary and Food Administration hereby declare that documentation regarding the level of *Listeria monocytogenes* during shelf life of products from the company [REDACTED], is in compliance with demands and guidelines stated in:

COMMISSION REGULATION (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs, Article 3 and Annex 1.

GUIDANCE DOCUMENT (2008) 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, Article 3.3. Historical data.

The evaluation is based on data provided by the company regarding the company HACCP program - including risk assessment performed on the production - and results from 110.683 analyses on the presence and levels of *L. monocytogenes* in products and environment carried out over the last 10 years.

The historical data regarding the presence of *L. monocytogenes* reveals that 100 % of 1328 shelf life samples have a level of *L. monocytogenes* less than 100 pr g. 99.7% of the shelf life samples have a level of *L. monocytogenes* less than 10 pr g.

Esbjerg, d. 21.10 2011

JØRGEN E. CHRISTENSEN
Official veterinarian


Jørgen E. Christensen
Official veterinarian



Listeria monocytogenes in salmone affumicato: esperienze in IZSVe

OSA n° 3: salmone affumicato danese

The evaluation is based on data provided by the company regarding the company HACCP program - including risk assessment performed on the production - and results from 110.683 analyses on the presence and levels of *L. monocytogenes* in products and environment carried out over the last 10 years.

The historical data regarding the presence of *L. monocytogenes* reveals that 100 % of 1328 shelf life samples have a level of *L. monocytogenes* less than 100 pr g, 99.7% of the shelf life samples have a level of *L. monocytogenes* less than 10 pr g.

Listeria monocytogenes in salmone affumicato: esperienze in IZSve

OSA n° 4: salmone affumicato spagnolo

4. RESULTADOS OBTENIDOS

4.1. Resultados obtenidos del producto SALMÓN

Muestras	n° dictamen	fecha análisis	Días incub.	Tª incub	Resultado <i>Listeria monocytogenes</i>		
					PNTM3092 (Vidas)	PNTM3081 (NMP)	ISO11290-2:2004 (recuento)
1	Sin inocular	21/10/2008	0	-	Ausencia en 25g	-	
2	Sin inocular	21/10/2008	0	-	Ausencia en 25g	-	
3	Sin inocular	21/10/2008	0	-	Ausencia en 25g	-	
4	20080330182	21/10/2008	0	-	-	14/g	
5	20080330183	21/10/2008	0	-	-	9,3/g	
6	20080330184	21/10/2008	0	-	-	46/g	
7	20080334171	10/11/2008	20	4°C	-	12/g	
8	20080334172	10/11/2008	20	4°C	-	12/g	
9	20080334173	10/11/2008	20	4°C	-	4,3/g	
10	20080338556	05/12/2008	45	8°C	-	24/g	
11	20080338557	05/12/2008	45	8°C	-	15/g	
12	20080338558	05/12/2008	45	8°C	-	9,3/g	
13	20080340905	19/12/2008	60	8°C	-	43/g	
14	20080340906	19/12/2008	60	8°C	-	93/g	
15	20080340907	19/12/2008	60	8°C	-	>2400/g	
18	20090343734	15/01/2009	85	-	-	-	1900 ufc/g

Observaciones:

Teniendo en cuenta que la concentración real del inóculo de *Listeria monocytogenes* ha sido de $7,2 \cdot 10^2$ ufc/ml, la concentración inicial de *Listeria monocytogenes* en todas las muestras estudiadas debería oscilar entre 19-20 ufc/g.

Listeria monocytogenes in salmone affumicato: esperienze in IZSVe

OSA n° 4: salmone affumicato spagnolo

5. COMENTARIOS Y CONCLUSIONES

Con los resultados obtenidos se puede concluir que el producto, hasta los 45 días, conservado a las condiciones del estudio, mantiene niveles de *Listeria monocytogenes* inferiores a 100/g (con $n = 3$ y $c = 0$, siendo "n" el número de muestras analizadas y "c" el número de muestras analizadas que superan los 100/g). A partir del control a los 60 días, los niveles de *Listeria monocytogenes* superan los 100/g en una de las tres muestras analizadas.

Barcelona, 8 de enero de 2009

Listeria monocytogenes in salmone affumicato: esperienze in IZSVe

OSA n° 4: salmone affumicato spagnolo

DETERMINACIONES MICROBIOLÓGICAS	5 días elaborado	24 días elaborado	45 días elaborado Fecha caducidad	60 días elaborado
<i>AEROBIOS</i>	605	12500	3250	160000
<i>ENTEROBACTERIAS</i>	10	-10	-10	160
<i>SALMONELLA</i>	Ausencia	Ausencia	Ausencia	Ausencia
<i>L. MONOCYTOGENES</i>	Presencia -5	Presencia -5	Presencia -5	15
<i>ST. AUREUS</i>	-10	-10	-10	-10
<i>COLIFORMES TOTALES</i>	-10	-10	-10	125
<i>E. COLI</i>	-10	-10	-10	-10

Las muestras han sido tomadas de la producción normal de la planta de elaboración, con una codificación en el laboratorio [REDACTED] con fecha de elaboración 13/05/2010.

4. CONCLUSIONES:

El análisis de los resultados nos permite obtener unas conclusiones de la evolución del producto Salmón [REDACTED] en atmósfera protectora en las condiciones de Tª que se ha mantenido, 60 días en refrigeración 0-5°C con una concentración interna de 0.9%O2 y 31.1%CO2 al envasar. El aspecto visual es aceptable ya que a los 60 días la coloración del salmón es sonrosada.

La investigación de *L. monocytogenes*, el único parámetro legislado, ha presentado en 3 de las 4 muestras un recuento inferior a 5 ufc/g y en una de ellas 15 ufc/g, pero correcto puesto que es inferior a 100 ufc/g. El resto de la flora incluida la *Salmonella* no presenta unos recuentos elevados.

Para garantizar un producto de máxima frescura y calidad cumpliendo con los exigentes estándares de la marca el producto Salmón Ahumado en atmósfera protectora tiene una caducidad de 45 días, teniendo en cuenta que puede ser ampliada hasta 60 pero considerando la pérdida de coloración.

Listeria monocytogenes

espe

to:

OSA n° 4: salmone affumicato spagnolo

Dir. [redacted] ica Ma [redacted] (1) (2) (3) (4) (5) (6) (7) (8) (9) (10) (11) (12) (13) (14) (15) (16) (17) (18) (19) (20) (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34) (35) (36) (37) (38) (39) (40) (41) (42) (43) (44) (45) (46) (47) (48) (49) (50) (51) (52) (53) (54) (55) (56) (57) (58) (59) (60) (61) (62) (63) (64) (65) (66) (67) (68) (69) (70) (71) (72) (73) (74) (75) (76) (77) (78) (79) (80) (81) (82) (83) (84) (85) (86) (87) (88) (89) (90) (91) (92) (93) (94) (95) (96) (97) (98) (99) (100)

ACTA GENERAL N° [redacted]

En P
A el Agente de
l'Agent de m
sa persona e
es persona i

sito en C/Pi
atuat al C/Pi
provincia de
provincia de
con D.N.I./C
amb D.N.I./C
con D.N.I./C
amb D.N.I./C
Motiu de la v
Coma cons

Com a conseqüència del control oficial efectuat es posen de manifest els següents fets: *Sanitativa italiana.*

A requerimiento de la autoridad sanitaria italiana sobre el producto:
"Salmón de España" [redacted]

que: De acuerdo con el artículo 3.2. del Reglamento (CE) n.º 2073/2005 de la Comisión, de 15 de noviembre de 2005, relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimentarios, los operadores de las empresas alimentarias responsables de la fabricación de los productos alimentarios realizarán estudios conforme a lo dispuesto en el Anexo II del mismo para investigar el cumplimiento de los criterios a lo largo de toda su vida útil.

Como agente de control oficial se le exige a la empresa estudios complementarios para determinar la vida útil de los distintos productos elaborados en sus distintas formas de comercialización.

Continúa en Registro de
CEO autorizados de la empresa RND


Y, en testimonio de lo actuado, se levanta la presente acta por TRIPLICADO en presencia del interesado que la firma, y en otro ejemplar, en otro ejemplar, con a testimoni de l'actuació, s'estén la present acta per TRIPLICAT en presència de l'interessat que la signa juntament amb el signatari actuat.

Por la empresa / Per l'empresa [redacted]

El agente de [redacted]

Listeria monocytogenes in salmone affumicato: esperienze in IZSVe

OSA n° 4: salmone affumicato spagnolo

 [REDACTED] cant) 2

CONSIGLIERIA DE SANITARI

Registro de No Conformidades y Observaciones (RNCO)/
Registre de No Conformitats i Observacions (RNCO)

VIENE DE FORMULARIO N° del Arch 6^o HOJA 3 DE 3
VE DE FORMULARI N° FULL.... DE.....

Como consecuencia de todo lo anterior y como agente de control oficial y autoridad sanitaria estimo válidos y satisfactorios el historico de datos aportado sobre el producto [REDACTED]

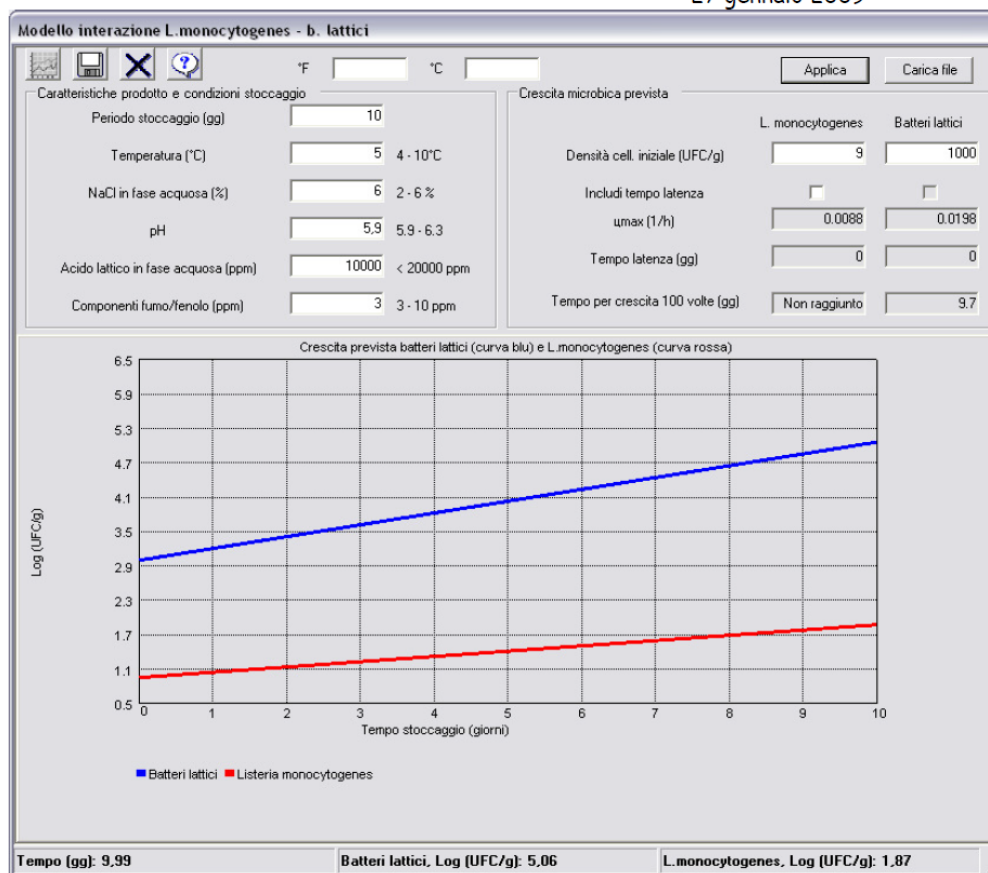
[REDACTED] para determinar la vida útil del producto y por tanto puede comercializar el producto con presencia de *Listeria monocytogenes* siempre que cumpla lo límites de 100 ufc/gr al final de vida útil conforme al Reglamento 2073/2005.

Adjunto visado y firmado los datos sobre los que se envia la informacion requerida por la autoridad italiana,

Listeria monocytogenes in salmone affumicato: esperienze in IZSVe

OSA n° 5: salmone norvegese

27 gennaio 2009



Listeria monocytogenes in salmone affumicato: esperienze in IZSVe

OSA n° 5: salmone norvegese

27 gennaio 2009

Modello generato da software SSSP v multilingua 2 (<http://www.dfu.min.dk/micro/sssp/>). Worst condition : presenza di *L. monocytogenes* al momento dell'analisi 9 UFC/g (0,90 log UFC/g). Dopo 10 giorni (scadenza) : 1,87 log UFC/g (= 74 UFC/g)

Listeria monocytogenes in salmone affumicato: esperienze in IZSVe

OSA n° 5: salmone norvegese

Egregio Dottore,

faccio seguito alla Sua richiesta per inviarLe i calcoli predittivi della crescita di *Listeria monocytogenes* in substrati con caratteristiche sovrapponibili a quelle del salmone affumicato oggetto dell'analisi, ovverosia pH pari a 5,90 (arrotondato) ed attività dell'acqua (a_w) compatibile con il contenuto salino del Vs prodotto (6 % = 0,950).

I calcoli predittivi sono quelli riportati nel software *Seafood Spoilage and Safety Predictor* (SSSP), consultabile al sito <http://www.dfu.min.dk/micro/sssp/> del Ministero della Pesca del Regno di Danimarca, l'unico al momento esistente per il salmone affumicato.

In considerazione del risultato analitico, < 10 UFC/g, è stata considerata una presenza specifica iniziale pari a 9 UFC/g anche se un tale contenuto appare sovrastimato rispetto a quanto usualmente riportato in letteratura (si confronti, al proposito, "Gestione delle prove di inoculazione sperimentale ai fini del Regolamento 2073/2005/CE" di V. Giaccone, M. Ferioli ed F. Ottaviani in *Ingegneria Alimentare* Dicembre 2008, pag. 22).

Il contenuto in acido lattico è stato considerato pari a 10000 ppm (1 %) ed il contenuto in fenoli (del fumo di affumicatura) pari al minimo del 3 %.

La temperatura è sia quella rilevata al momento del campionamento (+ 4 °C) che quella di massima conservazione inserita in etichetta, pari a 5 °C.

Il contenuto in flora lattica, con i conseguenti effetti antagonisti, è stata considerato, nei due modelli estremi, pari al minimo riscontrato nei prodotti all'intorno della scadenza (10.000 UFC/g) che il valore medio riscontrato nella medesima situazione (1.000.000 UFC/g).

Listeria monocytogenes in salmone affumicato: esperienze in IZSVe

OSA n° 5: salmone norvegese

Nel primo modello, che rappresenta la peggiore condizione possibile (basso contenuto in flora lattica antagonista, temperatura a 5 °C) l'incremento nel contenuto in *Listeria monocytogenes* dal momento dell'inizio dell'analisi alla data di scadenza indicata in etichetta (+10 giorni) é tale da generare un incremento numerico da 9 UFC/g (0,99 log UFC/g) a 74 UFC/g (1,87 log UFC/g), quindi inferiore al limite di 100 UFC/g (2 log UFC/g) stabilito al punto 1.2 dei Reg. 2073/2005 CE e 1441/2007 CE.

Nel secondo modello, che considera una situazione media realisticamente più probabile (moderato contenuto in flora lattica antagonista, temperatura a + 4 °C), l'incremento in *Listeria monocytogenes*, dal momento dell'inizio dell'analisi alla data di scadenza indicata in etichetta (+ 10 giorni), é tale da generare un incremento numerico da 9 UFC/g (0,99 log UFC/g) a 25 UFC/g (1,4 log UFC/g), ancora più basso del limite di 100 UFC/g (2 log UFC/g) stabilito al punto 1.2 dei Reg. 2073/2005 CE e 1441/2007 CE.

In definitiva, qualsiasi ipotesi si consideri, non esiste la possibilità, sia in condizioni "medie" che nelle peggiori condizioni possibili, che il contenuto in *Listeria monocytogenes* possa superare il limite imposto dai Reg. 2073/2005 CE e 1441/2007 CE per i prodotti alimentari alla scadenza.

Listeria monocytogenes in salmone affumicato:

esperienze in IZSVe

OSA n° 6: salmone polacco

Dorota SEJ-FURMANEK, MA
Sworn Translator of English
Ministry of Justice Record: TP/1320/05
Certified translation from Polish

Stupsk, ul. Lukaszewicza 1
Ustka, ul. Rybacka 5A/7

tel. 668 294 920
tel. 59 814 66 43
e-mail: tłumaczenia@repertorium.pl
www.tlumaczenia.repertorium.pl

Dist. Veterinary Officer

76-200 Stupsk, ul. Rybacka 5A/7
Tel. 59 814 66 43

Stupsk, dated 17th April 2012

PIW-12/hz.4213-4/1/12

CERTIFICATE

The District Veterinary Officer in Stupsk certifies on the basis of the results of own study of the company, external ones, received by the customers and the study of the Veterinary Inspection which was submitted to the District Veterinary Officer by the company [redacted] and the following documents:

Listeria monocytogenes in salmone affumicato: esperienze in IZSVe

OSA n° 6: salmone polacco

1. Results of *L. Monocytogenes* from own study at the end of the shelf- life for the years 2009-2011. Total amount of analyses for the year 2009 is 2487, for the year 2010 is 6890, and for the year 2011 is 9203. The list of the study was considered as extensive and complete. None of the results exceeded 100 cfu/ g.
2. The set of results developed in the scope of the external audit by an independent expert. 2351 starting results were presented in the set and corresponding 2351 results at the end of the shelf-life concerning the period from 01.01.2011 till 11.10.2011. All quantitative results of *Listeria Monocytogenes* were less than 10 cfu/g. *Listeria Monocytogenes* were found in 82 results at the start in 2351 pairs of results which constituted 3,5% of the amount of the study and out of this amount at the end of shelf period *L. Monocystogenes* were found in 9 samples – at the same time all results were below 10 cfu/g.

Listeria monocytogenes in salmone affumicato: esperienze in IZSVe

OSA n° 6: salmone polacco

3. The challenge test results carried out by two laboratories: (Italy) and (Germany) and drawn up in accordance with “WORKING DOCUMENT, version 2-Novembre 2008, TECHNICAL GUIDANCE DOCUMENT on shelf-life studies for *Listeria Monocytogenes* in ready-to-eat foods” and especially in accordance with Chapter 2.2.9 Exploitation of the results (2.2.9.1 Ability to support growth of *L. Monocytogenes* 2.2.9.2. Use of the growth potential value).
4. Scientific documentation which presents that storage trials showed that the growth of *L. Monocytogenes* in naturally contaminated cold-smoked salmon is much slower than growth in inoculated challenge tests and when cold-smoked salmon is inoculated the growth of *L. Monocytogenes* is possible but in naturally contaminated salmon the growth was more stopped , it suggested that other factors like smoke components, microbiological infections or the presence of other microorganisms are the important factor stopping the potential of the growth of *L. Mocyctogenes*.

Listeria monocytogenes in salmone affumicato: esperienze in IZSVe

OSA n° 6: salmone polacco

5. Information from customers and authorities concerning the presence and amount of *L. Monocytogenes* in the products of the company.
6. The results of 239 analyses carried out by accredited external laboratories for *Listeria Monocytogenes* at the end of the shelf-life performed in 2011. The list of the study was considered as extensive and complete.
7. The schedules and results of the environmental study before and during the manufacture for *Listeria Monocytogenes*. The processing plant performed 4160- such analyses in the year 2011 and 10636 in the year 2011.

OSA n° 6: salmone polacco

that the system of control and monitoring of *Listeria Monocytogenes* in the company – [redacted] (veterinary identification [redacted] producing smoked ready-to-eat fish products fulfil all requirements of The Regulations of the Commission (EC) No. 2073/2005 of 15th November 2005 concerning the microbiological criteria concerning food products with later changes.

The results of Challenge Tests and the documentation submitted by the Company allow to state that at the starting level of *Listeria Monocytogenes* in the amount below 10 cfu/g, the product does not exceed the limit of 100 cfu/g in the whole period of shelf-life for periods and temperatures of storage applied in this Company.

The Company determined the temporary limit of *Listeria Monocytogenes* below 10 cfu/g which is at present the minimal amount possible to qualitative designation.

The certificate was issued on the basis of long-standing experience out of supervision over the company made by the Veterinary Inspection, approved schedules of environmental study and products, results of the study carried out by the Veterinary Inspection, functioning of HACCP system and the Quality Management System, proved by the results of external controls among others FDA and documents supplied by the Company.

Listeria monocytogenes in salmone affumicato: esperienze in IZSVe

OSA n° 7: salmone serbo

International 58th Meat Industry Conference “Meat Safety and Quality: Where it goes?”

Occurrence of *Listeria monocytogenes* in a Serbian salmon and seafood processing line during 2013

Brankica Lakicevic^{a,*}, Tatjana Baltic^a, Vesna Jankovic^a, Branko Velebit^a, Mirjana Dimitrijevic^b, Nenad Parunovic^a, Dragan Milicevic^a

^aInstitute of Meat Hygiene and Technology, Kacanskog 13, 11040 Belgrade, Serbia

^bUniversity of Belgrade, Faculty of Veterinary Medicine, Bulevar oslobođenja 18, 11000 Belgrade, Serbia

Table 1. Overview of analyzed samples and occurrence of *L. monocytogenes* in a selected fish and seafood processing line.

Food group	Product type	No of samples	No (%) positive for <i>L. monocytogenes</i>
<u>Fish products</u>	Fresh, hot and cold smoked salmon (with / without herbs)	218	27 (12.4 %)
Seafood products	Seafood salads	108	9 (8.3 %)
Environmental samples	Swabs	485	11 (2.3 %)
Total		811	47 (5.8 %)

Namely, *L. monocytogenes* was isolated from 12.4 %, 8.3 % and 2.3 % of fish, seafood salads and environmental swabs, respectively. All *L. monocytogenes* positive food samples (36 out of 326) showed a contamination level below 100 CFU/g. This is comparable with data provided by Uyttendaele et al.⁷. The product with the highest prevalence of *L. monocytogenes* was smoked salmon (Table 1). This high prevalence could be due to the low smoking temperature involved during the cold-salmon processing; as these conditions would be ideal for proliferation of *L. monocytogenes* if the raw salmon harboured the pathogen or acquired the pathogen from the processing environment⁸. In addition to smoked salmon, a relatively high prevalence was observed in seafood



ELSEVIER

International Journal of Food Microbiology 62 (2000) 183–190

INTERNATIONAL JOURNAL OF
Food Microbiology

www.elsevier.nl/locate/ijfoodmicro

Listeria monocytogenes in the smoked salmon industry

Liv Marit Rørvik^{*,1}

The Norwegian School of Veterinary Science, Department of Pharmacology, Microbiology and Food Hygiene, P.b. 8146 Dep., 0033 Oslo, Norway

Accepted 25 April 2000

Abstract

Smoked salmon is sporadically contaminated with *Listeria monocytogenes*. Contamination levels are normally low and consumers are probably seldom exposed to risk concentrations. No clones of *L. monocytogenes* seem to be specific to smoked salmon, some clones found in smoked salmon having been isolated from several sources, including patients. Cold-smoking has been shown to eliminate *L. monocytogenes* in challenge tests at temperatures from 17.1 to 21.1°C, while from 22.2 to 30°C the bacteria survived. Under natural cold-smoking conditions (19 to 22°C) the frequency and level of *L. monocytogenes* seems to decrease. Hot-smoking seems to eliminate the bacteria when smoke is applied during the whole heating process. The prevention of recontamination of both cold-smoked and hot-smoked salmon is therefore of great importance. *L. monocytogenes* multiply considerably in smoked salmon during storage. Growth is faster in challenge tests than in naturally-contaminated smoked salmon. The declared shelf-life under refrigeration should be shorter than that customarily stipulated by many producers. While the sources of *L. monocytogenes* in smoked salmon processing plants have still to be determined, raw salmon does not seem to be an important source. The main issue for producers is to prevent colonization of the processing environment and spread of the bacteria to products. This should be achieved by the systemic implementation of hygienic measures, including the HACCP approach. © 2000 Elsevier Science B.V. All rights reserved.

ORIGINAL ARTICLE

Prevalence and growth of *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated cold-smoked salmon

A. Beaufort¹, S. Rudelle¹, N. Gnanou-Besse¹, M.T. Toquin², A. Kerouanton¹, H. Bergis¹, G. Salvat² and M. Cornu¹

¹ French Food Safety Agency (Afssa), LERQAP, Maisons-Alfort cedex, France

² French Food Safety Agency (Afssa), LERAP, Ploufragan cedex, France

Keywords

cold-smoked salmon, contamination levels, growth, *Listeria monocytogenes*, prevalence.

Correspondence

A. Beaufort, French Food Safety Agency (Afssa), LERQAP, 23 Avenue du Général de Gaulle, F-94706 Maisons-Alfort cedex, France.
E-mail: a.beaufort@afssa.fr

2006/0226: received 17 February 2006,
revised and accepted 30 October 2006

doi:10.1111/j.1472-765X.2006.02096.x

Abstract

Aim: To investigate *Listeria monocytogenes* contamination and behaviour in naturally contaminated French cold-smoked salmon (CSS).

Method and Results: Between 2001 and 2004, *L. monocytogenes* was detected in 104 of 1010 CSS packs, produced by nine French plants, with different prevalence (from 0% to 41%). The initial contamination, measured with a sensitive filtration method, was low (92% of contaminated products below 1 CFU g⁻¹) and growth was limited.

Conclusion: Growth was consistent with results of a predictive model including microbial competition.

Significance and Impact of the study: To be included in a quantitative risk assessment.

ORIGINAL ARTICLE

Prevalence and growth of *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated cold-smoked salmon

A. Beaufort¹, S. Rudelle¹, N. Gnanou-Besse¹, M.T. Toquin², A. Kerouanton¹, H. Bergis¹, G. Salvat² and M. Cornu¹

¹ French Food Safety Agency (Afssa), LERQAP, Maisons-Alfort cedex, France

² French Food Safety Agency (Afssa), LERAP, Ploufragan cedex, France

Table 1 Presence of *Listeria monocytogenes* (number of 'positive' packs/number of packs analysed) in CSS from nine French processing plants

	Processing plants									Total	in
	1	2	3	4	5	6	7	8	9		
Periods A ¹ .											
February to June 2001	7/50	1/50	2/50	0/50	0/50	0/50	nt	nt	–	10/300	in
September to December 2001	0/28	5/28	0/36	2/36	0/32	0/36	15/34	5/32	–	27/262	il-
March to April 2002	nt	nt	nt	nt	nt	nt	1/32	3/32	–	4/64	ve
Total	7/78	6/78	2/86	2/86	0/82	0/86	16/66	8/64	–	41/626	¹)
Percentage	9	8	2	2	0	0	24	13	–	6.5	
95% confidence interval	(4–18%)	(3–16%)	(0.3–8%)	(0.3–8%)	(0–4%)	(0–3%)	(16–33%)	(6–23%)	–	–	ig
Period B. ²											
May 2003 to January 2004	–	–	–	–	–	–	19/158	22/172	22/54	63/384	sk
Percentage	–	–	–	–	–	–	12	13	41	16	
95% confidence interval	–	–	–	–	–	–	(8–16%)	(9–17%)	(30–52%)	–	

A¹. Prevalence study: a 'representative' set of 8 plants; 'positive' means presence in 25 g at the end of the shelf life

B.² Enumeration study: a 'biased' set of 3 plants; 'positive' means presence in 30 g (25 g for detection + 5 g for enumeration) in the early shelf life

nt, not tested.

Table 2 Contamination levels of *Listeria monocytogenes* (and food flora) in naturally contaminated CSS for processing plants 7–9 during May 2003 to January 2004

Plant	Number of samples*	Storage times (day)		Observed <i>Listeria monocytogenes</i> contamination levels (CFU g ⁻¹)		
		At 4°C	At 8°C	Initial analysis	Final analysis	
7	8	8	7	<0.2	<0.2	
	1	9	7	<0.2	<0.2	
	1	8	7	<0.2	0.6	
	1	8	7	<0.2	1.6	
	1	8	7	<0.2	49	
	1	8	7	<0.2	66	
	1	9	7	<0.2	360	
	1	nt	nt	<0.2	nt	
	1	8	7	0.2	<0.2	
	1	8	7	0.3	570	
	1	7	7	0.6	<0.2	
	1	8	7	0.6	0.4	
	8	2	10	7	<0.2	<0.2
		3	13	7	<0.2	<0.2
		2	14	7	<0.2	<0.2
		4	15	7	<0.2	<0.2
		1	13	7	<0.2	0.2
1		15	7	<0.2	0.4	
1		13	7	<0.2	0.4	
1		15	7	<0.2	1	
1		15	7	<0.2	2700	
1		13	7	0.2	<0.2	
9	1	15	7	0.2	<0.2	
	1	10	7	0.2	1.4	
	1	15	7	0.2	910	
	1	10	7	0.4	4.8	
	1	10	7	0.6	0.2	
	8	15	7	<0.2	<0.2	
	1	15	7	<0.2	0.2	
	1	15	7	<0.2	1.6	
	1	15	7	<0.2	180	
	1	15	7	<0.2	270	
	1	15	7	0.2	2.6	
	1	15	7	0.2	48	
	2	15	7	0.4	<0.2	
	1	15	7	0.4	600	
	1	15	7	1.0	200	
1	15	7	1.6	250		
1	15	7	2.4	2800		
1	15	7	5.4	350		
1	nt	nt	7.0	nt		

nt, non tested.

*Number of samples in one combination of an observed initial count and an observed final count.

Listeria monocytogenes in smoked salmon

Boquin², A. Kerouanton¹, H. Bergis¹, G. Salvat²

The initial contamination levels, 7 days after the end of processing, are presented in Table 2. Most enumeration results were negative, i.e. absence in 5 grams (<0.2 CFU g⁻¹). Other values were relatively low, as only 8% of the contaminated products reached or exceeded 1 CFU g⁻¹. The highest observed level was 7 CFU g⁻¹. Initial mesophilic aerobic counts ranged from 20 to 10⁷ CFU g⁻¹ (data not shown).

In the second examination 14 or 22 days later, 17% of the contaminated products exceeded 100 CFU g⁻¹, and the highest contamination level detected was 2800 CFU g⁻¹. Final mesophilic aerobic counts ranged from 100 to 3·10⁷ CFU g⁻¹ (data not shown).

Examination of *Listeria monocytogenes* in Seafood Processing Facilities and Smoked Salmon in the Republic of Ireland

DARA LEONG, AVELINO ALVAREZ-ORDÓÑEZ, SARAH ZAOUALI, AND KIERAN JORDAN*

Teagasc Food Research Centre, Moorepark, Fermoy, County Cork, Ireland

MS 15-233: Received 28 May 2015/Accepted 16 July 2015

ABSTRACT

Listeria monocytogenes is a foodborne pathogen that causes listeriosis, a relatively rare but life-threatening disease primarily affecting immunocompromised individuals. The aim of this study was to determine the prevalence of *L. monocytogenes* in the seafood processing industry in the Republic of Ireland. The occurrence of *L. monocytogenes* was determined by regular sampling of both food samples and processing environment swabs at eight seafood processing facilities over two calendar years. All samples were analyzed by the International Organization for Standardization 11290-1 standard method, and the isolates were characterized by PCR, pulsed-field gel electrophoresis, serotyping, and the occurrence of some genes related to survival under stress (SSI-1, Tn6188, and *bcrABC*). A prevalence of 2.5% in 508 samples (433 environmental swabs and 75 food samples) was found. From the isolates obtained, eight different pulsed-field gel electrophoresis profiles were identified, two occurring in more than one facility and one occurring in food and the environment. Five of the eight pulsotypes identified contained at least one of the three stress survival-related genes tested. The tolerance of the isolates to benzalkonium chloride, a representative quaternary ammonium compound, was also examined and ranged from 5.5 ± 0.5 to 8.5 ± 0.5 ppm of benzalkonium chloride. To evaluate the ability of smoked salmon to support the growth of *L. monocytogenes*, including the T4 widespread pulsotype that was isolated, a challenge test was performed on cold-smoked salmon obtained from two separate producers. The results showed clearly that both types of smoked salmon supported the growth of *L. monocytogenes*. Although occurrence of *L. monocytogenes* on seafood was low, this study showed that the smoked salmon used in this study can support the growth of *L. monocytogenes*; therefore, vigilance is required in the processing facilities to reduce the associated risk.



Prevalence and challenge tests of *Listeria monocytogenes* in Belgian produced and retailed mayonnaise-based deli-salads, cooked meat products and smoked fish between 2005 and 2007

M. Uyttendaele^{a,*}, P. Busschaert^b, A. Valero^c, A.H. Geeraerd^d, A. Vermeulen^a, L. Jacxsens^a, K.K. Goh^b, A. De Loy^a, J.F. Van Impe^b, F. Devlieghere^a

^a Laboratory of Food Microbiology

^b Division of Chemical Engineering

^c Department of Food Safety and Food Quality

^d Division of Mechatronics

A B S T R A C T

Processed ready-to-eat (RTE) foods with a prolonged shelf-life under refrigeration are at risk products for listeriosis. This manuscript provides an overview of prevalence data ($n = 1974$) and challenge tests ($n = 299$) related to *Listeria monocytogenes* for three categories of RTE food i) mayonnaise-based deli-salads (1187 presence/absence tests and 182 challenge tests), ii) cooked meat products (639 presence/absence tests and 92 challenge tests), and iii) smoked fish (90 presence/absence tests and 25 challenge tests), based on data records obtained from various food business operators in Belgium in the frame of the validation and verification of their HACCP plans over the period 2005–2007.

L. monocytogenes was detected in 27.8% (25/90) smoked fish samples, while 4/25 positive samples failed to comply to the 100 CFU/g limit set out in EU Regulation 2073/2005.

Challenge testing of smoked fish showed growth of *L. monocytogenes* in 12/25 samples stored for 3–4 weeks at 4 °C. Of 45 (non-inoculated) smoked fish samples (13 of which were initially positive in 25 g) which were subjected to shelf-life testing, numbers exceeded 100 CFU/g in only one sample after storage until the end of shelf-life. Predictive models, dedicated to and validated for a particular food category, taking into account the inhibitory effect of various factors in hurdle technology, provided predictions of growth potential of *L. monocytogenes* corresponding to observed growth in challenge testing.

DRAFT MICROBIOLOGICAL RISK ASSESSMENT

LISTERIA MONOCYTOGENES

IN

COLD-SMOKED SALMON

April 2002

Table of contents

OBJECTIVE	4
Background	4
Methodology	6
RISK ASSESSMENT	6
<i>General considerations</i>	6
1. <i>HAZARD IDENTIFICATION</i>	7
1.1 <i>Listeria monocytogenes</i>	7
1.2 Incidence of Listeriosis	7
1.2.1 Sporadic cases and outbreaks	7
1.2.2 International	7
1.2.3 Australia and New Zealand	8
1.2.4 Epidemiological links between seafood and listeriosis	8
1.3 Association of <i>Listeria monocytogenes</i> with seafood	9
1.3.1 Recalls of seafood due to the presence of <i>L. monocytogenes</i> (Australia and New Zealand)	9
1.3.2 Seafood imports associated with <i>L. monocytogenes</i> (Australia and New Zealand)	10
1.3.5 Incidence of <i>Listeria</i> spp. in cold-smoked salmon – published	11
1.3.6 Incidence of <i>Listeria</i> spp. in cold-smoked salmon in Australia and New Zealand – unpublished	13
1.3.7 Summary of incidence data	14
2. <i>HAZARD CHARACTERISATION</i>	14
2.1 Listeriosis	14
2.1.1 The Disease and Population Susceptibility	14
2.1.2 Infective dose and risk quantification	15
2.2 Growth conditions for <i>Listeria monocytogenes</i>	15
2.3 Growth potential for <i>Listeria monocytogenes</i> in cold-smoked salmon	16
2.4 Sources and routes of contamination of seafood with <i>Listeria</i>	17
3. <i>EXPOSURE ASSESSMENT</i>	18
3.1 Post-cooking conditions	18
3.1.1 Storage time	18
3.1.2 Storage temperatures	18
3.1.3 Packaging	19
3.2 Consumption data for seafood	19
3.2.1 Consumption of smoked salmon in Australia and New Zealand	19
3.2.2 Estimated annual number of servings of smoked salmon in Australia and New Zealand	19
3.2.4 Limitations of consumption data	20
4. <i>RISK CHARACTERISATION</i>	21
5. <i>CONCLUSION</i>	21

DRAFT MICROBIOLOGICAL RISK ASSESSMENT

LISTERIA MONOCYTOGENES

IN

COLD-SMOKED SALMON

April 2002

2.3 Growth potential for *Listeria monocytogenes* in cold-smoked salmon

Cold-smoked salmon has an approximate pH of 6, and a water activity range of 0.983 – 0.964. The salt content of cold-smoked salmon is 3-6% (Ross *et al* 2000). These conditions support the growth of *L. monocytogenes*. The process used to cold-smoke salmon is not listericidal.

Therefore, storage temperatures and shelf life for cold-smoked can have a significant impact on bacterial numbers if contamination occurs.

There have been several studies on the growth rate of *L. monocytogenes* in cold-smoked salmon. In addition, studies have been conducted on other smoked finfish. These studies provide an average growth rate in smoked fish of 0.155 logs/day at 5°C. This is a moderate growth rate compared to most other ready to eat foods (US FDA 2001).

DRAFT MICROBIOLOGICAL RISK ASSESSMENT

LISTERIA MONOCYTOGENES

IN

COLD-SMOKED SALMON

April 2002

5. CONCLUSION

The data suggests that there is potential for smoked salmon to be contaminated with *L. monocytogenes*, and that growth of *L. monocytogenes* in smoked salmon is moderate. The shelf life of smoked salmon is four to six weeks, and *L. monocytogenes* could potentially grow to levels that may pose a risk to public health and safety. Smoked salmon is a high risk food, particularly for vulnerable subgroups.

Effect of Salt, Smoke Compound, and Storage Temperature on the Growth of *Listeria monocytogenes* in Simulated Smoked Salmon†

CHENG-AN HWANG*

Microbial Food Safety Research Unit, Eastern Regional Research Center, Agricultural Research Service, U.S. Department of Agriculture, 600 East Mermaid Lane, Wyndmoor, Pennsylvania 19038, USA

MS 07-068: Received 6 February 2007/Accepted 15 May 2007

ABSTRACT

Smoked salmon can be contaminated with *Listeria monocytogenes*. It is important to identify the factors that are capable of controlling the growth of *L. monocytogenes* in smoked salmon so that control measures can be developed. The objective of this study was to determine the effect of salt, a smoke compound, storage temperature, and their interactions on *L. monocytogenes* in simulated smoked salmon. A six-strain mixture of *L. monocytogenes* (10^2 to 10^3 CFU/g) was inoculated into minced, cooked salmon containing 0 to 10% NaCl and 0 to 0.4% liquid smoke (0 to 34 ppm of phenol), and the samples were stored at temperatures from 0 to 25°C. Lag-phase duration (LPD; hour), growth rate (GR; log CFU per hour), and maximum population density (MPD; log CFU per gram) of *L. monocytogenes* in salmon, as affected by the concentrations of salt and phenol, storage temperature, and their interactions, were analyzed. Results showed that *L. monocytogenes* was able to grow in salmon containing the concentrations of salt and phenol commonly found in smoked salmon at the prevailing storage temperatures. The growth of *L. monocytogenes* was affected significantly ($P < 0.05$) by salt, phenol, storage temperature, and their interactions. As expected, higher concentrations of salt or lower storage temperatures extended the LPD and reduced the GR. Higher concentrations of phenol extended the LPD of *L. monocytogenes*, particularly at lower storage temperatures. However, its effect on reducing the GR of *L. monocytogenes* was observed only at higher salt concentrations (>6%) at refrigerated and mild abuse temperatures (<10°C). The MPD, which generally reached 7 to 8 log CFU/g in salmon that supported *L. monocytogenes* growth, was not affected by the salt, phenol, and storage temperature. Two models were developed to describe the LPD and GR of *L. monocytogenes* in salmon containing 0 to 8% salt, 0 to 34 ppm of phenol, and storage temperatures of 4 to 25°C. The data and models obtained from this study would be useful for estimating the behavior of *L. monocytogenes* in smoked salmon.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Food Control

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodcont

Smoked salmon industry practices and their association with *Listeria monocytogenes*



Ovidiu Rotariu ^{a,*}, D. John I. Thomas ^b, Kaarin E. Goodburn ^c, Michael L. Hutchison ^b,
Norval J.C. Strachan ^a

^a School of Natural and Computing Sciences,

^b Hutchison Scientific Ltd, Wolverhampton St

^c Chilled Food Associates, Poplars Farm Road,

ABSTRACT

This study was conducted to analyse the current practices used by the Scottish smoked salmon industry that will affect the likelihood of *Listeria monocytogenes* contamination in products. Sixteen visits to smoked salmon premises were conducted between June and November 2011, interviews were carried out based on a questionnaire. The results indicate that most processors carry out appropriate food safety practices, but some improvements are needed in order to minimize the risk of *Listeria* contamination. It was found that the larger processors achieved better temperature control than the smaller processors. Approximately half of the visited premises needed to improve their refrigerated storage. The risk of ceiling condensation dripping onto product was a common problem, but the smaller premises were the most affected. Small food business operators require additional information on how cleaning and sanitation throughout the process can reduce contamination of the final product. Furthermore, guidance describing the best way of determining shelf life was requested by small processors. Fifty six percent of the smoked salmon processors (mostly large and medium size) tested the product for *L. monocytogenes* and prevalence ranged widely (0–12%) between processors. Those processors having the highest *Listeria* prevalence were also those most concerned about what microbiological testing should be carried out and how to evaluate the quality of their products. Most processors rarely exceeded (i.e. once every several years) the statutory limit set by the European Union (>100 cfu/g or presence in 25 g). The small producers did not undertake product testing for *Listeria* because of high test costs and lack of technical expertise. Hence, it was concluded that sharing expertise between producers, especially to smaller processors would be beneficial in terms of consumer protection.

.....**grazie per l'attenzione!**



Damiano Comin

Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie
SCS8-Valorizzazione delle Produzioni Alimentari
Tel. +39 0421 41361 - Cell.+39 335/230290
E-mail dcomin@izsvenezie.it