

ALMA MATER STUDIORUM - UNIVERSITÀ DI BOLOGNA
CAMPUS DI CESENA
SCUOLA DI AGRARIA E MEDICINA VETERINARIA
CORSO DI LAUREA IN TECNOLOGIE ALIMENTARI

**Applicazione dei challenge test per lo studio di *Listeria monocytogenes* in
un modello di prodotto RTE a ridotto contenuto di NaCl**

Relazione finale in
MICROBIOLOGIA ALIMENTARE (c.i. MICROBIOLOGIA DEGLI ALIMENTI)

Relatore
Prof. Andrea Gianotti

Presentata da
Marco Rastelli
Matricola N °. 0000789496

Correlatore
Dott. Lorenzo Nissen

Sessione Luglio 2019
Anno accademico 2018-2019

Indice

1	Riformulazione degli alimenti per la riduzione di sale, zucchero e grassi	4
1.1	Premessa	4
1.2	Obiettivi di riduzione e iniziative per la riformulazione degli alimenti	4
1.3	Approcci adottati nella ricerca industriale	5
2	Applicazione dei Challenge test per la messa a punto di prodotti innovativi	6
2.1	Premessa	6
2.2	Fattori da considerare nella realizzazione di un challenge test	7
2.2.1	Selezione dei microrganismi da sottoporre a challenge test	7
2.2.2	Livello di inoculo	10
2.2.3	Preparazione e metodo di inoculo	11
2.2.4	Durata dello studio	13
2.2.5	Formulazione e condizioni di stoccaggio	14
2.2.6	Analisi del campione	15
2.2.7	Interpretazione dei dati	16
2.2.8	Pass/fail criteria	17
2.3	Principali target microbici utilizzati nei challenge test	17
2.3.1	Funghi tossigeni: <i>Aspergillus</i> , <i>Penicillium</i> e <i>Fusarium spp.</i>	17
2.3.2	<i>Bacillus cereus</i>	17
2.3.3	<i>Campylobacter spp.</i>	18
2.3.4	<i>Clostridium botulinum</i>	18
2.3.5	<i>Clostridium perfringens</i>	18
2.3.6	<i>E.coli</i> enteroemorragico	19
2.3.7	<i>Listeria monocytogenes</i>	19
2.3.8	Salmonella spp.	19
2.3.9	Shigella spp.	19
2.3.10	<i>Staphylococcus aureus</i>	20
2.3.11	Vibrio spp.	20
2.3.12	<i>Yersinia enterocolitica</i>	20
3	Utilizzo di <i>Listeria monocytogenes</i> come target per challenge test su RTE.....	20
3.1	Tossinfezione da <i>L. monocytogenes</i>	20
3.2	Criteri di sicurezza microbiologica degli alimenti RTE	21
3.3	Realizzazione dei challenge test in alimenti RTE	22
3.3.1	Numero di lotti	26
3.3.2	Ceppi batterici	26
3.3.3	Preparazione dell'inoculo	26
3.3.4	Inoculo dell'alimento	27
3.3.5	Condizioni di conservazione	27
3.3.6	Analisi dei campioni inoculati	28
3.3.7	Analisi dei campioni non inoculati	28
3.3.8	Calcolo del potenziale di crescita	29
3.4	Evoluzione delle linee guida Europee (d.t. orientamento EUR Lm 2018)	29
3.5	Tre approcci di challenge tests di <i>L. monocytogenes</i> in alimenti RTE:	32
3.5.1	Challenge test per valutare il potenziale di sviluppo di L.m.	32
3.5.2	Challenge test per valutare la massima velocità di crescita di L.m.	33
3.5.3	Durability study	33
4	Progettazione di un Challenge test	34
4.1	Numero di lotti	34

4.2 Ceppi.....	34
4.3 Preparazione dell'inoculo	34
4.4 Inoculo delle unit à campione.....	35
4.5 Conservazione delle unit à campione	35
4.6 Misurazioni fisico-chimiche delle unit à campione non inoculate	35
4.7 Analisi microbiologiche	36
4.8 Determinazione della crescita potenziale ed esposizione dei risultati.....	36
4.9 Determinazione del massimo tasso di crescita ed esposizione dei risultati.....	37
4.10 Durability studies.....	37
4.10.1 Procedure di campionamento dell'alimento	37
4.10.2 Calcolo ed esposizione dei risultati	38
5 Recenti pubblicazioni scientifiche sull'applicazione di challenge test	38
5.1 Challenge test su verdure e insalate.....	38
5.2 Challenge test su prodotti carnei	40
5.3 Challenge test su prodotti ittici.....	42
5.4 Challenge test su formaggio	44
5.5 Challenge test su altri piatti pronti.....	46
6 Scopo della tesi	49
7 Materiali e metodi.....	50
7.1 Preparazione del modello	50
7.2 Analisi di aw e pH	51
7.3 Screening della crescita <i>L. monocytogenes</i> in presenza di NaCl e KCl.	52
7.4 Analisi ICP-MS	53
7.5 Challenge test con <i>L. monocytogenes</i>	53
7.5.1 Preparazione dell'inoculo	54
7.5.2 Preparazione del campione e conduzione del challenge test.....	55
7.5.3 Enumerazione di <i>L. monocytogenes</i> e LAB	57
7.5.4 Valutazione di aw e pH durante il challenge test	57
8 Risultati e Discussione	58
8.1 Misurazione dell'aw, del pH e ICP	58
8.2 Saggio di screening della crescita di <i>L. monocytogenes</i>	59
8.3 Challenge test	60
9 Conclusione	Errore. Il segnalibro non è definito.
10 Bibliografia.....	65

1 Riformulazione degli alimenti per la riduzione di sale, zucchero e grassi

1.1 Premessa

Nonostante la diversità delle diete europee, le malattie legate all'alimentazione sono una delle principali preoccupazioni per il settore sanitario e alimentare in tutti i paesi dell'UE. Dalle popolazioni del Sud che tradizionalmente seguono una sana dieta mediterranea; a quelle del Nord che sono abituate a cibi di origine animale; ad Ovest dove molti cibi sono ricchi di grassi saturi; all'Europa orientale nota per i cibi grassi e salati, tutte le aree registrano elevati tassi di morbilità (la morbilità corrisponde al rapporto tra persone malate e popolazione studiata totale in determinato periodo di tempo) e mortalità per malattie non trasmissibili legate alla nutrizione (NCD). Per ridurre l'incidenza di tali malattie, molti governi nazionali dell'UE hanno sviluppato piani sanitari e nutrizionali. Questi piani mirano principalmente a ridurre l'assunzione di sale, zuccheri e grassi, nonché a promuovere uno stile di vita sano che includa un'attività fisica regolare.

1.2 Obiettivi di riduzione e iniziative per la riformulazione degli alimenti

Attualmente, quasi tutti i paesi dell'UE hanno almeno un piano o un programma incentrato su alimenti/nutrizione e salute e molti di questi includono raccomandazioni per la riduzione di sale/grassi/zuccheri nei prodotti alimentari attraverso la riformulazione degli alimenti (Tabella 1 per una revisione della riduzione del sale). Il Piano d'azione nazionale austriaco per l'alimentazione, lanciato nel 2011 ed aggiornato nel 2012, ha tra i suoi principali obiettivi quello di ottimizzare la qualità dei grassi e ridurre l'assunzione di grassi, acidi grassi trans, zuccheri e sale anche favorendo la riformulazione degli alimenti (Ministero della Salute austriaco, 2013). Il secondo Piano d'azione nazionale bulgaro per l'alimentazione e la nutrizione 2012-2017 (una continuazione del piano 2005-2010) ha la riduzione del sale come uno dei temi più importanti ed include l'azione del settore privato per la produzione di alimenti con ridotto contenuto di sale (Lachat et al. 2013). La Danimarca, il primo paese al mondo a limitare gli acidi grassi trans artificiali, ha collaborato con l'industria della margarina per favorire la riformulazione del prodotto usando grassi più sani per sostituire i grassi trans (Bysted, Mikkelsen & Leth 2009). Il programma "STOP SALE!" in Ungheria ha tra i suoi obiettivi quello di ridurre il contenuto di sale degli alimenti trasformati ed è stato giudicato efficace sia dal punto di vista sanitario che economico (Nagyjanosi, Martos, Bődönyi e Vokó 2011). In Italia il programma nazionale "Guadagnaci in salute: rendi le scelte salutari più facili" è promosso dall'OMS e incoraggia l'industria a riformulare gli alimenti, in particolare la riduzione del sale nel pane e negli alimentari surgelati (Commissione europea 2015). Nel Regno Unito,

l'efficacia di quattro politiche nazionali per la riduzione del sale è stata confrontata e si è dimostrato che la riformulazione obbligatoria degli alimenti produce il maggior guadagno in anni di vita e il più grande risparmio economico (Collins et al., 2014). Nonostante un generale contesto europeo concentrato sul ridurre il consumo di sale, l'approccio alla riduzione del sale è molto diverso fra gli Stati membri europei. Ad esempio, l'Associazione dei Panifici ungherese ha raccomandato di ridurre il sale nel pane per raggiungere, dopo il mese di dicembre 2018, un livello massimo del 2,35%, piuttosto elevato per gli standard europei. In Spagna, la graduale riduzione del sale nel pane ha portato all'1,4% di sale massimo, e in Bulgaria il sale nel pane non può superare l'1,2%. D'altra parte, in Finlandia solo gli alimenti sovvenzionati dall'UE (ad es., nelle mense universitarie) hanno un livello massimo di sale permesso e nel Regno Unito solo il cibo servito ai pazienti ospedalieri deve soddisfare i requisiti sul contenuto di sale (rivisto dalla CE, 2014).

Tabella 1. Strategie di riformulazione del cibo – sale

Nazione	Data inizio	Data fine	Iniziativa	Partecipanti	Coinvolgimento	Obiettivo
Austria	2010	2015	Ministero federale per la salute	Industria panificatoria	Volontario	15% di riduzione
Francia	2010	-	Ministero per l'alimentazione, agricoltura e pesca	Industria della trasformazione degli alimenti	Volontario	-
Ungheria	2012	2018	Ministero della salute	Industria panificatoria	Volontario	-
Italia	2009	2012	Ministero della salute	Industria panificatoria e della pasta	Volontario	10% di riduzione
Romania	2011	2015	Ministero della salute	Industria della trasformazione degli alimenti	Volontario	-
Spagna	2010	2014	Ministero della salute e politiche sociali	Industria della trasformazione degli alimenti e HoReCa industry	Volontario	20% di riduzione
Regno unito	2006	2012	Dipartimento della salute, agenzia per la standardizzazione degli alimenti	Industria della trasformazione degli alimenti	Volontario	-

1.3 Approcci adottati nella ricerca industriale

La ricerca tecnologica nella riformulazione dei prodotti alimentari è correlata alle problematiche tecnologiche relative alla trasformazione alimentare, funzionalità caratteristiche sensoriali, conservanti alimentari e/o all'ottenimento di nuovi e più salutari

sostituiti per sale/grassi/zuccheri. Per i prodotti trasformati a base di carne, il sale aggiunto ha funzioni essenziali (flavour, texture e shelf-life), quindi gli effetti della riduzione del sale devono essere attentamente considerati. D'altra parte, le carni trasformate sono generalmente malsane in gran parte a causa del loro alto contenuto di sale. Alcuni esempi di sostituzione parziale del sale avvenuti con successo si possono trovare in letteratura. Una riformulazione, che aggiunge un estratto di alghe idrosolubili di *Palmaria palmata* come condimento per prosciutto cotto, riduce il contenuto di sale tra 1 e 1,2% senza alterare i parametri sensoriali e il gusto è stato positivamente apprezzato dai partecipanti al panel sensoriale (Barbieri, Barbieri, Bergamaschi, Franceschini & Berizi, 2016). Un'altra strategia ha utilizzato sali modificati a base di cloruro di potassio come parziale sostituzione del cloruro di sodio per migliorare il rapporto sodio-potassio nelle polpette di carne di maiale. Ciò ha avuto un limitato impatto sulle proprietà fisico-chimiche e i consumatori hanno indicato che le polpette modificate con sale di cloruro di potassio erano più appetibili di quelle prodotte con cloruro di sodio standard (Stanley, Bower & Sullivan, 2017). Inoltre, è possibile ottenere una maggiore percezione generale del sapore salato utilizzando inclusioni di aria all'interno di idrogel, migliorando così i tassi di erogazione del sodio e portando ad una maggiore percezione del sapore anche con una riduzione del sale dell'80% (Chin, Hewson, Yang, Linforth e Fisk, 2015). Tecnologie innovative come le alte pressioni idrostatiche e gli ultrasuoni hanno garantito la sicurezza microbiologica e un'adeguata shelf-life nei prodotti a basso contenuto di sodio (Inguglia, Zhang, Tiwari, Kerry e Burgess, 2017). Pertanto, sembra che una combinazione di più strumenti potrebbe consentire lo sviluppo di carni trasformate a basso contenuto di sale ed eventualmente consentire l'applicazione delle indicazioni dell'UE sulla salute ai prodotti a base di carne.

2 Applicazione dei Challenge test per la messa a punto di prodotti innovativi

2.1 Premessa

I challenge test microbiologici sono stati e continuano ad essere degli utili strumenti per determinare la capacità di un alimento di supportare la crescita di microrganismi patogeni o degradativi. I challenge test microbiologici giocano anche un ruolo importante nella validazione dei processi che sono destinati ad assicurare un certo grado di letalità contro un organismo o un gruppo di organismi target. Abbastanza spesso, riguardo a quest'ultimo proposito, vi è associata una performance standard (minimo effetto da conseguire) che il processo deve assicurare (per esempio, una riduzione di 5 log di *Escherichia coli* O157:H7 per le carni fermentate). Un challenge test microbiologico appropriatamente progettato convaliderà che uno specifico processo sia in conformità con una certa performance

standard. La progettazione, l'implementazione e la valutazione dei challenge test microbiologici è un lavoro complesso che dipende da fattori correlati a come il prodotto è formulato, fabbricato, confezionato, distribuito, preparato e consumato. Un microbiologo esperto deve considerare i fattori rilevanti e progettare uno studio che valuti al meglio la sicurezza del prodotto. Mancate valutazioni riguardo specifici prodotti e fattori ambientali nella progettazione del test potrebbero portare a conclusioni sbagliate. I challenge test microbiologici sono anche utili nel determinare la potenziale shelf-life di alcuni cibi refrigerati o conservati a temperatura ambiente. La determinazione se i challenge test siano appropriati o meno (od utili) deve essere fatta considerando alcuni fattori come la probabilità che il prodotto supporti la crescita di microrganismi patogeni o degradativi o la conoscenza della precedente storia del prodotto (esperienze empiriche e fatti che dimostrano che ci possa essere tale problematica). Per esempio, è inutile condurre challenge test su alimenti surgelati che non supportano la crescita quando si trovano alle corrette condizioni di conservazione; né è particolarmente utile condurre challenge test su cibi in scatola che hanno subito una sterilizzazione commerciale (sterilizzazione considerata accettabile, poiché non esiste una al 100% efficace). Tuttavia, nell'esempio del cibo in scatola, potrebbe essere appropriato condurre studi su confezioni inoculate come parte del protocollo per la validazione del processo. I challenge test microbiologici sono veramente utili per i prodotti alimentari sui quali possono crescere microrganismi patogeni e che sono conservati sotto refrigerazione, elevate temperature o a temperatura ambiente (le temperature di refrigerazioni rallentano soltanto, ma non bloccano la crescita del microrganismo) e vulnerabili alla crescita del microrganismo.

2.2 Fattori da considerare nella realizzazione di un challenge test

Quando si conduce un challenge test microbiologico, bisogna considerare un certo numero di fattori (Vestergaard, 2001). Questi includono (1) selezione dell'appropriato patogeno o surrogato, (2) livello di inoculo dell'alimento sottoposto a challenge test, (3) preparazione e il metodo di inoculo, (4) durata dello studio, (5) formulazione e condizioni di conservazione e (6) analisi dei campioni. L'interpretazione dei dati ed i criteri di approvazione/fallimento del processo sono di difficile valutazione se un alimento necessita di un controllo tempo/temperatura per la sua sicurezza.

2.2.1 Selezione dei microrganismi da sottoporre a challenge test

La tabella 2.2.1 mostra alcuni patogeni che potrebbero essere utilizzati nei challenge test per vari tipi di alimenti (Vestergaard 2001). La conoscenza della formulazione e della

storia dell'alimento (per esempio, associazione con epidemie conosciute e/o prove del potenziale di crescita) è fondamentale quando selezioniamo l'appropriato patogeno da sottoporre a challenge test. Per esempio, *Clostridium botulinum* potrebbe destare preoccupazione con alcuni prodotti conservati in atmosfera modificata (MAP) mentre *Staphylococcus aureus* per quegli alimenti aventi una microflora poco competitiva e in prodotti con una a_w ridotta. I microrganismi ideali per un challenge test sono quelli che sono stati preventivamente isolati da un alimento formulato in modo simile. Inoltre, patogeni da focolai di origine alimentare potrebbero essere inclusi per assicurarsi che la formulazione sia sufficiente per inibire anche quei microrganismi. Nei challenge test dovrebbero essere inclusi molteplici ceppi specifici di un patogeno target. Si è soliti sottoporre a challenge test una formulazione di cibo con un "cocktail" o miscela di molteplici ceppi, per tener conto della variazione potenziale fra questi. Non è insolito avere un cocktail di 5 o più ceppi di ogni patogeno target in un challenge test. Per esempio, i challenge test su botulino includono tipicamente parecchi ceppi proteolitici di tipo A e B così come rappresentativi ceppi non proteolitici (se necessario). Un singolo ceppo challenge con specifiche caratteristiche ben definite potrebbe essere usato per screenare prodotti simili nella natura a quelle formulazioni, che sono già state ampiamente sottoposte a challenge test con molteplici ceppi in passato. Prima di condurre un challenge test, i ceppi selezionati dovrebbero essere saggiati per testare un eventuale antagonismo reciproco, questi ceppi potrebbero infatti inibirsi a vicenda. È stato segnalato un antagonismo tra alcuni ceppi di *Listeria monocytogenes*, così come tra alcuni ceppi di *Clostridium botulinum* e tra batteri lattici produttori di batteriocine. Se non c'è compatibilità, quando vengono usati come parte di un cocktail per challenge test, potrebbero emergere risultati errati. È anche importante preparare e incubare la sospensione da valutare in condizioni e formati standardizzati. Trasferirsi a temperature di incubazione porta il microrganismo challenge a moltiplicarsi ed è stato dimostrato che la temperatura di conservazione del prodotto cambia la lunghezza del periodo lag del challenge test stesso, i.e. il tempo durante il quale l'alimento risulta consumabile (Curiale 1991). Vanno fatte considerazioni anche riguardo all'adattamento della sospensione challenge all'ambiente della formulazione dell'alimento prima di inoculare. Per esempio, l'adattamento all'acidità delle cellule di *E. coli* O157:H7 o salmonella prima di inoculare può fortemente influenzare la loro capacità di sopravvivere quando inoculate in un alimento acido. Infine, l'utilizzo di strumenti di caratterizzazione genetica può aiutare fortemente la determinazione di quali ceppi (se ci sono) utilizzati nei challenge test sono stati quelli dominanti lungo tutta la durata dello studio. Strumenti come il ribotyping e

l'elettroforesi in gel con campi pulsati possono aiutare a distinguere i vari ceppi, se sono stati inoculati o erano naturalmente presenti (Farber et al. 2001). Gli organismi challenge possono anche essere geneticamente modificati per portare un marker, che aiuti a distinguerli dagli altri ceppi e nella loro rilevazione all'interno della matrice alimentare stessa. Ovviamente, gli organismi geneticamente modificati devono avere caratteristiche fisiologiche comparabili ai corrispettivi selvatici od ai ceppi parentali. Per alcune applicazioni, possono essere usati nei challenge test microrganismi surrogati al posto dei patogeni specifici. Per esempio, solitamente non è possibile introdurre patogeni in un impianto di lavorazione, perciò è consigliato usare surrogati in quei casi. Un surrogato ideale è un ceppo di un patogeno target che mantiene tutte le sue caratteristiche ad eccezione della sua virulenza. Nella pratica, però, alcuni surrogati sono molto simili ma non necessariamente della stessa specie del patogeno target (genere→specie→ceppo). Classici esempi includono l'uso di *Clostridium sporogenes* come sostituto per *Clostridium botulinum* nello studio di confezioni inoculate, *Listeria innocua* come surrogato per *Listeria monocytogenes* e un ceppo generico di *Escherichia coli* come sostituto di *E. coli* O157:H7. Tuttavia, con quest'ultimo deve essere fatta attenzione perché un generico ceppo di *E. coli* non ha lo stesso livello di resistenza all'acido di un *E. coli* O157:H7 (proprio questa maggiore resistenza all'acidità aumenta la pericolosità di questo ceppo di coli). Perciò, mentre potrebbe andar bene usare un generico ceppo di *E. coli* in un challenge test per valutare l'impatto di un processo termico o la conservazione di un sistema ad alto pH, non è appropriato utilizzare un ceppo generico per valutare un cibo acido.

Generalmente, i surrogati sono selezionati da un gruppo di organismi ben caratterizzati ed hanno auspicabilmente i seguenti attributi (IFT 2000): i) non patogenici; ii) caratteristiche e cinetiche di inattivazione che possono essere usate per predire quelle del patogeno target; iii) comportamento simile a quello del patogeno target quando esposto alla formulazione (tipologia di matrice del prodotto) e/o parametri di processo (per esempio stabilità al pH, sensibilità alla temperatura e resistenza all'ossigeno); iv) caratteristiche di crescita stabili e costanti (indicata come la "consistency", ovvero una sicurezza, certezza, costanza dei risultati); v) popolazioni ad alta densità facilmente preparabili; vi) una volta preparata la popolazione resta stabile fino all'utilizzo; vii) facilmente conteggiabili usando sistemi rapidi, sensibili e poco costosi viii) facilmente differenziabili dalla microflora banale; ix) capacità di colonizzare il substrato che simula quelle del patogeno target; x) geneticamente stabili per cui i risultati possono essere replicati indipendentemente dal laboratorio o dal momento in cui si è effettuata la prova; xi) non risulterà essere un organismo degradativo se usato in un'area di produzione; xii) suscettibilità alle lesioni simile a quella del

patogeno target. Se deve essere usato un ceppo surrogato in un challenge test microbiologico, dovrebbe essere fatto un lavoro preliminare per ben caratterizzare il ceppo prima dell'utilizzo nello studio. Caratteristiche come quelle precedentemente discusse dovrebbero essere determinate e confermate attraverso un lavoro di laboratorio preliminare per garantire che il ceppo surrogato sia adatto allo scopo previsto. L'uso di surrogati dovrebbe essere limitato ai soli casi in cui lo specifico patogeno non può assolutamente essere usato per ragioni di sicurezza del prodotto e del personale.

Tabella 2.2.1 – Patogeni che possono essere considerati per l'utilizzo in *challenge test* per vari prodotti alimentari

Tipo di alimento	Tipo di organismo
Condimenti per insalate	Salmonelle, <i>Staphylococcus aureus</i>
Prodotti confezionati in atmosfere modificate (che sono verdure, carni, pollame, pesce)	<i>Clostridium botulinum</i> (ceppi proteolitici e non proteolitici) e altri patogeni (per esempio, salmonelle, <i>Listeria monocytogenes</i> ed <i>Escherichia coli</i> enteroemorragica)
Prodotti da forno (che sono prodotti ripieni, glassature, torte non di frutta)	Salmonelle, <i>S. aureus</i>
Prodotti lattiero caseari	Salmonelle, <i>S. aureus</i> , <i>C. botulinum</i> , <i>E. coli</i> enteroemorragica, <i>L. monocytogenes</i>
Prodotti di pasticceria	Salmonelle
Formulazioni con nuovi conservanti	Salmonelle, <i>S. aureus</i> , <i>C. botulinum</i> , <i>E. coli</i> enteroemorragica, <i>L. monocytogenes</i>
Condimenti e salse conservate a temperatura ambiente	Salmonelle, <i>S. aureus</i>

2.2.2 Livello di inoculo

Il livello di inoculo usato in un challenge test microbiologico dipende se l'obiettivo dello studio è determinare la stabilità e la shelf-life del prodotto o validare uno step in un processo progettato per ridurre il carico microbico. Solitamente, un livello di inoculo tra 10^2 e 10^3 cellule/g di prodotto è usato per accertare la stabilità microbiologica di una formulazione. Livelli di inoculo più alti possono essere appropriati per altri prodotti. Dipendentemente dalla formulazione del prodotto, parte dell'inoculo può morire subito all'inizio, prima di adattarsi all'ambiente. Se è usato un livello di inoculo troppo basso, può esser fatta l'errata ipotesi che il prodotto sia stabile quando non lo è. Al contrario, se il livello di inoculo è troppo alto per questo scopo, la miscela di conservanti o gli ostacoli

alla crescita (hurdle technology) potrebbero essere sopraffatti dall'inappropriato livello di inoculo, portando all'errata conclusione che la formulazione non sia stabile. Quando si sta utilizzando un challenge test per valutare la letalità di un processo come un trattamento termico, un trattamento ad alte pressioni o con radiazioni, è solitamente necessario usare un elevato livello di inoculo (per esempio, da 10^6 a 10^7 cellule/g di prodotto) per dimostrare il grado di riduzione del carico dei microorganismi challenge. Per esempio, negli Stati Uniti ai produttori di succo è ora richiesta una riduzione di 5 log dei microorganismi di pericolosità rilevante nei loro prodotti (5D performance standard). Questi protocolli di valutazione della riduzione logaritmica richiedono solitamente dei metodi di conteggio in piastra. Per misurare questo livello di riduzione entro i limiti statistici del metodo di conteggio, il livello di inoculo deve essere almeno di 10^6 ufc/g.

2.2.3 Preparazione e metodo di inoculo

La preparazione dell'inoculo, che deve essere usato in un challenge test microbiologico, è una componente importante dell'intero processo. Solitamente per le cellule vegetative si coltiva a partire dal brodo di coltura refrigerato, da strisci in piastra o da colture congelate in glicerolo. Le colture challenge dovrebbero crescere in quantità normali (crescita media) ed in condizioni adatte ad una crescita ottimale per la specifica coltura challenge. In alcuni studi gli specifici organismi challenge possono essere adattati a certe condizioni. Tale adattamento sarà ottimizzato per lo specifico alimento. Per esempio, *E. coli* O157:H7 possono essere adattati all'acidità con l'appropriato acidificante prima di usarlo in un challenge test su prodotti acidi. Le sospensioni di spore batteriche possono essere conservate in acqua refrigerata o congelate in glicerolo. Le sospensioni di spore devono essere diluite in acqua sterile e subire shock termico immediatamente prima dell'inoculo. Le spore di *C. botulinum* devono essere lavate bene prima dell'utilizzo per assicurarsi che nessuna tossina botulinica libera sia portata sul prodotto che sarà sottoposto a challenge test, e, se possibile, le spore dovrebbero subire shock termico all'interno dell'alimento che viene studiato (l'importanza del lavaggio consiste nell'eliminazione di tutte le tossine precedentemente prodotte affinché si possa valutare la reale capacità del microorganismo di produrre tossine nell'alimento da testare). La conta quantitativa nella sospensione challenge può essere fatta per aiutarsi nel calcolo della diluizione necessaria per ottenere l'inoculo target nel prodotto sottoposto a challenge test. Dovrebbero essere usate procedure appropriate e laboratori con strutture di contenimento quando si eseguono challenge test con certi patogeni. Il metodo di inoculo è un'altra considerazione estremamente importante quando si conduce un challenge test microbiologico. Deve essere fatto in modo che non

modifichi i parametri critici della formulazione del prodotto che sarà sottoposto a challenge test. Ci sono vari metodi di inoculo che possono essere usati dipendentemente dal tipo di prodotto che verrà studiato. In matrici liquido-acquose come salse o sughi aventi un'elevata a_w (>0.96), l'inoculo challenge può essere direttamente inoculato nel prodotto mediante una miscelazione, usando una minima quantità di acqua sterile o buffer come veicolo. L'uso di un diluente adeguato all' a_w approssimativa del prodotto attraverso l'utilizzo dell'umettante presente nell'alimento minimizza il potenziale d'errore in prodotti ad a_w intermedia. Negli studi in cui il livello di umidità è una delle variabili dell'esperimento, l'inoculo può essere sospeso nell'acqua o nel liquido utilizzato per regolare il livello di umidità della formulazione. Per gli inoculi in batch, l'inoculo può essere aggiunto direttamente al prodotto in un contenitore o recipiente di miscelazione. Per confezioni singole o applicazione in sacchetto (es. il sacchetto dello stomacher), l'inoculo può essere iniettato asetticamente usando una siringa sterile attraverso il lato della confezione contenente un setto di gomma. In matrici solide con $a_w >0.96$, come la pasta cotta o la superficie della carne, un'alternativa al metodo della siringa può essere l'utilizzo di un atomizzatore. Un atomizzatore vaporizza l'inoculo, che è sospeso in acqua sterile o buffer, alla base del prodotto o sulla sua superficie. La vaporizzazione dovrebbe essere svolta in una cappa di contenimento o usando altri dispositivi di sicurezza per evitare problemi di sicurezza dei lavoratori legato alla creazione di patogenicità. In tutte queste applicazioni dovrebbe essere usata la più piccola quantità di acqua o buffer necessaria alla sospensione dell'inoculo. L'inoculo può anche essere trasferito usando un tampone di velluto, un panno o un tessuto fibroso similare a condizione che il metodo sia calibrato e un riproducibile livello di inoculo può essere distribuito con un minimo trasferimento di umidità. Dovrebbero essere svolte analisi preliminari per assicurarsi che l' a_w o il livello di umidità della formulazione non siano cambiati dopo l'inoculo. Prodotti o componenti con un $a_w <0.92$ possono essere inoculati utilizzando l'atomizzatore con un minimo volume di acqua o buffer. Il prodotto dovrebbe sempre essere controllato per accertarsi che il livello finale di a_w del prodotto o il livello di umidità non siano cambiati. Un breve periodo di essiccazione post-inoculo può essere necessario per alcuni prodotti prima del confezionamento finale. In alternativa tali prodotti possono essere inoculati con organismi challenge che sono stati sospesi in un sistema acquoso o buffer a cui è stato aggiunto sabbia sterile, farina o una forma in polvere del prodotto (per esempio pasta disidratata), e lasciato asciugare. Anche le colture liofilizzate possono essere utilizzate per alcune applicazioni. La vitalità dell'inoculo e il livello di popolazione possono essere determinate durante l'avanzamento dello studio. Il preparato di inoculo disidratato dovrebbe essere

aggiunto asetticamente al prodotto testato e mischiato o agitato a fondo per un'equa distribuzione dell'inoculo. Abbastanza prodotto dovrebbe essere inoculato così che un minimo di tre repliche per tempo di campionamento siano disponibili per tutta la durata del challenge test. In alcuni casi, come in alcuni studi di rivalidazione e per campioni di controllo non inoculati, possono essere usate meno repliche.

2.2.4 Durata dello studio

È prudente condurre il challenge test microbiologico almeno per tutta la durata della shelf-life desiderata per il prodotto. Sarebbe più auspicabile sottoporre a challenge il prodotto per la sua intera shelf-life più un margine oltre a questa, perché è importante determinare cosa accadrebbe se il consumatore conservasse e consumasse il prodotto oltre la sua predefinita shelf-life. Alcune agenzie di regolamentazione richiedono un minimo di dati per la shelf-life più almeno un terzo della shelf-life prevista. Un ulteriore fattore da tenere in considerazione, che impatta sulla durata del challenge test, è la temperatura di conservazione del prodotto. I prodotti refrigerati possono essere conservati per l'intera durata della shelf-life sotto la temperatura di conservazione target, ma se si trovano a temperature d'abuso (temperature più alte di corretta conservazione) sono solitamente conservabili per un tempo più corto. In alcuni luoghi di ristorazione può essere conveniente per lo stabilimento alimentare tenere specifici prodotti refrigerati a temperatura ambiente per brevi periodi di tempo. Per esempio, alcuni operatori di fast food possono trovare conveniente tenere le fette di formaggio fuso a temperatura ambiente finanche ad 8 ore. Ciò permette al formaggio di raggiungere la temperatura ambiente e sciogliersi più velocemente quando vengono preparati alimenti come sandwich caldi. Tuttavia, possono essere presenti patogeni sulle fette di formaggio a causa della cross-contamination derivante dalla manipolazione nel ristorante, e perciò saranno necessari challenge test per fornire prove che questa pratica sia sicura. Se il ristorante volesse tenere le fette di formaggio spostate a temperatura ambiente per 8 ore, la durata del challenge test dovrebbe essere almeno di 12 ore. Questo challenge test è eseguito per assicurarsi che non avvenga una rapida crescita del patogeno, nel caso in cui le fette di formaggio subissero cross-contamination nel ristorante attraverso la manipolazione. È anche consigliabile testare il prodotto oltre la durata della sua intera shelf-life, perché potrebbero presentarsi dei danni sub-letali nei confronti dei microrganismi in alcuni prodotti. Ciò può portare ad un lungo periodo della fase lag, dove potrebbe non essere possibile coltivare l'inoculo, ma col tempo un piccolo numero di cellule lesionate recuperano e crescono nel prodotto. Questa reazione, o fenomeno "Fenice", è stata osservata in un certo numero di prodotti (Jay 1996). Se il

prodotto non viene testato per almeno l'intera durata della sua shelf-life, è possibile perdersi una rivitalizzazione e conseguente crescita tardiva del microrganismo challenge durante la sua shelf-life. La frequenza dei test è determinata dalla durata del challenge test microbiologico. È consigliabile raccogliere dati significativi in almeno 5-7 punti durante la shelf-life in modo da avere una buona indicazione sulla dinamica di sviluppo dell'inoculo. Solitamente se la shelf-life è misurata in giorni, la frequenza dei test dovrebbe essere giornaliera, se non di più volte al giorno. Se la shelf-life è misurata in settimane o mesi, la frequenza dei test è di solito non meno uno per settimana. Tutti gli studi dovrebbero iniziare con una valutazione al "tempo zero", che è un'analisi del prodotto subito dopo l'inoculo. Per alcuni tipi di prodotto è anche consigliabile concedere un periodo di assestamento all'inoculo per adattarsi al prodotto prima di essere valutato. Può essere utile valutare più frequentemente all'inizio del challenge test (per esempio, giornalmente o più volte al giorno per i primi giorni o settimane) e poi ridurre la frequenza dei test ad intervalli più lunghi.

2.2.5 Formulazione e condizioni di stoccaggio

Quando valutiamo una formulazione, è importante capire il range dei fattori chiave che controllano la sua stabilità microbiologica. Fattori intrinseci come pH, a_w o livello di conservanti possono essere fattori chiave per prevenire la crescita di patogeni o degradativi che influenzerebbero la sicurezza microbiologica del prodotto lungo la shelf-life prevista. È perciò importante valutare ogni variabile chiave singolarmente e/o in combinazione tra loro nella formulazione sottoposta alle peggiori condizioni. Per esempio, se il pH target è 4.8 ± 0.2 e la capacità del processo è all'interno di quel range di tolleranza, è importante valutare il prodotto per l'estremo più alto di quel range (ovvero pH 5.0). Similmente se l'acido sorbico è usato ad un livello di $0.15 \pm 0.05\%$, il prodotto dovrebbe essere valutato alla concentrazione minore, ovvero 0.10%. Ciò è raccomandato per assicurarsi che il challenge test copra l'intero range di capacità del processo per ogni fattore critico nella formulazione. Rilevanti proprietà intrinseche come pH, a_w , e livello di sale dovrebbero essere documentate per ogni studio per future comparazioni e riferimenti. Campioni di prova dovrebbero essere idealmente conservati nello stesso packaging come se fossero destinati alla commercializzazione. Se il prodotto commercializzato è sottovuoto o confezionato in atmosfera controllata (MAP), poi i campioni usati nel challenge test microbiologico dovrebbero essere confezionati nelle stesse condizioni usando lo stesso film di confezionamento. La temperatura di conservazione usata nel challenge test microbiologico dovrebbe replicare il tipico range di temperature a cui il prodotto deve

essere conservato e distribuito. Un prodotto refrigerato, che può essere soggetto a temperature d'abuso, dovrebbe essere testato a tali rappresentative temperature. Prodotti che possono andare incontro ad ambienti ad elevata umidità dovrebbero essere valutati anche a quelle condizioni (Notermans et al.1993). Alcuni challenge test possono incorporare cicli di temperature all'interno dei loro protocolli. Per esempio, i produttori possono distribuire un prodotto refrigerato sottoposto a ben controllate condizioni per una parte della sua shelf-life, dopo la quale il prodotto può essere soggetto ad elevate temperature immediatamente prima e durante l'utilizzo.

2.2.6 Analisi del campione

Solitamente in un challenge test microbiologico i livelli di microrganismi challenge vivi sono conteggiati ad ogni tempo di campionamento. Di solito è consigliabile avere almeno campioni in doppio o in triplo per le analisi ad ogni time point. In casi dove sono necessari più elevati livelli di sicurezza, dovrebbero essere usate un più alto numero di repliche o lo stesso studio replicato. La selezione degli strumenti e dei metodi di conteggio (per esempio, piastramento diretto o Most Probable Number) dipende dal tipo di patogeni o surrogati usati nello studio. Se il prodotto non ha una sostanziale microflora banale possono essere utilizzati strumenti non selettivi per la conta diretta. In casi dove sono usati organismi produttori di tossine (per esempio, *Staphylococcus aureus* o *C. botulinum*), dovrebbero essere eseguiti appropriati test per le tossine ad ogni time point usando il metodo validato più di recente. I livelli di tossine possono non essere sempre valutati ad ogni time point durante lo studio, ma dovrebbe essere fatto ad intervalli abbastanza frequenti per tutta la durata prevista della shelf-life per determinare se questa risulta accettabile. Dove appropriato, metodi di rinvenimento possono essere usati per evitare risultati errati.

È prudente analizzare il prodotto, inclusi i campioni di controllo non inoculati, ad ogni o a selezionati punti di campionamento nello studio per vedere come la microflora banale si stia comportando nei confronti della shelf-life del prodotto. Per esempio, se un prodotto ha un'elevata microflora banale, potrebbe essere inibita la crescita dell'inoculo challenge. In alcuni casi ciò è desiderabile e utile perché il prodotto degrada prima che i patogeni possano sviluppare (se un prodotto si degrada dal punto di vista sensoriale, es. irrancidimento, noi non saremo portati a mangiarlo e quindi eviteremo anche la successiva contaminazione patogena). In altre situazioni la microflora banale può non essere universalmente presente, portando ad un potenziale falso senso di sicurezza. Inoltre, in diverse circostanze, la microflora banale può cambiare i parametri di formulazione nel prodotto favorendo o inibendo la crescita dell'inoculo nel tempo (per esempio, le muffe

possono alzare il pH del prodotto, mentre i lattobacilli possono diminuirlo). È anche importante tracciare i parametri fisico-chimici d'interesse del prodotto riguardo alla shelf-life per vedere come loro possono cambiare ed influenzare il comportamento dei patogeni. Capire come a_w , umidità, salinità, pH, concentrazione dei gas nelle atmosfere modificate (MAP), livelli di conservanti ed altre variabili agiscono lungo la shelf-life del prodotto è la chiave per capire la stabilità microbiologica del prodotto.

2.2.7 Interpretazione dei dati

Una volta che il challenge test microbiologico è completato, i dati dovrebbero essere analizzati per vedere come i patogeni si comportano nel tempo. L'analisi degli andamenti ed appropriati grafici (che sono grafici semi-logaritmici) dei dati mostreranno se i microorganismi inoculati per il challenge muoiono, rimangono stabili o aumentano di numero col tempo. Nei casi di patogeni produttori di tossine, non dovrebbe essere rilevata alcuna tossina durante il periodo designato per il challenge test. Combinare i dati quantitativi dell'inoculo per ogni time point con i dati sulla microflora banale e i parametri fisico-chimici d'interesse dà una forte ed ampia rappresentazione della stabilità microbiologica della formulazione sottovalutazione. Basandosi su questi dati, può essere stabilita una ragionevole shelf-life o possono essere fatti aggiustamenti alla formulazione cosicché sia meno suscettibile alla crescita dei patogeni. Quando viene usato un challenge test microbiologico, come parte di un protocollo di validazione di processo, le analisi dei dati mostreranno se il processo è capace di conseguire il livello di letalità richiesto (che deve essere conforme con le performance standard definite anticipatamente). Basandosi su queste informazioni, possono essere fatti, se necessario, aggiustamenti al processo in modo tale che siano soddisfatti i requisiti di letalità. I dati provenienti dai challenge test microbiologici possono essere utilizzati nello sviluppo di modelli microbiologici predittivi o per la validazione di quelli esistenti. I modelli predittivi sono programmi informatici che simulano e predicono come specifici microrganismi si comporteranno in una formulazione a specifiche condizioni (per esempio pH, a_w , umidità, salinità e conservanti). I challenge test microbiologici sono usati sia per generare questi tipi di modelli empirici sia per validare la loro applicazione. Complessivamente, challenge test ben progettati possono fornire informazioni fondamentali sulla sicurezza microbiologica e la stabilità della formulazione di un alimento. Sono anche di inestimabile importanza nella valutazione dei punti chiave di controllo microbiologico o di letalità in un processo. I challenge test possono essere di incredibile aiuto nel determinare se un prodotto alimentare richiede una

temperatura controllata per tutta la sua shelf-life o se può tollerare una conservazione a temperatura ambiente per una parte o per tutta la sua shelf-life.

2.2.8 Pass/fail criteria

La selezione dei microrganismi da usare in un challenge test e/o per la costruzione di un modello dipende dalla conoscenza ottenuta dall'esperienza acquisita su prodotti destinati alla commercializzazione e/o sui dati epidemiologici, che indicano che l'alimento sotto esame può essere pericoloso a causa della crescita di patogeni. In aggiunta dovrebbero essere considerate le proprietà intrinseche (per esempio pH, attività dell'acqua e conservanti) e le proprietà estrinseche (per esempio atmosfera, temperatura e trattamenti subiti). L'importanza dell'accrescimento di una popolazione varia con la caratterizzazione del rischio per ogni microrganismo. Per esempio, la crescita di patogeni infettivi dovrebbe essere sempre inibita, mentre la maggior parte dei microrganismi produttori di tossine richiede una crescita sostanziale prima che esista un rischio. In questi casi la crescita di un organismo tossigeno non risulta essere da sola un rischio per la salute, ma lo sarà la produzione di tossine.

2.3 Principali target microbici utilizzati nei challenge test

La seguente lista identifica i microrganismi che possono essere usati in un challenge test microbiologico insieme alle raccomandazioni e alla motivazione del panel group per la selezione e la valutazione della crescita tollerabile.

2.3.1 Funghi tossigeni: *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium spp.*

Challenge test legati alla necessità di un controllo tempo/temperatura per la sicurezza non sono consigliati perché i funghi forniscono un indizio visivo per prevenire il consumo dei prodotti degradati.

2.3.2 *Bacillus cereus*

L'assenza della formazione di tossine è il criterio preferito. Tuttavia, finché la misurazione delle tossine risulta difficoltosa, un incremento di 3 log sopra il livello di inoculo indicherebbe la necessità di un controllo tempo/temperatura. La determinazione di questo limite di crescita è basata su due motivazioni di base: a) i classici livelli iniziali di *B. cereus* sono bassi; perciò 1000 ufc/g dovrebbero essere un prudente livello iniziale in base alla letteratura. Sono necessarie popolazioni $> 10^6$ ufc/g per produrre tossine aventi un livello di rischio per la salute (FDA 2001). b) Le tossine emetiche di *B. cereus* sono stabili

termicamente; perciò non ci può essere una riduzione apprezzabile. Altre considerazioni da farsi sono: c) le spore di *B. cereus* sono relativamente sensibili al calore. È probabile che la cottura al forno distrugga i bassi livelli di *B. cereus* trovati nelle farine usate nella produzione del pane (Kaur 1986); tuttavia un'insolita resistenza alle alte temperature è stata registrata nelle torte di zucca (Wyatt and Guy 1981). d) Il potenziale di sopravvivenza di *B. cereus* dovrebbe essere valutato per ogni specifico prodotto. Riso e patate hanno una storia di malattie alimentari associate a *B. cereus* e perciò prodotti contenenti riso e patate dovrebbero essere valutati attraverso requisiti di controllo tempo/temperatura.

2.3.3 *Campylobacter spp.*

Non è consigliato alcun challenge test perché altri organismi, come *Salmonella* che hanno linee di contaminazione simili, sono meno fastidiosi e più facili da coltivare. Inoltre, la sua minima temperatura di crescita e attività dell'acqua rispettivamente di 32°C e 0.98, rendono il *Campylobacter spp.* un candidato inadatto per challenge test.

2.3.4 *Clostridium botulinum*

L'assenza di formazione di tossine basata sulla metodologia attuale è il requisito raccomandato. *C. botulinum* deve essere considerato per alcuni prodotti cotti, in particolare quelli confezionati in condizioni di anaerobiosi e micro-aerobiosi come prodotti in atmosfera controllata (MAP); e quelli con una storia di malattie associate, come prodotti sott'olio e patate al forno.

2.3.5 *Clostridium perfringens*

È consigliato limitare l'incremento entro i 3 log basandosi sui seguenti fatti: i) sebbene altri prodotti possono contenere spore sopravvissute, *Clostridium perfringens* è rilevante soprattutto per la carne e prodotti a base di pollo, incluse salse e sughi. La maggior parte dei prodotti soggetti ai requisiti del Food Code saranno sia quelli crudi che quelli appena cotti; ii) le cellule vegetative di *C. perfringens* sono facilmente distrutte dalla cottura della carne e dei prodotti a base di pollo, e i livelli di spore sono solitamente bassi a causa degli esigenti requisiti di sporulazione. Un'iniziale popolazione di 100 ufc/g è considerata essere il peggior caso di conservazione da parte del panel group. Una popolazione $>10^5$ ufc/g è necessaria per comportare una patologia; perciò, un incremento entro i 3 log dovrebbe controllare il rischio.

2.3.6 *E.coli* enteroemorragico

Se è utilizzato un modello per predire la crescita del patogeno, ponendo condizioni di tempo/temperatura si dovrebbe mantenere *E. coli* enteroemorragico in fase lag a causa della natura infettiva del microrganismo. Tuttavia, se sono compiuti challenge test di laboratorio, la variabilità intrinseca nei metodi di quantificazione necessita l'uso di un incremento progressivo entro 1 log come indicatore che la crescita sia inibita.

2.3.7 *Listeria monocytogenes*

Le più recenti valutazioni del rischio (FDA/USDA 2001) indicano che un basso numero di *L. monocytogenes* rappresenti un basso rischio per la salute pubblica. In riconoscimento di ciò, alcune nazioni come Canada e Germania hanno stabilito una tolleranza per bassi livelli di questo organismo in alcuni cibi ready-to-eat che non supporteranno crescita ad alti livelli. D'altronde non è stata stabilita alcuna tolleranza per *L. monocytogenes* per questi tipi di alimenti negli Stati Uniti. È anche stato riconosciuto che prodotti che supportano la crescita del microrganismo rappresentano un rischio incrementato. Un livello di 100 ufc/g di *L. monocytogenes* al momento del consumo può fornire un accettabile livello di protezione per il consumatore (Ross et al. 2000). Tuttavia, i dati sono insufficienti per determinare generali livelli iniziali per i casi peggiori. Complessivamente il panel group ha concluso che un incremento entro 1 log era un appropriato livello di controllo per *L. monocytogenes*. Questo livello tiene conto della variabilità nelle tecniche di conteggio e mostra che la crescita di questo microrganismo ad alti livelli rappresenta un rischio per la salute pubblica, che deve essere controllato.

2.3.8 *Salmonella* spp.

Un modello per la crescita del patogeno appropriatamente validato può essere usato per verificare che la *Salmonella* spp. sia mantenuta in fase lag. Altrimenti la crescita della popolazione dovrebbe essere limitata entro un 1 log, seguendo la stessa logica usata per *E. coli* enteroemorragica.

2.3.9 *Shigella* spp.

Non sono consigliati challenge test per *Shigella* spp., perché ha la stessa potenziale origine della *Salmonella* spp. ed ha requisiti di sopravvivenza e crescita più fastidiosi.

2.3.10 *Staphylococcus aureus*

Non dovrebbe essere formata alcuna tossina rilevabile durante gli studi tempo/temperatura valutati. Come con *C. botulinum*, le attuali metodologie dovrebbero essere usate per la rilevazione delle tossine e dovrebbero essere rilevati gli specifici livelli di tossine. Al posto dei test per le tossine, può essere usato il criterio di una crescita < 3 log. Questo livello di limitazione della crescita è basata su una popolazione iniziale di 1000 ufc/g ed un minimo di 10^6 ufc/g per produrre tossine. Altre considerazioni: è opportuno studiare *Staphylococcus aureus* in alimenti che ricevono un'estesa manipolazione a causa dell'origine umana del microrganismo. *S. aureus* non compete bene con gli altri microrganismi; perciò non è opportuno considerare alimenti con elevati livelli di altri microrganismi, come vegetali crudi oppure prodotti correttamente fermentati.

2.3.11 *Vibrio* spp.

Un modello per la crescita del patogeno appropriatamente validato può essere usato per verificare che *Vibrio* spp. sia mantenuto in fase lag. Altrimenti la crescita della popolazione dovrebbe essere limitata entro un 1 log, seguendo la stessa logica usata per *E. coli*. *Vibrio parahaemolyticus* può essere usato come surrogato per altri *Vibrio* spp. Studi sul *V. parahaemolyticus* sono opportuni solo per alimenti di origine marina. Si dovrebbe anche notare che la maggior parte dei pesci è altamente deperibile e perciò saranno controllati a livello di temperatura per ragioni di deterioramento.

2.3.12 *Yersinia enterocolitica*

Non sono consigliati challenge test, perché *Y. enterocolitica* ha origini simili alla *Salmonella* spp. e le salmonelle sono più facili da coltivare.

3 Utilizzo di *Listeria monocytogenes* come target per challenge test su RTE

3.1 Tossinfezione da *L. monocytogenes*

L. monocytogenes è un bacillo Gram-positivo, anaerobio facoltativo, non sporigeno coinvolto in casi di infezioni da listeriosi di origine alimentare. *L. monocytogenes* è ampiamente distribuita nell'ambiente ed è stata isolata da diverse fonti, inclusi suolo, vegetazione, insilati, materiale fecale, liquami ed acqua. È presente frequentemente in cibi crudi sia di origine animale che vegetale e può essere trovata in cibi cotti a causa di contaminazioni dopo il trattamento termico. Difatti, è stata isolata da alimenti come latte crudo e non pastorizzato, formaggio, gelati, verdure crude, carni fermentate e salcicce cotte, carne di pollo cruda e cotta, carni crude e pesce crudo ed affumicato. Inoltre, la sua

presenza ubiquitaria porta anche ad una potenziale contaminazione degli ambienti di trattamento del cibo, in cui la persistenza di *L. monocytogenes* è frequente (Fox, Hunt, O'Brien & Jordan 2011; Nakari et al. 2014; Vongkamjan, Roof, Stasiewicz e Wiedmann 2013). Sebbene la listeriosi sia una malattia relativamente rara, può portare alla morte ed è particolarmente pericolosa per le donne incinta, gli individui più anziani e gli immunocompromessi con tassi di mortalità dal 20% al 30% comuni tra i pazienti ospedalizzati (Vazquez-Boland et al. 2001). La listeriosi si presenta in diverse forme: neuromeningiti, gastroenteriti materne-neonatali e febbrili e nei casi più gravi può portare ad infezioni cerebrali e anche morte. Secondo un rapporto di sintesi UE sulle zoonosi, gli agenti zoonotici e le epidemie di origine alimentare (Autorità europea per la sicurezza alimentare [EFSA] 2014), 1642 casi umani confermati di listeriosi sono stati segnalati nell'Unione europea nel 2012, rappresentando un aumento del 10,5% rispetto al 2011. Il tasso di notifica dell'UE è stato di 0,41 casi ogni 100.000 abitanti, con i più elevati tassi di notifica specifici per stati membri registrati in Finlandia, Spagna e Danimarca. In media, il 91,6% dei casi sono stati ospedalizzati. Questa è la percentuale più alta di casi ospedalizzati di tutte le zoonosi sotto sorveglianza dell'UE. Un totale di 198 decessi dovuti a listeriosi sono stati segnalati da 18 Stati membri nel 2012, che è stato il più alto numero di casi mortali segnalati dal 2006.

3.2 Criteri di sicurezza microbiologica degli alimenti RTE

Il regolamento europeo (CE) n. 2073/2005 (Commissione europea (CE) 2005) stabilisce i criteri microbiologici per determinati microrganismi negli alimenti e le norme di attuazione che devono essere rispettate dagli operatori del settore alimentare (OSA), quando si realizzano misure igieniche generali e specifiche. In relazione a *L. monocytogenes*, questo regolamento riguarda principalmente i prodotti alimentari RTE e richiede quanto segue: (i) nei prodotti RTE destinati ai lattanti e a fini medici speciali *L. monocytogenes* non deve essere presente in 10 campioni da 25 g; (ii) nei prodotti RTE diversi da quelli per neonati e scopi medici speciali si applicano criteri microbiologici diversi a seconda della capacità del prodotto alimentare di supportare o meno la crescita di *L. monocytogenes*. Pertanto, per gli alimenti RTE inadatti a supportare la crescita di *L. monocytogenes*, i livelli dovrebbero essere < 100 ufc/g per tutta la durata shelf life del prodotto ($n=5$; $c=0$). D'altra parte, negli alimenti RTE che sono in grado di supportare la crescita del batterio, *L. monocytogenes* non deve essere presente in 5 campioni da 25 g quando lascia l'impianto di produzione; tuttavia, se il produttore può dimostrare, con approvazione dell'autorità competente, che il prodotto non supererà il limite di 100 ufc/g per tutta la sua shelf-life, il livello dovrebbe

essere < 100 ufc/g per tutta la durata della shelf-life (n= 5; c=0). Inoltre, questo regolamento stabilisce che la sicurezza dell'alimento è responsabilità dell'OSA, il quale può condurre studi per valutare la crescita di *L. monocytogenes*, che può essere presente nel prodotto durante la shelf-life in condizioni di conservazione ragionevolmente prevedibili per distribuzione, stoccaggio e utilizzo al fine di verificare l'osservanza dei criteri per tutta la durata della shelf-life del prodotto. Ciò fa sorgere la domanda su come l'OSA decida se il prodotto sia in grado o non sia in grado di supportare la crescita di *L. monocytogenes* e in che modo possa essere dimostrata la conformità con il limite di 100 ufc/g per tutta la durata della shelf-life. A tale riguardo, la Direzione Generale della Salute e dei Consumatori (DG SANCO) della Commissione europea ha pubblicato un documento destinato agli operatori del settore alimentare che producono alimenti RTE per aiutarli a dimostrare con approvazione dell'autorità competente che i loro prodotti siano conformi al regolamento comunitario, a comprendere la gamma dei diversi approcci disponibili per contribuire a stabilire una shelf-life sicura del prodotto in relazione a *L. monocytogenes* e a classificare i loro prodotti in alimenti RTE in cui la crescita di *L. monocytogenes* può verificarsi o in alimenti RTE in cui la crescita di *L. monocytogenes* non si verificherebbe durante la loro shelf-life (DG SANCO 2008). A tale proposito i Challenge test sono riconosciuti ufficialmente come supporto per garantire la sicurezza degli RTE.

3.3 Realizzazione dei challenge test in alimenti RTE

Non è semplice determinare la capacità degli alimenti di sostenere la crescita di *L. monocytogenes* poiché molti alimenti RTE sono prodotti in modo tradizionale nelle regioni locali utilizzando formulazioni diverse, che possono avere un impatto sul destino di *L. monocytogenes*. La Food Standards Agency della Nuova Zelanda ha recentemente pubblicato linee guida per intraprendere challenge test (Food Standards Agency New Zealand [FSANZ], 2014), sebbene questo documento non sia specificamente correlato a *L. monocytogenes*. D'altra parte, il Canada ha anche linee guida che riguardano specificatamente *L. monocytogenes* (Health Canada, 2012). In Europa, al fine di facilitare il compito di eseguire challenge test, il Laboratorio di riferimento comunitario dell'Unione Europea (presso ANSES) ha preparato un documento di orientamento tecnico per *L. monocytogenes* nel 2008 in collaborazione con sette laboratori, tra cui sei laboratori nazionali di riferimento per *L. monocytogenes* (Commissione Europea, 2008). Questo documento orientativo mirava a descrivere le procedure microbiologiche per determinare la crescita di *L. monocytogenes* utilizzando challenge test nell'ambito dell'applicazione del regolamento (CE) n. 2073/2005. Il contenuto di questo documento di orientamento tecnico

è stato riesaminato da Beaufort (2011). Tuttavia, il feedback degli OSA e dei laboratori indipendenti ha indicato la necessità di una revisione del documento orientativo e di sviluppare una serie di linee guida più user-friendly per facilitare tali analisi. Nel settembre 2012 è stata avviata la revisione del "Documento di orientamento tecnico EURL *Lm* per lo svolgimento di studi sulla shelf-life riguardo *L. monocytogenes* in alimenti RTE". Il Laboratorio di riferimento comunitario dell'Unione europea per *L. monocytogenes* ha istituito un gruppo di lavoro di rappresentanti di 10 laboratori nazionali di riferimento, 1 laboratorio nazionale di riferimento associato e 1 laboratorio per conto di un laboratorio nazionale di riferimento, ed in seguito, nel 2014 è stata pubblicata una versione aggiornata del documento di orientamento tecnico (Commissione Europea, 2014). La capacità di crescita di *L. monocytogenes* nei prodotti alimentari può essere stimata sulla base delle specifiche delle caratteristiche fisico-chimiche del prodotto, della consultazione della letteratura scientifica disponibile o dell'utilizzo di modelli matematici predittivi. Tuttavia, nella maggior parte dei casi, la valutazione della crescita riguarderà studi di laboratorio, i cosiddetti challenge test. Un challenge test può essere definito come uno studio di laboratorio che misura la crescita di *L. monocytogenes* in alimenti contaminati artificialmente conservati in condizioni di abuso (inadatte o fuori norma per quel prodotto) prevedibili durante trasporto, stoccaggio al dettaglio e a livello dei consumatori. Come obiettivo principale, i challenge test mirano a determinare se un particolare prodotto alimentare ha o meno la capacità di sostenere la crescita di *L. monocytogenes*. Per molti prodotti alimentari non sono necessari challenge test, la legislazione europea indica comunque i Challenge test come un utile strumento per validare la sicurezza microbiologica dei Novel Foods. In generale, la consultazione della letteratura scientifica disponibile e le specifiche delle caratteristiche fisico-chimiche del prodotto aiuteranno a decidere se è necessario o meno un challenge test, sulla base dell'evidenza che *L. monocytogenes* non rappresenti un rischio o non abbia la capacità di crescere nel prodotto (Fig. 3.3). Infatti, i challenge test per *L. monocytogenes* non sarebbero necessari per le seguenti categorie di alimenti: I) Alimenti destinati ad essere cotti o sottoposti a un'altra fase di inattivazione batterica prima del consumo umano. II) Alimenti che hanno ricevuto trattamenti termici o altri trattamenti efficaci per eliminare *L. monocytogenes*, quando la ricontaminazione non è possibile dopo tale trattamento (ad esempio, i prodotti trattati nella loro confezione finale). III) Frutta e verdura fresche, non tagliate e non lavorate, ad esclusione dei semi germogliati (questi sono classificati come produzione primaria). IV) Pane, biscotti e prodotti simili. V) Acqua in bottiglia o confezionata, bibite analcoliche, birra, sidro, vino, alcolici e prodotti simili. VI) Zucchero, miele e dolci, compresi

cioccolato e prodotti a base di cacao. VII) Molluschi bivalvi. VIII) Sale per uso alimentare. IX) Prodotti surgelati. X) Alimenti con $\text{pH} \leq 4.4$ o $a_w \leq 0.92$ oppure alimenti con $\text{pH} \leq 5.0$ ed $a_w \leq 0.94$, condizioni che sono già note come inadatte a supportare la crescita di *L. monocytogenes*.

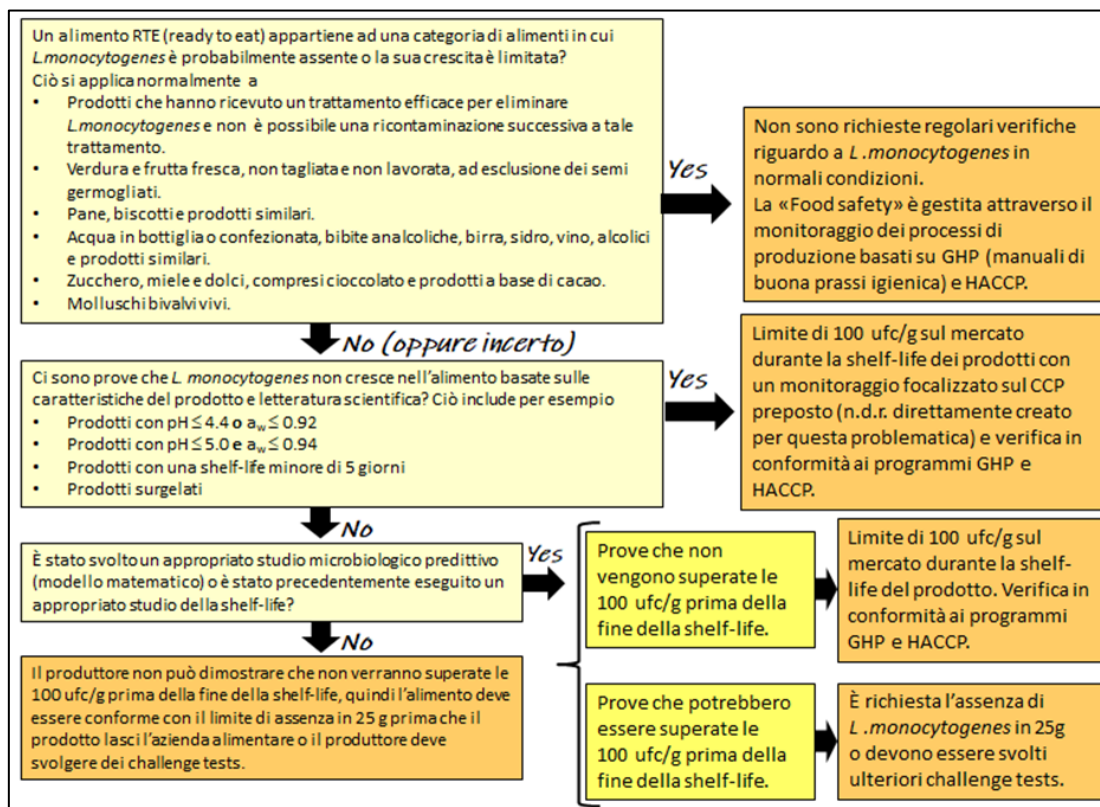


Figura 3.3. Albero decisionale che mostra le fasi schematiche da seguire per determinare se è necessario o meno un challenge test

Inoltre, i dati storici sulla prevalenza di *L. monocytogenes* negli specifici alimenti RTE alla fine della shelf-life ed in particolare sui risultati dei durability studies (il numero di campioni superiori a 100 ufc/g), ovvero lo studio dell'evoluzione della popolazione batterica naturalmente presente nell'alimento (ANNEX 1, documento di orientamento EURL *Lm* 2018), e le indicazioni dei moduli di microbiologia predittiva possono essere utili per decidere se è richiesto o meno un challenge test per un particolare prodotto alimentare. I seguenti fattori devono essere considerati quando si esegue un challenge test in laboratorio per valutare il potenziale di crescita, seguendo la versione aggiornata del documento di orientamento tecnico di EURL *Lm* per lo svolgimento di studi sulla shelf-life di RTE (Tab. 3.3)

Tabella 3.3 Maggiori differenze tra l'European Technical Guidance documents del 2008 (CE 2008) e del 2014 (CE 2014).

	Documento di riferimento europeo 2008	Documento di riferimento europeo 2014
Numero di lotti	Almeno 3	- Se la probabilità di crescita è bassa o la variabilità tra lotti di pH e attività dell'acqua (<i>a_w</i>) è trascurabile: 1 lotto. - Se la probabilità di crescita o la variabilità tra lotti è alta: almeno 3 lotti.
Scelta del ceppo	Una miscela di almeno 3 ceppi. Uno deve essere il ceppo di riferimento. Gli altri devono essere isolati dalla stessa o da una similare matrice alimentare.	Una miscela di almeno 2 ceppi. Uno di loro deve essere un ceppo con caratteristiche di crescita conosciute (collezione di ceppi EURL <i>Lm</i> a disposizione per questo scopo).
Preparazione dell'inoculo	Prima sub-cultura in un terreno non selettivo ad una temperatura favorevole ad una crescita ottimale di <i>L. monocytogenes</i> (37 °C). Seconda sub-cultura ad una temperatura vicina alla temperatura del prodotto, al fine di adattare il ceppo alle condizioni di conservazione.	Prima sub-cultura in un terreno non selettivo ad una temperatura ottimale (per esempio, 30 o 37 °C). Seconda sub-cultura ad una temperatura vicina alla temperatura effettiva di conservazione del prodotto.
Inoculazione dell'alimento	L'inoculo non dovrebbe superare l'1% del volume del campione. Il livello di contaminazione dovrebbe essere fissato a 50 ufc/g e non dovrebbe superare le 100 ufc/g. Diversi metodi di inoculazione possono essere presi in considerazione in base al prodotto testato.	Il volume di inoculo non deve superare l'1% della massa (o volume) del campione. Il livello di contaminazione deve essere fissato a circa 100 ufc/g. Diversi metodi di inoculazione in base al prodotto testato. La procedura di inoculazione dovrebbe imitare la naturale contaminazione.
Condizioni di conservazione	- Quando sono disponibili informazioni nazionali, l'uso di queste informazioni è preferito per selezionare il tempo e la temperatura di conservazione da usare. - Se non sono disponibili dati: 8 °C (1/3 della shelf-life), 12 °C (1/3 della shelf-life) e 12 °C (1/3 della shelf-life).	- Quando l'OSA ha i propri dati sulle prime due fasi della catena del freddo (dalla produzione alla vendita al dettaglio, e durante lo stoccaggio in fase di vendita al dettaglio) o esistono informazioni nazionali disponibili, l'uso di queste informazioni è preferito per selezionare la temperatura di conservazione da usare. - Se non sono disponibili dati: 8 °C (1/3 della shelf-life), 12 °C (1/3 della shelf-life) e 12 °C (1/3 della shelf-life).
Analisi dei campioni inoculati	- Conteggio della <i>L. monocytogenes</i> : almeno all'inizio del challenge test ed alla fine della shelf-life del prodotto (3 campioni per ogni tempo) seguendo il metodo standard EN ISO 11290-2 - Microflora banale: all'inizio e alla fine del challenge test seguendo la relativa metodologia standard. - Caratteristiche fisico-chimiche dell'alimento (almeno pH ed <i>a_w</i>): almeno all'inizio e alla fine del challenge test.	- Conteggio della <i>L. monocytogenes</i> : almeno all'inizio del challenge test ed alla fine della shelf-life del prodotto (3 campioni per ogni tempo) EN ISO 11290 - Microflora banale: all'inizio e alla fine del challenge test seguendo la relativa metodologia standard. - Caratteristiche fisico-chimiche dell'alimento (almeno pH ed <i>a_w</i>): almeno all'inizio e alla fine del challenge test.
Analisi dei campioni non inoculati	Analisi dei 3 campioni seguendo la relativa metodologia standard: - Rilevazione di <i>L. monocytogenes</i> (EN ISO 11290-1); - Microflora; - Caratteristiche fisico-chimiche dell'alimento (almeno pH e <i>a_w</i>).	Analisi di 1 campione seguendo la relativa metodologia standard: - Rilevazione di <i>L. monocytogenes</i> (EN ISO 11290-1); - Microflora associata; - Caratteristiche fisico-chimiche dell'alimento (almeno pH e <i>a_w</i>); - Concentrazione dei gas.
Calcolo della deviazione standard del numero di cellule (log₁₀ ufc/g) a t₀	La deviazione standard dei risultati ottenuti dal conteggio di <i>L.m</i> nei lotti inoculati a t ₀ non deve superare 0.3 log ₁₀ ufc/g.	La deviazione standard dei risultati ottenuti dal conteggio di <i>L.m</i> nei lotti inoculati a t ₀ non deve superare 0.5 log ₁₀ ufc/g.
Calcolo del potenziale di crescita	Il potenziale di crescita (log ₁₀ ufc/g) è la differenza tra la mediana dei risultati alla fine del challenge test e la mediana dei risultati all'inizio del challenge test.	Il potenziale di crescita (log ₁₀ ufc/g) è la differenza tra la mediana dei risultati alla fine del challenge test e la mediana dei risultati all'inizio del challenge test.

3.3.1 Numero di lotti

Il numero di lotti da includere nella progettazione del challenge test dipenderà dalle informazioni disponibili sulla probabilità di crescita e sulla variabilità tra i lotti per quanto riguarda pH ed attività dell'acqua (a_w). A tale scopo possono essere utilizzati strumenti di microbiologia predittiva come i moduli dei limiti di crescita/non crescita o calcolatori di "variabilità tra i lotti". Se la probabilità di crescita è bassa o la variabilità tra i lotti di pH e a_w per quanto riguarda la crescita di *L. monocytogenes* può essere considerata trascurabile, è possibile limitare lo studio a un singolo lotto. D'altro canto, se la probabilità di crescita e la variabilità all'interno dei lotti sono elevate, è necessario testare almeno tre lotti.

3.3.2 Ceppi batterici

Per tener conto della variazione di crescita e sopravvivenza tra i ceppi di *L. monocytogenes*, i challenge test devono essere svolti con una miscela di almeno due ceppi. Uno di questi deve essere un ceppo con caratteristiche di crescita note, mentre l'altro ceppo (o ceppi) può essere scelto liberamente e idealmente sarà isolato in origine dal prodotto alimentare in analisi. Questo secondo ceppo può anche essere isolato dall'ambiente, epidemie di listeriosi o può essere un ceppo di collezione. Il laboratorio di riferimento dell'Unione Europea per la *L. monocytogenes* ha recentemente costituito un insieme di ceppi di varia origine (carne, prodotti caseari, pesce) e vari sierotipi genetici (II e IV). Questi ceppi sono stati selezionati per la loro capacità di crescita in condizioni difficili di temperatura, pH e a_w , in conformità alla letteratura. La crescita di questi ceppi in difficili condizioni (8 °C, pH 5 o $a_w = 0,95$) è stata caratterizzata ed il loro uso è consigliato durante lo svolgimento dei challenge test (Laboratorio di riferimento dell'Unione europea per *Listeria monocytogenes* (EURL Lm), 2013).

3.3.3 Preparazione dell'inoculo

I ceppi batterici devono essere prima inoculati in un terreno non selettivo (ad es. Brain Heart Infusion [BHI] broth) incubato ad una temperatura ottimale (ad esempio, 30 o 37 °C) per il tempo necessario a raggiungere la fase stazionaria di crescita iniziale (ad esempio, lasciato durante la notte), e poi devono essere subcoltivati in terreno non selettivo e incubati ad una temperatura vicina alla reale temperatura di conservazione del prodotto da testare (ad es. 7 °C, o 10 °C quando si considerano cibi refrigerati RTE) per il tempo necessario per raggiungere la fase stazionaria iniziale. Ciò consente l'adattamento batterico alle condizioni di temperatura ambiente prevalenti durante il challenge test nel prodotto alimentare. Si possono aggiungere anche ulteriori stress di rilevanza per quell'organismo.

Infine, le singole colture devono essere combinate in uguali quantità e devono essere preparate diluizioni seriali per ottenere un inoculo alla concentrazione prevista da utilizzare per l'inoculo dell'alimento.

3.3.4 Inoculo dell'alimento

Il metodo di inoculo del prodotto alimentare con il cocktail di ceppi di *L. monocytogenes* deve essere tale da non compromettere le proprietà intrinseche (caratteristiche fisico-chimiche) dell'alimento. Per questo motivo, il volume dell'inoculo non deve superare l'1% della massa (o volume) del campione. Inoltre, l'inoculo deve imitare realistici scenari di contaminazione alimentare da *L. monocytogenes*. Al fine di ridurre al minimo l'incertezza di misura, il livello di contaminazione deve essere fissato a circa 100 ufc/g. Diversi metodi di inoculo possono essere presi in considerazione. L'inoculo può essere svolto sulla superficie per imitare la contaminazione di una parte specifica del prodotto lungo la catena alimentare. Tuttavia, per gli alimenti considerati omogenei (ad esempio, alimenti macinati) o quelli preparati mescolando diversi ingredienti (ad esempio, l'insalata mista) l'inoculo "in profondità" sarebbe l'opzione migliore. Altre tecniche (ad esempio, l'immersione) possono essere utilizzate, se è possibile dimostrare che le proprietà intrinseche del cibo non vengono modificate. Gli alimenti confezionati possono essere rimossi dal loro imballaggio, inoculati e poi riconfezionati in condizioni simili di gas nella confezione o mantenuti dentro la sua confezione e contaminati attraverso un setto.

3.3.5 Condizioni di conservazione

Le condizioni di conservazione (temperatura, tempo e confezione) degli alimenti inoculati devono aderire alle condizioni a cui è più probabile che il prodotto sia sottoposto durante la catena alimentare, fino al suo consumo finale. Il tempo di conservazione deve essere equivalente alla shelf-life del prodotto alimentare. Per quanto riguarda la temperatura di stoccaggio, bisogna prendere in considerazione le temperature di abuso per evitare una sottostima della crescita di *L. monocytogenes*. Quando l'OSA ha i propri dati sulle prime due fasi della catena del freddo (dalla produzione alla vendita al dettaglio, e durante lo stoccaggio in fase di vendita al dettaglio) o sono disponibili informazioni nazionali, l'uso di queste informazioni è preferito per selezionare le combinazioni tempi/temperature di conservazione da utilizzare. In tal caso, dovrebbe essere utilizzato il 75% dei dati osservati. Tuttavia, se non sono disponibili dati e la shelf-life del prodotto è ≤ 21 giorni, devono essere utilizzate le seguenti condizioni predefinite: 8 °C per un terzo della shelf-life totale del prodotto (rappresentante il periodo che intercorre dalla produzione al dettaglio), 12 °C

per il secondo terzo della shelf-life totale del prodotto (rappresentante lo stoccaggio in fase di vendita al dettaglio) e 12 °C per l'ultimo terzo della shelf-life totale del prodotto (rappresentante la conservazione da parte del consumatore). Se la shelf-life è > 21 giorni, devono essere utilizzate le seguenti condizioni di conservazione predefinite: 8 °C per 7 giorni (dalla produzione al dettaglio), 12 °C per metà della shelf-life residua (stoccaggio in fase di vendita al dettaglio) e 12 °C per l'altra metà della shelf-life residua (conservazione ad opera del consumatore).

3.3.6 Analisi dei campioni inoculati

Il numero di ufc di *L. monocytogenes* deve essere determinato almeno all'inizio del challenge test e alla fine della shelf-life del prodotto seguendo il metodo standard EN ISO 11290-2 per il conteggio di *L. monocytogenes*. Inoltre, ulteriori test points possono essere inclusi nella progettazione dell'esperimento al fine di rilevare potenziali picchi di crescita/inattivazione durante la shelf-life. L'uso di metodi analitici alternativi è accettabile quando i metodi sono convalidati rispetto al metodo di riferimento e se viene utilizzato un metodo ufficiale certificato da una parte terza in conformità al protocollo stabilito nella norma EN/ISO 16140 o ad altri analoghi protocolli accettati a livello internazionale. Altri metodi devono essere convalidati secondo i protocolli accettati a livello internazionale e il loro utilizzo autorizzato dall'autorità competente. Anche la microflora banale del prodotto deve essere conteggiata all'inizio e alla fine del challenge, seguendo la metodologia standard pertinente per gli organismi e il tipo di alimento in questione. Devono essere determinate pure le caratteristiche fisico-chimiche dell'alimento (per lo meno pH ed a_w , od in alternativa il contenuto di NaCl o l'umidità). Nel caso di alimenti confezionati in atmosfera modificata o confezionati sottovuoto, è opportuno monitorare anche la composizione atmosferica dei gas al giorno "0" ed al giorno "fine" del challenge test.

3.3.7 Analisi dei campioni non inoculati

I campioni non inoculati devono essere controllati per la presenza di *L. monocytogenes*, seguendo il metodo standard EN ISO 11290-1 per il rilevamento di *L. monocytogenes*. Solo quei lotti che mostrano l'assenza di *L. monocytogenes* devono essere sottoposti a contaminazione artificiale e challenge test. Alcuni campioni non inoculati possono essere conservati e, in caso di rilevamento positivo di *L. monocytogenes*, possono essere effettuati durability studies su alimenti naturalmente contaminati, determinando il numero di batteri nel tempo (in condizioni di conservazione prevedibili), seguendo la metodologia EN ISO

11290. Devono essere determinate anche per i campioni non inoculati la microflora banale del prodotto e le caratteristiche fisico-chimiche dell'alimento.

3.3.8 Calcolo del potenziale di crescita

Per ogni lotto, il potenziale di crescita (in \log_{10} ufc/g) è stimato come differenza tra la mediana del numero di *L. monocytogenes* alla fine del challenge test e la mediana del numero di *L. monocytogenes* all'inizio del challenge test. Il valore più elevato ottenuto tra tutti i lotti testati viene mantenuto come potenziale di crescita. Quando il potenziale di crescita calcolato è $> 0,5 \log_{10}$ ufc/g si considera che il prodotto alimentare supporti la crescita di *L. monocytogenes*.

3.4 Evoluzione delle linee guida Europee (d.t. orientamento EUR Lm 2018).

In base all'aggiornamento delle linee guida europee per la realizzazione di challenge tests, il "Documento tecnico di orientamento EURL Lm" del 2018, che determina la capacità degli alimenti RTE di sostenere la crescita di *L. monocytogenes* in condizioni di stoccaggio ragionevolmente prevedibili è molto importante per gli operatori del settore alimentare al fine di dimostrare la conformità ai criteri stabiliti dal regolamento europeo (CE) n. 2073/2005. Tuttavia, pochi dei challenge test riportati in letteratura hanno rigorosamente seguito tutti gli aspetti delle Linee guida EURL disponibili al momento della loro pubblicazione, ovvero le Linee guida EURL del 2008 e successivamente del 2014. Sebbene possano essere studi di ricerca validi, la mancata osservanza delle Linee Guida significa che sono di limitato valore per le autorità competenti, che hanno la decisione definitiva su quale categoria (se permette o non permette la crescita di *L. monocytogenes*) un alimento faccia parte, e per gli OSA, che non possono utilizzare i risultati pubblicati per ricavare il potenziale di crescita di *L. monocytogenes* e di conseguenza sono obbligati a svolgere costosi challenge test. I challenge test finora descritti in letteratura su prodotti a base di carne, pesce, latticini, verdura e piatti pronti sono stati condotti seguendo metodologie significativamente differenti. Mentre sono stati normalmente usati cocktail da tre a cinque ceppi, un paio di studi hanno usato un singolo ceppo isolato di *L. monocytogenes* o hanno inoculato diversi ceppi singolarmente in lotti separati. Temperatura e tempo di incubazione per la preparazione dell'inoculo sono variati ampiamente tra gli studi. Mentre alcuni autori hanno coltivato i ceppi batterici ad una temperatura ottimale, altri hanno svolto uno step di adattamento a basse temperature ≤ 10 °C. L'inoculo superficiale con un basso volume di inoculo era il metodo preferito di inoculo, ma sono stati impiegati anche altri metodi come l'inoculo in profondità

immersione (parziale tipo bagnatura) o immersione totale nella sospensione dell'inoculo. Anche il tempo di conservazione e la temperatura seguenti all'inoculo differivano tra gli studi e sono stati generalmente concordati con l'OSA. Pertanto, sebbene la normativa europea permetta l'uso della letteratura scientifica per stimare la capacità di crescita di *L. monocytogenes* su particolari alimenti, la mancanza di studi disponibili condotti seguendo un approccio armonizzato e rimanendo conformi ai documenti di orientamento dell'UE ne impediscono l'utilizzo a tal fine. Questa mancanza di armonizzazione, oltre al fatto che i dati ottenuti dai challenge test svolti per conto degli OSA appartengono agli OSA stessi e non sono generalmente pubblicati, porta a un vuoto di informazione e conoscenza. Sebbene le linee guida europee pubblicate di recente siano in una certa misura indefinite quando descrivono la metodologia da seguire per alcuni dei processi (per esempio, l'inoculo del cibo), la loro applicazione ha garantito un approccio più armonizzato e faciliterà il confronto dei risultati tra i laboratori. Le future indagini che analizzeranno la crescita di *L. monocytogenes* in particolari prodotti alimentari dovrebbero pertanto essere eseguite seguendo queste linee guida, se devono essere valide dal punto di vista normativo. Tuttavia, gli studi incentrati sul confronto tra la metodologia proposta con qualsiasi altra metodologia alternativa e più semplice sono molto validi (ad esempio, Everis e Betts, 2013) e potrebbero contribuire ad un'ulteriore revisione del documento di orientamento in futuro. Per questo, sia la metodologia standard che la metodologia alternativa devono essere seguite in parallelo e le performance di entrambi gli approcci devono essere confrontate. I risultati ottenuti seguendo una metodologia alternativa non saranno considerati validi in caso contrario. Il documento di orientamento tecnico EURL *Lm* pubblicato più di recente (2018) per lo svolgimento di studi sulla shelf-life riguardo *L. monocytogenes* in alimenti RTE è un miglioramento della versione del 2014, ed è un documento prezioso che offrirà agli OSA l'opportunità di condurre challenge test in maniera armonizzata. Tuttavia, gli OSA che vorranno determinare il potenziale di crescita di *L. monocytogenes* sui loro prodotti si troveranno di fronte a numerose ed importanti sfide che non sono ancora state risolte. Queste riguardano principalmente competenze e vincoli economici. Le parti interessate del settore (in alcuni casi i produttori artigianali di alimenti e gli operatori di piccole e medie imprese) di solito non dispongono delle conoscenze tecniche, delle competenze e delle risorse necessarie per svolgere efficacemente challenge test. Poiché di solito non dispongono di strutture e attrezzature di laboratorio adeguate e avranno difficoltà a comprendere e ad aderire rigorosamente al documento di orientamento tecnico europeo (ovvero potrebbero non avere accesso alla letteratura scientifica sulla crescita di *L. monocytogenes* o avere difficoltà nell'interpretazione dei risultati; potrebbero non essere in

grado di utilizzare il software di microbiologia predittiva o non avranno la sufficiente conoscenza o abilità in "microbiologia alimentare" per progettare ed eseguire un challenge test), hanno bisogno di commissionare i loro studi a laboratori indipendenti. Tuttavia, in alcuni paesi ci sono pochissimi laboratori che attualmente offrono questo servizio (con protocolli ottimizzati e accreditati) e le relative spese sono spesso troppo alte. Inoltre, le spese e gli sforzi possono essere intensificati dalla necessità di eseguire test di verifica per tutti i diversi tipi di alimenti RTE prodotti e in tutti i casi in cui si è verificata una modifica nella formulazione del prodotto. Alcuni paesi hanno una procedura armonizzata per l'attuazione dei challenge test. Ad esempio, la Francia dispone di una rete di laboratori accreditati per challenge test su *L. monocytogenes*. Tali laboratori sono accreditati da un gruppo di lavoro composto da agenti dell'autorità competente e agenti del laboratorio nazionale di riferimento (NRL) per *L. monocytogenes* dopo che il laboratorio ha superato un audit (condotto dall'NRL) che valuta la capacità del laboratorio di saper raccogliere e analizzare i dati del produttore e la competenza tecnica del laboratorio, e dopo che il laboratorio ha ottenuto risultati soddisfacenti per un saggio interlaboratorio di attitudine organizzato dall'NRL per *L. monocytogenes*. Un'ulteriore importante difficoltà, che si verifica nei paesi in cui non è presente una procedura armonizzata, è la mancanza di coordinamento tra le autorità di regolamentazione, gli OSA e i laboratori che effettuano challenge test. Nei casi dove avviene un'interpretazione flessibile del documento di orientamento tecnico europeo, i risultati di un challenge test possono non essere considerati accettabili dalle autorità di regolamentazione, che hanno l'ultima parola sul fatto che il prodotto alimentare sia classificato come un alimento RTE incapace o in grado di supportare la crescita di *L. monocytogenes*. Riassumendo, alcuni OSA interessati a classificare i loro alimenti RTE come alimenti RTE che non supportano la crescita di *L. monocytogenes* non saranno in grado di eseguire un challenge test adeguato a causa della mancanza di esperienza e/o risorse, od eseguiranno un challenge test che non sarà considerato valido dalle autorità di regolamentazione competenti. Esiste una chiara necessità di formazione degli OSA e degli impiegati dei laboratori indipendenti sugli obiettivi, la progettazione, l'esecuzione e l'interpretazione dei risultati dei challenge test per determinare il potenziale di crescita di *L. monocytogenes* sul cibo. L'implementazione coordinata di networks nazionali di addestramento e di networks di laboratori accreditati aiuterebbe a gettare le basi per una migliore applicazione delle linee guida europee. Inoltre, si raccomanda l'instaurazione di un dialogo con le autorità di regolamentazione prima dell'esecuzione di challenge test al fine di evitare la possibilità che i risultati vengano respinti a causa di un'erronea progettazione dello studio. Sin dalla pubblicazione del primo

documento di orientamento tecnico EURL *Lm* per la conduzione di studi sulla shelf-life riguardo *L. monocytogenes* in alimenti RTE nel 2008, un certo numero di studi è stato condotto su una vasta gamma di prodotti alimentari. Nell'ambito della letteratura scientifica, le principali applicazioni sono riportate e descritte successivamente in tabella 5, in cui Álvarez-Ordóñez et al. (2015) hanno riassunto le diverse metodiche adottate dai vari autori per la realizzazione di challenge test in alimenti RTE. Sono state confrontate le metodiche adottate per challenge test su varie tipologie di alimenti, in particolare (a) verdure e insalate, (b) prodotti carnei, (c) prodotti ittici (pesce, frutti di mare, ecc.), (d) formaggi e (e) altre tipologie di pasti pronti. Tuttavia, in molti casi non è stata rispettata una stretta osservanza dei criteri riportati all'interno del documento di orientamento tecnico EURL *Lm* ufficiale.

3.5 Tre approcci di challenge tests di *L. monocytogenes* in alimenti RTE:

Esistono tre diverse modalità nell'applicazione dei challenge test in funzione della finalità che vogliamo raggiungere. Si può realizzare una valutazione del potenziale di sviluppo, della velocità massima di sviluppo e della dinamica del microbiota (durability study). Un challenge test può quindi essere definito come uno studio di laboratorio che misura la crescita di *L. monocytogenes* in alimenti contaminati artificialmente conservati in condizioni di abuso (inadatte o non a norma per quel prodotto) prevedibili durante trasporto, stoccaggio fino al livello dei consumatori.

3.5.1 Challenge test per valutare il potenziale di sviluppo di *L.m.*

Un challenge test che valuta il potenziale di crescita è uno studio basato su un lavoro di laboratorio di microbiologia che misura la crescita di *L. monocytogenes* in alimenti artificialmente contaminati conservati in condizioni ragionevolmente prevedibili dalla produzione al consumo (stoccaggio al produttore, distribuzione, stoccaggio in fase di vendita al dettaglio e da parte del consumatore). Questo potenziale di crescita (δ) è definito come la differenza tra il \log_{10} ufc/g alla fine del challenge test e il \log_{10} ufc/g all'inizio del test. Per soddisfare i criteri microbiologici per la *Listeria monocytogenes* definiti nell'Allegato I (categorie alimentari 1.2 e 1.3) del regolamento (CE) n. 2073/2005, il potenziale di crescita (δ) ad un dato scenario tempo-temperatura può essere usato:

- Per la classificazione un alimento:
 - ~ nella categoria 1.2 "Alimenti RTE in grado di supportare la crescita di *L. monocytogenes*" quando $\delta > 0.5 \log_{10}$ ufc/g.

~ nella categoria 1.3 “Alimenti RTE non in grado di supportare la crescita di *L. monocytogenes*” quando $\delta \leq 0.5 \log_{10} \text{ ufc/g}$.

- Per valutare la crescita di *L. monocytogenes* in un alimento RTE classificato nella categoria 1.2, in base a definite condizioni di conservazione ragionevolmente prevedibili tra produzione e consumo.

Il potenziale di crescita (δ) dipende da molti fattori, i più importanti dei quali: proprietà intrinseche dell'alimento (per esempio pH, contenuto di NaCl, attività dell'acqua (a_w), microflora banale, conservanti), proprietà estrinseche (per esempio profilo tempo-temperatura, condizioni di imballaggio), stato fisiologico dei ceppo(i) inoculato(i) e livello di contaminazione.

3.5.2 Challenge test per valutare la massima velocità di crescita di *L.m.*

Un challenge test che valuta il tasso massimo di crescita è uno studio basato su un lavoro di laboratorio di microbiologia che misura il tasso di crescita di *L. monocytogenes* in alimenti artificialmente contaminati conservati ad una definita temperatura.

Il tasso massimo di crescita (μ_{\max} in logaritmo naturale) è calcolato dalla fase esponenziale della curva di crescita di *L. monocytogenes* ottenuta ad una definita temperatura tracciando il logaritmo naturale della popolazione batterica in funzione del tempo. La pendenza della linea in questa fase è la μ_{\max} . Il massimo tasso di crescita è un importante parametro della cinetica di crescita batterica che dipende da: i) il ceppo inoculato; ii) proprietà intrinseche dell'alimento (per esempio pH, a_w , umidità assoluta, contenuto di NaCl, microflora banale, costituenti antimicrobici); iii) proprietà estrinseche (per esempio temperatura, gas dell'atmosfera). Il tasso massimo di crescita può essere stimato dalla regressione lineare o non-lineare, e può essere usato per calcolare direttamente un incremento nella conta batterica e/o usato nei software di microbiologia predittiva.

3.5.3 Durability study

Un durability study è uno studio microbiologico per determinare l'evoluzione delle popolazioni batteriche naturalmente presenti nell'alimento conservato a condizioni ragionevolmente prevedibili dalla produzione al consumo (stoccaggio al produttore, distribuzione, stoccaggio in fase di vendita al dettaglio e da parte del consumatore).

4 Progettazione di un Challenge test

I seguenti elementi, identificati nel "Documento di orientamento tecnico EURL *Lm* per lo svolgimento di studi sulla shelf-life riguardo *L. monocytogenes* in alimenti RTE", dovrebbero essere specificati nella progettazione di un challenge test sperimentale.

4.1 Numero di lotti

In generale saranno testati tre lotti. Il laboratorio deve testare lotti selezionati a tempi differenti per tenere in considerazione la variabilità tra i lotti. I tre lotti dovrebbero rappresentare la variazione in processo di produzione e negli ingredienti. Quando sono testati meno di tre lotti, la ragione dovrebbe essere giustificata nel report. Per determinare il numero di lotti che devono essere testati, il laboratorio deve usare: i) Per il potenziale di crescita, un riconosciuto e comunemente accettato modello di "limite di crescita/non crescita" (per esempio, documento di orientamento tecnico EURL *Lm* sezione 3.2.1.2); ii) Per il tasso di crescita, il calcolatore di variabilità interna ai lotti (<https://eurl-listeria.anses.fr>) o un riconosciuto e comunemente accettato modello di "limite di crescita/non crescita" (per esempio, documento di orientamento tecnico EURL *Lm*).

4.2 Ceppi

Per tenere in considerazione la variabilità fra ceppi, è raccomandato che il laboratorio conduca il challenge test con diversi ceppi. Numero di ceppi: i) devono essere usati almeno due ceppi; ii) deve essere fornita l'origine dei ceppi (includendo il prodotto da cui il ceppo deve essere isolato, se conosciuto); iii) le caratteristiche di crescita di uno di questi ceppi devono essere documentate in modo tal da avere un punto di riferimento; iv) a seconda del challenge test svolto, questi ceppi devono essere in una miscela per il potenziale di crescita o individualmente per il tasso massimo di crescita.

4.3 Preparazione dell'inoculo

Il laboratorio dovrà svolgere la preparazione evitando il più possibile di influenzare il prodotto quando inoculiamo artificialmente *L. monocytogenes*.

a) Numero di subculture: i) devono essere svolte due subculture consecutive in un terreno appropriato, fino al raggiungimento dell'iniziale fase stazionaria. Incubare alla temperatura ottimale di crescita (prima subcoltura) ed ad una temperatura vicina alla temperatura di conservazione del prodotto nella prima fase della catena del freddo (seconda subcoltura). ii) per culture miscelate (potenziale di crescita), dovranno essere miscelate eguali quantità di ogni seconda subcoltura. b) Inoculo: i) la concentrazione target di inoculo dovrà essere

ottenuta dalla diluizione della coltura miscelata (potenziale di crescita) o dalla seconda subcoltura (massimo tasso di crescita) in soluzione fisiologica; ii) l'inoculo dovrebbe essere usato immediatamente e la sua concentrazione controllata sull'agar selettiva usata per il test.

4.4 Inoculo delle unità campione

In base alle informazioni raccolte e fornite dall'OSA, il laboratorio dovrà decidere tra i metodi a disposizione elencati nel documento di orientamento tecnico EURL *Lm*: i) inoculo in superficie o in profondità ii) con o senza l'apertura del packaging del prodotto. Il laboratorio dovrà giustificare la rilevanza del metodo di inoculo per il prodotto studiato. Il laboratorio dovrà utilizzare un'attrezzatura adeguata (per esempio, setto e siringa) per inoculare i prodotti. Il livello di contaminazione target (circa 100 ufc/g) dovrà essere rispettato così come il volume di inoculo ($\leq 1\%$ della massa dell'unità campione inocolata).

4.5 Conservazione delle unità campione

Questo step è di grande importanza, in particolare nei challenge test per la valutazione del potenziale di crescita. Le combinazioni di temperatura/durata per ogni step della catena del freddo dovranno essere giustificate in accordo alla tabella 3 della sezione 3.2.1.2. del documento di orientamento tecnico EURL *Lm*: a) Profilo tempo/temperatura supportato dalle informazioni fornite dall'OSA (75% dell'osservazione dei dati appartenenti all'OSA); b) Profilo tempo/temperatura basato sui dati nazionali (75% quando è presente la catena del freddo); c) Profilo tempo/temperatura definito da valori predefiniti (8 °C, 12 °C, 22 °C). Il laboratorio dovrà dar prova che le unità campione sono state conservate sotto il profilo tempo/temperatura definito nel protocollo.

4.6 Misurazioni fisico-chimiche delle unità campione non inoculate

Per caratterizzare il prodotto su cui è svolto il challenge test, il laboratorio dovrà misurare i parametri fisico-chimici sulle unità campione non inoculate come: i) pH, a_w o NaCl e il contenuto di umidità ii) composizione dei gas nell'atmosfera di confezionamento; iii) altri parametri. Il laboratorio dovrà specificare quando queste analisi vengono svolte e su quante unità campione non inoculate (provenienti dallo stesso lotto come il prodotto inoculato) vengono effettuate queste misurazioni. Dovrà essere usato almeno un campione all'inizio ed un campione alla fine dello studio per lotto.

4.7 Analisi microbiologiche

Il metodo usato dovrà adempire i requisiti specificati nell'articolo 5 del regolamento (CE) n. 2073/2005. Per valutare il comportamento di *L. monocytogenes* artificialmente introdotta nel prodotto, il laboratorio dovrà quantificare la concentrazione di *L. monocytogenes* mediante il metodo di riferimento EN ISO 11290-2 o un metodo alternativo validato in accordo al EN 16140-2. Il laboratorio dovrà assicurare che il limite inferiore di quantificazione è 10 ufc/g. Per essere sicuri che il challenge test sia svolto su prodotti che sono liberi da *L. monocytogenes*, il laboratorio dovrà effettuare il rilevamento di *L. monocytogenes* nelle unità campione non inoculate mediante il metodo di riferimento EN ISO 11290-1 o un metodo alternativo validato in accordo al EN 16140-2.

Per il lotto testato dovrà essere usato almeno un campione all'inizio ed un campione alla fine dello studio. Se *L. monocytogenes* viene rilevata nei campioni, il laboratorio deve immediatamente informare l'OSA, e se il challenge test è stato completato (rilevamento di *L. monocytogenes* alla fine dello studio), dove i dati sono usati per la valutazione del potenziale di crescita, dovrà essere fornita una giustificazione nel report.

Per caratterizzare il prodotto d'interesse, il laboratorio dovrà quantificare, usando unità campione non inoculate, la microflora naturale rilevante per il prodotto: per esempio microflora totale, batteri lattici o lieviti, ma almeno microflora totale.

Il laboratorio dovrà documentare quando queste analisi sono condotte e su quante unità campione non inoculate queste analisi vengono svolte. Per il lotto testato dovrà essere usato almeno un campione all'inizio ed un campione alla fine dello studio.

4.8 Determinazione della crescita potenziale ed esposizione dei risultati

Per calcolare il potenziale di crescita di *L. monocytogenes* del prodotto studiato, il laboratorio dovrà i) determinare la concentrazione di *L. monocytogenes* (in \log_{10} ufc/g) all'inizio e alla fine del challenge test usando tre campioni per lotto, come descritto nel documento di orientamento tecnico EURL *Lm*; ii) controllare per ogni lotto che al giorno 0, la deviazione standard dei conteggi di *L. monocytogenes* è $\leq 0.5 \log_{10}$ ufc/g. Se non dovesse risultare così il challenge test è inconcludente; iii) usare il calcolo di potenziale di crescita fornito dal documento di orientamento tecnico EURL *Lm*; iv) selezionare tra i potenziali di crescita ottenuti da ciascun lotto il valore più alto come risultato finale dello studio. In base ai risultati ottenuti, il laboratorio dovrà essere in grado di concludere se si è verificato un incremento significativo o non significativo di *L. monocytogenes* nel prodotto studiato. Quando la differenza tra il massimo e il minimo di tre valori di un lotto è alta, il laboratorio dovrà notificare questa informazione nel report di prova insieme alle

raccomandazioni degli esperti dello studio. Inoltre, ogni osservazione che potrebbe influenzare la validità dei dati o della conclusione deve essere riportata.

4.9 Determinazione del massimo tasso di crescita ed esposizione dei risultati

Per calcolare il massimo tasso di crescita di *L. monocytogenes* nel prodotto studiato, il laboratorio dovrà i) costruire le curve di crescita di *L. monocytogenes* (concentrazione di *L. monocytogenes* in \log_{10} ufc/g versus tempo) ad una definita temperatura per due ceppi, individualmente testati; ii) applicare una regressione nei data points sperimentali nella fase esponenziale, oppure adattare una regressione non lineare a tutti i data points sperimentali usando un software microbiologico; iii) il laboratorio dovrà essere in grado di fornire un intervallo di fiducia per il tasso di crescita in accordo all'errore standard dato dal software, e selezionare tra il massimo tasso di crescita per ogni lotto il valore più alto come risultato finale dello studio; iv) il laboratorio dovrà essere in grado di estrapolare la μ_{\max} ottenuta nello studio ad un'altra temperatura usando la formula per un modello secondario fornita dal documento di orientamento tecnico EURL *Lm*.

4.10 Durability studies

Durability studies vengono effettuati su lotti che potrebbero essere naturalmente contaminati da *L. monocytogenes*. Questi studi differiscono dai challenge test poiché i campioni non vengono contaminati artificialmente. A causa dell'elevata eterogeneità della contaminazione da parte di *L. monocytogenes* nei lotti, la selezione random dei campioni è fondamentale in quanto non tutti i campioni possono essere contaminati. La valutazione delle caratteristiche del prodotto, la shelf-life e le condizioni di conservazione a freddo sono importanti da considerare per i durability studies. Nei durability studies, il numero di campioni sopra i 100 ufc/g può essere valutato in termini di frequenza e tendenze.

4.10.1 Procedure di campionamento dell'alimento

Il laboratorio dovrebbe richiedere i dati storici dall'OSA (prevalenza di *L. monocytogenes*) per essere in grado di dare consigli sul valore dello svolgimento o meno di un durability study. Il laboratorio dovrebbe essere in grado di dare un'indicazione all'OSA riguardo alle procedure di campionamento per un campionamento random e mirato, e prendere in considerazione le procedure di campionamento per l'interpretazione dei risultati. Per le analisi su più lotti dovrebbe essere data la distribuzione nel tempo tra i lotti.

4.10.2 Calcolo ed esposizione dei risultati

Dovrebbe essere calcolata la percentuale di campioni sopra i 100 ufc/g ed espressa con un intervallo di confidenza. Questo intervallo di confidenza può facilmente essere ottenuto usando un software, per esempio http://www.causascientia.org/math_stat/ProportionCI.html. Tutti i dati misurati per *L. monocytogenes* dovrebbero essere forniti nel report per permettere ulteriori calcoli sui dati. In caso di campioni sopra i 100 ufc/g alla fine della shelf-life, il laboratorio dovrebbe informare l'OSA e i dati per tale informazione dovrebbero essere inclusi nel report.

5 Recenti pubblicazioni scientifiche sull'applicazione di challenge test

Sin dalla pubblicazione del primo documento di orientamento tecnico EURL *Lm* per la conduzione di studi sulla shelf-life riguardo *L. monocytogenes* in alimenti RTE nel 2008, un certo numero di studi è stato condotto su una vasta gamma di prodotti alimentari. Nell'ambito della letteratura scientifica, le principali applicazioni sono riportate in Tabella 5, in cui Álvarez-Ordóñez et al. (2015) hanno riassunto le diverse metodiche adottate dai vari autori per la realizzazione di challenge test in alimenti RTE. Sono state confrontate le metodiche adottate per challenge test su varie tipologie di alimenti, in particolare (a) verdure e insalate, (b) prodotti carnei, (c) prodotti ittici (pesce, frutti di mare, ...), (d) formaggi e (e) altre tipologie di pasti pronti. Tuttavia, in molti casi non è stata rispettata una stretta osservanza dei criteri riportati all'interno del documento di orientamento tecnico EURL *Lm* ufficiale.

5.1 Challenge test su verdure e insalate

Diversi tipi di verdure e insalate sono state sottoposte a challenge test negli ultimi anni con risultati variabili. Uyttendaele et al. (2009) hanno analizzato 182 insalate pronte a base di maionese (comprese insalate di uova, insalate di carne, insalate di pesce e insalate di verdure) dopo l'inoculo in profondità con un cocktail di tre ceppi di *L. monocytogenes*, confezionate in atmosfera normale o in condizioni di atmosfera modificata come indicato dall'OSA, e incubate per la shelf-life effettiva del prodotto a 4 o 7 °C o secondo un programma di temperature variabili (ad esempio, 1/3 di shelf-life a 4 °C e 2/3 di shelf-life a 7-8 °C) come definito dall'OSA. La crescita di *L. monocytogenes* è stata supportata da 18 delle 182 insalate testate. La maggior parte delle insalate pronte sottoposte a challenge test sono state formulate per avere un pH acido (solitamente pH 5.0-5.5) in combinazione con un a_w di 0.96-0.98. In queste condizioni nessuna crescita di *L. monocytogenes* è stata osservata durante una shelf life prolungata (fino a 35-42 giorni) a 4-7 °C. Le insalate pronte

a base di maionese contengono spesso acidi organici, prevalentemente acetico. Questo acido ha un forte effetto inibitorio sulla crescita di *L. monocytogenes* anche a concentrazioni molto basse [0,2% (w/w)] (Vermeulen et al., 2007). Altri acidi organici, come acido sorbico e benzoico, vengono spesso aggiunti alle insalate pronte come conservanti chimici e possono prevenire la crescita di *L. monocytogenes*. Tuttavia, nelle insalate con pH ≥ 5.5 e $a_w \geq 0.97$ vi era chiaramente un potenziale per la crescita di *L. monocytogenes*. Skalina e Nikolajeva (2010) hanno eseguito challenge test su insalate di gamberetti e pomodori, insalate di prosciutto affumicato e insalate di formaggio all'aglio individualmente inoculate in modo artificiale con tre ceppi di *L. monocytogenes* (un ceppo di riferimento e due isolati dal terreno) e conservate a temperature refrigerate (3 °C e 7 °C) per 48 h. Hanno dimostrato che tutte e tre le insalate, e in particolare l'insalata di formaggio all'aglio e l'insalata di prosciutto affumicato, erano in grado di supportare la crescita di *L. monocytogenes* e che il potenziale di crescita aumentava all'aumentare della temperatura. Sant'Ana, Barbosa, Destro, Landgraf e Franco (2012) hanno utilizzato i challenge test per valutare la capacità di diversi tipi di verdure RTE (scarola, cavolo verde, spinaci, crescione d'acqua, rucola, carota grattugiata, insalata verde e mix per yakisoba) di sostenere la crescita di *L. monocytogenes*. Le verdure RTE sono state inoculate con cocktail di cinque ceppi isolati da verdure RTE commercializzate a San Paolo, Brasile, e conservate a temperatura di refrigerazione (7°C) e d'abuso (15°C). Tutte le verdure RTE, eccetto le carote, hanno supportato la crescita di *L. monocytogenes* e il potenziale di crescita più elevato è stato osservato per i cavoli verdi e la rucola conservati a 15 °C per 6 giorni. Quel gruppo di ricerca ha anche determinato gli effetti di diversi scenari di stoccaggio [100% della shelf-life (6 giorni) a 7 °C; 70% della shelf-life a 7 °C e 30% a 15 °C; 30% della shelf-life a 7 °C e 70% a 15 °C; 100% della shelf-life a 15 °C] sulla capacità di crescita di *L. monocytogenes* in miscele RTE di lattuga iceberg e cavoli verdi contaminati artificialmente per ottenere 10^1 e 10^2 ufc/g con un cocktail di tre ceppi isolati da verdure RTE in Brasile. I campioni sono stati confezionati in atmosfera modificata ed in film perforato (Sant'Ana, Landgraf, Destro, & Franco, 2013). Hanno osservato che sia la lattuga che i cavoli verdi hanno supportato la crescita di *L. monocytogenes*, sebbene la crescita osservata fosse fortemente dipendente dalla temperatura di conservazione. Pertanto, anche basse contaminazioni come 10^1 ufc/g hanno portato a popolazioni elevate quando si sono presentate temperature d'abuso durante lo stoccaggio (15°C). Manios, Konstantinidis, Gounadaki e Skandamis (2013) hanno studiato la variabilità della crescita di elevate o basse popolazioni di *L. monocytogenes* in lattuga fresca tagliata e cavoli. Le insalate sono state inoculate con poche (1-4) o con 1000 cellule per campione di un singolo ceppo di *L.*

monocytogenes e conservate a 8 °C. Con un inoculo di 1000 cellule per campione, il numero di cellule è aumentato con variazione limitata (SD <0.5 log ufc/g) su insalate di verdure, a differenza della grande variabilità (SD<0.7-3.4 log ufc/g) nella crescita osservata da un inoculo costituito da 1 a 4 cellule per campione. L'incremento logaritmico totale di *L. monocytogenes* sulle insalate variava da 1.8 a 2.1 log ufc/g per i campioni con popolazione elevata e da 2.7 a 3.4 log ufc/g per i campioni con bassa popolazione. Gli autori hanno concluso che false implicazioni pericolose possono derivare da challenge test con inoculi irrealisticamente elevati. Leong, Alvarez-Ordóñez, Guillas e Jordan (2013) hanno valutato la crescita di *L. monocytogenes* sui funghi. Questi autori hanno immerso tre lotti differenti di funghi interi e funghi a fette in una miscela di tre ceppi di *L. monocytogenes* per ottenere una concentrazione di circa 100-1000 ufc/g ed hanno incubato i lotti contaminati artificialmente a 15 °C. Hanno dimostrato che sia i funghi a fette che quelli interi hanno supportato la crescita di *L. monocytogenes*. In un successivo esperimento Leong, Alvarez-Ordóñez e Jordan (2015) hanno dimostrato che, utilizzando una procedura di inoculazione diversa (diffusione superficiale piuttosto che immersione), i funghi interi non supportano la crescita di *L. monocytogenes*.

5.2 Challenge test su prodotti carnei

Vari prodotti carnei cotti sono stati sottoposti a challenge test per la determinazione della crescita di *L. monocytogenes* e, nella maggior parte dei casi, è stata osservata tale crescita. Uyttendacle et al. (2009) hanno eseguito dei challenge tests con tre ceppi di *L. monocytogenes* inoculati sulla superficie di 92 prodotti a base di carne, tra cui paté prosciutto cotto, lingua di maiale cotta, carne di maiale cotta e pranzo a base di carne ed è stata rilevata crescita di *L. monocytogenes* su 61 dei 92 prodotti carnei testati.

In generale due fattori hanno influenzato il potenziale di crescita dei prodotti carnei cotti, cioè l' a_w e la presenza di CO₂ nell'atmosfera di confezionamento. C'era una crescita significativa di *L. monocytogenes* nei prodotti carnei cotti esaminati con valori di a_w superiori a 0.96, a meno che i campioni di carne cotta fossero stati confezionati in atmosfera modificata. Ad esempio, se confezionato in atmosfera modificata, *L. monocytogenes* non cresceva su paté (a_w 0.961) per 42 giorni. Questi autori hanno concluso che i prodotti carnei cotti tendono a supportare la crescita di *L. monocytogenes* principalmente a causa del loro pH intrinsecamente più elevato (6.0-6.5). Garrido, Garcia-Jalón e Vitas (2010) hanno monitorato la crescita di un singolo ceppo di *L. monocytogenes* isolato in prosciutto cotto a fette usando un basso livello di inoculo (<10 ufc/g) e diverse temperature di conservazione (5 °C e 9 °C), rappresentative delle temperature di un

frigorifero domestico. La concentrazione critica di ufc/g di *L. monocytogenes* è stata rispettivamente raggiunta dopo il secondo e il terzo giorno di conservazione a 9 °C e 5 °C. Quando il tempo di conservazione è stato esteso a 5 giorni, il patogeno ha raggiunto valori $>10^3$ ufc/g ad entrambe le temperature di conservazione. Augustin et al. (2011) hanno effettuato challenge test su pasticci di maiale sottovuoto, prosciutto cotto affettato e confezionato in atmosfera modificata e pollo cotto inoculati in modo artificiale sulla superficie a $\sim 10^2$ ufc/g con un singolo ceppo di *L. monocytogenes*. Successivamente, i campioni di alimenti contaminati sono stati confezionati e conservati a 8 °C. La crescita di *L. monocytogenes* è stata supportata da tutti i campioni di carne testati. Everis e Betts (2013) hanno usato prosciutto cotto a fette per confrontare due approcci per eseguire challenge test. Nel primo è stato seguito il documento di orientamento tecnico EURL *Lm* per lo svolgimento di studi sulla shelf-life riguardo *L. monocytogenes* in alimenti RTE del 2008. Questo protocollo richiedeva l'analisi di tre lotti di prodotto, un livello di inoculo non superiore a 100 ufc/g, colture pre-adattate a condizioni di freddo e un regime di conservazione di 7 giorni a 8 °C seguiti da 14 giorni a 12 °C. Il secondo approccio era un più standard protocollo industriale utilizzando un singolo lotto di prodotto, un livello di inoculo compreso tra 100 e 1000 ufc/g, colture cresciute durante la notte a temperatura ottimale e un regime di conservazione di 21 giorni a 8 °C. In entrambi i casi è stata utilizzata una miscela di tre ceppi di *L. monocytogenes* (un ceppo di riferimento, uno isolato da pollo e uno isolato da un macello) per inoculare il prosciutto cotto a fette. Il potenziale di crescita, calcolato come la mediana dei log ufc/g alla fine della shelf-life meno la mediana dei log ufc/g al giorno 0, era >6.0 log ufc/g per il primo approccio e >4 log ufc/g per l'approccio industriale tra i giorni 0 e 21, mentre per i primi 3 giorni il potenziale di crescita era $>0,5$ log ufc/g per entrambi gli approcci. I risultati dello studio hanno mostrato che l'approccio standard del settore industriale ha fornito risultati simili a quelli del più complesso approccio di orientamento europeo per quanto riguarda il potenziale di crescita, lag time e il tempo per un aumento di 2 log. Samapundo et al. (2013) hanno condotto challenge test su prosciutto cotto a ridotto contenuto di NaCl (28% in meno di NaCl rispetto ai prosciutti cotti comunemente prodotti). I campioni di prosciutto cotto sono stati inoculati in superficie con un singolo ceppo di *L. monocytogenes*, originariamente isolata dal prosciutto cotto, ad un livello di $\sim 10^2$ ufc/g. Dopo l'inoculazione, i campioni sono stati immediatamente posti in sacchetti ad alta barriera verso l'ossigeno e confezionati con un'atmosfera al 30% di CO₂ e al 70% di N₂. Dopo il confezionamento, i campioni sono stati incubati a 7 °C. I risultati hanno mostrato che sia il prosciutto cotto di riferimento che il prosciutto cotto con ridotti livelli di NaCl hanno

supportato la crescita di *L. monocytogenes* e che non vi erano differenze nei profili di crescita di *L. monocytogenes* osservati in entrambi i prosciutti cotti.

5. 3 Challenge test su prodotti ittici

La maggior parte degli studi sui challenge test di *L. monocytogenes* effettuati su prodotti ittici sono stati fatti su pesce affumicato, sebbene siano stati analizzati anche altri prodotti ittici, come quelli in salamoia. Il challenge test su pesce affumicato di Uyttendaele et al. (2009) ha mostrato una crescita di *L. monocytogenes* in 12 dei 25 campioni inoculati con tre diversi ceppi e conservati per 3-4 settimane a 4 °C. La maggior parte dei campioni di pesce affumicato analizzati da questi autori aveva un pH piuttosto neutro (6.0-6.5) combinato con valori di a_w complessivi abbastanza elevati (0.96-0.98) (eccetto uno con un a_w di circa 0.94), che rappresentano condizioni chimico-fisiche favorevoli alla crescita di *L. monocytogenes*. D'altra parte, quando il pesce affumicato presentava valori di pH di 5.5-6.0 combinati con valori di a_w inferiori a 0.93-0.94, è stata rilevata una limitazione alla crescita di *L. monocytogenes*. Uyttendaele et al. ha inoltre sottoposto 45 campioni di pesce affumicato non inoculato (13 dei quali risultavano essere naturalmente contaminati da *L. monocytogenes*) ad un durability studies ed hanno osservato che i numeri di *L. monocytogenes* hanno superato i 100 ufc/g in un solo campione dopo la conservazione fino alla fine della shelf-life. Mejholm et al. (2008) hanno eseguito challenge test per esaminare la crescita di *L. monocytogenes* in gamberetti in salamoia. Questi autori hanno utilizzato gamberetti in salamoia così come gamberetti salati e scolati confezionati in atmosfera modificata (MAP) prodotti con diverse ricette di salamoia per studiare l'effetto dei parametri di conservazione come gli acidi organici (acidi benzoici, citrici e sorbici o acidi acetici, citrici e lattici), pH e sale. Hanno inoculato i campioni con una miscela di quattro ceppi isolati di *L. monocytogenes* precedentemente ottenuti da prodotti ittici. Dopo l'inoculo hanno confezionato i campioni di gamberetti salati e scolati in un'atmosfera modificata inizialmente contenente il 40% di CO₂ e il 60% di N₂ e hanno conservato i campioni a 7-8 °C per la shelf-life del prodotto. Essi hanno riportato che i gamberetti in salamoia con acidi benzoico, citrico e sorbico hanno impedito la crescita di *L. monocytogenes* per più di 40 giorni a 7 °C quando i parametri di conservazione erano simili a quelli dei prodotti commerciali. Tuttavia, hanno dimostrato che piccoli cambiamenti nei parametri di conservazione, ed in particolare ridotte concentrazioni di acido benzoico, hanno portato alla crescita di *L. monocytogenes* in gamberetti in salamoia. Allo stesso modo questo gruppo di ricerca ha anche eseguito challenge test utilizzando miscele di *Lactobacillus sakei* (4 isolati), *L. monocytogenes* (4 isolati), *Salmonella enteritidis*,

Salmonella weltevreden e *Staphylococcus aureus* (2 isolati) in gamberetti in salamoia preparati utilizzando due diversi tipi di salamoia (la prima contenente acetato di sodio, lattato di sodio e cloruro di sodio; la seconda contenente benzoato di sodio, acido citrico, sorbato di potassio e cloruro di sodio) (Mejholm, Devitt e Dalgaard, 2012). Dopo la marinatura hanno confezionato i gamberetti salati e scolati in un'atmosfera modificata inizialmente contenente il 40% di CO₂ e il 60% di N₂ e i campioni conservati a 7 e 15 °C. Questi esperimenti hanno dimostrato che *L. monocytogenes* non è in grado di crescere a 7 °C nei gamberetti salati e scolati, che assomigliavano a prodotti commerciali sia con acidi acetici e lattici o acidi benzoici, citrici e sorbici. Tuttavia, la riduzione della concentrazione di acido acetico e lattico del 50% o del 75% ha portato ad una crescita relativamente veloce. Augustin et al. (2011) hanno monitorato la crescita di *L. monocytogenes* in arringhe affumicate sottovuoto e insalata di surimi dopo l'inoculo a $\sim 10^2$ ufc/g con un singolo ceppo di *L. monocytogenes* e incubazione a 8 °C, ed hanno riportato la crescita del patogeno in entrambi i prodotti testati. Vermeulen, Devlieghere, De Loy-Hendrickx e Uyttendaele (2011) hanno utilizzato un case study per il salmone affumicato a freddo al fine di valutare il documento di orientamento tecnico europeo del 2008 per lo svolgimento di studi sulla shelf-life riguardo *L. monocytogenes* in alimenti RTE. Hanno inoculato tre lotti di salmone affumicato a freddo con un cocktail di tre ceppi di *L. monocytogenes*. I campioni sono stati quindi riconfezionati sottovuoto e incubati secondo un profilo di temperatura ragionevolmente prevedibile, come concordato con l'OSA, ovvero 8 giorni a 2 °C (stoccaggio interno allo stabilimento di produzione), 10 giorni a 4 °C (stoccaggio in fase di vendita al dettaglio) e 13 giorni a 8 °C (conservazione in un frigorifero domestico). I risultati hanno dimostrato che il salmone affumicato a freddo ha la capacità di supportare la crescita di *L. monocytogenes*, con un aumento da 1.3 a 2.8 log di *L. monocytogenes* alla fine della shelf-life. Hanno inoltre concluso che la variabilità tra lotti era significativamente più alta della variabilità all'interno del lotto stesso e che il miglior approccio da utilizzare (semplici challenge test che determinano i valori di log all'inizio e alla fine della shelf-life vs modellizzazione e microbiologia predittiva) dipenderà dal particolare contesto. Pertanto, hanno riconosciuto i semplici challenge test come test economicamente convenienti per le piccole e medie imprese potendo essere impostati abbastanza rapidamente, ma che forniscono un unico risultato e devono essere riconfermati se si verificano cambiamenti nella composizione o nel processo di produzione. D'altra parte, hanno descritto i processi di modellizzazione come più costosi, dal momento che richiedono una maggiore preparazione e analisi dei dati più complicate, ma più

vantaggiosi, poiché forniscono maggiori informazioni e consentono la previsione di crescita/non crescita in circostanze diverse.

Kang et al. (2012) hanno esaminato l'effetto del metodo di salagione e congelamento-scongelo del salmone affumicato a freddo sulla successiva crescita di ceppi geneticamente diversi di *L. monocytogenes* (inoculati dopo congelamento-scongelo). I filetti di salmone affumicati a freddo stagionati e salati con soluzione acquosa sono stati tagliati in fette di ~25g ed inoculati in superficie con singoli ceppi di *L. monocytogenes* ad una concentrazione finale di 10^4 ufc/g. Le fette di salmone inoculate sono state essiccate all'aria, confezionate sottovuoto e incubate a 7 °C. Il salmone affumicato a freddo ha supportato la crescita di *L. monocytogenes* e il congelamento-scongelo dei filetti di salmone prima dell'inoculo ha portato a una crescita pronunciata di *L. monocytogenes* a 7 °C. Gli autori hanno anche osservato variazioni nella crescita tra i diversi ceppi di *L. monocytogenes*, che indica l'importanza di valutare più ceppi.

5.4 Challenge test su formaggio

Alcuni autori hanno monitorato la capacità di crescita di *L. monocytogenes* nel formaggio RTE sia dopo l'inoculo del latte, prima della sua trasformazione, sia dopo l'inoculo superficiale del formaggio con *L. monocytogenes*. Altri studi hanno seguito la crescita/sopravvivenza di *L. monocytogenes* presente naturalmente. Nella maggior parte dei casi non è stata osservata crescita di *L. monocytogenes* nel formaggio RTE. Angelidis, Boutsiouki e Papageorgiou (2010) hanno inoculato lotti di formaggio fuso in modo indipendente con tre diversi ceppi di *L. monocytogenes* (un ceppo di riferimento, uno isolato da un caso clinico associato ad un focolaio di listeriosi da formaggio a pasta molle e un ceppo isolato da formaggio fuso). L'inoculo è stato distribuito tramite sgocciolamento il più uniformemente possibile sulla massa del formaggio per ottenere tre livelli di inoculazione (alto [6×10^5 ufc/g]; medio [6×10^3 ufc/g]; basso [10^2 ufc/g]), e successivamente i formaggi sono stati confezionati in un ambiente ad atmosfera controllata (30% CO₂/70% N₂) al fine di imitare le condizioni atmosferiche di imballaggio del prodotto commerciale. I formaggi sono stati conservati a 4, 12 o 22 °C. La crescita di *L. monocytogenes* non è stata osservata da Angelidis et al. in nessuna delle prove sperimentali (esperimenti che hanno coinvolto diverse combinazioni di ceppi, livello di inoculo e temperatura di conservazione) durante tutto il periodo di conservazione. Al contrario, le popolazioni di *L. monocytogenes* sono diminuite nel tempo a una velocità dipendente dal ceppo e dalla temperatura di conservazione. Le cinetiche di riduzione di *L. monocytogenes*

nel formaggio fuso sono state successivamente caratterizzate attraverso l'uso di strumenti di modellizzazione (Angelidis, Papageorgiou, Tyrovouzis e Stoforos, 2013).

Wemmenhove, Stampelou, van Hooijdonk, Zwietering e Wells-Bennik (2013) hanno inoculato tre diversi ceppi isolati di *L. monocytogenes* (uno isolato dal formaggio, uno isolato dall'ambiente di un caseificio e un ceppo di riferimento) nel latte destinato alla produzione di formaggio, e a seguire la formazione della cagliata indotta dagli starter e maturata per un periodo fino a 12 mesi ottenendo i formaggi Gouda. I conteggi della vitalità della *L. monocytogenes* sono stati stabiliti a diverse fasi della produzione e della stagionatura del formaggio. Hanno osservato che durante la formazione della cagliata, le cellule (i numeri) vitali di *L. monocytogenes* aumentavano di 0.5 log ufc/g, valore derivante dall'intrappolamento nella cagliata. Tuttavia, nessuna crescita è stata osservata durante le prime 8 settimane di maturazione ed una significativa diminuzione del numero di *L. monocytogenes* vitale è stata osservata nel formaggio Gouda dopo la maturazione per più di 8 settimane. Bernini et al. (2013) hanno eseguito un challenge test su croste di formaggio erborinato contaminate artificialmente con un cocktail di cinque ceppi di *L. monocytogenes* originariamente isolati dallo stesso tipo di formaggio. L'inoculo è stato effettuato con due livelli di contaminazione (10^1 e 10^2 ufc/g) distribuendo un'appropriata diluizione del cocktail dei ceppi sulle scorze di 25 fette di formaggio e permettendo loro di asciugare prima dell'incubazione a 4 °C o 8 °C per 55 giorni. Sono stati osservati aumenti del numero di *L. monocytogenes* di 1.80 e 1.70 log ufc/g dopo 10 giorni e di 2.48 e 2.93 log ufc/g dopo 30 giorni rispettivamente a 4 °C e 8 °C. Dalmaso e Jordan (2014) hanno monitorato la crescita di *L. monocytogenes* in due lotti indipendenti tra loro di formaggio Cheddar contaminato spontaneamente per un periodo di maturazione di cinque mesi. Per il primo lotto, *L. monocytogenes* è stata rilevata grazie all'arricchimento durante i primi tre mesi di maturazione, ma i numeri di batteri erano sempre inferiori al limite di rilevazione (10 ufc/g). Per il secondo lotto, i numeri di *L. monocytogenes* non hanno mai superato i 20 ufc/g per i primi due mesi di maturazione, mentre a tre mesi di maturazione i numeri sono scesi sotto al limite di quantificazione, sebbene *L. monocytogenes* sia ancora stata rilevata tramite arricchimento. Dopo cinque mesi di stagionatura, *L. monocytogenes* non è stata rilevata in entrambi i lotti di formaggi per conteggio diretto o tramite arricchimento, dimostrando che la crescita di *L. monocytogenes* non è supportata da quel caseificio di formaggio Cheddar.

5.5 Challenge test su altri piatti pronti

Uno studio condotto da Daelman, Jacxsens, Devlieghere e Uyttendaele (2013), che ha valutato la sicurezza microbiologica e la qualità dei vari tipi di alimenti cotti refrigerati, ha riportato dei challenge test per tre lotti di paella RTE composta di carne, riso, pollo e verdure. I lotti di paella sono stati inoculati superficialmente con un cocktail di tre ceppi isolati di *L. monocytogenes*, confezionati in atmosfera modificata costituita da una miscela 50:50 di N₂ e CO₂ e conservati a 4 °C (come raccomandato sull'etichetta) fino alla fine della shelf-life (6 giorni). Il numero di *L. monocytogenes* è aumentato di 0.63 log ufc/g alla fine del periodo di incubazione, il che significa che il prodotto ha supportato la crescita di *L. monocytogenes* anche ad una temperatura di 4 °C. Grassi, Nucera, Lomonaco e Civera (2013) hanno determinato il potenziale di crescita di *L. monocytogenes* in due tipi di salse fresche non pastorizzate per pasta (formaggio e salse di funghi). Hanno inoculato entrambi i tipi di salsa con una sospensione batterica mista composta da tre differenti ceppi di *L. monocytogenes* originariamente isolati da alimenti (uno da un formaggio a pasta molle, uno da un Gorgonzola e uno da un prodotto carneo) a ~10³ ufc/g, e incubato i campioni contaminati a due diverse temperature: 4 °C e 8 °C. A 4 °C l'aumento della conta di *L. monocytogenes* vitale era <0.5 log ufc/g per entrambe le salse, mentre a 8 °C la salsa di formaggio supportava la crescita di *L. monocytogenes* con incrementi della popolazione batterica > 0.5 log ufc/g. Samapundo et al. (2013) hanno valutato l'effetto della riduzione o sostituzione di NaCl sulla crescita di *L. monocytogenes* nella salsa bianca. La salsa bianca, composta da acqua, latte in polvere, farina di frumento, amido modificato, margarina, NaCl e sorbato di potassio, è stata inoculata con un singolo ceppo di *L. monocytogenes* per ottenere un livello iniziale di 10³ ufc/g. Le salse inoculate sono state incubate a 7 °C e la crescita è stata monitorata nel tempo. I risultati hanno mostrato che la salsa bianca supportava la crescita di *L. monocytogenes* e che la riduzione o sostituzione di NaCl non ha significativamente influenzato la crescita batterica.

Tabella 5 parte 1. Descrizione dei principali e recenti lavori pubblicati.

Ref.	Prodotto testato	No. lotti	Scelta ceppo	Prep. inoculo	Inoculo alimento	Conserv.	Analisi
Mejholm et al. (2008, 2012)	Gamberetti in salamoia e gamberetti salati e scolati.	Nd	Quattro ceppi di <i>L. mono</i> isolati da prodotti ittici.	Due subculture a 25 °C a 24h e 10 °C dai 2 ai 3 giorni.	Gamberetti salamoia: 0.1% (v/w) cocktail (10 ⁵ ufc/ml). Gamberetti salati e scolati: 1% (v/w) cocktail (10 ⁴ ufc/ml).	Gamberetti salamoia, gamberetti salati e scolati in MAP conservati a 7-8 °C o 15 °C.	Conteggio di <i>L. mono</i> secondo ISO 11290-2.
Uytendale et al. (2009)	Insalate pronte, prodotti carni cotti e pesce affumicato a base di maionese.	Nd	Tre ceppi di <i>L. mono</i> .	Subcultura per 24h a 30 °C.	(0.3-1.0 ml) superficie (carne e pesce) o in profondità (insalate) inoculo 100g dell'alimento per livello di circa 50-100 ufc/g.	Confezioni (aria, vuoto o MAP) shelf-life a 4-7 °C o a T. var. (1/3 della shelf-life a 4 °C e 2/3 della shelf-life a 7-8 °C).	Conteggio di <i>L. mono</i> in conformità all'ISO 11290-2 utilizzando un limite di rilevamento ridotto.
Angelidis et al. (2010)	Formaggio fuso	Due lotti	Tre ceppi di <i>L. mono</i> (un tipo di ceppo, 1 da caso clinico, 1 formaggio fuso).	Due subculture a 30 °C per 24h e 30 °C per 20h.	cocktail su 25g di formaggio per tre livelli di inoculo: alto (6x10 ⁵ ufc/g); medio (6x10 ³ ufc/g); basso (10 ² ufc/g).	Confezioni MAP che sono stati cons. a 4, 12 o 22 °C.	Conteggio di <i>L. mono</i> in conformità all'ISO 11290-2.
Garrido et al. (2010)	Prosciutto RTE a fette	Un lotto	Un ceppo di <i>L. mono</i> Isolato da prosciutto cotto	Subcultura a 30 °C per 18h.	Inoculo (1ml) su 25g di prosciutto per concentrazione t5 e i 10 ufc/g.	Confezioni conservate a 5 °C e 9 °C per 15 giorni.	<i>L. mono</i> (ISO 11290-2), micro tot. LAB.

Tabella 5 parte 2. Descrizione dei principali e recenti lavori pubblicati

Ref	Prodotto testato	No. lotti	Scelta ceppo	Prep. inoculo	Inoculo alimento	Conserv.	Analisi
August in et al. (2011)	Pasticcio di maiale, arringa affumicata, prosciutto affumicato, pollo cotto e insalata di surimi.	Pasticcio maiale 1; arringa 4; prosciutto 7; pollo: 2; insalata di surimi 3 lotti.	Un ceppo di <i>L. mono</i> .	Crescita esp. 37 °C–16h, 37 °C–8h, 9 °C–6 d. (BHI).	Inoculo sulla superficie o contaminazione omogenea dipendentem ente dal tipo di prodotto.	Conservati a 8 °C durante la shelf-life.	Conteggio di <i>L. mono</i> in conformità all'ISO 11290-2, aerobi e batteri lattici mesofili.
Vermeulen et al. (2011)	Salmone affumicato.	Tre lotti.	Tre ceppi di <i>L. mono</i> (uno dal formaggio, uno dal paté, uno da insalate di tonno).	Due subculture a 37 °C per 24h e a 7 °C fino all'iniziale fase lag..	Inoculo (200 µl) di 200g di campione di salmone con un cocktail per ottenere una concentrazione di circa 50ufc/g.	Conservazione a 2 °C per 8 giorni, seguiti da 10 giorni a 4 °C e 13 giorni a 8 °C come concordato con l'OSA.	Conteggio di <i>L. mono</i> in conformità all'ISO 11290-2, conta dei psicrotrofi totali, LAB e Enterobatteri
Kang et al. (2012)	Salmone affumicato a freddo.	Non dichiarato	Quattro ceppi di <i>L. mono</i> (2 da salmone RTE, 1 carne RTE, 1 lesione cutanea)	37 °C–18h in BHI, 16 °C – 24h in terreno povero, e 16 °C–24h in un terreno spec.	Distribuzione e della sospensione batterica per ottenere una concentrazione finale di 10 ⁴ ufc/g.	Campioni confezionati sottovuoto che sono stati conservati a 7 °C per 30 giorni.	<i>L. mono</i> : piastramento a spirale in Oxford agar. Batteri lattici.
Sant'Arena et al. (2012)	Verdure RTE – scarola, cavolo verde, spinaci, crescione d'acqua, rucola, carota grattugiata.	Non dichiarato	Cinque ceppi di <i>L. mono</i> isolati da verdure RTE.	Due subculture a 37 °C per 24h.	Inoculo spot (0.5 ml) di porzioni di 25g di verdure RTE. Conc. finale: 10 ³ ufc/g.	Confezioni (MAP) conservate: I (100% della shelf-life [6 giorni] a 7 °C), II (30% a 7 °C e 70% a 15 °C) e III (100% a 15 °C).	<i>L. mono</i> : omogenizzando 25g con 225 ml di peptoni in acqua, seguiti da diluizioni decimali e inoculo in Oxford agar selettivo.

6 Scopo della tesi

Gli attuali livelli di assunzione giornaliera di NaCl in Europa variano dai 9g (3540 mg di Na) in Austria fino ai 17.50g (6884 mg di Na) in Ungheria, tutti comunque molto lontani dai livelli massimi raccomandati da WHO e EFSA di 5-6g giornalieri (2000-2400 mg di Na). L'assunzione di elevate quantità di sodio sono state infatti associate all'ipertensione ed ad altre malattie cardiovascolari i cui costi sanitari annuali sono stati valutati in 169 miliardi di euro in UE e 403.1 miliardi di dollari in USA. La sostituzione di parte dell'NaCl con un altro sale non contenente sodio è stata utilizzata come una delle principali strategie per ridurre l'assunzione di sodio. D'altra parte, l'effetto dell'NaCl su stabilità e sicurezza degli alimenti si basa sia sulla sua capacità di abbassare l' a_w del sistema che di svolgere un'attività antimicrobica.

Lo scopo di questa tesi è valutare attraverso l'uso di un challenge test l'effetto della sostituzione di parte dell'NaCl con KCl sulla potenzialità di sviluppo di *L. monocytogenes* in un modello di prodotto carneo RTE trattato termicamente e refrigerato.

7 Materiali e metodi

7.1 Preparazione del modello

In modo da utilizzare il modello pi ù robusto e rappresentabile della riduzione del contenuto di NaCl, il prosciutto è stato sottoposto a soluzioni osmotiche dalle differenti concentrazioni di NaCl o KCl o differenti combinazioni degli stessi sali. Oltre alla valutazione del prosciutto trattato, sono state effettuate anche analisi sulle soluzioni osmotiche, come quella relativa alla crescita di *L. monocytogenes* con piastre multiwell. Dopo aver valutato i risultati ottenuti secondo le linee guida del protocollo ANSES per i Challenge test con *L. monocytogenes* sul prosciutto per la selezione dei campioni, sono stati effettuati dei saggi di challenge test con i due casi pi ù rappresentativi di un prodotto trattato con soluzione osmotica al 4% di NaCl e con una che aveva un contenuto ridotto di NaCl sostituito con KCl. Il prosciutto è stato preparato con la carne di lonza trattata con la soluzione osmotica alle differenti concentrazioni con un rapporto medio di 1:6 (g/ml) dentro ad un barattolo di vetro sterilizzato, in modo che la fetta di carne fosse completamente immersa nella soluzione. Il trattamento è durato per 24 ore in cella termostata a 4 °C. In seguito, la soluzione osmotica veniva rimossa, la fetta di carne sciacquata con acqua sterile in modo asettico e infine i barattoli chiusi con la fetta di lonza venivano esposti in bagno termostato per 10 minuti a 75 °C (Figura 7.1).

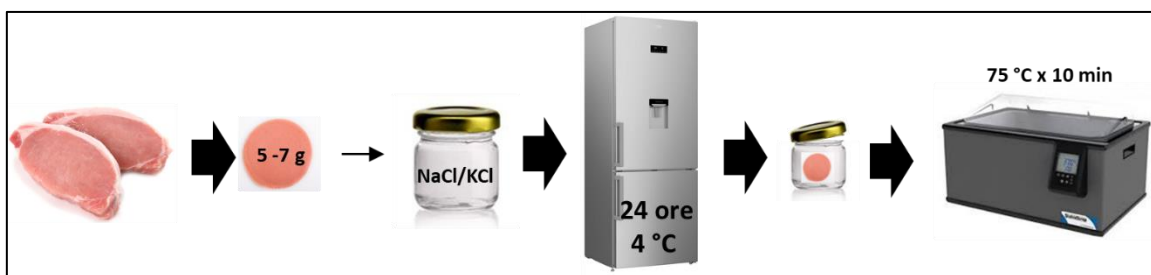


Figura 7.1 Schema della preparazione del prosciutto

Tabella 7.1 Lista dei campioni prodotti e analizzati

Codice	Trattamento	Analisi condotte
CRTL	0%	a_w , IPC, pH, Screening, Challenge Test
2 N	2 % NaCl	a_w , Screening
4 N	4% NaCl	a_w , IPC, pH, Screening, Challenge Test
6 N	6% NaCl	a_w , IPC, Screening
8 N	8% NaCl	a_w , IPC, Screening
10 N	10% NaCl	a_w , IPC, Screening
2 K	2% KCl	a_w , Screening
4 K	4% KCl	a_w , Screening
6 K	6% KCl	a_w , Screening
8 K	8% KCl	a_w , Screening
10 K	10% KCl	a_w , Screening
1+1 KN	1% NaCl + 1% KCl	a_w , Screening
2+2 KN	2% NaCl + 2% KCl	a_w , Screening
3+3 KN	3% NaCl + 3% KCl	a_w , Screening
4+4 KN	4% NaCl + 4% KCl	a_w , Screening
5+5 KN	5% NaCl + 5% KCl	a_w , Screening
0,5+1,5 KN	1,5% NaCl + 0,5% KCl	a_w , Screening
1+3 KN	3% NaCl + 1% KCl	a_w , pH, Screening, Challenge Test
1,5+4,5 KN	4,5% NaCl + 1,5% KCl	a_w , Screening
2+6 KN	6% NaCl + 2% KCl	a_w , Screening
2,5+7,5 KN	7,5% NaCl + 2,5% KCl	a_w , Screening

7.2 Analisi di a_w e pH

L'analisi dell'attività dell'acqua a_w è stata effettuata con uno strumento Aqua Lab (Decagon Devices Inc., USA). La preparazione del campione è stata effettuata nel seguente modo: il campione di carne è stato spezzettato in piccole parti in modo tale che la superficie della navicella, da inserire nello strumento, venisse completamente ricoperta. Tale passaggio risulta essere fondamentale per l'accuratezza della misurazione, poiché spazi vuoti eventualmente lasciati dal campione di carne intatto fornirebbero errori di lettura. Il campione di riferimento era rappresentato da una soluzione avente $a_w = 1$ e l'analisi del controllo veniva effettuata ogni dieci campioni.



Figura 7.2 a sinistra: strumento Aqualab per valutare l' a_w e a destra: pHmetro Crison basic.

L'analisi del pH è stata effettuata sia sulla soluzione osmotica, che sui campioni sottoposti al challenge test. È stato utilizzato uno pHmetro (Crison, Spain) tarato con soluzioni tampone standard a pH 7.00 e 4.00. Durante il challenge test il pH dei campioni di prosciutto è stato valutato immergendo e stocando il campione in un volume costante di acqua sterile.

7.3 Screening della crescita *L. monocytogenes* in presenza di NaCl e KCl.

Lo screening è stato effettuato con piastre multiwell da 96 pozzetti e utilizzando uno strumento spettrofotometro Tecan (Tecan Inc, USA). Ogni campione aveva un volume nel pozzetto di 200 μ l ed era costituito da 180 μ l di soluzione osmotica e 20 μ l di inoculo del cocktail di Lm alla concentrazione di 5 Log_{10} CFU/ml ottenuta con valutazione spettrofotometrica e correlazione unit OD_{600} / CFU ml^{-1} . Inoltre, sono stati utilizzati dei controlli, sia relativi alle stesse soluzioni non inoculate con *L. monocytogenes*, sia a soluzioni di controllo, come acqua e Tryptone Soy Broth inoculate con *L. monocytogenes*.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	2N	2N	2N	4N	4N	4N	6N	6N	6N	8N	8N	8N
B	10N	10N	10N	2K	2K	2K	4K	4K	4K	6K	6K	6K
C	8K	8K	8K	10K	10K	10K	1+1	1+1	1+1	2+2	2+2	2+2
D	3+3	3+3	3+3	4+4	4+4	4+4	5+5	5+5	5+5	0.5+1.5	0.5+1.5	0.5+1.5
E	1+3	1+3	1+3	1.5+4.5	1.5+4.5	1.5+4.5	2+6	2+6	2+6	2.5+7.5	2.5+7.5	2.5+7.5
F	TSB+	TSB+	TSB+	CTRL+	CTRL+	CTRL+	TSB	TSB	TSB	CTRL	CTRL	CTRL

Figura 7.3. Impostazione delle piastre multiwell.

Le analisi sono state condotte con due differenti batch di micropiastre con doppia misurazione e a differenti intervalli di tempo, in media due misurazioni in 24 ore fino al tempo di 72 ore. La temperatura di incubazione era di 30 °C in condizioni di aerobiosi. Le micropiastre sono state impostate secondo lo schema presentato in figura 7.3

7.4 Analisi ICP-MS

L'analisi dell'ICP serve a determinare la quantità di diverse sostanze inorganiche metalliche e non metalliche presenti anche in bassissime concentrazioni (ppm o ppb) all'interno di un campione. Nel nostro caso siamo andati a determinare in particolare le quantità di Na^+ e K^+ presenti, indici del livello di adsorbimento dei sali nella carne dalla soluzione osmotica. L'analisi è stata condotta presso i laboratori della sede di Bologna del DiSTAL in collaborazione con il Dr. Andrea Simoni. I campioni dopo aver subito il trattamento di salamoia sono stati prima pesati ed equilibrati con acqua, poi riscaldati e sottoposti a trattamento con acido nitrico e H_2O_2 . In seguito, il prodotto ottenuto è stato equilibrato e sottoposto all'analisi strumentale con spettrofotometro di massa abbinato al plasma accoppiato induttivamente.



Figura 7.4. Presentazione delle analisi IPC per determinare il Na. A = trattamento con acido nitrico; B = filtrazione prodotto del trattamento; C) Strumento ICP.

7.5 Challenge test con *L. monocytogenes*

Dopo aver preparato i campioni di carne con il modello stabilito, sono stati scelti i campioni 4N e 1+3KN poiché risultano essere quelli più rappresentativi per valori di a_w dei prodotti in commercio, come riportato in tabella 7.5. Per svolgere il challenge test i campioni inoculati e non inoculati in doppio sono stati preparati in batch per un totale di 36 unità. L'inoculo è stato svolto superficialmente con 100 ufc e sono stati scelti tre time point.

Tabella 7.5 Condizioni utilizzate per il challenge test

Campioni	Conc	NaCl	KCl	a_w	pH	Conservazione
CTRL	0%	0	0	0.997 ÷ 0.998	6.2 ± 0.05	0-7 g @ 8 °C
4N	4%	100%	0	0.979		7-21 g @ 12 °C
1+3KN	4%	75%	25%	0.980 ÷ 0.993		

Il primo time point t0 avviene subito dopo la preparazione del campione, mentre t1 corrisponde ad un'incubazione a 8 °C per 7 giorni ed infine t2 prevede ulteriori 14 giorni di incubazione a 12 °C. Per ogni tipologia di campione sono stati valutati pH, a_w , crescita di *L. monocytogenes* e LAB.



Figura 7.5 Schema semplificato del challenge test.

7.5.1 Preparazione dell'inoculo

L'inoculo di *L. monocytogenes* per effettuare il challenge test è stato ottenuto con 4 ceppi differenti di *Lm*. In particolare, uno era il type strain e tre erano ceppi isolati da differenti matrici alimentari relative a prodotti carnei. I ceppi sono stati rinfrescati da stock conservati a -80 °C in brodo al glicerolo BHI (Brain Heart Infusion) [infuso di cuore e cervello 17,5 g/L; peptone 10 g/L; glucosio 2 g/L; cloruro di sodio 5g/L; sodio fosfato bibasico 2,5 g/L; 30 % glicerolo] e fatti crescere singolarmente in terreno liquido selettivo TSB (Tryptone Soy Broth) [digerito pancreatico di caseina 17 g/L; digerito peptico di soia 3 g/L; glucosio 2,5 g/L; cloruro di sodio 5 g/L; fosfato d'idrogeno dipotassico 2,5 g/L] a 30 °C per almeno 48 ore. In seguito, 100 ul delle colture dei vari ceppi sono state trasferite singolarmente in nuovo brodo TSB per un secondo passaggio e fatte crescere per 48 ore a 30 °C. Queste sono state poi sottoposte a crescita prolungata a 7 °C per almeno 10 giorni, in modo da ottenere l'adattamento alla temperatura di conservazione del prosciutto. In ogni

caso l'incubazione è avvenuta in aerobiosi in tubi falcon da 15 ml. Dopo il tempo di coltura, la crescita microbica di ogni ceppo è stata quantificata, sfruttando la turbidimetria del brodo di coltura con spettrofotometro a 600 nm di lunghezza d'onda e con l'impiego di un'applicazione on line le unità di densità ottica sono state trasformate Log_{10} CFU/ml (<https://www.chem.agilent.com/store/biocalculators/calculODBacterial.jsp>). I singoli ceppi sono stati diluiti in TSB con la formula $C1:V1=C2:V2$ fino a 4 Log_{10} CFU/ml e poi miscelati e diluiti in un cocktail contenente tutti e quattro i ceppi con concentrazione finale di 3 Log_{10} CFU/ml. Il cocktail batterico è stato quindi centrifugato a 6000 rpm per 10 minuti, il supernatante rimosso e il pellet risospeso in ugual volume di acqua sterile. 75 μl del cocktail di inoculo così ottenuto è stato spatolato in superficie sul prosciutto, in modo da non superare l'1% del peso del campione e da avere una concentrazione di contaminazione di 50-100 CFU/g.

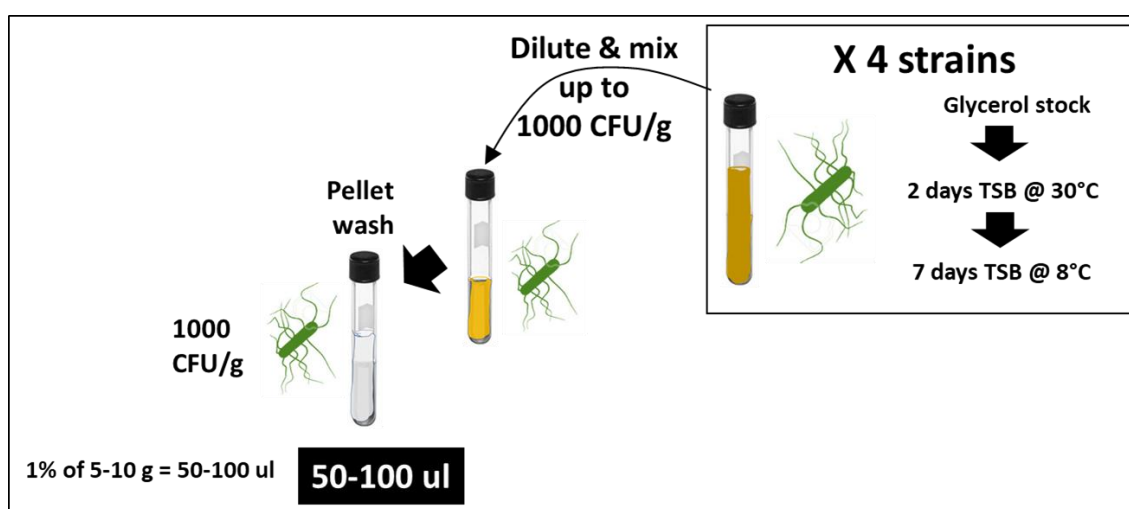


Figura 7.5.1. Schema semplificato della preparazione dell'inoculo di *L. monocytogenes*.

7.5.2 Preparazione del campione e conduzione del challenge test.

Il campione di prosciutto è stato preparato nel seguente modo: da una fetta di lonza cruda conservata a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ è stata ritagliata in modo asettico una fettina tonda di circa 7 g di peso, posta in un barattolo di vetro sterilizzato e immersa nella soluzione osmotica sterile o in acqua sterile con un rapporto 1:6 (p/v). Sia il barattolo che la soluzione erano stati adattati durante la notte alla temperatura di $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. I barattoli chiusi con la fetta di lonza e la soluzione sono stati condizionati per almeno 24 ore a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. In seguito, la soluzione è stata rimossa in modo asettico e il barattolo contenente la lonza posto in bagno termostato a $75 \text{ }^{\circ}\text{C}$ per 10 minuti e poi raffreddato in cella a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ per almeno un'ora (Figura 7.5.2a). Una volta che il campione si era raffreddato si è proceduto all'inoculo per spatolamento sulla superficie del prosciutto del cocktail di Lm precedentemente preparato. Subito il

campione è stato trasferito in sacchetti da vuoto, confezionato sottovuoto al 99.5%, sigillato e incubato alle condizioni del challenge test, ovvero per la durata della shelf life del prodotto, prima a 8 °C per 7 giorni e poi a 12 °C per altri 14 giorni. Sono stati prodotti due batch per ogni campione, accompagnati da un controllo inoculato costituito dal prosciutto precedentemente trattato con sola acqua sterile e altrettanti campioni di controllo non inoculati (Figura 7.5.2b).

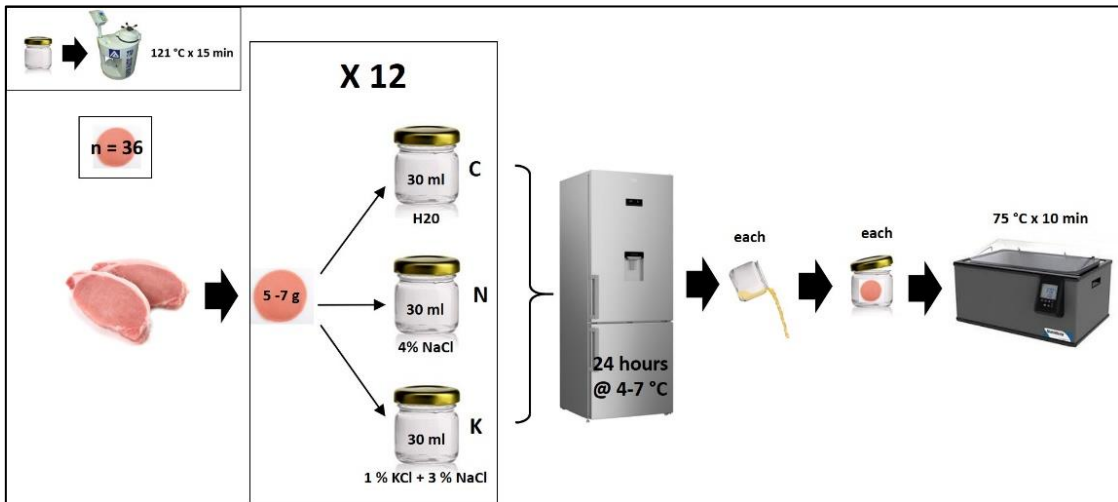


Figura 7.5.2a. Schema semplificato della preparazione del campione

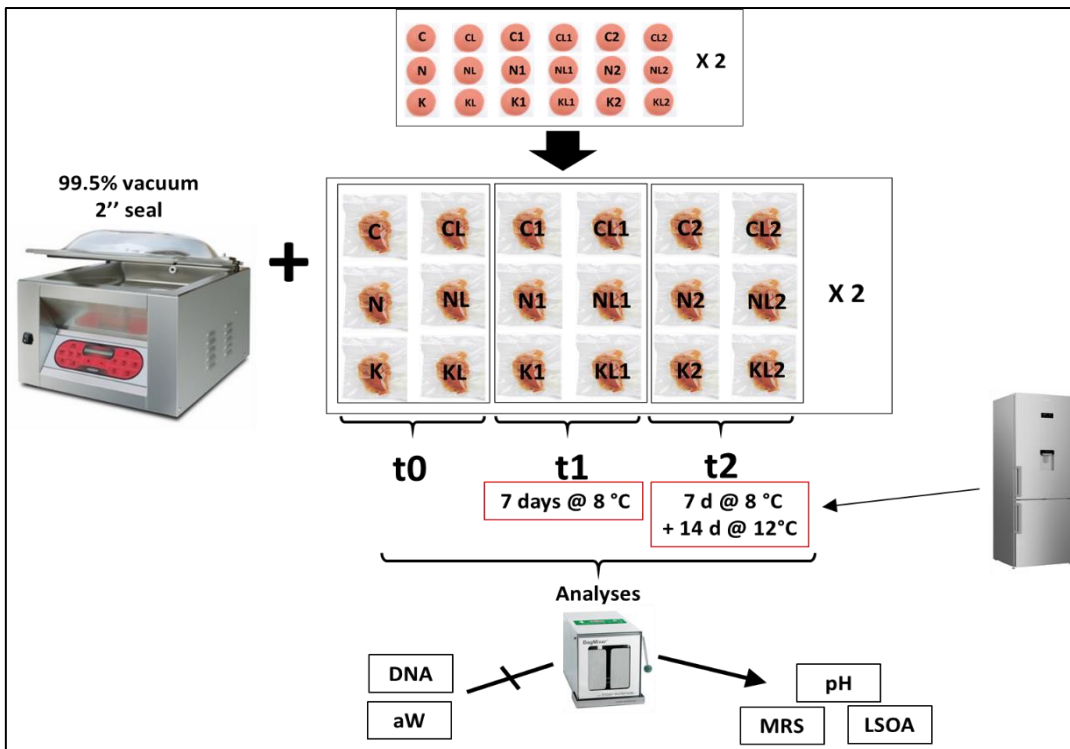


Figura 7.5.2b. Schema semplificato della preparazione del campione e conduzione del challenge test

7.5.3 Enumerazione di *L. monocytogenes* e LAB

L'enumerazione di *L. monocytogenes* e dei LAB è stata effettuata secondo il protocollo ANSES e secondo il metodo ISO 112290_2. Questo prevedeva la conta in piastra su terreno agarizzato selettivo LSAO (*Listeria Selective Agar Oxford*) per Lm e MRS (de Man-Rugosa Sharpe) per i LAB. Le diluizioni del campione omogeneizzato per 2 minuti con stomacher sono state effettuate in acqua peptonata tamponata pH 7.2 [peptone 10 (g/L), NaCl 5 (g/L), di-sodio fosfato 3.5 (g/L), potassio di-idrogeno fosfato 1.5 (g/L)] per Lm e in acqua fisiologica [NaCl 9 (g/L)] per i LAB. Il terreno LSOA è stato autoclavato a 121 °C per 15 minuti, raffreddato a temperatura attorno ai 60 °C e addizionato dei supplementi specifici prima del piastramento. Il terreno LSOA [Columbia Blood Agar Base 39.0 (g/L), Aesculin 1.0 (g/L), Ferric ammonium citrate 0.5 (g/L), Lithium chloride 15.0 (g/L)] è stato addizionato con i supplementi specifici per l'enumerazione di Lm "Listeria Selective Supplement (Oxford formulation)" [Cycloheximide (400 mg/L), Colistin sulphate (20 mg/L), Acriflavine (5 mg/L), Cefotetan (2g/L), Fosfomicin (10 g/L)]. L'incubazione prima delle conte è stata effettuata a 30 °C dopo 48 ore al tempo iniziale e dopo 24 ore al tempo intermedio e a quello finale. Invece, l'enumerazione dei LAB è stata effettuata dopo incubazione a 37 °C per almeno 48 ore.

7.5.4 Valutazione di a_w e pH durante il challenge test

Per la determinazione di a_w e pH è stato utilizzato un batch destinato esclusivamente a tale scopo. La preparazione del campione è stata effettuata nel seguente modo: ciascun sacchetto da vuoto è stato aperto ed il campione di carne posto in un sacchetto sterile nuovo, quindi si è passati alla pesatura. In questa maniera è stato possibile diluire precisamente ogni diverso campione di carne con acqua sterile in un rapporto 1:10 ed in seguito omogenizzare tramite stomacher. Al campione così diluito è stato misurato il pH inserendo il rilevatore del pHmetro direttamente all'interno della soluzione. Successivamente è stata eliminata l'acqua di diluizione, facendo attenzione a non perdere le parti di carne più piccole derivanti dalla stomacatura. La carne, che aveva già subito un lavaggio gentile attraverso la diluizione, è posta all'interno di una navicella di plastica e questa inserita nello strumento Aqua Lab per la misurazione dell' a_w .

8 Risultati e Discussione

8.1 Misurazione dell' a_w , del pH e ICP

La tabella 8.1 riporta l'intero pool di campioni di carne, sottoposti a diverse salamoie, inizialmente presi in considerazione. Dalla Figura 8.1 si vede che ogni campione presenta una propria discesa lineare dell' a_w all'aumentare della concentrazione di NaCl, KCl o una combinazione dei due. Nel controllo con concentrazione allo 0% l' a_w è maggiore nella soluzione, poiché la carne contiene comunque un alcuni soluti aventi funzione di osmoliti. Invece nei campioni che hanno subito salamoia si nota che la carne di lonza ha un' a_w maggiore rispetto alla soluzione, poiché i sali presenti nella salamoia devono essere assorbiti dalla carne e tale assorbimento, oltre a richiedere tempo, può raggiungere un equilibrio diverso da quello della salamoia.

Tabella 8.1 Valori di a_w , pH e IPC della carne trattata con diverse salamoie

Campione	a_w	pH	ICP (Na)
2 N	0.991	/	/
4 N	0.979	6.26	0.90 mg/kg
6 N	0.970 ÷ 0.973	/	1.34 mg/kg
8 N	0.957	/	1.84 mg/kg
10 N	0.939	/	2.30 mg/kg
2 K	0.998	/	/
4 K	0.983 ÷ 0.991	/	/
6 K	0.983 ÷ 0.989	/	/
8 K	0.971 ÷ 0.981	/	/
10 K	0.959 ÷ 0.979	/	/
1+1 KN	0.993	/	/
2+2 KN	0.985 ÷ 0.988	/	/
3+3 KN	0.970 ÷ 0.986	/	/
4+4 KN	0.960 ÷ 0.977	/	/
5+5 KN	0.943 ÷ 0.972	/	/
0,5+1,5 KN	0.992	/	/
1+3 KN	0.980	6.09	/
1,5+4,5 KN	0.965 ÷ 0.987	/	/
2+6 KN	0.955 ÷ 0.983	/	/
2,5+7,5 KN	0.945 ÷ 0.973	/	/
CTRL	0.997 ÷ 0.998	6.17	0.02 mg/kg

A tal proposito si possono andare a leggere i risultati ottenuti dall'analisi ICP, la quale permette di determinare la quantità di Na^+ presente nel campione di carne, indice del livello di adsorbimento del sale a partire dalla soluzione osmotica. Dai valori ottenuti dall'analisi sperimentale si evidenzia che l'assorbimento di sale risulta crescere proporzionalmente all'aumentare delle concentrazioni di sale nelle salamoie.

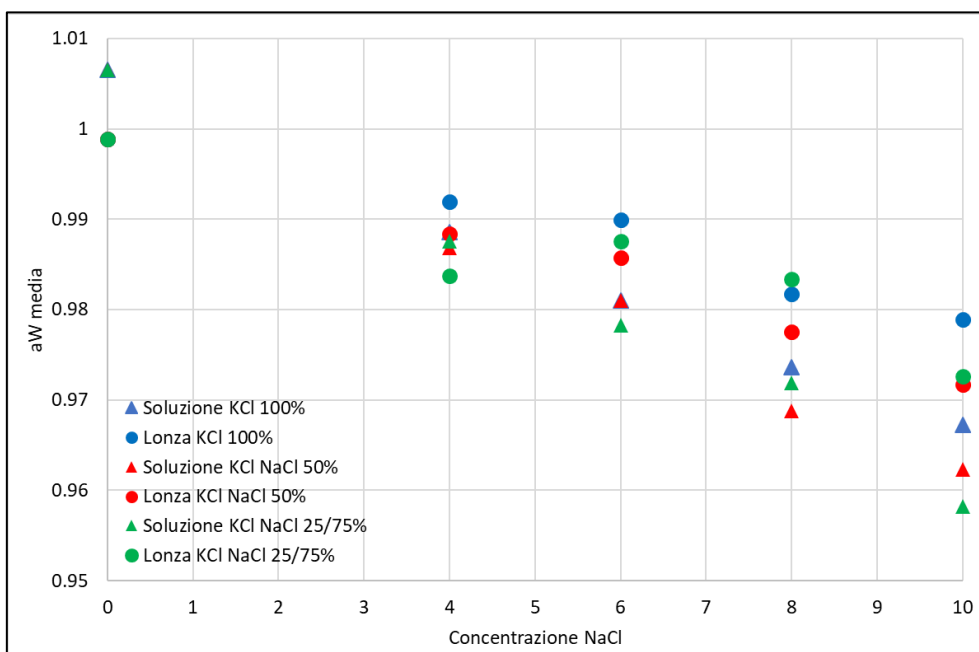


Figura 8.1 Valori di a_w della lonza trattata in base alla concentrazione di sale

8.2 Saggio di screening della crescita di *L. monocytogenes*

Il saggio di screening è stato svolto su tutte le combinazioni di campione ed in tabella 8.2 sono stati riportati solo i campioni che hanno mostrato i risultati più interessanti. Dato che i pozzetti erano di volume molto limitato, la quantità di nutrienti era bassa per cui dopo 72h tutti i campioni di *L. monocytogenes* erano in starvation. Il campione di controllo con *L. monocytogenes* inoculata su TSB presentava fin da subito un'accentuata fase esponenziale che culmina a 40h con un OD_{600} pari 0.55. Il campione 4N presentava una crescita meno accentuata e raggiungeva il massimo valore di OD_{600} pari a 0.39 dopo 24h, mentre il campione 6N a causa della maggior concentrazione di sale presentava una fase lag più lunga ed un picco massimo pari 0.37 dopo 40h. Il campione KN1+3 ha condotto una crescita più lineare e la sua fase stazionaria è durata fino a 64 ore con un picco di OD_{600} pari 0.35 dopo 48h, mentre il campione KN1.5+4.5 presentava una fase lag molto lunga ed una fase esponenziale debole culminante con un OD_{600} pari 0.25 dopo 48h.

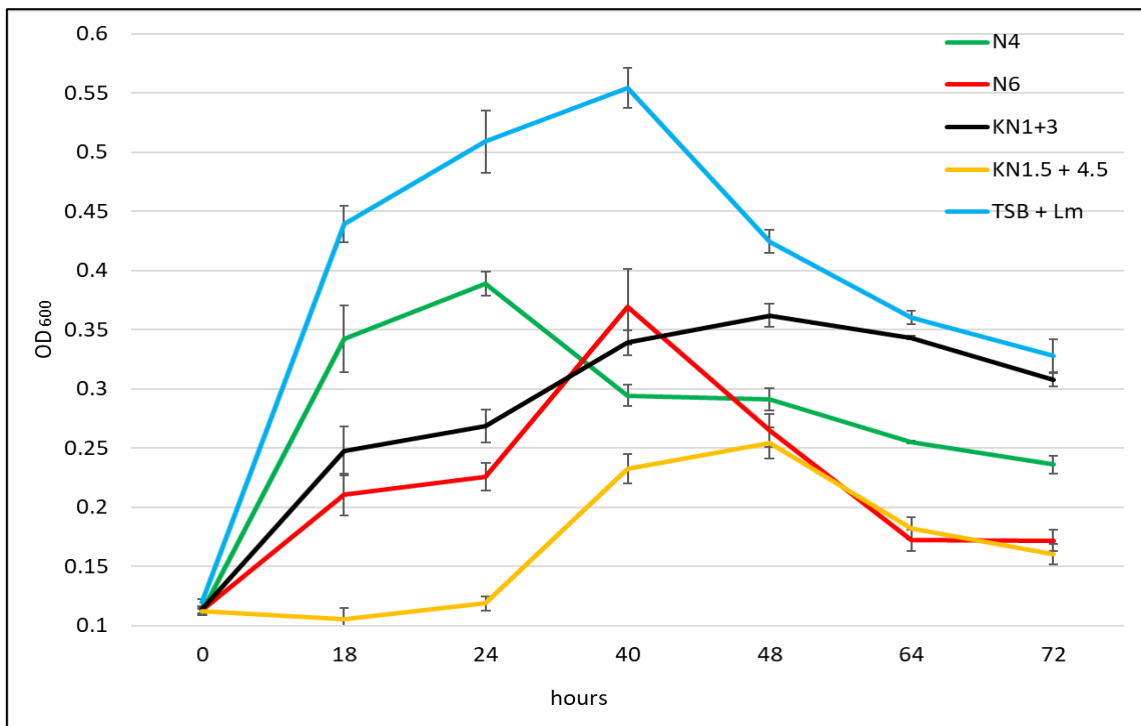


Figura 8.2. Effetto della crescita di *L. monocytogenes* con differenti soluzioni osmotiche ed un controllo.

8.3 Challenge test

Il challenge test (tabella 7.5) è stato condotto per valutare l'andamento della crescita microbica sulla superficie di campioni carnei precedentemente cotti e l'evoluzione dei parametri fisico-chimici di tali campioni in condizioni di conservazione controllate. In particolare, si è studiata la crescita dei LAB sopravvissuti al trattamento termico, rappresentanti della flora microbica naturale, e la crescita della *L. monocytogenes* inoculata successivamente alla cottura, rappresentando quindi una post contaminazione. Al t₀ la popolazione di LAB in tutti i campioni era di 3 ± 0.3 Log UFC/ml, mentre al t₁ la crescita è stata influenzata dal trattamento con salamoia: CTRL e CTRL + *Lm* (*L. monocytogenes*) hanno rispettivamente raggiunto una popolazione di 4.91 e 4.98 Log con un Δ di crescita di circa 1.7 Log, 4N e 4N + *Lm* hanno rispettivamente raggiunto una popolazione di 3.00 e 3.39 Log, valori abbastanza simili nonostante il fatto che 4N era l'unico campione che partiva da una popolazione iniziale più bassa della media, ed infine 1+3KN e 1+3KN + *Lm* hanno rispettivamente raggiunto una popolazione di 3.60 e 3.65 Log con un Δ di crescita di circa 1.0 Log. Si deduce quindi che l'utilizzo di salamoia inibisce fortemente la crescita della microflora e che una parziale sostituzione di KCl con NaCl non influisce troppo su tale inibizione. Al t₂, ovvero dopo 21 giorni di conservazione, tutti i campioni hanno mostrato una popolazione <1 Log. Interessante sottolineare che la copresenza con *Lm* non ha influito sulla crescita dei LAB.

Tabella 8.3. Challenge test, valori espressi come media di 2 misurazioni e 2 batch distinti.

Campione	Log10 CFU/ml LAB			Log10 CFU/ml Lm			pH			a _w		
	t0	t1	t2	t0	t1	t2	t0	t1	t2	t0	t1	t2
CTRL	3.2	4.91	<1	<1	<1	<1	6.17	6.00	5.88	0.997	/	1.002
4 N	2.3	3.00	<1	<1	<1	<1	6.26	5.91	5.73	0.979	/	0.996
1+3 KN	2.7	3.60	<1	<1	<1	<1	6.09	5.88	5.91	0.980	/	0.997
CTRL + Lm	3.25	4.98	<1	1.4	5.47	7.81	6.17	6.05	5.73	0.997	/	1.002
4 N + Lm	3	3.39	<1	1.4	4.81	7.34	6.26	6.18	6.00	0.979	/	1.003
1+3 KN + Lm	2.6	3.65	<1	1.3	5.18	7.52	6.09	6.30	5.82	0.980	/	1.005

Per quanto riguarda la *L. monocytogenes* la popolazione a t0 è circa pari a 1.4 log₁₀ UFC/ml, rappresentante del valore dell'inoculo iniziale appena effettuato. Al t1 la dinamica di crescita di *Lm* è stata apparentemente esponenziale tant'è che il CTRL + *Lm* ha raggiunto una popolazione di 5.47 Log, mentre 4N + *Lm* e 1+3KN + *Lm* hanno rispettivamente raggiunto una popolazione di 4.81 e 5.18 Log più contenute ma comunque alte. Durante i successivi 14 giorni di conservazione *L. monocytogenes* ha continuato a crescere raggiungendo a t2 una popolazione di 7.8 Log per il CTRL + *Lm*, mentre 4N + *Lm* e 1+3KN + *Lm* hanno rispettivamente raggiunto una popolazione di 7.34 e 7,52 Log. Tali valori risultano essere robusti, perché tutti i controlli non inoculati sono risultati negativi alla crescita di *L. monocytogenes*.

Sia nei campioni inoculati che in quelli non inoculati il pH iniziale di 6.20±0.05 tende ad abbassarsi nel tempo fino a pH 5.90±0.10; è importante notare che a t1 il pH dei campioni inoculati aveva subito una lievissima acidificazione e soltanto successivamente è sceso a differenza del pH dei campioni non inoculati. Il valore dell'a_w si attestava inizialmente sui 0.997 ÷ 0.998 per CTRL e il CTRL + *Lm* e sui 0.979 ÷ 0.980 per 4N, 4N + *Lm*, 1+3KN e 1+3KN + *Lm*.

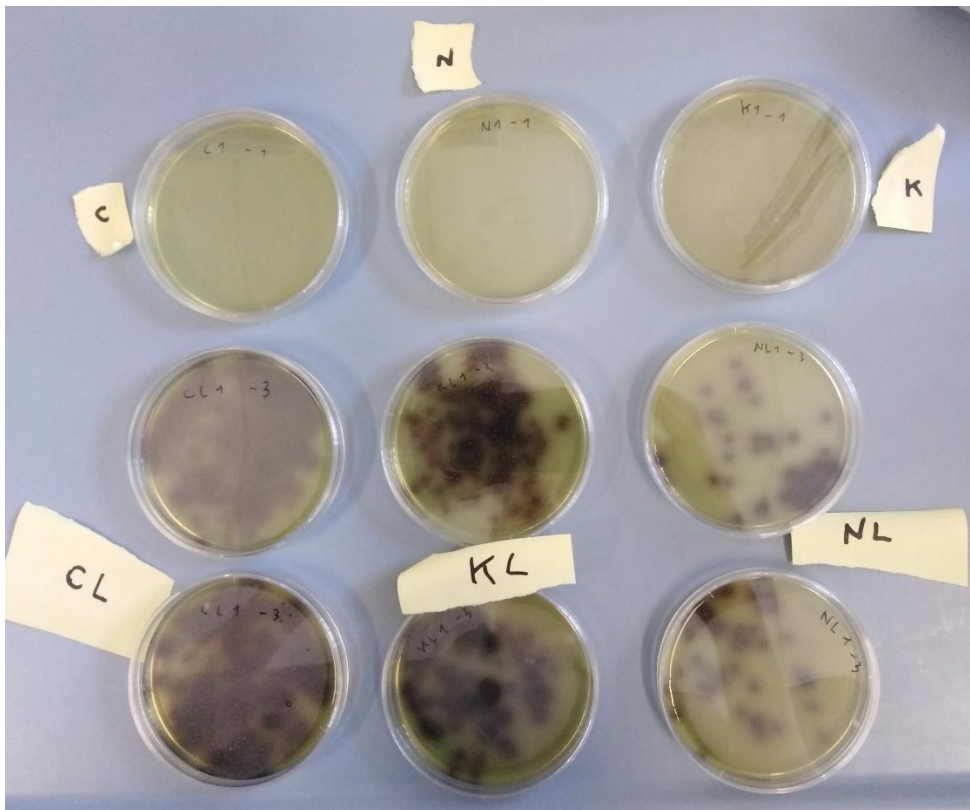


Figura 8.3a. Crescita su LSOA di *L. monocytogenes* a t1, dopo 7 giorni ad 8 °C. Diluizioni 10E-3. CL = controllo con *Lm*; KL = campione con soluzione con KCl con *L. monocytogenes*; NL = campione con soluzione con NaCl con *L. monocytogenes*; C = controllo; N = campione con soluzione di NaCl non inoculato; K = campione con soluzione di KCl non inoculato

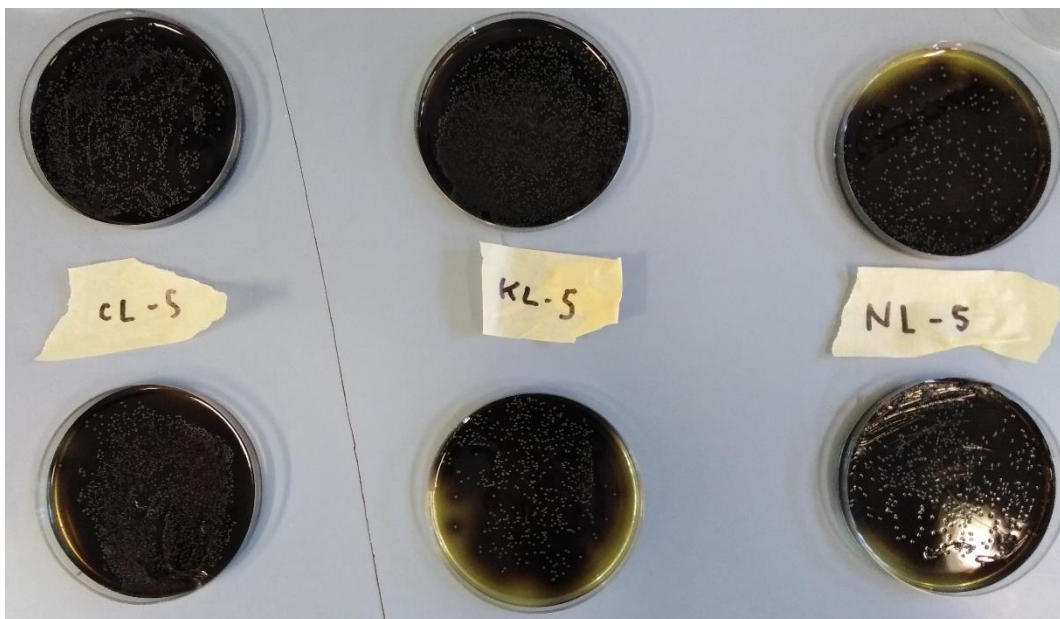


Figura 8.3b. Crescita su LSOA di *Lm* a t2, dopo 7 giorni a 8 °C e 14 giorni a 12 °C. Diluizioni 10E-5. CL = controllo con *L. monocytogenes*; KL = campione con soluzione con KCl con *L. monocytogenes*; NL = campione con soluzione con NaCl con *L. monocytogenes*.

I risultati ottenuti dall'enumerazione di *L. monocytogenes* e dei LAB sono descritti nella tabella 9, in cui sono riportati solo i criteri di valutazione esposti dal protocollo ANSES, i.e. differenza dell' a_w tra il tempo iniziale e il tempo finale, differenza di crescita fra il tempo iniziale e finale e valori del pH al tempo iniziale e a quello finale. Il principale valore da rispettare per considerare un alimento sicuro da *L. monocytogenes* è quello relativo alla enumerazione di *L. monocytogenes* che non deve avere un Δ superiore agli 0.5 Log CFU/g. Nel nostro caso, nessuna delle condizioni applicate hanno permesso di definire il nostro prodotto “non adatto allo sviluppo di *L. monocytogenes* secondo le linee guida europee”. Si può comunque osservare che, a fronte di un prevedibile maggiore incremento di sviluppo avvenuto nel controllo non sottoposto a salamoia (CTRL +Lm), la parziale sostituzione nella salamoia del 25% dell'NaCl con KCl sembra portare solo ad una leggera minor efficacia di inibizione dello sviluppo di *L. monocytogenes*.

Tabella 9. Challenge test, valori espressi come media di 2 misurazioni e 2 differenti batch

Campione	Delta a_w	Delta pH	Delta CFU Lm	Risultato
CTRL + Lm	0.005	- 0.44	6.41	Non idoneo
4N + Lm	0.024	- 0.26	5,9	Non idoneo
1+3KN + Lm	0.025	- 0.27	6.22	Non idoneo

9 Conclusione

Storicamente la sicurezza alimentare si preoccupa delle contaminanti alimentari, ma oggi si ritiene che le comuni abitudini alimentari contribuiscano a causare gravi malattie. La riformulazione dei prodotti alimentari per ridurre il sale, lo zucchero e i grassi a beneficio della salute dei consumatori è un processo incoraggiato dalle autorità e sostenuto dalla comunità scientifica. Ciò rappresenta una sfida complessa per l'industria alimentare, poiché devono essere soddisfatti diversi aspetti tecnologici, sensoriali e di sicurezza. Le nuove tecnologie e le strategie di riformulazione contribuiscono a una significativa riduzione di grassi, sale o zucchero, pur mantenendo l'apprezzamento del consumatore. Sono inoltre necessarie politiche migliori, stimoli alla ricerca e supporto scientifico/tecnologico poiché tutti concordano che una dieta povera di sale, grassi e zuccheri è una componente essenziale di una vita sana, che può avere un impatto drammatico sui costi sociali di una popolazione in rapida crescita.

In conclusione, è stato costruito un modello robusto sul quale realizzare un challenge test con *L. monocytogenes*. In particolare, in questa prova preliminare nelle condizioni utilizzate, scelte sulla base di prodotti commerciali analoghi, è stato dimostrato che la parziale sostituzione di NaCl con KCl non influisce negativamente sull'inibizione della crescita microbica. Il protocollo messo a punto ha permesso di correlare le concentrazioni di sali nella salamoia con quelle nel prodotto finale. Nessuna delle combinazioni adottate ha permesso di rientrare nel range di sicurezza richiesto dai criteri del protocollo ANSES, come prevedibile per un prodotto carneo RTE sottoposto unicamente al trattamento di salamoia senza l'utilizzo di alcun conservante, acidificante o spezie diversamente dai prodotti carnei solitamente in commercio. Nonostante, il modello proposto rimane valido per studi successivi di sostituzione della concentrazione di Na⁺, che prendano in considerazione una combinazione più efficaci di fattori d'inibizione dello sviluppo di *L. monocytogenes*.

10 Bibliografia

- Curiale MS. 1991. Shelf-life evaluation analysis. *Dairy Food Environ Sanit* 11(4):364-9.
- Farber J. M., Gendel S. M., Tyler K. D., Boerlin P., Landry W. L., Fritschel S. I., Barrett T. J. (2001). Chapter 11: Molecular typing and differentiation. In: Downes FP, Ito K, editors. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. Washington (DC): American Public Health Assoc.
- [FDA] Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition (2001). The "Bad Bug Book" [Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins handbook]. <http://www.cfsan.fda.gov/~mow/intro.html>. Accessed 2001 Dec 10.
- [FDA/USDA] Food and Drug Administration, Center for Food Safety and Applied Nutrition; U.S. Dept. of Agriculture, Food Safety and Inspection Service (2001). Draft assessment of the relative risk to public health from foodborne *Listeria monocytogenes* among selected categories of ready-to-eat foods. <http://www.foodsafety.gov/~dms/lmrisk.html>. Accessed 2001 Dec 13.
- [IFT] Institute of Food Technologists, Dept. of Science and Technology Projects (2000). Special supplement: Kinetics of microbial inactivation for alternative food processing technologies. Barach J. T., Barbosa-Canovas G. V., Busta F. F., Datta A. K., Davidson P. M., Farkas D. F., Heldman D. R., Hoover D. G., Kokini J. L., Pflug I. J., Pierson M. D., Sastry S. K., Schaffner D. W., Zhang Q. H., editors. Chicago: IFT. [108] p. (*Journal of Food Science*; vol. 65, no.8, suppl).
- Jay I. M. (1996). *Modern food microbiology*. 5th ed. New York: Chapman & Hall.
- Kaur P. (1986). Survival and growth of *Bacillus cereus* in bread. *J Appl Bacteriol* 60:513-6
- Notermans S., Veld P., Wijtzes T., Mead G. C. (1993). A user's guide to microbiological challenge testing for ensuring the safety and stability of food products. *Food Microbiol* 10(2):145-57
- Ross T., Todd E., Smith M. (2000). Exposure assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods: preliminary report for joint FAO/WHO expert consultation on risk assessment of microbiological hazards in foods. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations. Report nr MRA 00/02. 242 p.
- Vestergaard E. M. (2001). Building product confidence with challenge studies. *Dairy Food Environ Sanit* 21(3):206-9.
- Wyatt C. J., Guy V. H. (1981). Incidence and growth of *Bacillus cereus* retail pumpkin pies. *J Food Prot* 44(6):422-4.
- Angelidis A. S., Boutsouki P., & Papageorgiou D. K. (2010). Loss of viability of *Listeria monocytogenes* in contaminated processed cheese during storage at 4, 12 and 22 °C. *Food Microbiology*, 27, 809-818.

- Angelidis A.S., Papageorgiou D. K., Tyrovouzis N. A., & Stoforos N. G. (2013). Kinetics of *Listeria monocytogenes* cell reduction in processed cheese during storage. *Food Control*, 29, 18-21.
- Augustin J.C., Bergis H., Midelet-Bourdin G., Cornu M., Couvert O., Denis C., et al. (2011). Design of challenge testing experiments to assess the variability of *Listeria monocytogenes* growth in foods. *Food Microbiology*, 28, 746-754.
- Beaufort A. (2011). The determination of ready-to-eat foods into *Listeria monocytogenes* growth and no growth categories by challenge tests. *Food Control*, 22, 1498-1502.
- Bernini V., Bottari B., Dalzini E., Sgarbi E., Lazzi C., Neviani E., et al. (2013). The presence, genetic diversity and behaviour of *Listeria monocytogenes* in blue-veined cheese rinds during the shelf life. *Food Control*, 34,323-330.
- Daelman J., Jacxsens L., Devlieghere F., & Uyttendaele M. (2013). Microbial safety and quality of various types of cooked chilled foods. *Food Control*, 30,510-517.
- Dalmasso M., & Jordan K. (2014). Absence of growth of *Listeria monocytogenes* in naturally contaminated Cheddar cheese. *The Journal of Dairy Research*, 81,46-53.
- DG SANCO (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. Available online https://www.fsai.ie/uploadedFiles/EU_Guidance_listeria_monocytogenes.pdf (accessed on 02 October 2014).
- European Commission (EC) (2005). Commission Regulation (EC) No. 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. *Official Journal of the European Union*, L338.
- European Commission (EC) (2008). 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. Available online http://ec.europa.eu/food/food/biosafety/salmonella/docs/guidoc_listeria_monocytogenes_en..pdf (accessed on 27 May 2014).
- European Commission (EC) (2014). EURL Lm technical guidance document for conducting shelf-life studies on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Available online [http://www.fsai.ie/uploadedFiles/EURL%20Lm_Technical%20Guidance%20Document%20Lm%20shelf-life%20studies_V3_2014-06-06%20\(2\).pdf](http://www.fsai.ie/uploadedFiles/EURL%20Lm_Technical%20Guidance%20Document%20Lm%20shelf-life%20studies_V3_2014-06-06%20(2).pdf) (accessed on 25 August 2014).
- European Food Safety Authority (EFSA) (2014). The European Union summary report on trends and sources of zoonosis, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2012. *EFSA Journal*, 12, 3547.
- European Union Reference Laboratory for *Listeria monocytogenes* (EURL Lm) (2013). Development of a set of *Listeria monocytogenes* strains for conducting challenge tests.

http://www.evira.fi/files/attachments/fi/laboratoriotoiminta/vertailulaboratoriot/lmo-sailyvyyskoekantakokoelma_20_12_2013.pdf (accessed on 02 October 2014).

- Everis L., & Betts G. (2013). Evaluation of *Listeria* challenge testing protocols: A practical study using cooked sliced ham. *Food Control*, 29, 61-65.
- Food Standards Agency New Zealand (FSANZ) (2014). How to determine the shelf life of food: A guidance document. Available online <http://www.foodsafety.govt.nz/elibrary/industry/determine-shelf-life-of-food/how-to-determine-the-shelf-life-of-food-revision.pdf> (accessed on 6 October 2014).
- Fox E., Hunt K., O'Brien M., & Jordan K. (2011). *Listeria monocytogenes* in Irish farmhouse cheese processing environments. *International Journal of Food Microbiology*, 145 S39-S45.
- Garrido V., García-Jalón I., & Vitas A. I. (2010). Temperature distribution in Spanish domestic refrigerators and its effect on *Listeria monocytogenes* growth in sliced ready-to-eat ham. *Food Control*, 21, 896-901.
- Grassi M. A., Nucera D., Lomonaco S., & Civera T. (2013). Growth potential of *Listeria monocytogenes* in fresh sauces for pasta. *Food Control* 30, 288-291.
- Health Canada (2012). *Listeria monocytogenes* challenge testing refrigerated ready-to-eat foods. Available online http://www.hc-sc.gc.ca/fn-an/legislation/pol/listeria_monocytogenes-test-eng.php (accessed on 6 October 2014).
- Kang J., Tang S., Liu R.H., Wiedmann M., Boor K. J., Bergholz T. M., et al. (2012). Effect of curing method and freeze-thawing on subsequent growth of *Listeria monocytogenes* on cold-smoked salmon. *Journal of Food Protection* 75, 1619-1626.
- Leong D., Alvarez-Ordóñez A., Guillas F., & Jordan K. (2013). Determination of *Listeria monocytogenes* growth during mushroom production and distribution. *Foods*, 2, 544-553.
- Leong D., Alvarez-Ordóñez A., & Jordan K. (2015). A note on challenge trials to determine the growth of *Listeria monocytogenes* on mushrooms. *Irish Journal of Agricultural and Food Research*.
- Manios S. G., Konstantinidis N., Gounadaki A. S., & Skandamis P.N. (2013). Dynamics of low (1-4 cells) vs high populations of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella Typhimurium* in fresh-cut salads and their sterile liquid or solidified extracts. *Food Control*, 29, 318-327.
- Mejholm O., Devitt T. D., & Dalgaard P. (2012). Effect of brine marination on survival and growth of spoilage and pathogenic bacteria during processing and subsequent storage of ready-to-eat shrimp (*Pandalus borealis*). *International Journal of Food Microbiology*, 157, 16-27.
- Mejholm O., Kjeldgaard J., Modberg A., Vest. M. B., Bokaes N., Koort J., et al. (2008). Microbial changes and growth of *Listeria monocytogenes* during chilled storage of brined shrimp (*Pandalus borealis*). *International Journal of Food Microbiology*, 124, 250-259.

- Nakari U. M., Rantala L., Pihlajasaari A., Toikkanen S., Johansson T., Hellsten C., et al. (2014). Investigation of increased listeriosis revealed two fishery production plants with persistent *Listeria* contamination in Finland in 2010. *Epidemiology and Infection*, 24, 1-9.
- Samapundo S., Anthierens T., Ampofo-Asiama J., Xhaferi R., van Bree I., Szczepaniak S., et al. (2013). The effect of NaCl reduction and replacement on the growth of *Listeria monocytogenes* in broth, cooked ham and white sauce. *Journal of Food Safety*, 33, 59-70.
- Sant'Ana A. S., Barbosa M. T., Destro M. T., Landgraf M., & Franco B. D. G. M. (2012). Growth potential of *Salmonella* spp. and *Listeria monocytogenes* in nine types of ready-to-eat vegetables stored at variable temperature conditions during shelf-life. *International Journal of Food Microbiology*, 157, 52-58.
- Sant'Ana A., Landgraf M., Destro M. T., & Franco B. G. M. (2013). Growth potential of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat lettuce and collard greens packaged under modified atmosphere and in perforated film. *Journal of Food Protection*, 76, 888-891.
- Skalina L., & Nikolajeva V. (2010). Growth potential of *Listeria monocytogenes* strains in mixed ready-to-eat salads. *International Journal of Food Microbiology*, 144,317-321.
- Uyttendaele M., Busschaert P., Valero A., Geeraerd. A. H., Vermuelen A., Jacxsens L., et al. (2009). Prevalence and challenge tests *Listeria monocytogenes* in Belgian produced and retailed mayonnaise-based deli-salads, cooked meat products and smoked fish between 2005 and 2007. *International Journal of Food Microbiology*, 133, 94-104.
- Vazquez-Boland. J.A., Kuhn M., Berche P., Chakraborty T., Dominguez-Bernal G., Goebel W., et al.(2001). *Listeria* pathogenesis and molecular virulence determinants. *Clinical Microbiology Reviews*, 14, 584-640.
- Vermeulen A., Devlieghere F., De Loy-Hendrickx A., & Uyttendaele M. (2011). Critical evaluation of the EU-technical guidance on shelf-life studies for *L. monocytogenes* on RTE-foods: A case study for smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology*,145, 176-185.
- Vermeulen A., Gysemans K. P. M., Bernaerts K., Geeraerd A. H., Van Impe J.F., Debevere J., et al. (2007). Influence of pH, water activity and acetic acid concentration on *Listeria monocytogenes* at 7 °C: Data collection for the development of a growth/no growth model. *International Journal of Food Microbiology*, 114, 332-341.
- Vongkamjan K., Roof S., Stasiewicz M. J., & Wiedmann, M. (2013). Persistent *Listeria monocytogenes* subtypes isolated from a smoked fish processing facility included both phage susceptible and resistant isolates. *Food Microbiology*, 35, 38-48.
- Wemmenhove E., Stampelou I., van Hooijdonk A. C. M., Zwietering M. H., & Wells-Bennik M. H. J. (2013). Fate of *Listeria monocytogenes* in Gouda microcheese: No growth, and substantial inactivation after extended ripening times. *International Dairy Journal*, 32, 192-198.

- Austrian Ministry of Health (2013). National action plan for nutrition: Including measures overview and planning 2013.
- Barbieri G., Barbieri G.e, Bergamaschi M., Franceschini M., & Berizi E. (2016). Reduction of NaCl in cooked ham by modification of the cooking process and addition of seaweed extract (*Palmaria palmata*). *Food Science and Technology*, 73, 700-706.
- Bysted A., Mikkelsen A. A., & Leth T. (2009). Substitution of trans fatty acids in foods on the Danish market. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 111(6), 574-583.
- Chiu N., Hewson L., Yang N., Linforth R., & Fisk I. (2015). Controlling salt and aroma perception through the inclusion of air fillers. *Food Science and Technology*, 63, 65-70.
- Collins M., Mason H., O'Flaherty M., Guzman-Castillo M., Critchley J., & Capewell S. (2014). An economic evaluation of salt reduction policies to reduce coronary heart disease in England: A policy modelling study. *Value in Health*, 17(5), 517-524.
- European Commission, Directorate General Health and Consumers (2014). Survey on Member States' implementation of the EU salt reduction framework. <https://doi.org/10.2772/50212>.
- European Commission, Chrodis Joint Action (2015). Good practice in the field of health promotion and primary prevention. Italy Country Review. http://chrodis.eu/wp-content/uploads/2015/02/1taly-CHRODIS-final-draft_rivistoBD_DG.pdf. Accessed date: August 2018.
- Inguglia E. S., Thang Z., Tiwari B. K., Kerry J. P., & Burgess C. M. (2017). Salt reduction strategies in processed meat products - a review. *Trends in Food Science & Technology*, 59, 70-78.
- Lachat C., Otchere S., Roberfroid D., Abdulai A., Aguirre Seret F. M., Milesevic J., et al. (2013). Diet and physical activity for the prevention of noncommunicable diseases in low-and middle-income countries: A systematic policy review. *PLoS Medicine*, 10(6), e1001-1465. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1001465>.
- Nagyjanosi L., Martos E., Bodonyi D., & Voko Z. (2011). Health-economic impact of the Hungarian salt intake reduction program. *Value in Health*, 14, 233-510.
- Stanley R.E., Bower C.G., & Sullivan G.A. (2017). Influence of sodium chloride reduction and replacement with potassium chloride-based salt in the sensory and physicochemical characteristics of pork sausage patties. *Meat Science*, 133, 36-42.