

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA  
Dipartimento di Agronomia, Animali, Alimenti, Risorse Naturali e  
Ambiente

Corso di laurea magistrale in Scienze e Tecnologie Alimentari

Requisiti e linee guida per condurre challenge test in  
alimenti

Relatore  
Prof. Leonardo Alberghini

Laureanda  
Sofia Panariello  
Matricola n. 2044600

ANNO ACCADEMICO 2022/2023

## **RIASSUNTO**

La sicurezza alimentare è un tema di primaria importanza per gli operatori del settore alimentare (OSA), che devono essere in grado di garantire la sicurezza dei propri prodotti. Per questo motivo, è necessario disporre di metodi affidabili per valutare la capacità di un alimento di favorire la crescita di agenti patogeni alimentari.

La norma UNI EN ISO 20976-1, pubblicata nel giugno 2019, fornisce indicazioni per l'impostazione e l'effettuazione di challenge test per tutti gli agenti patogeni di origine alimentare in tutti gli alimenti. La norma è uno standard internazionale che fornisce linee guida per lo studio del potenziale di crescita e per lo studio della cinetica di crescita.

Il presente elaborato ha valutato il contenuto e l'applicazione della norma UNI EN ISO 20976-1 sulla base di una revisione della letteratura scientifica. I risultati hanno mostrato che, sebbene la norma fornisca un quadro generale per la progettazione e l'esecuzione di challenge test, la sua applicazione è ancora in fase di sviluppo e necessita di ulteriori approfondimenti.

## **ABSTRACT**

Food safety is a primary concern for food business operators (FBOs), who must be able to guarantee the safety of their products. For this reason, it is necessary to have reliable methods to assess the ability of a food to promote the growth of foodborne pathogens.

The UNI EN ISO 20976-1 standard, published in June 2019, provides guidance on the setting up and carrying out of challenge tests for all foodborne pathogens in all foods. The standard is an international standard that provides guidelines for the study of growth potential and for the study of growth kinetics.

This study evaluated the content and application of the UNI EN ISO 20976-1 standard based on a review of the scientific literature. The results showed that, although the standard provides a general framework for the design and execution of challenge tests, its application is still in development and requires further research.

# INDICE

1. I <i>challenge test</i> : uno strumento per la sicurezza alimentare .....	7
1.1 Il Regolamento (CE) n. 2073/2005.....	8
1.2 Challenge test: definizione e scopo.....	11
1.3 Linee guida per l'esecuzione di challenge test .....	12
1.3.1 Cos'è e a che cosa serve una norma ISO.....	13
1.4 Scopo dell'elaborato .....	14
2 Challenge test per lo studio del potenziale di crescita e lo studio della cinetica di crescita .....	15
2.1 Obiettivo dello studio .....	16
2.2 Gli studi sul potenziale di crescita .....	17
2.2.1 Stima del potenziale di crescita ( $\Delta$ ).....	19
2.3 Gli studi sulla cinetica di crescita.....	22
2.3.1 La cinetica di crescita microbica .....	23
2.3.2 Stima dei parametri della cinetica di crescita .....	24
2.4 Apparecchiature, terreni colturali e reagenti .....	25
2.5 Progettazione dello studio.....	27
2.5.1 Numero di lotti.....	27
2.5.2 Unità di prova: inoculazione e conservazione .....	28
2.5.3 Controlli e unità di controllo .....	33
2.5.4 Numero minimo di unità.....	34
2.5.5 Selezione dei ceppi e preparazione dell'inoculo .....	36
2.5.6 Analisi.....	39
2.6 Espressione dei risultati e rapporto di prova.....	40
3 Applicazioni pratiche .....	42
3.1 Challenge test per valutare il potenziale di crescita di <i>Bacillus cereus</i> nelle zuppe di verdure pronte da riscaldare.....	42

3.1.1 Il prodotto e il processo di produzione.....	42
3.1.2 <i>Bacillus cereus</i> .....	43
3.1.3 Scopo e progettazione del challenge test.....	44
3.1.4 Discussione dei risultati .....	47
3.2 Challenge test per valutare il potenziale di crescita di <i>Listeria monocytogenes</i> in un formaggio greco a pasta molle .....	52
3.2.1 <i>Listeria monocytogenes</i> .....	52
3.2.2 Il prodotto .....	54
3.2.3 Scopo e progettazione del challenge test.....	54
3.2.4 Discussione dei risultati .....	56
3.3 Challenge test per valutare il potenziale di crescita di <i>Listeria monocytogenes</i> in salsicce affumicate a freddo .....	59
3.3.1 Il prodotto .....	59
3.3.2 Progettazione del challenge test e discussione dei risultati.....	60
3.4 Challenge test per valutare l'efficacia degli acidi lattici e acetici sulla crescita di <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Bacillus cereus</i> nel formaggio fresco primo sale.....	62
3.4.1 Determinazione della concentrazione minima inibente .....	63
3.4.2 Progettazione del challenge test.....	64
3.4.3 I risultati del challenge test per <i>Listeria monocytogenes</i> .....	65
3.4.4 I risultati del challenge test per <i>Bacillus cereus</i> .....	67
3.4.5 Conclusioni.....	68
3.5 Challenge test per studiare la dinamica di <i>Salmonella enterica</i> Typhimurium e <i>Listeria monocytogenes</i> in larve di <i>Hermetia illucens</i> allevate con due diete artificiali .....	68
3.5.1 Progettazione del challenge test.....	69
3.5.2 I risultati del challenge test per <i>Salmonella enterica</i> Typhimurium .....	71
3.5.3 I risultati del challenge test per <i>Listeria monocytogenes</i> .....	72
3.5.4 Analisi su pH e $a_w$ .....	74

3.5.5 Discussione dei risultati .....	74
4. Conclusioni .....	78
BIBLIOGRAFIA.....	83
SITOGRAFIA .....	85
LEGISLAZIONE CONSULTATA .....	86

## 1. I *challenge test*: uno strumento per la sicurezza alimentare

Secondo l'ultimo rapporto annuale sulle zoonosi in Europa, pubblicato dall'Autorità europea per la sicurezza alimentare (EFSA, 2022) e dal Centro europeo per la prevenzione e il controllo delle malattie (ECDC), nel 2021 si è registrato un aumento generale di focolai di zoonosi e malattie a trasmissione alimentare rispetto al 2020.

Le zoonosi sono malattie causate da microrganismi che possono passare dagli animali all'uomo in diversi modi. Questi microrganismi possono essere batteri, virus, funghi o parassiti. La trasmissione può avvenire per contatto diretto o indiretto con animali infetti, tramite artropodi vettori, oppure attraverso il consumo di alimenti o acqua contaminati.

Nel 2021, le malattie zoonotiche che hanno causato più casi negli esseri umani sono state la campilobatteriosi (127.840 casi) e la salmonellosi (60.050 casi). Entrambi gli agenti patogeni hanno registrato un aumento di circa 7.000 casi rispetto al 2020.

La terza zoonosi più comunemente segnalata negli esseri umani è stata la yersiniosi, una malattia causata da batteri come *Yersinia enterocolitica* che si trovano comunemente nella carne di maiale e nelle verdure poco cotte. Le infezioni da *Escherichia coli* e da *Listeria monocytogenes* hanno seguito la yersiniosi in termini di numero di casi segnalati. Entrambi questi agenti possono causare malattie gravi e persino mortali, soprattutto nei gruppi ad alto rischio, come le persone immunocompromesse, i bambini, le donne incinte e gli anziani. Le infezioni da *Listeria monocytogenes* e dal virus del Nilo occidentale sono state le zoonosi più gravi nel 2021, con la più alta percentuale di ricoveri e decessi tra i pazienti infetti.

Nonostante l'aumento rispetto al 2020, i livelli di contagio di zoonosi e malattie a trasmissione alimentare rimangono inferiori a quelli del periodo pre-pandemico. Questo è probabilmente dovuto alle misure di contenimento del COVID-19, che hanno portato a un cambiamento delle abitudini alimentari e a una maggiore attenzione all'igiene.

Dati i risultati del rapporto, è importante che le aziende alimentari prestino molta attenzione alle contaminazioni che possono interessare i prodotti finiti che poi arrivano alla tavola del consumatore. Proprio perché ogni anno, in Europa, milioni di persone si ammalano a causa di alimenti contaminati da microrganismi patogeni, l'Unione Europea ha approvato diverse normative, facenti parte del così detto "pacchetto igiene", con lo scopo di garantire un elevato livello di tutela della salute umana dei cittadini europei. Tra i regolamenti del "pacchetto igiene", il fondamentale in materia di sicurezza

alimentare è il regolamento (CE) n. 178/2002, che stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare in base ai quali i prodotti a rischio non possono essere immessi sul mercato.

## 1.1 Il Regolamento (CE) n. 2073/2005

A completamento del “pacchetto igiene”, vi sono ulteriori normative, come il Regolamento (CE) n. 2073/2005 della Commissione del 15 novembre 2005 “sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari”, che stabilisce criteri specifici per alcuni microrganismi presenti negli alimenti che hanno un rischio maggiore di causare malattie di origine alimentare.

Per rispettare i criteri stabiliti dal regolamento, tutti gli operatori del settore alimentare (OSA) che producono o esportano alimenti nell'Unione Europea devono attuare procedure interne di autocontrollo per garantire l'igiene dei propri processi produttivi e dei prodotti finiti, in tutte le fasi della produzione, trasformazione e distribuzione degli alimenti. Devono inoltre scrivere, attuare e mantenere procedure permanenti (secondo i sette principi fondamentali del sistema HACCP) che si traducono in misure preventive e/o azioni correttive per evitare non conformità (Lanni et al., 2022).

Nel regolamento (CE) n. 2073/2005, all'articolo 2 vengono distinti due tipi di criteri microbiologici:

- “Criteri di sicurezza alimentare”: si applicano al prodotto stesso per tutta la sua durata commerciale, al fine di garantire che non contenga microrganismi patogeni in quantità tali da rappresentare un rischio per la salute dei consumatori.
- “Criteri di igiene del processo”: si applicano ai semilavorati o al prodotto durante la lavorazione, al fine di verificare che il processo produttivo sia efficace nel prevenire la contaminazione microbica.

Questa distinzione è importante perché richiede agli OSA di valutare in modo critico l'intera filiera produttiva garantendo che i prodotti alimentari siano conformi ai criteri microbiologici stabiliti nell'allegato I del presente regolamento.

Inoltre, l'articolo 3 recita testualmente:

*“Se necessario, gli operatori del settore alimentare responsabili della fabbricazione del prodotto effettuano studi, in conformità all'allegato II, per verificare se i criteri sono: rispettati per l'intera durata del periodo di conservabilità. In particolare, ciò si applica agli alimenti pronti che costituiscono*

*terreno favorevole alla crescita di Listeria monocytogenes e che possono costituire un rischio per la salute pubblica in quanto mezzo di diffusione di tale batterio”.*

Il regolamento, come riportato, si concentra particolarmente su *Listeria monocytogenes* in riferimento a una specifica categoria di alimenti ovvero quelli pronti, che il regolamento all'art. 2 definisce: *“i prodotti alimentari destinati dal produttore o dal fabbricante al consumo umano diretto, senza che sia necessaria la cottura o altro trattamento per eliminare o ridurre a un livello accettabile i microrganismi presenti”.*

I ritmi di vita frenetici e l'aumento dei nuclei familiari monoparentali hanno portato a una riduzione del tempo dedicato alla cucina in casa. Di conseguenza, è aumentato il consumo di cibi pronti e precotti, che richiedono poco tempo per essere preparati o che sono pronti per essere consumati senza ulteriori trattamenti. Come riporta Statista il mercato di questa tipologia di alimenti è in crescita in Europa, con un fatturato di 83,64 miliardi di dollari nel 2023 e una previsione di crescita annuale del 5,26% fino al 2028. Questi cibi sono spesso convenienti e pratici, ma possono essere contaminati da microrganismi patogeni, soprattutto da *Listeria monocytogenes*.

*Listeria monocytogenes* è un batterio resistente che può insediarsi stabilmente in ambienti difficili da pulire, come macchinari, utensili e superfici di lavoro. Inoltre, molti ceppi di *Listeria* sono in grado di formare biofilm, che li rende ancora più difficili da rimuovere. Queste caratteristiche la rendono un agente patogeno particolarmente difficile da controllare per l'industria alimentare, poiché può contaminare facilmente gli alimenti in qualsiasi fase della produzione o commercializzazione (Giaccone et al. 2017).

Come riporta il rapporto One Health (EFSA, 2022), la listeriosi è una delle malattie di origine alimentare più gravi nell'UE ed è una minaccia significativa per la salute pubblica a causa dell'elevato tasso di ricoveri ospedalieri, morbilità e mortalità.

Per un OSA, diventa quindi fondamentale stabilire se i propri alimenti sono idonei alla crescita di *Listeria monocytogenes*. Il Regolamento (CE) n. 2073/2005, al capitolo 1 dell'Allegato I, classifica gli alimenti pronti al consumo in due categorie di rischio, in base alla loro suscettibilità alla crescita di questo batterio:

- Categoria 1: alimenti che possono costituire terreno favorevole alla crescita di *Listeria monocytogenes*.

- Categoria 2: alimenti che non costituiscono terreno favorevole alla crescita di *Listeria monocytogenes*.

I criteri di sicurezza alimentare per *Listeria monocytogenes* variano quindi in base alla capacità di un alimento pronto di sostenere la sua crescita.

Innanzitutto, l'OSA può classificare un alimento pronto in base al suo pH e/o alla sua attività dell'acqua ( $a_w$ ).

In particolare, gli alimenti con  $\text{pH} \leq 4,4$  o  $a_w \leq 0,92$ , gli alimenti con  $\text{pH} \leq 5,0$  e  $a_w \leq 0,94$ , e gli alimenti con una durata di conservazione inferiore a cinque giorni sono considerati, a priori, incapaci di sostenere la crescita di *Listeria monocytogenes*.

Tuttavia, l'OSA può anche classificare un alimento pronto come incapace di sostenere la crescita di *Listeria monocytogenes*, indipendentemente dal suo pH e/o dalla sua  $a_w$ , se può dimostrare, con solide prove scientifiche, che tale alimento non è in grado di sostenere la crescita di *Listeria monocytogenes*.

Per fare ciò, infatti, nell'allegato II, viene specificato quanto segue:

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

- *prove per determinare le caratteristiche fisico-chimiche del prodotto, quali pH,  $a_w$ , contenuto salino, concentrazione di conservanti e tipo di sistema di confezionamento, tenendo conto delle condizioni di lavorazione e di conservazione, delle possibilità di contaminazione e della conservabilità prevista,*
- *consultazione della letteratura scientifica disponibile e dei dati di ricerca sulle caratteristiche di sviluppo e di sopravvivenza dei microrganismi in questione.*

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

- *modelli matematici predittivi stabiliti per il prodotto alimentare in esame, utilizzando fattori critici di sviluppo o di sopravvivenza per i microrganismi in questione presenti nel prodotto,*

- *prove per determinare la capacità dei microrganismi in questione, debitamente inoculati, di svilupparsi o sopravvivere nel prodotto in diverse condizioni di conservazione ragionevolmente prevedibili,*
- *studi per valutare lo sviluppo o la sopravvivenza dei microrganismi in questione che possono essere presenti nel prodotto durante il periodo di conservabilità, in condizioni ragionevolmente prevedibili di distribuzione, conservazione e uso.*

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

In conclusione, l'Allegato II suggerisce all'OSA di valutare non solo le caratteristiche intrinseche della matrice (come il contenuto di umidità, il potenziale redox, i nutrienti, gli additivi antimicrobici e le strutture biologiche), ma anche le condizioni ambientali estrinseche (come la temperatura di stoccaggio, l'umidità relativa dell'ambiente, la presenza e la concentrazione di gas, la presenza e l'attività di altri microrganismi) (Lanni et al., 2022).

Per valutare ciò, il produttore deve programmare e attuare nell'alimento un insieme coordinato di prove che definiamo *challenge test*.

## 1.2 Challenge test: definizione e scopo

I microrganismi agenti di malattia alimentare sono in grado di moltiplicarsi negli alimenti, diventando dannosi per la salute del consumatore quando superano una determinata "carica infettante". La crescita dei microrganismi negli alimenti è influenzata da diversi fattori, tra cui la composizione chimica, la flora microbica della matrice in associazione con le varie tecnologie applicate al processo e al confezionamento (Giaccone et al, 2017).

In generale un challenge test è un test microbiologico in cui un microrganismo viene inoculato intenzionalmente in un alimento, in modo da simulare una contaminazione che potrebbe verificarsi. Questo test permette di documentare, in modo scientifico e riproducibile, il comportamento del microrganismo in determinate condizioni di conservazione.

Un challenge test potrebbe essere utile per uno dei seguenti scopi:

- Valutare la capacità di un alimento di sostenere lo sviluppo di microrganismi di riferimento (patogeni o indici di scarsa igiene). Questo è lo scopo principale del challenge test, ed è utilizzato per verificare la sicurezza di un alimento, assicurandosi che non sia suscettibile alla crescita di microrganismi patogeni o alteranti.
- Verificare gli effetti di un processo produttivo sulla sopravvivenza o mortalità di tali microrganismi. Il challenge test può essere utilizzato per stabilire il grado di letalità di un determinato trattamento (per esempio: calore, composto a effetto antimicrobico) su uno specifico germe (Giaccone et al. 2008).
- Determinare la shelf life di un prodotto finito. Il challenge test può essere utilizzato per determinare il periodo di tempo entro il quale un alimento rimane sicuro da consumare, sia esso un prodotto “nuovo” per il quale la shelf life sia ancora da verificare, o per rivalidare la shelf life precedentemente determinata di prodotti già in commercio per il quale siano sensibilmente variate condizioni tecnologiche, di produzione o di stoccaggio (Fontana et al. 2007). Tuttavia, in questo caso la determinazione della shelf life è da associare a ulteriori informazioni ricavate da altri test, come lo “*storage test*” che consiste nel conservare il prodotto alimentare in condizioni controllate e nel monitorare la crescita microbica e le variazioni delle caratteristiche organolettiche nel tempo.

### 1.3 Linee guida per l'esecuzione di challenge test

Per quanto riguarda l'implementazione di challenge test per tutti i generi di microrganismi in tutti i tipi di alimenti, nonché nei mangimi per animali, è stata pubblicata nel 2019 dall'Organizzazione Internazionale per la Normazione (in inglese *International Organization for Standardization*, ISO) la ISO 20976-1:2019 intitolata “*Microbiology of the food chain — Requirements and guidelines for conducting challenge tests of food and feed products — Part 1: Challenge tests to study growth potential, lag time and maximum growth rate*”. Questa norma specifica i requisiti e le linee guida per la progettazione e l'implementazione di tutti i challenge test per studiare il potenziale di crescita, il tempo di latenza e il tasso di crescita massimo nelle materie prime e nei prodotti intermedi o finiti, in modo da garantire che siano condotti in modo uniforme e affidabile. Inoltre, è stata appena pubblicata la seconda parte che tratta dei challenge test per studiare il potenziale di inattivazione e i parametri cinetici (ISO 20976-2:2022).

L'ANSES (Agenzia nazionale per la sicurezza alimentare francese) ha pubblicato una linea guida specifica per l'esecuzione di challenge test su *Listeria monocytogenes* intitolata "EURL Lm TECHNICAL GUIDANCE DOCUMENT on challenge tests and durability studies for assessing shelf-life of ready-to-eat foods related to *Listeria monocytogenes*", (versione 4 del 1° luglio 2021). Questa linea guida è destinata agli OSA e fornisce indicazioni su come progettare e implementare un challenge test per questo specifico microrganismo.

In conclusione, per condurre un challenge test su *Listeria monocytogenes*, il produttore è tenuto a fare riferimento ai due documenti indicati, la norma ISO 21864-1 e la norma EURL Lm 2021. Per tutti gli altri microrganismi e tipi di alimenti, la linea guida da seguire è la norma ISO.

### 1.3.1 Cos'è e a che cosa serve una norma ISO

L'ISO è un'organizzazione non governativa che coordina la definizione di norme tecniche a livello internazionale.

L'attività di stesura delle norme internazionali è svolta generalmente attraverso comitati tecnici ISO. I comitati tecnici sono gruppi di esperti provenienti da diversi paesi e settori che si riuniscono per sviluppare norme in un determinato campo.

Secondo la Direttiva Europea 98/34 (Direttiva 98/34/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 22/6/1998) la definizione di norma è la seguente:

*“La specifica tecnica approvata da un organismo riconosciuto a svolgere attività normativa per applicazione ripetuta o continua, la cui osservanza non sia obbligatoria [...]”*

Le norme tecniche sono documenti tecnici che forniscono linee guida o caratteristiche, relative a determinate attività o a loro risultati, al fine di ottenere il miglior risultato in un determinato contesto. Sono prodotte mediante consenso di tutte le parti interessate e approvate da un organismo riconosciuto. La loro applicazione è volontaria, ma sono spesso utilizzate come base per la legislazione e la regolamentazione nazionali e internazionali.

Le regole tecniche, invece, sono documenti aventi valore giuridico cogente, quindi obbligatorio. Ne è un esempio il regolamento (CE) n. 2073/2005. Sono emesse dalle autorità dei singoli Stati o armonizzate ed emesse come Direttive dall'Unione Europea. Stabiliscono i requisiti essenziali a tutela di interessi pubblici collettivi, come la sicurezza e la salute, nelle diverse attività produttive.

## 1.4 Scopo dell'elaborato

In questo elaborato si analizzeranno i requisiti e le linee guida per condurre challenge test in alimenti contenuti nella norma ISO 20976-1. Lo scopo è fornire una panoramica in senso critico di questa metodica, nella speranza di formare i professionisti del settore alimentare a comprenderne i principi e a utilizzarla in modo efficace.

## 2 Challenge test per lo studio del potenziale di crescita e lo studio della cinetica di crescita

In questo capitolo analizzeremo la norma ISO 20976-1 che fornisce un insieme di regole e linee guida per la progettazione e la conduzione di challenge test, utilizzati per valutare la capacità di microrganismi di interesse *“di crescere, sopravvivere o essere inattivati”* nei prodotti alimentari *“in condizioni ragionevolmente prevedibili di processi alimentari, conservazione e uso”* (ISO 20976-1, 2019).

Come riporta la suddetta norma, il challenge test è un *“approccio riconosciuto”* e viene usato *“per validare le misure di controllo all'interno del sistema HACCP, nonché per valutare la sicurezza microbiologica e la qualità dei prodotti alimentari, i processi di produzione alimentare, le condizioni di conservazione degli alimenti e le raccomandazioni per la preparazione degli alimenti per i consumatori”*.

Il suo utilizzo richiede competenze in diverse aree, tra cui:

- la microbiologia alimentare: lo studio dei microrganismi che si trovano negli alimenti e dei loro effetti su di essi. È importante conoscere tali microrganismi per poterli identificare e controllare, in modo da garantire la sicurezza degli alimenti;
- la scienza alimentare: lo studio della composizione, della trasformazione, della conservazione e della sicurezza degli alimenti per poter comprendere le proprietà degli alimenti e come questi si comportano durante la lavorazione e la conservazione;
- la statistica dei prodotti alimentari: l'applicazione della statistica alla scienza alimentare, importante per poter raccogliere, analizzare e interpretare i dati relativi agli alimenti.

In particolare, le competenze statistiche sono fondamentali per la raccolta, l'analisi e l'interpretazione dei dati microbiologici, nonché per la progettazione sperimentale. Inoltre, sono necessarie per la modellizzazione predittiva della crescita batterica, ovvero l'utilizzo di modelli matematici per valutare l'andamento della crescita di microrganismi in funzione di fattori come la temperatura, il pH, la concentrazione di nutrienti e la presenza di agenti inibitori.

Il *“gamma concept”* ne è un esempio ed è particolarmente utile per queste attività, in quanto consente di effettuare ulteriori simulazioni utilizzando i dati ricavati dal challenge test. Ad esempio,

è possibile valutare la crescita batterica testandola a temperature diverse da quelle utilizzate nella prova originale.

Un challenge test viene eseguito da un *“laboratorio organizzatore”* che la norma definisce come *“il laboratorio avente la responsabilità di gestire i challenge test”* che quindi, mette in pratica il progetto ed elabora un apposito rapporto finale. Il laboratorio è auspicabile sia accreditato, anche se la norma non lo dice direttamente, si può intuire al punto 4.1 dove afferma: *“le analisi devono essere condotte nell’ambito di un sistema di assicurazione della qualità (per esempio in conformità a ISO/IEC 17025)”*. La norma ISO/IEC 17025 è un insieme di requisiti che i laboratori devono soddisfare per dimostrare la loro competenza tecnica e la validità dei loro risultati. L’accreditamento è un procedimento con cui un organismo riconosciuto attesta formalmente la competenza di un organismo o persona a svolgere funzioni specifiche (ISO 8402, 1994).

È altamente consigliabile che il metodo di prova del challenge test sia accreditato da un soggetto terzo (Accredia per l’Italia) (Lanni et al., 2022).

I protocolli specificati dalla norma ISO 20976-1 sono applicabili per lo studio di batteri in fase vegetativa, batteri sporigeni e lieviti che non formano micelio in materie prime, prodotti intermedi e prodotti finiti.

## 2.1 Obiettivo dello studio

Il primo passo per realizzare un challenge test è definire l'obiettivo dello studio, che può essere:

- lo studio del potenziale di crescita,
- lo studio della cinetica di crescita (tempo di latenza e tasso di crescita massimo).

La progettazione di un esperimento per valutare la crescita microbica deve essere adatta allo scopo e deve tenere conto delle diverse fasi della catena alimentare in cui la crescita microbica può verificarsi. Questo è importante per garantire che i risultati del challenge test siano confrontabili con la situazione reale.

È importante altresì definire i criteri decisionali che verranno presi in considerazione per valutare i risultati dello studio e trarre conclusioni. I criteri decisionali sono spesso basati su valori quantitativi, come i valori limite di crescita microbica. Ad esempio, un criterio decisionale potrebbe essere che la

concentrazione di un determinato microrganismo patogeno in un alimento non deve superare un certo valore entro un determinato periodo di tempo. Il valore limite di crescita microbica è solitamente stabilito da un'autorità competente sulla base di considerazioni scientifiche per garantire la sicurezza, proteggendo così i consumatori da potenziali rischi per la salute.

## 2.2 Gli studi sul potenziale di crescita

Gli studi sul potenziale di crescita sono indicati per:

1. *“Validare la durata di conservazione microbiologica di un alimento nell’ambito delle condizioni d’uso e di conservazione ragionevolmente prevedibili tra la produzione e il consumo”* (ISO 20976-1, 2019). Validare significa dimostrare che la durata di conservazione microbiologica di un alimento è conforme ai requisiti di sicurezza alimentare, senza che si verifichino alterazioni microbiologiche che possano costituire un rischio per la salute umana. Questo viene fatto basandosi su criteri microbiologici che sono valori limite per la presenza di microrganismi, al di sopra dei quali l'alimento non è sicuro.

Se la velocità di crescita del microrganismo patogeno è tale che la popolazione microbica raggiunge il valore limite entro la durata di conservazione dichiarata, allora l'alimento non è sicuro da consumare dopo la data di scadenza.

Per spiegare meglio, ecco un esempio. Supponiamo che un produttore di alimenti voglia validare la durata di conservazione microbiologica di un nuovo prodotto alimentare a base di carne. Il produttore deve determinare il potenziale di crescita di un microrganismo patogeno, come *Escherichia coli*, in un campione del prodotto conservato a temperatura refrigerata. Il produttore conduce il challenge test per un periodo di tempo di 15 giorni. I risultati degli studi mostrano che la popolazione di *Escherichia coli* raggiunge il valore limite entro 10 giorni. In questo caso, il produttore deve dichiarare una durata di conservazione microbiologica di 10 giorni e non 15 giorni in quanto dopo 10 giorni, l'alimento non è più sicuro da consumare.

2. *“Valutare se un prodotto, sottoposto a prova nell’ambito di condizioni specifiche, permette la crescita di un microrganismo inoculato”* (ISO 20976-1, 2019). In questo caso, l'obiettivo è determinare se il microrganismo è in grado di crescere nel prodotto.

Se il microrganismo è in grado di crescere nel prodotto, allora il prodotto è suscettibile alla contaminazione da quel microrganismo. Questo significa che la contaminazione del microrganismo in quell'alimento potrebbe portare a un problema di sicurezza alimentare.

I risultati di questi studi si applicano solo al prodotto alimentare specifico e alle condizioni di conservazione utilizzate durante lo studio. In parole semplici, questo significa che i risultati di uno studio sul potenziale di crescita non possono essere generalizzati ad altri prodotti alimentari o a condizioni di conservazione diverse.

Se i criteri microbiologici non sono soddisfatti, o se le condizioni vengono modificate, è necessario effettuare un nuovo studio sul potenziale di crescita.

Questo accade perché le modifiche alle caratteristiche o alle condizioni alimentari possono influire sulla capacità di un microrganismo di crescere. Ad esempio, se il produttore aggiunge un conservante al prodotto alimentare, il conservante può inibire la crescita di alcuni microrganismi. In questo caso, è necessario effettuare un nuovo studio sul potenziale di crescita per determinare se il microrganismo patogeno è ancora in grado di crescere nel prodotto alimentare.

Ecco alcuni esempi di modifiche che potrebbero richiedere un nuovo studio sul potenziale di crescita:

- Modifiche alla formulazione del prodotto, come l'aggiunta di nuovi ingredienti o l'eliminazione di ingredienti esistenti o la modifica al tipo o alla concentrazione di additivi.
- Modifiche alle caratteristiche fisico-chimiche del prodotto, come il pH ovvero *“la misura della concentrazione di acidità o alcalinità di un materiale in soluzione acquosa”* (ISO 20976-1, 2019), e l'attività dell'acqua ( $a_w$ ), ovvero *“il rapporto tra la pressione del vapore acqueo nel prodotto alimentare e la pressione del vapore dell'acqua pura alla stessa temperatura”* (ISO 20976-1, 2019).
- Modifiche all'imballaggio.
- Modifiche alle condizioni di conservazione quali temperatura, umidità relativa e composizione dell'atmosfera ovvero la miscela di gas che circonda il prodotto.

### 2.2.1 Stima del potenziale di crescita ( $\Delta$ )

Questa tipologia di challenge test consiste nell'introdurre un microrganismo in un campione di prodotto alimentare e quindi nel monitorare la crescita del microrganismo nel tempo, quantificandone l'aumento. Per ottenere risultati accurati da un test microbiologico, l'inoculo utilizzato, ovvero la *“sospensione microbica alla concentrazione desiderata utilizzata per contaminare le unità di prova”* (ISO 20976-1, 2019), deve essere preparato in modo da simulare le condizioni in cui il microrganismo si troverà nell'alimento.

In particolare, l'inoculo, se necessario, deve essere sottoposto a condizioni che possano danneggiare la cellula o la spora, come quelle che si verificano durante la manipolazione o la lavorazione degli alimenti. Questi danni possono innescare risposte adattive da parte della cellula o della spora, che possono influire sul suo comportamento durante la crescita. Ad esempio, se un alimento viene sottoposto a cottura, le cellule batteriche o le spore possono essere danneggiate dal calore. Questo può portare a una riduzione della loro capacità di crescere e moltiplicarsi. Pertanto, per ottenere risultati accurati da un test microbiologico su un alimento che è stato riscaldato, l'inoculo deve essere sottoposto a un riscaldamento simile. In conclusione, l'obiettivo di adattare l'inoculo alle condizioni di manipolazione/lavorazione degli alimenti è quello di ottenere risultati che siano rappresentativi del comportamento microbico naturale nell'alimento.

*“È importante disporre di un minimo di cinque punti di campionamento equamente distribuiti sull'intero periodo di durata di conservazione”* (ISO 20976-1, 2019). Se i punti di campionamento fossero concentrati in un periodo di tempo specifico, ad esempio all'inizio o alla fine della durata di conservazione, la stima potrebbe essere distorta.

Il potenziale di crescita non fornisce indicazioni sulla durata della fase di latenza, sul valore del tasso di crescita o sul livello massimo della fase stazionaria. L'incapacità del potenziale di crescita di fornire informazioni su queste variabili lo rende inadatto per prevedere come si comporterà il microrganismo in altre condizioni.

Per determinare il potenziale di crescita di un microrganismo in un alimento, è possibile applicare profili di temperatura dinamici ovvero curve che rappresentano le variazioni di temperatura che l'alimento può subire durante la sua reale conservazione. Ad esempio, un alimento da conservare a temperatura di refrigerazione può subire variazioni di temperatura durante il trasporto o la

distribuzione. I profili di temperatura dinamici possono essere utilizzati per simulare queste variazioni di temperatura.

Per fare ciò l'appendice E della norma ISO 20976-1 riporta quanto segue: *“i dati relativi alle condizioni di conservazione (tempo e temperatura) possono essere basati su osservazioni dei diversi passaggi e dei Paesi in cui si trovano la catena di approvvigionamento alimentare e i consumatori. È inoltre possibile utilizzare:*

- *dati relativi alla sorveglianza della temperatura lungo la catena alimentare disponibili nella letteratura scientifica;*
- *sorveglianza pratica delle temperature di conservazione nelle catene del freddo studiate”.*

Per il calcolo del potenziale di crescita, la formula da applicare è la seguente:

$$\Delta = \text{Log}_{\text{max}} - \text{Log}_i$$

Se lo studio è effettuato su un lotto, è necessario seguire i seguenti passaggi:

- 1) Raccogliere i dati sperimentali monitorando la crescita dei batteri nel tempo registrando il numero di cellule per unità di volume o peso.
- 2) Calcolare la media dei data point sperimentali per ogni punto di campionamento. Questo si fa sommando i valori di tutti i data point per ogni punto di campionamento e dividendo il risultato per il numero di data point.
- 3) Calcolare il potenziale di crescita utilizzando la formula dove  $\text{Log}_{\text{max}}$  è il valore della concentrazione batterica più elevato dei valori medi calcolati nel passaggio 2 e  $\text{Log}_i$  è il valore medio iniziale del lotto.

Se invece vengono studiati tre o più lotti, il potenziale di crescita è il valore massimo raggiunto da uno qualsiasi di questi lotti. In questo caso,  $\text{Log}_{\text{max}}$  è il valore massimo registrato per un lotto, mentre  $\text{Log}_i$  è il valore di partenza dello stesso lotto (ISO 20976-1, 2019).

Inoltre:

- il valore del potenziale di crescita deve essere espresso in scala logaritmica in base 10;
- il potenziale di crescita è pari a zero se la concentrazione batterica finale è inferiore o uguale alla concentrazione batterica iniziale;

- un challenge test deve essere respinto se lo scarto tipo dei dati è maggiore di un certo limite. Lo scarto tipo è una misura dell'incertezza dei dati. Un valore elevato dello scarto tipo indica che i dati sono meno affidabili. Nel caso di un challenge test, lo scarto tipo viene calcolato utilizzando i dati della concentrazione batterica iniziale (quindi al tempo 0). Se lo scarto tipo è maggiore di 0,3 Log<sub>10</sub> UFC/g, significa che i dati della concentrazione batterica iniziale sono troppo imprecisi per essere utilizzati per calcolare il potenziale di crescita. In questo caso, il challenge test deve essere respinto e ripetuto (ISO 20976-1, 2019).

Per lo studio del potenziale di crescita, si utilizza un approccio a due fasi. Nella prima fase, si determina semplicemente se la crescita si verifica o meno. Se la concentrazione del microrganismo nel campione è maggiore di quella iniziale, significa che il microrganismo è cresciuto. Nella seconda fase, si determina quanto la crescita è accettabile. Questo viene realizzato definendo un valore di soglia (*cut-off*) che possiamo trovare in pubblicazioni scientifiche o viene fornito da istituzioni o regolamenti. Se la concentrazione del microrganismo nel campione è maggiore del valore di soglia, significa che l'alimento permette la crescita del microrganismo in misura inaccettabile.

L'appendice D della norma ISO 20976-1 fornisce degli esempi su come stimare il potenziale di crescita. Quando tre lotti sono inoculati contemporaneamente si procede a determinare se si verifica la crescita microbica target ponendo il criterio decisionale ovvero il valore del potenziale di crescita in Log<sub>10</sub> UFC/g, se questo valore viene superato l'alimento è di supporto alla crescita. In questo caso, si procede con la quantificazione del potenziale di crescita che è il valore massimo ottenuto dai tre lotti. Quando invece i tre lotti non sono inoculati contemporaneamente, vi è la necessità di aumentare le unità di prova al tempo 0 da 1 a 3, mediare i dati e procedere come prima. In tutti i casi, come già detto, è indispensabile calcolare lo scarto tipo delle conte al tempo 0, se questo è minore di 0,30 Log<sub>10</sub> UFC/g le inoculazioni sono accettabili, altrimenti se per un lotto o più il limite viene superato, il lotto è da respingere e quindi deve essere aggiunto un altro lotto supplementare accettabile per determinare il potenziale di crescita.

## 2.3 Gli studi sulla cinetica di crescita

Gli studi sulla cinetica di crescita sono indicati per:

1. Valutare come fattori intrinseci ed estrinseci influenzano la crescita e lo sviluppo di un microrganismo target. I fattori intrinseci sono quelli che sono specifici dell'alimento, come il pH, l' $a_w$  e la presenza di conservanti. I fattori estrinseci sono quelli che sono esterni all'alimento, come la composizione dell'atmosfera e la temperatura di conservazione. Ad esempio, si potrebbe valutare il comportamento di *Salmonella enteritidis* in condizioni di pH diverse e valutare quale valore di pH è più favorevole o meno favorevole al suo sviluppo.
2. Generare dati che vengono poi utilizzati in modelli che simulano l'effetto dei fattori intrinseci ed estrinseci sul comportamento microbico in condizioni di conservazione prevedibili.
3. Il confronto dei risultati della simulazione della crescita microbica con i criteri microbiologici, per garantire che l'alimento sia sicuro per il consumo durante tutta la sua durata di conservazione.

Come riporta la norma ISO 20976-1 questi studi *“sono utilizzati per stimare e validare la durata di conservazione microbiologica di un alimento”*.

Gli studi sulla cinetica di crescita sono particolarmente utili nelle ultime fasi di sviluppo del prodotto, quando si apportano modifiche alla formulazione, all'imballaggio o alle condizioni di lavorazione. In questi casi, è importante valutare l'impatto di tali modifiche sulla crescita dei microrganismi.

Uno studio sulla cinetica di crescita può fornire informazioni più dettagliate su come i microrganismi crescono in un alimento rispetto a uno studio sul potenziale di crescita. Tuttavia, gli studi sulla cinetica di crescita sono più complessi da progettare, eseguire, interpretare e utilizzare, soprattutto quando sono inclusi più fattori.

Teniamo presente che la cinetica di crescita di una popolazione microbica è influenzata dai seguenti fattori: caratteristiche dell'alimento, condizioni di conservazione, processi alimentari, stato fisiologico del microrganismo e dalle interazioni con i microrganismi naturali di fondo (ISO 20976-1, 2019).

I microrganismi di fondo sono microrganismi che si trovano naturalmente nell'alimento e che non sono stati aggiunti intenzionalmente. Questi microrganismi possono influenzare la cinetica di

crescita del microrganismo di interesse in diversi modi, ad esempio possono competere per i nutrienti disponibili, possono produrre sostanze antimicrobiche o possono modificare le condizioni ambientali come il pH o la quantità di ossigeno e quindi influenzare la crescita del microrganismo target.

### 2.3.1 La cinetica di crescita microbica

Quando il conteggio della popolazione logaritmica viene tracciato rispetto al tempo, si possono distinguere quattro fasi distinte: fase di latenza (lag time), fase esponenziale, fase stazionaria e morte (Yousef e Abdelhamid, 2019). Per quanto riguarda lo scopo del challenge test prenderemo in considerazione solo le prime tre fasi che descrivono la cinetica di crescita microbica.

#### Fase di latenza (lag time)

La fase di latenza è un periodo di cessazione della crescita di un microrganismo dopo che è stato introdotto in un nuovo ambiente. Durante questo periodo, il microrganismo si adatta al nuovo ambiente riorganizzandosi e sintetizzando nuovi componenti. La durata della fase di latenza varia a seconda della natura del mezzo e delle condizioni di stress del microrganismo. Se l'inoculo è vecchio o viene trasferito in un mezzo chimicamente diverso, la fase di latenza sarà lunga. Al contrario, la fase di latenza sarà breve o addirittura assente quando una coltura giovane in vigorosa crescita viene trasferita in un mezzo avente la stessa composizione (Yousef e Abdelhamid, 2019).

Il lag time dipende dai livelli di inoculazione, dalle condizioni di conservazione e dallo stato fisiologico del microrganismo (ISO 20976-1, 2019).

#### Fase esponenziale

La fase esponenziale della crescita microbica è la fase in cui la popolazione di microrganismi cresce a un ritmo esponenziale, raddoppiandosi ogni certo intervallo di tempo. In condizioni favorevoli, la fase esponenziale può durare per un tempo indefinito, ma in genere è limitata dall'esaurimento dei nutrienti o dalla produzione di sostanze tossiche da parte delle cellule (Yousef e Abdelhamid, 2019).

Questa fase è caratterizzata dal tasso di crescita, un parametro che misura la velocità con cui le cellule si dividono e si moltiplicano. La norma ISO 20976-1 lo definisce come *“l'aumento massimo nel logaritmo naturale o decimale del numero di cellula per unità di tempo”*. Il logaritmo è una

funzione matematica che trasforma i numeri in una scala logaritmica, che è più facile da interpretare quando si lavora con microrganismi. In pratica, è il tasso di crescita massimo che una popolazione cellulare può raggiungere in condizioni ideali. È una misura importante della vitalità e della capacità di proliferazione delle cellule.

Le caratteristiche fisico-chimiche e microbiologiche e le condizioni di conservazione possono influenzare in modo significativo i tassi di crescita microbica. Il tasso di crescita di una popolazione microbica non è influenzato dalla sua concentrazione iniziale e dai suoi stati fisiologici (ISO 20976-1, 2019).

#### Fase stazionaria

In questa fase, il ritmo di crescita diminuisce fino a diventare trascurabile. La fase stazionaria è una fase in cui la popolazione cellulare non cresce più e ha raggiunto il suo livello massimo. Questo perché le risorse disponibili sono esaurite o perché le condizioni ambientali sono sfavorevoli. Nonostante la mancanza di moltiplicazioni evidenti durante la fase stazionaria, la popolazione cellulare può rimanere metabolicamente attiva (Yousef e Abdelhamid, 2019).

### 2.3.2 Stima dei parametri della cinetica di crescita

Per caratterizzare la cinetica di crescita, è necessario misurare il lag time e il tasso di massima crescita. Quando vengono considerati più lotti questi parametri devono essere stimati separatamente per ogni lotto.

Il tasso di massima crescita viene usato principalmente per valutare e determinare la durata di conservazione microbiologica di un alimento ed eventualmente ottimizzarla. In particolare, può essere utilizzato per calcolare l'aumento della concentrazione batterica nelle condizioni previste dal challenge test e può essere utilizzato per simulare la crescita batterica in un alimento, il che può essere utile per sviluppare strategie di conservazione che la ritardino.

Per caratterizzarla in modo accurato, è necessario raccogliere *“almeno otto punti di informazione sperimentali distribuiti in tutte le fasi di crescita, con almeno cinque punti di informazioni nella fase esponenziale”*. Inoltre, *“la cinetica di crescita deve essere stimata a una temperatura costante*

*mediante l'applicazione di un modello matematico riconosciuto e comunemente accettato utilizzato per descrivere la crescita microbica" (ISO 20976-1, 2019).*

Il valore del tasso di crescita stimato ad una determinata temperatura, può essere usato per simulazioni successive in modelli predittivi basati sul gamma concept, sia in condizioni statiche (cambiamento di un parametro chimico come il pH) che dinamiche ovvero la valutazione di temperature diverse che il prodotto nella sua conservazione può subire (ISO 20976-1, 2019). È importante prendere in considerazione, per esempio, il comportamento del consumatore e la fluttuazione di temperatura durante il trasporto. L'appendice E della norma ISO 20976-1 descrive questo caso e ne fornisce un esempio con *Listeria monocytogenes*, ponendo che il prodotto per il 60% del tempo di conservazione rimarrà ad una temperatura di 4 gradi, il 30% a 8 gradi e il 10% a 12 gradi.

Inoltre, l'appendice D della norma fornisce un esempio per stimare il lag time e il tasso di massima crescita. Nell'esempio, vengono analizzate 3 porzioni per i 9 punti di campionamento ottenendo così i data point sperimentali. Viene poi applicato il "modello logistico con crescita ritardata" ovvero un modello matematico che prevede la crescita di una popolazione di microrganismi in funzione del tempo. Alla fine, si ottengono i valori stimati del tasso di massima crescita e il lag time di ogni lotto con i loro rispettivi errori di riferimento.

## 2.4 Apparecchiature, terreni colturali e reagenti

La norma ISO 20976-1 specifica le apparecchiature, i terreni colturali e i reagenti da utilizzare quando si realizza un challenge test, ciò garantisce che i risultati dei test siano accurati e riproducibili.

La normale apparecchiatura di laboratorio di microbiologia specificata nella ISO 7218 è necessaria per eseguire qualsiasi tipo di analisi microbiologica, inclusi i challenge test. La ISO 7218:2007 è una norma internazionale che fornisce i requisiti generali e le linee guida per le analisi microbiologiche.

Inoltre, potrebbero essere necessarie apparecchiature di laboratorio specifiche per preparare i campioni, conservarli in condizioni idonee e monitorare le loro variazioni.

Le apparecchiature specificamente menzionate nella ISO 20976-1 includono:

- *“Apparecchiatura per l'imballaggio”* per confezionare il campione in modo da simulare le condizioni di conservazione previste. I campioni possono essere esposti all'aria, sottovuoto o in atmosfera protettiva modificata.
- *“Incubatrice refrigerata”* per mantenere l'alimento a una temperatura costante.
- *“Camera di controllo di clima”* che consente di mantenere condizioni ambientali controllate quali la temperatura e l'umidità relativa.
- *“pH-metro”* per misurare il pH dell'alimento (Figura 2.1).
- *“ $a_w$ -metro”* per misurare l'attività dell'acqua dell'alimento (Figura 2.2).
- *“Analizzatore dello spazio di testa”* per misurare la composizione dei gas presenti come ossigeno e anidride carbonica tra il prodotto e l'imballaggio.
- *“Registratori per la misurazione delle condizioni di conservazione”* dei campioni quali temperatura e umidità.



**Figura 2.1** pH-metro.



**Figura 2.2**  $a_w$ -metro.

Per quanto riguarda i terreni colturali e i reagenti la norma ISO 20976-1 fornisce le seguenti indicazioni:

- Eseguire i test in conformità alla ISO 7218.
- Per garantire la qualità e la validità dei terreni colturali e dei reagenti, è necessario seguire le procedure specificate nella ISO 11133 e nella norma internazionale specifica per la popolazione microbica studiata. La ISO 11133 è una norma internazionale che fornisce le linee guida per la preparazione e le prove prestazionali dei terreni colturali.

- I metodi utilizzati per l'individuazione o l'enumerazione di microrganismi target devono essere riconosciuti e ampiamente accettati a livello internazionale, oppure devono essere alternativi e validati secondo protocolli accettati a livello internazionale. Ad esempio, se non esiste un metodo riconosciuto per il microrganismo specifico da identificare, il laboratorio di prova può utilizzare un metodo alternativo che sia stato validato secondo la ISO 16140-2.

## 2.5 Progettazione dello studio

Nella fase di progettazione di un challenge test, è importante considerare le fonti di variabilità che potrebbero influenzare i risultati, come la variabilità tra lotti di prodotti, la variabilità all'interno di un lotto di prodotti e la variabilità associata all'inoculazione artificiale di un microrganismo in un campione.

### 2.5.1 Numero di lotti

Il numero di lotti da includere in un challenge test dipende dalla variabilità del processo di produzione e dell'alimento (fattori intrinseci, estrinseci o microbiologici).

*“Se la variabilità inter-lotto delle caratteristiche alimentari (per esempio fisico-chimica e microbiologica) è sufficiente a provocare differenze nel comportamento di crescita microbica (quando  $\Delta \varphi_{pH_{aW}}$  o  $\Delta \psi$  maggiore dello 0,2) è necessario studiare lotti diversi per valutare la variabilità delle risposte microbiche. In tal caso, un numero minimo di tre lotti dovrebbe essere utilizzato sia per gli studi sul potenziale di crescita che per gli studi sulla cinetica di crescita” (ISO 20976-1, 2019).*

In generale, è preferibile utilizzare più lotti di un alimento, in modo da rappresentare tale variabilità. Tuttavia, in alcuni casi come precisato dalla norma ISO 20976-1, è possibile utilizzare un unico lotto, ma solo se è chiaramente giustificato, per esempio:

- *“Valutando l'impatto di una nuova formulazione alimentare”.*
- *“Utilizzando un lotto che rappresenti le condizioni di crescita maggiormente favorevoli”.*

- Per uno studio sulla cinetica di crescita, se l'impatto della variabilità inter-lotto è non significativo. In questo caso, è necessario utilizzare uno strumento di calcolo per valutare l'impatto della variabilità inter-lotto.

Nella norma ISO nell'appendice A viene dettagliato lo strumento di calcolo per stimare l'impatto della variabilità inter-lotto. Questo strumento si basa sull'utilizzo del "calcolatore della variabilità fisico-chimica inter-lotto", se questa supera un valore di riferimento (ovvero quando  $\Delta \phi_{pH_{aW}}$  o  $\Delta \psi$  maggiore dello 0,2) la variabilità ha un impatto significativo sul modello di crescita microbica, in questo caso quindi dovrebbero essere sottoposti a prova più lotti.

Questo metodo è applicabile solo se i challenge test vengono condotti per stimare il tasso di crescita del microrganismo e se il pH e l' $a_w$  sono gli unici fattori che hanno un impatto significativo su questo parametro.

## 2.5.2 Unità di prova: inoculazione e conservazione

La ISO 20976-1 dà una definizione precisa di unità di prova: "*quantità di alimento misurata (volume o massa) utilizzato per l'inoculazione*". Di seguito vedremo la modalità di preparazione e di conservazione delle unità di prova da inoculare per eseguire un challenge test descritte nella norma.

Le unità di prova utilizzate per analizzare un alimento devono essere rappresentative della matrice alimentare da cui sono state prelevate. In particolare, le unità di prova possono essere:

- l'intera unità di imballaggio,
- porzioni dell'unità di imballaggio. Il prelievo asettico dei campioni è essenziale per evitare che vengano contaminati da microrganismi o altre sostanze estranee, che potrebbero alterarne i risultati.

Le seguenti istruzioni per la preparazione delle unità di prova sono una serie di linee guida che devono essere seguite per garantire la validità dei risultati del test.

Le unità di prova, secondo la norma ISO 20976-1 devono:

- *“Essere mantenute ad una temperatura di conservazione adeguata prima dell'inoculazione”*. In quanto se queste venissero conservate a una temperatura troppo alta o troppo bassa, la crescita microbica subirebbe alterazioni che influenzerebbero i risultati del test.
- *“Essere inoculate il più vicino possibile alla data di produzione, se non diversamente definito dagli obiettivi dello studio”*. In questo modo verrebbero evitate e ridotte al minimo le probabilità di cambiamento delle condizioni, ad esempio un abuso termico, nel tempo che intercorre tra la data di produzione e il momento dell'inoculazione.
- *“Avere la stessa composizione dell'alimento originario, in particolare per prodotti alimentari compositi”*. Questi prodotti possono contenere diversi ingredienti, che possono influire sulla crescita microbica.
- *“Essere imballate utilizzando le stesse condizioni di imballaggio dell'alimento originale”*. In particolare, è essenziale utilizzare lo stesso materiale di imballaggio, una miscela di gas comparabile e un rapporto spazio di testa-alimento analogo. Tuttavia, in caso di necessità, è possibile utilizzare un materiale alternativo, purché abbia le stesse proprietà tecniche dell'originale, in particolare la permeabilità al gas. In questo caso è importante dimostrare che le proprietà tecniche del materiale alternativo sono equivalenti a quelle dell'originale.
- È consigliabile preparare un numero maggiore di unità di prova per essere pronti a qualsiasi imprevisto.

La procedura di inoculo è un processo importante che deve essere eseguito con attenzione per garantire che i risultati dei test siano accurati e riproducibili. Le regole indicate dalla norma ISO 20976-1 sono le seguenti:

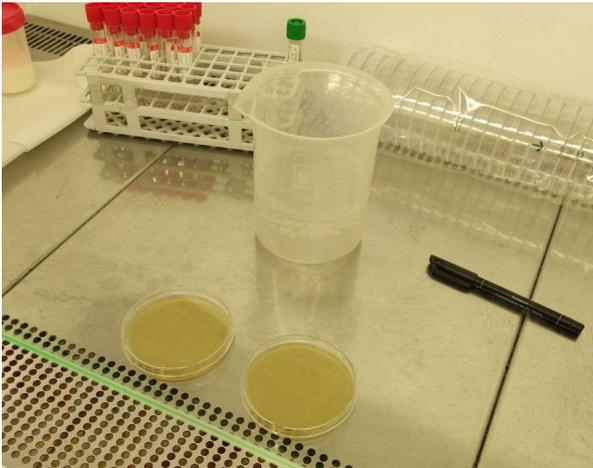
- L'inoculo deve essere uniforme. Ciò significa che ogni unità di prova deve contenere la stessa quantità di microrganismi. Se l'inoculo non è uniforme, alcune unità di prova potrebbero contenere più microrganismi di altre. Questo può portare a risultati errati, in quanto le unità di prova con più microrganismi potrebbero produrre risultati maggiori che non rispettano la realtà.
- L'inoculo non deve alterare le caratteristiche fisico-chimiche del campione. Ciò significa che il pH e l' $a_w$  del campione non devono essere modificati. Se necessario, le caratteristiche

dell'inoculo ( $pH$  e  $a_w$ ) possono essere regolate per garantire che sia compatibile con il campione.

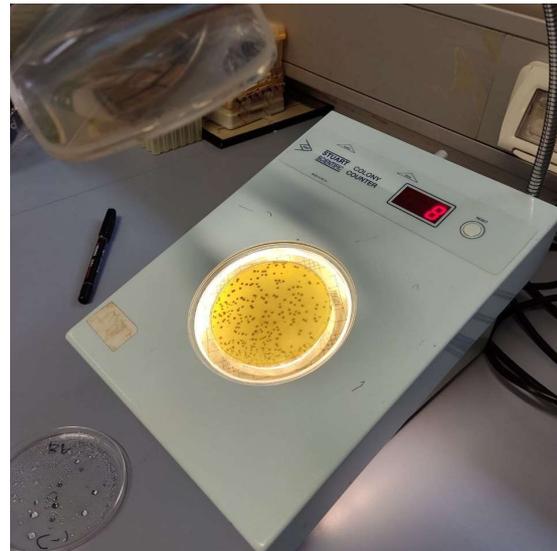
- La quantità di inoculo da aggiungere al campione non dovrebbe essere superiore all'1% della massa o del volume del campione.
- La temperatura dei campioni, prima del momento dell'inoculazione, deve essere la stessa della temperatura alla quale verrà eseguito il test. Ad esempio, se il test viene eseguito a 37 °C e il campione è a 25 °C, i microrganismi potrebbero crescere più lentamente nel campione, portando a una sottostima del numero di microrganismi presenti.

Inoltre, la scelta del livello di inoculazione deve essere giustificata e appropriata per il tipo di alimento e per il microorganismo che si sta cercando di quantificare. Questo significa che il livello di inoculazione deve essere sufficientemente alto da garantire che il microorganismo sia rilevato e quantificato con precisione dal metodo di quantificazione scelto. Il limite di quantificazione è la concentrazione più bassa di microrganismi che può essere rilevata e quantificata con un determinato metodo. Se il livello di inoculazione fosse inferiore al limite di quantificazione, i risultati potrebbero essere errati.

*“Quando la concentrazione iniziale di inoculo è bassa, il limite di quantificazione può essere abbassato”* (ISO 20976-1, 2019). Per aumentare le probabilità di rilevare anche i microrganismi presenti in basse concentrazioni, è possibile aumentare per esempio il numero di piastre utilizzate per la quantificazione. In pratica, l'analisi di un campione di microrganismi viene effettuata inoculando una quantità nota di campione su una piastra di Petri contenente un terreno di coltura (Figura 2.3). Dopo un periodo di incubazione, si contano le colonie di microrganismi che si sono formate sulla piastra (Figura 2.4). Il numero di colonie è proporzionale alla concentrazione iniziale di microrganismi nel campione. Se la concentrazione iniziale è bassa, è possibile che non si formino colonie visibili sulla piastra. In questo caso, è possibile aumentare il numero di piastre utilizzate per l'analisi. In questo modo, si aumentano le probabilità di rilevare anche i microrganismi presenti in basse concentrazioni.



**Figura 1.3** Piastre di Petri contenenti terreni di coltura su cui inoculare microrganismi.



**Figura 2.4** Contacolonie con Piastra di Petri contenente colonie di *Staphylococcus aureus* su Baird-Parker-Agar.

*“Si raccomanda un livello di inoculazione pari ad almeno cinque volte il limite di quantificazione del metodo di enumerazione e non maggiore di una concentrazione iniziale di  $10^4$  UFC/g (o per unità di volume o area)”* (ISO 20976-1, 2019).

Per studiare la contaminazione di un alimento, è necessario utilizzare una procedura di inoculazione che simuli il modo in cui l'alimento è contaminato nella realtà. Ad esempio, attraverso un'inoculazione al centro (ad esempio per prodotti macinati), in superficie o di massa (per alimenti liquidi o semi-liquidi).

La distribuzione dell'inoculo nell'alimento dipende dall'obiettivo dell'analisi. Se si vuole analizzare il comportamento microbico nell'intero alimento, l'inoculo deve essere distribuito in modo uniforme. Per analizzare, invece, il comportamento microbico in una parte specifica dell'alimento, l'inoculo deve essere distribuito solo in quella parte, ad esempio in superficie.

Per quanto riguarda i prodotti alimentari eterogenei, come quelli composti da più ingredienti o da fasi diverse, il laboratorio può identificare una parte del prodotto alimentare come il più favorevole alla crescita microbica e inoculare quella particolare parte, purché l'intera unità di prova venga utilizzata per determinare la concentrazione della popolazione microbica target. Inoltre, è necessario descrivere e giustificare la scelta del componente specifico inoculato, e preservare la struttura e il rapporto dei componenti del prodotto durante l'inoculo.

*“Gli alimenti confezionati in atmosfera modificata (incluso il sottovuoto) possono essere aperti, inoculati e rimballati”* (ISO 20976-1, 2019). Questo può essere fatto iniettando il microrganismo direttamente nell'alimento attraverso uno o più setti adesivi. I setti adesivi sono piccoli dispositivi che vengono applicati sull'imballaggio dell'alimento e consentono di iniettare il microrganismo senza danneggiare l'imballaggio. L'uso di setti adesivi consente di contaminare l'alimento in modo controllato e senza alterare l'atmosfera di imballaggio. Dopo aver inoculato l'alimento, è importante assicurarsi che l'imballaggio rimanga sigillato ermeticamente per tutta la durata della prova in modo da garantire che l'alimento sia contaminato solo dal microrganismo in questione.

Le unità di prova devono essere conservate in una incubatrice refrigerata o in una camera di controllo di clima alla temperatura selezionata per il periodo di tempo specifico. La temperatura deve essere scelta in modo da permettere la crescita del microrganismo oggetto di studio, ma anche da rappresentare in modo realistico le condizioni di conservazione dell'alimento. La temperatura deve essere monitorata e registrata per tutta la durata del test (ISO 20976-1, 2019).

Gli alimenti che sono sensibili alle condizioni ambientali, come l'umidità relativa, possono richiedere l'utilizzo di una camera di controllo del clima per simulare le condizioni di conservazione reali. Anche in questo caso, è necessario registrare le condizioni ambientali per tutta la durata del test.

Ora vediamo le indicazioni che fornisce la norma ISO 20976-1 sia per la conservazione delle unità di prova destinate alla stima del potenziale di crescita che per quelle destinate alla stima dei parametri della cinetica di crescita.

Per le unità di prova destinate alla stima del potenziale di crescita seguire la seguente indicazione:

durante il challenge test applicare condizioni di conservazione realistiche e tali da rappresentare le condizioni di conservazione più estreme che l'alimento è più probabile che subisca dalla produzione al consumo. Questo significa che il test deve simulare situazioni in cui l'alimento può essere conservato per un periodo di tempo più lungo o a una temperatura più alta del previsto.

Per determinare il peggiore scenario possibile, *“le condizioni di conservazione di ogni parte della catena del freddo considerata possono essere, per esempio, il 75 percentile dei dati osservati”* (ISO 20976-1, 2019). In altre parole, si possono utilizzare le condizioni di conservazione che sono state osservate solo nel 25% dei casi più critici.

Supponiamo di avere i dati relativi alla temperatura di conservazione di un prodotto alimentare lungo la catena del freddo. I dati sono raccolti da un sistema di monitoraggio e sono rappresentati

da una distribuzione di probabilità. Il 75 percentile di questa distribuzione è il valore che lascia al di sotto di sé il 75% dei dati. In altre parole, è il valore che è stato osservato solo nel 25% dei casi più estremi.

Se le condizioni di conservazione sono completamente controllate, il challenge test può essere eseguito alla temperatura regolamentata o a una temperatura definita dal produttore.

Invece, per le unità di prova destinate a stimare i parametri della cinetica di crescita seguire la seguente indicazione:

le unità di prova devono essere conservate a una temperatura costante durante l'intero periodo di prova. La temperatura deve consentire la crescita del microrganismo target e deve essere il più vicino possibile alle condizioni di conservazione effettive.

### 2.5.3 Controlli e unità di controllo

I controlli sull'alimento vengono effettuati per assicurarsi che le unità di prova siano rappresentative dell'intero lotto o della popolazione di alimenti da cui sono stati prelevati.

Oltre a verificare la rappresentatività delle unità di prova, è importante controllare anche altre caratteristiche dell'alimento che potrebbero influenzare i risultati dell'analisi. Ad esempio, il pH, la concentrazione di conservanti, l'atmosfera e microrganismi di fondo possono influenzare la crescita dei microrganismi (ISO 20976-1, 2019); quindi, è importante conoscerne i valori prima di effettuare l'analisi.

I controlli sull'alimento possono essere utilizzati per determinare il livello di contaminazione naturale di un alimento da parte di un particolare gruppo di microrganismi, ad esempio batteri patogeni o microrganismi responsabili del deterioramento.

Le unità di controllo, invece, sono definite dalla ISO 20976-1 come *“le unità alimentari identiche alle unità di prova ma non contaminate artificialmente (utilizzate come riferimento)”*.

Le unità di controllo sono utilizzate per garantire che la preparazione delle unità di prova non abbia influito sulle caratteristiche dell'alimento studiato come una variazione di composizione; infatti, queste unità vengono inoculate con un diluente non stimolatore della crescita in volume pari a

quello della sospensione batterica. Queste unità sono anche utilizzate per fornire informazioni supplementari da utilizzare per l'espressione dei risultati e del rapporto di prova.

Come per le unità di prova, è opportuno avere a disposizione unità di controllo extra per affrontare eventuali problemi imprevisti. Per esempio, nell'elaborazione di un challenge test per valutare il potenziale di crescita di *Listeria monocytogenes* in un formaggio greco a pasta molle sono state preparate cinque unità di riserva per ogni lotto (Vasileiadi et al., 2022).

#### 2.5.4 Numero minimo di unità

Il numero minimo di unità necessarie per lo studio è indicato nella Figura 2.5.

Il diagramma di flusso fornito dalla norma ISO 20976-1 ci indica che:

- Il numero minimo di unità di prova da utilizzare per un'analisi in un determinato punto di campionamento è determinato dalla variabilità tra lotti. Se le unità di prova all'interno di un lotto sono molto variabili, è necessario analizzare un numero maggiore di unità di prova o selezionare punti di campionamento aggiuntivi per ottenere una stima precisa.
- Se i tre lotti di un prodotto non vengono inoculati nello stesso momento, il numero di unità di prova per il tempo 0 ( $t_0$ ), ovvero il momento in cui le unità di prova vengono inoculate, dovrebbe essere di almeno tre per lotto.
- Per quanto riguarda le unità di controllo, i punti di campionamento obbligatori sono solo due: uno iniziale ( $t_0$ ) e uno finale ( $t_{end}$ ). Tuttavia, la norma consiglia di includere anche punti di analisi intermediari per monitorare l'evoluzione del prodotto durante il challenge test. I parametri da monitorare includono pH, gas nell'atmosfera, concentrazioni di conservanti e microrganismi di fondo. Le stesse unità possono essere utilizzate per la misurazione di tutti questi parametri che influiscono sulla crescita microbica.

In uno studio condotto da Vasileiadi et al. (2022) per valutare il potenziale di crescita di *Listeria monocytogenes*, sono state utilizzate 51 unità totali per l'intero challenge test. Questo numero è in linea con il minimo indicato dalla norma ISO, che è di 21 unità.

In un altro studio, condotto da Alberghini et al. (2023) per valutare il potenziale di crescita di *Bacillus cereus*, sono state utilizzate per ogni lotto 36 unità di prova e 12 unità di controllo, per un totale di

144 unità per l'intero challenge test. Questo numero è di gran lunga superiore al minimo indicato dalla norma ISO.

	<b>Potenziale di crescita</b>	<b>Tasso di crescita</b>
<b>Numero minimo di lotti</b>	3 lotti <sup>a)</sup>	3 lotti <sup>a)</sup>
<b>Numero minimo di unità di prova per lotto</b>	1 unità di prova <sup>a)</sup>	1 unità di prova
<b>Numero minimo di punti di campionamento</b>	5 punti di campionamento inclusi $t_0$ e $t_{end}$	8 punti di campionamento inclusi 5 nella fase esponenziale
<b>Numero minimo delle unità di prova</b>	3 lotti x 1 unità di prova x 5 punti di campionamento = 15 unità di prova	3 lotti x 1 unità di prova x 8 punti di campionamento = 24 unità di prova
<b>Numero minimo delle unità di controllo</b>	3 lotti x 1 unità di controllo x 2 punti di campionamento ( $t_0$ e $t_{end}$ ) (+ controllo della temperatura <sup>b)</sup> ) = 6 unità di controllo	3 lotti x 1 unità di controllo x 2 punti di campionamento ( $t_0$ e $t_{end}$ ) (+ controllo della temperatura <sup>b)</sup> ) = 6 unità di controllo
<b>Numero minimo totale delle unità</b>	21 unità	30 unità

**Figura 2.5** Numero minimo di unità di prova necessario per lo studio del challenge test.  
 Legenda: a) L'uso di un unico lotto deve essere chiaramente giustificato. In tal caso, il numero di unità di prova per lotto è esteso a 3. b) Se i tre lotti non sono eseguiti contemporaneamente, è necessaria un'unità controllo della temperatura minima per lotto (ISO 20976-1, 2019).

## 2.5.5 Selezione dei ceppi e preparazione dell'inoculo

In un challenge test, è importante identificare accuratamente ogni ceppo di microrganismo utilizzato in modo da poterne conoscere le caratteristiche e il comportamento. La caratterizzazione di un ceppo può essere effettuata utilizzando diversi metodi, come quelli biochimici, sierologici e genetici.

In questo paragrafo verranno discusse le indicazioni che la norma ISO 20976-1 riporta per quanto riguarda la selezione dei ceppi microbici da utilizzare nel challenge test e la preparazione dell'inoculo.

In generale, è preferibile utilizzare ceppi di microrganismi isolati direttamente da un alimento o da un ambiente correlato all'alimento, piuttosto che utilizzare solo ceppi preesistenti in una collezione di colture. I ceppi isolati sono più rappresentativi della comunità microbica presente nell'alimento o nell'ambiente e possono essere più specifici per l'alimento o l'ambiente da cui sono stati isolati.

Inoltre, è importante conoscere l'origine di ogni ceppo utilizzato e gli isolati dovrebbero essere conservati in modo appropriato, in modo da poter essere utilizzati nuovamente in futuro, ad esempio in una raccolta nazionale o internazionale o nel laboratorio di prova che ha effettuato il challenge test (Figura 2.6).



**Figura 2.6** Provette di Microbank per la conservazione a lungo termine e il recupero di ceppi batterici isolati da matrici alimentari e piastra di Petri contenente colonie di *Staphylococcus aureus* su Baird-Parker-Agar.

Per stimare il potenziale di crescita, è necessario utilizzare una miscela di ceppi della stessa specie. Per stimare il tasso di crescita, è sufficiente utilizzare un solo ceppo per test.

Per esempio, nell'elaborazione di un challenge test per valutare il potenziale di crescita di *Bacillus cereus*, è stato utilizzato un ceppo di riferimento proveniente da una collezione internazionale e un ceppo selvaggio isolato direttamente dal prodotto oggetto del test (Alberghini et al., 2023). In un altro test, per valutare il potenziale di crescita di *Listeria monocytogenes* in un formaggio a pasta molle, è stata utilizzata una miscela di ceppi isolati da diversi latticini e dal filtro ambiente del reparto di produzione del latte (Vasileiadi et al., 2022).

Prima di effettuare un test, è necessario conoscere la capacità di crescita dei ceppi coinvolti. Questo può essere fatto utilizzando dati storici o pubblicati, oppure conducendo nuovi test.

Il ceppo o i ceppi selezionati per uno studio devono in grado di crescere e sopravvivere nelle condizioni in cui verranno utilizzati. Se possibile, è preferibile utilizzare ceppi per i quali si conoscono i valori cardinali. I valori cardinali sono i valori critici per la crescita di un microrganismo, come la temperatura minima e massima di crescita, il pH ottimale, l' $a_w$  ottimale e la concentrazione minima inibitoria (MIC) per i conservanti, ovvero la più bassa concentrazione del conservante in grado di inibire la crescita di un microrganismo target. L'utilizzo di ceppi per i quali sono stati determinati i valori cardinali consente di sviluppare modelli predittivi più accurati della crescita dei microrganismi.

Per la preparazione dell'inoculo, attenersi alle norme di laboratorio ISO 7218.

Per preparare le sospensioni delle cellule vegetative di un ceppo selezionato, è necessario effettuare due colture successive come descritto nella ISO 20976-1:

- La prima coltura viene effettuata in un terreno colturale che *“consente una crescita ottimale del ceppo”*. Questo terreno deve includere tutti i nutrienti necessari per il ceppo e le condizioni ambientali ottimali. La coltura viene fatta crescere fino al termine della fase esponenziale o fino al raggiungimento della fase stazionaria iniziale.  
La crescita in un terreno colturale ottimale consente alle cellule di ripristinare il loro stato fisiologico normale. Questo perché le cellule microbiche possono essere in uno stato di stress o inattive quando vengono isolate dall'ambiente naturale.
- La seconda coltura viene effettuata *“in un terreno colturale che imita le condizioni naturali dell'alimento (almeno la temperatura e, ove pertinente, il pH e/o  $a_w$ )”*. L'obiettivo è portare al minimo la fase di latenza dopo l'inoculazione, ovvero il caso peggiore che potrebbe realizzarsi. La coltura viene fatta crescere fino al termine della fase esponenziale o fino al raggiungimento della fase stazionaria iniziale.

La determinazione della concentrazione della popolazione microbica viene effettuata alla fine della seconda coltura.

In alcuni casi, è necessario sottoporre l'inoculo a trattamenti che simulino i processi di produzione alimentare. L'appendice C della norma descrive alcuni esempi di protocolli *“per indurre stress microbico o risposte adattative in microrganismi”*. Le condizioni da applicare dipendono dal tipo e dal ceppo del microrganismo selezionato. In particolare, vi sono esempi di protocolli che provocano danni alle popolazioni batteriche di *Listeria monocytogenes*.

*“L'impatto dello stress indotto deve essere stimato”* (ISO 20976-1), per fare ciò è necessario misurare la crescita del microrganismo prima e dopo il trattamento utilizzando mezzi selettivi e non selettivi.

*“Non è necessario alcun adattamento e/o trattamento del danno se si utilizza esclusivamente il tasso di massima crescita in ulteriori simulazioni”* (ISO 20976-1).

Le diluizioni seriali della seconda coltura devono essere eseguite in un diluente che non contenga nutrienti. I nutrienti presenti nel diluente potrebbero infatti favorire la crescita del microrganismo, inducendo un'eccessiva concentrazione di microrganismi nelle unità di prova. In questo modo, si otterrebbero risultati non rappresentativi della crescita del microrganismo.

Se necessario, il diluente può essere adattato alle condizioni del secondo terreno colturale, come il pH, l' $a_w$  e la temperatura, per garantire la compatibilità e per mantenere lo stato fisiologico dell'inoculo.

Quando si utilizza una miscela di ceppi, è importante quantificare separatamente ogni ceppo prima di miscelarli. Inoltre, è importante che questi ceppi siano presenti in concentrazioni equivalenti. Il terreno utilizzato per quantificare i ceppi deve essere lo stesso terreno utilizzato per il test.

Per la preparazione di una sospensione di spore, seguire queste tre fasi:

- Coltura delle spore: il primo passo è quello di coltivare il microrganismo in un terreno colturale che favorisca la sporulazione. Il tempo necessario per questa fase varia a seconda della specie o del ceppo microbico e delle condizioni di sporulazione.
- Controllo della sporulazione: una volta che la coltura è pronta, è necessario controllare l'estensione della sporulazione con un microscopio.
- Enumerazione delle spore: le spore vengono quantificate per determinare la concentrazione della sospensione.

Anche in questo caso, l'appendice C della norma fornisce un esempio di protocollo per la produzione di spore di ceppi del batterio *Bacillus* di genere mesofilo.

Inoltre, è necessario contare il numero di spore presenti in una coltura prima di eseguire un challenge test, usando lo stesso terreno utilizzato per il test. Dopo un adeguato trattamento termico, è possibile contare le spore germinate per determinare la concentrazione effettiva.

## 2.5.6 Analisi

Seguire le indicazioni contenute nella ISO 7218 e nella ISO 11133, come già menzionato nei paragrafi precedenti.

In tutti i challenge test, è necessario effettuare un'analisi iniziale il giorno in cui avviene l'inoculazione con il microrganismo di interesse (ISO 20976-1, 2019). L'analisi iniziale è importante per stabilire una baseline da cui misurare i cambiamenti nella crescita microbica nel corso del tempo. Successivamente, è necessario effettuare ulteriori analisi in corrispondenza dei punti di campionamento previsti dal tipo di challenge test.

Inoltre, la quantificazione microbiologica e le misurazioni dei parametri fisico-chimici devono essere raccolti da punti di campionamento diversi, in base alla progettazione dello studio.

È preferibile utilizzare l'intera unità di prova per l'analisi, se possibile.

*“Le analisi fisico-chimiche e microbiologiche devono essere effettuate con metodi riconosciuti e ampiamente accettati a livello internazionale o con metodi alternativi validati secondo i protocolli accettati a livello internazionale”* (ISO 20976-1, 2019). Ad esempio, facendo riferimento alla ISO 6887-1 che definisce le regole generali per la preparazione della sospensione iniziale e delle diluizioni decimali oppure alla ISO 16140-2 che indica il protocollo per la validazione di metodi alternativi rispetto ad un metodo di riferimento.

Nei casi in cui l'inoculo venga effettuato sulla superficie di un alimento o su un alimento composito o eterogeneo, è necessario utilizzare l'intera unità di prova per un singolo test. L'unità di prova non deve essere riutilizzata.

Se la porzione di prova è grande, può essere più pratico eseguire la diluizione 1:10 in due fasi, anziché in una sola.

*“Le fonti di incertezza analitica sono essenzialmente il campionamento e il metodo analitico”* (ISO 20976-1, 2019). L'incertezza analitica può essere ridotta aumentando il numero di unità di prova da analizzare per punto di campionamento e il numero di analisi per punto di campionamento. Questo è particolarmente importante quando la variabilità della matrice alimentare o dell'inoculazione artificiale è elevata.

Inoltre, la norma riporta le seguenti note da tenere in considerazione:

- *“Nei casi in cui l'alimento non presenta microrganismi di fondo, può essere utilizzato un agar non selettivo per enumerare la popolazione microbica target, in quanto ciò favorisce la capacità di recupero delle cellule lesionate”.*
- *“Il laboratorio di microbiologia può adattare i volumi placcati sul terreno colturale per l'isolamento (in conformità alla ISO 7218) al fine di ridurre il limite di quantificazione del metodo utilizzato”.* Questo significa che riducendo il volume di materiale biologico distribuito sul terreno di coltura, è possibile ridurre il limite di quantificazione del metodo; quindi, sarà possibile rilevare microrganismi presenti in concentrazioni inferiori.
- *“Quando si eseguono “challenge test” non è obbligatorio eseguire prove di conferma complete su colonie tipiche come parte della procedura tecnica di enumerazione.”*
- *“Il campionamento della superficie può essere effettuato mediante metodi quali il risciacquo o la tamponatura (per esempio ISO 17604, ISO 18593)”.*

## 2.6 Espressione dei risultati e rapporto di prova

Il calcolo del potenziale di crescita e la stima dei parametri lag time e tasso di crescita sono riportati nei paragrafi 2.2.1 e 2.3.2. I risultati della determinazione del numero di microrganismi devono essere convertiti in  $\text{Log}_{10}$  UFC per peso, volume o superficie.

Il rapporto di prova deve includere tutti i dati necessari per l'interpretazione del challenge test, dichiarando:

- il metodo utilizzato, i risultati ottenuti e gli errori di riferimento associati al metodo;
- i dettagli di tutte le fasi operative non specificate o considerate facoltative dalla ISO;

- informazioni su eventuali scostamenti che potrebbero aver influenzato i risultati (ISO 20976-1, 2019).

La norma ISO al punto 15 fornisce i capitoli, i paragrafi e i dettagli che deve contenere un rapporto di prova. In sintesi, i contenuti sono i seguenti:

1. Definizione dello scopo del challenge test, in base al quale si determinerà il tipo di test da eseguire e i criteri decisionali. Descrizione delle caratteristiche dell'alimento oggetto del test.
2. Descrizione del protocollo sperimentale: descrizione dei ceppi microbici utilizzati, specifica del numero di lotti di prodotto da sottoporre a test, descrizione della preparazione delle unità di prova, piano di campionamento e analisi.
3. Analisi del campione: condizioni di conservazione del campione, numero di porzioni di prova analizzate, peso o il volume o l'area delle unità di prova, metodi utilizzati per l'analisi microbica e fisico-chimica.
4. Risultati: presentazione dei risultati ottenuti, in relazione al tipo di challenge test.
5. Conclusioni: confronto dei risultati con i criteri decisionali e discussione.
6. Documenti di riferimento: se necessario, elenco dei riferimenti bibliografici utilizzati.

Gli OSA sono responsabili di valutare e interpretare correttamente i risultati di ogni singolo challenge test prodotto dal laboratorio di prova, assicurando così la sicurezza alimentare dei loro prodotti.

## 3 Applicazioni pratiche

Nel presente capitolo, verranno discussi alcuni studi recenti, pubblicati in letteratura scientifica negli ultimi tre anni, che hanno utilizzato i challenge test per valutare la sicurezza microbiologica di prodotti alimentari. L'obiettivo di questo capitolo è fornire una panoramica dei challenge test e delle loro applicazioni pratiche.

### 3.1 Challenge test per valutare il potenziale di crescita di *Bacillus cereus* nelle zuppe di verdure pronte da riscaldare

#### 3.1.1 Il prodotto e il processo di produzione

Le zuppe di verdure pronte da riscaldare sono alimenti pronti al consumo che i consumatori scelgono per la loro facilità e velocità di preparazione. Tuttavia, rappresentano una categoria di alimenti rischiosi dal punto di vista della sicurezza alimentare, in particolare per la presenza di batteri del genere *Bacillus spp.* e *Clostridium spp.*, che possono contaminare il prodotto e moltiplicarsi fino a raggiungere concentrazioni dannose per la salute del consumatore. Questi microrganismi sono in grado di formare spore, strutture di sopravvivenza che li rendono resistenti a condizioni ambientali avverse.

Le zuppe pronte da riscaldare prodotte industrialmente sono realizzate seguendo un diagramma di flusso relativamente simile (Alberghini et al., 2023).

Il processo di produzione di una zuppa inizia con la cottura degli ingredienti in acqua bollente per almeno 45 minuti. Una volta cotti, gli ingredienti vengono frullati e confezionati in ciotole. In questa fase il prodotto ha una temperatura di circa 80-85 °C.

Il processo di confezionamento può avvenire in camere microbiologicamente asettiche o in ambienti con normale circolazione d'aria. Nel primo caso, la zuppa viene confezionata in un ambiente sterile, in modo da evitare la contaminazione da batteri, lieviti e muffe. Nel secondo caso invece, la zuppa viene confezionata in un ambiente normale, dove è possibile la presenza di microrganismi. Per evitare che questi microrganismi causino il deterioramento della zuppa o la rendano pericolosa per il consumo, è auspicabile sottoporre la zuppa a un secondo trattamento termico.

Il secondo trattamento termico consiste nel riscaldare la zuppa a una temperatura di 85-95 °C per 10-45 minuti. Tuttavia, non tutte le aziende adottano questo passaggio.

Il processo produttivo delle zuppe influenza notevolmente le loro caratteristiche microbiologiche. Gli ingredienti utilizzati possono contenere diversi microrganismi, a seconda della loro origine.

La prima cottura in acqua bollente riduce drasticamente il numero di forme vegetative di batteri, lieviti e muffe. Tuttavia, le spore di *Bacillus spp.* e *Clostridium spp.* possono sopravvivere al trattamento termico e, a seconda delle condizioni ambientali, possono germinare. Il secondo trattamento termico dovrebbe garantire anche la devitalizzazione delle cellule di *Bacillus spp.* o *Clostridium spp.* nate dalla germinazione delle spore, garantendo un elevato livello di sicurezza microbiologica del prodotto.

L'evoluzione da spora inerte a cellula vegetativa metabolicamente attiva richiede un periodo di crescita che può durare dalle 10 alle 40 ore (o più). Se la seconda pastorizzazione viene effettuata subito dopo il confezionamento o qualche ora dopo la prima, il calore non sarà in grado di inattivare le forme microbiche in fase di germinazione, poiché il processo è ancora nelle fasi iniziali (Alberghini et al., 2023).

### 3.1.2 *Bacillus cereus*

*Bacillus cereus* è un batterio ubiquitario, molto diffuso in natura e spesso isolato dal suolo e dalle piante. Si diffonde facilmente in molti tipi di alimenti, soprattutto quelli di origine vegetale (riso e pasta). È frequentemente presente nelle materie prime e negli ingredienti utilizzati nell'industria alimentare, come verdure, amido e spezie (Lindbäck and Granum, 2019).

Non è un batterio molto competitivo, ma può crescere rapidamente in alimenti sottoposti a cottura e successivo raffreddamento. Questo perché il trattamento termico induce la germinazione delle spore, che possono poi crescere e produrre tossine. In assenza di altri batteri, *Bacillus cereus* può crescere rapidamente, con un tempo di generazione di soli 12 minuti per alcuni ceppi in condizioni ottimali (Lindbäck and Granum, 2019).

*Bacillus cereus* ha la possibilità di indurre due diverse patologie: la sindrome diarroica e la sindrome emetica.

La sindrome diarroica è una gastroenterite ed è legata all'ingestione di una quantità rilevante di cellule del microbo vivo e vitale. Ha un'entità generalmente lieve data dalla sintesi da parte di alcuni ceppi di una serie di fattori enterotossici termolabili. La sindrome emetica invece è legata all'assunzione della tossina cereulide, molto resistente al calore e al pH. Questa patologia è più rapida, più acuta e più dolorosa rispetto alla precedente.

Nella maggior parte dei casi, le spore sopravvissute a un trattamento termico sono la causa di entrambi i tipi di malattie di origine alimentare.

I sintomi dell'avvelenamento da *Bacillus cereus* compaiono solo se il batterio è presente in quantità molto elevate nel cibo. Per la forma diarroica, è necessaria una quantità di almeno  $10^5$ - $10^6$  UFC/g di alimento, mentre per la forma emetica è necessaria una quantità di almeno  $10^6$ - $10^7$  UFC/g di alimento (Alberghini et al., 2023).

I prodotti alimentari precotti e refrigerati con una durata di conservazione prolungata possono essere un terreno fertile per *Bacillus cereus*. I sintomi di queste malattie sono spesso lievi e di breve durata, quindi è probabile che siano altamente sottostimate (Lindbäck and Granum, 2019).

### 3.1.3 Scopo e progettazione del challenge test

Gli OSA che producono questa tipologia di alimenti pronti potrebbero essere interessati a valutare se il loro prodotto consente o riduce la crescita di *Bacillus cereus*, per garantirne la sicurezza. Questo scopo può essere raggiunto eseguendo un challenge test studiando il potenziale di crescita.

Lo studio di Alberghini et al. (2023) preso in considerazione e successivamente discusso, descrive la progettazione e l'implementazione di un challenge test secondo lo standard ISO 20976-1:2019 in una tipologia di zuppa di verdura pronta da riscaldare contenente i seguenti ingredienti: carote, cipolle, sedano, pomodoro, prezzemolo, cavolo cappuccio, rosmarino, salvia, zucchine, bietole e basilico semilavorato, farro (*Triticum monococcum*), olio extravergine di oliva e acqua. Nella formulazione del prodotto non sono stati aggiunti conservanti.

I cereali, come il farro, sono alimenti ricchi di proteine e/o amido, che sono condizioni favorevoli per la crescita di *Bacillus cereus*. Per questo motivo, le zuppe che contengono cereali sono potenzialmente più a rischio di altre di favorire la proliferazione di questo batterio.

Il challenge test messo in atto da Alberghini et al. (2023) ha permesso di calcolare il potenziale di crescita di *Bacillus cereus* nel prodotto a due condizioni di conservazione:

- Conservazione normale: il prodotto è stato mantenuto a temperature inferiori a +4 °C per tutta la sua durata di conservazione.
- Conservazione in abuso termico: fino al 20° giorno di prova il prodotto è stato mantenuto a +4 °C, periodo che rappresentava lo stoccaggio dalla produzione alla vendita al dettaglio. Dal 21° al 35° giorno a +8 °C per simulare la conservazione al dettaglio. Dal 36° giorno, il prodotto è stato sottoposto ad un'alterazione termica: è stato portato a +20 °C per 4 ore, per simulare il momento del trasporto dal punto vendita al domicilio del consumatore. Successivamente, il prodotto è stato riportato a +10 °C fino al 90° giorno, per simulare lo stoccaggio presso il domicilio del consumatore.

La zuppa in questione è stata sottoposta a una prima cottura a 90 °C per 45 minuti. Dopo il confezionamento, è stata sottoposta a un secondo trattamento termico che raggiunge una temperatura di oltre 85 °C per almeno 15 minuti. Tutte le confezioni sono state acquistate da un'azienda che ha fornito i campioni il giorno successivo alla produzione.

Una singola confezione di zuppa aveva un peso netto di 620 g e una durata prevista di 90 giorni se conservata a temperature inferiori a +4 °C.

Lo scopo dello studio è stato valutare se nei 90 giorni di conservazione previsti, *Bacillus cereus* è stato in grado di crescere e moltiplicarsi nel prodotto, valutando il potenziale di crescita. Se *Bacillus cereus* è in grado di avvicinarsi e raggiungere il valore limite ciò significa che il prodotto non è sicuro per il consumo. In questo caso, è necessario modificare la durata di conservazione del prodotto o rivalutare il processo di produzione per ridurre la contaminazione da *Bacillus cereus*.

Per determinare il numero di lotti da prendere in considerazione per il challenge test, è stata valutata la variabilità inter-lotto. Per fare ciò sono stati prelevati al termine della produzione, su dieci lotti, cinque confezioni da ciascun lotto ed è stato misurato il valore di pH e  $a_w$ . Con questi valori si è potuto utilizzare il calcolatore disponibile online nel sito dell'ANSES e sviluppato dal Laboratorio di riferimento dell'Unione Europea. Il valore è stato poi confermato con lo strumento fornito dalla norma ISO 20976-1 presente nell'appendice A. La variabilità inter-lotto è stata considerata significativa, quindi sono stati considerati tre lotti.

L'inoculo è stato preparato utilizzando due ceppi di *Bacillus cereus*: uno di riferimento (ATCC11778) e un ceppo selvaggio isolato dallo stesso tipo di zuppa e dallo stesso produttore. Il ceppo selvaggio è stato identificato biochimicamente in questo caso utilizzando il sistema *BIOLOG*, un sistema che si basa sulla capacità dei batteri di metabolizzare diversi substrati.

Per preparare le cellule vegetative da inoculare, per ciascun ceppo di *Bacillus cereus* utilizzato nel challenge test, sono state preparate due colture successive. La prima coltura è stata allestita inoculando cellule batteriche vive in brodo di infusione BHI (*brain heart infusion*). Questa coltura è stata incubata a +37 °C per 18-20 ore, fino a raggiungere la fine della fase di crescita esponenziale.

Un millilitro del brodo della prima coltura è stato quindi inoculato in 9 ml di un brodo per infusione BHI con valori di pH e  $a_w$  corrispondenti a quelli della zuppa di farro e verdure, rispettivamente 6,3 e 0,98. Questa seconda coltura è stata incubata a +37 °C per 96 h, per consentire alla sospensione batterica di raggiungere la fine della fase di incremento logaritmico.

L'inoculo è stato preparato miscelando in volumi uguali le sospensioni di ciascuno dei due ceppi.

La concentrazione iniziale di cellule vegetative della seconda coltura è stata di circa  $10^7$  UFC/ml, concentrazione che ha permesso di raggiungere il livello di inoculo richiesto dalla norma ISO 20976-1. Tale concentrazione è stata poi confermata dalla semina in piastre. Ogni unità di prova è stata inoculata con 5 ml della sospensione batterica utilizzando siringhe sterili.

Per ogni lotto sono state inoculate 36 unità di prova: 21 delle quali da mantenere a +4 °C e 15 per il test di abuso termico. I punti di campionamento sono stati 7 rispettivamente il 1° (T0), 20° (T1), 35° (T2), 45° (T3), 51° (T4), 60° (T5) e 90° giorno (T6). In ciascun punto di campionamento sono state analizzate tre unità di prova conservate a 4° C, mentre per le unità sottoposte ad abuso termico sono state analizzate sempre 3 unità, ma a partire dal giorno 20 quindi per i cinque punti di campionamento T2, T3, T4, T5 e T6.

Alle 36 unità di prova sono state aggiunte 12 unità di controllo utilizzate per misurare parametri quali pH,  $a_w$  e valori redox all'inizio e alla fine del test, e per la quantificazione della conta vitale totale (TVC) che rappresenta la microflora di fondo.

In totale sono quindi state allestite 108 unità di prova e 36 unità di controllo, per un totale di 144 confezioni di zuppa.

Nelle unità di prova è stata effettuata la quantificazione di *Bacillus cereus* secondo la norma ISO 7932:2020.

Nelle unità di controllo, è stato determinato il TVC secondo la norma ISO 4833-1:2013.

Ogni quantificazione è stata espressa come UFC/g. Successivamente, tutti i valori in UFC/g sono stati convertiti in logaritmo in base 10.

### 3.1.4 Discussione dei risultati

In seguito, prenderemo in considerazione e discuteremo i risultati delle analisi ottenuti dallo studio di Alberghini et al. (2023).

La ricerca di *Bacillus cereus* non ha rilevato la presenza del batterio in nessuna delle unità di controllo. Pertanto, i risultati ottenuti nell'intero challenge test sono stati considerati validi.

La Tabella 3.1 mostra i valori di pH, redox,  $a_w$  e TVC rilevati nelle unità di controllo all'inizio e alla fine del challenge test.

**Tabella 3.1** Valori di pH, redox,  $a_w$  e TVC rilevati all'inizio (T0) e alla fine (T6) del challenge test. I valori riportati sono la media ( $\mu$ ) dei tre valori ottenuti dalle singole unità di prova analizzate per ciascuna fase analitica (Alberghini et al., 2023).

Tempo	Lotto	Temperatura (°C)	$\mu$ TVC Log <sub>10</sub> UFC/g	$\mu$ pH	$\mu$ Redox (mV)	$\mu a_w$
T0	Lotto 1	4	<1	6,12	+50	0,987
	Lotto 2	4	<1	6,49	+21	0,996
	Lotto 3	4	<1	6,34	+25	0,986
T6 (90° giorno)	Lotto 1	4	3,20	6,14	+40	0,993
		10	6,26	6,44	+39	0,992
	Lotto 2	4	<1	6,55	+15	0,990
		10	2,88	6,49	+12	0,984
	Lotto 3	4	<1	6,42	+21	0,992
		10	3,51	6,39	+22	0,992

I valori di pH delle unità di controllo riscontrati per i tre lotti hanno mostrato a T0 valori variabili da un lotto all'altro. Per le unità di prova mantenute a 4° C a T6 si è rilevato un leggero aumento del valore in tutti e tre i lotti, mentre per le unità di prova in condizione di abuso termico si è riscontrato un aumento marcato solo nel lotto 1 (da 6,12 a 6,44).

Il valore di  $a_w$  è rimasto pressoché invariato in tutti e tre i lotti.

Il potenziale redox è un indicatore della condizione aerobica di un substrato. Valori positivi indicano che il substrato è aerobico, mentre valori negativi indicano che è anaerobico. Nel caso specifico, il potenziale redox ha sempre mostrato valori positivi sia all'inizio che alla fine del challenge test, indicando che la zuppa era aerobica in entrambi i casi. Tuttavia, il valore registrato tendeva a diminuire durante la conservazione, soprattutto nel lotto 1.

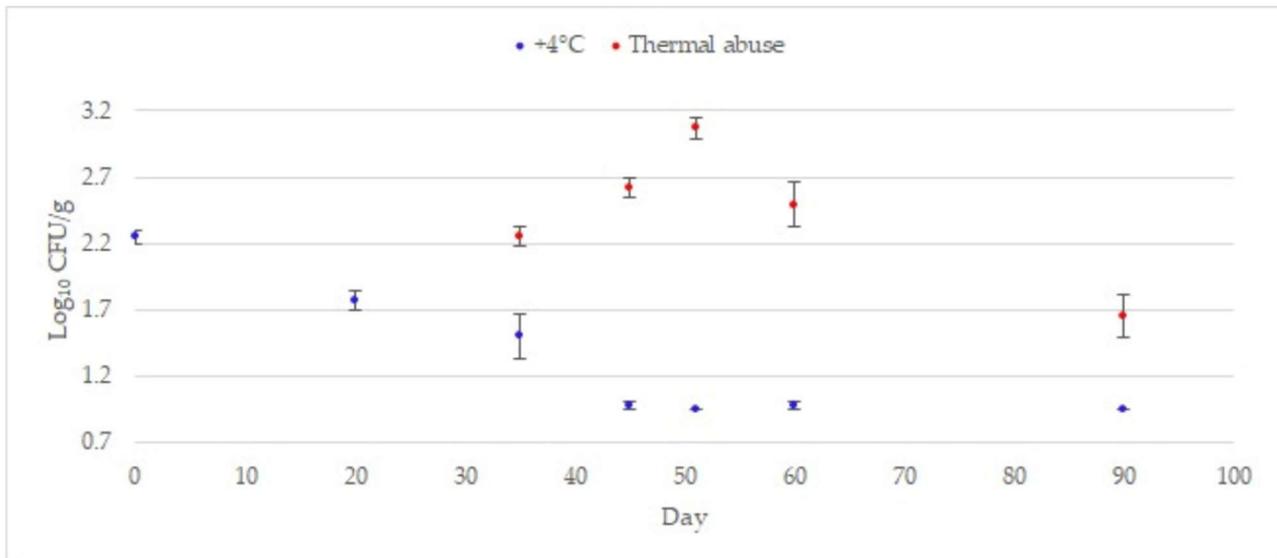
Questa diminuzione del potenziale redox può essere attribuita alla crescita di *Bacillus cereus*. *Bacillus cereus* è un batterio aerobio, ciò significa che ha bisogno di ossigeno per crescere. Durante la sua crescita, il batterio consuma ossigeno, portando ad una diminuzione del potenziale redox.

A T0, il TVC in tutti e tre i lotti era inferiore al limite di rilevabilità del metodo, ovvero inferiore a 10 UFC/g. A T6, il TVC era ancora inferiore a 10 UFC/g nei lotti 2 e 3 per i campioni posti a conservazione refrigerata. Questo risultato, come riportano gli autori, è probabilmente dovuto al fatto che la conservazione a una temperatura di refrigerazione costante ha limitato la crescita di *Bacillus cereus*. In particolare, è possibile che alcune cellule di *Bacillus cereus* siano morte a causa delle basse temperature di conservazione. È anche possibile che altre cellule abbiano sporulato, ovvero abbiano prodotto spore che sono state in grado di sopravvivere a condizioni ambientali sfavorevoli, come le basse temperature.

I campioni sottoposti a conservazione in abuso termico hanno mostrato un aumento modesto del numero di microrganismi, raggiungendo un valore di 2,88 Log<sub>10</sub> UFC/g nel lotto 2 e di 3,51 Log<sub>10</sub> UFC/g nel lotto 3.

Nel lotto 1, il TVC è aumentato moderatamente (3,20 Log<sub>10</sub> UFC/g) a T6 a +4°C. In condizioni di abuso termico, invece, TVC ha avuto un aumento molto più significativo (6,26 Log<sub>10</sub> UFC/g). Quest'aumento della carica microbica potrebbe essere correlato a due fattori: l'aumento del valore del pH nel lotto 1 e l'aumento della carica di *Bacillus cereus* nelle unità di prova.

La Figura 3.1 rappresenta l'andamento della concentrazione di *Bacillus cereus* nel lotto 1 nelle due condizioni di conservazione. Per ogni passaggio analitico, è stato calcolato il valore medio dei tre conteggi delle unità di prova.

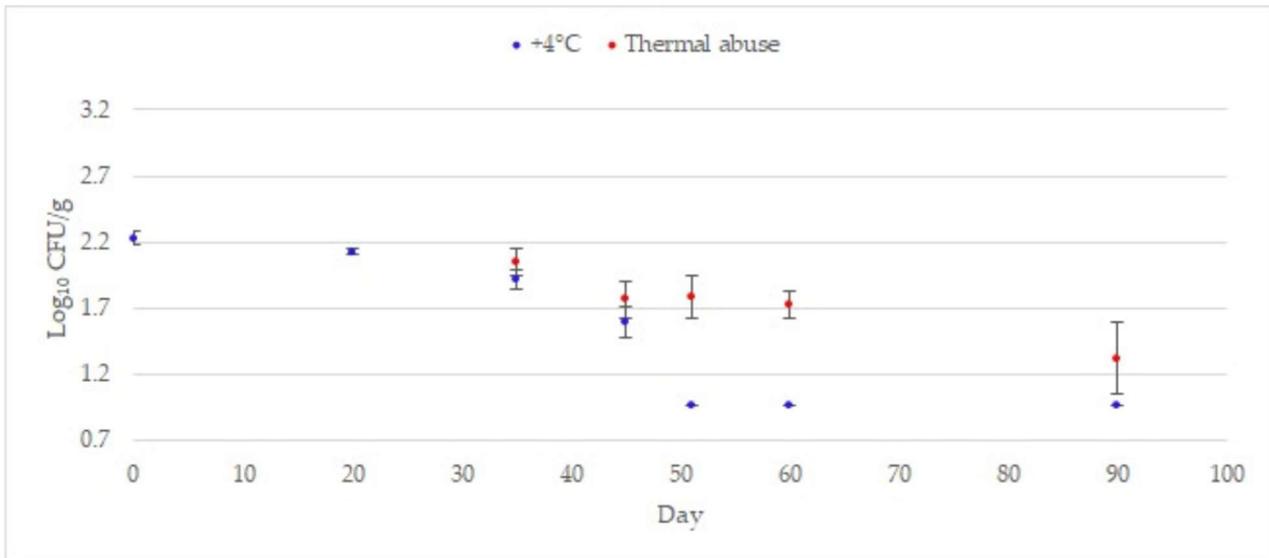


**Figura 3.1** Grafico che rappresenta i carichi di *Bacillus cereus* nel lotto numero 1 durante il periodo del challenge test. Per convenzione, per rappresentare i dati <1 Log<sub>10</sub> UFC/g è stato utilizzato 0,95 Log<sub>10</sub> UFC/g (Alberghini et al., 2023).

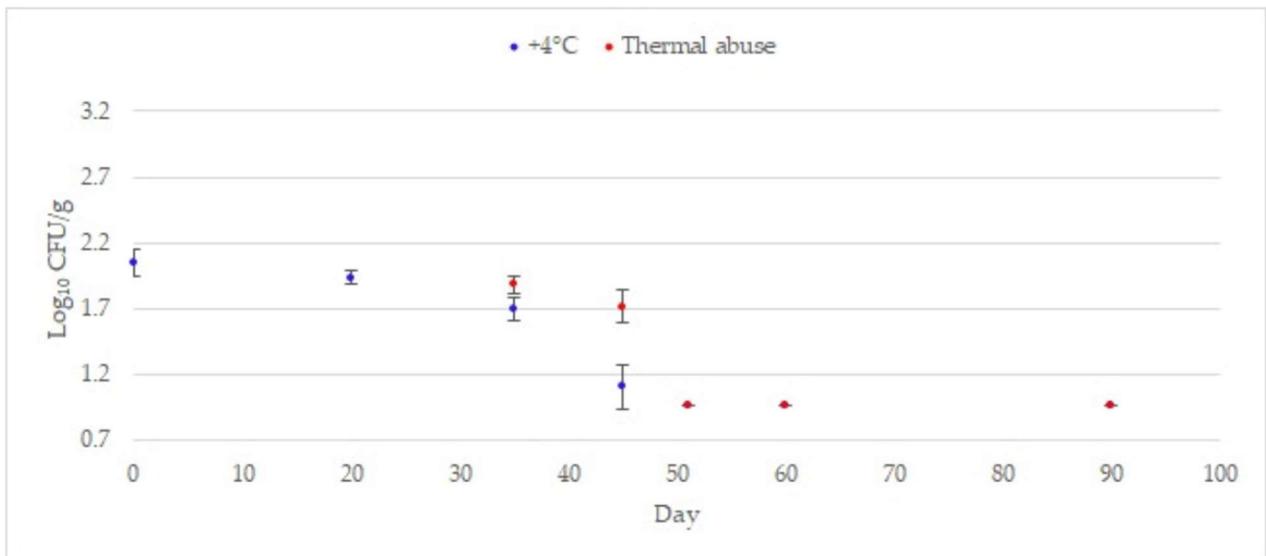
Notiamo che a 4 °C il batterio è diminuito progressivamente di numero fino a <1 Log<sub>10</sub> UFC/g. In abuso termico invece la carica è aumentata, il massimo del valore è stato riscontrato al giorno 51 (3,07 Log<sub>10</sub> UFC/g), probabilmente dovuto ad una moltiplicazione delle cellule vitali. Se il numero di spore aumenta comunque non c'è pericolo per la produzione di tossine perché sono inerti (Alberghini et al., 2023).

La Figura 3.2 e la Figura 3.3 mostra rispettivamente l'andamento della concentrazione di *Bacillus cereus* nei lotti 2 e 3 nelle due condizioni di conservazione.

I valori massimi raggiunti sono stati 2,05 Log<sub>10</sub> UFC/g per il lotto 2 e 1,88 Log<sub>10</sub> UFC/g nel lotto 3, riscontrati al tempo T2 (35° giorno).



**Figura 3.2** Grafico che rappresenta i carichi di *Bacillus cereus* nel lotto numero 2 durante il periodo del challenge test. Per convenzione, per rappresentare i dati <1 Log<sub>10</sub> UFC/g è stato utilizzato 0,95 Log<sub>10</sub> UFC/g (Alberghini et al., 2023).



**Figura 3.3** Grafico che rappresenta i carichi di *Bacillus cereus* nel lotto numero 3 durante il periodo del challenge test. Per convenzione, per rappresentare i dati <1 Log<sub>10</sub> UFC/g è stato utilizzato 0,95 Log<sub>10</sub> UFC/g (Alberghini et al., 2023).

Ora proseguiamo con il calcolo del potenziale di crescita di *Bacillus cereus* per ciascuno dei tre lotti, riportato in Tabella 3.2.

**Tabella 3.2** I potenziali di crescita ( $\Delta \text{Log}_{10}$ ) di *Bacillus cereus* calcolati per ciascun lotto di zuppa analizzato. I carichi si riferiscono alle unità di prova mantenute regolarmente a +4 °C nonché alle unità di prova sottoposte a prova di abuso termico a +8° e +10 °C (Alberghini et al., 2023).

<b>Lotto</b>	<b>Temperatura (°C)</b>	<b>Log<sub>10</sub> Max – Log<sub>10</sub> i</b>	<b><math>\Delta</math> (Log<sub>10</sub>)</b>
<b>Lotto 1</b>	+4	2,26 – 2,26	0
	+10	3,08 – 2,26	0,82
<b>Lotto 2</b>	+4	2,23 – 2,23	0
	+10	2,23 – 2,23	0
<b>Lotto 3</b>	+4	2,05 – 2,05	0
	+10	2,05 – 2,05	0

Come possiamo vedere nei lotti 2 e 3 *Bacillus cereus* non è riuscito a moltiplicarsi. Nel lotto 1, nelle unità di prova sottoposte alle condizioni di abuso termico è stato rilevato un potenziale di crescita di 0,82 Log<sub>10</sub> UFC/g. Secondo gli autori dello studio, i diversi potenziali di crescita registrati tra i tre lotti sono attribuibili a piccole differenze chimico-fisiche e microbiologiche che si verificano naturalmente tra un lotto e l'altro dello stesso prodotto.

Questo risultato ci porta ad affermare che il prodotto è sicuro per il consumo e in queste condizioni non c'è nessuna possibilità che il prodotto superi la carica dannosa di 10<sup>5</sup> UFC/g.

Come riportato da Alberghini et al. (2023) è possibile che i lotti con una maggiore potenzialità di crescita di *Bacillus cereus* contenessero una maggiore quantità di spore di altri batteri sporigeni. Queste spore, dopo il secondo trattamento termico, sono state indotte a germinare e hanno contribuito alla crescita di *Bacillus cereus*. Le variazioni del valore di pH rilevato nelle unità di prova conservate in condizioni di abuso termico sono probabilmente dovute al metabolismo residuo di TVC. Il metabolismo di questi batteri ha prodotto sostanze che hanno abbassato il valore di pH.

In conclusione, la strategia più efficace per garantire la sicurezza di una zuppa di verdura e farro pronta da riscaldare è quella di mantenere carichi molto bassi di forme vegetative e spore di *Bacillus cereus*, in questo modo non si raggiunge la dose infettiva necessaria a indurre intossicazione alimentare. Per ottenere questo risultato, è importante adottare misure igieniche rigorose in tutte le fasi della produzione, dalla preparazione degli ingredienti al confezionamento, soprattutto se non viene eseguito il secondo trattamento termico. Il mantenimento delle confezioni a basse

temperature per tutta la durata della loro vita commerciale rappresenta un'ulteriore strategia efficace per prevenire il rischio di intossicazioni alimentari da *Bacillus cereus*.

## 3.2 Challenge test per valutare il potenziale di crescita di *Listeria monocytogenes* in un formaggio greco a pasta molle

### 3.2.1 *Listeria monocytogenes*

*Listeria monocytogenes* è un batterio patogeno ubiquitario molto resistente, in grado di sopravvivere a una vasta gamma di condizioni, tra cui pH bassi, concentrazioni elevate di NaCl e basse temperature. Questo lo rende un potenziale contaminante di una vasta gamma di alimenti. L'infezione da *Listeria monocytogenes* causa la listeriosi che può manifestarsi in diverse forme, a seconda del gruppo di popolazione a cui appartiene il soggetto colpito.

Negli adulti sani, la listeriosi si presenta generalmente con sintomi lievi, simili a quelli dell'influenza, come febbre, mal di testa, dolori muscolari e nausea. In alcuni casi, l'infezione può però evolvere in una forma più grave, come meningite, setticemia o aborto spontaneo. Negli individui con un sistema immunitario compromesso, come le persone anziane, le donne in gravidanza, i bambini piccoli e le persone affette da malattie croniche, l'infezione da *Listeria monocytogenes* può essere molto grave, con un tasso di mortalità che può arrivare al 30%. Inoltre, il tempo di incubazione della listeriosi può arrivare fino a 70 giorni (Ryser et al., 2019).

Il controllo di *Listeria monocytogenes* negli alimenti è una sfida significativa per l'industria alimentare. Il batterio è ampiamente distribuito nell'ambiente e può entrare negli impianti di trasformazione alimentare attraverso una varietà di modi, tra cui: contaminazione delle materie prime; contaminazione delle attrezzature e delle superfici di lavorazione e contaminazione da parte del personale.

Una volta che *Listeria monocytogenes* è presente in un impianto di trasformazione alimentare, può sopravvivere e crescere a basse temperature, come quelle utilizzate per la conservazione degli alimenti. Inoltre, il batterio può formare biofilm, che lo rendono più difficile da rimuovere dalle superfici.

Soprattutto gli alimenti *ready to eat* (RTE) conservati a una temperatura di refrigerazione offrono un ambiente appropriato per la sua crescita. Il rischio aumenta se gli alimenti pronti sono conservati a temperature comprese tra 8 e 15 °C o se sono conservati in frigorifero per un lungo periodo di tempo. Gli alimenti di questa categoria includono latte non pastorizzato e latticini preparati con latte crudo, come formaggi a pasta molle non stagionati o stagionati in superficie, wurstel non riscaldati prima del consumo, carni di specialità gastronomiche e pesce affumicato, nonché alcuni frutti di mare e alcuni prodotti di carne, frutta fresca e verdura (Ryser et al., 2019).

Il regolamento (CE) n. 2073/2005 stabilisce criteri microbiologici specifici per la presenza di *Listeria monocytogenes* negli alimenti pronti. Questi criteri sono diversi a seconda della capacità del prodotto alimentare di supportare la crescita del batterio.

Per gli alimenti pronti destinati ai lattanti e a fini medici speciali, il criterio è il più rigoroso. *Listeria monocytogenes* non deve essere rilevata in 25 g di prodotto (n=10, c=0).

Per gli altri alimenti pronti, i criteri sono meno rigorosi. Se il prodotto alimentare non è in grado di supportare la crescita di *Listeria monocytogenes*, i livelli del batterio non devono superare il limite di 100 UFC/g per tutta la durata di conservazione del prodotto.

Se il prodotto alimentare è in grado di supportare la crescita di *Listeria monocytogenes* invece, il criterio è più rigoroso. Il batterio non deve essere rilevato in 25 g di prodotto al momento dell'uscita dall'impianto di produzione (n=5, c=0).

Tuttavia, se il produttore dimostra che il prodotto non supererà il limite di 100 UFC/g per tutta la sua durata di conservazione, anche se è un prodotto che risulta terreno favorevole alla crescita di *Listeria monocytogenes*, il livello dovrà essere < 100 UFC/g per tutta la durata di conservazione del prodotto.

Come riporta l'ultima versione del documento EURL Lm (2021), il valore del potenziale di crescita ci permette di classificare l'alimento nel modo seguente:

- quando  $\Delta$  è maggiore al limite di 0,5 Log<sub>10</sub> UFC/g, l'alimento è classificato come "Alimento pronto in grado di supportare la crescita di *Listeria monocytogenes*" (categoria 1.2 del regolamento (CE) n. 2073/2005),
- quando  $\Delta$  è inferiore o uguale al limite di 0,5 Log<sub>10</sub> UFC/g, l'alimento è classificato come "Alimento pronto al consumo incapace di sostenere la crescita di *Listeria monocytogenes*" (categoria 1.3 del regolamento (CE) n. 2073/2005).

Per classificare un alimento in base al suo potenziale di crescita di *Listeria monocytogenes*, è necessario effettuare un challenge test. Questo test consente di calcolare il valore di  $\Delta$ , che determina la categoria di appartenenza dell'alimento.

### 3.2.2 Il prodotto

Il prodotto considerato dallo studio di Vasileiadi et al. (2022) è un formaggio fresco a pasta molle della tradizione greca *Anthotyros*. L'alimento è confezionato sottovuoto e prodotto con latte di pecora e capra pastorizzato, senza aggiunta di conservanti.

I formaggi a pasta molle e semi molle sono particolarmente suscettibili alla contaminazione da *Listeria monocytogenes*, a causa del loro alto contenuto di umidità e del pH favorevole.

La pastorizzazione del latte inattiva la *Listeria monocytogenes* presente inizialmente nel latte crudo. Tuttavia, i formaggi pastorizzati possono ancora essere contaminati da *Listeria monocytogenes* a causa della contaminazione incrociata post-pastorizzazione. Molti, infatti, dei focolai di listeriosi segnalati sono stati collegati a latticini (Vasileiadi et al., 2022).

Negli impianti di lavorazione lattiero-casearia, le fonti della contaminazione sono il latte crudo e l'ambiente, in particolare, il batterio può essere presente nei pavimenti e negli scarichi, nelle aree all'interno e attorno ai refrigeratori o nei luoghi soggetti a contaminazione esterna (Ryser et al., 2019). Per garantire quindi la sicurezza dei prodotti e ridurre il rischio di contaminazione del batterio, è opportuno che l'OSA adotti misure preventive agendo soprattutto nell'igiene dell'intero stabilimento pulendo e disinfettando regolarmente le aree di lavorazione e le attrezzature, formando il personale sulle buone pratiche igieniche e identificando e rimuovendo le fonti di contaminazione post-pastorizzazione.

### 3.2.3 Scopo e progettazione del challenge test

Lo scopo del challenge test è valutare se il prodotto RTE Anthotyros è considerato terreno favorevole o non a *Listeria monocytogenes*, calcolando il potenziale di crescita e paragonarlo al valore limite di 0,5 Log<sub>10</sub> UFC/g. Il challenge test è stato condotto seguendo l'ultima versione del "Documento tecnico di orientamento EURL Lm sui test di sfida e sugli studi di durabilità per la valutazione della

durata di conservazione degli alimenti pronti correlati a *Listeria monocytogenes*" e la ISO 20976-1:2019 (Vasileiadi et al., 2022).

Il peso netto del prodotto era di 250 g e la durata di conservazione indicata nella confezione era di 25 giorni in condizioni di refrigerazione.

I punti di campionamento sono stati: giorno 0 (T0), 2° (T1), 7° (T2), 14° (T3), 23° giorno (T4). I campioni sono stati inoculati due giorni dopo la produzione.

Le condizioni di conservazione del challenge test sono state applicate valutando tutte le fasi della catena del freddo dalla produzione al consumo e sono state applicate le seguenti temperature: 5 °C per simulare le condizioni di stoccaggio a livello di produttore e trasporto da T0 a T2; 7 °C per simulare le condizioni di stoccaggio a livello di vendita al dettaglio da T2 a T3 e 10 °C per simulare le condizioni di conservazione a livello del consumatore da T3 a T4.

La variabilità inter-lotto è stata valutata studiando tre lotti prodotti in tre diversi giorni e costituiti da 22 campioni ciascuno (17 per il challenge test e 5 campioni di riserva).

Per l'inoculo è stata utilizzata una miscela di tre diversi ceppi: 09CEB411 LM e 17SEL82 LM isolati da formaggi e 17SEL22 LM isolato dal filtro ambiente del reparto di produzione del latte.

Sono state preparate due sottocolture per ognuno dei tre ceppi seguendo le indicazioni del documento EURL e successivamente sono state miscelate in modo da ottenere una sospensione uniforme con la stessa concentrazione di ciascun ceppo.

La sospensione è stata diluita in acqua fisiologica fino a raggiungere il livello di contaminazione desiderato di 150 UFC/g.

Per poter inoculare il formaggio con una concentrazione totale di tutti e tre i ceppi di circa 150 UFC/g, è stata necessaria una standardizzazione della preparazione dell'inoculo (Vasileiadi et al., 2022). Questa standardizzazione è stata effettuata con numerosi test preliminari, che hanno portato alla determinazione delle seguenti concentrazioni dell'inoculo per i tre lotti:

- Lotto 1:  $1,4 \times 10^4$  UFC/ml
- Lotto 2:  $1,7 \times 10^4$  UFC/ml
- Lotto 3:  $1,5 \times 10^4$  UFC/ml

La concentrazione dell'inoculo è stata determinata secondo la norma ISO 11290-2.

Le unità di prova allestite sono state sette per ciascun lotto. Ciascuna delle quali è stata inoculata utilizzando una siringa sterile in 10 punti diversi, con circa 0,2 ml di inoculo per punto. Questo significa che il volume totale dell'inoculo è stato di circa 2 ml, che è inferiore all'1% della massa di un'unità di formaggio. Per fare ciò le unità sono state disimballate, inoculate e rimbollate sottovuoto. Tre unità sono state analizzate per determinare la concentrazione di *Listeria monocytogenes* a T0, mentre una unità è stata analizzata rispettivamente a T1, T2, T3, T4.

Sono poi state preparate cinque unità di controllo per ogni lotto, quattro delle quali sono state iniettate con NaCl allo 0,9% in volume uguale a quello dell'inoculo ma prive del batterio. Queste unità sono state utilizzate per valutare eventuali influenze dovute a un cambiamento nella composizione effettiva dell'alimento. In queste unità sono stati determinati a T0 i valori di pH,  $a_w$ , %NaCl, % di grasso e la flora microbica di fondo, mentre a T4 sono stati determinati i valori di pH,  $a_w$ , %NaCl e la flora microbica di fondo. Per valutare la flora microbica di fondo sono stati testati due criteri microbiologici: la conta aerobica mesofila e i battei lattici.

Un'altra unità di controllo è stata utilizzata per misurare le temperature di stoccaggio delle unità di prova. Questa unità di controllo era costituita da un registratore di dati termici che è stato posizionato nello stesso incubatore delle unità di prova. Il registratore di dati termici ha registrato i valori di temperatura durante tutto il test.

Infine, sono stati analizzati cinque campioni di controllo alimentare, che non erano stati sottoposti ad alcuna preparazione, risultati utili a verificare la rappresentatività della produzione. Questi campioni sono stati analizzati a T0 per pH,  $a_w$ , %NaCl, % di grasso e presenza di *Listeria monocytogenes*.

### 3.2.4 Discussione dei risultati

Nei campioni di controllo alimentare è stata confermata l'assenza del patogeno nei cinque campioni a T0 in ciascuno dei tre lotti. Le caratteristiche fisico-chimiche sono state mantenute più o meno stabili nei tre diversi lotti.

Per quanto riguarda l'analisi delle caratteristiche fisico chimiche delle unità di controllo si è potuto riscontrare che:

- Il pH al T0 è stato rilevato su valori intorno a 6,5 e si è osservata una diminuzione significativa per tutti i lotti, data dall'acidificazione naturale dovuta alla crescita della flora microbica di fondo del prodotto. Il valore a T4 è risultato ancora favorevole alla crescita di *Listeria monocytogenes* e quindi non è stato in grado di bloccarne la crescita.
- $a_w$  ha avuto valori tra 0,95 e 0,96 e si sono mantenuti costanti per l'intero test. Il valore è quindi favorevole alla moltiplicazione del batterio.
- I valori di NaCl sono variati tra i tre lotti, in due lotti è aumentato mentre nel lotto 2 è diminuito.

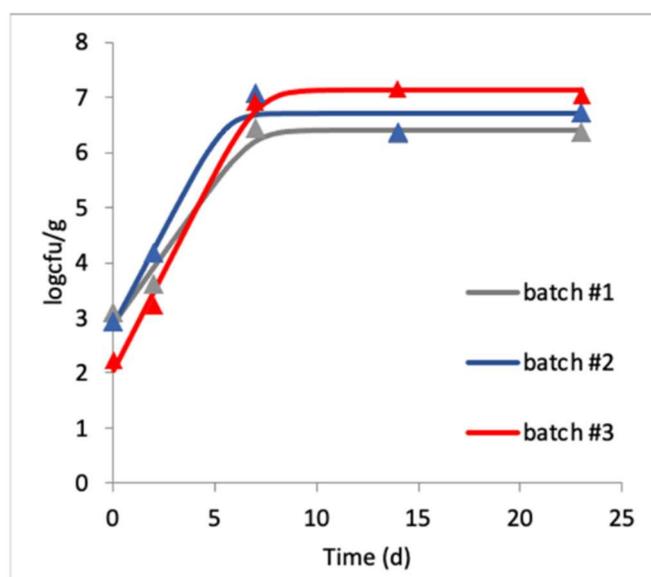
Per quanto riguarda invece l'analisi microbiologica, nelle unità di controllo il valore della flora microbica di fondo, per entrambi i criteri microbiologici, è aumentato da T0 a T4 per tutti e i tre lotti, con un aumento di concentrazione medio di circa 45%.

In Tabella 3.3 sono riportati i valori di *Listeria monocytogenes* delle unità di prova nei 3 lotti in ciascuno dei punti di campionamento. A T0 il valore corrisponde alla media dei valori delle 3 unità di prova considerate per ciascun lotto.

**Tabella 3.3** Concentrazione di *Listeria monocytogenes* ( $\text{Log}_{10}$  UFC/g) nei 3 lotti contaminati durante la conservazione a 5 °C, 7 °C e 10 °C nel periodo studiato (Vasileiadi et al., 2022).

<i>Listeria monocytogenes</i> ( $\text{Log}_{10}$ UFC/g)			
Giorno (Temperatura di stoccaggio)	Lotto 1	Lotto 2	Lotto 3
0	3,10	2,93	2,23
2 (5 °C)	3,62	4,18	3,21
7 (7 °C)	6,43	7,07	6,92
14 (7 °C)	6,35	6,36	7,17
23 (10 °C)	6,36	6,71	7,04

In Figura 3.4 viene riportato il grafico che rappresenta l'andamento di *Listeria monocytogenes* nei diversi lotti nell'intero periodo di conservazione del challenge test. La crescita microbica è stata modellata utilizzando il modello di crescita di Baranyi. Sono stati stimati i parametri cinetici della crescita microbica: il tasso di crescita variava da 0,517 a 0,722 d<sup>-1</sup>, non è stata osservata alcuna fase di latenza in nessuno dei lotti testati e la popolazione massima N max era compresa tra 6,4 e 7,1 Log UFC/g alla fine del periodo di conservazione.



**Figura 3.4** Concentrazione di *Listeria monocytogenes* (Log<sub>10</sub> UFC/g) nei 3 lotti contaminati durante la conservazione a 5 °C, 7 °C e 10 °C nel periodo studiato. I punti indicano i valori sperimentali e le linee corrispondono alle previsioni del modello Baranyi, R<sup>2</sup> = 0,956–0,987 (Vasileiadi et al., 2022).

Nella Tabella 3.4 viene riportato il calcolo del potenziale di crescita di *Listeria monocytogenes* per ciascun lotto.

**Tabella 3.4** Determinazione del potenziale di crescita di *Listeria monocytogenes* nei tre lotti.

Lotto	Log <sub>10</sub> Max – Log <sub>10</sub> i (Log <sub>10</sub> UFC/g)	Δ (Log <sub>10</sub> UFC/g)
Lotto 1	6,43 – 3,10	3,33
Lotto 2	7,07 – 2,93	4,14
Lotto 3	7,17 – 2,23	4,94

Il potenziale di crescita risultante dal challenge test è stato di 4,94 Log<sub>10</sub> UFC/g, che supera il criterio di 0,5 Log<sub>10</sub> UFC/g. Questo ci fa concludere che Anthotyros è un alimento pronto in grado di supportare la crescita di *Listeria monocytogenes* ed è classificato nella categoria alimentare 1.2 del regolamento (CE) n. 2073/2005. Quindi l'OSA deve rispettare il criterio per cui il batterio non deve essere rilevato in 25 g al momento dell'uscita dell'impianto di produzione.

Il challenge test non ha dimostrato che i valori di pH e di  $a_w$  del formaggio fossero sufficienti a scoraggiare la crescita di *Listeria monocytogenes*. Inoltre, la flora microbica di fondo del formaggio non è stata in grado di inibirne la crescita, né attraverso l'abbassamento del pH dovuto all'attività dei batteri lattici, né attraverso l'aumento della concentrazione, che avrebbero potuto controllare la proliferazione di *Listeria monocytogenes* attraverso la loro attività antagonista.

### 3.3 Challenge test per valutare il potenziale di crescita di *Listeria monocytogenes* in salsicce affumicate a freddo

#### 3.3.1 Il prodotto

Le salsicce affumicate a freddo fanno parte dei prodotti alimentari pronti al consumo che richiedono un'attenzione particolare per la sicurezza in quanto possono essere contaminati da *Listeria monocytogenes*, batterio patogeno descritto precedentemente.

Nello studio di Sauka et al. (2020) vengono considerate due tipologie di salsicce: *Barona* e *Cigarellas*, la prima ha subito fermentazione spontanea mentre la seconda conteneva una coltura starter.

Il processo di produzione delle due salsicce è stato il seguente: affettatura e macinazione della carne (manzo e maiale), aggiunta di additivi e insacco in budello di collagene. L'affumicatura è stata effettuata ad una temperatura compresa tra 20 e 22 °C per cinque giorni. Inizialmente l'umidità è stata impostata al 90%, ma è stata gradualmente ridotta nel corso del tempo. Questo processo consente al fumo di penetrare uniformemente nelle salsicce e di conferire loro un aroma caratteristico. Al termine dell'affumicatura, le salsicce sono state trasferite in una camera climatica, in cui la temperatura è stata mantenuta tra 16 e 18 °C e l'umidità relativa al 76%. Le salsicce hanno subito una stagionatura di 3-4 settimane, durante le quali il loro pH ha raggiunto il livello desiderato per ciascun tipo di salsiccia (Sauka et al., 2020).

La durata di conservazione indicata era di 30 giorni a temperatura compresa tra 2 e 4 °C.

### 3.3.2 Progettazione del challenge test e discussione dei risultati

Lo scopo dello studio di Sauka et al. (2020) è stato determinare il potenziale di crescita di *Listeria monocytogenes* nei due tipi di salsicce per poterle classificare in una delle due categorie presenti nel Reg. (CE) n. 2073/2005. Il challenge test è stato realizzato in accordo con la norma ISO 20976-1:2019.

Prima della lavorazione, il pH di Barona è stato di 5,7, mentre dopo la lavorazione è stato pari a 4,9. Cigarellas, invece, ha presentato un pH iniziale di 5,9, che è sceso a 5,4 dopo la lavorazione.

Per il challenge test sono stati presi in considerazione tre lotti di produzione e sono state testate unità da 60 grammi. La temperatura di conservazione per l'intero challenge test è stata compresa tra i 2 e i 6 °C.

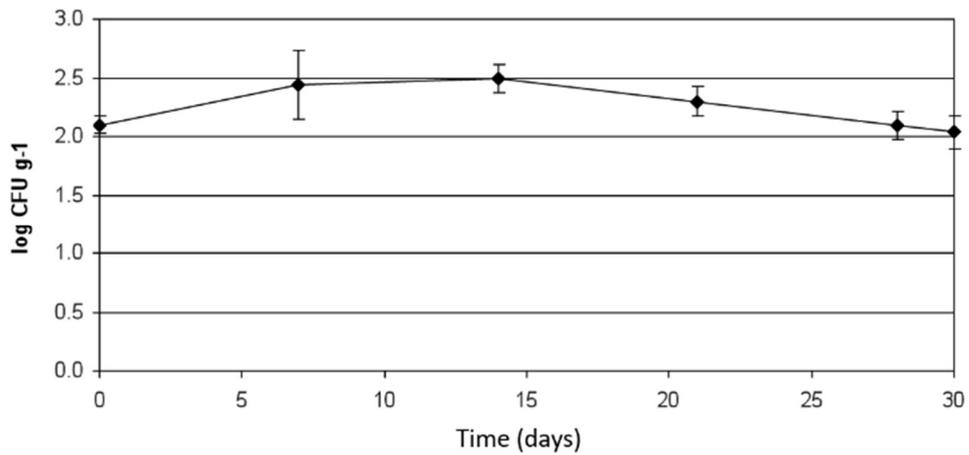
Per l'inoculo è stato utilizzato il ceppo di riferimento ATCC19112. La contaminazione è stata superficiale ed è stata realizzata immergendo il prodotto per 30 min a 20 °C in una sospensione di *Listeria monocytogenes* la cui concentrazione era pari a 100 UFC/ml in soluzione salina fisiologica.

L'analisi delle unità di prova è stata condotta periodicamente a partire dal giorno dell'inoculazione, per un totale di sei punti di campionamento.

*Listeria monocytogenes* è stata quantificata secondo lo standard ISO 11290-2.

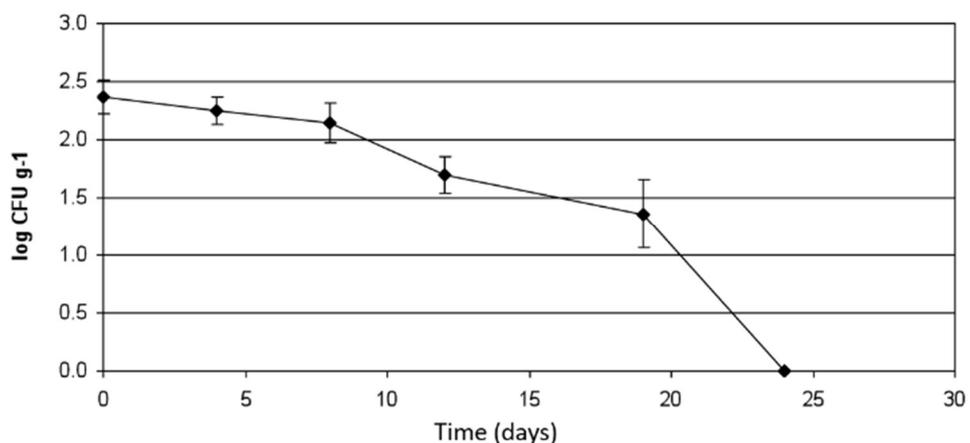
Prima dell'inoculazione, non è stata rilevata *Listeria monocytogenes* in nessuna delle salsicce.

Nelle salsicce Barona è stata osservata una crescita significativa di *Listeria monocytogenes* raggiungendo il valore massimo il giorno 14 pari a 2,6 Log<sub>10</sub> UFC/g (Figura 3.5). Alla fine del test la concentrazione è diminuita raggiungendo un valore molto simile a quello iniziale. Il potenziale di crescita è stato pari a 0,4, valore inferiore a 0,5 Log UFC/g. Questa tipologia conteneva l'additivo alimentare D-glucono-1,5-lattone, che ha conferito ai prodotti un sapore acido ed è diventato un agente che ha ridotto il pH dopo la trasformazione in acido gluconico. La presenza di nitrito e D-glucono-1,5-lattone insieme allo 0,42% di destrosio può spiegare il potenziale di crescita insignificante (0,4) di *Listeria monocytogenes* e l'inizio del declino del numero di *Listeria monocytogenes* dopo due settimane.



**Figura 3.5** Variazioni della concentrazione di *Listeria monocytogenes* nelle salsicce “Barona” (Log UFC/g) entro 30 giorni dalla conservazione a 2-6 °C. I dati sono medie con errori standard (Sauka et al., 2020).

Nelle salsicce Cigarellas, la concentrazione di *Listeria monocytogenes* ha iniziato a diminuire dopo l'ottavo giorno, raggiungendo un valore inferiore al limite di rilevabilità del metodo pari a 10 UFC/g (Figura 3.6). Il potenziale di crescita è stato pari a zero in quanto in questa tipologia di salsicce, è stato aggiunto uno starter con proprietà protettive contro la *Listeria monocytogenes*, che ha portato all'acidificazione e alla produzione di batteriocine.



**Figura 3.6** Cambiamenti nella concentrazione di *Listeria monocytogenes* nelle salsicce “Cigarellas” (Log UFC/g) entro 24 giorni dalla conservazione a 2-6 °C. I dati sono medie con errori standard (Sauka et al., 2020).

In conclusione, possiamo affermare che entrambi i prodotti testati non sono stati in grado di supportare la crescita di *Listeria monocytogenes* e possono essere classificati nella categoria 1.3 del Regolamento (CE) n. 2073/2005.

Nonostante nella tipologia Barona *Listeria monocytogenes* ha dimostrato un trascurabile potenziale di crescita Sauka et al. (2020) suggeriscono di adottare ulteriori misure per ottenere una tolleranza zero del batterio nei prodotti pronti a base di carne. Tra queste misure, si potrebbe considerare un'estensione del periodo di fermentazione o considerare un trattamento termico o l'aggiunta di altri additivi antimicrobici. Tuttavia, è importante valutare attentamente l'impatto di tali misure sulla qualità organolettica del prodotto, che potrebbe risultare alterata.

### 3.4 Challenge test per valutare l'efficacia degli acidi lattici e acetici sulla crescita di *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus* nel formaggio fresco primo sale

*Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus* sono batteri patogeni che possono contaminare i prodotti lattiero caseari. Una strategia efficace potrebbe essere l'applicazione di composti antimicrobici come gli acidi organici.

La crescita microbica, infatti, può essere ridotta in presenza di acidi organici non dissociati per due motivi principali (Tirloni et al., 2021):

- Riduzione del pH intracellulare: gli acidi organici non dissociati possono attraversare la membrana cellulare batterica. Una volta all'interno della cellula, si dissociano, liberando ioni idrogeno (H<sup>+</sup>) che abbassano il pH intracellulare. La maggior parte dei microrganismi ha un pH intracellulare ottimale di circa 7,0. Un pH intracellulare più basso può danneggiare le proteine, gli acidi nucleici e altri componenti cellulari, impedendo la crescita e la sopravvivenza dei microrganismi.
- Pompa protonica: per ristabilire il pH intracellulare, la cellula batterica deve pompare fuori gli ioni H<sup>+</sup>. Questo processo richiede energia, che può essere utilizzata per altri processi metabolici. In presenza di concentrazioni elevate di acidi organici, la cellula può non essere in grado di pompare fuori abbastanza ioni H<sup>+</sup> per mantenere un pH intracellulare ottimale.

Lo scopo dello studio condotto da Tirloni et al. (2021) è stato determinare le concentrazioni di acido lattico e acetico necessarie per inibire la crescita di *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus* in brodo, per una possibile applicazione alla produzione del formaggio. Ulteriormente sono stati condotti due challenge test inoculando separatamente i due batteri sulla superficie di un formaggio fresco primo sale per valutare la capacità dei due acidi organici di inibirne la crescita.

### 3.4.1 Determinazione della concentrazione minima inibente

Per prima cosa, i ricercatori hanno preparato colture di *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus* in brodo BHI a pH 7,2, utilizzando rispettivamente un ceppo di *Listeria monocytogenes* isolato da un latticino fresco (MS12209) e un ceppo di riferimento di *Bacillus cereus* (ATCC14579). Successivamente, sono state raccolte le cellule batteriche alla fine della fase di crescita esponenziale e sono state diluite a una concentrazione di  $10^4$  UFC/ml.

Successivamente sono state inoculate le cellule batteriche in provette da 10 ml contenenti BHI addizionato con diverse concentrazioni di acido lattico o acido acetico, raggiungendo una concentrazione batterica finale di circa 100 UFC/ml. È stata preparata anche una serie di controlli (BHI senza l'aggiunta di acido).

Le concentrazioni di acido testate erano 2,78 mM, 5,55 mM, 11,10 mM, 22,20 mM e 44,40 mM per l'acido lattico e 1,25 mM, 2,50 mM, 5,00 mM, 12,49 mM e 24,98 mM per l'acido acetico.

Infine, i ricercatori hanno misurato la densità ottica delle colture batteriche a T0 e a 24, 48, 72 e 96 ore. Le provette sono state poi incubate a 37°C in duplicato. I risultati sono stati i seguenti:

- A 37 °C, il BHI con una concentrazione di acido acetico di 24,98 mM non supportava la crescita di *Listeria monocytogenes* o *Bacillus cereus* entro 7 giorni.
- Lo stesso effetto è stato ottenuto con BHI con una concentrazione di 44,40 mM di acido lattico.
- Il BHI con una concentrazione di 22,20 mM di acido lattico non ha supportato la crescita di *Bacillus cereus*.

### 3.4.2 Progettazione del challenge test

Tirioni et al. (2021) hanno condotto un challenge test sul formaggio primo sale, un formaggio fresco prodotto con latte vaccino che presenta una fase di maturazione precoce. Lo scopo del test era determinare se le concentrazioni minime inibenti (MIC) dell'acido acetico e dell'acido lattico non dissociato, determinate precedentemente, fossero efficaci quando applicate alla matrice del formaggio.

Per standardizzare il peso del formaggio, sono state ottenute delle fettine da ciascuna delle porzioni utilizzate. Il peso di ciascuna fettina era di 8 grammi.

I campioni sono stati acquistati il giorno successivo alla produzione e appartenevano ad un unico lotto.

Per i due inoculi sono stati utilizzati rispettivamente il ceppo MS12209 di *Listeria monocytogenes* e il ceppo di *Bacillus cereus* ATCC14579. Come già descritto, i ceppi sono stati trasferiti nel BHI e successivamente, per adattare le cellule alle condizioni del challenge test, le colture sono state inoculate nuovamente in brodo BHI e incubate a temperature diverse a seconda del test (4 e 8 °C per *Listeria monocytogenes*, 15 °C per *Bacillus cereus*).

Nella fase di crescita esponenziale, le colture sono state raccolte e le concentrazioni cellulari sono state determinate mediante microscopia.

I due inoculi sono stati diluiti e aliquote di 20 microlitri sono state distribuite sulla superficie del formaggio. In questo modo, la concentrazione iniziale dei batteri sul formaggio è stata di circa 2 Log UFC/ g, volume che non ha modificato le caratteristiche del prodotto.

Dopo aver inoculato i campioni, sono stati conservati per 30 minuti al fine di consentire ai batteri di aderire alla superficie del formaggio. Successivamente, sono stati divisi in cinque serie per ciascun microrganismo, ognuna delle quali è stata immersa in una soluzione diversa di acidi organici.

Per *Listeria monocytogenes*: acido acetico, AC1: 49,96 mM; AC2: 24,98 mM; acido lattico, AL1: 88,80 mM; AL2: 44,40 mM; CTRL: acqua distillata sterile.

Per *Bacillus cereus*: acido acetico, AC1: 49,96 mM; AC2: 24,98 mM; acido lattico, AL2: 44,40 mM; AL3: 22,20 mM; CTRL: acqua distillata sterile.

In aggiunta ai campioni inoculati, sono state preparate anche serie di campioni bianchi, ovvero campioni non contaminati da microrganismi, per la determinazione del pH ad ogni punto di campionamento. Per la preparazione di questi campioni sono state utilizzate le stesse concentrazioni di acido organico utilizzate per la preparazione dei campioni inoculati.

I campioni sono stati successivamente incubati alle temperature di 4 e 8 °C per *Listeria monocytogenes* e 15 °C per *Bacillus cereus*. Durante il challenge test effettuato a 4 °C, i campioni sono stati analizzati a T0 e dopo 2, 5, 8 e 10 giorni dall'inoculazione. A 8 °C, i prelievi sono stati effettuati a T0 e dopo 1, 2, 3, 5, 6 e 8 giorni dall'inoculazione. A 15 °C, i campioni sono stati analizzati a T0 e dopo 1, 2, 3 e 4 giorni dall'inoculazione.

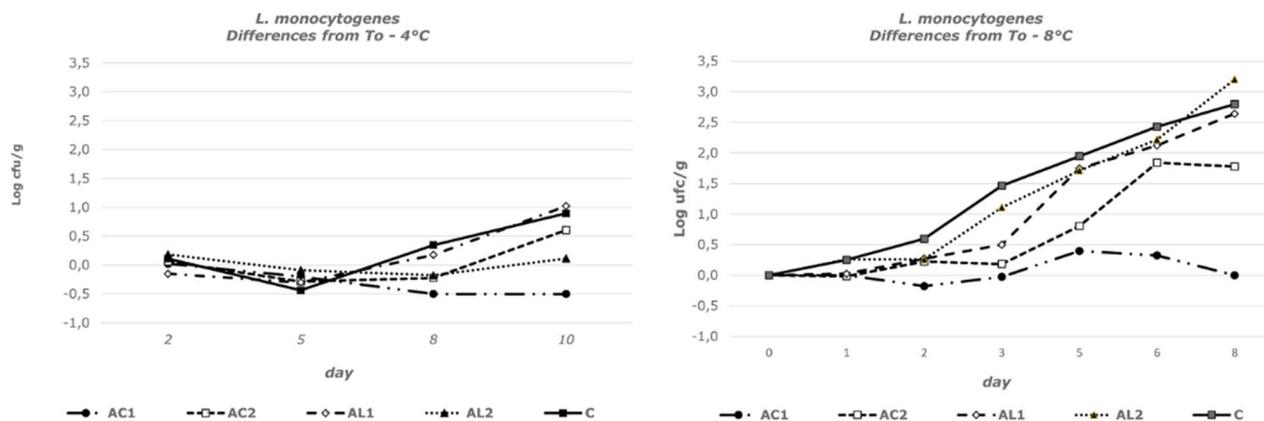
A ogni punto di campionamento, le analisi sono state ripetute due volte, sia per l'enumerazione di *Listeria monocytogenes* che per l'enumerazione di *Bacillus cereus* tramite piastratura. Le spore di *Bacillus cereus* sono state enumerate tramite piastratura dopo applicazione di un trattamento di pastorizzazione alla diluizione.

Per discriminare la crescita o l'assenza di crescita nel prodotto è stato utilizzato il valore di 0,5 Log UFC/g.

### 3.4.3 I risultati del challenge test per *Listeria monocytogenes*

I risultati a 4°C hanno mostrato che:

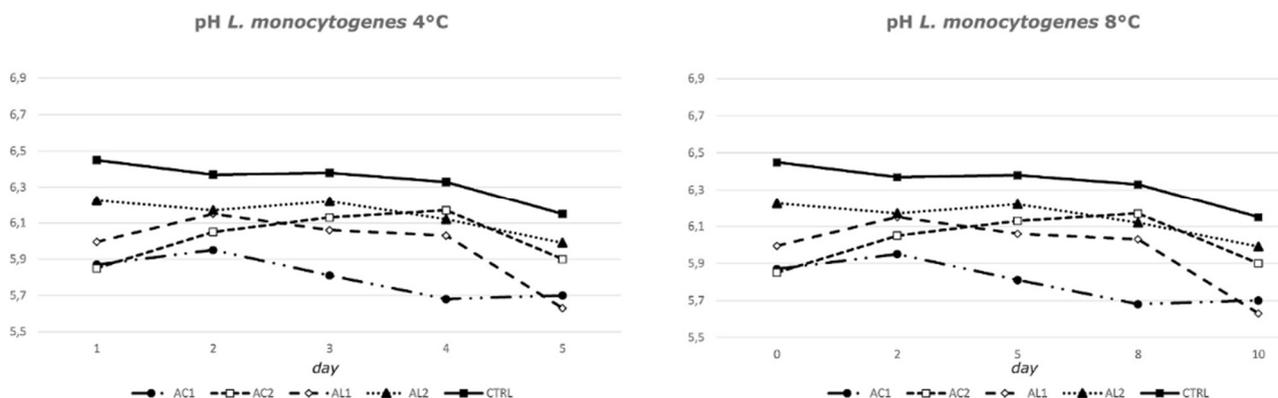
- C'è stata una leggera riduzione della crescita di *Listeria monocytogenes* in tutti i campioni trattati, rispetto ai campioni di controllo. Tuttavia, solo i campioni immersi in acido acetico AC1 (49,96 mM) hanno mostrato una riduzione significativa della conta batterica (Figura 3.7a).
- L'immersione del formaggio in acidi organici ha provocato una riduzione del pH superficiale (Figura 3.8a). L'effetto di acidificazione è stato più forte per l'acido acetico che per l'acido lattico. Inoltre, l'effetto è stato dose-dipendente, ovvero è aumentato con l'aumentare della concentrazione dell'acido.



**Figura 3.7** Conteggi di *Listeria monocytogenes* ottenuti nel formaggio primo sale durante il challenge test eseguito: a) a 4 °C e b) a 8 °C. Immersione: AC1: acido acetico, 49,96 mM; AC2: acido acetico, 24,98 mM; AL1: acido lattico, 88,80 mM; AL2: acido lattico, 44,40 mM; CTRL: acqua distillata (Tirloni et al., 2021).

A 8°C, invece, i risultati hanno mostrato che:

- C'è stata una crescita significativamente inferiore di *Listeria monocytogenes* nei campioni immersi in acido acetico AC1 (49,96 mM), rispetto a tutti gli altri campioni trattati (Figura 3.8a). Infatti, questi campioni non hanno mostrato alcuna crescita evidente fino all'ottavo giorno.
- La misurazione del pH dei campioni ha confermato che tutti i trattamenti di immersione hanno avuto un effetto acidificante, con una differenza significativa tra i campioni controllo e tutte le altre serie (Figura 3.8b). In altre parole, tutti i campioni trattati con una soluzione acida hanno avuto un pH più basso rispetto ai campioni non trattati.



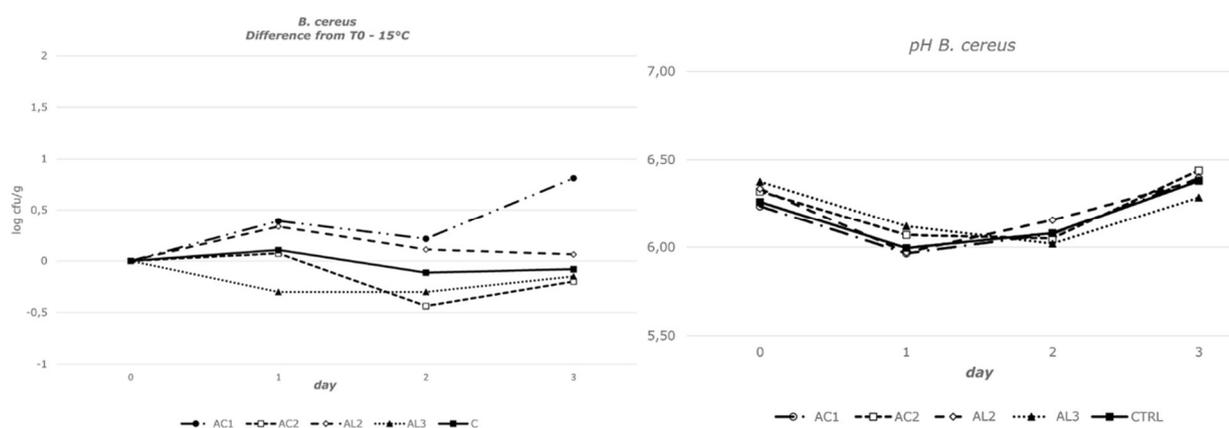
**Figura 3.8** Valori di pH misurati nel formaggio primo sale durante il challenge test effettuato: a) a 4 °C e b) a 8 °C (Tirloni et al., 2021).

L'acido acetico ha avuto una maggiore attività battericida rispetto all'acido lattico, grazie al suo valore pKa più elevato. Ciò significa che una maggiore quantità di acido acetico rimane in forma non dissociata a pH più elevati. La forma non dissociata degli acidi organici è quella che ha un'attività antimicrobica maggiore. Tuttavia, l'efficacia relativa degli acidi organici specifici può essere influenzata da diversi fattori, tra cui il pH del substrato alimentare e la matrice alimentare (Tirloni et al., 2021). In questo studio, la concentrazione della forma non dissociata era evidentemente più alta per l'acido acetico, giustificando così l'effetto osservato.

### 3.4.4 I risultati del challenge test per *Bacillus cereus*

I risultati hanno mostrato che in nessuna delle serie è stata rilevata alcuna crescita significativa del batterio (Figura 3.9).

Tirloni et al. (2021), suggeriscono che questa inibizione potrebbe essere stata dovuta a una combinazione di fattori ambientali, tra cui la temperatura e il pH. La temperatura di 15 °C è infatti vicina al limite inferiore di crescita per la maggior parte dei ceppi di *Bacillus cereus*, mentre i valori di pH erano variabili ma sempre permissivi, da 6,4 (all'inizio della prova) a 6,2/6,3 (alla fine della prova). Tuttavia, non è possibile escludere che altri fattori, come l'umidità superficiale o la presenza di microflora naturale, abbiano contribuito a questa inibizione.



**Figura 3.9** Conteggi di *Bacillus cereus* e valori di pH ottenuti nel formaggio primo sale durante il challenge test eseguito a 15 °C. Immersione: AC1: acido acetico, 49,96 mM; AC2: acido acetico, 24,98 mM; AL2: acido lattico, 44,40 mM; AL3: acido lattico, 22,20 mM; CTRL: acqua distillata (Tirloni et al, 2021).

### 3.4.5 Conclusioni

I formaggi primo sale sono prodotti lattiero-caseari freschi, con un pH relativamente neutro e una superficie ricca di acqua e nutrienti. Questi fattori rendono la superficie di questi formaggi un ambiente favorevole alla crescita di microrganismi. Le contaminazioni durante la produzione sono difficili da evitare, quindi è importante trovare modi per prolungare la durata di conservazione di questi formaggi.

Un metodo possibile è l'aggiunta di conservanti. In questo studio di Tirloni et al. (2021), è stato valutato l'effetto dell'immersione degli acidi organici come trattamento superficiale del formaggio primo sale. L'acido acetico ha mostrato effetti promettenti, in particolare contro il batterio *Listeria monocytogenes*.

Tuttavia, l'aggiunta di conservanti può avere un impatto sulle caratteristiche sensoriali del formaggio. L'acidità dell'acido acetico, ad esempio, può rendere il formaggio più aspro. Pertanto, è importante trovare un equilibrio tra l'efficacia dell'inibizione della crescita e l'accettabilità sensoriale del prodotto.

Ulteriori studi sono necessari per valutare l'efficacia di altri acidi/sali organici come conservanti superficiali per i formaggi primo sale. In particolare, si potrebbero studiare miscele di diversi acidi/sali organici, con l'obiettivo di identificare la combinazione più efficace.

### 3.5 Challenge test per studiare la dinamica di *Salmonella enterica* Typhimurium e *Listeria monocytogenes* in larve di *Hermetia illucens* allevate con due diete artificiali

L'entomofagia, il consumo di insetti commestibili, è una pratica alimentare diffusa in molte parti del mondo. Negli ultimi anni, l'interesse per l'entomofagia è aumentato anche nei paesi occidentali, dove gli insetti vengono sempre più considerati come un'alternativa sostenibile alle fonti tradizionali di proteine e altri nutrienti.

Gli insetti hanno un alto contenuto di proteine, aminoacidi essenziali, minerali e vitamine. Il loro stadio larvale finale, la prepupa, ha un contenuto particolarmente elevato di proteine e grassi (Grisendi et al., 2022).

L'allevamento di insetti è un'attività che richiede meno energia e risorse rispetto all'agricoltura tradizionale. Gli insetti sono in grado di riprodursi rapidamente e di convertire il cibo in massa corporea in modo molto efficiente. Tuttavia, l'uso di insetti come alimento o mangime solleva alcune preoccupazioni in termini di sicurezza microbiologica e prima di poter considerare gli insetti come un alimento sicuro per il consumo umano, è necessario effettuare ulteriori studi sulla loro qualità microbiologica.

Gli insetti d'allevamento devono essere nutriti con substrati sicuri, tuttavia tali substrati possono essere contaminati da agenti patogeni. Inoltre, è importante tener conto delle proprietà intrinseche del pH e di  $a_w$  nella dieta degli insetti, che possono influenzare la crescita e la sopravvivenza dei microrganismi patogeni (Grisendi et al., 2022).

Lo studio condotto da Grisendi et al. (2022) ha valutato il livello di contaminazione delle larve di *Hermetia illucens* coltivate su due substrati altamente contaminati da *Salmonella enterica* sierotipo *Typhimurium* e *Listeria monocytogenes*. *Hermetia illucens*, un insetto dittero più comunemente conosciuto con il nome di "black soldier fly" può nutrirsi di una vasta gamma di substrati organici, questa caratteristica la rende una possibile risorsa per la gestione dei rifiuti e per sostenere un mercato basato sull'economia circolare. Le sue larve possono essere considerate un'importante fonte di proteine per alimenti e mangimi, quindi, è importante valutarne la sicurezza.

In questo studio, che discuteremo e analizzeremo in seguito, sono stati condotti due challenge test indipendenti ed è stata studiata l'evoluzione del carico patogeno nelle larve e nel substrato, in conformità alla norma ISO 20976-2.

### 3.5.1 Progettazione del challenge test

In questo studio, i ricercatori hanno esaminato l'efficienza di crescita di due diete diverse per le larve di *Hermetia illucens*: la dieta "Gainesville" (G) (composta da crusca di frumento, farina di erba medica e farina di mais) e una dieta artificiale fatta in casa (D) (composta da agar, farina di lenticchie, crusca di frumento, farina di mais, germe di grano e acqua).

Le larve sono state allevate in condizioni controllate e sono state alimentate con i due substrati per tre cicli di vita. Per ciascun substrato, sono stati raccolti dati da ciascuna generazione di larve per confrontare l'efficienza di crescita delle due diete.

Per ogni challenge test, otto scatole contenenti 100 g di substrato per ciascuna dieta sono state incubate a 25 °C con un'umidità relativa del  $70 \pm 5\%$  in condizioni di oscurità. Tre scatole sono state utilizzate come campioni di controllo e, pertanto, sul substrato non sono state posizionate uova di *Hermetia illucens*. Le larve sono state collocate nelle restanti cinque scatole.

Prima dell'aggiunta delle larve, ciascuna dieta è stata contaminata artificialmente con 2 ml di un inoculo contenente tre ceppi di *Salmonella enterica* sierotipo *Typhimurium* (un ceppo ATCC e due ceppi dello stesso sierotipo isolati da carne di maiale) e tre ceppi di *Listeria monocytogenes* (un ceppo ATCC e due ceppi isolati da carne suina).

Tutti i ceppi sono stati prima coltivati in brodo nutriente per almeno 12 ore a 37 °C e per adattare il ceppo alle condizioni del challenge test, il brodo è stato mantenuto a 25 °C per 3 giorni. A questo punto, i tre ceppi sono stati miscelati e inoculati nelle due diete.

Gli inoculi hanno raggiunto una fase stazionaria iniziale di circa  $1 \times 10^8$  UFC/ml.

A partire dal giorno della contaminazione, per un totale di cinque volte sono stati forniti campioni di 10 g di substrato, a seconda del cambio di stadio di *Hermetia illucens*. A partire dal terzo giorno, sono stati raccolti campioni di 10 larve per l'analisi microbiologica e successivamente al 6°, 8°, 10°, 13° e 17° giorno. Le larve di due giorni di età sono risultate troppo piccole per essere analizzate microbiologicamente. Per questo motivo, le misurazioni sono state effettuate a partire dal terzo giorno di età. Questa limitazione è accettabile perché lo stadio di sviluppo di interesse commerciale è quello della prepupa, che viene raggiunto dopo circa 17 giorni.

*Salmonella spp.* è stata rilevata secondo la norma ISO 6579-1:2017. *Salmonella Typhimurium* è stata conteggiata secondo la norma ISO 6579-2:2012. *Listeria monocytogenes* è stata rilevata e conteggiata secondo ISO 11290-1:2017 e ISO 11290-2:2017.

Tutti i conteggi sono stati ripetuti in triplicato e i dati sono stati presentati come media delle tre repliche. La stessa procedura è stata utilizzata anche per l'analisi del substrato (sia trattato che non trattato).

I risultati dell'analisi dei patogeni sono stati espressi in logaritmo decimale e sono stati utilizzati per tracciare le curve di crescita.

Per quanto riguarda le analisi chimico-fisiche l' $a_w$  e il pH sono stati determinati nei due substrati con e senza larve al 1°, 2°, 6°, 8°, 10°, 13° e 17° giorno.

### 3.5.2 I risultati del challenge test per *Salmonella enterica Typhimurium*

Le due diete proposte per l'allevamento delle larve sono state confrontate per determinare se fossero ugualmente adatte a sostenere la crescita di *Salmonella enterica Typhimurium*. Poiché non sono state osservate differenze tra le due diete, i dati dei due test sono stati uniti per ottenere una visione più completa dei risultati. La media e la deviazione standard sono state ricalcolate (Tabella 3.5).

**Tabella 3.5** Decadimento della *Salmonella enterica Typhimurium* nel substrato, larve e CTRL (substrato senza larve) Log UFC/g (deviazione standard). Dati ottenuti in sei repliche in due challenge test indipendenti. Le lettere <sup>a, b, c</sup> indicano differenze tra gruppi (substrato, larve e CTRL) alla stessa data di campionamento; le lettere <sup>x, y, z, j, k, w</sup> indicano differenze tra le date all'interno dello stesso gruppo. Dall'analisi microbiologica sono state escluse le larve di uno e due giorni (0,01 g ciascuna) (Grisendi et al., 2022).

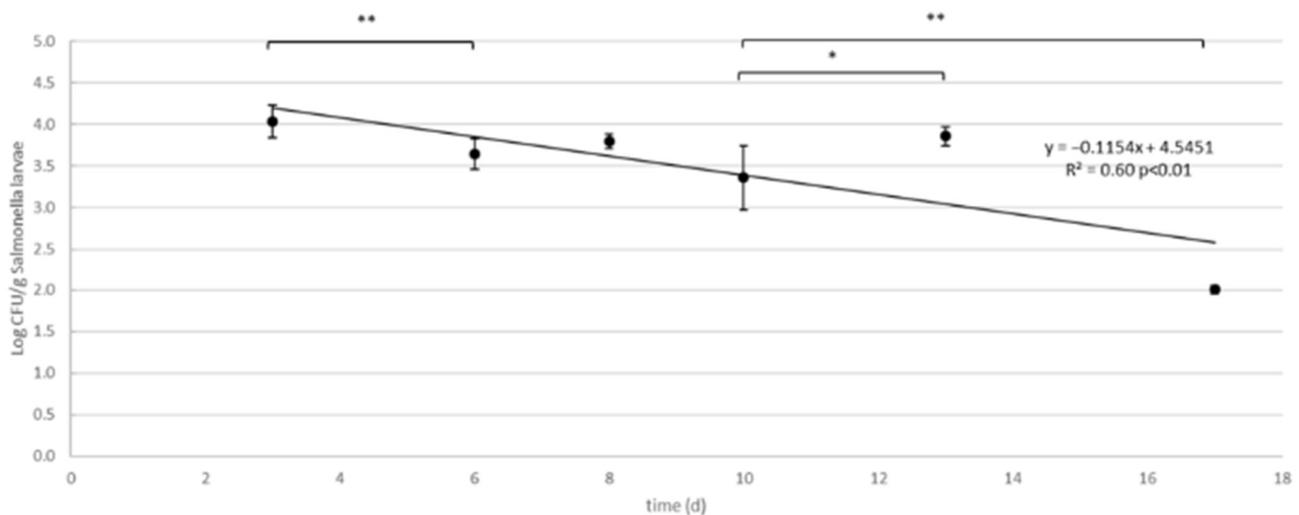
Giorni	Log UFC/g (DS)		
	Substrato	Larve	CTRL
<b>1</b>	7,29 (0,06) <sup>a,x</sup>		7,69 (0,24) <sup>c,x</sup>
<b>2</b>	6,84 (0,24) <sup>a,y</sup>		7,59 (0,16) <sup>c,x</sup>
<b>3</b>	4,49 (0,22) <sup>a,z</sup>	4,04 (0,20) <sup>b,x</sup>	7,31 (0,05) <sup>c,x</sup>
<b>6</b>	3,67 (0,25) <sup>a,j</sup>	3,64 (0,18) <sup>a,y</sup>	7,46 (0,16) <sup>c,x</sup>
<b>8</b>	3,72 (0,12) <sup>a,j</sup>	3,80 (0,09) <sup>a,y</sup>	5,15 (0,18) <sup>c,y</sup>
<b>10</b>	3,54 (0,17) <sup>a,j</sup>	3,36 (0,39) <sup>a,z</sup>	5,55 (0,25) <sup>c,y</sup>
<b>13</b>	4,73 (0,13) <sup>a,k</sup>	3,86 (0,11) <sup>b,y</sup>	5,33 (0,69) <sup>a,y</sup>
<b>17</b>	3,74 (0,06) <sup>a,w</sup>	2,00 (0,05) <sup>b,k</sup>	4,24 (0,09) <sup>c,z</sup>

I risultati hanno mostrato che:

- La contaminazione da *Salmonella enterica Typhimurium* è diminuita significativamente nel tempo in tutti e tre i gruppi. La concentrazione di *Salmonella enterica Typhimurium* nelle larve è stata inferiore a quella del loro substrato il giorno 3 e nelle ultime due date sperimentali. Nel periodo intermedio, la concentrazione del batterio nelle larve è stata simile a quella del loro substrato di crescita.

- La diminuzione è stata più rapida nelle larve rispetto al loro substrato.
- Nel gruppo di controllo, il decadimento della *Salmonella enterica Typhimurium* è stato estremamente basso nei primi 6 giorni e, successivamente, accelerato tra il giorno 8 e il giorno 17.

La Figura 3.10 mostra la curva di sopravvivenza che descrive l'andamento della concentrazione di *Salmonella enterica Typhimurium* nelle larve nel corso del tempo.



**Figura 3.10** Decadimento di *Salmonella enterica Typhimurium* nelle larve (Log UFC/g) di *Hermetia illucens* allevata su substrato artificiale contaminato. Le barre verticali rappresentano la deviazione standard di 6 ripetizioni in due test di sfida indipendenti. Le barre orizzontali mostrano differenze significative tra i punti sperimentali, \* p < 0,05; \*\* p < 0,01. L'equazione per la retta di regressione e R<sup>2</sup> è presentata insieme al p significativo del modello (Grisendi et al., 2022).

### 3.5.3 I risultati del challenge test per *Listeria monocytogenes*

Come per *Salmonella enterica Typhimurium*, non sono state osservate differenze tra le diete quindi i dati dei due test sono stati uniti e la media e la deviazione standard sono state ricalcolate (Tabella 3.6).

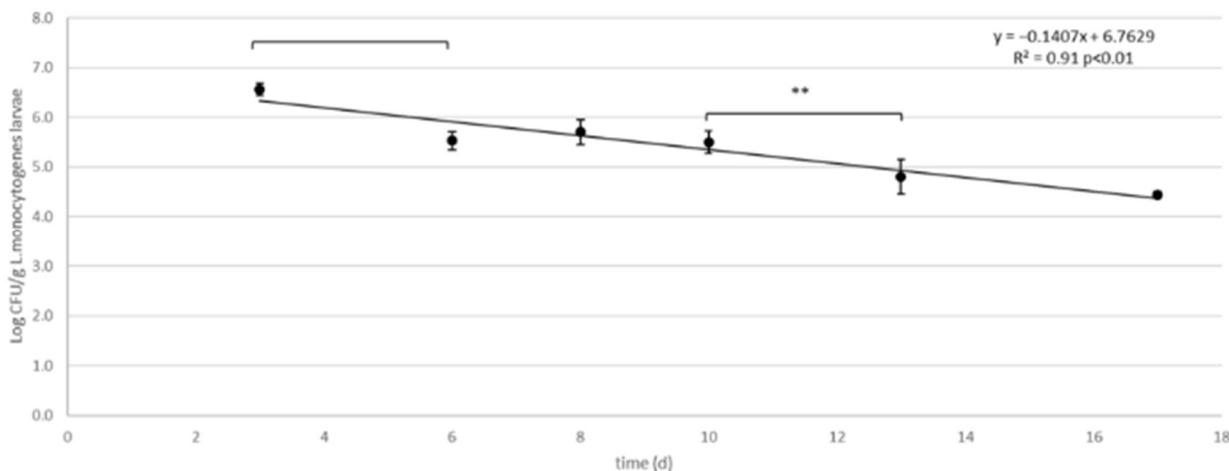
**Tabella 3.6** Decadimento di *Listeria monocytogenes* nel substrato, larve e CTRL (substrato senza larve) Log UFC/g (deviazione standard). Dati ottenuti in 6 ripetizioni in due test di sfida indipendenti. Le lettere <sup>a, b, c</sup> indicano differenze tra gruppi (substrato, larve e CTRL) nella stessa data di campionamento. Le lettere <sup>x, y e z</sup> indicano differenze tra le date all'interno dello stesso gruppo. Dall'analisi microbiologica sono state escluse le larve di uno e due giorni (0,01 g ciascuna) (Grisendi et al., 2022).

Giorni	Log UFC/g (DS)		
	Substrato	Larve	CTRL
<b>1</b>	7,24 (0,11) <sup>a,x</sup>		7,75 (0,04) <sup>c,x</sup>
<b>2</b>	6,96 (0,17) <sup>a,x</sup>		7,43 (0,07) <sup>c,x</sup>
<b>3</b>	6,59 (0,05) <sup>a,y</sup>	6,56 (0,12) <sup>a,x</sup>	7,00 (0,06) <sup>c,y</sup>
<b>6</b>	6,18 (0,07) <sup>a,z</sup>	5,53 (0,18) <sup>b,y</sup>	7,62 (0,26) <sup>c,x</sup>
<b>8</b>	6,57 (0,19) <sup>a,y</sup>	5,70 (0,25) <sup>b,y</sup>	7,49 (0,17) <sup>c,x</sup>
<b>10</b>	6,44 (0,26) <sup>a,y</sup>	5,50 (0,22) <sup>b,y</sup>	7,82 (0,19) <sup>c,x</sup>
<b>13</b>	6,30 (0,26) <sup>a,y</sup>	4,81 (0,34) <sup>b,z</sup>	7,43 (0,40) <sup>c,x</sup>
<b>17</b>	5,93 (0,09) <sup>a,z</sup>	4,45 (0,06) <sup>b,z</sup>	7,48 (0,07) <sup>c,x</sup>

I risultati hanno mostrato che:

- Il substrato di controllo, ovvero il substrato inoculato con *Listeria monocytogenes* ma senza larve, ha sempre mostrato una concentrazione di *Listeria monocytogenes* significativamente più alta rispetto al substrato con larve.
- A partire dal giorno 6, la concentrazione di *Listeria monocytogenes* nelle larve era significativamente inferiore a quella del loro substrato di crescita.
- La concentrazione di *Listeria monocytogenes* è diminuita significativamente nel tempo sia nelle larve che nel loro substrato di crescita, ma non nel gruppo di controllo.
- La riduzione più rapida è stata osservata nelle larve.
- Nel gruppo di controllo, il decadimento di *Listeria monocytogenes* è stato estremamente basso durante tutto il tempo dell'esperimento.

La Figura 3.11 mostra la curva di sopravvivenza che descrive l'andamento della concentrazione di *Listeria monocytogenes* nelle larve nel corso del tempo.



**Figura 3.11** Decadimento di *Listeria monocytogenes* nelle larve (Log UFC/g) di *Hermetia illucens* allevata su substrato artificiale contaminato. Le barre verticali rappresentano la deviazione standard di 6 ripetizioni in due test di sfida indipendenti. Le barre orizzontali mostrano differenze significative tra i punti sperimentali, \*\* p < 0,01. L'equazione per la retta di regressione e R<sup>2</sup> è presentata insieme al p significativo del modello (Grisendi et al., 2022).

### 3.5.4 Analisi su pH e a<sub>w</sub>

Per quanto riguarda i risultati delle analisi chimico-fisiche possiamo effettuare le seguenti considerazioni:

- In entrambi i substrati, il pH è rimasto nell'intervallo di normalità per entrambe le diete (6,59-8,08) fino alla fine del test. Tuttavia, le larve hanno indotto un pH significativamente più alto per il substrato rispetto al controllo, in particolare per la dieta D.
- Nei controlli, i valori di a<sub>w</sub> sono rimasti stabili solo fino al giorno 10. Dopodiché, i valori sono diminuiti, raggiungendo 0,65 alla fine dell'esperimento. Questo è probabilmente dovuto all'essiccazione all'aria dei substrati.
- Quando erano presenti le larve, i valori di a<sub>w</sub> sono rimasti stabili durante lo studio.

### 3.5.5 Discussione dei risultati

L'esperimento di Grisendi et al. (2022) è stato condotto secondo la norma ISO 20976-2, che specifica i protocolli per condurre challenge test per studiare il potenziale di inattivazione e i parametri cinetici.

La limitazione di questo studio è che l'esperimento non ha considerato la possibilità che una bassa contaminazione del substrato possa amplificarsi nelle larve durante il periodo di produzione. In altre parole, l'esperimento ha misurato solo la capacità del processo di inattivare l'agente patogeno, ma non ha considerato la possibilità che l'agente patogeno possa crescere e moltiplicarsi nelle larve durante il periodo di produzione.

La norma ISO 20976-1, invece, come abbiamo visto specifica i protocolli per condurre challenge test per studiare il potenziale di crescita, il tempo di latenza e il tasso massimo di crescita di agenti patogeni in alimenti e mangimi. Un esperimento condotto secondo questa norma avrebbe potuto fornire informazioni più complete sulla sicurezza del processo, poiché avrebbe considerato la possibilità che l'agente patogeno possa crescere e moltiplicarsi nelle larve durante il periodo di produzione.

Nonostante ciò, lo studio ha dimostrato che le larve di *Hermetia illucens* possono essere allevate su un substrato contaminato da *Salmonella enterica Typhimurium* e *Listeria monocytogenes*, con conseguente riduzione della carica microbica di entrambi gli agenti patogeni. Tuttavia, Grisendi et al. (2022) hanno sottolineato che la riduzione osservata è stata incompleta e che la lenta velocità di decadimento dei patogeni è motivo di preoccupazione. Potrebbe infatti essere indicativo della presenza di una sottopopolazione di batteri più resistenti, che potrebbero sopravvivere al processo di sviluppo delle larve e contaminare il prodotto alimentare finale. Inoltre, il breve periodo di sviluppo larvale di *Hermetia illucens* limita la sua capacità di ridurre la carica microbica durante il periodo di allevamento.

Durante il test è stata osservata una differenza nella dinamica dei due patogeni: *Listeria monocytogenes* ha mostrato concentrazioni più elevate rispetto a *Salmonella enterica Typhimurium*, sia nel substrato con le larve che nei controlli senza larve, ma solo dal secondo giorno.

I ricercatori ritengono che questa differenza possa essere dovuta a diversi fattori, tra cui:

- La diversità delle pareti cellulari batteriche dei Gram-positivi rispetto a quelle dei batteri Gram-negativi: la parete cellulare dei batteri Gram-positivi è più spessa e quindi più resistente.
- La maggiore resistenza intrinseca di *Listeria monocytogenes* agli stress ambientali.

- La produzione di agenti antimicrobici specifici: le larve di *Hermetia illucens* producono agenti antimicrobici che sono efficaci contro i batteri Gram-negativi, ma non contro i batteri Gram-positivi.

Inoltre, è stato osservato che le larve di *Hermetia illucens* producono una risposta immunitaria che ha una maggiore attività antibatterica, anche contro batteri Gram-positivi. È possibile che un'infezione da patogeno nelle larve possa effettivamente stimolare questa risposta immunitaria.

Uno studio condotto da Park et al. (2014), ha dimostrato che le larve di *Hermetia illucens* sono in grado di produrre una risposta immunitaria che viene indotta dall'infezione da patogeni, e può avere un'attività antibatterica anche contro i batteri Gram-positivi.

Le larve, infatti, sono entrate in contatto con un'alta concentrazione di *Listeria monocytogenes* dopo la schiusa. È possibile che questa esposizione abbia stimolato una risposta immunitaria nelle larve, che ha contribuito a ridurre la carica batterica.

Lo studio di Grisendi et al. (2022) ha rilevato che le larve allevate su substrato contaminato hanno avuto un carico patogeno inferiore rispetto al substrato stesso. Questa differenza può essere quantificata, e consente di prevedere la contaminazione finale delle larve in funzione della contaminazione iniziale del substrato. Questi risultati suggeriscono che è possibile classificare i diversi substrati di crescita da utilizzare per allevare larve di *Hermetia illucens* per implicazioni sulla sicurezza. In particolare, i substrati con un basso carico patogeno iniziale produrranno larve con un carico patogeno inferiore.

È stato visto che la carica degli agenti patogeni è diminuita anche nei campioni di controllo, in cui non sono state aggiunte larve. Questa diminuzione è attribuita a una diminuzione di  $a_w$ , che può portare a stress e, quindi, a una riduzione del numero di microrganismi. Tuttavia, questa riduzione è stata più lenta di quella osservata nelle larve.

Nei controlli, il pH è rimasto abbastanza costante attorno a valori neutri. Nella dieta D, l'azione delle larve ha comportato un aumento del pH di circa 1 punto rispetto alla dieta G. È stato ipotizzato che i composti antimicrobici presenti nelle larve siano meno stabili o meno attivi a pH più bassi. Tuttavia, nei risultati di questo studio, le differenze di pH delle due diete testate non sono sembrate interferire con la capacità delle larve di ridurre la carica patogena.

In conclusione, lo studio dimostra che le larve di *Hermetia illucens* possono ridurre la contaminazione da *Salmonella enterica Typhimurium* e *Listeria monocytogenes* in substrati contaminati. Tuttavia, questa riduzione non è completa e, pertanto, è necessario un trattamento post-produzione per garantire la sicurezza alimentare di alimenti o mangimi.

Tuttavia, ulteriori studi sono necessari per comprendere meglio i meccanismi alla base delle proprietà antimicrobiche delle larve e per valutare il rischio residuo di contaminazione da patogeni, anche a seguito di trattamenti post-produzione. In particolare, sarebbe utile uno studio di valutazione del rischio per valutare diversi possibili substrati di crescita a diversi livelli di contaminazione microbica e per definire le migliori pratiche di trattamento post-produzione.

Se questi studi dovessero dare risultati positivi, l'allevamento di larve di *Hermetia illucens* diventerebbe un'opzione più appetibile per i produttori alimentari e per i mangimifici. Questo tipo di allevamento, infatti, sarebbe in linea con le esigenze di un mercato che deve sempre più orientarsi verso un'economia circolare.

In particolare, l'utilizzo di substrati potenzialmente contaminati consentirebbe di ridurre gli sprechi alimentari e di valorizzare sottoprodotti che altrimenti verrebbero smaltiti. Inoltre, l'allevamento di larve di *Hermetia illucens* sarebbe un modo per ridurre l'uso di risorse naturali, come la terra e l'acqua.

## 4. Conclusioni

Il presente elaborato ha avuto lo scopo di valutare l'applicazione della norma ISO 20976-1 per effettuare challenge test su alimenti.

In letteratura scientifica, sono presenti un numero esiguo di lavori che attuano challenge test su alimenti facendo riferimento a questa norma. Inoltre, quelli presenti hanno effettuato studi sul potenziale di crescita e nessuno ha effettuato studi sulla cinetica di crescita.

Questa mancanza di studi sulla cinetica di crescita è un limite importante, in quanto la cinetica di crescita può fornire informazioni più dettagliate sulla capacità di un microrganismo di crescere in un determinato alimento.

Inoltre, nei primi tre lavori che abbiamo considerato nel capitolo precedente, seppur abbiano progettato e implementato i challenge test secondo la norma ISO 20976-1, si riscontrano alcune criticità.

Nel challenge test realizzato da Alberghini et al. (2023) per studiare il potenziale di crescita di *Bacillus cereus* in una zuppa pronta da riscaldare, è stato utilizzato il calcolatore di variabilità inter-lotto presente nell'allegato A della norma ISO 20976-1. La norma specifica, tuttavia, che tale calcolatore può essere applicato solo agli studi sulla cinetica di crescita, a condizione che i parametri pH e  $a_w$  siano gli unici che influenzano il tasso di crescita.

Inoltre, in questo lavoro, sono state allestite 12 unità di controllo che sono servite a misurare il pH, l' $a_w$ , il potenziale redox e il TVC, all'inizio e alla fine del challenge test. Tali parametri vengono misurati per valutare l'eventuale influenza sulla crescita del microrganismo target. Come specificato dalla norma ISO 20976-1, in queste unità viene aggiunto un diluente non stimolatore della crescita, al fine di garantire che la preparazione delle unità di prova non abbia influito sulle caratteristiche dell'alimento, tra cui pH e  $a_w$ .

Tuttavia, nell'articolo si riscontra una incongruenza nella definizione delle unità di controllo. In particolare, nella misurazione dei parametri a T0, le unità di controllo vengono definite come tali, mentre nella misurazione dei parametri a fine challenge test vengono definite come unità di prova. Ciò significa che i valori di pH,  $a_w$ , potenziale redox e TVC sono stati misurati nelle unità di prova contenenti il microrganismo, e non nelle unità di controllo non contenenti il microrganismo.

La misurazione dei parametri nelle unità di prova contenenti il microrganismo potrebbe essere influenzata dalla crescita del microrganismo stesso.

Per evitare questo problema, è necessario che le unità di controllo siano sempre distinte dalle unità di prova. In questo modo, si può essere certi che i risultati ottenuti riflettano effettivamente le caratteristiche dell'alimento, e non siano influenzati dalla crescita del microrganismo.

Per completezza del challenge test, può essere interessante valutare la variazione dei parametri pH,  $a_w$ , potenziale redox e TVC sia nelle unità di controllo che nelle unità di prova. La valutazione nelle unità di controllo permette di determinare l'influenza dei parametri dell'alimento sulla crescita del microrganismo target, mentre la valutazione nelle unità di prova permette di determinare l'influenza della crescita del microrganismo target sui parametri stessi. È importante che le due valutazioni siano distinte, in modo da evitare che i risultati possano essere influenzati l'uno dall'altro.

Come ultima considerazione, potrebbe essere stato utile effettuare il challenge test in una zuppa che non sia stata sottoposta al secondo trattamento termico, in modo tale da valutare una possibile germinazione da spore che sono state indotte a germinare a seguito del primo trattamento termico.

L'articolo di Vasileiadi et al. (2022) ha invece effettuato il challenge test basandosi sulla norma ISO 20976-1 e sul documento di orientamento tecnico specifico per l'attuazione di challenge test su *Listeria monocytogenes* (EURL Lm), per valutarne il potenziale di crescita in un formaggio fresco.

La variabilità inter-lotto è stata valutata su tre lotti provenienti da diversi giorni di produzione e gli stessi lotti sono stati utilizzati per il challenge test. Il documento EURL raccomanda di utilizzare tre lotti diversi per tenere conto delle variazioni del processo produttivo e del prodotto, ciò significa condurre tre diversi challenge test. La norma ISO 20976-1, invece, considera la valutazione della variabilità inter-lotto come un processo separato dall'esecuzione del challenge test. In questo caso, le unità utilizzate per valutare la variabilità inter-lotto non sono le stesse con cui realizzare il challenge test.

Nonostante ciò, gli autori dell'articolo hanno inserito tre unità di controllo della temperatura, una per lotto, e per ogni lotto sono state analizzate tre unità di prova a T0. Questa scelta è giustificata dal fatto che i tre lotti non sono stati inoculati contemporaneamente, come richiede la norma ISO 20976-1.

Inoltre, il tempo trascorso tra produzione e inoculo è stato pari a due giorni. La norma ISO 20976-1 consiglia di far passare meno tempo possibile tra inoculazione e data di produzione delle unità di prova, senza dare un limite massimo. Invece la EURL parla di un periodo massimo di due giorni.

In conclusione, l'articolo di Vasileiadi et al. (2022) ha fornito dati utili per valutare il potenziale di crescita di *Listeria monocytogenes* in un formaggio fresco. Tuttavia, per un'azienda potrebbe essere utile creare un documento di riferimento interno che interseca le informazioni della norma ISO con il documento EURL Lm (Lanni et al., 2022). Questo documento potrebbe aiutare a standardizzare la metodologia del challenge test e a garantire la sua corretta applicazione.

Nella valutazione del potenziale di crescita di *Listeria monocytogenes* in salsicce effettuata da Sauka et al. (2020), il challenge test, sebbene progettato secondo la norma ISO 20976-1 e il documento EURL Lm, presenta alcuni limiti.

Innanzitutto, il challenge test non è stato condotto in abuso termico, ciò significa che non si può escludere che il batterio possa crescere a temperature più elevate, che possono verificarsi durante il trasporto, la vendita al dettaglio o il consumo domestico.

In secondo luogo, lo studio non fornisce informazioni sulle modalità di valutazione della variabilità inter-lotto, sulla preparazione dell'inoculo e sul numero di unità considerate. Ciò rende difficile la replicabilità dello studio.

Infine, per l'inoculo è stato utilizzato un ceppo di riferimento, mentre sarebbe stato preferibile utilizzare un ceppo selvaggio isolato dall'ambiente o dal prodotto stesso, come richiede la norma ISO 20976-1.

Lo studio di Tirloni et al. (2021) ha valutato l'efficacia di acidi organici nella crescita di *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus* nel formaggio fresco primo sale attraverso un challenge test. I risultati hanno mostrato che gli acidi organici sono in grado di inibire la crescita di entrambi i microrganismi, ma alcuni aspetti dello studio meritano di essere discussi.

Il primo aspetto riguarda la mancata implementazione del challenge test secondo la norma ISO 20976-1, e quindi la mancata definizione di uno dei due scopi: lo studio del potenziale di crescita o della cinetica di crescita.

In questo caso, lo studio avrebbe potuto essere idoneo a condurre un challenge test per la valutazione della cinetica di crescita, calcolando il lag time e il tasso di massima crescita. Infatti,

l'articolo ha considerato un ceppo per ogni microrganismo e il challenge test è stato effettuato a temperatura costante, presupposti idonei a condurre uno studio sul potenziale di crescita.

Tuttavia, la norma ISO 20976-1 prevede che, per valutare la cinetica di crescita, il numero di punti di campionamento deve essere di almeno otto, di cui cinque nella fase esponenziale. Nel caso dello studio di Tirloni et al., il numero di punti di campionamento è stato di massimo sette; quindi, non sarebbe stato sufficiente per valutare la cinetica di crescita. Inoltre, lo studio ha considerato solo un lotto, scelta che dovrebbe essere giustificata.

L'ultimo studio di Grisendi et al. (2022) è stato riportato per completezza, in quanto prende in considerazione la seconda parte della norma ISO 20976.

In conclusione, l'analisi dei lavori scientifici considerati nell'elaborato ha evidenziato che l'applicazione della norma ISO 20976-1 per effettuare challenge test su alimenti è ancora in fase di sviluppo e applicazione.

Questa situazione è dovuta a due principali criticità: la mancanza di studi sulla cinetica di crescita dei microrganismi e l'applicazione non sempre rigorosa della norma.

Ricordiamo comunque che la norma ISO 20976-1 è una norma volontaria; pertanto, la sua applicazione non è obbligatoria. Tuttavia, è importante applicarla in modo rigoroso per ottenere risultati attendibili.

Per migliorare l'applicazione della norma, sono necessari ulteriori studi che prendano in considerazione diversi microrganismi e matrici alimentari. Questi studi dovrebbero progettare challenge test che siano conformi alle linee guida della norma e che rappresentino un riferimento per la loro specifica implementazione.

Inoltre, nell'immediato futuro, si può considerare la possibilità di utilizzare i challenge test nell'ambito della *precision food safety*, "un nuovo paradigma della sicurezza alimentare basato sui *big data*" per migliorare la valutazione e la gestione del rischio (Paparella et al., 2023).

I challenge test sono una metodologia valida e affidabile per la valutazione della sicurezza alimentare. I dati raccolti da questi test possono essere utilizzati per sviluppare modelli predittivi della crescita, sopravvivenza e inattivazione dei microrganismi negli alimenti. Questi modelli possono essere utilizzati per supportare le decisioni degli operatori del settore alimentare nella definizione e implementazione di misure di controllo del rischio. Tuttavia, è importante tenere

presente i loro limiti, come la necessità di condizioni di laboratorio standardizzate e la possibilità di risultati non riproducibili.

La combinazione dei challenge test con le nuove tecnologie, come l'intelligenza artificiale, l'*Internet of Things* e la *blockchain*, potrebbe consentire di superare questi limiti e migliorare ulteriormente l'accuratezza e la riproducibilità dei risultati (Paparella et al., 2023).

Tuttavia, l'utilizzo di queste nuove tecnologie richiede nuove competenze da parte dei professionisti della sicurezza alimentare, che devono essere in grado di comprendere e analizzare i dati, nonché di collaborare con esperti di scienza dei dati. Inoltre, è necessario che le fonti di dati disponibili siano più interoperabili e che le problematiche legate alla tutela dei dati personali e alla sicurezza delle reti siano affrontate in modo adeguato (Paparella et al., 2023).

Naturalmente, la combinazione dei challenge test con le nuove tecnologie è ancora una ricerca in corso. Tuttavia, i risultati ottenuti finora sono promettenti e suggeriscono che questa combinazione potrebbe rappresentare un importante passo avanti nella valutazione della sicurezza alimentare.

## BIBLIOGRAFIA

- Alberghini, G., Fabbian, A., Ferioli, M., Miotti Scapin, R., Catellani, P., Giaccone, V. (2023). The Growth Potential of *Bacillus cereus* in Ready-to-Reheat Vegetable Soups. *Hygiene*, 3(3), 339–350.
- ANSES. (2021). EURL Lm Technical Guidance Document on challenge tests and durability studies for assessing shelf-life of ready-to-eat foods related to *Listeria monocytogenes*. Version 4.
- European Food Safety Authority, European Centre for Disease Prevention and Control. (2022). The European Union One Health 2021 Zoonoses Report. *EFSA Journal*, 20(12).
- Fontana, M., Bisotti, B., Ariotti, R. (2007). Il Regolamento 2073 CE e la valutazione dei criteri di processo e di sicurezza alimentare attraverso il Challenge test. *Progresso Veterinario*, LXII, (8), 343-346.
- Giaccone, V., Ferioli M., Ottaviani F. (2008). Gestione delle prove di inoculazione sperimentale ai fini del Regolamento n. 2073/2005/Ce. *Ingegneria alimentare*, novembre 2008: 47-54.
- Giaccone, V., Lanni, L., Destro, G. (2017). Spunti per l'impostazione di challenge test per *Listeria monocytogenes* in alimenti per l'uomo. *Industrie alimentari*, LVI, 1-13.
- Grisendi, A., Defilippo, F., Lucchetti, C., Listorti, V., Ottoboni, M., Dottori, M., Serraino, A., Pinotti, L., Bonilauri, P. (2022). Fate of *Salmonella enterica* Typhimurium and *Listeria monocytogenes* in Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) Larvae Reared on Two Artificial Diets. *Foods*, 11(15), 2208.
- ISO 4833-1:2013 Microbiology of the food chain - Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Part 1: Colony count at 30 °C by the pour plate technique
- ISO 7932:2020 Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of presumptive *Bacillus cereus* - Colony-count technique at 30 degrees C
- ISO 6579-1:2017 Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* - Part 1: Detection of *Salmonella* spp.
- ISO 6579-2:2012 Microbiology of food and animal feed - Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella* - Part 2: Enumeration by a miniaturized most probable number technique

- ISO 6887-1:2017 Microbiology of the food chain. Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination. Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions.
- ISO 7218:2007 Microbiology of food and animal feeding stuffs. General requirements and guidance for microbiological examinations.
- ISO 8402:1994 Quality management and quality assurance. Vocabulary.
- ISO 11133:2014 Microbiology of food, animal feed and water. Preparation, production, storage and performance testing of culture media.
- ISO 11290-1:2017 - Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. - Part 1: Detection method
- ISO 11290-2:2017 Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes* and of *Listeria* spp. - Part 2: Enumeration method
- ISO 16140-2:2016 Microbiology of the food chain. Method validation. Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method.
- ISO/IEC 17025:2017 General requirements for the competence of testing and calibration laboratories.
- ISO 17604:2015 Microbiology of the food chain. Carcass sampling for microbiological analysis.
- ISO 18593:2018 Microbiology of the food chain. Horizontal methods for surface sampling.
- ISO 20976-1:2019 Microbiology of the food chain - Requirements and guidelines for conducting challenge tests of food and feed products - Part 1: Challenge tests to study growth potential, lag time and maximum growth rate.
- ISO 20976-2:2022 Microbiology of the food chain - Requirements and guidelines for conducting challenge tests of food and feed products - Part 2: Challenge tests to study inactivation potential and kinetic parameters.
- Lanni, L., Morena, V., Scattareggia Marchese, A., Destro, G., Ferioli, M., Catellani, P., Giaccone, V. (2022). Challenge Test as Special Tool to Estimate the Dynamic of *Listeria monocytogenes* and Other Foodborne Pathogens. *Foods*, 11(1), 32.
- Lindbäck, T., Granum, P. E. (2019). *Bacillus cereus*. In *Food Microbiology* (pp. 541–554). John Wiley & Sons, Ltd.

- Paparella, A., Schirone, M., Visciano, P. (2023). Sicurezza alimentare e data science: dalla microbiologia predittiva alla precision food safety. In *Igiene nei processi alimentari* (pp. 464-471). Milano: Ulrico Hoepli Editore S.p.A.
- Park, S.-I., Chang, B. S., Yoe, S. M. (2014). Detection of antimicrobial substances from larvae of the black soldier fly, *Hermetia illucens* (Diptera: Stratiomyidae). *Entomological Research*, 44(2), 58–64.
- Ryser, E. T., Buchanan, R. L., Bakke, H. C. den. (2019). *Listeria monocytogenes*. In *Food Microbiology* (pp. 451–486). John Wiley & Sons, Ltd.
- Sauka, J., Semjonovs, A., Baranovičs, E., Nikolajeva, V. (2020). Growth potential of *Listeria monocytogenes* in cold smoked sausages with and without fermentation. *Environmental and Experimental Biology*, 18(4).
- Tirloni, E., Bernardi, C., Celandroni, F., Ghelardi, E., Stella, S. (2021). Effectiveness of lactic and acetic acids on the growth of *Listeria monocytogenes* and *Bacillus cereus* in primo sale fresh cheese. *LWT*, 151, 112170.
- Vasileiadi, N., Lappa, A., Koukouvinos, C., Tsironi, T., Mandilara, G. (2022). Challenge Test for Assessing the Growth Potential of *Listeria Monocytogenes* in Greek Soft Cheese (Anthotyros). *Applied Sciences*, 12(23), 12349.
- Yousef, A. E., Abdelhamid, A. G. (2019). Behavior of Microorganisms in Food: Growth, Survival, and Death. In *Food Microbiology* (pp. 3–21). John Wiley & Sons, Ltd.

## SITOGRAFIA

- ANSES - EURL European Union Reference Laboratory for *Listeria monocytogenes*. Calculator inter-batch variability. <https://eurl-listeria.anses.fr/en/minisite/listeria-monocytogenes/mandate> consultata il 30/10/2023
- Statista. (2023). Ready-to-Eat Meals – Europe. <https://www.statista.com/> consultata il 06/10/2023

## LEGISLAZIONE CONSULTATA

- Commissione Europea. (2005). Regolamento (CE) N. 2073/2005 della Commissione del 15 novembre 2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari.
- Parlamento Europeo e Consiglio dell'Unione Europea. (1998). Direttiva 98/34/CE del Parlamento Europeo e del Consiglio del 22 giugno 1998 che prevede una procedura d'informazione nel settore delle norme e delle regolamentazioni tecniche e delle regole relative ai servizi della società dell'informazione.
- Parlamento Europeo e Consiglio dell'Unione Europea. (2002). Regolamento (CE) N. 178/2002 del Parlamento europeo e del Consiglio del 28 gennaio 2002 che stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare.