Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna

Lo studio di shelf-life negli alimenti pronti al consumo : *Listeria monocytogenes*

Lia Bardasi

IZSLER – Sezione di Bologna

Perché *Listeria monocytogenes* ?

- PATOGENO con ELEVATA LETALITA' 25-30% e OSPEDALIZZAZIONE >92%

DIVERSE CARATTERISTICHE AUMENTANO LA SUA IMPORTANZA COME PATOGENO ALIMENTARE:

- PSICROTROFA
- AEROBIA E FACOLTATIVAMENTE ANAEROBIA
- RESISTENTE NELL' AMBIENTE E .. SULLE ATTREZZATURE

PRODOTTI DA CONSUMARSI PREVIA COTTURA (crudi/pastorizzati/congelati) :
O.M. 7 dicembre1993 Limiti di *Listeria monocytogenes* in alcuni prodotti alimentari

Reg.2073/2005 introduce il criterio di sicurezza alimentare per altre categorie di alimenti:
ALIMENTI PRONTI PER LATTANTI e a fini medici speciali
ALIMENTI PRONTI DIVERSI da quelli per lattanti che sostengono o non sostengono la crescita di *Listeria monocytogenes*

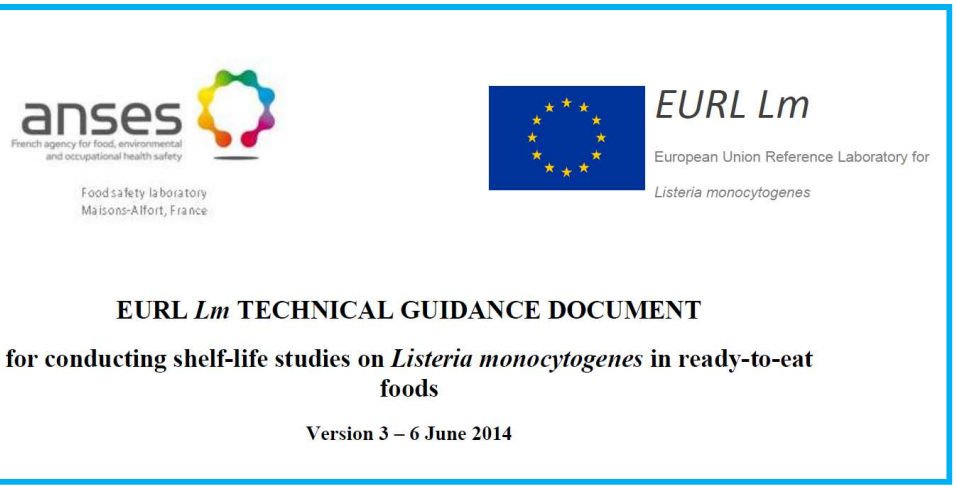
REGOLAMENTO (CE) n. 2073/2005 DELLA COMMISSIONE del 15 novembre 2005
sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari

CRITERI MICROBIOLOGICI
NEI PRODOTTI RTE

RTE COME MEZZO DI DIFFUSIONE DEL PATOGENO *LISTERIA MONOCYTOGENES*, POTENZIALE RISCHIO PER LA SALUTE PUBBLICA

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES
Brussels, C(2008)
COMMISSION STAFF WORKING DOCUMENT

GUIDANCE DOCUMENT
on *Listeria monocytogenes* shelf-life studies for ready-to-eat foods, under Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs



Shelf-life is defined as a period of time for which a product remains safe and meets its quality specifications under expected storage and use.

- **Articolo 3 del Reg CE 2073/2005**

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.

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.

Cap.1 Criteri di Sicurezza alimentare (Reg. 2073)

relativamente al criterio *Listeria monocytogenes* vengono individuate 2 categorie:
favorevoli e non favorevoli alla crescita

pH ≤ 4,4 o Aw ≤ 0,92
pH ≤ 5,0 e Aw ≤ 0,94

Periodo di conservabilità (note 5,7,8 cap.1)
< 5 giorni

Altri Alimenti non favorevoli alla crescita:

-prodotti congelati, con trattamento termico efficace, molluschi bivalvi vivi, frutta e verdura fresca non lavorata, pane, biscotti, bibite, vino, zucchero, miele, cioccolata (nota 4 capitolo 1 + SANCO/1628/2008)

Tutti gli altri sono per definizione favorevoli alla crescita

A meno che non venga dimostrato il contrario

➢Alimenti RTE favorevoli alla crescita:

Richiesta l'assenza in 25 g alla fine della produzione .

A meno che il produttore non dimostri che il livello non supera 100 UFC/g durante shelf-life

1.2	Alimenti pronti che costituiscono terreno favorevole alla crescita di *L. monocytogenes*, diversi da quelli destinati ai lattanti e a fini medici speciali	*Listeria monocytogenes*	5	0	100 ufc/g (c)	EN/ISO 11290-2 (a)	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
			5	0	Assente in 25 g (c)	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 *L. monocytogenes*, diversi da quelli destinati ai lattanti e a fini medici speciali (a) (b)	*Listeria monocytogenes*	5	0	100 ufc/g	EN/ISO 11290-2 (a)	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità

➢Alimenti RTE non favorevoli alla crescita:

Limite microbiologico: inferiore a 100 UFC/g durante la vita commerciale

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

— ***PROVE PER DETERMINARE LE CARATTERISTICHE FISICO.CHIMICHE DEL PRODOTTO***
(es pH, aw, contenuto salino, conservanti, …) + ***CARATTERISTICHE ESTRINSECHE***

— ***CONSULTAZIONE DELLA LETTERATURA SCIENTIFICA DISPONIBILE***
(caratteristiche di sviluppo e di sopravvivenza dei microrganismi)

Se necessario, l'operatore del settore alimentare effettua studi ulteriori …..

Table 1. Intrinsic and Extrinsic Characteristics[a]

Intrinsic	Extrinsic
pH and type of acid present[b]	**Temperature (during production, storage, distribution and display)**[b]
Water activity (a_w)[b]	**Packaging**[b]
Redox potential (E_h)	Gas atmosphere
Natural barriers	Relative humidity
Nutritional content of food and availability	Food processing
Antimicrobial substances	Good manufacturing and hygiene practices
Microflora	Historical data[c]
Microbiological quality of ingredients	Storage and distribution
Food formulation and composition	Consumer practices
Food assembly and structure	Procedures based on HACCP

ALLEGATO II **Se necessario, l'operatore del settore alimentare effettua studi ulteriori …..**

— utilizzo di MODELLI MATEMATICI PREDITTIVI
stabiliti per il prodotto alimentare in esame, utilizzando fattori critici di sviluppo o di sopravvivenza per i microrganismi presenti nel prodotto

— studi di DURABILITA' per valutare lo sviluppo o la sopravvivenza dei microrganismi presenti nel prodotto durante il periodo di conservabilità, in condizioni ragionevolmente prevedibili di distribuzione, conservazione e uso.

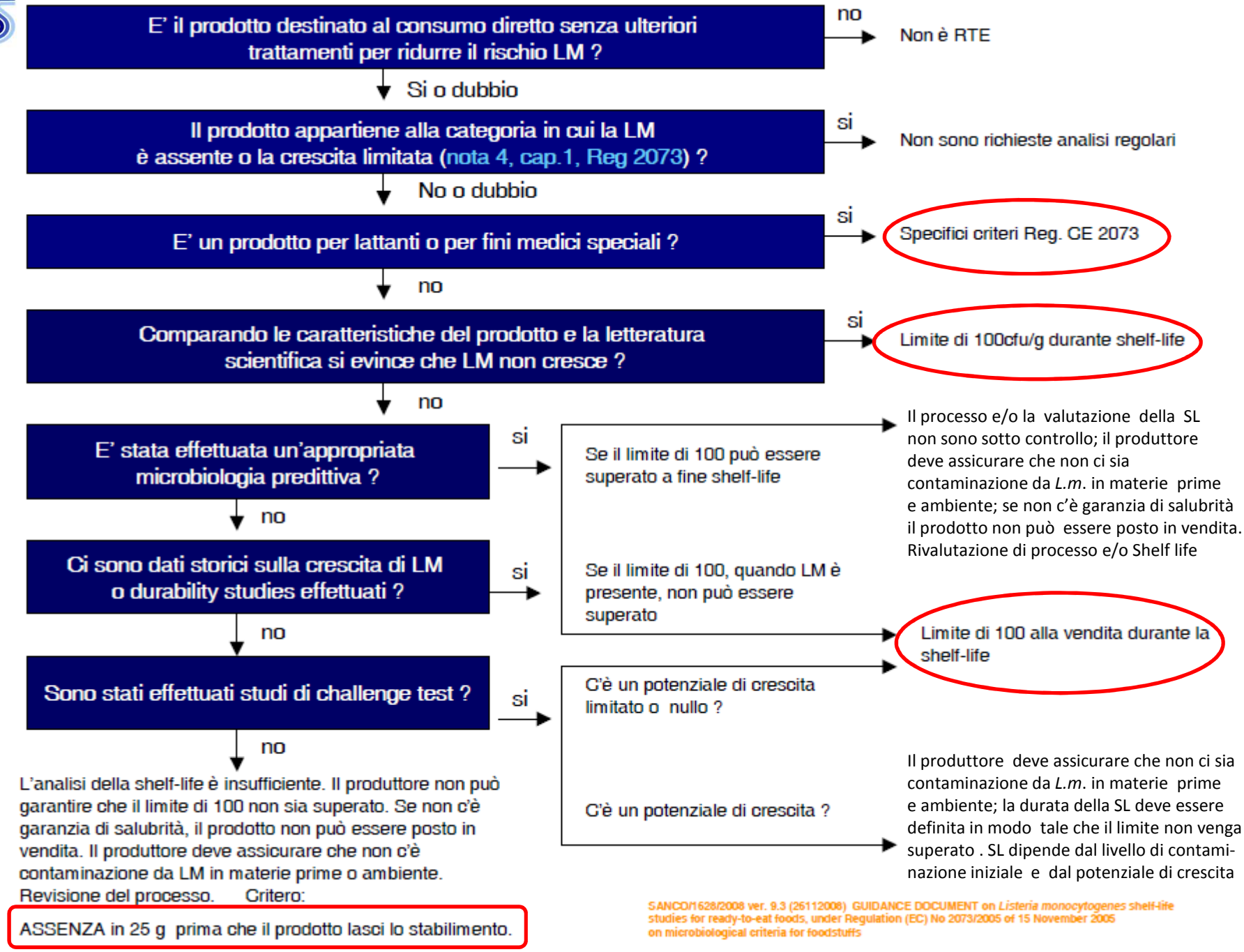
— CHALLENGE TEST per determinare la capacità dei microrganismi in questione, debitamente inoculati, di svilupparsi o sopravvivere nel prodotto in ≠ condizioni di conservazione ragionevolmente prevedibili

COMMISSION OF THE EUROPEAN COMMUNITIES
Brussels, C(2008)
COMMISSION STAFF WORKING DOCUMENT

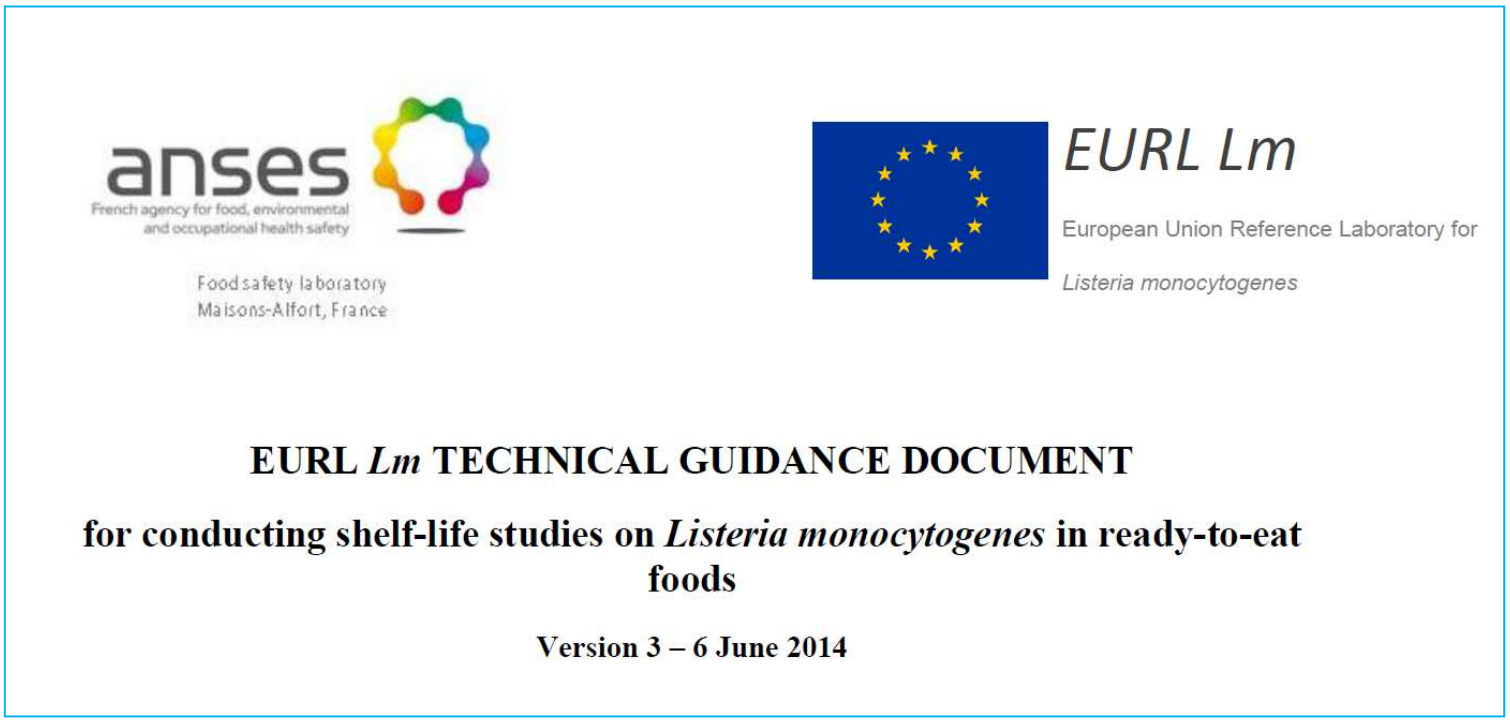
GUIDANCE DOCUMENT
on *Listeria monocytogenes* shelf-life studies for ready-to-eat foods, under Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs

This document is mainly directed at Food Business Operators who produce ready-to-eat foods and conduct *Listeria monocytogenes* shelf-life studies for them in accordance with Article 3(2) and Annex II of Reg.2073/2005

Attraverso un albero delle decisioni fornisce **indicazioni su quando siano necessari studi addizionali specifici** per investigare la crescita di *L.monocytogenes*.

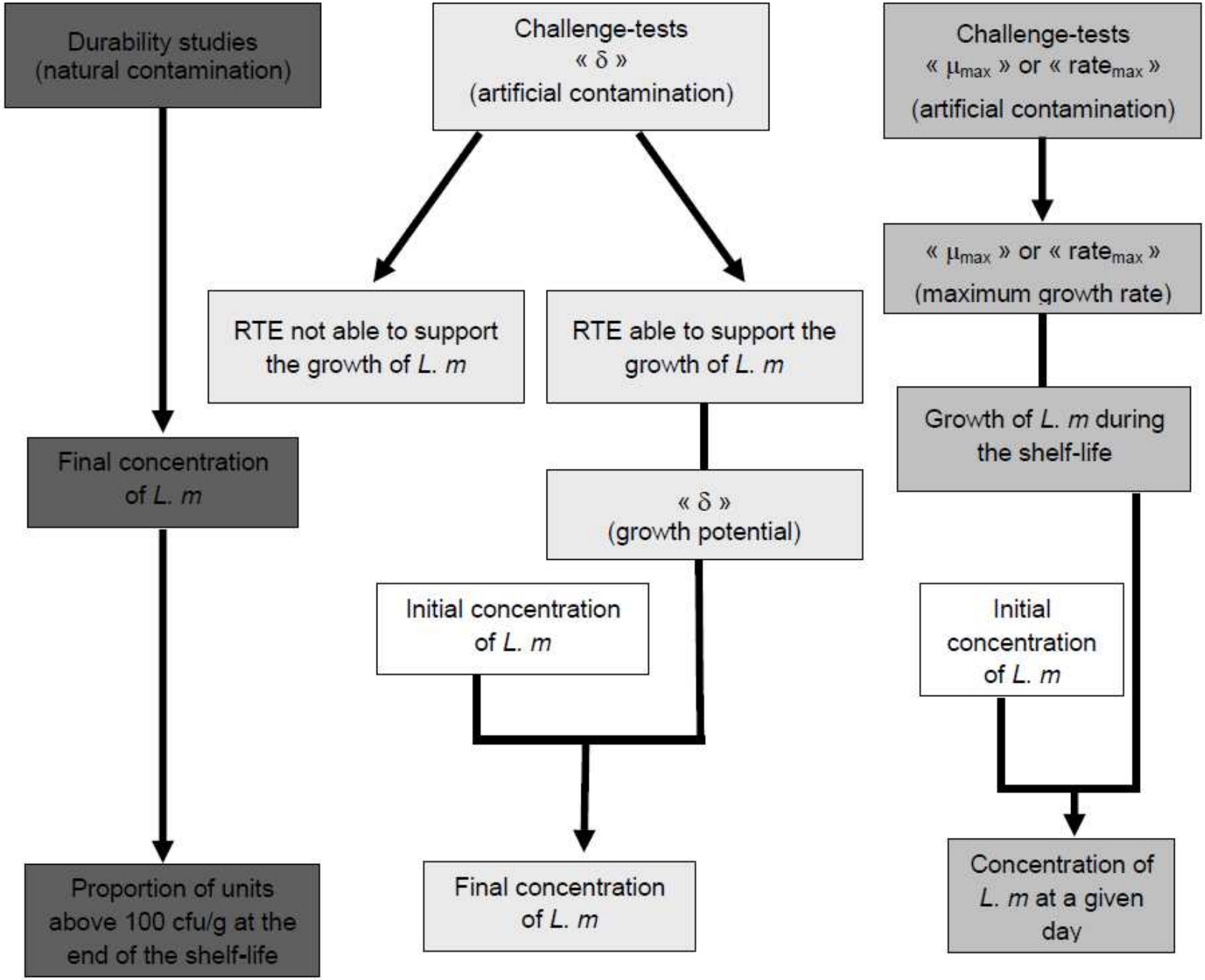


SANCO/1628/2008 ver. 9.3 (26112008) GUIDANCE DOCUMENT on *Listeria monocytogenes* shelf-life studies for ready-to-eat foods, under Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs



LA **SHELF LIFE DEVE ESSERE DETERMINATA SUL PRODOTTO <u>COSI' COME COMMERCIALIZZATO</u> DAL PRODUTTORE**

LA SCELTA DELLO STUDIO DA EFFETTUARE DOVREBBE ESSERE FATTA DAL FBO
SE NECESSARIO CON LA COLLABORAZIONE DEL LABORATORIO


Durability studies
(natural contamination)
Final concentration
of L. m
Proportion of units
above 100 cfu/g at the
end of the shelf-life
Challenge-tests
« δ »
(artificial contamination)
RTE not able to support
the growth of L. m
RTE able to support the
growth of L. m
« δ »
(growth potential)
Initial concentration
of L. m
Final concentration
of L. m
Challenge-tests
« μmax » or « ratemax »
(artificial contamination)
« μmax » or « ratemax »
(maximum growth rate)
Growth of L. m during
the shelf-life
Initial
concentration
of L. m
Concentration of
L. m at a given
day

EURL *Lm* TECHNICAL GUIDANCE DOCUMENT

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

Version 3 – 6 June 2014

Studi di conservabilità

(contaminazione naturale)

- **Più realistici ma non utili in caso di bassa prevalenza e basso livello di contaminazione**
- **Bassa probabilità di testare campioni contaminati**
- **Livello di contaminazione naturale variabile, non omogenea nel lotto**

Challenge Test

Potenziale di crescita (δ)

- **Livello 1: relativamente semplice**
- **Consente di rispondere alla domanda: il prodotto sostiene la crescita del batterio?**

Challenge Test Tasso di crescita massimo (μ max)

- **Livello 2: più complesso**
- **Consente di rispondere alla domande:**

Data una conc. Iniziale, quale conc. avrò al giorno x?

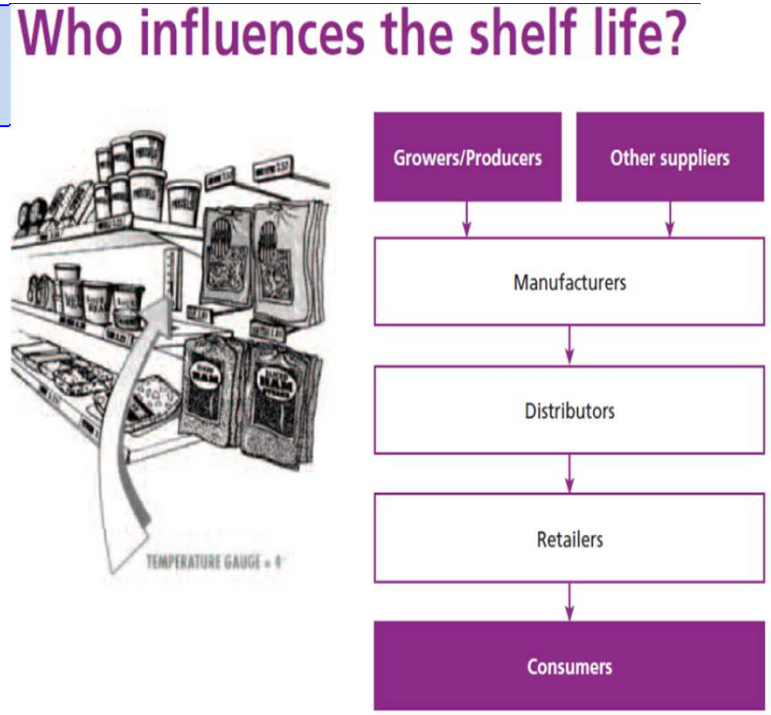
Quale conc. iniziale deve rispettare per garantire <100 ufc/g a fine processo?

Challenge Test

DEFINIZIONE

Test per individuare la capacità del **microrganismo opportunamente inoculato** di crescere o sopravvivere nel prodotto in diverse condizioni di trattamento o conservazione

Challenge Test : VALUTAZIONI PRELIMINARI



- Conoscenza del prodotto RTE

  Caratteristiche che variano

  durante la SL
- Confezionamento (ATM?)
- **Caratterizzazione della catena del freddo**

FBO è responsabile dell'individuazione delle condizioni di conservazione definite per la valutazione della Shelf Life

Challenge Test : Numero dei lotti da utilizzare per la prova

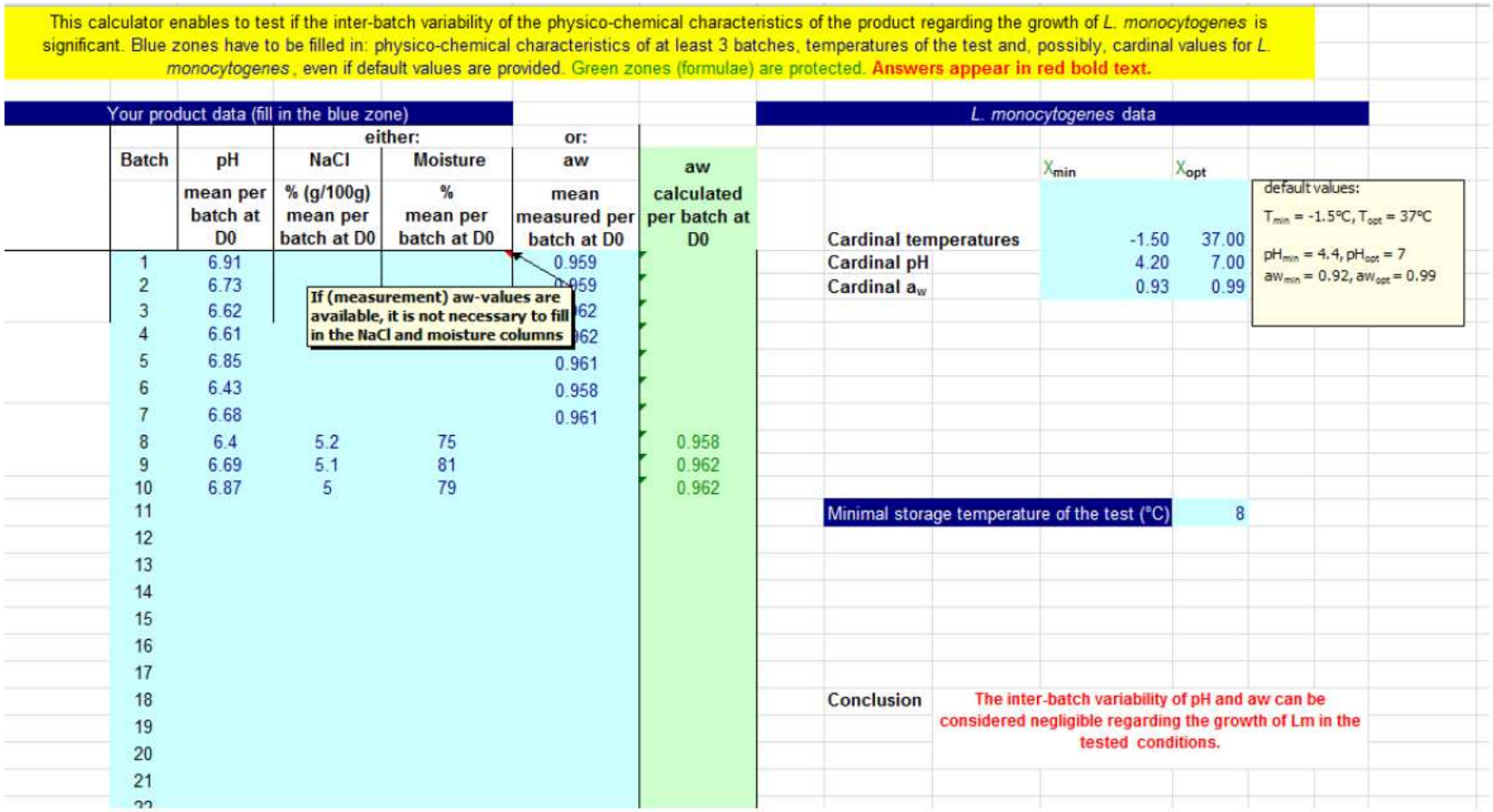
La versione 3 del Giugno 2014 introduce la possibilità di utilizzare un solo lotto se:

- Bassa probabilità di crescita di *Listeria monocytogenes*

  (≤ 10 % , calcolata tramite software di microbiologia predittiva)

- Variabilità trascurabile fra le caratteristiche fisico chimiche (ph e Aw) di almeno 3 lotti in relazione alla capacità di sviluppo di *L. monocytogenes*

Esempio



This calculator enables to test if the inter-batch variability of the physico-chemical characteristics of the product regarding the growth of *L. monocytogenes* is significant. Blue zones have to be filled in: physico-chemical characteristics of at least 3 batches, temperatures of the test and, possibly, cardinal values for *L. monocytogenes*, even if default values are provided. Green zones (formulae) are protected. **Answers appear in red bold text.**

Your product data (fill in the blue zone)

Batch	pH	either: NaCl	Moisture	or: aw	aw
	mean per batch at D0	% (g/100g) mean per batch at D0	% mean per batch at D0	mean measured per batch at D0	calculated per batch at D0
1	6.91			0.959	
2	6.73			0.959	
3	6.62			0.962	
4	6.61			0.962	
5	6.85			0.961	
6	6.43			0.958	
7	6.68			0.961	
8	6.4	5.2	75		0.958
9	6.69	5.1	81		0.962
10	6.87	5	79		0.962
11					
12					
13					
14					
15					
16					
17					
18					
19					
20					
21					

If (measurement) aw-values are available, it is not necessary to fill in the NaCl and moisture columns

L. monocytogenes data

	X_{min}	X_{opt}
Cardinal temperatures	-1.50	37.00
Cardinal pH	4.20	7.00
Cardinal a_w	0.93	0.99

default values:
T_{min} = -1.5°C, T_{opt} = 37°C
pH_{min} = 4.4, pH_{opt} = 7
aw_{min} = 0.92, aw_{opt} = 0.99

Minimal storage temperature of the test (°C)	8

Conclusion: The inter-batch variability of pH and aw can be considered negligible regarding the growth of Lm in the tested conditions.

Figure 3: Example of the use of the calculator to determine the inter-batch variability of the physico-chemical characteristics (Excel file)

Challenge Test : Determinazioni analitiche

Caratteristiche chimico fisiche:

almeno **pH, Aw** o (conc NaCl+umidità) ad inizio e fine SL.

Idem per altri parametri eventualmente significativi

Atmosfera gassosa:

Se necessario (ATM) opportuno valutare le **composizioni gassose a inizio e fine test**;

Analisi microbiologiche:

Su *Listeria monocytogenes* : ISO 11290-1 e 11290-2

Su flora microbica contaminante: es. CBT, batteri lattici, *Pseudomonas*, lieviti e muffe..

Challenge Test : Quali ceppi utilizzare

- Versione 2008

Almeno 3 ceppi di cui uno di collezione e due di campo

- Versione 2014

Almeno due ceppi di cui uno di campo e uno di cui siano note le caratteristiche di crescita

- Possibile utilizzo di *Listeria innocua* come surrogato in situazioni particolari

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

Challenge Test : preparazione inoculo

7.3.1 Preparation of subcultures for strain 1

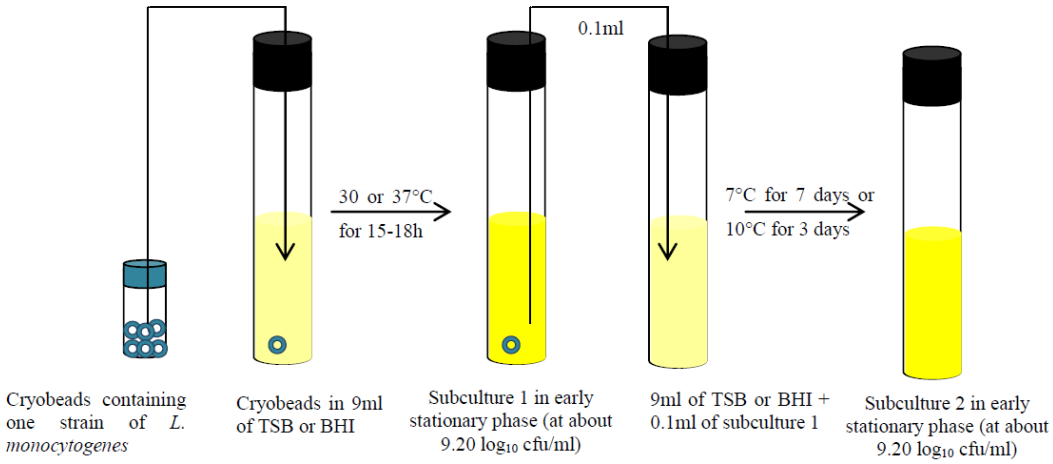


Figure 9: Preparation of the 2 subcultures for each strain

Es. per Growth potential miscela di ceppi

7.3.2 Preparation of the inoculum for challenge test assessing growth potential

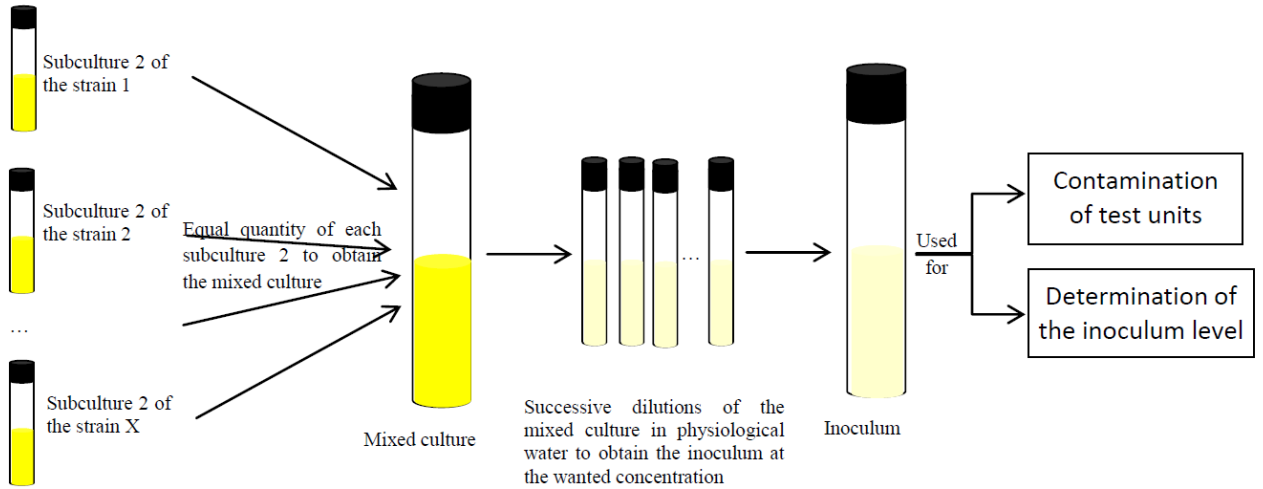


Figure 10: Preparation of the inoculum from the subcultures 2

Challenge Test : modalità di inoculo

- Mantenere inalterate le caratteristiche chimico fisiche dell'alimento: Volume di inoculo non superiore a 1%

- Livello di contaminazione circa 100 ufc/g

- Modalità di inoculo scelta in base all'ipotetica possibilità di contaminazione reale: in superficie, nella massa..
Possibile utilizzare anche immersione, se assenza di interferenze su proprietà ch/fis

- Mantenere le modalità di confezionamento (prodotti in atmosfera modificata).

Challenge Test

GROWTH POTENTIAL (δ) (1)

- **Misura la crescita di *L.m.*** in un alimento artificialmente contaminato e conservato in condizioni prevedibili di trasporto, stoccaggio al dettaglio e presso il consumatore finale.

- Il **potenziale di crescita (δ)** è la differenza fra il $\log_{10}$ cfu/g finale e il $\log_{10}$ cfu/g all'inizio del test

Challenge Test

GROWTH POTENTIAL (δ) (2)

- δ dipende da diversi fattori:

-ceppi usati per l'inoculo

-livello dell'inoculo

-stato fisiologico delle cellule inoculate

-proprietà intrinseche dell'alimento (pH,Aw,microflora , conservanti..)

-proprietà estrinseche (profilo tempo/temperatura, atmosfera gassosa..)

Challenge Test

GROWTH POTENTIAL (δ) (3)

δ può essere usato per:

- **classificare l'alimento** nella categoria corretta:

Se **δ > 0,5** $\log_{10}$ cfu/g l'alimento rientra nella categoria 1.2, ovvero fra quelli che **sostengono** la crescita di L.m.

Se **δ ≤ 0,5** $\log_{10}$ cfu/g l'alimento rientra nella categoria 1.3, ovvero fra quelli che **non sostengono** la crescita di L.m.

- **quantificare lo sviluppo di *L.m*.** in alimento di cat.1.2 in **condizioni** ragionevolmente **prevedibili** definite fra la produzione ed e la fine della SL.

Challenge Test : GROWTH POTENTIAL (δ)(4) schema sperimentale

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

	"day 0"[a)]	"day end"[b)]
Enumeration of *L. monocytogenes* in inoculated test units	3	3
Detection of *L. monocytogenes* 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 Enumeration of the associated microflora in non-inoculated test units	1	1

a) "day 0": the day of inoculation

b) "day end": the end of the shelf-life

Opportuno inserire tempi di analisi intermedi
Considerare che a volte L.m. può incrementare rapidamente all'inizio della S.L. prima di decrescere altrettanto rapidamente

Challenge Test : GROWTH POTENTIAL (δ)(5) schema sperimentale

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 *L. monocytogenes* in inoculated test units		3	3	3	3	3
Detection of *L. monocytogenes* 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 : GROWTH POT. (δ)(6) temperature di stoccaggio

Table 3: Flow diagram of storage (incubation) conditions

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

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

Challenge Test : GROWTH POT. (δ)(7) temperature di stoccaggio

Responsabilità del produttore l'individuazione delle temperature;
Scelte sbagliate portano a valutazioni sbagliate

Scenario #1: a constant temperature at 4°C;

Scenario #2: includes 3 steps (one third of the shelf-life for each step), (i) 4°C to mimic transportation from plant to retail, (ii) 8°C to mimic storage at retail and (iii) 8°C to mimic storage at consumer;

Scenario #3: includes 3 steps (one third of the shelf-life for each step), (i) 8°C to mimic transportation from plant to retail, (ii) 12°C to mimic storage at retail and (iii) 12°C to mimic storage at consumer.

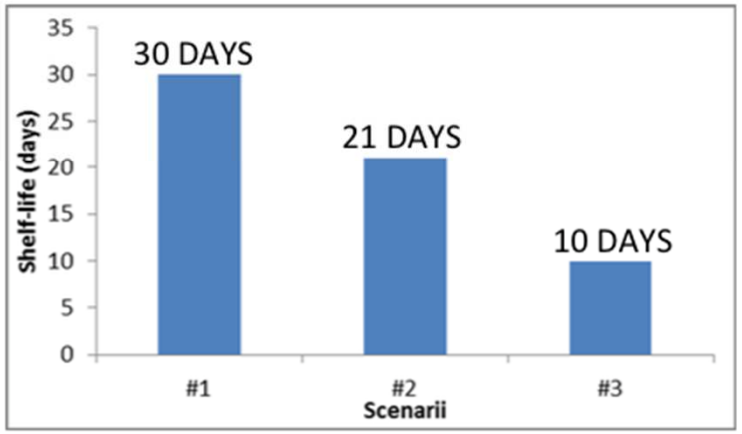


Figure 13: Shelf-life of a meat product related to the different scenarii

Challenge Test : GROWTH POTENTIAL (δ)(8) esempio

Table 4. First example of results obtained from a growth potential test.

CONVERSION in $\log_{10}$

Batches	Day	Concentration (cfu/g)	Concentration ($\log_{10}$ cfu/g) **In bold: median**	Growth potential "δ" per batch ($\log_{10}$ cfu/g)	Highest"δ" among the 3 batches ($\log_{10}$ cfu/g)
1	"day 0"	140	**2.15**	2.11-2.15=-0.04	**0.10**
		150	2.18		
		120	2.08		
	"day end"	140	2.15		
		120	2.08		
		130	**2.11**		
2	"day 0"	150	2.18	2.11-2.11=0.00	
		130	2.11		
		130	**2.11**		
	"day end"	130	**2.11**		
		140	2.15		
		110	2.04		
3	"day 0"	110	2.04	2.18-2.08=0.10	
		130	2.11		
		120	**2.08**		
	"day end"	150	**2.18**		
		140	2.15		
		180	2.26		

Challenge Test : GROWTH POT. (δ)(9) VALUTAZIONE ED UTILIZZO

δ può essere usato per **classificare l'alimento :**

- **0,5** $\log_{10}$ cfu/g **sostiene** la crescita;
- **≤ 0,5** $\log_{10}$ cfu/g **non sostiene** la crescita

δ può essere usato per predire la crescita di *L.m.* :

Concentrazione finale = concentrazione iniziale + δ

QUESTION 2: What is the concentration of *L. monocytogenes* at the end of the test, knowing that the initial concentration is 1 $\log_{10}$ cfu/g?

The predicted concentration of *L. monocytogenes* at the end of the test is:

final concentration = initial concentration + δ

$1 + 0.70 = 1.70 \log_{10}$ cfu/g

(below the legal limit of 2 $\log_{10}$ cfu/g)

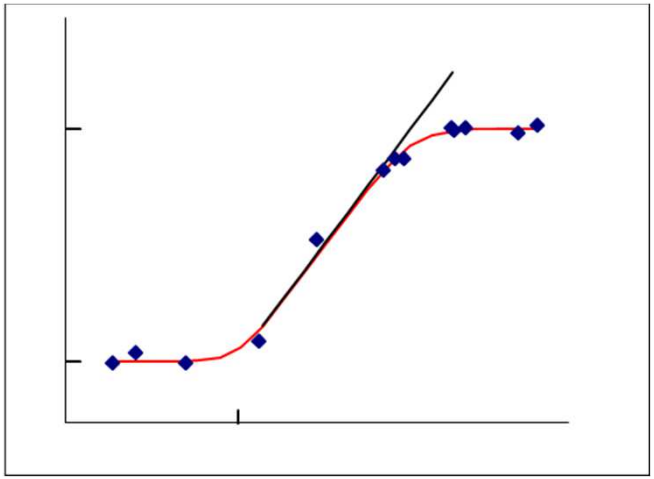
Il δ si può usare solo per il prodotto testato/condizioni

Challenge Test

MAXIMUM GROWTH RATE (μ_{max}) (1)

Misura il **TASSO di CRESCITA** di **un ceppo di *L.m*** in un prodotto artificialmente contaminato e conservato **ad una Temperatura fissa**.

Dalla curva di crescita si calcola il Maximum Growth Rate del ceppo di L.m. ad una temperatura prefissata.



Nella fase di crescita esponenziale, riportando in grafico il ln di cellule *vs* il tempo si ottiene una linea retta la cui pendenza è μ_{max} o Maximum Growth Rate

Challenge Test-CALCOLO MAXIMUM GROWTH RATE (μ_{max})(2)

Per elaborare i dati e stimare μ_{max} si possono usare software come ad es. DMFit

Il programma fornisce i parametri di crescita della curva:

- il tasso di crescita o **Rate** espresso in $\log_{10}$
- La relativa deviazione standard **σ**, usata per calcolare il limite maggiore dell'intervallo di confidenza del rate: + 2 σ , con α= 95%

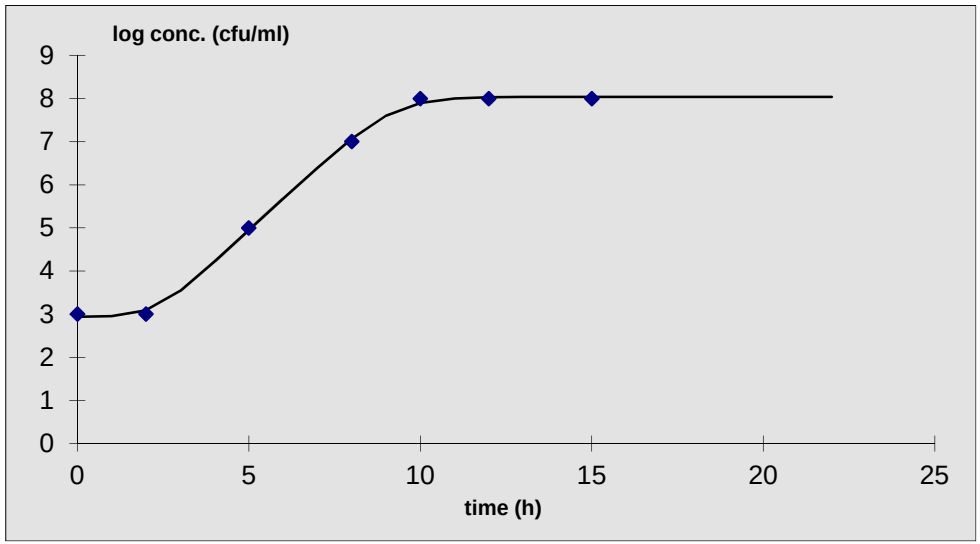
μ_{max} è espresso in logaritmo naturale

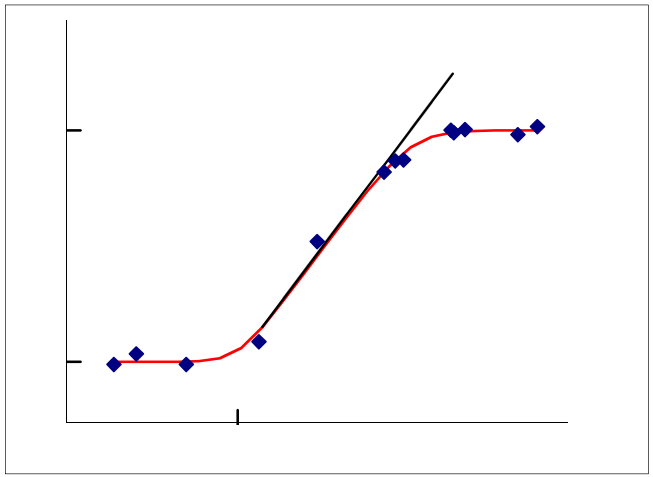
Il tasso (rate) è espresso in logaritmo decimale: $\mu_{max} = \ln 10 \times rate$

Per 3 lotti e due ceppi… si avranno 6 curve di crescita.
Per l'utilizzo dei risultati si sfrutterà il valore maggiore del tasso di crescita fra quelli ottenuti.

Challenge Test

MAXIMUM GROWTH RATE (μ_{max}) (3)





t	logc	DM_fit	A_t	err2Ln params			Lg10 parameters	
0	3	2,937764961	0	0,0038732	mumax	1,685366319	**rate:**	**0,731945292**
2	3	3,08564731	0,202050809	0,007335462	lag	2,250326747	**lag=**	**2,250326747**
5	5	4,949926772	2,750665317	0,002507328	y(0)	6,764453805	**inoc:**	**2,937764961**
8	7	7,064460026	5,749674518	0,004155095	y(end)	18,50943223	**final conc:**	**8,03854428**
10	8	7,894581726	7,749673268	0,011113013	M	10		
12	8	8,029198934	9,749673253	0,000852578	N	5	**dbltime=**	**0,411273901**
15	8	8,03841695	12,74967325	0,001475862				
					ss2=	**0,031312537**		

Challenge Test- MAXIMUM GROWTH RATE (μ_{max})(3)

E’ un parametro importante della curva di crescita che dipende da :

- Ceppo inoculato
- Proprietà intrinseche dell’alimento
- Proprietà estrinseche dell’alimento (temperatura, umidità, atmosfera)

Flessibilità:

- consente di estrapolare una μ_{max} ad una certa temperatura per predire un’ altra μ_{max} ad ad un’altra temperatura in uno stesso alimento
- Permette una stima della concentrazione di *L.m*. ad un certo giorno della SL partendo da una concentrazione iniziale nota.

Challenge Test - MAXIMUM GROWTH RATE (μ_{max})(5)

Numero dei lotti da testare, procedure analitiche per la determinazione delle caratteristiche chimico fisiche e per le determinazioni microbiologiche, modalità di allestimento degli inoculi sono uguali a quelli previsti per la determinazione del potenziale di crescita.

IN QUESTO CASO PERO':

- Necessario testare almeno due ceppi **separatamente** per ogni lotto; avremo per ogni inoculo con ceppo singolo una curva di crescita diversa.

- TEMPERATURA di conservazione del prodotto FISSA

Challenge Test

MAXIMUM GROWTH RATE (μ_{max})(6)

Table 6. Minimum number of test units to be prepared per batch

	Test units	
Enumeration of *L. monocytogenes* in inoculated test units	10 to 15 (with 5 to 7 in exponential phase)	
Detection of *L. monocytogenes* in the food in non-inoculated test units	"day 0" 3	"day end" 3
Measurement of physical-chemical characteristics in non-inoculated test units Measurement of gas atmosphere (for product under gas atmosphere) in non-inoculated test units	"day 0" 1	"day end" 1
Enumeration of associated microflora in non-inoculated test units		

Challenge Test – UTILIZZO GROWTH RATE (7)

Noto un Growth rate calcolato ad una certa T_{ref}

è possibile calcolare il Growth rate ad una altra temperatura

sfruttando la seguente formula

(versione semplificata, da usare se T_{ref} e T sono inferiori a 25°C)

$$\text{rate} = \text{rate}_{ref} \cdot \frac{(T - T_{min})^2}{(T_{ref} - T_{min})^2}$$

(with T_{min} = minimal growth temperature for *L. monocytogenes* ≈ -1.5°C)

rate_{ref} and rate may be expressed in $\log_{10}$ cfu/g per time unit.

Challenge Test – UTILIZZO GROWTH RATE (8)

Assumendo un modello molto semplice, senza fase lag o stazionaria,
Posso calcolare la concentrazione dopo un certo periodo ad una certa T..

$$\text{Growth } (\log_{10}) \text{ obtained at } T_{ref} \text{ during a storage time } d_1 \text{ (in days)} = \text{rate}_{ref} \ (\log_{10} \text{ cfu/g per day}) \times d_1$$

Noti i «rate» alle temperature prevedibili di conservazione
Posso calcolare la concentrazione in base al profilo tempo Temperatura che voglio valutare..

Challenge Test: UTILIZZO GROWTH RATE (9) esempi

- Shelf-life: 9 days, "day 0" is the day of production

- Storage conditions: 4°C for 3 days (d_1) and 8°C for 6 days (d_2)

The challenge test was performed at T_{ref} = 8°C.

- $rate_{ref}$ = 1.00 log_{10} cfu/g (Figure 6)

The maximal $rate_{ref}$ could be obtained: $rate_{ref_{max}}$ = 1.00 + (2 x 0.04) = 1.08 log_{10} cfu/g per day (Figure 7).

The secondary model enables to predict rate at T = 4°C

$$rate_{max} = rate_{ref_{max}} \cdot \frac{(T - T_{min})^2}{(T_{ref} - T_{min})^2}$$

The point-estimate is:

$$rate_{max} = [1.08 \frac{(4 - (-1.5))^2}{(8 - (-1.5))^2}]$$
$$= 0.36 \log_{10} \text{cfu/g per day}$$

Then, the maximum growth rate predicted at 4°C is 0.36 log_{10} cfu/g per day.

Challenge Test: UTILIZZO GROWTH RATE (10) esempi

- **Question 1:** what is the growth of *L. monocytogenes* predicted during the shelf-life?

Growth during the shelf-life =

[(rate$_1$ in $\log_{10}$ cfu/g per day) x d_1] + [(rate$_2$ in $\log_{10}$ cfu/g per day) x d_2] where:

$$\text{Growth}_{max} = (0.36 \times 3) + (1.08 \times 6)$$

$$= 7.56 \log_{10} \text{cfu/g}$$

This calculation does not include the lag phase and the stationary phase (i.e. assumes the whole simulated behaviour is exponential growth), and consequently, the results may be (very) fail-safe.

- **Question 2:** what is the concentration of *L. monocytogenes* at the end of the shelf-life if the level for *L. monocytogenes* at day 7 is equal to 1.65 $\log_{10}$ cfu/g?

The maximum level of *L. monocytogenes* at "day end" will be 1.65 + 1.08 x 2 = 3.81 $\log_{10}$ cfu/g).

The limit of 100 cfu/g is exceeded for this product.

STUDI DI CONSERVABILITA' O DURABILITA' (1)

- SI EFFETTUANO SU PRODOTTI NATURALMENTE CONTAMINATI
  consente di stimare la proporzione di unità che superano il limite di 100 ufc/g a fine SL

- FONDAMENTALE E' LA PROCEDURA DI CAMPIONAMENTO CHE DEVE TENER CONTO DELL'ETEROGENEITA' DEL LOTTO.

Campionamento casuale semplice (principio di equiprobabilità)

- CONDIZIONI DI STOCCAGGIO
  analoghe a quelle previste per la valutazione del potenziale di crescita

- METODI DI NUMERAZIONE DI LISTERIA

A fine SL tutte le unità test vengono esaminate per verificare in quante L.m. eccede 100 ufc/g.

STUDI DI CONSERVABILITA' O DURABILITA' (2)

The interpretation of durability studies, which consists in verifying that the limit of 100 cfu/g is not exceeded at the time of consumption, is a different case. As described below, this interpretation can be facilitated by the assessment of the proportion of units exceeding 100 cfu/g (with its associated confidence interval) at the end of shelf-life, after a storage period reflecting the foreseeable conditions of distribution and storage.

From the number (n) of test units taken randomly from a batch (of size N), the estimated proportion (p) of units exceeding 100 cfu/g at the end of shelf-life is derived simply as the observed proportion $p = r / n$ (where r is the number of test units above 100 cfu/g).

STUDI DI CONSERVABILITA' O DURABILITA' (3)

Valuto la **proporzione di unità che superano il valore di 100 uf/g alla fine della SL** (con il relativo intervallo di confidenza) dopo un periodo di conservazione che riflette le normali condizioni di distribuzione e stoccaggio.

Tale proporzione è semplicemente quella osservata ***p = r/n***
(*r* = numero di unità che superano il limite)

Table 7 : Example of estimated proportion of test units > 100 *L. monocytogenes*/g after storage period

n number of analysed test units	*r* number of test units > 100 cfu/g	*p* estimated proportion	CI Confidence Interval at 95%
20	0	0%	[0% – 16%]
100		0%	[0% – 4%]
20	1	5%	[1% – 24%]
100		1%	[0.2% – 5%]
20	2	10%	[3% – 30%]
100		2%	[0.6% – 7%]

IN GENERALE…. CHALLENGE TEST

Verosimiglianza

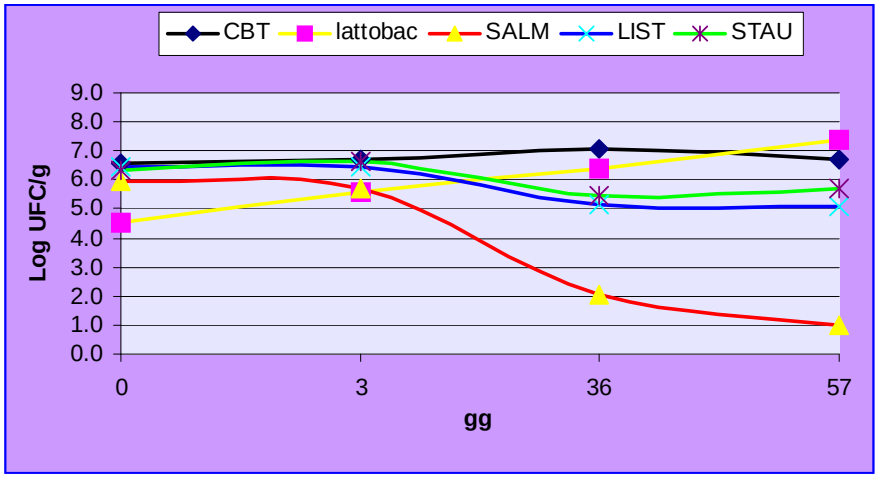
- Riprodurre in condizioni sperimentali:
  - Prodotto
  - Processi
  - Contaminazione (patogeno, surrogato)
- Necessaria collaborazione attiva fra azienda e laboratorio

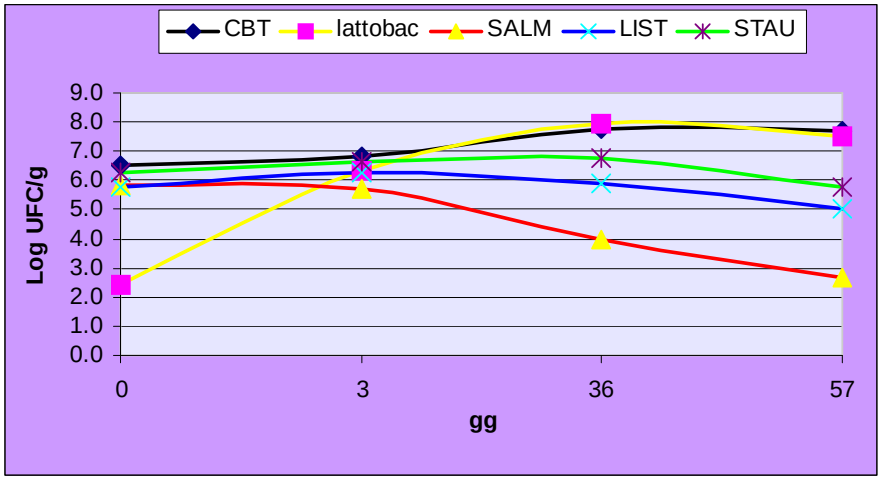
Variabilità

- Prodotti (n. lotti)
- Patogeni (n. ceppi e loro origine)
- Condizioni ambientali sperimentali

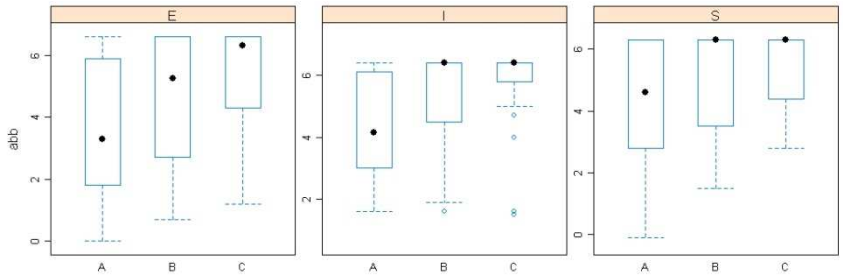
Altre possibili applicazioni sanitarie dei challenge test

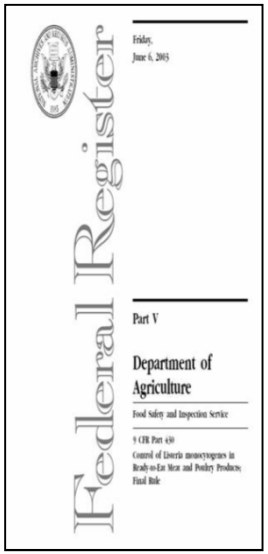
Valutazione dell'effetto del processo produttivo su diversi patogeni potenziali presenti nella materia prima

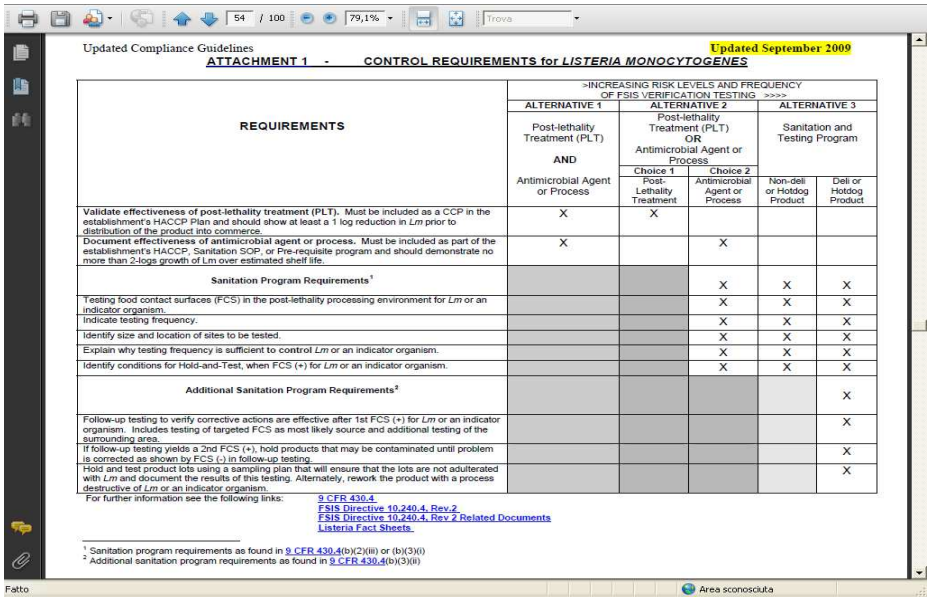




Validazione trattamenti post letali su prodotti cotti







Updated Compliance Guidelines — **Updated September 2009**

ATTACHMENT 1 - CONTROL REQUIREMENTS for *LISTERIA MONOCYTOGENES*

REQUIREMENTS	>INCREASING RISK LEVELS AND FREQUENCY OF FSIS VERIFICATION TESTING >>>> ALTERNATIVE 1: Post-lethality Treatment (PLT) AND Antimicrobial Agent or Process	ALTERNATIVE 2: Post-lethality Treatment (PLT) OR Antimicrobial Agent or Process — Choice 1: Post-Lethality Treatment	ALTERNATIVE 2 — Choice 2: Antimicrobial Agent or Process	ALTERNATIVE 3: Sanitation and Testing Program — Non-deli or Hotdog Product	ALTERNATIVE 3 — Deli or Hotdog Product
Validate effectiveness of post-lethality treatment (PLT). Must be included as a CCP in the establishment's HACCP Plan and should show at least a 1 log reduction in *Lm* prior to distribution of the product into commerce.	X	X			
Document effectiveness of antimicrobial agent or process. Must be included as part of the establishment's HACCP, Sanitation SOP, or Pre-requisite program and should demonstrate no more than 2-logs growth of Lm over estimated shelf life.	X		X		
Sanitation Program Requirements[1]			X	X	X
Testing food contact surfaces (FCS) in the post-lethality processing environment for *Lm* or an indicator organism.			X	X	X
Indicate testing frequency.			X	X	X
Identify size and location of sites to be tested.			X	X	X
Explain why testing frequency is sufficient to control *Lm* or an indicator organism.			X	X	X
Identify conditions for Hold-and-Test, when FCS (+) for *Lm* or an indicator organism.			X	X	X
Additional Sanitation Program Requirements[2]					X
Follow-up testing to verify corrective actions are effective after 1st FCS (+) for *Lm* or an indicator organism. Includes testing of targeted FCS as most likely source and additional testing of the surrounding area.					X
If follow-up testing yields a 2nd FCS (+), hold products that may be contaminated until problem is corrected as shown by FCS (-) in follow-up testing.					X
Hold and test product lots using a sampling plan that will ensure that the lots are not adulterated with *Lm* and document the results of this testing. Alternately, rework the product with a process destructive of *Lm* or an indicator organism.					X

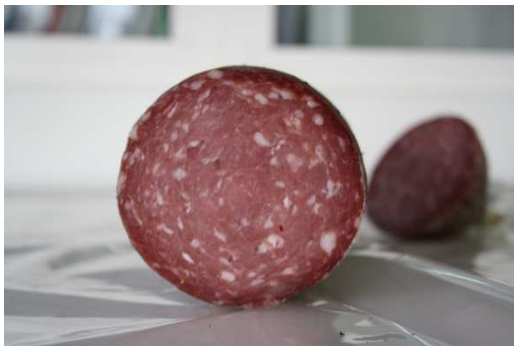
For further information see the following links: 9 CFR 430.4; FSIS Directive 10,240.4, Rev.2; FSIS Directive 10,240.4, Rev 2 Related Documents; Listeria Fact Sheets

[1] Sanitation program requirements as found in 9 CFR 430.4(b)(2)(iii) or (b)(3)(i)
[2] Additional sanitation program requirements as found in 9 CFR 430.4(b)(3)(ii)

Validazione trattamenti su prodotti stagionati, fermentati

- Trattamenti termici superficiali

- Alte pressioni idrostatiche



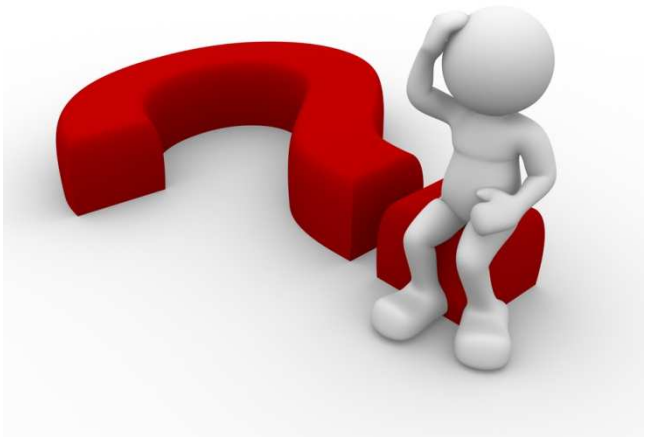
Valutazioni di riduzioni/sostituzioni conservanti su germinazione e tossinogenesi *Clostridium botulinum*

Food Directorate
Health Products and Food Branch
Health Canada

Identification Number:
Version Number: 1
Issue Date: November 24, 2010

Food Directorate

Clostridium botulinum **Challenge Testing of Ready-to-Eat Foods**



Grazie dell’attenzione!

Table 3. Approximate Water Activity of common Foods[a-b]

Food	Water Activity
Distilled water	1.0
Fresh meats, poultry, fish and eggs	≥ 0.98
Fresh fruit and vegetables	≥ 0.98
Fresh milk	≥ 0.98
Fruit and vegetable juices	≥ 0.98
Cured meats, fresh breads, cheddar cheese	≥ 0.93 - 0.98
Dry and fermented sausages, dry cheeses, margarine, fruit juice concentrates and maple syrup	≥ 0.80 – 0.93
Soy Sauce *(will vary depending on salt concentration)*	0.70 – 0.80
Dried meat e.g. *beef jerky*	≥ 0.65
Dried fruits, jams, honey and flours	≥ 0.60- 0.85
Biscuits, dry noodles, pasta and crisps	≥ 0.30 – 0.60
Whole egg powders	0.40 – 0.50
Dried vegetables, soups, breakfast cereals and milk powders	≥ 0.20 – 0.30
Coffee powder	≤ 0.20

[a] Values taken at 20°C

[b] The minimum water activity for microbial growth is generally determined by addition of salt. The minimum for growth with other substances e.g. sugars will be different. For toxin production by most pathogens the minimum water activity value is normally higher than that for growth

Table 2. Approximate pH of Common Foods

Food	pH
Baking soda	≥8.0
Pure water	7.0
Fresh eggs	7.0 - 7.8
Fresh shellfish	6.6 - 7.0
Fresh fish	6.6 - 6.8
Cows' milk	6.2 - 7.3
Butter	6.1 - 6.4
Fresh pork/Potatoes	6.0 - 6.2
Fresh poultry	5.8 - 6.0
Bacon	5.6 - 6.6
Fresh beef steaks	5.5 - 5.9
Canned vegetables	5.4 - 6.5
Bread	5.3 - 5.8
Cheddar cheese	5.2 - 5.9
Bananas	4.5 - 5.1
Cottage cheese/Yoghurt/Mayonnaise	4.2 - 4.5
Tomatoes/Beer and wines	4.0 - 4.5
Apple/Fruit juices	3.8 - 4.0
Tomato ketchup	3.6 - 3.8
Vinegar	2.0 - 2.5
Lemon juice	2.0 - 2.2

Table 6. Growth Characteristics of Common Foodborne Bacterial Pathogens[a-b]

Pathogen	Temp (°C)	pH	Water Activity (a_w)	(%) Salt[l]	Gas Atmos-phere	Some Commonly Associated Foods
	Min (Optimum) Max *Allowing Growth*		**Min** *Allowing Growth*	**Max** *Allowing Growth*	*Allowing Growth*	
Salmonella spp.[c]	5 (35-43) 47	3.8 (7-7.5) 9.5	0.94	4	Facultative	Eggs, meats, unpasteurised dairy products, sprouting seeds, fruit, vegetables, chocolate, infant formula, herbs, spices etc.
Clostridium botulinum (Proteolytic)	10 (35-40) 42	< 4.6 (7) 8	> 0.94	10	Anaerobic	Foods which are canned, vacuum packed, modified atmosphere packed, jarred, i.e. low oxygen environments
Clostridium botulinum[d] *(Non-Proteolytic)*	3 (28-30) 35	< 5.0 (7) 8	> 0.97	5	Anaerobic	
Staphylococcus aureus	10 (40-45) 48	4 (7-8) 9.6	0.83[e]	10	Facultative	Eggs, poultry, meats, dairy products, confectionary, salads, sandwiches, etc.

Campylobacter spp.	32 (42-43) 45	4.9 (6.5-7.5) 9	> 0.98	1.5	Micro-aerophilic	Poultry meat, unpasteurised milk and dairy products
Yersinia enterocolitica	-1.3 (25-37) 42	4.2 (7.2) 9.6	0.94	7	Facultative	Fresh meats (pork in particular) and unpasteurised milk and dairy products
Listeria monocytogenes[f]	-1.5 (30-37) 45	4.2 (7) 9.5	0.90	12	Facultative	Chilled, ready-to-eat foods
Clostridium perfringens[g]	10 (43-47) 50	5.5 (7.2) 9	0.93	6	Anaerobic	Cooked meats, gravy, stocks, soup
Shiga toxin (STEC) or Verocytotoxin (VTEC) producing Escherichia coli[h]	6.5 (30-40) 45	3.6 (6-7) 9	0.95	> 6.5	Facultative	Meat, poultry, unpasteurised dairy products and apple juice, sprouted seeds, salad vegetables, untreated drinking water etc.
Bacillus cereus[i]	4 (30-40) 55	5 (6-7) 8.8	0.93	7.5	Facultative	Cooked rice, spices, neonatal liquid formulas

Pathogen	Temp (°C)	pH	Water Activity (a_w)	(%) Salt[l]	Gas Atmos-phere	Some Commonly Associated Foods
	Min (Optimum) Max *Allowing Growth*		**Min** *Allowing Growth*	**Max** *Allowing Growth*	*Allowing Growth*	
Vibrio parahaemolyticus	5 (37) 43	4.8 (7.8-8.6) 11	0.94	8	Facultative	Fish and shellfish
Cronobacter spp.[l]	5.5 (39.4) 45	3.89 (5-9) No Data	0.2[k]	9.1	Facultative	Dried infant formula, infant feeds, follow-on formula