

Università degli Studi di Padova

Facoltà di Medicina e Chirurgia

**CORSO DI LAUREA TRIENNALE IN TECNICHE DELLA PREVENZIONE
NELL'AMBIENTE E NEI LUOGHI DI LAVORO**

Presidente: prof. Bruno Saia



TESI DI LAUREA

**DETERMINAZIONE DELLA *SHELF-LIFE* DEGLI ALIMENTI
PRONTI AL CONSUMO.**

RELATORE: PROF. ALBERGHINI LEONARDO

(DIPARTIMENTO DI SANITA' PUBBLICA, PATOLOGIA COMPARATA E IGIENE VETERINARIA –
FACOLTA' DI MEDICINA VETERINARIA (PD))

CORRELATORI: DOTT. ANDREA CERESER

DOTT.SSA ALESSANDRA PEZZUTO

(ISTITUTO ZOOPROFILATTICO DELLE VENEZIE –SEZ. DI SAN DONA' DI PIAVE (VE))

LAUREANDO: ANDREA TAMAI

MATRICOLA: 570124

ANNO ACCADEMICO 2006 - 2007

INDICE

1. Introduzione	Pag. 1
1.1 Contesto normativo	Pag. 1
1.2 Considerazioni generali sugli alimenti pronti al consumo e relativa <i>shelf-life</i>	Pag. 3
1.3 Considerazioni sui <i>challenge tests</i>	Pag. 4
1.4 Alterazioni causate dalla presenza di microrganismi	Pag. 5
2. Scopo della tesi	Pag. 9
3. Materiali e metodi	Pag. 11
3.1 Caratteristiche del prodotto alimentare oggetto della ricerca	Pag. 11
3.2 Tipologia dei campioni	Pag. 12
3.3 Parametri e metodi analitici	Pag. 13
3.4 Protocollo operativo per <i>challenge test</i> con <i>Listeria monocytogenes</i>	Pag. 16
3.4.1 Protocollo di lavoro	Pag. 16
4. Risultati	Pag. 19
5. Discussione	Pag. 39
5.1 Discussione dei risultati del I° lotto	Pag. 39
5.2 Discussione dei risultati del II° lotto	Pag. 43
5.3 Confronto tra i risultati dei due lotti	Pag. 51
5.4 Discussione dei risultati del <i>challenge test</i> con <i>Listeria monocytogenes</i>	Pag. 52
6. Conclusioni	Pag. 55
7. Bibliografia	Pag. 57

ELENCO TABELLE

Tab. 1 Schema di valutazione indicativo di alimenti sottoposti a cottura (Tiecco G. 2001).	Pag. 7
--	--------

Tab. 2	Limiti ricavati da standard ufficiali o proposti in più parti del mondo (Tiecco G. 2001).	Pag. 7
Tab. 3	Possibili limiti di qualità per alcuni germi patogeni veicolati con gli alimenti (Tiecco G. 2001).	Pag. 7
Tab. 4	Piano di campionamento I° e II° lotto	Pag. 13
Tab. 5	Metodi analitici adottati (criteri di sicurezza)	Pag. 14
Tab. 6	Metodi analitici adottati (criteri di igiene di processo e di conservabilità)	Pag.15
Tab. 7	Piano di campionamento per il <i>challenge test</i> con <i>Listeria monocytogenes</i>	Pag.18
Tab. 8	I° lotto - valori di a_w	Pag.20
Tab. 9	I° lotto - valori di pH	Pag. 21
Tab. 10	I° lotto - valori di <i>Salmonella</i> e <i>Listeria monocytogenes</i>	Pag. 22
Tab. 11	I° lotto - valori di Microrganismi mesofili (CMT) a 30° C	Pag. 23
Tab. 12	I° lotto - valori di Batteri Lattici a 30° C	Pag. 24
Tab. 13	I° lotto - valori di Lieviti e Muffe	Pag. 25
Tab. 14	I° lotto - valori di Clostridi Solfito Riduttori e <i>Bacillus Cereus</i>	Pag. 26
Tab. 15	I° lotto - valori di <i>Escherichia coli</i> e Stafilococchi Coagulasi positivi	Pag. 27
Tab. 16	I° lotto - valori di Enterobatteri	Pag. 28
Tab. 17	I° lotto - valori di <i>Pseudomonas spp</i>	Pag. 29
Tab. 18	II° lotto - valori di a_w e pH	Pag. 30
Tab. 19	II° lotto valori di <i>Salmonella</i> e <i>Listeria monocytogenes</i>	Pag. 31
Tab. 20	II° lotto - valori di Microrganismi mesofili (CMT) a 30° C	Pag. 32
Tab. 21	II° lotto - valori di Batteri lattici a 30° C	Pag. 33

Tab. 22	II° lotto - valori di Lieviti e Muffe	Pag. 34
Tab. 23	II° lotto - valori di Clostridi Solfito Riduttori e <i>Bacillus cereus</i>	Pag. 35
Tab. 24	II° lotto - valori di <i>Escherichia coli</i> . e Stafilococchi Coagulasi positivi	Pag. 36
Tab. 25	II° lotto - valori di <i>Pseudomonas</i> ed Enterobatteri	Pag. 37
Tab. 26	II° lotto - <i>Challenge test</i> : valori di <i>Listeria monocytogenes</i>	Pag. 38
Tab. 27	<i>Challenge test</i> - numero di valori outliers per ciascuna distribuzione	Pag. 52

ELENCO GRAFICI

Grafico 1	I° lotto - Microrganismi mesofili a 30°C alle due temperature di conservazione	Pag. 40
Grafico 2	I° lotto - Batteri lattici a 30°C alle due temperature di conservazione	Pag. 40
Grafico 3	I° lotto - Lieviti alle due temperature di conservazione	Pag. 41
Grafico 4	I° lotto – presenza di <i>Listeria monocytogenes</i> nei 30 campioni conservati a +3°C	Pag. 42
Grafico 5	II° lotto – Valori di pH alle due temperature di conservazione	Pag. 44
Grafico 6	II° lotto - Presenza di <i>Listeria monocytogenes</i> nei 30 campioni conservati a +9°C.	Pag. 45
Grafico 7	II° lotto – Valori di attività dell'acqua (a_w) alle due temperature di conservazione	Pag. 46
Grafico 8	II° lotto - Microrganismi mesofili a 30°C alle due temperature di conservazione	Pag. 47
Grafico 9	II° lotto - Batteri lattici a 30°C alle due temperature di conservazione	Pag. 48
Grafico 10	II° lotto - Lieviti alle due temperature di conservazione	Pag. 49
Grafico 11	II° lotto - Muffe alle due temperature di conservazione	Pag. 49

Grafico 12 II° lotto - Enterobatteri alle due temperature di conservazione di Pag. 50

Grafico 13 *Challenge test*- valori di *Listeria monocytogenes* Pag. 53

1. INTRODUZIONE

1.1 Contesto normativo

L'alimentazione rappresenta da sempre un problema fondamentale per la sopravvivenza e lo sviluppo dell'uomo. Gli alimenti scelti e consumati variano in relazione a vari fattori economici, demografici e sociali che caratterizzano le diverse popolazioni (livello di reddito, struttura della popolazione, tradizioni culturali, usi, abitudini, credenze religiose). Indipendentemente da quali alimenti si consumano è indispensabile che ogni prodotto alimentare sia **sicuro** e quindi esente dai rischi di provocare danni alla salute del consumatore.

Tra i rischi legati all'alimentazione quello microbiologico viene identificato, da esperti scientifici, come il più preoccupante anche se non viene così percepito dalla popolazione. In effetti il rischio microbiologico è classificato all'ultimo posto, mentre i rischi maggiori vengono associati ai pericoli chimici (pesticidi e inquinamento), nutrizionali e al problema delle frodi (Zavanella M. et al., 2008).

In ambito europeo, le istituzioni comunitarie hanno già da tempo introdotto nella normativa sulla sicurezza alimentare i concetti di "*risk analysis*" e "*risk assessment*". Il Regolamento (CE) n. 178 del 28 gennaio 2002, che stabilisce e fissa i requisiti generali della legislazione alimentare, comprese le procedure nel campo della sicurezza alimentare, individua nell'Analisi del Rischio il modello operativo di riferimento e stabilisce che gli alimenti non possono essere immessi sul mercato se sono a rischio. (Reg. (CE) n. 178/2002).

La normativa europea riguardante la sicurezza alimentare ha completato il suo riassetto con l'entrata in vigore dal gennaio 2006 del "pacchetto igiene" (Reg. (CE) 852/2004, 853/2004, 854/2004, 882/2004) e del Reg. (CE) 2073/2005. In questo contesto si inseriscono i nuovi metodi e criteri per giudicare l'innocuità degli alimenti contenenti microrganismi o residui potenzialmente pericolosi. La metodica da utilizzare sarà quindi la valutazione del rischio legata al consumo dell'alimento (Nuvoloni R. et al., 2006).

Questi regolamenti rappresentano un fondamentale cambiamento nella produzione alimentare ed il produttore - OSA - (Operatore del Settore Alimentare) diventa sempre più l'attore principale del proprio processo produttivo e primo responsabile

della sicurezza degli alimenti da lui prodotti. Secondo il concetto di *risk analysis* l'OSA dovrà valutare con metodi scientifici i pericoli legati al consumo del proprio prodotto e dovrà quindi conoscere:

1. le caratteristiche fisiche, chimiche e microbiologiche del prodotto ed i rischi associati;
2. stabilire la durata del prodotto e le corrette modalità di conservazione;
3. capire cosa succede al prodotto quando è correttamente conservato e quando vi siano situazioni di abuso, che a volte riflettono la realtà distributiva e domestica;
4. definire e comunicare al consumatore le corrette condizioni di conservazione ed utilizzo.

Un aspetto particolare per gli alimenti pronti al consumo "*ready-to-eat*", definiti dal Reg. (CE) 2073/2005 come 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*", è la valutazione della presenza di *Listeria monocytogenes*. Con il Reg. (CE) 2073/2005, l'innocuità del consumo di un alimento non è più strettamente legata alla produzione di un prodotto privo di tale patogeno, ma è stabilita sulla base della probabilità che la sua presenza possa causare un danno reale alla salute del consumatore. Con il Regolamento (CE) 2073/2005 si differenziano le tipologie di alimenti in quelli che costituiscono e quelli che non costituiscono terreno favorevole alla crescita di *Listeria monocytogenes*, e vengono stabiliti dei differenti limiti. L'OSA potrà pure mettere in commercio prodotti con presenza di *Listeria monocytogenes* entro i limiti di 100 unità formanti colonia per grammo (ufc/g) purché dimostri, per quelli che costituiscono terreno favorevole alla *Listeria monocytogenes*, "*con soddisfazione dell'autorità competente, che il prodotto non supererà tale limite durante il periodo di conservabilità*" (Reg. (CE) 2073/2005).

1.2 Considerazioni generali sugli alimenti pronti al consumo e relativa *shelf-life*.

I prodotti di gastronomia sono un gruppo molto eterogeneo di prodotti alimentari, che subiscono una forte manipolazione ed elaborazione prima di essere pronti per il consumo. Spesso derivano da una mescolanza di vari ingredienti di diversa natura e sono frequentemente ricchi di germi, derivanti dalle materie prime e dalla lavorazione (Zavanella M. et al., 2008).

Con il termine *shelf-life* viene intesa tutta la vita commerciale dell'alimento dal momento in cui viene prodotto fino a quando viene consumato, o fino al raggiungimento della data di scadenza o del termine minimo di conservazione. Concettualmente per *shelf-life* si intende quel periodo durante il quale il prodotto mantiene un livello di qualità accettabile sia dal punto di vista sensoriale che di sicurezza. Si accetta che durante questo periodo l'alimento cambi le sue caratteristiche, ma sempre entro certi limiti e senza comprometterne la qualità complessiva (Giaccone V., 15.05.08).

Il deperimento di un alimento caratterizza la *shelf-life* del prodotto ed è legato a vari aspetti tra i quali: la senescenza che riguarda la naturale attività enzimatica di invecchiamento di un prodotto; il deperimento biologico che va tenuto in considerazione soprattutto per alimenti deperibili come i prodotti di gastronomia; il deperimento chimico legato principalmente alle reazioni enzimatiche e ossidative; alterazioni fisiche; consistenza/viscosità come nei prodotti emulsionati tipo maionese dove si può avere separazione fisica tra componenti del prodotto; cambiamenti sensoriali legati allo sviluppo di aromi e gusti per varie reazioni

Le problematiche relative alla *shelf-life* sono sempre più studiate ed analizzate anche per l'aumento della richiesta da parte del consumatore di alimenti pronti all'uso e sicuri dal punto di vista igienico sanitario. La valutazione della *shelf-life* si può studiare e calcolare attraverso test acceleratori di *shelf-life*, che riducono i tempi di studio, o attraverso sperimentazioni che consistono nell'esaminare il prodotto periodicamente sino alla fine della sua *shelf-life*, considerando anche reali condizioni di distribuzione. Questo aspetto riguarda in modo particolare gli alimenti pronti refrigerati, che possono vivere situazioni di abuso termico in cui non viene rispettata

la temperatura di conservazione raccomandata con conseguenze importanti sulla durabilità del prodotto (Porretta S., 2008).

La determinazione della *shelf-life* di un prodotto e la valutazione della sua innocuità igienico-sanitaria viaggiano di pari passo e sono due aspetti inscindibili di un alimento (Giaccone V., 03.07.08).

Dal punto di vista microbiologico il Reg. CE. 2073/05 si sofferma su alcuni parametri e lascia spazio all'Autorità Sanitaria e al produttore per effettuare altri accertamenti ritenuti necessari per la valutazione della salubrità degli alimenti e l'igiene della produzione. Per la tipologia dei prodotti di gastronomia vengono consigliate le ricerche di: carica batterica totale (CBT), Stafilococchi coagulasi positivi, *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, Clostridi solfito riduttori (Zavanella M. et al. 2008).

Tra i gruppi microbici più alteranti vi sono le Pseudomonadacee, gli Enterobatteri totali e i coliformi, i batteri lattici omo- ed eterofermenti, e i lieviti (Giaccone V., 15.05.08). In particolare i lieviti e i lactobacilli rappresentano le principali cause di contaminazione delle salse e condimenti (Porretta S., 2008).

1.3 Considerazioni sui *challenge tests*.

Il *challenge test* è sempre più considerato importante per i controlli delle produzioni alimentari e costituisce una garanzia per l'innocuità dell'alimento. E' un metodo previsto e richiamato dall'art. 3 del Reg. (CE) 2073/05 che dà la possibilità all'OSA di effettuare studi per verificare il rispetto dei criteri di sicurezza durante la vita commerciale del prodotti, in particolare per gli alimenti pronti che costituiscono terreno favorevole per la crescita di *Listeria monocytogenes*.

Sul significato di *challenge test* non c'è uniformità di traduzione: viene tradotto sia con prove di contaminazione sperimentale che con prove di inoculazione sperimentale. Comunque venga tradotto, esso consiste nell'inserire in un alimento una quantità nota di un microrganismo o di un composto per poi valutarne analiticamente il decorso nel tempo. Questo permette di capire il comportamento del batterio o del composto in quello specifico substrato. Può essere utilizzato sia per capire l'efficacia di un trattamento sia per capire come si evolve nel tempo ed in determinate condizioni, il microrganismo o composto inserito. E' importante

pianificare bene un *challenge test* in quanto i risultati che si ottengono possono essere molto diversi.

Attualmente in Italia non esistono linee guida o norme specifiche che riportino modelli di come deve essere effettuato un *challenge test*. A livello internazionale, alcuni autori statunitensi hanno tracciato delle possibili linee guida.

In linea di massima si descrivono alcune considerazioni generali (Giaccone V., 15.05.08):

- Alcuni autori (Scott. V. et al.,2005) suggeriscono di utilizzare ceppi standard ed almeno 3-5 ceppi dello stesso batterio, effettuando delle prove preliminari per verificare che i vari ceppi non siano in competizione tra loro.
- È opportuno utilizzare un ceppo già isolato nella matrice da osservare e non è consigliato l'uso di ceppi surrogati (es. *Listeria innocua*) che possono evidenziare comportamenti non appropriati o simili.
- Per valutare il comportamento di *Listeria monocytogenes* in alimenti pronti, si deve tenere conto che le cariche che generalmente si riscontrano sono molto basse, meno di 10 UFC/g.
- L'inoculazione può avvenire con vari metodi in funzione del tipo di alimento.
- Nel programmare il *challenge test* in alimenti refrigerati si dovrà tenere in considerazione che spesso la conservazione non avviene alla temperatura indicata, ma in situazioni di abuso (+8/+10°C) e quindi si dovranno eseguire prove anche a quelle temperature.
- Si consiglia inoltre di effettuare prove anche oltre il termine stabilito di vita commerciale.

1.4 Alterazioni causate dalla presenza di microrganismi

La velocità di comparsa delle alterazioni non è costante e varia in funzione di più fattori e del tipo di alimento. In linea generale aumenta in modo proporzionale al numero e al metabolismo dei microrganismi presenti, e in modo inversamente proporzionale alle condizioni che ostacolano lo sviluppo dei microbi presenti (Tiecco G. 2001).

I microrganismi utilizzano le sostanze presenti nell'alimento per il loro metabolismo degradando zuccheri, proteine e lipidi.

Dai carboidrati si generano: acido lattico, acido acetico, acido butirrico, etanolo, CO₂ e altri ancora. Tali composti portano ad una acidificazione dell'alimento e modifiche sensoriali.

Dalle proteine si generano urea, ammoniaca, ammine; dagli amminoacidi si formano composti solforati. Questi composti portano a modifiche sensoriali con sviluppo di odori e possibili cambiamenti di colore.

Dai lipidi si originano aldeidi e chetoni con sviluppo di aromi sgradevoli di rancido. I germi psicrofili del gruppo Pseudomonadacee spesso producono pigmenti e portano a variazioni del pH e comparsa di cattivi odori (ammoniacale, solforoso, di acido butirrico, etc).

Le Enterobatteriacee (Enterobatteri totali) sono indesiderabili perché tra loro troviamo dei patogeni e perché con il loro metabolismo proteolitico, saccarolitico e/o lipidico degradano le caratteristiche sensoriali.

I Batteri lattici producono acidi organici, aldeidi, chetoni con sviluppo di sapori sgradevoli di rancido e senso di acidificazione (Giaccone V. 2007).

I lieviti provocano cambiamenti indesiderabili di due tipi: uno estetico (pellicola sulla superficie), e uno sensoriale per aumento del pH e sviluppo di aromi particolari. Le muffe si adattano bene al substrato e sono in grado di trasformare la maggior parte degli elementi alimentari. Le modifiche che inducono si traducono in alterazioni delle caratteristiche organolettiche (Bourgeois C. M et al 1990).

La carica microbica mesofila viene utilizzata come indice generico, indicatore di processo e molto cautamente come indicatore di possibile presenza di patogeni.

Per quanto riguarda i livelli di carica microbica, in linea di massima si rileva che in un alimento le prime alterazioni si hanno con una carica microbica superiore a 10⁶-10⁷ UFC/gr.; a valori poco inferiori si considera l'alimento ancora edibile anche se di qualità scadente (Tiecco G. 2001).

Le seguenti tabelle riportano alcuni parametri di riferimento.

Tab.1-Schema di valutazione indicativo di alimenti sottoposti a cottura (Tiecco G. 2001).

UFC/g di carica batterica	Qualità dell'alimento
10^3	Ottimo
10^4	Buono
10^5	Discreto
10^6	Scadente
10^7	Pessimo
5×10^7	Alterato

Tab. 2-Limiti ricavati da standard ufficiali o proposti in più parti del mondo (Tiecco G. 2001).

Piatti pronti	C.M.T. u.f.c./g.	Enterobatteri o coliformi u.f.c./g.	<i>E. coli</i> o fecali u.f.c./g.	<i>Clostridium perfringens</i> u.f.c./g.	<i>Bacillus cereus</i> u.f.c./g.	<i>Staf. aureus</i> u.f.c./g.	Muffe u.f.c./g
Cotti e refrigerati	$10^5 - 10^6$	10^2	10	$10^2 - 10^3$	$10^3 - 10^4$	$10^2 - 10^3$	10^3
Refrigerati con uno o più componenti	10^8	10^4	----	$10^2 - 10^3$	$10^3 - 10^4$	$10^2 - 10^3$	10^3

Tab. 3-Possibili limiti di qualità per alcuni germi patogeni veicolati con gli alimenti (Tiecco G. 2001).

Microrganismo	Possibile valore accettabile
<i>Bacillus cereus</i>	$<10^2$ u.f.c./g.
<i>Clostridium perfringens</i>	$<10^2$ u.f.c./g.
<i>Escherichia coli</i>	<10 u.f.c./g.
<i>Staphylococcus aureus</i>	$<10^2$ u.f.c./g.

2. SCOPO DELLA TESI

La sperimentazione svolta segue quelli che sono i nuovi concetti introdotti dalla normativa comunitaria, finalizzati a garantire la sicurezza degli alimenti.

Rispecchia quanto evidenziato da un gruppo di esperti scientifici sui pericoli biologici e sul rischio di *Listeria monocytogenes* legato al consumo di alimenti pronti. Tenuto conto che:

- dopo una regressione negli anni '90, il numero di casi di listeriosi è aumentato dal 2000 a causa dell'aumento del consumo di alimenti pronti che costituiscono terreno favorevole alla crescita di *Listeria monocytogenes*;
- la crescita del batterio è legata al tipo di alimento, al tempo e alla temperatura di conservazione soprattutto nei frigoriferi domestici;
- i casi di listeriosi sono associati al consumo di cibi contaminati con cariche nettamente superiori agli attuali limiti legislativi;

vi è la necessità di approfondire gli studi sui cibi pronti al consumo che costituiscono terreno favorevole allo sviluppo di *Listeria monocytogenes* per ridurre o capire il potenziale di crescita del microorganismo e migliorare la consulenza sulla conservazione e sullo stoccaggio di tali alimenti (EFSA JOURNAL, 2008).

In particolare questo lavoro ha lo scopo di controllare, dal punto di vista microbiologico, lo stato igienico sanitario di un prodotto di gastronomia pronto al consumo “*ready-to-eat*” (vitello tonnato), prodotto da una azienda alimentare per:

- Valutare la conservabilità del prodotto durante la vita di scaffale (“*shelf-life*”);
- Valutare l'evoluzione dei parametri microbiologici durante la fase di conservazione in diverse condizioni di temperatura;
- Valutare la prevalenza di *Listeria monocytogenes*;

- Studiare, dopo opportuna contaminazione in laboratorio con ceppi di collezione e/o di campo (*challenge test*), la dinamica di *Listeria monocytogenes* per stabilire se l'alimento costituisce o meno terreno favorevole alla crescita di questo microorganismo in funzione delle condizioni di conservazione.

3. MATERIALI E METODI

La ricerca ha preso in considerazione due lotti di produzione di vitello tonnato commercializzato in confezioni sottovuoto da 200 g e con una *shelf-life* dichiarata di 30 gg.

3.1 Caratteristiche del prodotto alimentare oggetto della ricerca

- Ingredienti: bovino cotto 45% (magatello, sale), salsa tonnata, capperi. (Ingredienti della salsa tonnata: maionese, tonno all'olio di oliva 15%, capperi, filetti di acciuga; ingredienti della maionese: olio di semi di girasole, uova pastorizzate, aceto di vino bianco, sale, saccarosio, senape, succo di limone, addensante - E415, conservanti - E330, E200; ingredienti della senape: acqua, semi di senape, aceto di acquavite, sale, sciroppo di zucchero caramellato, estratto di spezie);
- Processo produttivo: il magatello cotto viene tagliato a fettine e, dopo aver preparato la salsa tonnata, si dispongono ordinatamente le fettine nella vaschetta e si guarnisce con la salsa tonnata. Successivamente il preparato viene confezionato in vaschette sottovuoto e stoccato in frigorifero (+1/+4°C);
- Shelf-life: 30 gg.
- Temperatura di conservazione: tra +1°C e +4°C;
- Caratteristiche microbiologiche (valori alla spedizione):
Microrganismi mesofili a 30°C < 500.000 ufc/g
Coliformi totali <1000 ufc/g
Escherichia coli <10 ufc/g
Staphylococcus aureus <100 ufc/g
Salmonella spp. assente/25 g
Listeria monocytogenes assente/25 g
- Caratteristiche organolettiche:
Aroma: delicato con profumo di tonno; Colore: tinta delicata
Sapore: tipico della carne di vitello miscelata con salsa tonnata
Aspetto: fettine di vitello ordinatamente disposte con salsa
Consistenza: salda e tenera del vitello, denso della salsa

3.2 Tipologia dei campioni

Sono stati esaminati due lotti di produzione; per ciascun lotto sono stati prelevati 60 campioni, e analizzati tenendo in considerazione due variabili, il tempo e la temperatura di conservazione (Tab.4).

Come suggerito da vari autori (Man et al. 1994; Betts G.D et al. 2004), il prodotto è stato analizzato in diversi momenti del periodo di conservabilità:

all'inizio della *shelf-life* : tempo 0 (momento della produzione),

ad un quarto della *shelf-life* (dopo circa 1 settimana dalla produzione)

a metà della *shelf-life* (dopo circa 2 settimane dalla produzione)

a tre quarti della *shelf-life* (dopo circa 3 settimane dalla produzione)

a fine della *shelf-life* (dopo circa 4 settimane dalla produzione)

oltre il termine della *shelf-life* (dopo circa 5 settimane dalla produzione).

Per l'intero periodo della sperimentazione i campioni sono stati conservati in laboratorio a due temperature: una riproduceva la condizione di refrigerazione indicata dal produttore e riportata in etichetta (+1°C/+4°C), l'altra la condizione di refrigerazione domestica (+7°C/+10°C; Comunicazione del Ministero della Salute del 24/04/08). In particolare i campioni del primo lotto sono stati conservati a +3°C e a +7°C, quelli del secondo lotto a +3°C e a +9°C.

Tab. 4-Piano di campionamento I° e II° lotto

Fasi della <i>shelf-life</i> del prodotto in cui sono state eseguite le prove	Temperatura di conservazione dei campioni		Temperatura di conservazione dei campioni		Numero di campioni esaminati
	I° lotto		II° lotto		
1. Inizio della <i>shelf-life</i> (Tempo zero)	3±1°C	7±1°C	3±1°C	9±1°C	5 per ogni temperatura
2. Fase intermedia 1 (dopo 1 settimana)	3±1°C	7±1°C	3±1°C	9±1°C	5 per ogni temperatura
3. Metà <i>shelf-life</i> (dopo 2 settimane)	3±1°C	7±1°C	3±1°C	9±1°C	5 per ogni temperatura
4. Fase intermedia 2 (dopo 3 settimane)	3±1°C	7±1°C	3±1°C	9±1°C	5 per ogni temperatura
5. Fine della <i>shelf-life</i> (dopo 4 settimane)	3±1°C	7±1°C	3±1°C	9±1°C	5 per ogni temperatura
6. Oltre la <i>shelf-life</i> prevista (dopo 5 settimane)	3±1°C	7±1°C	3±1°C	9±1°C	5 per ogni temperatura

3.3 Parametri e metodi analitici

Per tutti i campioni di entrambi i lotti sono stati valutati i seguenti parametri microbiologici, oltre a pH ed a_w (attività dell'acqua):

- *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes* (criteri di sicurezza Reg. CE. 2073/05);
- microorganismi mesofili a 30°C, batteri lattici a 30°C, stafilococchi coagulasi positivi, *Pseudomonas spp.*, enterobatteri, *Escherichia coli* β -glucuronidasi positivi (Reg. (CE) 2073/05), muffe e lieviti, *Bacillus cereus*, clostridi solfito riduttori (criteri di igiene di processo e di conservabilità).

Nelle tab. 5 e 6 sono riportati i metodi analitici adottati nella ricerca.

Tab. 5-Metodi analitici adottati (criteri di sicurezza)

Parametro	Metodo di prova
<i>Listeria monocytogenes</i>	<p>ISO 11290-1:1996 - Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the detection and enumeration of <i>Listeria monocytogenes</i>. Part 1: Detection method</p> <p>Amendment 1:2004 - Modification of the isolation media and haemolysis test, and inclusion of precision data</p>
<i>Listeria monocytogenes</i>	<p>ISO 11290-2 :1998 - Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the detection and enumeration of <i>Listeria monocytogenes</i>. Part 2: Enumeration method</p> <p>Amendment 1:2004 - Modification of the enumeration medium</p> <p>Nota 6 Reg.2073: 1 ml di inoculo viene posto su una piastra di Petri di 140 mm di diametro o su tre piastre di Petri di 90 mm di diametro</p>
<i>Salmonella spp</i>	<p>ISO 6579:2002 - Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the detection of <i>Salmonella</i> spp.</p> <p>Technical corrigendum 1: 2004</p>

Tab. 6-Metodi analitici adottati (criteri di igiene di processo e di conservabilità)

Parametro	Metodo di prova
Microorganismi mesofili a 30°C	ISO 4833:2003 - Microbiology of food and animal feeding stuffs Horizontal method for the enumeration of microorganisms – Colony-count technique at 30°C
Batteri lattici a 30°C	PDP BAT 08 rev 00 MRSBL 30°C per 72h in aerobiosi
Stafilococchi coagulasi positivi	ISO 6888-2:1999 - Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (<i>Staphylococcus aureus</i> and other species). Part 2: Technique using rabbit plasma fibrinogen agar medium Amendment 1:2003 – Inclusion of precision data
<i>Pseudomonas spp.</i>	ISO 13720:1995 Meat and meat products-Enumeration of <i>Pseudomonas spp.</i>
Enterobatteri	ISO 21528-2:2004 - Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae. Part 2: Colony-count method
<i>E. coli</i> β-glucuronidasi positivi	ISO 16649-2:2001 - Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the enumeration of β-glucuronidase-positive <i>Escherichia coli</i> . Part 2: Colony-count technique at 44°C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide
Muffe e lieviti	PDP BAT 16 rev 09 Rose Bengala Cloramfenicolo Agar 25°C per 3-5 gg
<i>Bacillus cereus</i>	PDP BAT 26 rev 07 BC Agar 32°C per 24-48h
Clostridi solfito-riduttori	PDP BAT 09 rev 09 SPS Agar 37°C per 20h in anaerobiosi
a _w	PDP BAT 27 rev 06
pH	PDP BAT 28 rev 07 (I° lotto) + ISO 2917:1999 (II° lotto)

NOTA PDP BAT (procedura di prova batteriologica), 00 (numero), rev 00 (n. di revisione), altre sigle indicano i tipi di terreni usati .

Nella prima sessione analitica (I° lotto) tutte le prove sono state effettuate su una aliquota di campione prelevata dalla confezione madre e ritenuta rappresentativa dell'intera massa. Nella seconda sessione di prove (II° lotto), per aumentare la ripetibilità dei risultati, si è deciso di utilizzare l'intero contenuto della confezione da 200 g di vitello tonnato costituente ciascun campione. Il tutto è stato omogenato e da qui poi si sono prelevate le aliquote per le varie prove (quantitative, qualitative e chimiche).

I risultati analitici sono stati sottoposti a test statistici (test non parametrico di Wilcoxon-Mann-Whitney) per verificare eventuali differenze significative tra i valori osservati alle due diverse temperature, e tra i valori osservati alla medesima temperatura, ma in momenti diversi della *shelf-life*.

3.4 Protocollo operativo per *challenge test* con *Listeria monocytogenes*

Sui campioni appartenenti al secondo lotto è stato effettuato anche un *challenge test* con *Listeria monocytogenes* utilizzando un ceppo isolato precedentemente da un campione positivo del primo lotto.

Il prodotto è stato inoculato in laboratorio con quantità note di microrganismo e sottoposto a successive analisi per verificare la dinamica di crescita o sopravvivenza in funzione del tempo e delle diverse condizioni di conservazione

3.4.1 Protocollo di lavoro:

A) Contaminazione sperimentale in laboratorio di 112 campioni sottovuoto di vitello tonnato da 25g (preparati rispettando il rapporto dichiarato dal produttore: vitello 45%, salsa 55% e utilizzando dei sacchetti da omogeneizzatore peristaltico “stomacher”). Dei 112 campioni:

► 55 sono stati inoculati con carica di *Listeria monocytogenes* (ceppo isolato da campione di vitello tonnato del precedente campionamento) inferiore a 10 unità formanti colonia/grammo (UFC/g);

► 55 sono stati inoculati con carica di *Listeria monocytogenes* (ceppo isolato da campione di vitello tonnato del precedente campionamento) pari a 10-20 UFC/g;

► 2 NON sono stati inoculati perché sono stati utilizzati come controllo negativo.

L'inoculo è stato preparato a partire da colonie di *Listeria monocytogenes* isolate su terreno selettivo ALOA e sospese in soluzione fisiologica; la sospensione così ottenuta è stata letta allo spettrometro per la quantificazione delle cellule batteriche presenti; da qui sono poi state allestite delle diluizioni in modo da ottenere dopo l'inoculo cariche pari a <10 ufc/g di alimento e 10-20 ufc/g di alimento.

L'inoculo è stato iniettato mediante siringa direttamente nella carne e nella salsa, all'interno della confezione da 25g.

B) Confezionamento sottovuoto dei sacchetti da stomacher con i campioni di vitello tonnato da 25 g.

C) Conservazione dei 112 campioni a due diverse temperature di refrigerazione:

► 61 a +3°C (Temperatura di conservazione conforme a quanto riportato in etichetta 1-4°C)

► 51 a +9°C (Temperatura di conservazione più simile alla refrigerazione domestica)

D) Fase analitica. I campioni sono stati esaminati per il parametro *Listeria monocytogenes* a 37°C (quantitativa ISO 11290-2:1996 + Amd 1:2004) in diverse fasi della loro vita commerciale (tab. 7).

E) In ogni sessione analitica sono stati esaminati 5 campioni inoculati con carica <10 ufc/g di *L. monocytogenes* e 5 con carica >10 ufc/g, per ciascuna temperatura di conservazione.

F) I controlli negativi sono stati analizzati uno all'inizio del periodo di osservazione (tempo 0) e l'altro alla fine, dopo averlo conservato alla temperatura più alta ($9\pm 1^\circ\text{C}$).

G) Allo scopo di recuperare tutte le colonie introdotte nel campione con l'inoculo, nell'allestimento della prova sono stati analizzati tutti i 25 g di vitello tonnato della confezione, e il brodo di prearricchimento è stato aggiunto direttamente dentro al sacchetto da stomacher.

Tab. 7-Piano di campionamento per il *challenge test* con *Listeria monocytogenes*

Fasi della <i>shelf-life</i> del prodotto in cui sono state eseguite le prove	Carica presunta dell'inoculo UFC/g		Temperatura di conservazione dei campioni		Numero di campioni esaminati
1. Controllo negativo. Inizio della <i>shelf-life</i> (Tempo zero)	--		$3\pm 1^\circ\text{C}$		1
2. Inizio della <i>shelf-life</i> (Tempo zero)	<10	>10	$3\pm 1^\circ\text{C}$		5 per ogni carica
3. Fase intermedia 1 (dopo 1 settimana)	<10	>10	$3\pm 1^\circ\text{C}$	$9\pm 1^\circ\text{C}$	5 per ogni carica e per ogni temperatura
4. Metà <i>shelf-life</i> (dopo 2 settimane)	<10	>10	$3\pm 1^\circ\text{C}$	$9\pm 1^\circ\text{C}$	5 per ogni carica e per ogni temperatura
5. Fase intermedia 2 (dopo 3 settimane)	<10	>10	$3\pm 1^\circ\text{C}$	$9\pm 1^\circ\text{C}$	5 per ogni carica e per ogni temperatura
6. Fine della <i>shelf-life</i> (dopo 4 settimane)	<10	>10	$3\pm 1^\circ\text{C}$	$9\pm 1^\circ\text{C}$	5 per ogni carica e per ogni temperatura
7. Oltre la <i>shelf-life</i> prevista (dopo 5 settimane)	<10	>10	$3\pm 1^\circ\text{C}$	$9\pm 1^\circ\text{C}$	5 per ogni carica e per ogni temperatura
8. Controllo negativo Oltre la <i>shelf-life</i> prevista (dopo 5 settimane)	--		$9\pm 1^\circ\text{C}$		1

4. RISULTATI

In questo capitolo vengono esposte le tabelle relative ai risultati analitici ottenuti dai campioni esaminati, secondo il seguente ordine:

1. dalla tabella n. 8 (pag. 20) alla tabella n. 17 (pag. 29) vengono esposti i valori dei 60 campioni relativi al I° lotto;
2. dalla tabella n. 18 (pag. 30) alla tabella n. 25 (pag. 37) vengono esposti i valori dei 60 campioni relativi al II° lotto;
3. nella tabella n. 26 (pag. 38) vengono esposti i valori dei 112 campioni relativi al *challenge test* con *Listeria monocytogenes*.

Tab. 8: I° lotto - valori di a_w

settimane di vita	cons. a 3°C	media	cons. a 7°C	media
	Aw			
0	0,99	0,97	0,96	0,95
	0,99		0,96	
	0,95		0,96	
	0,95		0,94	
	0,96		0,95	
1	0,97	0,97	0,98	0,97
	0,96		0,97	
	0,97		0,97	
	0,98		0,97	
	0,97		0,97	
2	0,97	0,96	0,97	0,96
	0,95		0,96	
	0,96		0,96	
	0,95		0,96	
	0,98		0,96	
3	0,98	0,95	0,96	0,95
	0,95		0,96	
	0,95		0,94	
	0,95		0,95	
	0,94		0,95	
4	0,94	0,93	0,94	0,94
	0,93		0,93	
	0,93		0,93	
	0,93		0,94	
	0,92		0,94	
5	0,90	0,90	0,93	0,92
	0,90		0,92	
	0,91		0,91	
	0,90		0,91	
	0,90		0,92	
media	0,95	0,95	0,95	0,95
minimo	0,90	0,90	0,91	0,92
massimo	0,99	0,97	0,98	0,97

Tab. 9: I° lotto - valori di pH

settimane di vita	cons. a 3°C	media	cons. a 3°C	media	cons. a 7°C	media	cons. a 7°C	media	cons. a 3°C	media	cons. a 7°C	media
	pH maionese		pH carne		pH maionese		pH carne		pH			
0									6,9	6,0	5,6	5,6
									5,7		5,5	
									5,8		5,8	
									6,3		5,7	
									5,3		5,2	
1									6,4	5,6	5,5	5,7
									5,5		6,4	
									5,8		5,4	
									5,8		5,6	
									4,3		5,6	
2	4,9	5,2	5,9	6,0	4,8	5,0	5,7	5,5	5,4	5,6	5,3	5,2
	5,4		6,3		5,0		5,4		5,2			
	5,2		5,9		5,0		5,5		5,6		5,3	
	5,2		5,7		5,0		5,5		5,5		5,3	
	5,4		6,4		5,2		5,3		5,9		5,3	
3	5,3	5,1	5,8	5,5	4,9	4,9	5,3	5,5	5,6	5,3	5,1	5,2
	5,0		5,2		5,0		5,4		5,2			
	5,1		5,2		4,9		5,3		5,2		5,1	
	5,0		5,5		4,9		6,0		5,3		5,5	
	5,0		6,0		4,9		5,6		5,5		5,3	
4	5,1	5,1	5,5	5,7	5,1	5,0	6,0	5,6	5,3	5,4	5,6	5,3
	5,2		5,9		5,1		5,9		5,6			
	5,0		5,4		4,9		5,1		5,2		5,0	
	5,2		6,1		4,9		5,5		5,7		5,2	
	5,0		5,4		4,9		5,3		5,2		5,1	
5	5,2	5,2	5,5	5,6	4,9	4,9	5,4	5,3	5,4	5,4	5,2	5,1
	5,2		5,9		4,9		5,5		5,6		5,2	
	5,2		5,3		5,0		5,3		5,3		5,2	
	5,2		5,9		4,9		5,1		5,6		5,0	
	5,2		5,5		4,9		5,3		5,4		5,1	
media	5,2	5,2	5,7	5,7	5,0	5,0	5,5	5,5	5,5	5,5	5,4	5,4
minimo	4,9	5,1	5,2	5,5	4,8	4,9	5,1	5,3	4,3	5,3	5,0	5,1
massimo	5,4	5,2	6,4	6,0	5,2	5,0	6,0	5,6	6,9	6,0	6,4	5,7

Tab. 10: I° lotto - valori di *Salmonella* e *Listeria monocytogenes*

settimane di vita	cons. a 3°C	cons. a 7°C	cons. a 3°C	cons. a 7°C	cons. a 3°C	media	cons. a 7°C	media
	Salmonella		<i>Listeria m. qualitativa</i>		<i>Listeria m. quantitativa (ufc/g)</i>			
0	Assente	Assente	Assente	Assente	<10	<10	<10	<10
	Assente	Assente	Assente	Assente	<10		<10	
	Assente	Assente	Assente	Assente	<10		<10	
	Assente	Assente	Assente	Assente	<10		<10	
	Assente	Assente	Assente	Assente	<10		<10	
1	Assente	Assente	Assente	Assente	<10	<10	<10	<10
	Assente	Assente	Assente	Assente	<10		<10	
	Assente	Assente	Assente	Assente	<10		<10	
	Assente	Assente	Assente	Assente	<10		<10	
	Assente	Assente	Assente	Assente	<10		<10	
2	Assente	Assente	Assente	Assente	<10	<10	<10	<10
	Assente	Assente	Assente	Assente	<10		<10	
	Assente	Assente	Assente	Assente	<10		<10	
	Assente	Assente	Assente	Assente	<10		<10	
	Assente	Assente	Assente	Assente	<10		<10	
3	Assente	Assente	Assente	Assente	<10	<10	<10	<10
	Assente	Assente	Assente	Assente	<10		<10	
	Assente	Assente	Assente	Assente	<10		<10	
	Assente	Assente	Assente	Assente	<10		<10	
	Assente	Assente	Assente	Assente	<10		<10	
4	Assente	Assente	Assente	Assente	<10	<10	<10	<10
	Assente	Assente	Assente	Assente	<10		<10	
	Assente	Assente	Assente	Assente	<10		<10	
	Assente	Assente	Assente	Assente	<10		<10	
	Assente	Assente	Assente	Assente	<10		<10	
5	Assente	Assente	Assente	Assente	<10	<10	<10	<10
	Assente	Assente	Presente	Assente	<10		<10	
	Assente	Assente	Assente	Assente	<10		<10	
	Assente	Assente	Assente	Assente	<10		<10	
	Assente	Assente	Assente	Assente	<10		<10	
media	Assente	Assente	Assente	Assente	<10	<10	<10	<10
minimo	Assente	Assente	Assente	Assente	<10	<10	<10	<10
massimo	Assente	Assente	Presente	Assente	<10	<10	<10	<10

Tab. 11: I° lotto - valori di Microrganismi mesofili (CMT) a 30° C.

settimane di vita	cons. a 3°C	media	media log		cons. a 7°C	media	media log
	CMT (ufc/g)						
0	26.000	10.160	1,0E+04		15.000	30.400	3,0E+04
	4.500				5.000		
	5.500				100.000		
	10.000				14.000		
	4.800				18.000		
1	180.000	1.396.000	1,4E+06	>	1.000.000	1.000.000	1,0E+06
	2.700.000				1.000.000		
	1.800.000				1.000.000		
	1.200.000				1.000.000		
	1.100.000				1.000.000		
2	170.000.000	119.000.000	1,2E+08		200.000.000	216.000.000	2,2E+08
	160.000.000				210.000.000		
	53.000.000				210.000.000		
	92.000.000				240.000.000		
	120.000.000				220.000.000		
3	350.000.000	238.000.000	2,4E+08		370.000.000	288.000.000	2,9E+08
	310.000.000				260.000.000		
	190.000.000				310.000.000		
	150.000.000				170.000.000		
	190.000.000				330.000.000		
4	230.000.000	222.000.000	2,2E+08		440.000.000	456.000.000	4,6E+08
	360.000.000				350.000.000		
	170.000.000				640.000.000		
	180.000.000				570.000.000		
	170.000.000				280.000.000		
5	30.000.000.000*	447.500.000	4,5E+08		390.000.000	308.000.000	3,1E+08
	990.000.000				310.000.000		
	250.000.000				400.000.000		
	360.000.000				270.000.000		
	190.000.000				170.000.000		
media	1.156.401.027	171.317.693			211.505.067	211.505.067	
minimo	4.500	10.160			5.000	30.400	
massimo	30.000.000.000	447.500.000			640.000.000	456.000.000	

* valore anomalo non considerato nella media

Tab. 12: I° lotto - valori di Batteri Lattici a 30°C

settimane di vita	cons. a 3°C	media	media log		cons. a 7°C	media	media log
	Batteri lattici (ufc/g)						
0	17.000	6.420	6,4E+03		10.000	13.840	1,4E+04
	1.700			2.000			
	1.600			40.000			
	10.000			4.200			
	1.800			13.000			
1	160.000	1.390.000	1,4E+06	>	1.000.000	1.000.000	1,0E+06
	2.700.000			>	1.000.000		
	2.200.000			>	1.000.000		
	1.300.000			>	1.000.000		
	590.000			>	1.000.000		
2	170.000.000	109.200.000	1,1E+08		210.000.000	210.000.000	2,1E+08
	120.000.000			200.000.000			
	46.000.000			210.000.000			
	90.000.000			230.000.000			
	120.000.000			200.000.000			
3	370.000.000	204.000.000	2,0E+08		100.000.000	137.600.000	1,4E+08
	270.000.000			68.000.000			
	90.000.000			250.000.000			
	60.000.000			90.000.000			
	230.000.000			180.000.000			
4	120.000.000	160.000.000	1,6E+08		380.000.000	302.500.000	3,0E+08
	270.000.000			310.000.000			
	120.000.000			320.000.000			
	140.000.000			200.000.000			
	150.000.000			2.100.000.000*			
5	180.000.000	172.000.000	1,7E+08		330.000.000	258.000.000	2,6E+08
	130.000.000			290.000.000			
	190.000.000			290.000.000			
	190.000.000			240.000.000			
	170.000.000			140.000.000			
media	107.766.070	107.766.070		211.435.640	151.518.973		
minimo	1.600	6.420		2.000	13.840		
massimo	370.000.000	204.000.000		2.100.000.000	302.500.000		

* valore anomalo non considerato nella media

Tab. 13: I° lotto - valori di Lieviti e Muffe

settimane di vita	cons. a 3°C	media	media log	cons. a 7°C	media	media log	cons. a 3°C	media	cons. a 7°C	media
	Lieviti (ufc/g)						Muffe (ufc/g)			
	200	140	1,4E+02	200	300	3,0E+02	100	<100	<100	<100
	100			100			<100			
	200			1.000			100		<100	
	100			100			<100			
	100			100			<100			
1	1.900	1.040	1,0E+03	35.000	46.200	4,6E+04	<100	<100	<100	<100
	800			18.000			<100		<100	
	400			50.000			<100		<100	
	300			98.000			<100		<100	
	1.800			30.000			<100		<100	
2	80.000	35.240	3,5E+04	60.000	46.000	4,6E+04	<100	<100	<100	160
	25.000			70.000			<100		<100	
	9.200			30.000			<100		<100	
	50.000			40.000			<100		<100	
	12.000			30.000			<100		400	
3	180.000	300.000	3,0E+05	310.000	310.000	3,1E+05	<100	<100	100	160
	660.000			590.000			<100		<100	
	150.000			200.000			<100		400	
	210.000			230.000			<100		<100	
	1.500.000*			220.000			<100		<100	
4	990.000	308.600	3,1E+05	40.000	70.000	7,0E+04	200	120	100	125
	220.000			91.000			<100		100	
	28.000			45.000			100		100	
	65.000			82.000			<100		200	
	240.000			92.000			<100		1.600*	
5	180.000	61.800	6,2E+04	41.000	34.880	3,5E+04	<100	<100	100	140
	37.000			35.000			<100		<100	
	33.000			69.000			<100		<100	
	25.000			7.400			<100		300	
	34.000			22.000			<100		100	
media	157.803	117.803		84.563	84.563		<100	<100	180	131
minimo	<100	140		<100	300		<100	<100	<100	<100
massimo	1.500.000	308.600		590.000	310.000		200	120	1.600	160

* valore anomalo non considerato nella media

Tab. 14: I° lotto - valori di Clostridi Solfito Riduttori e *Bacillus Cereus*

settimane di vita	cons. a 3°C	media	cons. a 7°C	media	cons. a 3°C	media	cons. a 7°C	media
	Clostridi SR (ufc/g)				<i>Bacillus cereus</i> (ufc/g)			
0	<10	<10	<10	<10	<100	<100	<100	<100
	<10		<10					
	<10		<10					
	<10		<10					
	<10		<10					
1	<10	<10	<10	<10	<100	<100	<100	<100
	<10		<10					
	<10		<10					
	<10		<10					
	<10		<10					
2	<10	<10	<10	<10	<100	<100	<100	<100
	<10		<10					
	<10		<10					
	<10		<10					
	<10		<10					
3	<10	<10	<10	<10	<100	<100	<100	<100
	<10		<10					
	<10		<10					
	<10		<10					
	<10		<10					
4	<10	<10	<10	<10	<100	<100	<100	<100
	<10		<10					
	<10		<10					
	<10		<10					
	<10		<10					
5	<10	<10	<10	<10	<100	<100	<100	<100
	<10		<10					
	<10		<10					
	<10		<10					
	<10		<10					
media	<10	<10	<10	<10	<100	<100	<100	<100
minimo	<10	<10	<10	<10	<100	<100	<100	<100
massimo	<10	<10	<10	<10	<100	<100	<100	<100

Tab. 15: I° lotto - valori di *Escherichia coli* e Stafilococchi coagulasi positivi

settimane di vita	cons. a 3°C	media	cons. a 7°C	media	cons. a 3°C	media	cons. a 7°C	media
	<i>E. coli</i> (ufc/g)				Staf. coag + (ufc/g)			
0	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	12
	<10		<10					
	<10		<10					
	<10		<10					
	<10		<10					
1	<10	<10	<10	<10	10	12	<10	<10
	<10		<10					
	<10		10					
	<10		<10					
	<10		<10					
2	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	<10		<10					
	<10		<10					
	<10		<10					
	<10		<10					
3	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	<10		<10					
	<10		<10					
	<10		<10					
	<10		<10					
4	<10	<10	10	<10	20	20	<10	<10
	<10		<10					
	<10		<10					
	<10		<10					
	<10		<10					
5	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	<10		<10					
	<10		<10					
	<10		<10					
	<10		<10					
media	<10	<10	<10	<10	<12	<12	<10	<10
minimo	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
massimo	<10	<10	10	<10	20	20	20	12

Tab. 16: I° lotto - valori di Enterobatteri

settimane di vita	cons. a 3°C		media	cons. a 7°C		media		
	Enterobatteri (ufc/g)							
0	<	10	<	10	<	10		
	<	10			<	10		
	<	10			40			
	<	10			40			
	<	10			<	10		
1		20		92		790		
		360				150		
		60				10		
	<	10				44.000*		
	<	10				19.000*		
2	<	10		92		110		
		150				60		
		110			<	10		
	<	10				250		
		180			<	10		
3	<	10	<	10	<	10		
	<	10			<	10		
	<	10			<	10		
	<	10				2.300*		
	<	10			<	10		
4	<	10		56	>	15.000*		
	<	10			<	10		
	<	10			<	10		
		240			<	10		
	<	10			<	10		
5	<	10		215		150		
	<	10				80.000*		
		6.300*				30		
		650			<	10		
		190				10		
media		282		79		5.403		71
minimo		<10		<10		<10		22
massimo		6.300		215		80.000		317

* valore anomalo non considerato nella media

Tab. 17: I° lotto - valori di *Pseudomonas spp.*

settimane di vita	cons. a 3°C		media		cons. a 7°C		media	
	<i>Pseudomonas spp</i> (ufc/g)							
0	<	100	100	<	100		160	
		100		<	200			
		100			100			
		100			300			
		100		<	100			
1		non determinabile	-----	<	100	<	100	
		non determinabile		<	100			
		non determinabile		<	100			
		non determinabile		<	100			
		non determinabile		<	100			
2		2.300	1.125	<	100		200	
		100			12.000*			
		2.000			100			
	<	100			73.000*			
		70.000*			400			
3		6.100.000*	278	<	100	<	100	
		1.800.000*		<	100			
	<	100		<	100			
	<	100		<	100			
		600		<	100			
4	<	100	140		1.000.000*		4.675	
		200			400			
		200			8.200			
	<	100			9.900			
		100			200			
5	<	100	9078		400		160	
		510.000*		<	100			
		36.000			100			
		100		<	100			
	<	100		<	100			
media		340.912	2144		36.897		899	
minimo		100	100		<100		<100	
massimo		6.100.000	9078		1.000.000		4675	

* valore anomalo non considerato nella media

Tab. 18: II° lotto - valori di a_w e pH

settimane di vita	cons. a 3°C	media	cons. a 9°C	media	cons. a 3°C	media	cons. a 9°C	media
	aw				pH			
0	0,86	0,86	0,85	0,85	5,5	5,5	5,5	5,4
	0,86		0,85		5,5		5,4	
	0,86		0,85		5,6		5,5	
	0,86		0,85		5,4		5,4	
	0,85		0,85		5,3		5,3	
1	0,87	0,88	0,88	0,88	5,2	5,4	5,7	5,4
	0,88		0,88		5,3		5,6	
	0,88		0,88		5,6		5,0	
	0,87		0,88		5,5		5,3	
	0,88		0,89		5,6		5,5	
2	0,90	0,89	0,89	0,89	5,5	5,5	5,0	5,2
	0,90		0,89		5,3		5,1	
	0,89		0,88		5,4		5,3	
	0,89		0,90		5,7		5,2	
	0,89		0,89		5,5		5,2	
3	0,87	0,87	0,87	0,87	5,2	5,2	5,3	5,2
	0,87		0,87		5,2		5,2	
	0,87		0,87		5,1		5,2	
	0,87		0,87		5,2		5,3	
	0,87		0,87		5,2		5,2	
4	0,87	0,88	0,91	0,89	5,3	5,4	5,2	5,3
	0,88		0,88		5,7		5,2	
	0,87		0,87		5,3		5,3	
	0,88		0,88		5,4		5,7	
	0,88		0,89		5,5		5,2	
5	0,86	0,87	0,88	0,86	5,2	5,2	5,0	5,1
	0,87		0,86		5,2		5,0	
	0,87		0,86		5,3		5,0	
	0,87		0,86		5,2		5,2	
	0,87		0,86		5,2		5,2	
Media	0,87	0,87	0,87	0,87	5,4	5,4	5,3	5,3
Min	0,85	0,86	0,85	0,85	5,1	5,2	5,0	5,1
Max	0,90	0,89	0,91	0,89	5,7	5,5	5,7	5,4

Tab. 19: II° lotto - valori di *Salmonella* e *Listeria monocytogenes*

settimane di vita	cons. a 3°C	cons. a 9°C	cons. a 3°C	cons. a 9°C	cons. a 3°C	media	cons. a 9°C	media
	Salmonella		<i>Listeria m.</i> qualitativa		<i>Listeria m.</i> quantitativa (ufc/g)			
0	Assente	Assente	Assente	Assente	nd	----	nd	----
	Assente	Assente	Assente	Presente	nd		<10	
	Assente	Assente	Assente	Presente	nd		<10	
	Assente	Assente	Assente	Presente	nd		<10	
	Assente	Assente	Assente	Presente	nd		<10	
1	Assente	Assente	Assente	Assente	nd	----	nd	----
	Assente	Assente	Assente	Assente	nd		nd	
	Assente	Assente	Assente	Assente	nd		nd	
	Assente	Assente	Assente	Assente	nd		nd	
	Assente	Assente	Assente	Assente	nd		nd	
2	Assente	Assente	Assente	Assente	<10	<10	<10	<10
	Assente	Assente	Assente	Assente	<10		<10	
	Assente	Assente	Assente	Assente	<10		<10	
	Assente	Assente	Assente	Assente	<10		<10	
	Assente	Assente	Assente	Assente	<10		<10	
3	Assente	Assente	Assente	Assente	<10	<10	<10	<10
	Assente	Assente	Assente	Assente	<10		<10	
	Assente	Assente	Assente	Assente	<10		<10	
	Assente	Assente	Assente	Assente	<10		<10	
	Assente	Assente	Assente	Assente	<10		<10	
4	Assente	Assente	Assente	Assente	nd	----	nd	----
	Assente	Assente	Assente	Assente	nd		nd	
	Assente	Assente	Assente	Assente	nd		nd	
	Assente	Assente	Assente	Presente	nd		10	
	Assente	Assente	Assente	Assente	nd		nd	
5	Assente	Assente	Assente	Assente	nd	----	nd	----
	Assente	Assente	Assente	Assente	nd		nd	
	Assente	Assente	Assente	Assente	nd		nd	
	Assente	Assente	Assente	Assente	nd		nd	
	Assente	Assente	Assente	Assente	nd		nd	

nd = non determinata

Tab. 20: II° lotto - valori di Microrganismi mesofili (CMT) a 30°C

settimane di vita	cons. a 3°C	media log.	cons. a 9°C	media log.
	CMT (ufc/g)			
0	2.200	3,4E+03	5.100	5,7E+03
	820		3.600	
	1.700		4.000	
	2.100		12.000	
	10.000		4.000	
1	2.800	4,1E+03	590.000	1,3E+07
	3.100		540.000	
	9.500		590.000	
	2.100		62.000.000	
	3.200		3.200.000	
2	10.000	9,2E+04	42.000.000	9,1E+07
	72.000		83.000.000	
	120.000		57.000.000	
	36.000		94.000.000	
	220.000		180.000.000	
3	9.100.000	5,5E+06	150.000.000	3,1E+08
	1.600.000		510.000.000	
	2.900.000		68.000.000	
	5.400.000		270.000.000	
	8.400.000		570.000.000	
4	3.000.000	4,0E+07	350.000.000	6,6E+08
	26.000.000		200.000.000	
	3.300.000		2.500.000.000	
	160.000.000		160.000.000	
	9.000.000		100.000.000	
5	300.000.000	7,9E+07	260.000.000	2,9E+08
	46.000.000		250.000.000	
	4.000.000		250.000.000	
	34.000.000		340.000.000	
	9.100.000		350.000.000	
Media	20.743.184	2,1E+07	228.364.957	2,3E+08
Min	820	3.364	3.600	5.740
Max	300.000.000	78.620.000	2.500.000.000	662.000.000

Tab. 21: II° lotto - valori di Batteri lattici a 30°C

settimane di vita	cons. a 3°C	media log.	cons.a 9°C	media log.
	Batteri lattici (ufc/g)			
0	3.500	2,5E+03	3.700	8,3E+03
	3.200		5.300	
	2.000		27.000	
	2.000		2.000	
	1.600		3.500	
1	3.300	4,5E+03	480.000	1,3E+07
	2.300		310.000	
	10.000		70.000	
	4.200		61.000.000	
	2.500		3.000.000	
2	9.100	1,3E+05	17.000.000	7,0E+07
	89.000		57.000.000	
	130.000		38.000.000	
	250.000		110.000.000	
	150.000		130.000.000	
3	6.400.000	4,4E+06	140.000.000	2,8E+08
	1.100.000		490.000.000	
	2.800.000		53.000.000	
	5.700.000		240.000.000	
	6.100.000		490.000.000	
4	1.800.000	4,3E+07	320.000.000	5,8E+08
	23.000.000		240.000.000	
	3.100.000		2.000.000.000	
	180.000.000		140.000.000	
	8.700.000		200.000.000	
5	30.000.000	2,5E+07	290.000.000	2,6E+08
	50.000.000		230.000.000	
	3.200.000		240.000.000	
	30.000.000		250.000.000	
	14.000.000		290.000.000	
Media	12.218.757	1,2E+07	200.996.717	2,0E+08
Min	1.600	2.460	2.000	8.300
Max	180.000.000	43.320.000	2.000.000.000	580.000.000

Tab 22: II° lotto - valori di Lieviti e Muffe

settimane di vita	cons. a 3°C	media	cons.a 9°C	media	cons. a 3°C	media	cons.a 9°C	media
	Lieviti (ufc/g)				Muffe (ufc/g)			
0	100	90	100	90	<100	<100	100	<200
	<100		<100		<100			
	100		<100		100			
	<100		<100		<100			
	100		<100		100			
1	<100	90	200	480	200	240	200	<140
	<100		200		300		<100	
	<100		400		300		200	
	<100		700		200		100	
	<100		900		200		<100	
2	200	120	1.000	920	<100	<280	100	500
	100		600		<100		400	
	100		100		<100		500	
	100		400		1.000		1.200	
	100		2.500		100		300	
3	100	180	100	1380	600	260	300	960
	200		400		200		200	
	100		5.900		300		800	
	100		300		100		2.500	
	400		200		100		1.000	
4	<100	1340	1000	460	100	<140	700	880
	300		100		<100		500	
	500		400		<100		1100	
	200		600		200		1000	
	5.600		200		200		1100	
5	1.200	600	1400	800	100	<140	1600	1320
	1.000		600		300		800	
	<100		400		<100		1400	
	<100		1400		100		400	
	600		200		100		2400	
Media	560	403	780,77	688,33	-----	-----	730	915
Min	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<100	<140
Max	5600	1340	5900	1380	1000	<280	2500	1320

Tab. 23: II° lotto - valori di Clostridi Solfito Riduttori e *Bacillus cereus*

settimane di vita	cons. a 3°C	media	cons. a 9°C	media	cons. a 3°C	media	cons. a 9°C	media
	Clostridi SR (ufc/g)				<i>Bacillus cereus</i> (ufc/g)			
0	<10	<10	<10	<10	100	<100	<100	<100
	<10		<10		<100			
	<10		<10		<100			
	<10		<10		<100			
	<10		10		<100			
1	20	<12	10	<10	<100	<100	<100	<100
	10		<10		<100			
	<10		10		<100			
	<10		<10		<100			
	10		10		<100			
2	30	<14	<10	<10	<100	<100	<100	<100
	<10		<10		<100			
	<10		10		<100			
	<10		<10		<100			
	10		<10		<100			
3	<10	<12	<10	<10	<100	<100	<100	<100
	<10		10		<100			
	<10		<10		<100			
	10		<10		100			
	20		<10		<100			
4	<10	<10	<10	<10	<100	<100	<100	<100
	<10		<10		<100			
	<10		<10		<100			
	<10		<10		<100			
	<10		<10		<100			
5	<10	<10	<10	<10	<100	<100	<100	<100
	<10		<10		<100			
	<10		<10		<100			
	<10		<10		<100			
	<10		<10		<100			
Media	----	----	<10	<10	<100	<100	<100	<100
Min	<10	<10	<10	<10	<100	<100	<100	<100
Max	30	<14	10	<10	<100	<100	<100	<100

Tab. 24: II° lotto - valori di *Escherichia coli* e Stafilococchi Coagulasi positivi

settimane di vita	cons. a 3°C	media	cons. a 9°C	media	cons. a 3°C	media	cons. a 9°C	media
	<i>E. coli</i> (ufc/g)				Staf. coag + (ufc/g)			
0	20	<14	<10	<12	<10	<10	<10	<10
	<10		<10					
	20		20					
	<10		<10					
	<10		<10					
1	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	<10		<10					
	<10		<10					
	<10		<10					
	<10		<10					
2	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	<10		<10					
	<10		<10					
	<10		<10					
	<10		<10					
3	40	<20	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	30		<10					
	<10		<10					
	<10		<10					
	<10		<10					
4	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	<10		<10					
	<10		<10					
	<10		<10					
	<10		<10					
5	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
	<10		10					
	<10		<10					
	<10		<10					
	<10		<10					
Media	----	----	----	----	<10	<10	<10	<10
Min	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10	<10
Max	40	<20	20	<12	10	<10	10	<10

Tab. 25: II° lotto - valori di *Pseudomonas* ed Enterobatteri

settimane di vita	cons. a 3°C	media	cons. a 9°C	media	cons. a 3°C	media	cons. a 9°C	media
	<i>Pseudomonas spp</i> (ufc/g)				Enterobatteri (ufc/g)			
0	<100	<100	<100	<100	<10	<18	<10	<14
	<100		<100		<10		<10	
	<100		<100		20		<10	
	<100		<100		<10		30	
	<100		<100		40		<10	
1	<100	<100	<100	<100	10	<10	40	350
	<100		<100		<10		110	
	<100		<100		<10		70	
	<100		<100		<10		1.500	
	<100		<100		<10		30	
2	<100	<100	<100	<100	<10	<14	<10	<200
	<100		<100		<10		<10	
	<100		<100		<10		<10	
	<100		<100		30		170	
	<100		<100		<10		800	
3	<100	<100	<100	<100	240	<64	<10	<244
	<100		<100		50		660	
	<100		<100		<10		<10	
	<100		<100		<10		<10	
	<100		<100		<10		530	
4	<100	<100	<100	<100	<10	<10	410	<100
	<100		<100		<10		60	
	<100		<100		<10		<10	
	<100		<100		<10		<10	
	<100		<100		<10		<10	
5	<100	<100	<100	<100	<10	<10	<10	<16
	<100		<100		<10		40	
	<100		<100		<10		<10	
	<100		<100		<10		<10	
	<100		<100		<10		<10	
Media	<100	<100	<100	<100	----	----	----	----
Min	<100	<100	<100	<100	<10	<10	<10	<10
Max	<100	<100	<100	<100	240	<64	1500	350

Tab. 26: II° lotto - challenge test: valori di *Listeria monocytogenes*

settimane di vita	carica presunta	cons. a 3°C	media	cons. a 9°C	media	carica presunta	cons. a 3°C	media	cons. a 9°C	media
		<i>Listeria m. quantitativa (ufc/g)</i>					<i>Listeria m. quantitativa (ufc/g)</i>			
0	controllo negativo	<10					<10			
0	<10 ufc/g	10	<10	----	----	>10 ufc/g	10	<12	----	----
		<10		----						
		<10		----						
		<10		----						
		<10		----						
1	<10 ufc/g	<10	<12	410	<140	>10 ufc/g	20	<22	1.500	770
		<10		<10			60		130	
		<10		220			10		560	
		<10		50			<10		160	
		20		<10			10		1.500	
2	<10 ufc/g	10	<10	20	9.448	>10 ufc/g	30	<44	290.000	242.042
		10		20			20		530.000	
		<10		47.000			10		390.000	
		<10		10			<10		150	
		<10		190			150		10	
3	<10 ufc/g	<10	<10	30	<36	>10 ufc/g	34.000	6.826	660	510.456
		<10		40			40		2.500.000	
		10		<10			50		560	
		<10		<10			30		60	
		<10		90			<10		51.000	
4	<10 ufc/g	<10	<10	10	<10	>10 ufc/g	<10	3.008	710	50.210
		10		10			<10		80	
		<10		<10			15.000		80	
		<10		<10			<10		180	
		<10		<10			<10		250.000	
5	<10 ufc/g	<10	<10	2.700.000	848.000	>10 ufc/g	10	<10	1.500.000	1.200.032
		<10		<10			<10		70	
		<10		<10			<10		4.500.000	
		<10		1.500.000			10		80	
		<10		20			10		10	
5	controllo negativo			<10						
	Media	----	----	----	----	Media	----	-----	-----	----
	Min	<10	<10	<10	<10	Min	<10	<10	10	770
	Max	20	<12	2.700.000	848.000	Max	34.000	6.826	4.500.000	1.200.032

5. DISCUSSIONE

I risultati analitici sono stati valutati statisticamente per verificare se in particolare:

1. per ciascun parametro esisteva una differenza significativa tra i valori rilevati nell'intero periodo di osservazione, alle due temperature di conservazione considerate in ogni lotto (+3°C e +7°C nel I° lotto; +3°C e +9°C nel II° lotto);
2. esisteva una differenza significativa nell'evoluzione dei singoli parametri nel tempo, alla stessa temperatura di conservazione.

Ai fini della valutazione statistica, il piano di campionamento seguito ha fornito una buona numerosità per il confronto dei dati osservati nell'intero periodo alle due diverse temperature (30 valori per temperatura), mentre la numerosità dei dati da valutare per ciascun parametro e fase per fase durante la *shelf-life* è ridotta (5 valori per ciascuna coppia a confronto).

5.1 Discussione dei risultati del I° lotto

Relativamente alla valutazione dell'esistenza di una differenza tra i valori osservati alle due temperature di conservazione (+3°C e +7°C), per nessun parametro si sono rilevate differenze statisticamente significative, ad eccezione dei parametri **attività dell'acqua (a_w)** e **pH**. Per questi due parametri le differenze nei valori osservati sono probabilmente legate ad aspetti di standardizzazione non ottimale nella fase di preparazione del campione.

Per quanto riguarda l'evoluzione dei parametri nel tempo alla stessa temperatura di conservazione ci sono delle differenze significative per i seguenti parametri:

- Microrganismi mesofili a 30°C
- Batteri lattici a 30°C
- Lieviti

I **microrganismi mesofili a 30°C** e i **batteri lattici a 30°C** presentano entrambi un andamento simile alle due temperature, caratterizzato da cariche iniziali dell'ordine di 10^3 - 10^4 ufc/g che aumentano fino a 10^8 ufc/g a circa metà *shelf-life*

(corrispondente a 2 settimane di vita commerciale). I valori delle cariche rimangono poi stabili fino alla fine del periodo di osservazione (grafico 1 e 2).

Grafico 1. I° lotto - Microrganismi mesofili a 30°C alle due temperature di conservazione

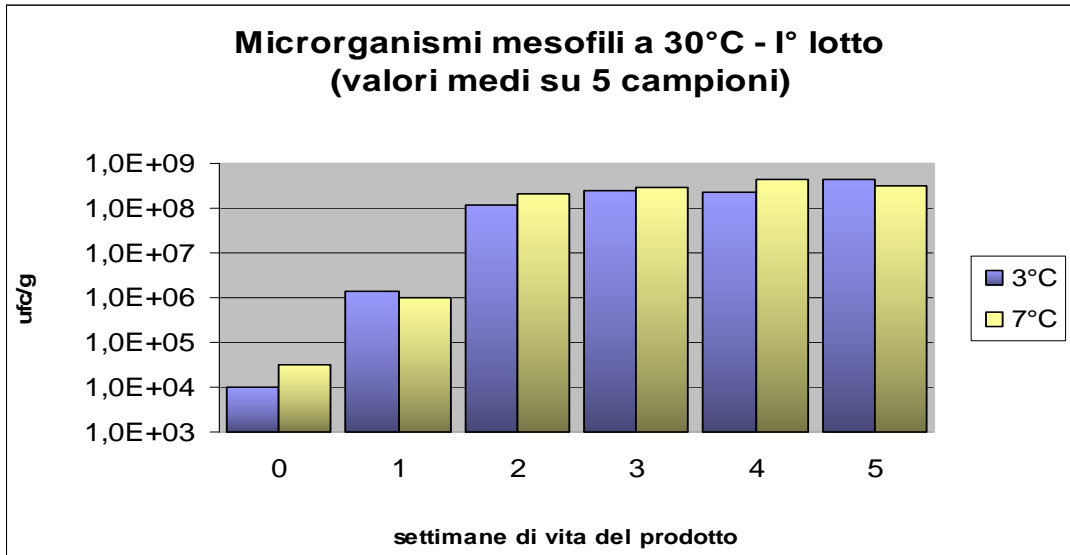
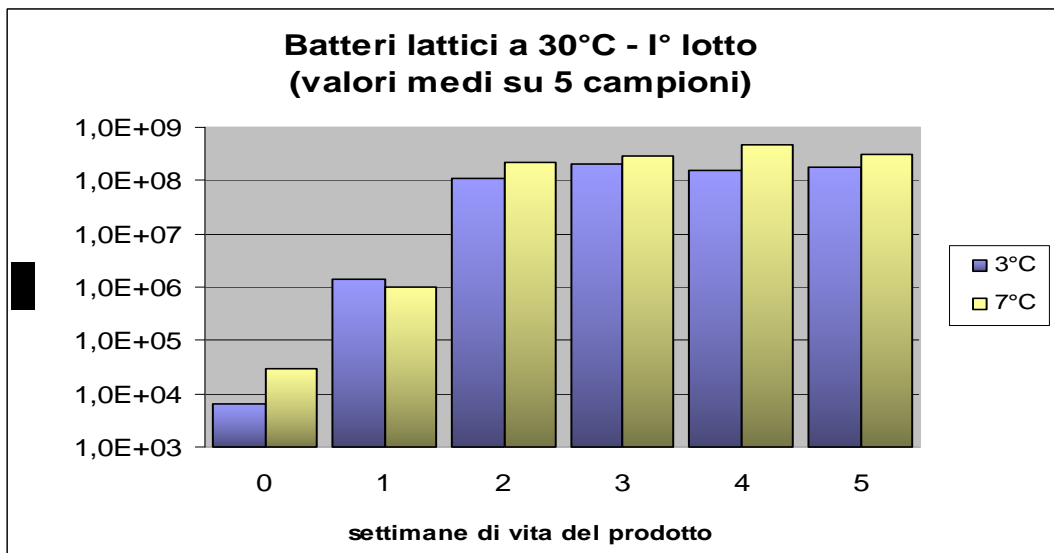


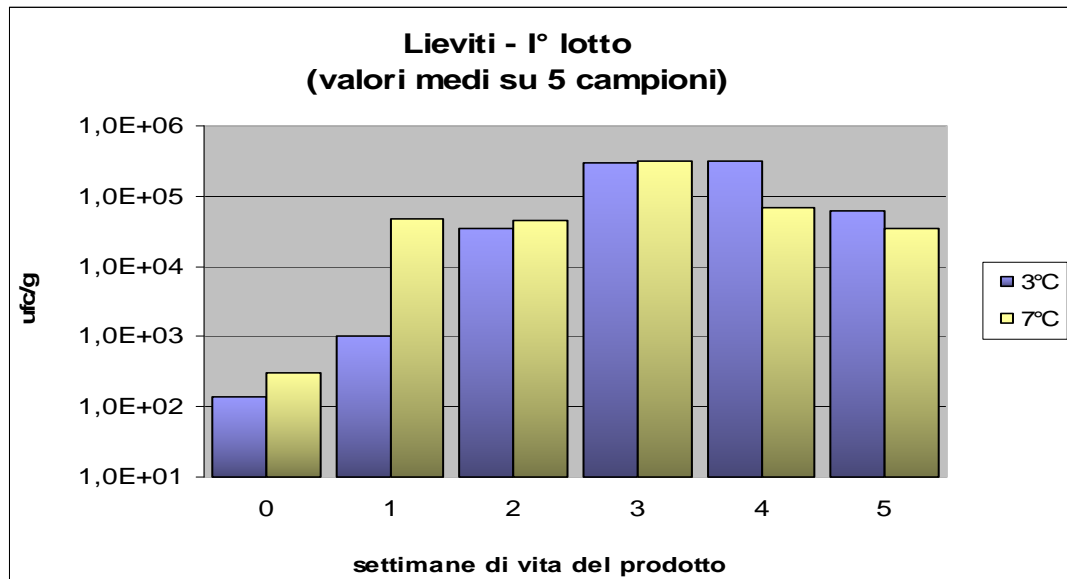
Grafico 2. I° lotto - Batteri lattici a 30°C alle due temperature di conservazione



Anche i **lieviti** sono caratterizzati da un aumento delle cariche iniziali dell'ordine di 10^2 ufc/g fino a 10^5 ufc/g in corrispondenza della 2° fase intermedia della *shelf-life*

(corrispondente a 3 settimane di vita commerciale). Il numero di lieviti diminuisce poi fino a 10^4 ufc/g per entrambe le temperature, ma più lentamente a $+3^\circ\text{C}$ che a $+7^\circ\text{C}$. (grafico 3).

Grafico 3. I° lotto - Lieviti alle due temperature di conservazione



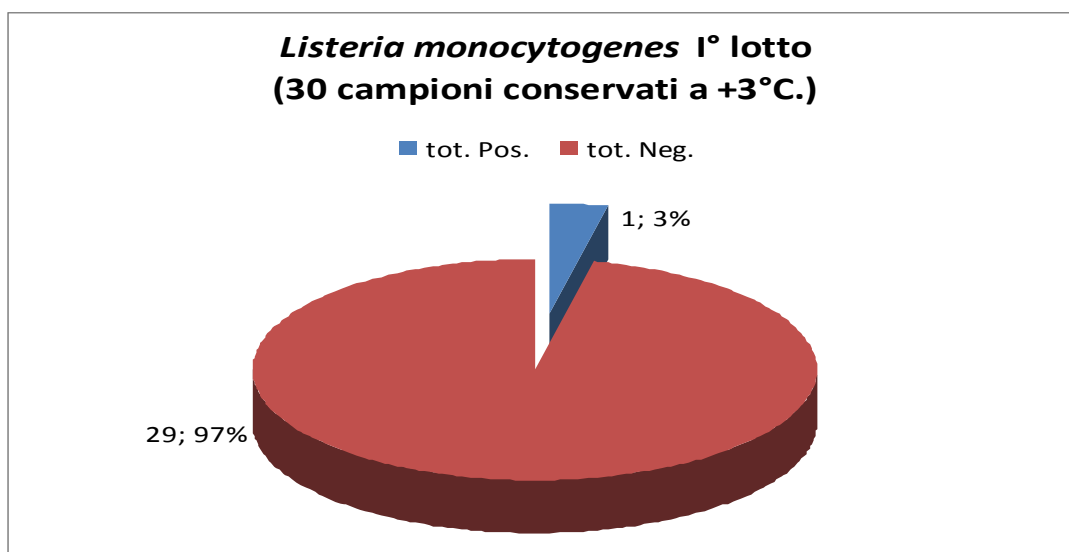
Non risultano, invece, differenze temporali significative per i seguenti parametri:

- Clostridi solfito riduttori
- *Bacillus cereus*
- *Salmonella spp.*
- *Listeria monocytogenes* (metodo quantitativo)
- *Escherichia coli* β -glucuronidasi positivi a 44°C
- Stafilococchi coagulasi positivi
- Muffe

In tutti i 60 campioni analizzati i **clostridi solfito riduttori**, il *Bacillus cereus*, *Salmonella spp* e *Listeria monocytogenes* (metodo quantitativo) sono risultati sempre assenti o inferiori al limite di rilevabilità del metodo.

Con il metodo qualitativo la presenza di *L. monocytogenes* è stata rilevata in 1 solo campione conservato a +3°C e oltre il termine di vita del prodotto (grafico 4).

Grafico 4. I° lotto – presenza di *Listeria monocytogenes* nei 30 campioni conservati a +3°C.



***Escherichia coli* β-glucuronidasi positivi**, gli **Stafilococchi coagulasi positivi** e le **muffe** hanno presentato distribuzioni diverse nei campioni, ma tutte caratterizzate da basse cariche (*E. coli*: 2 campioni positivi su 60, con cariche pari a 10 ufc/g, entrambi a +7°C; stafilococchi coagulasi positivi: 11 campioni positivi su 60, di cui 10 a +3°C ed 1 a +7°C, con cariche pari a 10-20 ufc/g; muffe: 16 campioni positivi su 60, di cui 4 a +3°C e 12 a +7°C, con cariche comprese tra 100 e 400 ufc/g; un outlier 1600 ufc/g)

Per quanto riguarda i rimanenti parametri:

- Enterobatteri a 37°C
- *Pseudomonas spp.*
- pH e a_w

i valori osservati sono caratterizzati da grande variabilità, anche tra campioni analizzati nello stesso momento e conservati nelle medesime condizioni; per entrambe le temperature non è stato possibile delineare un andamento crescente o decrescente nel tempo proprio a causa della dispersione dei dati e della presenza di outliers.

Nel caso di **Enterobatteri a 37°C** (cariche comprese tra 10 e 10^4 ufc/g) e ***Pseudomonas spp*** (cariche comprese tra 10^2 e 10^6 ufc/g) la variabilità dei dati osservati può essere dipesa dalla selettività non ottimale dei terreni di coltura utilizzati per la quantificazione di questi gruppi microbici.

Relativamente, invece, alla misurazione del **pH** (valori compresi tra 4,3 e 6,9) e dell'**a_w** (valori compresi tra 0,90 e 0,99), l'ampiezza dell'intervallo in cui cadono i valori rilevati, soprattutto del pH, potrebbe essere stata causata dalle modalità di preparazione dell'aliquota di campione da sottoporre ad analisi, descritte nel cap 2. Si è provato quindi a misurare il pH separatamente nella salsa e nella carne, e calcolare poi la media dei due valori. Nonostante ciò la distribuzione dei valori è rimasta di difficile interpretazione.

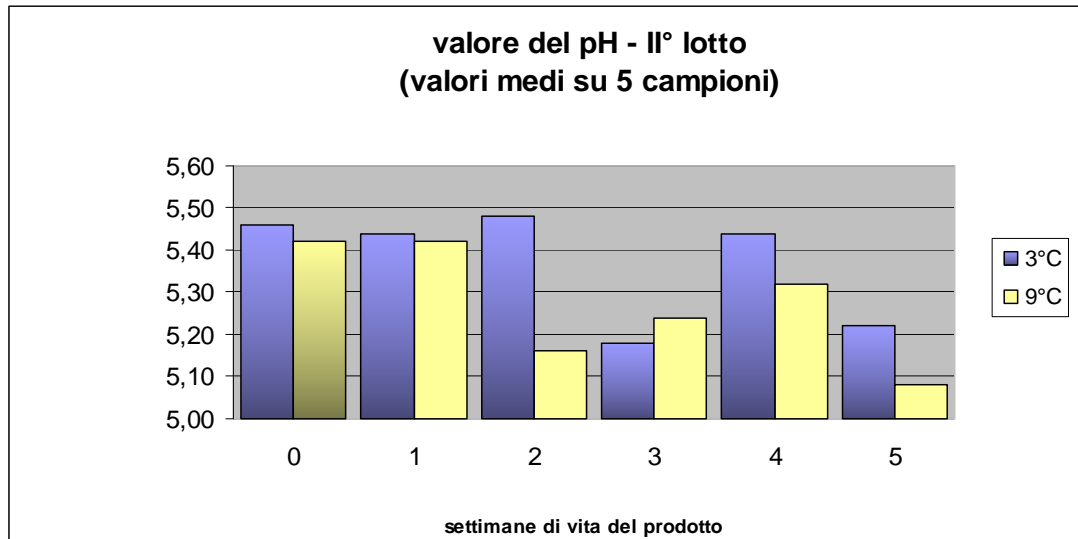
5.2 Discussione dei risultati del II° lotto

Per quanto riguarda la verifica dell'esistenza per ciascun parametro di una differenza significativa tra i valori rilevati alle due temperature di conservazione (+3°C e +9°C) nell'intero periodo di osservazione, a differenza del primo lotto, è emerso che alcuni parametri presentano una differenza statisticamente significativa tra i valori osservati a +3°C e quelli a +9°C. In particolare le cariche dei **microrganismi mesofili a 30°C**, dei **batteri lattici**, dei **lieviti**, delle **muffe**, e degli **enterobatteri** riscontrata nei campioni conservati a +3°C è statisticamente più bassa di quella rilevata per i campioni conservati a +9°C (grafici 8-9-10-11-12 a pag 47 e seguenti).

Dal punto di vista statistico, anche il **pH** misurato alle due temperature è significativamente differente: il valore medio a +3°C è più elevato che a +9°C. Dal punto di vista degli effetti di tale parametro sull'aspetto microbiologico, la differenza tra i valori medi risulta poco rilevante: a +3°C i valori sono distribuiti tra 5,2 e 5,5, mentre a +9°C tra 5,1 e 5,4 (grafico 5). Alla luce del Reg (CE) 2073/2005

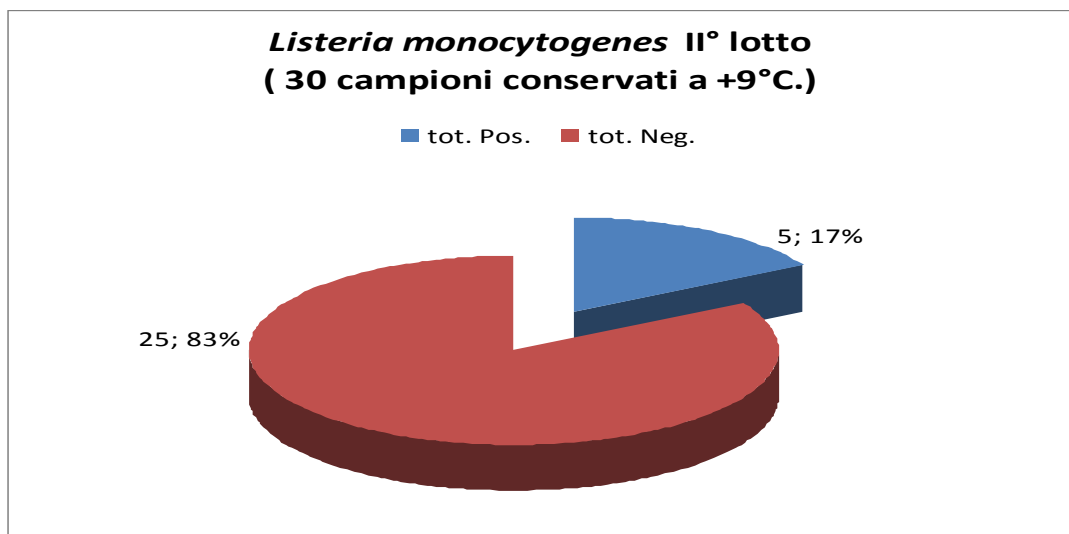
tali valori di pH rendono comunque il prodotto rientrante nella categoria degli alimenti pronti al consumo che costituiscono terreno favorevole alla crescita di *Listeria monocytogenes*.

Grafico 5. II° lotto – Valori di pH alle due temperature di conservazione



Per la ricerca qualitativa di *Listeria monocytogenes*, tutti i campioni conservati a +3°C sono risultati negativi, mentre a +9°C è stata rilevata la presenza del microrganismo su 5 dei 30 campioni, di cui 4 analizzati all'inizio della *shelf-life* ed uno alla fine del periodo di conservabilità. Nei 4 casi trovati positivi all'inizio della *shelf-life*, il metodo per la quantificazione di *Listeria m.* ha dato esito negativo (cioè la carica era inferiore al limite di rilevabilità, <10 ufc/g), mentre nel caso positivo alla fine della *shelf-life* la carica è stata rilevata pari a 10 ufc/g (grafico 6).

Grafico 6. II° lotto - Presenza di *Listeria monocytogenes* nei 30 campioni conservati a +9°C.

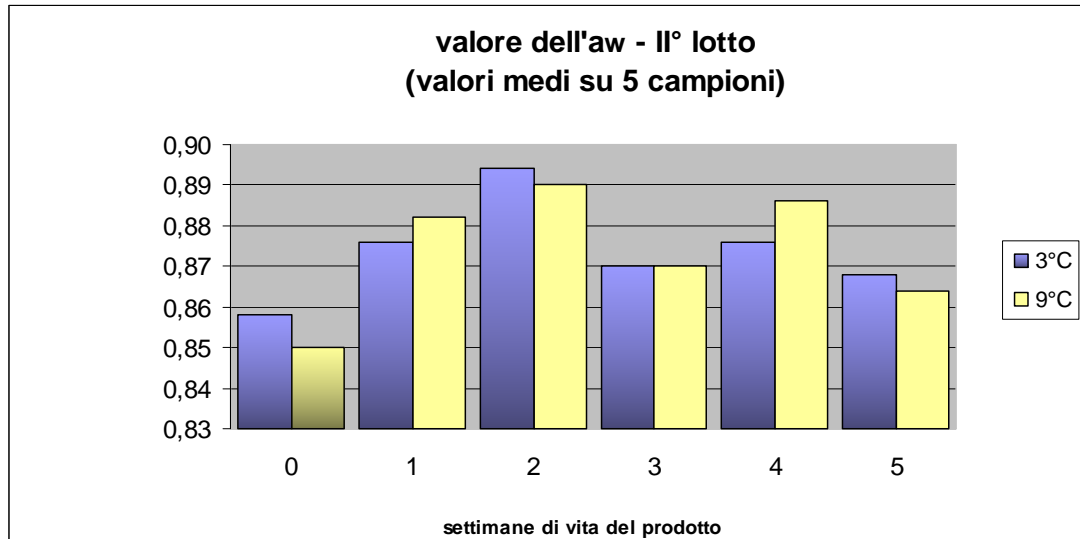


Per tutti gli **altri parametri microbiologici** la diversa temperatura di conservazione non sembra aver influito sulle cariche microbiche dei campioni, che si sono mantenute pressoché a livelli non rilevabili dai metodi analitici adottati o comunque molto bassi:

- Clostridi solfito riduttori: a +3°C 7 campioni positivi con cariche comprese tra 10 e 30 ufc/g, a +9°C 6 campioni positivi con cariche pari a 10 ufc/g.
- *E. coli* β-glucuronidasi positivi a 44°C: a +3°C 4 campioni positivi con cariche comprese tra 20 e 40 ufc/g, a +9°C 2 campioni positivi con cariche comprese tra 10 e 20 ufc/g.
- *Bacillus cereus*: 2 campioni positivi a +3°C con carica pari a 100 ufc/g.
- Stafilococchi coagulasi positivi: 1 campione positivo a +3°C con carica pari a 10 ufc/g.
- *Pseudomonas spp.*: la carica in tutti i campioni è risultata sempre inferiore al limite di rilevabilità.
- *Salmonella spp.*: è risultata sempre assente in tutti i campioni.

Neppure nel caso dell'**attività dell'acqua** i campioni presentano dei valori significativamente diversi tra +3°C e +9°C: in particolare a +3°C l' a_w media varia da 0,86 a 0,89, a +9°C da 0,85 a 0,89 (grafico 7).

Grafico 7. II° lotto – valori di attività dell'acqua (a_w) alle due temperature di conservazione

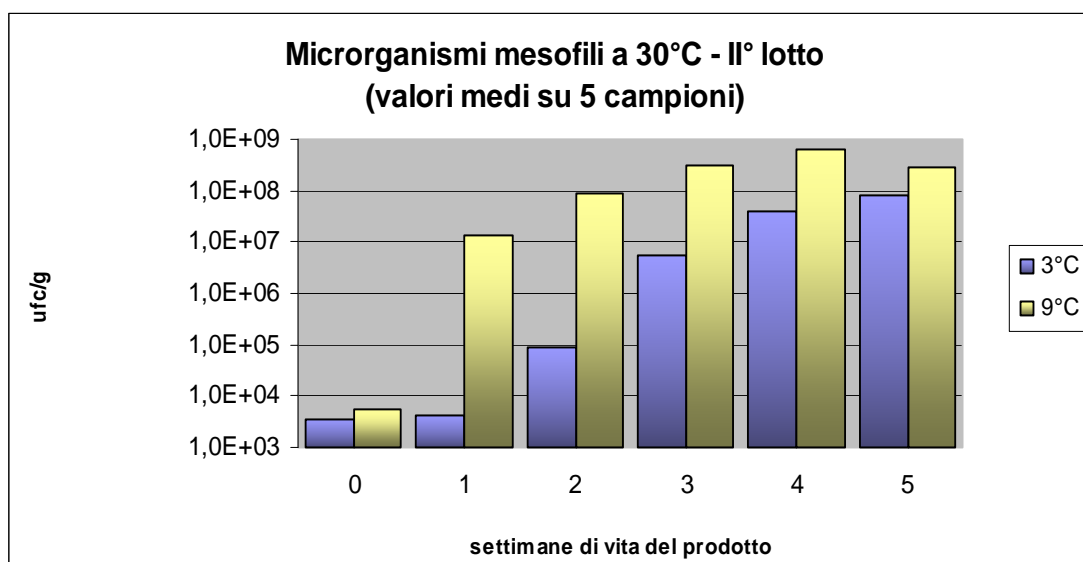


Per quanto riguarda la variazione dei valori osservati alla stessa temperatura di conservazione nelle diverse fasi della *shelf-life*, risultano delle differenze significative per i seguenti parametri:

- Microrganismi mesofili a 30°C
- Batteri lattici
- Lieviti
- Muffe
- Enterobatteri
- pH e a_w

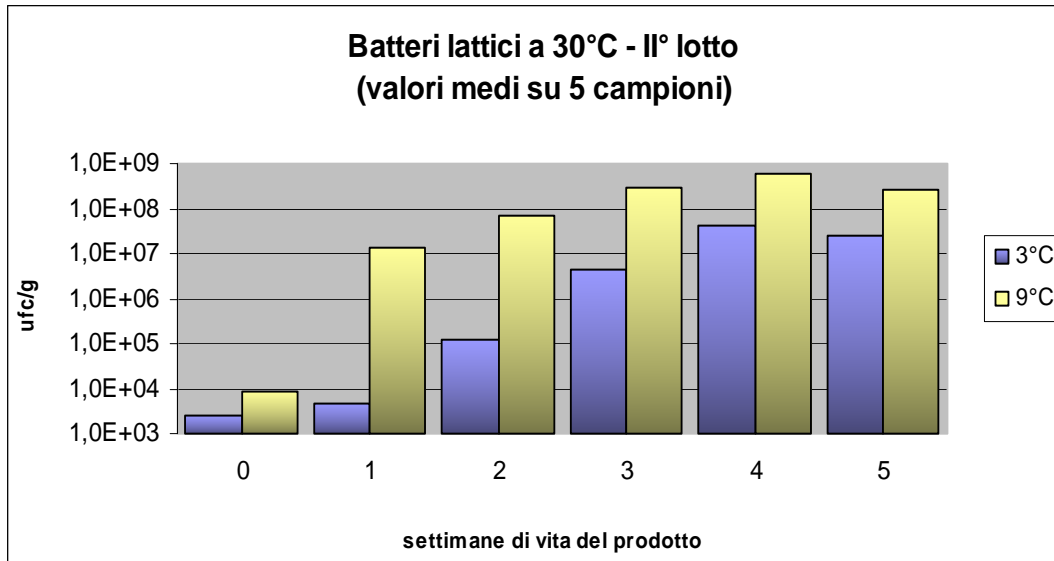
I **microrganismi mesofili a 30°C** presentano valori in aumento dall'inizio del periodo di osservazione fino alla fine; in particolare da cariche medie iniziali pari a 10^3 ufc/g per entrambe le temperature si arriva a cariche di 10^7 ufc/g e 10^8 ufc/g rispettivamente a +3°C e a +9°C. Come già detto in precedenza esiste una differenza significativa nell'andamento dei valori osservati alle due temperature: mentre a +3°C l'aumento si manifesta dopo due settimane di vita (metà *shelf-life*) e continua progressivamente fino alla fine, a +9°C l'aumento è più repentino e veloce (dopo una settimana di vita i valori sono aumentati a 10^7 ufc/g, dopo 3 settimane a 10^8 ufc/g e poi stabili fino alla termine del periodo di osservazione) (grafico 8).

Grafico 8. II° lotto - Microrganismi mesofili a 30°C alle due temperature di conservazione



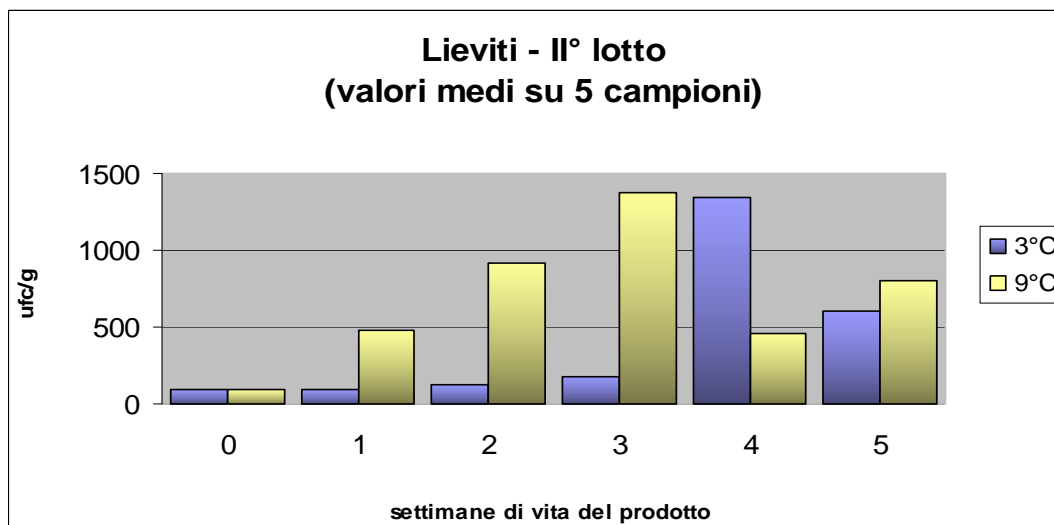
I **batteri lattici** sono caratterizzati da un andamento pressoché sovrapponibile a quello dei microrganismi mesofili a 30°C, proprio come si era verificato nel primo lotto (grafico 9).

Grafico 9. II° lotto - Batteri lattici a 30°C alle due temperature di conservazione



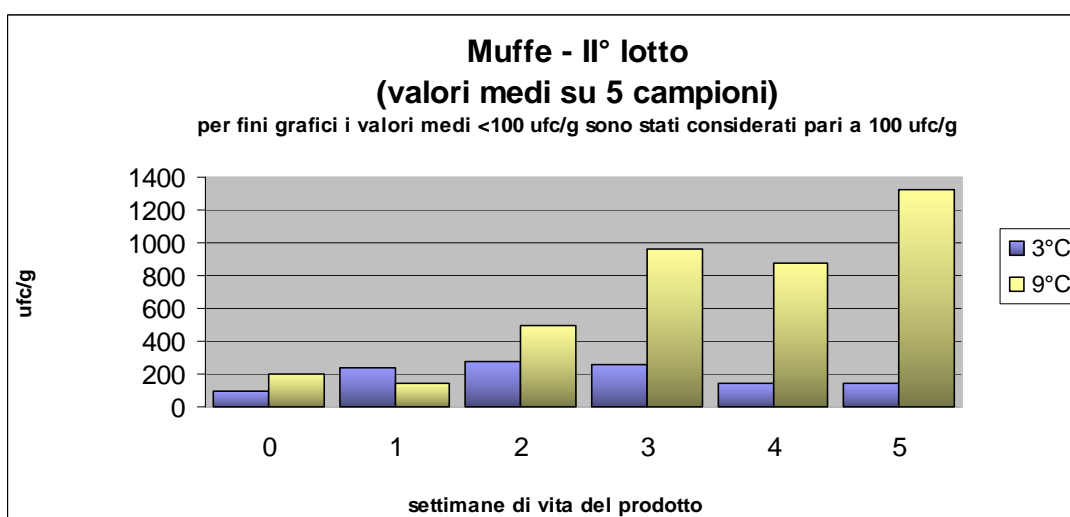
Per quanto riguarda i **lieviti**, nonostante le cariche mantengano valori abbastanza contenuti (valore massimo 5600 ufc/g a +3°C e 5900 ufc/g a +9°C), si evidenzia un andamento leggermente crescente nel tempo, a partire da cariche medie iniziali ≤ 100 ufc/g per entrambe le temperature di conservazione, fino a valori medi pari a 10^3 ufc/g raggiunti dopo 4 settimane di vita commerciale a +3°C, e dopo 3 settimane a +9°C; dopo questa fase i valori diminuiscono e si stabilizzano sulle 10^2 ufc/g. Come per i microrganismi mesofili a 30°C e i batteri lattici, la differente temperatura di conservazione determina nei campioni conservati a +9°C un aumento dei lieviti più precoce (dopo una settimana dalla produzione) rispetto a quello che si verifica alla temperatura più bassa (dopo 2 settimane dalla produzione) (grafico 10).

Grafico 10. II° lotto - Lieviti alle due temperature di conservazione



Analogamente ai lieviti, anche per le **muffe** si sono riscontrate cariche piuttosto limitate che non superano le 1000 ufc/g a +3°C e le 2500 ufc/g a +9°C. Per entrambe le temperature di conservazione però è emersa una tendenza all'aumento nel tempo a partire da cariche medie iniziali ≤ 200 ufc/g; tale tendenza è molto più marcata nei campioni conservati a +9°C, rispetto a quelli a +3°C, e si è resa evidente dopo 2 settimane di vita del prodotto (grafico 11).

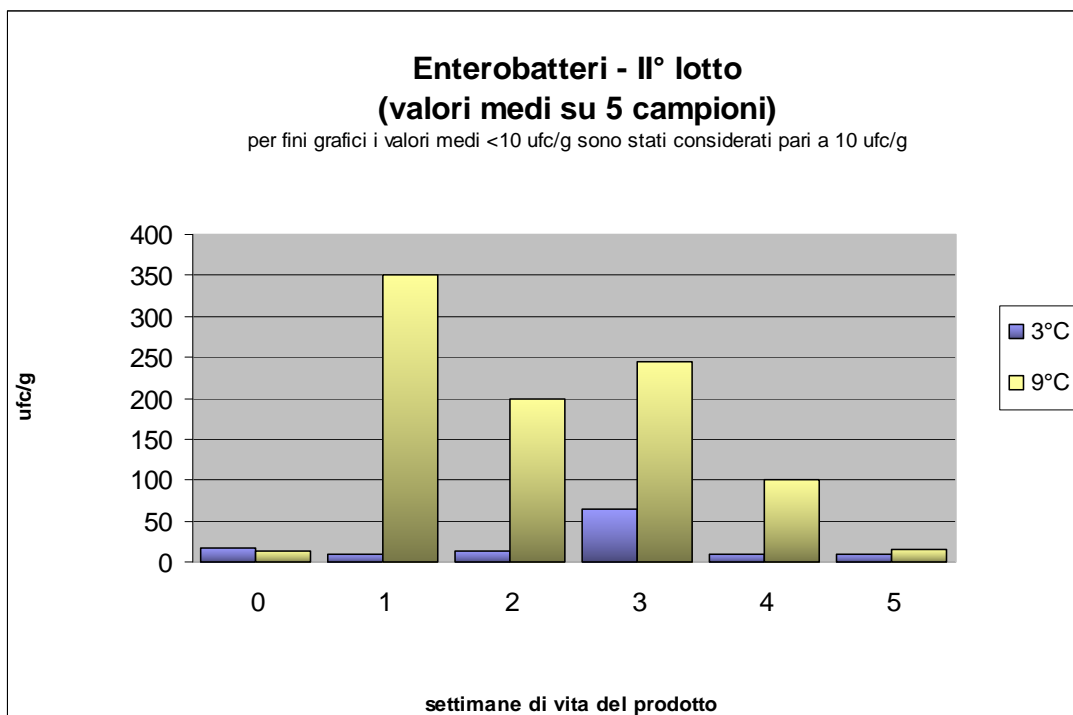
Grafico 11. II° lotto - Muffe alle due temperature di conservazione



Nel caso degli **enterobatteri** l'analisi statistica applicata al confronto dei valori ottenuti nei diversi istanti temporali non ha evidenziato alcuna differenza

significativa nei campioni conservati a +3°C (valori compresi tra 10 e 240 ufc/g). Relativamente a quelli conservati a +9°C, gli enterobatteri sono presenti in quantità ancora molto modeste (valori compresi tra 30 e 1500 ufc/g), ma emerge un leggero aumento delle cariche dopo una settimana di vita del prodotto (da cariche iniziali medie appena rilevabili a cariche medie dell'ordine di 10^2 ufc/g); tali cariche ritornano poi ai valori iniziali al termine del periodo di osservazione (grafico 12).

Grafico 12. II° lotto - Enterobatteri alle due temperature di conservazione



Relativamente a **pH** e **a_w**, i valori misurati presentano dal punto di vista statistico una piccola variabilità nel tempo per entrambe le temperature, ma tale variabilità non risulta caratterizzata da un andamento nettamente crescente o decrescente (grafici 5-7 a pag. 44 e 46 rispettivamente).

Per tutti gli **altri parametri microbiologici** non sono emerse differenze temporali significative.

5.3 Confronto tra i risultati dei due lotti

Dal confronto dei risultati ottenuti nei due lotti emergono alcune considerazioni:

- a) la sperimentazione riguardante la conservazione del prodotto alimentare ad una temperatura più simile a quella della refrigerazione domestica rispetto alle condizioni riportate in etichetta, ha messo in luce che l'aumento da +7°C (I° lotto) a +9°C (II° lotto) ha determinato importanti conseguenze sull'evoluzione del quadro microbico dei campioni nell'arco della vita commerciale del prodotto. Sulla diversa evoluzione delle caratteristiche microbiologiche non sembra aver influito la stagionalità del campionamento in quanto le cariche microbiche del prodotto all'inizio del periodo di osservazione (tempo 0) erano simili nei due lotti.
- b) I parametri più significativi quali indicatori di questa evoluzione temporale delle caratteristiche microbiologiche dell'alimento testato sono risultati essere principalmente i microrganismi mesofili a 30°C, i batteri lattici e i lieviti. Dall'andamento pressoché sovrapponibile delle cariche dei due gruppi microbici, si può desumere che i microrganismi mesofili a 30°C siano rappresentati fondamentalmente dai batteri lattici, tipici delle carni. Anche la presenza dei lieviti è giustificata da dati scientifici che li annoverano tra i microrganismi responsabili dei processi di deterioramento degli alimenti.
- c) Il prodotto esaminato, in entrambi i lotti, ha raggiunto durante la *shelf-life* livelli di carica mesofila totale di 10^8 ufc/g. Questo parametro è considerato, come un indicatore sullo stato di alterazione di un prodotto, e secondo la letteratura consultata un alimento viene considerato alterato quando raggiunge livelli di carica di 5×10^7 - 10^8 ufc/g. Tale parametro è comunque un indice da considerare cautamente e le alterazioni che si possono riscontrare nell'alimento sono essenzialmente di tipo organolettico con possibile sviluppo di odori sgradevoli, aumento del senso di acidità e possibile sviluppo di patine superficiali. Da questo punto di vista la verifica della qualità del prodotto va integrata con una indagine di tipo organolettico, come specificato anche nella pubblicazione

dell'autore Porretta S. (2008) per associare i cambiamenti sensoriali ai valori rilevati,

- d) I valori di a_w decisamente più bassi nel secondo lotto rispetto al primo, sono di dubbia interpretazione dato che il processo produttivo si è mantenuto identico in entrambe le produzioni. Molto importanti saranno i risultati che si otterranno dalle prove su un terzo lotto già programmate, ma non ancora eseguite, e che prevederanno la misurazione dell'attività dell'acqua anche separatamente nella carne e nella salsa.
- e) Il diverso sistema di omogeneizzazione del campione nella fase di preparazione dell'aliquota da sottoporre a prova, adottato nel secondo lotto, ha migliorato la ripetibilità dei dati osservati; persiste ancora comunque il problema di interpretazione di alcuni valori outliers, la cui presenza è legata alla matrice alimentare costituita da ingredienti che non sono uniformemente miscelati nel prodotto finito.

5.4 Discussione dei risultati del *challenge test* con *Listeria monocytogenes*

Come descritto nel cap. 3, sui campioni di vitello tonnato appartenenti al II° lotto è stato effettuato un *challenge test* inoculando i campioni con un ceppo di *Listeria monocytogenes* precedentemente isolato da un campione del I° lotto.

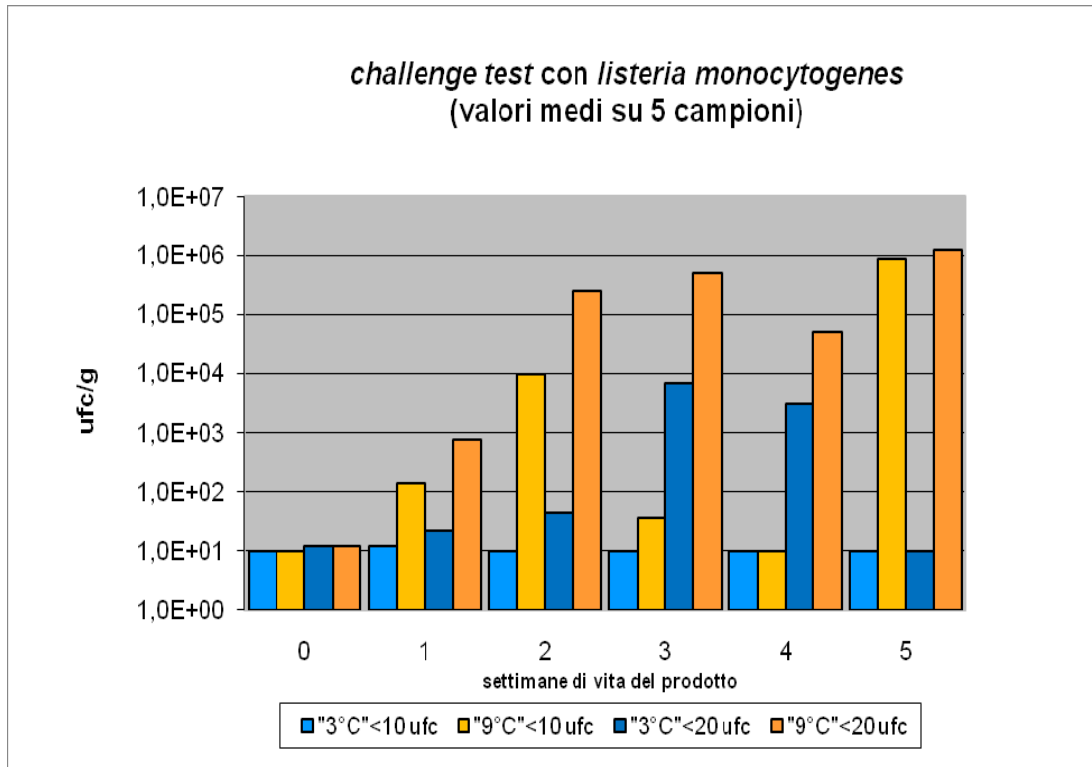
a) Osservando i dati ottenuti si evidenzia la grande variabilità dei valori di carica microbica riscontrata anche tra campioni conservati alla stessa temperatura, inoculati con la stessa carica ed analizzati nello stesso istante temporale. La dispersione dei dati e la presenza di valori outliers possono essere dipese dal fatto che il microrganismo è stato inoculato in una matrice alimentare disomogenea. (Tab. 26)

Tab. 27: *Challenge test* - numero di valori outliers per ciascuna distribuzione

Inoculo di <i>Listeria m.</i>	CAMPIONI A +3°C		CAMPIONI A +9°C	
	<10 ufc/g	>10 ufc/g	<10 ufc/g	>10 ufc/g
Numero di valori outliers	0 su 30 osservazioni	2 su 30 osservazioni	3 su 25 osservazioni	10 su 25 osservazioni
	0%	7%	12%	40%

b) Le cariche di *Listeria monocytogenes* rilevate nei campioni conservati a +9°C sono significativamente più alte che in quelli a +3°C. Questo è stato osservato per entrambi i livelli di inoculo (grafico 13)

Grafico 13. *Challenge test- valori di Listeria monocytogenes*



Nei campioni inoculati con meno di 10 ufc/g di *Listeria m.* si sono osservate cariche comprese tra <10 ufc/g e 20 ufc/g nei campioni conservati a +3°C, tra <10 ufc/g e $2,7 \times 10^6$ ufc/g in quelli conservati a +9°C (tra <10 ufc/g e 410 ufc/g senza outliers).

Nei campioni inoculati con più di 10 ufc/g di *Listeria m.* sono state riscontrate cariche comprese tra <10 ufc/g e $3,4 \times 10^4$ ufc/g nei campioni conservati a +3°C (tra <10 ufc/g e 150 ufc/g senza outliers), tra 10 ufc/g e $4,5 \times 10^6$ ufc/g in quelli conservati a +9°C (tra <10 ufc/g e 710 ufc/g senza outliers).

Alla medesima conclusione si giunge anche se si escludono dall'analisi statistica i valori fuori-scala (outliers).

c) Sia considerando tutti i valori osservati che escludendo gli outliers, dalla valutazione statistica emerge anche che esiste una differenza significativa tra le cariche riscontrate nei campioni inoculati con meno di 10 ufc/g e quelli con più di 10 ufc/g analizzati nello stesso istante temporale, sia a +3°C che a +9°C. In particolare le cariche di *Listeria m.* ottenute da inoculi maggiori di 10 ufc/g sono tendenzialmente superiori a quelle ottenute con l'inoculo minore.

d) Riassumendo, la dinamica di sopravvivenza e/o moltiplicazione di *Listeria monocytogenes* nel campione oggetto di studio sembra dipendere dalla temperatura di conservazione e dalla carica di partenza. Tali considerazioni necessitano sicuramente di altre prove i cui dati siano maggiormente ripetibili.

6. CONCLUSIONI

La conservabilità (“shelf-life”) di un prodotto è parte integrante della sicurezza alimentare. Negli alimenti deperibili essa dipende dalla sopravvivenza e dallo sviluppo di microrganismi alteranti, ma include anche la sopravvivenza e la crescita di microrganismi patogeni.

Secondo il Reg. (CE) 2073/2005, è responsabilità dell’OSA (“Operatore del Settore Alimentare”) individuare e applicare le misure idonee per la gestione dei pericoli legati al consumo dell’alimento da lui prodotto; queste misure includono anche le opportune informazioni per il consumatore sulla corretta modalità di conservazione e uso del prodotto.

A tale scopo l’OSA deve conoscere le caratteristiche fisiche, chimiche e microbiologiche dei propri prodotti e i pericoli associati; sulla base di queste conoscenze deve stabilire la durata commerciale del prodotto, nonché le idonee modalità di conservazione considerando anche la realtà distributiva e domestica, in cui possono verificarsi situazioni di abuso termico; deve definire e comunicare al consumatore le corrette condizioni di utilizzo.

E’ evidente che questi aspetti sono tutti strettamente connessi tra loro; in particolare la vita commerciale e la modalità di conservazione di un alimento dipendono direttamente dalle caratteristiche del prodotto al momento dell’immissione sul mercato.

I risultati esposti in questa tesi evidenziano che i parametri microbiologici più significativi per la valutazione della *shelf-life* del prodotto oggetto di studio, sono i microrganismi mesofili a 30°C, rappresentati soprattutto dai batteri lattici, e i lieviti. L’analisi della variazione temporale di questi parametri non ha permesso però di stabilire completamente l’idoneità o meno della durata commerciale stabilita dal produttore. Le prove microbiologiche andrebbero associate a valutazioni di tipo organolettico in grado di definire il livello di apprezzabilità dell’alimento da parte del consumatore.

Per quanto riguarda la sicurezza igienico-sanitaria dell’alimento testato, non sono emersi segnali di rischio per il consumatore: i criteri di sicurezza cercati sono sempre risultati assenti (*Salmonella spp*) o quando presenti lo erano, comunque, in quantità molto piccole (*Listeria monocytogenes* presente nel 5,2% dei campioni

nella stagione più sfavorevole, ma al massimo con 10 ufc/g). In riferimento a quanto prevede il Reg. CE 2073/2005 per i prodotti pronti al consumo, i dati raccolti relativi a pH e attività dell'acqua (a_w) non sono esaustivi per classificare l'alimento oggetto di studio tra i prodotti che costituiscono o meno terreno favorevole alla crescita di *Listeria monocytogenes*. Analogamente le prove di contaminazione sperimentale del prodotto con questo microrganismo richiedono ulteriori indagini per definirne la dinamica di sopravvivenza e/o moltiplicazione.

BIBLIOGRAFIA

- Betts G.D., Brown H.M. and Everis L.K. (Editors) (2004). Guideline no.46 CCFRA (Campden & Chorleywood Food Research Association) Evaluation of product shelf-life for chilled foods.(13-15)
- Bourgeois C. M., Mescle J. F., Zucca G., (1990). *Microbiologia Alimentare, Tecniche Nuove* 20129 Milano. (161-162, 173)
- EFSA JOURNAL, (2008). Parere del gruppo di esperti scientifici sui pericoli biologici (BIOHAZ) in merito alla richiesta di aggiornamento del precedente parere del comitato scientifico, riguardo alle misure veterinarie collegate con la sanità pubblica (SCVPH), sul rischio di *Listeria monocytogenes* connesso agli alimenti pronti e sulla, consulenza scientifica a diversi livelli in merito alla presenza di *Listeria monocytogenes* negli alimenti pronti e il relativo rischio di intossicazione per l'uomo 22 gennaio 2008 (-SUMMARY- 599,1-2). Sito www.europass.parma.it - oppure www.efsa.europa.eu/EFSA/efsa_locale-1178620753820_home.ht
- Giaccone V., (2007) “Elementi di microecologia degli alimenti”, atti convegno 24.10.2007, Venezia.
- Giaccone V., (2008) “Buone pratiche di igiene: la valutazione della shelf-life microbiologica degli alimenti”, atti convegno 15.05.08, San Donà di Piave (VE).
- Giaccone V.,(2008) “I challenge test nel Regolamento CE n. 2073/05”, -atti convegno 03.07.08, Legnaro (PD).
- ISO 13720:1995 Meat and meat products - Enumeration of *Pseudomonas* spp.
- ISO 11290-1:1996 - Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*. Part 1: Detection method Amendment 1:2004 - Modification of the isolation media and haemolysis test, and inclusion of precision data.
- ISO 11290-2 :1998 - Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the detection and enumeration of *Listeria monocytogenes*. Part 2: Enumeration method Amendment 1:2004 - Modification of the enumeration medium .

- ISO 2917:1999 - Meat and meat products –Measurement of pH – Reference Method .
- ISO 6888-2:1999 - Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (Staphylococcus aureus and other species). Part 2: Technique using rabbit plasma fibrinogen agar medium Amendment 1:2003 – Inclusion of precision data.
- ISO 16649-2:2001 - Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the enumeration of β -glucuronidase-positive Escherichia coli. Part 2: Colony-count technique at 44°C using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide.
- ISO 6579:2002 - Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the detection of Salmonella spp. Technical corrigendum 1: 2004.
- ISO 4833:2003 - Microbiology of food and animal feeding stuffs Horizontal method for the enumeration of microorganisms – Colony-count technique at 30°C.
- ISO 21528-2:2004 - Microbiology of food and animal feeding stuffs- Horizontal method for the detection and enumeration of Enterobacteriaceae. Part 2: Colony-count method.
- Man C.M.D., Jones A. A. (1994) Shelf life evaluation of foods. Blackie Academic & Professional; pag.34
- Ministero della Salute (2008) Comunicazione del 24/04/08.
- Nuvoloni R., Pedonese F., D'Ascenzi C., Rindi S. (2006). La valutazione del rischio da Listeria monocytogenes in alimenti pronti per il consumo. Annali della facoltà di medicina veterinaria di Pisa, volume LIX, 29-45. Sito <http://www.biblio.vet.unipi.it/annali2006/2006.htm>
- Porretta S., (2008) Shelf Life degli alimenti, meccanismi di valutazione e previsione, Chiriotti editori, Pinerolo.(16-21,31-34,64-65,68-69,121,203-204)
- Reg. (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.

- Reg. (CE) n. 852/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio del 29 aprile 2004 sull'igiene dei prodotti alimentari.
- Reg. (CE) n. 853/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio, del 29 aprile 2004, che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale.
- Reg. (CE) n. 854/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio, del 29 aprile 2004, che stabilisce norme specifiche per l'organizzazione di controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano.
- Reg. (CE) n. 882/2004 del Parlamento Europeo e del Consiglio, del 29 aprile 2004, relativo ai controlli ufficiali intesi a verificare la conformità alla normativa in materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali.
- Reg. (CE) n. 2073/2005 della Commissione del 15 novembre 2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari.
- Reg. (CE) n. 1441/2007 della Commissione del 05 dicembre 2007 che modifica il regolamento (CE) n. 2073/2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari.
- Scott Virginia N., Swanson Katherine M. J., Freier Timothy A., Pruett W. Payton, Sveum William H., Hall Paul A., Smoot Leslie A., Brown Daniel G., (2005), *Guidelines for Listeria monocytogenes Challenge testing of foods*, Food Protection Trends, (vol. 25 n° 11, pagg. 818-825)
- Tiecco G. (2001), *Igiene e tecnologia alimentare*, Calderini Edagricole. (6-7,11,19, 37,300,439-440)
- Zavanella M., Muliari R., Mioni R., D'Incau M. (2008) *Microbi e alimenti – Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche – Brescia*. (1-2,10,65-66)