

*DOF. Landini*



# Ministero della Salute

DIPARTIMENTO PER LA SANITA' PUBBLICA VETERINARIA, LA NUTRIZIONE E LA SICUREZZA DEGLI ALIMENTI

DIREZIONE GENERALE DELLA SICUREZZA DEGLI ALIMENTI E DELLA NUTRIZIONE

Regione Lombardia - Giunta Ufficio IX  
Sanita  
19/07/2007 14.41  
Arrivo 18/07/2007 13.38  
MI.2007.0034349

Regioni e Province Autonome  
di Trento e Bolzano  
Servizi Veterinari  
Loro Sedi

p. c. II.ZZ.SS.  
Loro Sedi

I.S.S. - C.N.Q.A.R.A.  
Fax n° 06-49387101

S.S.I.C.A.  
Fax n° 0521-771829

ex D.G.S.V.A. - Ufficio III

ex D.G.S.V.A. - Ufficio II

Associazioni di categoria  
Loro Sedi

Ministero della Salute  
0008878-P-18/07/2007  
DGSAN



7907710

Oggetto: Procedura di passaggio dall'alternativa 3 all'alternativa 2a per i produttori di prodotti a base di carne cotti: criteri per la validazione dei trattamenti post-letali .

In riferimento all'oggetto e dando seguito alla Nota Ministeriale DGSAN/IX/2076/P del 27-03-07, conformemente a quanto indicato nel 2° capoverso del capitolo "Procedura" della medesima Nota, con la presente si desidera indicare i criteri minimi da seguire per lo svolgimento delle sperimentazioni da effettuare ai fini della validazione dei trattamenti post-letali adottati nell'ambito dell'alternativa 2a. Tali criteri sono pertanto riportati nelle Linee guida allegate alla presente.

Si pregano i Servizi Veterinari regionali in indirizzo di trasmettere la presente ai Servizi Veterinari delle A.S.L. di propria competenza.

Ringraziando per la faticosa collaborazione si porgono distinti saluti.

IL DIRETTORE GENERALE  
(dott. Silvio Borrello)

Allegato: 4 pagine

*SB M*

## LINEE GUIDA PER LA VALIDAZIONE DI UN PROCESSO DI INATTIVAZIONE DI *LISTERIA MONOCYTOGENES* IN FASE POST-LETALE

Lo scopo delle seguenti Linee guida è quello di indicare i passi essenziali per una corretta effettuazione dei "challenge test" atti a validare un processo industriale applicato per l'inattivazione superficiale di *Listeria monocytogenes* in prodotti di salumeria "pronti al consumo", nell'ottica del passaggio in Alternativa 2a ai sensi del Regolamento statunitense 9 CFR 430.

### I. TIPO E NUMERO DI CEPPI DI *LISTERIA MONOCYTOGENES*

E' consigliato utilizzare almeno cinque ceppi diversi di *L. monocytogenes* di diversa provenienza (da collezioni internazionali, da episodi clinici), privilegiando quei ceppi isolati dal prodotto che deve essere studiato, al fine di tener conto di potenziali variazioni dei ceppi.

Deve essere conosciuta la resistenza dei ceppi utilizzati alle condizioni di processo da validare (termoresistenza, resistenza alle alte pressioni, ecc.). Tale caratteristica deve essere documentata. Prima di condurre il challenge test, verificare che i ceppi di *Listeria monocytogenes* selezionati per il saggio e da utilizzare in pool non presentino un eventuale reciproco antagonismo, in quanto potrebbero portare a risultati erronei.

### II. UTILIZZO DI *LISTERIA INNOCUA*

Qualora il processo debba essere studiato all'interno della linea produttiva, è data la possibilità di impiegare ceppi di *L. innocua* che hanno dimostrato di avere una resistenza analoga a quella di *L. monocytogenes* al trattamento applicato. Tale caratteristica deve essere documentata.

Ove possibile, utilizzare ceppi di *Listeria innocua* la cui termoresistenza, uguale o superiore a ceppi di *L. monocytogenes*, sia già stata dimostrata in altri lavori, come ad esempio quelli di seguito descritti:

- *L. innocua* M1 (*L. innocua* ATCC 33091) [J. Food Sci., 2006, 71, 3, R23-R30; J. Food Sci., 2003, 68, 4, 1443-1447; Poultry Sci., 2001, 80, 515-521; Appl. Env. Microbiol., 1993, 59, 4, 1247-1250]
- *L. innocua* LA-1 [Appl. Env. Microbiol., 2004, 70, 10, 6138-6146; Int. J. Food Microbiol., 1998, 39, 167-173; J. Cl. Microbiol., 1987, 1463-1466]

- *L. innocua* 14S [M.A.N., 1989, 9, 125-128; Ind. conserve, 1989, 64, 8-12].

Utilizzo di un pool di 5 o più ceppi di *Listeria innocua* al fine di tener conto di potenziali variazioni dei ceppi.

Prima di condurre il challenge test, verificare che i ceppi di *Listeria innocua* selezionati per il saggio e da utilizzare in pool non presentino un eventuale reciproco antagonismo, in quanto potrebbero portare a risultati erronei.

Le colture, sia di *Listeria monocytogenes* che di *Listeria innocua*, da utilizzare nella preparazione degli inoculi sperimentali, debbono essere conservate in modo da assicurare il mantenimento nel tempo delle caratteristiche peculiari dei ceppi.

Conservare i ceppi di *L. innocua* e di *L. monocytogenes*, da utilizzare nelle varie sperimentazioni, in Microbank stoccate a -70°C/-80°C o, comunque, allo stato congelato a -20°C.

Prima di utilizzare le colture, aprire sterilmente la Microbank e usando un ago o una pinza sterile estrarre una microsfera. Richiudere la Microbank e riportarla nel più breve tempo possibile alla temperatura di conservazione. Seminare direttamente la microsfera in specifico terreno agarizzato (ad esempio ALOA, Oxford o Palcam) ed incubare a 37°C per 18 ore. Esaminare le colture per verificarne la purezza e la morfologia caratteristica delle colonie (su ALOA: colonie di colorazione azzurra circondate da alone opaco, nel caso di *L. monocytogenes*, e senza alone nel caso di *L. innocua*; su Oxford: colonie brune circondate da alone scuro; su Palcam: colonie grigio verdastre con centro nero infossato e circondate da un alone nero)

### III. LIVELLO DI INOCULO

Per prove di inattivazione superficiale è opportuno utilizzare livelli medio-bassi di inoculo, compresi tra  $10^3$  e  $10^4$  ufc/g, al fine di non allontanarsi troppo dalle condizioni di inquinamento naturale.

### IV. PREPARAZIONE DELL'INOCULO

La miscela deve essere preparata da ceppi in fase stazionaria di crescita. Coltivare i ceppi di *L. innocua* e di *L. monocytogenes*, da utilizzare nei test di contaminazione sperimentale, a 37°C per 16-18 ore (tale intervallo di ore assicura il superamento della fase logaritmica e il raggiungimento della fase stazionaria, prima che inizi la fase di decrescita).

### V. METODO DI INOCULO

E' da preferire l'inoculo di una porzione della superficie da trattare mediante la deposizione di un piccolo volume della miscela dei ceppi di *Listeria*, e la successiva dispersione con una spatola sterile.

Deve essere lasciato il tempo all'inoculo di aderire alla superficie prima di procedere al confezionamento e al trattamento.

E' possibile vaporizzare l'inoculo, dopo averlo sospeso in acqua o tampone, sulla superficie del prodotto alimentare.

La superficie da inoculare dovrebbe rappresentare la condizione peggiore in cui *Listeria* può essere presente (grasso evidente, cavità e rugosità evidenti).

#### VI. APPLICAZIONE DEL PROCESSO DI INATTIVAZIONE

E' opportuno che le prove di validazione siano effettuate con un numero di unità campione non inferiore a cinque (dieci sarebbe meglio) e che siano ripetute almeno tre volte.

Devono essere indicati e controllati tutti i parametri di processo critici, poiché i risultati della validazione saranno strettamente collegati ad essi. Ad esempio, per processi di inattivazione con il calore sono importanti, ma non solo:

- Mezzo di riscaldamento (acqua, vapore, aria/vapore)
- Temperatura di processo
- Tempo di processo
- Temperatura iniziale del prodotto
- Carico complessivo dell'impianto
- Velocità nastro trasportatore (se in continuo)
- Pressione di esercizio (se autoclave)
- Tempo di salita (se autoclave).

I campioni inoculati dovrebbero essere posizionati nel punto più sfavorito dell'impianto, in modo da operare nelle condizioni che permettano di ottenere almeno gli stessi risultati in tutti gli altri prodotti. Questo rende implicita la validazione preventiva dell'impianto.

Sarebbe opportuno determinare la temperatura raggiunta nello strato superficiale ( $\approx 0,5$  cm di profondità) del prodotto, come riferimento del processo applicato.

Il controllo della contaminazione iniziale deve essere effettuato su un numero analogo di campioni (5 o 10) inoculati non trattati per poter calcolare il numero di riduzioni decimali ottenute dopo il trattamento di inattivazione.

#### VII. METODO ANALITICO

I campioni trattati possono essere analizzati immediatamente dopo il trattamento. La superficie inocolata viene recuperata in condizioni di asetticità e sottoposta alle procedure analitiche specifiche per *Listeria*. E' importante tenere in considerazione che la sensibilità del metodo deve permettere di recuperare (e contare) anche poche cellule sopravvivenenti per grammo di prodotto. Utilizzare il Most Probable Number secondo il metodo USDA MLG 8.05:2006 nel caso in cui si prevedesse di numerare poche cellule per grammo. Il metodo ISO 11290-2:1998 infatti prevede la conta in piastra e tale tecnico ha un limite di

quantificazione di 100 ufc/g (semina di 0.1 ml di inoculo/piastra) o 10 ufc/g (semina di 1 ml inoculo in tre piastre).

Si prevede l'eventuale ricorso ad una tecnica molecolare nel caso in cui si ottenessero risultati inattesi, per poter differenziare cellule non appartenenti all'inoculo sperimentale bensì appartenenti ad un'eventuale contaminazione ambientale.

#### VIII. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Per dare una quantificazione della inattivazione di *L. monocytogenes* procurata dal processo applicato, è opportuno operare in modo da ricavare una differenza di cellule vitali prima e dopo il trattamento, piuttosto che con processi "a scomparsa". Il risultato delle prove daranno quindi un risultato in "numero di riduzioni decimali" causate sulla popolazione di *Listeria* inoculata.