

I nuovi criteri microbici previsti dal Reg. CE 2073/2005: le innovazioni.
Burden or benefit per le aziende

Beniamino Cenci Goga
Laboratorio di Ispezione degli Alimenti di Origine Animale
Facoltà di Medicina Veterinaria - Università di Perugia

Schema dell'intervento:

- 1_Principi ecologici e strategici
- 2_Campionamento
- 3_Trasporto
- 4_Procedure analitiche
- 5_Valori di riferimento – *standard*

- **1_Principi ecologici e strategici**
- 2_Campionamento
- 3_Trasporto
- 4_Procedure analitiche
- 5_Valori di riferimento – *standard*

Principi ecologici e strategici

- ◆ **Considerazioni ecologiche**
- ◆ In primo luogo "longitudinally integrated good manufacturing" e "distribution" "practices" sono la chiave per assicurare la sicurezza e devono essere verificate attraverso l'analisi del prodotto finito.
- ◆ Inoltre l'accettabilità microbica nel commercio internazionale degli alimenti è basata in larga parte, se non interamente, sull'analisi dei campioni, sebbene idealmente supportata dall'ispezione degli stabilimenti locali.

◆L'esame chimico data alla metà dell'800, e la differenza sostanziale con la qualità microbica degli alimenti è:

Distribuzione degli elementi e dei composti è stabile

Anche se i livelli degli analiti possono essere bassi --> distribuzione di Poisson.

Variazioni analitiche non superiori al 10%

Monitoraggio microbico

- ◆Branca recente della scienza
- ◆Lattiero caseari: anni '30
- ◆Molluschi: 1940
- ◆Interesse accademico: anni '50
- ◆Distribuzione dei batteri casuale

Distribuzione casuale dei batteri

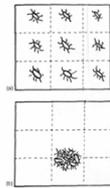


FIGURE 7.1. Essential heterogeneity of distribution of microorganisms in foods. (a) Ideal situation - perfectly uniform distribution of target organisms in a food. (b) Clustering of the same number of cfus as in (a), as a rule observed in practice.

Microscopio elettronico



FIGURE 7.2. Electron micrograph illustrating stratification of colonization at the microscopic level. (Reproduced by courtesy of Dr G. S. Genesi.)

Alimento generico

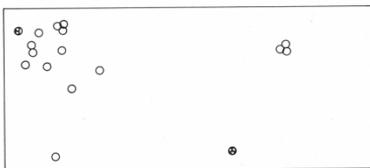


FIGURE 7.3. Phantom image for the contamination of a food.

Mancanza di tradizione accademica

◆ Coefficiente di variazione sempre superiore al 10%

◆ Pertanto...

Numero di criteri limitato a) per la capacità del laboratorio

- ◆ Più campioni piuttosto che pochi con molte analisi
- ◆ Importante sempre, ma in particolar modo nel campo della microbiologia per i motivi espressi (distribuzione eterogenea)
- ◆ Campionamento più importante per la microbiologia che per composizione chimica e nutrizionale.

b) Più variabilità maggiore probabilità di errori, dubbi e discordanze.

◆ Pochi, semplici test!!!

I criteri dipendono dall'ecologia microbica dell'alimento

- ◆ Batteri che causano malattia
- ◆ Batteri causa di alterazione
 - ◆ Diversi da alimento ad alimento, pertanto diversi saranno i criteri

Se le citate condizioni non sono rispettate, l'esame microbiologico perde di credibilità

Pochi test ben fatti!!!

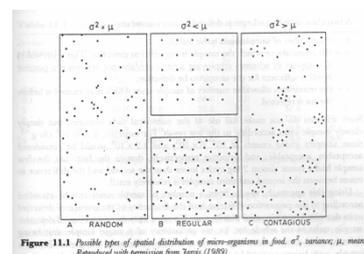
- ◆ In epidemiologia: la ricerca dei patogeni è necessaria per identificare ed eliminare la fonte.
- ◆ Nella routine: non si cercano i patogeni, ma i marker. Eccezione: gli acquirenti o l'importatore che richiedono assenza di patogeni nel lotto.

- 1_Principi ecologici e strategici
- **2_Campionamento**
- 3_Trasporto
- 4_Procedure analitiche
- 5_Valori di riferimento – *standard*

Stratificazione della colonizzazione

- ◆ Sporadica, eterogenea, localizzata

Media e varianza



Microscopio elettronico



FIGURE 7.2. Electron micrograph illustrating stratification of colonization at the microscopic level. (Reproduced by courtesy of Dr. G. S. Gerrens.)

Metodo di campionamento adeguato!

- ◆A) quantità e grandezza dei campioni conforme alle necessità statistiche (batteri con distribuzione random);
- ◆B) eliminare l'effetto della stratificazione microscopica e spaziale.
 - ◆Cioè l'estrema variabilità nel numero e tipo di batteri rinvenibili su diverse parti: carcassa, macchinari, sistemi eterogenei (alimenti secchi, emulsioni, salami, formaggi)

Alimento generico

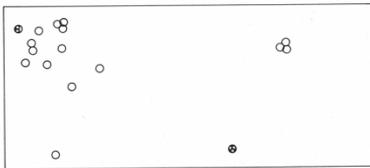


FIGURE 7.3. Phantom image for the contamination of a food.

Aliquote

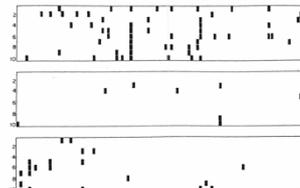


FIGURE 7.5. Analytical impact of the stratification of the distribution of microorganisms in three consecutive aliquots of dead food. Black squares represent aliquots found positive for a target organism; the total contamination level examined for that organism; white areas were found negative for the target organism. (Source: van Schothorst et al., 1995.)

Evitare

- ◆A) Contaminazione ambientale;
- ◆B) Proliferazione o distruzione batterica durante il trasporto.

Tipi di campionamento

- ◆A due classi
- ◆A tre classi

Campionamento a due classi

- ◆ I campioni sono classificati come ACCETTABILI o NON CONFORMI.
- ◆ In rapporto a dei ****limiti**** oppure a ****presenza/assenza****

Definizioni del campionamento a due classi

- ◆ **n**: numero di campioni da saggiare;
- ◆ **m**: valore ****limite**** (non compare nei test P/A)
- ◆ **c**: numero massimo di campioni il cui valore può superare m.

Se aumenta n, aumenta la severità del campionamento

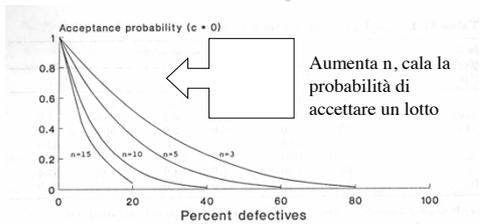


Figure 11.3 Operating characteristic curves (increasing stringency). $c = 0$, $n = 3, 5, 10, 15$

Se c aumenta, il campionamento è meno severo

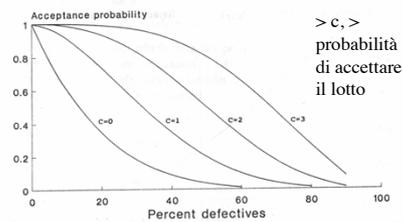


Figure 11.4 Operating characteristic curves (decreasing stringency). $n = 5$, $c = 0, 1, 2, 3$

Curva ideale

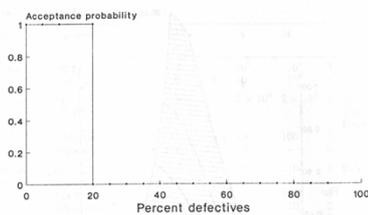


Figure 11.5 An ideal operating characteristic curve

Rischi del produttore e del consumatore

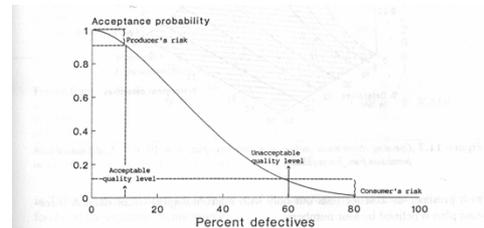


Figure 11.6 Producer's and consumer's risk

Tipi di campionamento

- ◆ A due classi
- ◆ **A tre classi**

Campionamento a tre classi

- ◆ Il campionamento a 2 classi suddivide i campioni in accettabili e non accettabili; quello a tre classi introduce la categoria del campione ****marginalemente accettabili****.
- ◆ Non si può usare con P/A test, ma solo con conte microbiche

Definizioni del campionamento a tre classi

- ◆ **n**: numero di campioni da saggiare;
- ◆ **M**: se una sola conta supera questo valore l'intero lotto è scartato
- ◆ **m**: valore tra buona qualità e qualità marginale
- ◆ **c**: numero massimo di campioni che possono trovarsi tra m e M.

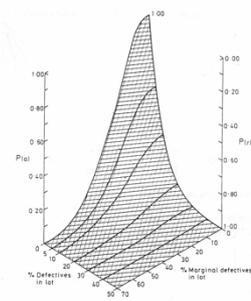


Figure 11.7 Operating characteristic surface for a three-class plan. $n = 10$, $c = 2$. Reproduced with permission from Jarvis (1989)

Valori suggeriti da ICMFS

Table 11.3 ICMFS suggested sampling plans

Degree of concern relative to safety and health hazard	Conditions in which food is expected to be handled and consumed after sampling, in the usual course of events*		
	Conditions reduce degree of concern	Conditions cause no change in concern	Conditions may increase concern
No direct health hazard Utility, e.g. shelf-life and spoilage	Increase shelf-life 3-class $n = 5, c = 3$	No change 3-class $n = 5, c = 2$	Reduce shelf-life 3-class $n = 5, c = 1$
Health hazard Low, indirect (indicator)	Reduce hazard 3-class $n = 5, c = 3$	No change 3-class $n = 5, c = 2$	Increase hazard 3-class $n = 5, c = 1$
Moderate, direct, limited spread e.g. <i>Salmonella</i> e.g. <i>C. parvum</i>	3-class $n = 5, c = 2$	3-class $n = 5, c = 1$	3-class $n = 10, c = 1$
Moderate, direct, potentially extensive spread e.g. <i>Salmonella</i>	2-class $n = 5, c = 0$	2-class $n = 10, c = 0$	2-class $n = 20, c = 0$
Severe, direct e.g. <i>C. botulinum</i> e.g. <i>S. typhi</i>	2-class $n = 15, c = 0$	2-class $n = 30, c = 0$	2-class $n = 60, c = 0$

* More stringent sampling plans would generally be used for sensitive foods destined for susceptible populations.

Adapted from ICMFS (1986)

- 1_Principi ecologici e strategici
- 2_Campionamento
- **3_Trasporto**
- 4_Procedure analitiche
- 5_Valori di riferimento – *standard*

- 1_Principi ecologici e strategici
- 2_Campionamento
- 3_Trasporto
- **4_Procedure analitiche**
- 5_Valori di riferimento – *standard*

- 1_Principi ecologici e strategici
- 2_Campionamento
- 3_Trasporto
- 4_Procedure analitiche
- **5_Valori di riferimento –
*standard***

L'ultima fase...

- ◆ Confrontare i risultati con i parametri.
- ◆ Criteri chimici in uso dal 1800, mentre per la microbiologia considerazioni più blande, su cui discutiamo oggi...

Per molti "esperti"...

- ◆ In assenza di standard è impossibile valutare obiettivamente la qualità microbica degli alimenti.

Per l'industria...

- ◆ Il commercio sarebbe bloccato se gli standard diventassero requisiti previsti dalla legge.
- ◆ C'è enorme variabilità intrinseca nelle metodiche.
- ◆ Ovvio... come spiegato all'inizio!!!

Carcassa



FIGURE 7.4. Heterogeneity of contamination of carcasses as established in practice: 1, Regio pharyngica; 2, R. nombostrichitica; 3, R. splanchnica; 4, R. lumbalis; 5, R. plures. (Source: Cattaras et al., 1974.)

Aliquote

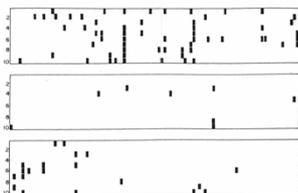


FIGURE 7.0. Analytical impact of the stratification of the distribution of microorganisms in three aliquots of a food. Black squares represent aliquots found positive for a target organism had the total organism been examined for that purpose; white areas were found negative for the target organism. (Source: van Schothorst et al., 1996.)

Distribuzione casuale dei batteri

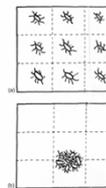


FIGURE 7.1. Essential heterogeneity of distribution of microorganisms in foods. (a) Ideal situation - perfectly uniform distribution of target organisms in a food. (b) Clustering of the same number of cfu as in (a), as a rule observed in practice.

Microscopio elettronico



FIGURE 7.2. Electron micrograph illustrating stratification of colonization at the microscopic level. (Reproduced by courtesy of Dr. G. E. Geertz.)

Alimento generico

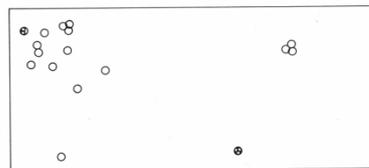


FIGURE 7.3. Phantom image for the contamination of a food.

Pertanto...

- ◆... il riscontro di un patogeno in un campione ha scarso significato se i campioni successivi sono costantemente negativi.

A peggiorare le cose...

- ◆I metodi utilizzati per valutare la rispondenza ai valori standard sono costantemente sotto processo. A ogni nuovo metodo più preciso segue il classico processo...

Quindi?

- ◆1) **uso razionale degli standard**
- ◆2) principi intelligenti
- ◆3) quantitativi
- ◆4) tassonomia ben definita
- ◆5) valutati sperimentalmente
- ◆6) contenere elementi essenziali

1) Uso razionale degli standard

- ◆A) solo quando GMP fallisce
- ◆B) includere criteri validi nel GMP

Quindi?

- ◆1) uso razionale degli standard
- ◆2) **principi intelligenti**
- ◆3) quantitativi
- ◆4) tassonomia ben definita
- ◆5) valutati sperimentalmente
- ◆6) contenere elementi essenziali

2) principi intelligenti

- ◆A) tipo di alimento e target organism: sviluppa alle condizioni di conservazione e trasporto?
- ◆B) se cotti, sono conservati a temperature > 60°C

Quindi?

- ◆1) uso razionale degli standard
- ◆2) principi intelligenti
- ◆3) **quantitativi**
- ◆4) tassonomia ben definita
- ◆5) valutati sperimentalmente
- ◆6) contenere elementi essenziali

3) quantitativi

- ◆A) virulenza, quantità di tossina, UFC necessarie, per i segmenti più a rischio della popolazione.
- ◆B) uso di marker
- ◆C) livelli minimi di alterazione in rapporto a metaboliti

Quindi?

- ◆1) uso razionale degli standard
- ◆2) principi intelligenti
- ◆3) quantitativi
- ◆4) **tassonomia ben definita**
- ◆5) valutati sperimentalmente
- ◆6) contenere elementi essenziali

4) **tassonomia ben definita**

- ◆Vanno evitati i termini generici a cui il nostro legislatore ci ha abituato

Quindi?

- ◆1) uso razionale degli standard
- ◆2) principi intelligenti
- ◆3) quantitativi
- ◆4) tassonomia ben definita
- ◆5) **valutati sperimentalmente**
- ◆6) contenere elementi essenziali

5) **valutati sperimentalmente**

- ◆Da linee di produzione validate

Quindi?

- ◆1) uso razionale degli standard
- ◆2) principi intelligenti
- ◆3) quantitativi
- ◆4) tassonomia ben definita
- ◆5) valutati sperimentalmente
- ◆6) **contenere elementi essenziali**

6) **contenere elementi essenziali**

- ◆A) piani di campionamento precisi;
- ◆B) metodi identici a quelli usati nella indagine epidemiologica
- ◆C) tolleranza espressa con un piano a 3 classi o P/A

Intervalli microbici di riferimento...

- ◆ ... piuttosto che "standard".
- ◆ Come in clinica, ematologia.
- ◆ Non solo semantica, ma anche sostanza!
- ◆ Infatti serve a vedere se un processo è momentaneamente fuori controllo...

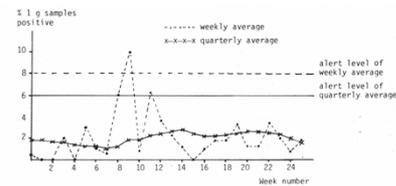


FIGURE 7.18. Trend analysis, expressed as colonization profile, obtained by sequential sampling. (Source: Habraken et al., 1986.)

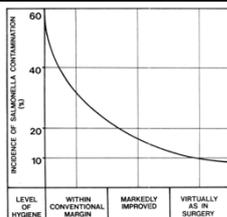


FIGURE 6.5. The effect of improved hygiene in abattoirs on the incidence of *Salmonella* spp. on carcasses. (Source: Gerats et al., 1981.)

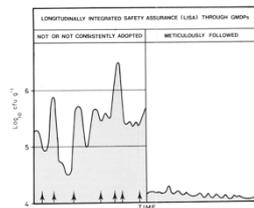


FIGURE 6.3. The effect of adoption of USA on the level of ampicillin resistance in contamination and colonization of animal hosts. 1 = *Enterococcus faecalis* isolated at a level $>10^4$ g. (Source: Meisel, van Amel and Brink, unpublished data, 1992.)

Considerazioni economiche e giuridiche

- ◆ Standard stabiliti per legge o che derivano da accordi tra cliente e produttore?
- ◆ Sono di competenza nostra o di altre figure.
- ◆ Nei paesi anglosassoni: *compliance officer*

Tutto parte dalla Legge 30 aprile 1962, 283...

- ◆ Art. 5.
- ◆ È vietato impiegare nella preparazione di alimenti o bevande, vendere,
- ◆ detenere per vendere o somministrare come mercede ai propri dipendenti, o
- ◆ comunque distribuire per il consumo sostanze alimentari:
- ◆ ...
- ◆ b) in cattivo stato di conservazione;
- ◆ c) con cariche microbiche superiori ai limiti che saranno stabiliti dal regolamento di esecuzione o da ordinanze ministeriali;

... che prevedeva ammende...

- ◆ Da 600.000 a 60.000.000. E' competente la Procura della Repubblica. Il giudice può disporre la chiusura dello stabilimento o dell'esercizio e la revoca del provvedimento amministrativo (licenza, autorizzazione, riconoscimento...) che consente l'esercizio dell'attività.

... e proseguì con il DPR 26 marzo 1980, n. 327

- ◆ Art. 14 - Prelevamento dei campioni destinati alla determinazione delle cariche microbiche.
- ◆ Con le ordinanze previste dall'art. 5, lettera c), della legge e dall'art. 69 del presente regolamento, il Ministro della sanità, sentito il Consiglio superiore di sanità, nel determinare i limiti delle cariche microbiche, stabilisce altresì i criteri di campionamento delle varie sostanze alimentari e le modalità di prelievo, conservazione e trasporto dei campioni, nonché i relativi metodi di analisi.

Esempi di cosa aveva previsto il legislatore

- ◆ Ordinanza 7 dicembre 1993 - Limiti di *Listeria monocytogenes* in alcuni prodotti alimentari
 - ◆ Integra le tabelle A, B e C dell'ordinanza ministeriale 11 ottobre 1978 "Limiti di cariche microbiche in determinati alimenti e bevande".

Alimenti crudi non sottoposti a trattamento di riscaldamento

- ◆ n=3
- ◆ Non oltre 11/g in 1 u.c.
- ◆ Non oltre 110/g in 2 u.c.

Alimenti congelati o surgelati

- ◆ n=3
- ◆ Non oltre 11/g in 2 u.c.
- ◆ Non oltre 110/g in 3 u.c.

Alimenti precotti o pastorizzati

- ◆ n=5
- ◆ Non oltre 11/g in 4 u.c.
- ◆ Non oltre 110/g in 1 u.c.

Decreto legislativo 30 dicembre 1992, n. 530 Per il testo aggiornato: GU 104 del 6/5/99

- ◆ Molluschi bivalvi vivi
 - ◆ ... requisiti dei m.b.:
 - ◆ Meno di 300 *coliformi fecali* ***o*** meno di 230 *E. coli* per 100 g di polpa e l.i.
 - ◆ Metodo: MPN **o qualsiasi altro procedimento batteriologico che presenti lo stesso grado di precisione**
 - ◆ Non potevano dire quale? Forse non lo sapevano?

Definizione vaga di coliformi fecali e di *E. coli*...

- ◆ Coliformi fecali: lattoso +, gas, a 44°C
- ◆ *E. coli*: indolo +
 - ◆ Non è così facile...

...però le sanzioni...

- ◆ Per la violazione dell'Allegato A, comma 1, lettera B (coliformi): arresto fino a 1 anno o ammenda da 600.000 a 60.000.000; in combinato disposto con art. 5 lettera c Legge 283/62
- ◆ Per la violazione dell'Allegato A, comma 1, lettera C (salmonella): arresto da 3 mesi a 1 anno o ammenda da 5.000.000 a 90.000.000; in combinato disposto con art. 5 lettera d, Legge 283/62
- ◆ Competenza: procura della repubblica

D.M. 9 maggio 1991, n. 185

- ◆ Latte fresco pastorizzato di alta qualità:
- ◆ Tenore in germi a 30°C superiore a 100.000 ---> sanzione ---> da 1 a 5 milioni. Autorità competente è l'autorità sanitaria locale.

DPR 54, DECRETO DEL PRESIDENTE DELLA REPUBBLICA 14 gennaio 1997, n. 54. Regolamento recante attuazione delle direttive 92/46 e 92/471 CEE in materia di produzione e immissione sul mercato di latte e di prodotti a base di latte.

- ◆ Violazione, per es. dell'art. 4, comma 2, lettera c), in combinato disposto con l'art. 5, lettera c) L. 283/62; oppure art. 5, comma 1, lettera d.

B. Criteri microbiologici per il latte alimentare
1. Il latte crudo alimentare di vacca deve, dopo il confezionamento, soddisfare le seguenti norme:

Tenore di germi a 30°C	(per ml): ≤ 50.000 ¹⁰
<i>Staphylococcus aureus</i>	(per ml): m = 100, M = 500, n = 5, c = 2
Salmonella	(assenza in 25g): n = 5, c = 0

Sanzione...

- ◆ Come in precedenza (600.000 - 6 milioni).
- ◆ Latte sequestrato e distrutto.

2. In occasione dei controlli per sondaggio effettuati nello stabilimento di trattamento, il latte pastorizzato deve soddisfare le seguenti norme microbiologiche:¹¹

Germi patogeni (assenza in 25 g): n = 5, c = 0, m = 0, M = 0;
 Coliformi (per ml): n = 5, c = 1, m = 0, M = 5.
 Dopo incubazione a 6°C per 5 giorni:
 Tenore di germi a 21°C (per ml): n = 5, c = 1, m = 5 x 10⁶, M = 5 x 10⁶

I. Criteri obbligatori: germi patogeni.

Tipo di germe	Prodotti	valori (ml. g) ¹
<i>Listeria monocytogenes</i>	Formaggi diversi da quelli a pasta dura	Assenza 25 g n = 5, c = 0
	Altri prodotti ⁴	Assenza di Ig
<i>Salmonella spp</i>	Tutti, salvo latte in polvere	Assenza 25 g n = 5, c = 0
	Latte in polvere	Assenza in 25 g n = 10, c = 0

2. Criteri analitici: germi testimoni di carenza d'igiene.

Tipo di germe	Prodotti	valori (ml. g) ⁷
<i>Staphylococcus aureus</i>	Formaggio a base di latte crudo e latte termizzato	m = 1.000 M = 10.000 n = 5, c = 2
	Formaggio a pasta molle (a base di latte trattato termicamente)	m = 100 M = 1.000 n = 5, c = 2
	Formaggio fresco	m = 10
	Latte in polvere Prodotti gelati a base di latte (compresi i gelati e le creme gelate)	M = 100 n = 5, c = 2
<i>Escherichia coli</i>	Formaggio a base di latte crudo e latte termizzato	m = 10.000 M = 100.000 n = 5, c = 2
	Formaggio a pasta molle (a base di latte trattato termicamente)	m = 100 M = 1.000 n = 5, c = 2

3. Germi indicatori: linee direttrici.

Tipo di germe	Prodotti	valori (ml. g) ⁷
Coliformi 30°C	Prodotti liquidi a base di latte	m = 0 M = 5 n = 5, c = 2
	Burro a base di latte o di crema pastorizzata	m = 0 M = 10 n = 5, c = 2
	Formaggio a pasta molle a base di latte trattato termicamente)	m = 10.000 M = 100.000 n = 5, c = 2
Tenore di germi	Prodotti in polvere a base di latte	m = 0 M = 10 n = 5, c = 2
	Prodotti gelati a base di latte (compresi i gelati e le creme gelate)	m = 10 M = 100 n = 5, c = 2
	Prodotti liquidi a base di latte trattato termicamente e non fermentato ⁴	m = 10.000 M = 100.000 n = 5, c = 2

D.L.vo 26 maggio 1997, n. 155

◆Le cose migliorano e le sanzioni non riguardano il superamento dei limiti, ma solo individuazione e attuazione delle disposizioni relative all'autocontrollo.

Poi arriva il pacchetto igiene... e il Regolamento 2073 (modificato dal Regolamento 1441)

Criteri di igiene di processo

- ◆Latte pastorizzato
- ◆Enterobatteri
- ◆n c m M
- ◆5 2 <1 5/ml

◆ **Formaggi**

◆ *E. coli*

◆ n c m M

◆ 5 2 100 1000

◆ **Formaggi al latte crudo**

◆ Staphy coagulasi positivi

◆ n c m M

◆ 5 2 10⁴ 10⁵

◆ Formaggi (< pastor) e formaggi stagionati (past o >)

◆ Staphy coagulasi positivi

◆ n c m M

◆ 5 2 100 1000

◆ Formaggi a pasta molle (past o >)

◆ Staphy coagulasi positivi

◆ n c m M

◆ 5 2 10 100

◆ *Pastorizzazione* (o pasteurizzazione): definita come un trattamento termico in grado di 1) eliminare i batteri patogeni non sporigeni e 2) consentire un significativa riduzione della carica batterica totale dei batteri non sporigeni responsabili di alterazione. Termine altresì utilizzato per designare trattamenti termici nell'intervallo 60-80°C, per tempi da alcuni secondi fino ad alcuni minuti.

◆ E' evidente la necessità di pervenire a una definizione precisa nelle varie situazioni pratiche. In generale la pastorizzazione consente una riduzione di 7-12 cicli logaritmici dei batteri non sporigeni. L'esatta quantificazione della riduzione necessaria va calcolata sulla base di analisi della valutazione del rischio che determinati batteri sopravvivano.

◆ **Burro e panna al latte crudo o < past**

◆ *E. coli*

◆ n c m M

◆ 5 2 10 100

◆ Latte in polvere

◆ *Enterobatteri* (a due classi)

◆ n c m

◆ 5 0 10

◆ Staphy coagulasi positivi

◆ n c m M

◆ 5 2 10 100

- ◆ Gelati e dessert
- ◆ *Enterobatteri*
- ◆ n c m M
- ◆ 5 2 10 100

- ◆ Lattanti
- ◆ Enterobatteri
- ◆ n c m M
- ◆ 10 0 Assente in 10g

◆ Criteri di sicurezza alimentare

- ◆ Formaggi, burro, panna da latte crudo, latte in polvere, gelati

◆ Salmonella

- ◆ n c m M
- ◆ 5 0 P/A in 25g