

ANALISI DI LABORATORIO

Carni e prodotti a base di carne:
il ruolo del laboratorio per una filiera in sicurezza



©shutterstock.com

La normativa europea comprende una serie di atti legislativi a garanzia della salubrità e sicurezza di alimenti e mangimi. In particolare, i regolamenti (CE) 2073/2005 e 882/2004 – quest'ultimo abrogato dal regolamento (UE) 2017/625 – sono norme che stabiliscono i criteri microbiologici che devono essere applicati ai prodotti alimentari e le regole specifiche per l'organizzazione dei controlli ufficiali in materia di mangimi, alimenti e prodotti di origine animale destinati al consumo umano.

Nel 2016 sono state introdotte in ambito nazionale, ad integrazione delle norme comunitarie, le "Linee guida per il controllo ufficiale ai sensi dei regolamenti (CE) 882/2004 e 854/2004". Uno degli aspetti presi in esame dal documento è l'attività relativa al controllo ufficiale degli alimenti. L'obiettivo è stato armonizzare gli ambiti della suddetta attività, in termini di matrici da esaminare, pericoli microbiologici e chimici da considerare e criteri interpretativi, al fine di fornire delle linee di indirizzo comuni a livello nazionale per la definizione e applicazione dei "Piani Alimenti" che vengono implementati a livello regionale.

Sono stati inoltre previsti nuovi parametri microbiologici da soddisfare, oltre a quelli già stabiliti dal regolamento (CE) 2073/2005. Anche per le carni e i prodotti a base di carne. Nell'ambito della sicurezza microbiologica, tuttavia, non è sempre sufficiente attuare strategie classiche, quali le analisi del prodotto finito o i principi dell'Haccp.

Per far fronte alle richieste di un mercato sempre più globalizzato ed esigente, quindi, è spesso necessaria l'applicazione di strategie proattive per rispondere rapidamente alle minacce che possono mettere a repentaglio la sicurezza dei consumatori, mirando a prevenire piuttosto che a correggere.

I *challenge test* (prove di laboratorio che prevedono la contaminazione artificiale di un alimento) sono certamente la via più affidabile per definire le cinematiche di un determinato microrganismo in uno specifico prodotto a rischio di proliferazione microbiaca, come può essere un prodotto a base di carne pronto per il consumo.

Ma la normativa vigente offre un'altra, interessante e più economica possibilità: impiegare modelli matematici predittivi, utilizzando fattori critici di sviluppo o di sopravvivenza per i microrganismi presenti nei prodotti alimentari.

56 CARNE CONTAMINATA.

LE SALMONELLE "MINORI" E "MAGGIORI"

Ingrid Riz e Gaetano Forte

61 SERVIZI DI ANALISI PER IL SETTORE

AGROALIMENTARE - ALS Italia (Leochimica)

62 CONTROLLI UFFICIALI.

I NUOVI PARAMETRI MICROBIOLOGICI

Elena Ramon e Lisa Barco

66 UN'ESPERIENZA CONSOLIDATA NELL'ANALISI

DEI PRODOTTI ALIMENTARI - Biogest

68 SICUREZZA DEI PRODOTTI

A BASE DI CARNE. I MODELLI PREDITTIVI

Luigi Iannetti e Francesco Pomilio

Carne contaminata

Le Salmonelle “minori” e “maggiori”

Esiste una differenza giuridica?

di Ingrid Riz e Gaetano Forte
Avvocati ed Esperti di Legislazione degli Alimenti

56

**Salmonella è un patogeno
che trova terreno
di proliferazione
in diverse categorie
di alimenti.
Ma è nel settore delle carni
che la sua incidenza
è maggiore.
Quelle di pollame sono
l'ambito ove più incerto
è il passo del giurista,
poiché ancora la produzione
giurisprudenziale
non si è confrontata
con le ultime sfaccettature
proposte dalla normativa**

Risale al 12 dicembre 2017 la pubblicazione congiunta da parte dell'European Centre for Disease Prevention and Control (Ecdc) e dell'Autorità europea per la Sicurezza alimentare (Efsa) del report "EU summary report on zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks 2016", che fornisce un

quadro su zoonosi e focolai epidemici di malattie trasmesse da alimenti (Mta) e acqua nell'Unione europea (UE) e che, per il parametro *Salmonella*, conferma la stabilità del numero dei casi segnalati (94.530) rispetto all'anno precedente.

Secondo quanto ripreso da EpiCentro – Centro nazionale per la Prevenzione delle malattie e la Promozione della salute, "tra i focolai epidemici di malattie a trasmissione alimentare, le tossinfezioni di origine batterica, e in particolare i focolai di salmonellosi, continuano a essere quelli più frequentemente riportati nell'UE (22,3% del totale)".

Ben si comprende, in tal modo, che, quando si affronta il tema delle "Salmonelle" negli alimenti, si accede ad un sistema complesso ed articolato, ove le evidenze scientifiche devono essere contemperate e coordinate con le modalità di gestione concreta dei processi di produzione e commercializzazione e con il conseguente inquadramento giuridico (e trattamento giudiziario) di una contaminazione microbiologica dell'alimento.

Dal punto di vista strettamente scientifico, *Salmonella* è un microrganismo potenzialmente patogeno, che conosce diversi sierotipi idonei a provocare infezioni.

L'uomo può essere infettato principalmente attraverso alimenti come carne cruda o non

adeguatamente cotta, prodotti lattiero-caseari e uova, contaminati *ab origine* oppure *in itinere*, nel corso delle fasi di preparazione, confezionamento e conservazione.

Salmonella è un microrganismo potenzialmente patogeno, che conosce diversi sierotipi idonei a provocare infezioni

Per queste ragioni, un ruolo primario nella lotta alle zoonosi ed infezioni alimentari connesse è senza dubbio attribuito all'operatore del settore alimentare (Osa), chiamato normativamente ad un'accurata gestione delle fasi di allevamento, produzione e commercializzazione del prodotto carneo, sulle quali viene dispiegata la vigilanza pubblica, attraverso piani di controllo e campionamento delle matrici rilevanti.

Salmonella nelle carni, la normativa di riferimento

Quanto sopra è propedeutico all'esame della regolamentazione normativa della contaminazione microbiologica da *Salmonella* nelle matrici carnee.

Il microrganismo in questione trova terreno di proliferazione anche in alimenti di origine vegetale o lattiero caseari, ma è nel settore delle carni che la sua diffusione è assolutamente superiore, con picco di incidenza nelle carni crude e, in particolare, nel pollame.

Il regolamento (CE) 2073/2005

Le carni di pollame sono l'ambito ove più incerto è il passo del giurista, poiché ancora la produzione giurisprudenziale non si è confrontata con le ultime sfaccettature proposte dalla normativa. Sul punto, infatti, il centro di gravità della disciplina normativa è dato dal regolamento (CE) 2073/2005, che individua i criteri microbiologici per taluni microrganismi e le norme di attuazione che gli operatori del set-

tore alimentare devono rispettare nell'applicazione delle misure di igiene generali e specifiche di cui al regolamento (CE) 854/2004.

Il regolamento distingue i criteri di sicurezza alimentare dai criteri di igiene di processo, il primo relativo all'accettabilità di un prodotto o partita di prodotti immessi sul mercato, il secondo all'accettabilità del processo di produzione, non applicabile pertanto ai prodotti immessi sul mercato.

Spetta agli operatori del settore alimentare garantire che i prodotti siano conformi ai requisiti microbiologici di sicurezza alimentare, tra i quali si rinvengono le diverse matrici sensibili a *Salmonella*. Per il settore delle carni, le categorie alimentari con relativi limiti, metodi e criterio di fase sono riportate dai punti 1.4 a 1.9, ove si richiede l'assenza del batterio *Salmonella* in 25 g per le 5 aliquote da prelevare.

Il regolamento (UE) 1086/2011

Per sparigliare le carte, è stato adottato il regolamento (UE) 1086/2011, che ha introdotto un nuovo criterio di sicurezza, che, per la carne fresca di pollame (allegato I, punto 1.28, del regolamento (CE) 2073/2005), richiede l'assenza in 25 g per le sole *Salmonella typhimurium* ed *enteritidis*, qualificate come "Salmonelle rilevanti", con la precisazione che detto criterio non si applica alle carni fresche di pollame destinate a trattamento termico industriale o ad altro trattamento termico inteso ad eliminare *Salmonella* (allegato II, punto E, del regolamento (UE) 1086/2011).

La distinzione tra Salmonelle rilevanti e minori si rinvie già tra i criteri di igiene di processo ove, per le carcasse di pollame (polli da carne e tacchini), è richiesta l'indagine sul parametro *Salmonella* spp (assenza in 25 g di un campione aggregato di pelle del collo), che, se positivamente riscontrata, va poi sierotipizzata per la verifica del rispetto del criterio di sicurezza di cui al punto 1.28 dell'allegato I per i ceppi *typhimurium* ed *enteritidis*.

Le note ministeriali

Sul punto è sorto un ampio dibattito tra gli operatori per comprendere l'esatta portata



©shutterstock.com

Il regolamento (UE) 1086/2011 ha introdotto un nuovo criterio di sicurezza, che, per la carne fresca di pollame, richiede l'assenza in 25 g per le sole *Salmonella typhimurium* ed *enteritidis*, qualificate come "Salmonelle rilevanti".

della modifica e delle necessarie implicazioni sistematiche, tanto che, a livello nazionale, il Ministero della Salute è stato sollecitato a fornire chiarimenti e delucidazioni concrete. Il primo intervento ministeriale, con nota del 28 luglio 2005, attiene alle indicazioni operative di gestione delle Salmonelle non rilevanti (ovvero diverse da *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis* e *Salmonella typhimurium* variante monofasica) nella carne fresca di pollame in stabilimenti diversi dal macello.

La nota precisa che, qualora le carni siano state impiegate per la produzione di preparazioni di carni, carni macinate, prodotti a base di carne destinate ad essere consumate previa "adeguata cottura" e tale indicazione sia chiaramente riportata in etichetta, l'Osa non sarà tenuto ad effettuare il ritiro o richiamo dal mercato ai sensi dell'articolo 19 del regolamento (CE) 178/2002. In caso contrario, invece, ovvero in assenza di indicazioni precise di consumazione previa cottura, il prodotto dovrà essere ritirato o richiamato. Solo in ca-

so di ritiro (in caso di richiamo si avrà sempre distruzione), peraltro, i prodotti, previo parere favorevole dell'autorità competente, potranno essere trasformati tramite adeguato trattamento termico.

Per Salmonelle non rilevanti si intendono quelle diverse da *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteritidis* e *Salmonella typhimurium* variante monofasica

Dopo pochi mesi, il Ministero è nuovamente intervenuto con la nota n. 1038 del 15 gennaio 2016, precisando che la dicitura in etichetta "Da consumarsi previa accurata e completa cottura ad almeno 75 °C a cuore del prodotto" è adeguata e coerente con il regolamento (CE) 178/2002, salvo la possibilità per l'Osa di

definire, in base alle caratteristiche del prodotto, tempi e temperature riferiti alle modalità di cottura idonee a raggiungere lo stesso livello di sicurezza.

Le linee guida: come si deve comportare l'Osa

Risale infine al 3 marzo 2016 l'intesa sancita tra Governo, Regioni e Province autonome circa le nuove "Linee guida relative all'applicazione del regolamento (CE) 2073/2005 e successive modifiche ed integrazioni sui criteri microbiologici applicabili agli alimenti", dove si tenta di fare chiarezza sul nuovo assetto normativo, rappresentando immediatamente, tra le iniziali definizioni, la distinzione tra "Salmonelle rilevanti", *enteritidis* e *typhimurium* – inclusa la variante monofasica, e "Salmonelle minori", ovvero tutti i sierotipi diversi.

Dalle linee guida si ricavano le indicazioni pratiche circa il comportamento dell'Osa a fronte di una rilevazione di positività, sempre con specifico riferimento alle carni di pollame.

Il provvedimento, infatti, si cura di precisare quali debbano essere i comportamenti conformi alla disciplina comunitaria di settore dall'allevamento al macello, alla trasformazione, all'acquisizione dei risultati analitici.

Se la positività per le Salmonelle rilevanti è riscontrata in allevamento, gli animali appartenenti al gruppo positivo devono essere inclusi nei Piani di campionamento al macello per la verifica del rispetto del pertinente criterio di sicurezza, salvo che l'Osa non decida di inviare l'intero gruppo alla trasformazione mediante un metodo che garantisca il rispetto del criterio di sicurezza ovvero che tuteli comunque il consumatore dal rischio (principalmente la cottura).

Presso lo stabilimento di macellazione, il responsabile deve effettuare i campionamenti di cui al regolamento (CE) 2073/05, segnatamente relativi alle carni fresche del pollame sia per criterio di processo che di sicurezza: se vi sono positività per le Salmonelle rilevanti, si può procedere con l'invio alla cottura, che esonera l'Osa dal campionamento sulle carcasse, altrimenti obbligatorio.

Se la positività riguarda le Salmonelle minori,

l'Osa può impiegare le carni per la produzione di tagli freschi, preparazioni di carni, carni macinate, prodotti a base di carne destinati ad essere consumati previa cottura, nel caso in cui tale indicazione sia adeguatamente riportata in etichetta.

Anche nelle fasi successive alla macellazione, è necessario rispettare i criteri di igiene di processo e di sicurezza, limitandosi, per la matrice carne fresca di pollame, alle sole Salmonelle rilevanti: unicamente quando la lavorazione avviene in reparto annesso allo stabilimento di macellazione, non sarà necessario ripetere il campionamento e le analisi (se la lavorazione avviene altrove, si ripeteranno campioni ed analisi), curandosi in ogni caso di prevenire contaminazioni crociate.

Anche nelle fasi successive alla macellazione, è necessario rispettare i criteri di igiene di processo e di sicurezza, limitandosi, per la matrice carne fresca di pollame, alle sole Salmonelle rilevanti

Qualora dall'analisi risulti la presenza di Salmonelle rilevanti nelle carni o nei prodotti da esse derivati (non sottoposti a trattamento termico al macello o nelle successive fasi di lavorazione), gli stessi dovranno essere destinati, sotto vincolo sanitario, ad un trattamento idoneo ad eliminarne il pericolo ovvero alla trasformazione quale sottoprodotto di categoria 3; se detti prodotti non sono più nella disponibilità dell'Osa, ma sono stati immessi sul mercato, anche se non a livello di dettaglio, si deve procedere al ritiro: in tale ipotesi, previo parere della competente autorità, potranno essere sottoposti a cottura per il contenimento del rischio ed il rispetto del pertinente criterio microbiologico di sicurezza. Se i prodotti sono già pervenuti a livello di commercio al dettaglio, sarà necessario procedere a ritiro o richiamo secondo il regolamento (CE) 178/2002.



©shutterstock.com

Il reato che consegue ad un'accertata positività per *Salmonella* è l'articolo 5, lettera d), della legge 283/62.

***Salmonella* nelle aule di giustizia**

Fatta questa sintetica e non esaustiva panoramica dell'assetto normativo, quale risvolto assumono le distinzioni tra *Salmonelle* nelle aule di giustizia? Bisogna premettere che *Salmonella* accede alle aule di tribunale soprattutto come fonte del danno alla persona ovvero come responsabile della contaminazione dell'alimento posto in vendita al consumatore. Nel secondo caso, vi è un'indagine d'ufficio originata da campionamenti ufficiali che riscontrano la presenza del batterio nel prodotto alimentare in violazione del più volte citato criterio di sicurezza, diversificato per matrice di riferimento. Il reato che ordinariamente consegue ad accertata positività per *Salmonella* è l'articolo 5, lettera d), della legge 283/62, che sanziona penalmente la preparazione, vendita, detenzione o distribuzione per il commercio di sostanze alimentari «insudicate, invase da parassiti, in stato di alterazione o comunque nocive, ovvero sottoposte a lavorazioni

o trattamenti diretti a mascherare un preesistente stato di alterazione».

La giurisprudenza, tuttavia, ancora non ha affrontato l'aspetto oggettivo del rapporto tra matrici e tipologie di *Salmonelle* ovvero se la presenza di *Salmonella* minore in un prodotto destinato alla cottura correttamente etichettato costituisca o meno un'esimente del reato contravvenzionale.

La giurisprudenza non ha ancora chiarito se la presenza di *Salmonella* minore in un prodotto destinato alla cottura correttamente etichettato costituisca o meno un'esimente del reato contravvenzionale

Controlli ufficiali

I nuovi parametri microbiologici

Le novità introdotte nel 2016 dalle linee guida nazionali

di Elena Ramon e Lisa Barco

Istituto zooprofilattico sperimentale delle Venezie

Le linee guida, pubblicate a fine 2016, integrative ai regolamenti europei 882/2004 e 854/2004 prevedono, per i controlli ufficiali, nuovi parametri microbiologici, identificabili con metodi che integrano le classiche metodiche microbiologiche con nuove metodiche molecolari

La normativa europea comprende una serie di atti legislativi a garanzia della salubrità e sicurezza di alimenti e mangimi. In particolare, i regolamenti (CE) 2073/2005 e 882/2004 – quest'ultimo abrogato dal regolamento (UE) 2017/625 – sono norme che stabiliscono i criteri microbiologici che devono essere applicati ai prodotti alimentari, sia in fase di produzione sia immessi nel mercato, e le regole specifiche per l'organizzazione dei controlli ufficiali in materia di mangimi, alimenti e prodotti di origine animale destinati al consumo umano.

Nel 2016 sono state introdotte in ambito naziona-

le, ad integrazione delle norme comunitarie, le "Linee guida per il controllo ufficiale ai sensi dei regolamenti (CE) 882/2004 e 854/2004".

Uno degli aspetti presi in esame da tali linee guida è l'attività relativa al controllo ufficiale degli alimenti, affrontata da un gruppo di lavoro coordinato dell'Istituto superiore di Sanità e che ha visto la partecipazione degli Istituti zooprofilattici sperimentali distribuiti nel territorio nazionale.

L'obiettivo è stato armonizzare gli ambiti della suddetta attività, in termini di matrici da esaminare, pericoli microbiologici e chimici da considerare e criteri interpretativi, al fine di fornire delle linee di indirizzo comuni a livello nazionale per la definizione e applicazione dei "Piani Alimenti" che vengono implementati a livello regionale.

I "legami" con il regolamento europeo 2073/2005

Queste nuove linee guida sono da intendersi come integrative al regolamento (CE) 2073/2005, da cui prendono spunto come impostazione:

- negli allegati 6 e 7 elencano le matrici da esaminare, i pericoli chimici e microbiologici da considerare, la modalità di campionamento in termini di unità campionarie, i

metodi analitici da impiegare e i criteri di interpretazione per valutare la conformità o meno del campione in esame;

- in ambito microbiologico, oltre ai criteri di igiene di processo e di sicurezza alimentare previsti dal regolamento (CE) 2073/2005, elencano una serie di altri criteri, definiti come "valori guida" da interpretare sia nell'ambito della valutazione della conformità del processo di produzione di un alimento sia nella conformità del prodotto finito. Tale regolamento, infatti, ribadisce che i criteri fissati possano essere integrati a livello dei singoli Paesi membri con l'introduzione di nuovi parametri;
- forniscono indicazioni in termini di numerosità di analisi che devono essere eseguite per le singole matrici dalle diverse Regioni, ripartendole tra campionamenti alla "produzione" e alla "distribuzione". Regioni che poi articoleranno propri Piani di campionamento in funzione delle diverse indicazioni fornite;
- stabiliscono la programmazione minima delle analisi da effettuare, mentre la ricerca di particolari pericoli già previsti da norme specifiche vigenti, come per esempio gli Ogm, o di "pericoli" identificati sulla base dell'analisi del rischio vengono presi in considerazione nei Piani regionali dei controlli delle singole Regioni;
- contemplano 22 categorie alimentari: in parte riprendono quelle riportate nel regolamento (CE) 2073/2005 (ad esempio, carni, preparazioni di carne, prodotti a base di carne, molluschi bivalvi), ma ne includono anche di nuove (ad esempio, cioccolato, farine, paste alimentari all'uovo, latte crudo). Mentre l'allegato 6 elenca le categorie di interesse, i pericoli da investigare e la numerosità di analisi da rendicontare, ripartendole tra campionamenti alla produzione e alla distribuzione, l'allegato 7 descrive nel dettaglio i criteri interpretativi, oltre che le modalità di gestione del campione. Tali documenti devono intendersi come dinamici: i loro contenuti potranno essere oggetto di revisione periodica in funzione della mutata anagrafica degli stabilimenti, che andrà ad impattare sulla numerosità delle analisi nei diversi punti di prelie-

vo, come pure dell'evoluzione delle conoscenze scientifiche, che potrebbero portare a delle rettifiche, ad esempio in termini di pericoli da ricercare.

Le analisi

In linea generale, le analisi previste dalle nuove linee guida vengono eseguite secondo metodiche ISO basate su approcci di microbiologia tradizionale.

La *Real Time PCR*

Per alcuni criteri microbiologici è previsto l'impiego di protocolli di analisi integrate tra metodiche di microbiologia classica e metodiche di biologia molecolare, come la *Real Time PCR*. Quest'ultima è un metodo che consente l'amplificazione di frammenti di DNA dei quali si conosca la sequenza nucleotidica.

Per alcuni criteri microbiologici è previsto l'impiego di protocolli di analisi integrate tra metodiche di microbiologia classica e metodiche di biologia molecolare

L'amplificazione avviene, in questo caso, in tempo reale (*real time*) ovvero ad ogni ciclo di amplificazione ed è possibile vedere lo stato dei campioni analizzati consentendo una tempestiva rielaborazione dei dati e, quindi, un immediato esito alla fine dell'analisi stessa. L'amplificazione mediante PCR consente di ottenere in vitro molte copie di DNA bersaglio, nel nostro caso del DNA del microrganismo che vogliamo andare a ricercare, e, di conseguenza, una maggiore sensibilità e specificità rispetto alle metodiche di microbiologia classica. In linea generale, tuttavia, andando a valutare la presenza del DNA dei microrganismi, nell'ambito della valutazione della conformità degli alimenti, in caso di riscontro della presenza di DNA, è necessario appurare la vitalità del microrganismo eventualmente presente at-

traverso esame colturale. Pertanto, in questo specifico contesto, quando sono utilizzate metodiche molecolari per l'identificazione dei microrganismi, queste devono essere intese come metodiche di screening da confermare con metodi microbiologici, in caso di esito positivo.

La ricerca di *Escherichia coli* STEC

Le analisi aggiuntive, rispetto al regolamento (CE) 2073/2005, in termini di criteri di sicurezza alimentare, sono relative alla ricerca di *Escherichia coli* produttori di verocitotossine (STEC) in carni macinate e preparazioni a base di carne, prodotti a base di carne, latte crudo, prodotti a base di latte. Ad esempio, la presenza di *Escherichia coli* STEC, in accordo alla norma ISO TS 13136, nei prodotti a base di carne viene identificata inizialmente con metodiche di biologia molecolare e solo in caso di esito positivo si procede con l'isolamento del patogeno attraverso l'utilizzo di metodiche di microbiologia classica.

64

La presenza di *Escherichia coli* STEC nei prodotti a base di carne viene identificata inizialmente con metodiche di biologia molecolare: solo in caso di esito positivo si procede con il suo isolamento attraverso l'utilizzo di metodiche di microbiologia classica

Le colonie eventualmente isolate vengono successivamente e nuovamente confermate con Real Time PCR.

L'approccio integrato tra le tecniche di microbiologia e le metodiche di biologia molecolare permette di effettuare uno screening iniziale veloce ed accurato, sbloccando in tempi rapidi i campioni negativi, mentre solo i campioni presunti positivi proseguono con l'approfondimento diagnostico.

Nella ricerca di *E. coli* STEC, i campioni pre-arricchiti con terreno appropriato vengono sottoposti ad estrazione del DNA e successivamente viene

ne effettuata la PCR. In un primo momento, con la *Real Time* PCR vengono ricercati i geni responsabili della sintesi delle tossine prodotte dagli *E. coli* verocitotossici (*stx1*, *stx2*, *eae*) eventualmente presenti. L'esito positivo di questa prima analisi determina l'isolamento del batterio e la successiva ricerca tramite PCR dei sierogruppi più frequenti di *E. coli*. Per avere una maggiore probabilità di identificare il batterio, 50 colonie isolate dal campione pre-arricchito vengono testate in PCR per verificarne la capacità di produrre tossine verocitossiche.

Le colonie eventualmente positive, quindi produttrici delle tossine, vengono infine tipizzate tramite *Real Time* PCR per identificare i sierogruppi presenti.

I virus enterici

Tra i parametri di sicurezza alimentare introdotti dalle linee guida vi sono anche i virus enterici, quali Norovirus, e virus dell'epatite A, da ricercare nei prodotti della pesca, frutti di bosco e vegetali a foglia. Questi vengono indagati unicamente con metodica ISO basata su approccio molecolare poiché non esistono tecniche in grado di isolare i virus eventualmente presenti nel campione. Nel caso della loro ricerca nei molluschi, è richiesta l'analisi sull'epatopancreas dell'animale: la sede in cui vengono accumulati.

Per la categoria dei prodotti della pesca e dei molluschi bivalvi, è prevista anche la ricerca di *Vibrio* potenzialmente patogeni, come *V. cholerae* e *V. parahaemolyticus*, oltre che i criteri stabiliti dal regolamento (CE) 2073/2005.

Per diverse categorie alimentari (ad esempio, paste alimentari all'uovo, preparazioni alimentari gastronomiche, spezie e semiconserve) viene inoltre richiesta la ricerca di batteri indicatori, nell'ambito della valutazione dei criteri di igiene di processo, quali *Bacillus cereus* e *Clostridium perfringens*. In questo contesto, le linee guida rimarcano che, a fronte del superamento dei criteri stabiliti, è necessario valutare la presenza di tossine nell'alimento, la cui eventuale presenza deve intendersi come criterio di sicurezza alimentare.

Tuttavia, le linee guida per questi specifici criteri non definiscono i metodi analitici da impiegare, dal momento che non sono disponibili metodi mi-

crobiologici standardizzati riconosciuti. Di conseguenza, per garantire un'armonizzazione dei dati nel contesto nazionale, sarebbe opportuno definire dei protocolli condivisi da adottare in tale contesto da parte dei laboratori coinvolti nella sorveglianza.

La ricerca di *Yersinia enterocolitica* patogena

Anche per le carni e i prodotti a base di carne le nuove linee guida prevedono nuovi parametri da soddisfare, oltre a quelli già previsti dal regolamento (CE) 2073/2005. Ad esempio, valutando i prodotti a base di carne di suino pronti al consumo, introducono anche la ricerca di *Yersinia enterocolitica* patogena, ribadendo la necessità di andare ad indagare la presenza dei geni di patogenicità. Anche in questo contesto, l'isolamento del patogeno deve essere supportato da una caratterizzazione molecolare per indagare la presenza di eventuali geni di patogenicità.

Per quanto riguarda le conserve e le semiconserve, le linee guida prevedono, nell'ambito della

valutazione dei criteri di sicurezza alimentare, la ricerca dei clostridi produttori di tossine botuliniche e la ricerca delle tossine botuliniche.

La ricerca di *Listeria monocytogenes*

Infine, sebbene formalmente l'ordinanza ministeriale del 7 dicembre 1993, che stabilisce criteri microbiologici per *Listeria monocytogenes* in alimenti da consumarsi previa cottura, non sia stata abrogata, le linee guida 2016, per i prodotti che rientrano in queste categorie, fissano, come "criteri di igiene di processo", limiti differenti (≤ 1000 ufc/g) rispetto a quanto stabilito dall'ordinanza stessa.

Ne emerge che le linee guida rendono variegato e completo il pannello analitico da contemplare nell'ambito dei controlli ufficiali degli alimenti. Questo considera prevalentemente metodi ISO, ma lascia spazio anche allo sviluppo di nuove metodiche per rispondere alle mutate necessità di caratterizzazione di eventuali patogeni identificati.



©shutterstock.com

Per i prodotti a base di carne di suino pronti al consumo, le linee guida 2016 introducono anche la ricerca di *Yersinia enterocolitica* patogena.

Sicurezza dei prodotti a base di carne

I modelli predittivi

Preziose le loro informazioni sul comportamento microbico

di Luigi Iannetti e Francesco Pomilio

Istituto zooprofilattico sperimentale dell'Abruzzo e del Molise

68

I challenge test sono la via più affidabile per definire le cinetiche di un determinato microrganismo in uno specifico prodotto a rischio di proliferazione microbica.

Ma la normativa vigente offre un'altra, interessante e più economica possibilità: impiegare modelli matematici predittivi

La sicurezza microbiologica dei prodotti a base di carne deve essere garantita dagli operatori del settore alimentare (Osa), che secondo la normativa vigente (il regolamento (CE) 178/2002 e l'intero "Pacchetto Igiene") sono i primi responsabili della salubrità dei loro alimenti. Pertanto, gli Osa devono mettere in atto metodi e sistemi al fine di garantire la conformità del prodotto ai criteri microbiologici, come definiti nel regolamento (CE) 2073/2005, e alle altre norme che disciplinano la sicurezza degli alimenti.

Nell'ambito della sicurezza microbiologica non è

sempre sufficiente attuare strategie classiche, quali le analisi del prodotto finito o i principi dell'Haccp. Per far fronte alle richieste di un mercato sempre più globalizzato ed esigente, quindi, è spesso necessaria l'applicazione di strategie proattive per rispondere rapidamente alle minacce che possono mettere a repentaglio la sicurezza dei consumatori, mirando a prevenire piuttosto che a correggere. Il regolamento (CE) 2073/2005 individua diverse misure che possono essere utilizzate dagli operatori del settore alimentare per verificare la sicurezza microbiologica degli alimenti. Ad esempio, la presenza di *Listeria monocytogenes* nei prodotti pronti al consumo in grado di supportarne la crescita può essere tollerata solo se il produttore è in grado di dimostrare scientificamente, e con soddisfazione dell'autorità competente, che il limite di 100 ufc/g non sarà mai superato durante l'intera vita commerciale del prodotto.

I challenge test (prove di laboratorio che prevedono la contaminazione artificiale di un alimento) sono certamente la via più affidabile per definire le cinetiche di un determinato microrganismo in uno specifico prodotto a rischio di proliferazione microbica, come può essere un prodotto a base di carne pronto per il consumo. Questi studi sono dispendiosi, richiedono tempi lunghi di esecuzione e notevoli quantità di alimenti, materiale di laboratorio e risorse umane. Ma la normativa vigente offre un'altra, interessante e più economica, possibilità:

impiegare «modelli matematici predittivi stabiliti per il prodotto alimentare in esame, utilizzando fattori critici di sviluppo o di sopravvivenza per i microrganismi in questione presenti nel prodotto».

I vantaggi dei modelli predittivi

La microbiologia predittiva (anche detta “Ecologia microbica quantitativa degli alimenti”) è una scienza quantitativa in grado di descrivere le risposte microbiche alle diverse condizioni ambientali (composizione degli alimenti e ambiente esterno), mediante l’impiego di modelli matematici.

I modelli predittivi permettono di ottenere preziose informazioni sul comportamento microbico

I modelli predittivi permettono di ottenere preziose informazioni sul comportamento microbico in condizioni non direttamente esplorate nelle prove di *challenge*, con una buona precisione e in maniera molto più economica; questi non possono sostituire completamente le indagini di laboratorio, tuttavia possono fornire informazioni di grande utilità per prendere decisioni relative alla sicurezza alimentare nell’ambito dei processi di lavorazione e conservazione degli alimenti (Whiting & Buchanan, 2002). Come sopra ricordato, il loro utilizzo è previsto dal regolamento (CE) 2073/2005 sui criteri microbiologici, per quel che riguarda i criteri relativi alla contaminazione da *Listeria monocytogenes* nei prodotti pronti per il consumo. Ma i modelli matematici sono stati anche ripetutamente utilizzati per scopi che vanno oltre i requisiti di legge previsti per i prodotti pronti. Basti pensare alle opinioni dell’Efsa sulla conservazione e il trasporto delle carni fresche, che hanno fondato importanti proposte di modifica ai regolamenti (CE) attualmente in vigore, basandosi quasi esclusivamente su risultati ottenuti mediante l’impiego di modelli predittivi, in relazione a diversi microrganismi patogeni (Efsa 2014a, 2014b).

I modelli primari e secondari

I primi tentativi di descrivere la cinetica batterica con l’impiego di modelli matematici risalgono al 1922 con Esty e Meyer, che descrissero come l’inattivazione di spore di *Clostridium botulinum* seguisse un modello log-lineare. Tale modello proponeva in maniera fedele la riduzione della contaminazione ed ancora oggi è utilizzato per stimare il trattamento termico da applicare agli alimenti in scatolati: ad una determinata temperatura, il tasso di morte (*specific death rate*) di uno specifico microrganismo è costante nel tempo. Scott, nel 1936, studiò il rapporto tra lo *specific death rate* e l’acqua disponibile per i batteri, oggi misurata come attività dell’acqua (aw). Lo studioso notò che anche il tasso di crescita (*specific growth rate*) di certi microrganismi nella carne risultava essere influenzato dalla

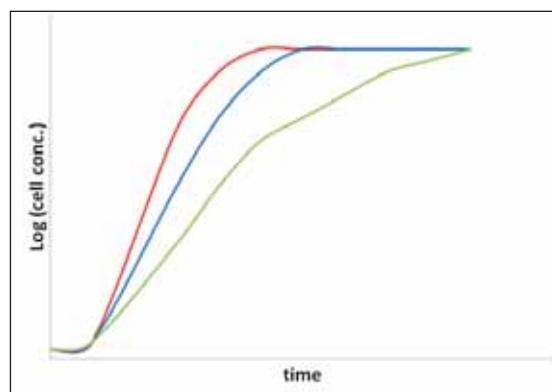


Figura 1 – Modello predittivo primario. Dopo la *lagphase*, il logaritmo della popolazione cellulare aumenta linearmente al tempo (*exponential phase*), fino alla *stationary phase*.

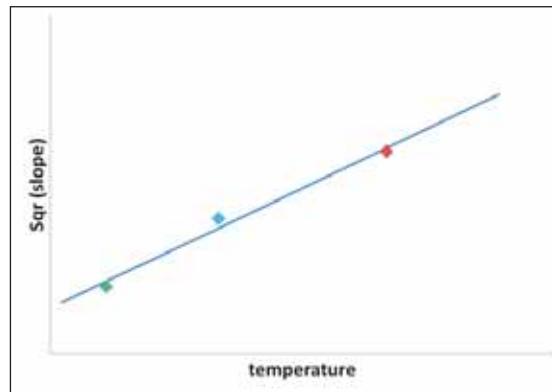


Figura 2 – Modello predittivo secondario. Lo *specific rate* (sqr: squareroot) aumenta linearmente alla temperatura.

temperatura e, in relazione ai microrganismi saprofiti, poteva essere riportato in un modello per stabilire la vita commerciale degli alimenti secondo la temperatura di conservazione. Erano stati, in questo modo, identificati i due modelli predittivi di base. I modelli matematici predittivi primari (*Figura 1*, pubblicata a pagina 69) descrivono le modifiche della concentrazione dei batteri negli alimenti in funzione del tempo. I modelli matematici predittivi secondari (*Figura 2*, pubblicata a pagina 69) descrivono i parametri dei modelli predittivi primari in funzione delle condizioni ambientali quali temperatura, pH e aw. Le metodiche per la produzione dei modelli predittivi sono state standardizzate negli anni '80 e '90 del secolo scorso. Gibson *et al.* (1988) hanno identificato le basi per riportare in formule matematiche le fasi di crescita batterica, proponendo l'impiego della funzione sigmoide di Gompertz per i modelli primari e della funzione quadratica polinomiale per i modelli secondari. Non essendo stato originariamente sviluppato per modellizzare la crescita batterica, il modello di Gompertz presentava comunque importanti limiti. Questo approccio di base fu progressivamente migliorato per ridurre il margine di errore legato al fatto che le cellule batteriche sono organismi viventi e come tali non sempre aderiscono in maniera precisa a semplici regole matematiche.

Conseguentemente, un modello dinamico fu specificamente sviluppato da Baranyi e Roberts (1993, 1994, 1995), in grado di riflettere le naturali modifiche ambientali che possono intervenire durante la *shelf-life* degli alimenti: la "storia" delle cellule batteriche precedenti alla contaminazione fu individuata come un fattore determinante, che ne influenza le capacità di adattamento al nuovo ambiente e conseguentemente la durata della fase transizionale (*lag phase*) che precede l'inizio della crescita esponenziale (*exponential phase*).

Per quanto riguarda i modelli secondari, nonostante alcune proposte alternative negli anni '90 (Rosso *et al.* 1995), l'impiego di modelli empirici multivariati polinomiali resta l'approccio normalmente preferito.

I modelli terziari

I modelli terziari sono oggi i modelli predittivi più utilizzati dall'industria alimentare. Questi sono

l'integrazione dei modelli primari e secondari in software e database.

Quelli terziari sono oggi i modelli predittivi più utilizzati dall'industria alimentare

Tali programmi raccolgono i dati elaborati in laboratorio, definiscono la cinetica più probabile dei vari microrganismi secondo le osservazioni raccolte e restituiscono previsioni del comportamento batterico nelle diverse condizioni ambientali. Alcuni esempi sono il ComBase (www.combase.cc), gestito da un consorzio internazionale in passato guidato dall'*Institute of Food Research* di Norwich (UK) e finanziato anche dall'Unione europea, e oggi in gestione all'Università di Tasmania (Australia). Il ComBase è alimentato da un consorzio di istituti di ricerca e, insieme al francese Symprevius (www.symprevius.eu), è consigliato dal Laboratorio europeo di riferimento per *Listeria monocytogenes* (EURL Lm 2014).

Altri modelli terziari disponibili sono il *Pathogen Modeling Program* (PMP) (www.ars.usda.gov) e il *Food Spoilage and Safety Predictor* (FSSP) (www.fssp.food.dtu.dk). Recentemente, software di microbiologia predittiva sono anche stati integrati nell'ambito di programmi per l'analisi del rischio, come ad esempio il *Dairy Product Safety Predictor*, *FDA-iRISK*, *MicroHibro* (Tenenhaus-Azia & Ellouze, 2015).

La variabile statistica nei modelli

Ulteriori sviluppi della microbiologia predittiva avvenuti nell'ultimo decennio hanno riguardato, oltre che il costante sviluppo di nuovi modelli terziari, anche l'introduzione della variabilità statistica nei modelli. È possibile tenere conto della naturale variabilità della popolazione batterica osservando quello di singole cellule e derivandone distribuzioni statistiche (Baranyi & Pin 2001, Elfwing *et al.*, 2004). Sarà necessario approfondire il comportamento, attualmente considerato non prevedibile,

in corrispondenza delle zone di transizione tra crescita microbica e fase stazionaria (*growth/no growth boundary region*), inserendolo in nuove tipologie di modelli (Iannetti *et al.* 2017). Nuovi studi puntano sulla proteomica, sulla genomica e, in generale, sulla biologia dei sistemi per individuare sottopopolazioni batteriche all'interno di uno stesso clone, in grado di comportarsi diversamente, ed introdurre questa naturale diversità nell'ambito dei modelli (Koutsomanis *et al.*, 2016).

Nei prossimi anni, la microbiologia predittiva è destinata ad aumentare il proprio impatto nell'ambito della microbiologia alimentare

In ogni caso, la microbiologia predittiva è destinata ad aumentare il proprio impatto nell'ambito della microbiologia alimentare nel corso dei prossimi anni, come ormai evidente dal sempre maggiore uso che ne viene fatto per stimare il rischio associato al consumo dei prodotti a base di carne, soprattutto in assenza di dati di laboratorio esauritivi. A tal proposito, in una recente pubblicazione, Jòzsef Baranyi, considerato il "padre" della moderna microbiologia predittiva (Baranyi and Buss da Silva, 2016), ha voluto sottolineare la filosofia che deve essere alla base dell'impiego di questo prezioso strumento da parte delle industrie alimentari e dei prodotti a base di carne: sono grandi i benefici ottenuti dalla microbiologia predittiva a fronte di spese estremamente basse, ma questo non deve spingere gli utilizzatori ad accettare i risultati così come vengono generati. È piuttosto necessario valutarli adeguatamente, ben conoscendo il margine di errore inevitabilmente associato ad essi, al fine di prendere decisioni oggettive e ponderate.

Bibliografia

- Baranyi, J. and Buss da Silva, N. (2016). *The use of predictive models to optimize risk of decisions*. Int J Food Microbiol, 240: 19-23.
- Baranyi, J. and Pin, C. (2001). *A parallel study on modelling bacterial growth and survival curves*. J TheorBiol, 210: 327-336.
- Baranyi, J. and Roberts, T.A. (1994). *A dynamic approach to predicting bacterial growth in food*. Int J Food Microbiol, 23: 277-294.
- Baranyi, J. and Roberts, T.A. (1995). *Mathematics of predictive food microbiology*. Int J Food Microbiol, 26: 199-218.
- Baranyi, J. and Roberts, T.A. (2004). *Predictive Microbiology – Quantitative Microbial Ecology*. Culture - March 2004. http://www.ifr.ac.uk/safety/comicro/Culture_25.pdf accessed on 07/01/2015 accessed on 12 gennaio 2015.
- Baranyi, J., Roberts, T.A., McClure, P.J. (1993). *A non-autonomous differential equation to model bacterial growth*. Food Microbiol, 10: 43-59.
- Elfwing, A., Le Marc, Y., Baranyi, J. and Ballagi, A. (2004). *Observing the growth and division of large number of individual bacteria using image analysis*. Appl Environ Microbiol, 70: 675-678.
- Esty, J.R. and Meyer, K.F. (1922). *The heat resistance of the spore of *Bacillus botulinus* and allied anaerobes*. J Infect Dis, 31: 650-663.
- European Food Safety Authority (Efsa) 2014a. *Scientific Opinion on the public health risks related to the maintenance of the cold chain during storage and transport of meat. Part 1 (meat of domestic ungulates)*. Efsa Journal, 12:3601.
- European Food Safety Authority (Efsa) 2014b. *Scientific Opinion on the public health risks related to the maintenance of the cold chain during storage and transport of meat. Part 2 (minced meat from all species)*. Efsa Journal, 12:3783.
- Gibson, A.M., Bratchell, N., Roberts, T.A. (1988). *Predicting microbial growth: growth responses of salmonellae in a laboratory medium as affected by pH, sodium chloride and storage temperature*. Int J Food Microbiol, 6: 155-178.
- Iannetti, L., Salini, R., Sperandii, A.F., Santarelli, G.A., Neri, D., Di Marzio, V., Romantini, R., Migliorati, G., Baranyi, J. (2017). *Predicting the kinetics of *Listeria monocytogenes* and *Yersinia enterocolitica* under dynamic growth/death-inducing conditions, in Italian style fresh sausage*. Int J Food Microbiol, 240: 108-114.
- Koutsomanis, K., Lianou, A., Gougoli, M.

(2016). *Last developments in foodborne pathogens modeling*. Current Opinion in Food Science, 8:89-98.

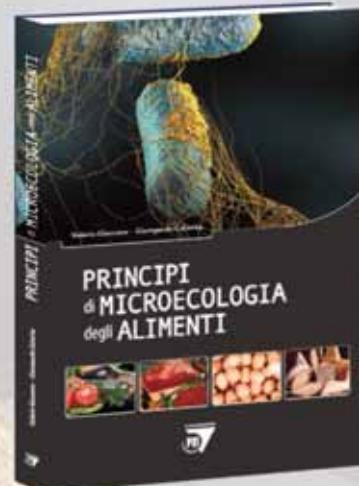
- Presidenza del Consiglio dei Ministri (2016). *Linee guida per il controllo ufficiale ai sensi dei regolamenti (CE) 882/2004, 854/2004*. Repertorio Atti 212/CSR, 10 novembre 2016.
- Rosso, L., Lobry, J.R., Bajard, S., Flandrois, J.P. (1995). *A convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth*. Appl Env Microbiol, 61: 610-616.
- Scott W.J. (1928). *The growth of microorga-*

nisms on ox muscle. I. The influence of water content of substrate on rate of growth at -1°C. J Counc Sci Ind Res, 9: 177-182.

- Tenenhaus-Aziza, F., Ellouze, M. (2015). *Software for predictive microbiology and risk assessment: A description and comparison of tools presented at the ICPMF8 Software Fair*. Food Microbiol, 45: 290-299.
- Whiting, R.C. and Buchanan, R.L. (2001). *Predictive microbiology and risk assessment*. In Food Microbiology. Fundamentals and Frontiers. American Society for Microbiology Press, Washington DC.

PRINCIPI DI MICROECOLOGIA DEGLI ALIMENTI

Valerio Giaccone
Giampaolo Colavita



* Abbonati al periodico di Point VET - Vittorio Emanuele

Questo volume è un valido mezzo di consultazione per tutti coloro che, operando nel settore dell'Igiene degli alimenti, hanno la necessità di trovare un valido mezzo di consultazione che riporti nozioni essenziali, ma aggiornate sui microrganismi degli alimenti e soprattutto sugli effetti che le varie flore microbiche possono procurare alla salute umana o alla qualità delle derrate alimentari.

Gli autori, come Docenti che si occupano di Salute Pubblica e di Igiene delle produzioni alimentari, hanno portato al centro dell'attenzione, gli alimenti, perché sono essi che determinano nel bene o nel male il destino dei microrganismi, che più o meno occasionalmente li popolano.

L'Ecologia è quella scienza che studia i rapporti tra l'uomo e l'ambiente che lo circonda. Grazie alle conoscenze raccolte negli ultimi anni, oggi sappiamo che anche i microrganismi che popolano gli alimenti, nel loro insieme, si possono vedere come un essere vivente unitario. Per traslato, quindi, la Scienza che studia i rapporti tra il microbiota e l'ambiente in cui esso si trova (l'alimento) non può che chiamarsi Ecologia microbica degli alimenti o, per crasi, Microecologia degli alimenti. Il testo, che non è infarcito di troppi tecnicismi, è semplice, agile, fruibile e di facile lettura.

Edizione aprile 2015 - Brossura, 160 x 240 mm - 224 pagine



Prezzo di copertina: € 35,00
Prezzo Abbonati*: € 29,75

* spese di spedizione escluse



PER ORDINI E INFORMAZIONI:
tel. 02 - 60.85.23.32 - www.pointvet.it
e-mail: diffusionelibri@pointvet.it