

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI PARMA

Dottorato di ricerca in Scienze e Tecnologie Alimentari

Ciclo .XXI

Sviluppo di una banca dati per la microbiologia alimentare e
validazione di modelli predittivi sulla cinetica di microorganismi
patogeni in prodotti italiani a base di latte e di carne

Coordinatore:
Chiar.mo Prof. Giuliano Sansebastiano

Tutor:
Dr. Paolo Boni

Tutor:
PhDr. József Baranyi

Dottorando: Elena Cosciani Cunico

[2009]

INDICE

1. INTRODUZIONE.....	1
1.1. RACCOLTA DATI SUI PRODOTTI A BASE DI LATTE E DI CARNE.....	4
1.2. MICROBIOLOGIA PREDITTIVA	9
1.2.1. Le origini.....	9
1.2.2. Modelli primari	9
1.2.3. Il Modello Baranyi	11
1.2.4. Modelli secondari.....	12
1.2.5. Modelli primari dinamici	15
1.2.6. Fattore di correzione.....	16
2. MATERIALI E METODI.....	18
2.1. RACCOLTA E ORGANIZZAZIONE DI DATI.....	18
2.1.1. Database	18
2.1.2. Combase: la struttura.....	20
2.2. UTILIZZO DI MEZZI INFORMATICI PER LA COSTRUZIONE DI MODELLI DI MICROBIOLOGIA PREDITTIVA.....	25
2.2.1. DMfit	25
2.2.2. Polinomi multivariati	27
2.2.3. Combase predictor.....	28
2.2.4. Salmonellae predictor	29
2.3. SVILUPPO DI UN MODELLO PREDITTIVO PER DETERMINARE IL TEMPO DI RIDUZIONE DECIMALE DI <i>E. COLI</i> O157:H7 IN FUNZIONE DI PH E A_w	30
2.4. CONTAMINAZIONI SPERIMENTALI: CHALLENGE TESTS	36
2.4.1. Microorganismi patogeni utilizzati per contaminare gli alimenti.....	36
2.4.2. Preparazione dell'inoculo.....	36
2.4.3. Protocollo sperimentale	38
2.4.3.1 Alimenti che supportano la crescita di <i>L. monocytogenes</i>	38
2.4.3.1.a) ready to eat (RTE), contaminati e conservati a diverse temperature;	38
(a) Mortadella Bologna al naturale.....	38
(b) Nervetti al naturale.....	38
(c) Ricotta salata.....	39
2.4.3.1.b) Alimenti crudi o precotti, conservati a diverse temperature.....	39
(a) Hamburger di tacchino.....	39
(b) Zampone precotto tagliato a fette e messo sottovuoto.....	39
2.4.3.2 Alimenti in cui <i>L. monocytogenes</i> diminuisce di concentrazione grazie alla temperatura di processo.	39
(a) Grana Padano, dal latte alla messa in fascera.....	39
2.4.3.3 Alimenti in cui <i>S. Typhimurium</i> , <i>E. coli</i> O157:H7, <i>L. monocytogenes</i> , diminuiscono di concentrazione grazie a fattori secondari dinamici (a_w , pH).	40
2.4.3.3.a) Salame nostrano:.....	40
(a) contaminato con miscela di ceppi di <i>L. monocytogenes</i> (Lm_At, Lm_m3, Lm_m4),	40
(b) contaminato con miscela di ceppi di <i>E. coli</i> O157:H7 (Ec_At, Ec_m1, Ec_m2),	40
(c) contaminato con miscela di ceppi di <i>S. Typhimurium</i> (Ss_At, Ss_m1, Ss_m2);	40
2.4.3.3.b) Salamini alla cacciatora DOP:	40
(a) contaminato con miscela di ceppi di <i>L. monocytogenes</i> (Lm_At, Lm_m5),	40
(b) contaminato con miscela di ceppi di <i>E. coli</i> O157:H7 (Ec_At, Ec_m1, Ec_m2),	40
(c) contaminato con miscela di ceppi di <i>S. Typhimurium</i> (Ss_At, Ss_m3, Ss_m4).	41
2.4.3.3.c) Salame Milano:	41
(a) contaminato con miscela di ceppi di <i>E. coli</i> O157:H7 (Ec_At, Ec_m1, Ec_m2),	41
(b) contaminato con miscela di ceppi di <i>S. Typhimurium</i> (Ss_At, Ss_m1, Ss_m2).	41
2.4.3.3.d) Salame della bergamasca:.....	41
(a) contaminato con ceppo di <i>L. monocytogenes</i> (Lm_At),.....	41
(b) contaminato con miscela di ceppi di <i>E. coli</i> O157:H7 (Ec_At, Ec_m1, Ec_m2),	41

(c) contaminato con ceppo di <i>S. Typhimurium</i> (Ss_At).....	41
2.4.3.3.e) Salame piccante:.....	41
(a) contaminato con ceppo di <i>S. Typhimurium</i> (Ss_At).....	41
2.4.4. Caratteristiche intrinseche ed estrinseche del prodotto alimentare.....	41
2.4.5. Determinazioni chimico-fisiche e microbiologiche dei prodotti alimentari.....	42
2.4.6. Forma e pezzatura del prodotto, processo di produzione, confezionamento e temperatura di stoccaggio.....	43
2.4.7. Contaminazione dell'alimento.....	44
2.4.8. Calcolo della velocità di crescita o di morte dei microorganismi inoculati nel substrato alimentare.....	44
2.4.9. Espressione dei risultati.....	45
2.4.10. Validazione dei modelli.....	46
2.4.11. Fattore di correzione sperimentale.....	46
3. RISULTATI.....	48
3.1. CHALLENGE TEST E VALIDAZIONE DI MODELLI PREDITTIVI.....	48
3.1.1. Alimenti che supportano la crescita di <i>L. monocytogenes</i>	48
3.1.1.1 Ready to eat (RTE): alimenti pronti al consumo.....	49
3.1.1.1.a) Mortadella Bologna IGP.....	49
3.1.1.1.b) Nervetti.....	53
3.1.1.1.c) Ricotta salata.....	57
3.1.1.2 Alimenti crudi o precotti, a diverse temperature di conservazione.....	60
3.1.1.2.a) Hamburger di tacchino.....	60
3.1.1.2.b) Zampone precotto.....	63
3.1.1.3 Alimenti in cui <i>L. monocytogenes</i> diminuisce grazie alla temperatura durante il processo di produzione.....	67
3.1.1.3.a) <u>Grana Padano DOP, dal latte alla messa in fascera</u>	67
3.1.1.4 Alimenti in cui <i>S. Typhimurium</i> , <i>E. coli</i> O157:H7, <i>L. monocytogenes</i> , diminuiscono di concentrazione grazie a fattori secondari che variano nel tempo (a_w , pH).....	68
3.1.1.4.a) Salame nostrano, vendibile dopo 42 giorni di stagionatura.....	69
(a) contaminato con <i>L. monocytogenes</i>	69
(b) contaminato con <i>E. coli</i> O157:H7.....	70
(c) contaminato con <i>S. Typhimurium</i>	71
3.1.1.4.b) Salamini alla cacciatora DOP, vendibili dopo 21 giorni di stagionatura.....	73
(a) contaminato con <i>L. monocytogenes</i> ;.....	73
(b) contaminato con <i>E. coli</i> O157:H7.....	74
(c) contaminato con <i>S. Typhimurium</i>	75
3.1.1.4.c) Salame Milano, vendibile dopo 60 giorni di stagionatura.....	77
(a) contaminato con <i>E. coli</i> O157:H7.....	77
(b) contaminato con <i>S. Typhimurium</i>	78
3.1.1.4.d) Salame della bergamasca, vendibile dopo 42 giorni di stagionatura.....	80
(a) contaminato con <i>L. monocytogenes</i>	80
(b) contaminato con <i>E. coli</i>	81
(c) contaminato con <i>S. Typhimurium</i>	82
3.1.1.4.e) Salame piccante.....	84
(a) contaminato con <i>S. Typhimurium</i>	84
4. CONCLUSIONI.....	86
4.1. RISPOSTA MICROBIOLOGICA NEGLI ALIMENTI.....	86
4.2. VALIDAZIONE DEI MODELLI MATEMATICI.....	87
4.3. PROSPETTIVE FUTURE.....	96
5. RINGRAZIAMENTI.....	99
6. BIBLIOGRAFIA.....	100

1. INTRODUZIONE

Il regolamento comunitario 2073/2005, che appartiene all'insieme dei regolamenti dell'Unione Europea facenti capo al cosiddetto "pacchetto igiene", riguardanti la sicurezza alimentare basata sull'analisi del rischio e dunque sui criteri che consentono liberi scambi alimentari internazionali (reg. CE 178/2000, reg. CE 854/2004, www.cfsan.fda.gov, FSIS 2001, www.wto.org), all'allegato II indica nella microbiologia predittiva uno degli strumenti tecnico-scientifici a supporto delle documentazioni sulle garanzie di sicurezza alimentare in particolare per i prodotti pronti al consumo (Ready to eat, RTE).

Numerosi tra i prodotti tradizionali tipici italiani a base di latte o di carne rientrano in questa categoria; generalmente sono prodotti di prima trasformazione che devono la propria stabilità a processi fermentativi e non a trattamenti termici; a discapito di una qualità organolettica e nutrizionale maggiore, tuttavia, la sicurezza microbiologica di tali prodotti non è sempre garantita (FAO/WHO 2004; Buchanan *et al.*, 2000) e documentabile.

Casi di focolai epidemici legati a presenza di microorganismi patogeni quali *Listeria monocytogenes*; *Escherichia coli* O157:H7 e *Salmonella Typhimurium*, ritrovati in prodotti di prima trasformazione come salami e formaggi a latte non pastorizzato, sono descritti in letteratura nel corso degli ultimi decenni (Gerner-Smidt *et al.*, 2008; Oliver *et al.*, 2005; Boni *et al.*, 1996, www.cdc.gov).

Tradizionalmente la sicurezza e la durabilità (*shelf-life*) di tali prodotti sono state stimate attraverso contaminazioni sperimentali (*challenge test*) (Hinkens *et al.* 1996, Genegeorgis *et al.*, 1991, Ryser and Marth, 1987, Faith *et al.*, 1997, Glass *et al.*, 1998, Ramsaran *et al.*, 1998). La crescita, la morte o la sopravvivenza dei microorganismi sono state studiate inoculando l'alimento con ceppi patogeni e ricercando poi la presenza dei batteri ad intervalli prestabiliti di tempo, dopo normali condizioni di conservazione o in situazione di abuso termico.

Il notevole costo per le analisi, il tempo necessario e la complessità di questo tipo di sperimentazioni, sono risultati, tuttavia, insostenibili per molte realtà, soprattutto della piccola e media industria. Si è manifestata perciò la necessità di elaborare un metodo

più economico e rapido in grado di fornire risposte altrettanto affidabili, la microbiologia predittiva.

I modelli predittivi teorici, generati considerando il comportamento dei microorganismi in terreni colturali controllati, devono essere validati sui prodotti alimentari. L'errore tra il modello e i dati osservati nelle contaminazioni sperimentali può essere significativo; infatti, le caratteristiche degli alimenti possono creare un effetto protettivo nei confronti dei batteri. Tuttavia è possibile calcolare un fattore di correzione, *cf* (*corrective factor*), tra il modello teorico e il dato osservato in modo che la predizione si avvicini maggiormente al dato reale.

La complessità del sistema "risposta microbiologica/ fattori ambientali" richiede, per la modellazione e l'analisi dei dati, l'organizzazione delle informazioni in una banca dati per la microbiologia alimentare, *ComBase* (www.combase.cc), e la conoscenza dei processi e delle produzioni alimentari (www.ars-alimentaria.it).

La microbiologia predittiva è basata sulla premessa che una popolazione batterica che si trova in un substrato (alimento o terreno colturale), cresca, sopravviva, muoia e produca tossine in modo riproducibile. Pertanto, basandosi su precedenti osservazioni è possibile predire il comportamento degli stessi microorganismi in condizioni ambientali simili (Ross and McMeekin, 1994).

In brodi di coltura i modelli primari di microbiologia predittiva descrivono la variazione logaritmica della concentrazione batterica (*logc*) nel tempo, in ambiente costante. Il parametro principale del modello primario è la massima velocità specifica (*maximum specific rate*), μ se la scala è in sale logaritmica naturale (\ln) o *rate* se la scala è logaritmica in base 10.

Dal valore μ si possono calcolare il tempo di duplicazione batterica (T_d), il tempo per arrivare al limite legale di 100 ufc/g (T_{100}) di *L. monocytogenes* negli alimenti RTE, la durata della *shelf-life* di un prodotto alimentare e, ancora, il tempo di riduzione decimale (*D value*).

I modelli secondari di microbiologia predittiva descrivono come i parametri del modello primario dipendano dai fattori ambientali. Come il più significativo parametro del modello primario è μ , così i

modelli secondari studiano principalmente come varia μ in funzione temperatura, pH e a_w .

Tuttavia la matrice alimentare, per la sua complessità, non rappresenta un sistema costante. Specialmente i prodotti di prima trasformazione, come ad esempio salumi e formaggi, sono caratterizzati, durante la fermentazione e la stagionatura, da un profilo dinamico di pH e/o a_w . In questo caso si parla di “modello primario dinamico” e di velocità specifica di crescita o morte istantanea. Considerando piccoli intervalli di tempo si può presupporre che in quegli intervalli la velocità specifica sia costante. Grazie a questa considerazione, si può calcolare, ad esempio, l'efficacia di un trattamento termico a temperature variabili o il numero di cicli logaritmici di abbattimento, o il tempo per arrivare a 100ufc/g di un microorganismo di interesse, durante la stagionatura o la fermentazione di un prodotto caratterizzato da fattori ambientali che cambiano nel tempo.

Risulta, perciò, indispensabile conoscere le peculiarità delle specie batteriche di interesse: microorganismi patogeni; deterioranti; indicatori di igiene, e le caratteristiche specifiche di ogni alimento. In particolare, per la matrice alimentare: la temperatura di conservazione, o di processo; il valore di pH; di attività dell'acqua (a_w); la presenza di flora batterica competitiva; l'aggiunta di conservanti; il confezionamento in atmosfera modificata.

Partendo dall'assunto che un microorganismo si moltiplica tanto più velocemente quanto l'ambiente che lo circonda gli è favorevole, e viceversa, si possono mettere in relazione una, o più di una, tra queste variabili, tra temperatura, pH, a_w , CO₂ e presenza di acidi organici, con la velocità di crescita o di morte della popolazione batterica di interesse. Di conseguenza, i passaggi fondamentali per la costruzione di modelli di microbiologia predittiva risultano essere:

- Raccolta di informazioni sulle caratteristiche chimiche, chimico-fisiche e le variabili di processo che caratterizzano un substrato alimentare durante tutto la dinamica di maturazione e trasformazione dello stesso.
- Conoscenza del comportamento del microorganismo di interesse in un substrato costante (brodo di coltura) e calcolo della velocità di crescita o di morte dello stesso.

- Studio della relazione che intercorre tra la cinetica di comportamento del microorganismo e la modificazione delle variabili esterne che caratterizzano il substrato.
- Validazione del modello matematico teorico tramite contaminazioni sperimentali degli alimenti e calcolo dell'errore tra modello e situazione reale (McMeekin *et al.*, 1993).

Risulta evidente che la gestione di un numero così elevato di informazioni e la necessità di fruibilità pubblica dei dati, sia per la costruzione di modelli matematici, sia per un'elaborazione statistica per l'analisi del rischio, richieda lo sviluppo di un archivio informatico di facile consultazione. L'archivio deve contenere i dati riguardanti i microorganismi e l'ambiente in cui si trovano, e deve essere possibile creare *link* di connessione tra un'informazione e l'altra (McMeekin *et al.*, 2006). Tale banca dati, denominata *ComBase*, voluta da centri di ricerca sulla sicurezza alimentare e organizzazioni per la sicurezza pubblica, è stata pubblicata nel 2003 ed è continuamente alimentata (Baranyi and Tamplin, 2004).

I dati e le informazioni raccolte durante il progetto di dottorato sono stati trasferiti in *Combase* e sono pubblicamente accessibili in rete (www.combase.cc).

1.1. Raccolta dati sui prodotti a base di latte e di carne

All'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna (IZSLER), con sede a Brescia, presso il dipartimento di Sicurezza Alimentare (DSA) diretto da Dr. Boni, da circa trenta anni si raccolgono dati sulla sicurezza alimentare, si effettuano analisi epidemiologiche, misurazioni chimico-fisiche e microbiologiche. Grazie a progetti di ricerca approvati e finanziati dal Ministero della Salute, sono stati raccolti dati al fine di caratterizzare alcuni prodotti tipici italiani e questi sono stati divulgati sul sito tecnico-informativo www.ars-alimentaia.it. Il sistema informativo raccoglie i risultati di indagini sulla sicurezza alimentare ottenuti da diversi Istituti Zooprofilattici Sperimentali dislocati nelle regioni di Italia (progetto ministeriale corrente: "*Sistema informativo sulla Sicurezza alimentare: implementazione con rilievi di campo e di*

laboratorio e messa a punto di metodologie molecolari correlate alle verifiche di identità, qualità e salubrità”, 2005; progetti ministeriali finalizzati: “Rilievi di campo (processi e prodotti) e attivazione di prassi di sorveglianza epidemiologica degli allevamenti per l'alimentazione del sistema informativo sulla sicurezza alimentare”, 2006; “Messa a punto e attivazione di modelli di sorveglianza epidemiologica e gestione del rischio a livello di produzione primaria e di trasformazione in prodotti tradizionali del territorio”, 2007; “Determinazione delle caratteristiche di qualità e sicurezza basata su microbiologia predittiva e valutazione del rischio di prodotti tradizionali nel territorio”, 2008).

Ars alimentaria è un sistema a supporto e documentazione delle caratteristiche di identità, qualità e sicurezza dei prodotti e degli alimenti italiani.

Nel sito è possibile reperire informazioni derivate dall'attività di studio dei prodotti e di monitoraggio e sorveglianza dei processi per documentare scientificamente le caratteristiche di qualità e salubrità degli alimenti. Gli Istituti Zooprofilattici Sperimentali italiani rappresentano il punto di riferimento per l'alimentazione del sito al quale contribuiscono e partecipano le aziende di trasformazione, gli operatori economici, gli organismi di vigilanza.

I dati raccolti sui prodotti alimentari e la conoscenza approfondita dei processi di trasformazione della materia prima, hanno permesso di creare una preziosa banca dati dove poter reperire le informazioni necessarie per applicare i modelli di microbiologia predittiva a tali alimenti. Infatti, caratterizzando gli alimenti dal punto di vista chimico, fisico e microbiologico, e conoscendo le variabili di processo durante la trasformazione e la stagionatura, è possibile predire il comportamento di eventuali microorganismi patogeni o alterativi nell'alimento con un certo margine di errore.

Il disegno sperimentale, considerato anche nel progetto di dottorato, ha coinvolto il campionamento in tre stabilimenti, produttori del medesimo alimento, di tre lotti di produzione. Per prodotti a base di latte è stato campionato: il latte crudo, o pastorizzato dopo l'innesto di colture starter; la cagliata; il formaggio in diverse fasi di processo e di stagionatura. Per prodotti a base di carne sono stati analizzati: la materia prima, impasto, se si tratta di salame; il prodotto durante le

diverse fasi di processo, stagionatura e conservazione (Smulders, 2006, Daminelli *et al.*, 2008).

Sono stati valutati nel tempo i seguenti profili:

1. temperatura;
2. pH;
3. a_w ;
4. batteri lattici (Lab);
5. batteri della famiglia delle *micrococcaceae*;
6. Enterococchi;
7. carica batterica mesofila totale.

E' stato monitorato il profilo/presenza di:

1. lieviti;
2. muffe;
3. *Enterobacteriaceae*;
4. *Escherichia coli*;
5. Clostridi solfito riduttori;
6. *Staphilococcus aureus*.

Ogni alimento che rientra nel progetto di ricerca è stato catalogato registrando dapprima la ditta produttrice; poi ne sono descritti l'aspetto, gli ingredienti utilizzati per ottenerlo e le fasi del processo riportate in modo dettagliato, considerando in particolare il rapporto tempo temperatura durante la produzione e la shelf life.

Durante il periodo di dottorato sono stati archiviati circa 12.000 profili batterici raccolti su 136 prodotti alimentari ottenuti in 167 differenti stabilimenti (in alcuni casi il medesimo prodotto alimentare è stato analizzato in diverse sedi produttive). Sono stati caratterizzati formaggi e salumi DOP come Taleggio, Pecorino Siciliano, Casciotta di Urbino, Grana Padano, Bitto, Caciocavallo Silano, Provolone Valpadana, Ragusano, Quartirolo Lombardo, Salamini italiani alla cacciatora, Coppa Piacentina, Pancetta Piacentina, Salame Piacentino; prodotti IGP come Bresaola della Valtellina, Mortadella Bologna, Zampone Modena, e altre produzioni locali minori o preparati alimentari (Tab. 1). Alcuni prodotti sono stati contaminati con patogeni durante il processo di produzione o la loro *shelf-life*.

Nome prodotto	Produttore	Nome prodotto	Produttore
Salsiccia Appennino Dauno	Sal. Moccia Mario	Pecorino siciliano DOP	Cas. Amato Giuseppa
	Sal. Moreno di D'Onofrio		Ferrara Giuseppe
	Carni SUS Gisonni M.		Pravatà Giuseppe
Cacioricotta	Antica cas. Pietra del sale	Bottarga di tonno	Castiglione Nino
	Piano della spina	Cosacavaddu ibleo	Cassarino F.lli
	Latteria Salvia Maria		Guerrieri Rosario
Pecorino di Filiano	Antica cas. Pietra del sale		Tumino Giovanni
	Piano della spina	Ragusano DOP	Ragusa Latte
	Sapori lucani F.lli Caraffa	Formagela Valseriana	Paleni (gromo)
Caciocavallo Silano DOP	Casearia F.lli Pizzo	Bresaola Valtellina IGP	Robustellini S.r.l.
	Cordisco Antonio		Paginoni distr. aliment.
Caciocavallo	San Salvatore	Scimudin	Latteria soc. Valtellina
Pecorino Lago di Bolsena	Alta Tuscia Formaggi	Piattono	Latteria soc. Valtellina
Pecorino Martano nero	Alta Tuscia Formaggi	Friseggio	Cattaneo Dario Az.Agr.
Crema di Roma	Giuseppe Lopez	Caprino fresco	Cattaneo Dario Az.Agr.
Salamella Cicolana	SA.NO	Ribiola della Bettola	C.na Bosco Gerolo
Salamella di fegato	SA.NO	Cacio del Po	Caseificio Borgonovo
Pecorino Gran Riserva	Italformaggi	Strolghino	Galli Remo salumificio
Pecorino Lago di Bolsena	Alta Tuscia Formaggi	Strolghino con noci	Galli Remo salumificio
Salame Napoli	Sal. Canonico Grazia	Salame mantovano	Predaroli & Bonandi Sal.
	Sal. F.lli Spiezia	Salame casalino	Predaroli & Bonandi Sal.
	Sal. Schettino Raffaele	Salame di mora romagnola	Natural salumi
Formaggio di fossa	Fattorie Marchigiane	Caprino fresco	Az. Agr. Il Boscasso
	Caseificio Val d'Apsa	Salama da sugo	Magnoni
	Caseificio La Giunchiglia	Bitto DOP	Mazzoni Ivo Az. Agr.
	Cas. Martarelli M.Luisa		Bongiolatti Giancarlo
Galantina	Orma group	Salame prealpino varesino	Salumificio Bustese
Casciotta di Urbino DOP	Fattorie Marchigiane		Pian du Lares Az. Agr.
	Caseificio Val d'Apsa		Az. Agr. Martinelli Gloria
	Caseificio La Giunchiglia	Salame cremonese	Colombo Salvo & C.
Ciabuscolo	Salumificio Ciriaci	Crescenza	Latt. Soc. Ca' de' Stefani
	Salumificio Mezzaluna		Cas. Soc. Montirone
	Passamonti S.r.l.	Fontal	Ind. Agr. Cas. Medeghini
	CCS		Cas. Soc. Montirone
Ribiola di Roccaverano	Stutz Pfister Simone	Occhiatello	Cas. F.lli Dancelli
	Rossello Enrico	Salame Pizza	Foresti S.p.A.
	Taschetti Mariolina	Salame della bergamasca	Cas. F.lli Dancelli
Macagn	Bozzo Loretta	Salamini cacciatora DOP	Citterio
	Giacomone Pier Flavio	Mascarpone	Bortolotti Mario
	Venara Ugo	Grana Padano DOP	Volpi Salumificio
Bra duro	Cas. Rabbia Francesco	Salamini cacciatora DOP	foresti
	Cas. San Martino	Mozzarella per pizzeria	Consorzio GP DOP
Salame crudo Cuneo	Sal. Dho Giuseppe	Silter	Volpi Salumificio
	Salumificio Chiapella		Cantarelli
Lucanica trentina	Salumificio Crucolo		Baccanelli Oscar
Lucanica trentina stag.	Cis Massimo macelleria		Bariselli Maffignoli A.
Luganega del trentino	Salumificio Val Rendena		Bezzi Andrea
Casolet	Cas. Comp. Cercen		Bontempi
	Cas. Soc. Presanella		Romelli
Salame nostrano padovano	Salumificio Bazza		Spandre
	Az. Italbontà	Hamburger di pollo	Maggioni
	Crepaldi Giannino	Bresaola della Valtellina IGP	Rigamonti salumificio
Vastedda Valle del Belice	Cas. Alagna Salvatore	Prosciutto cotto	Tre Valli VR - Montorsi
	Cas. Bavetta Calogero	Mortadella di Bologna IGP	Tre Valli ? - Montorsi
	Cas. Campo Pietro	Formagella di Tremosine	Alpe del Garda
	Cas. Cangemi Antonino	Formagella della Val Trompia	Malga di Piano Paterlini
	Cas. D' Aloisio Rocco		Mensi Adriana
	Cas. Interrante Salvatore		
	Caseificio Rivetto		
	Caseificio Pignolo		

Nome prodotto	Produttore	Nome prodotto	Produttore
Formaggella della Val Trompia	Mensi Emanuela	Spianata	Tre Valli - Montorsi
	Mensi Pietro Giuseppe	Grana Padano DOP grattug.	Consorzio
	Spranzi Palmira	Mortadella IGP affettata	Tre Valli RE - Montorsi
	Zanolini Esterina	Speck affettato	Tre Valli RE - Montorsi
	Zanolini Renato	Yogurt intero	Granarolo
Arista speziata	Tre Valli VR - Montorsi	Mortadella IGP affettata	
Prosciutto cotto	Tre Valli VR - Montorsi	Mortadella affettata	Tre Valli RE - Montorsi
Provola affumicata	Spinelli	Prosciutto arrosto affettato	Tre Valli RE - Montorsi
Taleggio DOP	Emilio Mauri	Caprino	Capragarda
	Acquistapace	Deli (fesa tacchino al forno)	Delicatesse
Fishburger	Coldfish	Fesa bovino inglese naturale	Delicatesse
Arista speziata	Tre Valli VR - Montorsi	Cima alla genovese	Delicatesse
Prosciutto cotto	Tre Valli VR - Montorsi	Burro di montagna	
Prosciutto cotto cubettato	Tre Valli - Montorsi	Prosciutto arrosto affettato	Tre Valli RE - Montorsi
Prosciutto cotto cubettato	Tre Valli - Montorsi	Ricotta	Caseificio Elda
Caprino	Valpersane	Cacciatori DOP	Pedrazzoli salumificio
Caprino	Capragarda	Bagoss	Stagnoli Giovanni
Pancetta arrotolata	Pozzoli 1875 - Citterio		Buccio Aldino
Ricotta	Caseificio Elda	Prosciutto cotto Festa	Salvadori Amerigo
ripieno spinaci e ricotta	Caseificio Elda	Nostrano Val Trompia	Fumagalli Industria Alimentare
Raviggio	Fatt. Trapoggio Boscherini		Az Malga di Piano di Paterlini
Ricotta	Caseificio Elda	Salame Cremini	Zanolini Andrea
Arista speziata	Tre Valli VR - Montorsi	Salame Casalini contadini MN	Beltrami Mauro
Taleggio DOP	Emilio Mauri		Salumi Cremini
Pancetta cubettata	Montorsi	Prosciutto crudo affettato	Az. Agr. Eredi Mattioli
Sugna	Non definito	Bresaola affettata	Agr. Cantina Cà Roma
Pancetta tesa	Pozzoli 1875 - Citterio	Nervetti	Az Agr. Mezza
Coppa Piacentina	San Bono	Bagoss contaminato	Montana Alimentari S.p.A.
Salame gigante	Volpi salumificio	Pecorino grattugiato	Montana Alimentari S.p.A.
Mozzarella per pizza	Cantarelli	Ricotta ovina salata	Delicatesse S.p.A.
Mozzarella per pizza	Cantarelli	Taleggio DOP	Stagnoli Giovanni
Mozzarella cubettata	Cantarelli	Quartirolo DOP	Gennaro Auricchio S.p.A.
Mozzarella cubettata	Spinelli	Polline essiccato e congelato	Gennaro Auricchio S.p.A.
Caprina (stracchino di capra)	Coop. Val Palot	Ricotta ovina salata	Acquistapace S.p.A.
Formaggella	Coop. Val Palot	Salame Milano	Acquistapace S.p.A.
Zampone a fette	Citterio	Provolone mezze lune	UNIAPI Lombardia
Taleggio DOP	Emilio Mauri	Fesa bovino inglese naturale	Gennaro Auricchio S.p.A.
Deli (fesa tacchino al forno)	Delicatesse	Yogurt intero	Delicatesse
Cima alla genovese	Delicatesse	Yogurt alla fragola	Serenissima
Fesa bovino inglese naturale	Delicatesse		Serenissima
Yogurt intero	Serenissima		
Yogurt alla fragola	Serenissima		

Tab. 1: Produttori e prodotti censiti

Elenco di prodotti alimentari e diversi stabilimenti di produzione caratterizzati sotto il profilo microbiologico, chimico e chimico-fisico e dal processo di produzione. Dati inseriti nella banca dati *ComBase* (www.combase.cc) e nel sito *ars-alimentaria* (www.ars-alimentaria.it).

1.2. Microbiologia Predittiva

1.2.1. Le origini

Storicamente si stabilisce la nascita di questa disciplina, agli inizi del secolo, quando prima Bigelow (1921) e poi Esty e Meyer (1922) descrissero come, in conserve vegetali mantenute a temperatura costante, il logaritmo della concentrazione di spore di *Clostridium botulinum* diminuisse nel tempo in modo lineare. Tale modello esprime semplicemente che, in un ambiente costante, ad una data temperatura, la velocità relativa, o specifica, di morte di questo patogeno è costante nel tempo (modello primario). In altre parole che la percentuale di popolazione cellulare inattivata nell'unità di tempo è costante. Successivamente Scott (1936) verificò come la temperatura influenzasse la velocità di morte dei microorganismi, evidenziando che il logaritmo della velocità decresceva in modo lineare all'aumentare della temperatura (modello secondario). Tuttavia anche se la definizione di microbiologia predittiva fu coniata negli anni '30 è solo dagli anni '80 che questa scienza ha iniziato ad essere studiata intensamente e applicata con un approccio quantitativo per la determinazione dell'evoluzione microbica nel substrato alimentare.

Sicuramente la possibilità di elaborare i dati con computer e condividerli tramite internet ha amplificato e facilitato l'utilizzo dei mezzi che la microbiologia predittiva mette a disposizione di chi ne vuole sfruttare le peculiarità.

Attualmente la definizione di microbiologia predittiva racchiude il concetto di una scienza quantitativa in grado di descrivere in modo oggettivo l'effetto delle operazioni di processo, di distribuzione e di conservazione sull'evoluzione dei microorganismi negli alimenti, da un punto di vista di sicurezza e di qualità, e che tale dinamica sia espressa attraverso modelli matematici (McKellar *and* Lu, 2004).

1.2.2. Modelli primari

Dalla terminologia classica si definiscono modelli primari di microbiologia predittiva quelle funzioni matematiche che descrivono

il comportamento di una popolazione batterica in un ambiente costante.

In un brodo colturale si valuta la dinamica di crescita o di morte dei microorganismi in un *range* di pH, a_w , e temperatura di conservazione o di trattamento che imiti il substrato alimentare dove il microorganismo potrebbe svilupparsi o morire. Se l'andamento nel brodo di coltura, con le variabili che maggiormente influenzano il comportamento dei microorganismi, discosta in modo significativo da quello nella matrice alimentare, sarà necessario considerare un'ulteriore variabile in grado di modificare la cinetica di comportamento dei microorganismi, quale presenza nell'alimento di acidi organici, conservanti o di CO₂.

Il parametro principale dei modelli primari è la velocità di crescita specifica (μ) che può essere concepita come il numero di divisioni cellulari in un'unità di tempo (in *Combase* questo intervallo è di un'ora). Può essere dimostrato matematicamente che può essere identificata come la massima pendenza del logaritmo naturale della concentrazione cellulare rispetto al tempo.

La difficoltà di determinare il valore di μ è che:

1. le cellule raggiungono gradualmente la μ , dopo una fase lag, generalmente necessitano di almeno 3-4 generazioni;
2. l'ambiente in cui si trovano le cellule non è mai costante perché le cellule producono metaboliti che aumentano di concentrazione all'aumentare della popolazione batterica.

Idealmente, per calcolare la μ in un brodo colturale, la concentrazione cellulare (cell/ml) dovrebbe essere di circa 10³ cell/ml, in modo che possa, ammettiamo, aumentare di circa un log₁₀ durante la fase di adattamento al substrato (*lag phase*) e che nella fase esponenziale di crescita la concentrazione possa incrementarsi di altri 2-3 log₁₀ avendo, così, un *range* sufficiente per determinare il parametro μ .

Se $\log c$ definisce il log₁₀(concentrazione) e t definisce il tempo, allora μ può essere calcolata dalla massima pendenza della funzione $\log c(t)$

$$\mu = \ln(10) \cdot \max \frac{d \log c}{d t} \approx 2.3 \cdot \max \frac{d \log c}{d t}$$

Dai dati della *logc* osservati, ciò può essere ottenuto adattando (*to fit*) le misurazioni ad una curva sigmoide e considerando μ come la massima pendenza della curva.

La curva di crescita o di morte è una sigmoide in quanto il *logc* non varia nelle fasi che precedono (*lag* o *shoulder*) o seguono (*plateaux* o *tail*) la fase esponenziale di crescita o di morte lineare (Ross *et al.*, 2000).

1.2.3. Il Modello Baranyi

Il modello primario di Gompertz, curva sigmoide nella quale la fase lag è calcolata empiricamente da un'interpretazione geometrica, è stato il più comunemente usato per descrivere la moltiplicazione batterica fino alla metà degli anni '90.

Un nuovo approccio è stato dato da Baranyi e Roberts (1994); gli autori diedero valide basi matematiche per un modello meccanicistico della fase *lag* (Fig. 1).

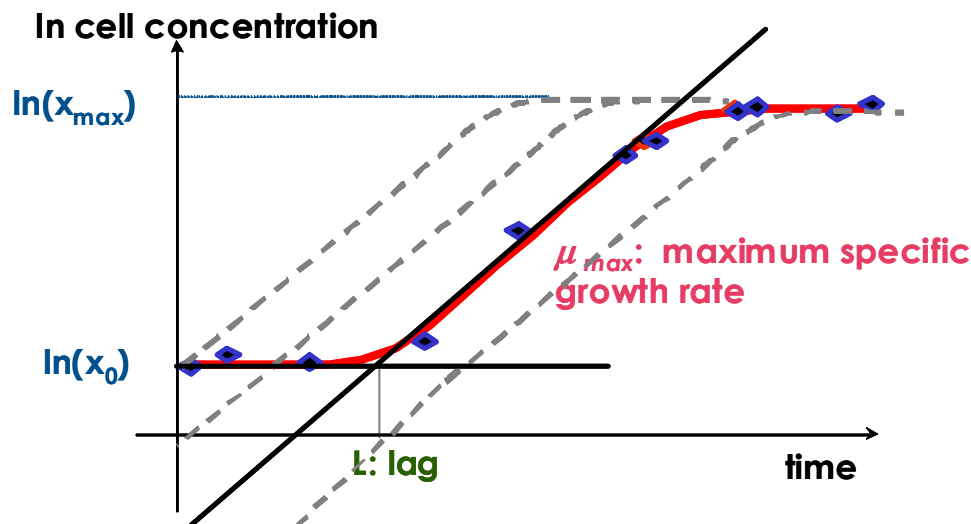


Fig. 1: Rappresentazione del modello Baranyi, modello complesso semi meccanicistico e dinamico (Baranyi and Roberts, 1994)

Baranyi introduce nella funzione il parametro h_0

$$h_0 = lag * \mu$$

l'autore lo definisce “*work to be done*”, cioè il lavoro necessario alla cellula per organizzarsi e poi duplicarsi ed è calcolato tramite il rapporto tra *lag*, considerato come il tempo utile affinché una sostanza necessaria raggiunga la soglia critica nella cellula, e μ , velocità massima specifica. La fase *lag* dipende dalla “storia” dell'inoculo, sarà più lunga se le cellule sono state danneggiate o stressate, mentre la velocità di crescita è autonoma e dipende solo dall'ambiente in cui si trova l'inoculo. Il parametro h_0 può essere espresso anche da α_0

$$\alpha_0 = exp-(h_0)$$

α_0 è definito dall'autore “*initial physiological state*” (stato fisiologico iniziale delle cellule), varia tra 0 ed 1, e può essere interpretato come la “disponibilità” delle cellule a duplicarsi. 1 significa che la totalità delle cellule si riproduce immediatamente (non esiste fase Lag), mentre 0 significa che le cellule non riescono a duplicarsi e la fase lag è infinita.

Il modello Baranyi a differenza di modelli predittivi deterministici, come quello espresso dalla funzione di Gompertz o il modello logistico, è complesso semi-meccanicistico e dinamico. Pur essendo di meno facile interpretazione, la funzione studiata da Baranyi è quella che descrive al meglio il comportamento dei microorganismi in substrati non costanti.

Citato in oltre 300 articoli di microbiologia predittiva, il modello Baranyi attualmente è il più utilizzato, (www.wok.mimas.ac.uk). Esso descrive, a differenza di altri modelli primari, le fasi di transizione della popolazione batterica da statica a dinamica sia in una situazione di crescita che di morte (Baranyi and Pin, 2001) in questo modo la velocità può essere calcolata anche se le caratteristiche del substrato variano nel tempo (Baranyi, 1995).

1.2.4. Modelli secondari

I modelli secondari studiano in che modo l'ambiente in cui si trovano i microorganismi, inteso come variabili estrinseche, quali, ad esempio, temperatura e atmosfera modificata, o intrinseche, pH, a_w , conservanti, metaboliti e competizione batterica, singolarmente o

combinare fra loro, influenzino i parametri generati dai modelli primari.

Considerando μ il parametro principale dei modelli primari, i modelli secondari studiano come varia questo parametro in funzione di fattori esterni (ef):

$$\mu(ef_1, ef_2, \dots)$$

dove ef_i sono i fattori esterni ($i=1,2,\dots$) con la temperatura generalmente considerata ef_1 , il pH ef_2 , e l'attività dell'acqua a_w o b_w (Gibson *et al.*, 1994) ef_3 :

$$ef_1 = temp$$

$$ef_2 = pH$$

$$ef_3 = b_w.$$

Negli anni '80 Ratkowsky (1983), ad esempio, stabilì che esistesse una relazione diretta tra la radice quadrata della velocità specifica di crescita e la temperatura del substrato (T) dove si trovavano i microorganismi, fino alla temperatura ottimale di crescita:

$$\mu_{max} = b(T - T_{min})$$

Essendo molteplici i fattori in grado di influenzare l'andamento dei microorganismi, i modelli matematici maggiormente utilizzati per i modelli secondari sono polinomi multivariati (Ross and Dalgaard, 2003). Essi rappresentano i dati espressi dalle osservazioni empiriche.

$$\ln(\mu) = a_0 + a_1 * ef_1 + a_2 * ef_2 + a_3 * ef_3 + a_4 * ef_1 * ef_2 + a_5 * ef_1 * ef_3 + a_6 * ef_2 * ef_3 + a_7 * (ef_1)^2 + a_8 * (ef_2)^2 + a_9 * (ef_3)^2 \pm \epsilon.$$

Il successo dei modelli secondari ottenuti da polinomi multivariati è che sono basati sulla regressione dei dati sperimentali; i parametri del modello (a_0, a_1, a_2, \dots) si possono ottenere utilizzando *software* di semplice consultazione e pubblicamente reperibili (www.geocities.com/SiliconValley/Network/1032/).

Il programma di calcolo "*essential regression program*" permette di selezionare quali siano i parametri significativi ($\alpha < 0.05$) nella modulazione del logaritmo della velocità di crescita o nel logaritmo del D *value*.

Per costruire modelli secondari non è consigliabile valutare, come fattore discriminante per l'accettabilità, esclusivamente l'errore residuo minore tra il dato osservato e quello predetto. Infatti, una buona corrispondenza tra i dati sperimentali e quelli ottenuti dall'equazione matematica, "good fit", può essere a discapito di una "over-parameterisation" del modello e di perdita d'informazioni (Fig. 2).

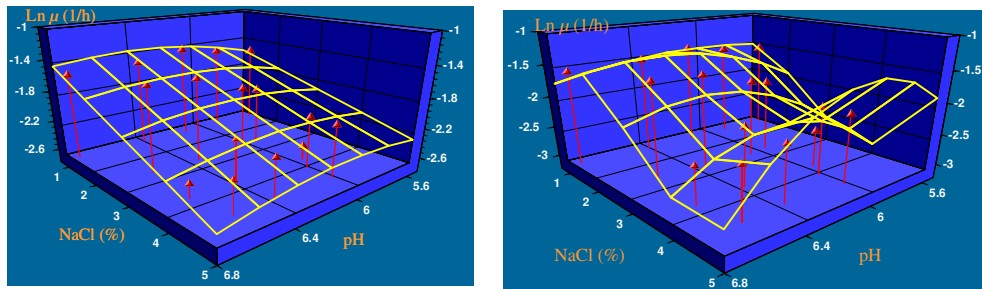


Fig. 2: **Rappresentazione di un modello secondario.** Polinomio multivariato che descrive la crescita di *Salmonellae* a 15°C influenzata da pH e concentrazione salina (Gibson et al, 1988). Le frecce rosse rappresentano i dati sperimentali e il piano giallo il modello. È evidente nella figura di destra l'effetto negativo di utilizzare un maggior numero di parametri per diminuire l'errore del modello (Baranyi, 2003)

A questo proposito, riferendosi a modelli per l'analisi del rischio quantitativo, anche Zwietering (2008) afferma "Simple is not stupid and complex is not always better", mentre il Dr. Baranyi durante i seminari sulla modellazione e la microbiologia predittiva usa sovente l'espressione che un modello matematico è quello dove si è utilizza "the art to omit the unnecessary" (Baranyi et al., 1996).

Il substrato alimentare è complesso e le variabili che influenzano l'andamento possono essere decine; generalmente nei modelli se ne considerano al massimo 4, che sono le tre variabili ambientali principali e l'aggiunta di un ulteriore parametro che può essere la presenza di acidi organici, conservanti, CO₂ (www.combase.cc, Clavero et al., 1996, Le Marc et al., 2002, Pond et al., 2001, Rosso et al., 1996, Baranyi et al., 1996, Zwietering et al., 1990).

1.2.5. Modelli primari dinamici

Nei modelli primari dinamici è considerata anche la variazione dei fattori che caratterizzano il substrato dove si trovano i microorganismi. Si ipotizzi che i fattori dominanti cambino nel tempo ma che, considerando solo piccoli intervalli di tempo, questi si possano considerare costanti. In questo scenario è possibile calcolare la μ istantanea di crescita o di morte dei microorganismi con equazioni differenziali come quelle descritte nel modello Baranyi (Baranyi *et al.*, 1993). Queste non risultano necessariamente in soluzioni algebriche né tanto meno in curve sigmoidi; infatti, la velocità varia al variare dell'ambiente in cui si trova secondo relazioni matematiche descritte dai modelli secondari.

Tuttavia, anche in un ambiente dinamico, la risposta batterica può essere simulata, con sufficiente accuratezza, su un semplice foglio elettronico, attraverso il metodo delle differenze centrali, che risultano in un metodo numerico di secondo ordine per simulare il modello in modo numerico, come spiegato di seguito.

Si consideri la concentrazione iniziale y_0 e si supponga che un modello secondario di microbiologia predittiva definisca la funzione che lega μ ai fattori ambientali esteri, $\mu (ef_1, ef_2, \dots)$.

Si ipotizzi di voler simulare la variazione della concentrazione batterica rispetto al tempo, in un intervallo definito $[0, t_{obs}]$, dove anche i fattori esterni potrebbero variare nel tempo $ef_i(t)$.

Si divida $[0, t_{obs}]$ in n intervalli h sufficientemente piccoli:

$$\begin{aligned}t_0 &= 0 \\t_1 &= h \\&\dots \\t_n &= n \cdot h = t_{obs}\end{aligned}$$

poi si applichi la sequenza :

$$y_{i+1} = y_i + \mu \left(ef_1 \left(\frac{t_i + t_{i+1}}{2} \right), ef_2 \left(\frac{t_i + t_{i+1}}{2} \right), \dots \right) \cdot h$$

La pendenza nel mezzo dell'intervallo $[t_i, t_{i+1}]$ è usata per calcolare il valore simulato successivo, y_{i+1} ; è per questo che il metodo prende il nome di “centrale”. Si tratta di un'approssimazione perché è

al 100% accurato quando la soluzione è un polinomio di secondo grado altrimenti la sua accuratezza dipende dalla scelta degli intervalli h sufficientemente piccoli.

Questo metodo è stato utilizzato per generare la predizione dell'andamento dei microorganismi, sapendo che a_w e/o pH variavano durante il tempo considerato.

1.2.6. Fattore di correzione

I modelli predittivi sono generati da dati sperimentali ottenuti in ambienti controllati come i brodi colturali. La predizione teorica, rispetto alla risposta microbiologica negli alimenti, risulterà “safe” per la crescita batterica poichè nei terreni colturali i batteri trovano le condizioni ottimali di sviluppo, e, spesso, “unsafe” nei modelli che descrivono la sopravvivenza batterica in quanto l'alimento funge da protezione ai microorganismi stessi.

L'errore del modello rispetto al comportamento del microorganismo sulla matrice alimentare può arrivare anche al 50% (Pin *et al.*, 1999). Per diminuire il divario tra la predizione e i dati osservati sull'alimento, si può assumere che l'errore tra il modello e l'alimento sia costante e che si possa applicare al modello predittivo un fattore di correzione (c_f) diverso per ogni microorganismo e per ogni alimento. Esso è fattore moltiplicativo della velocità di crescita, o di morte, del microorganismo.

Il fattore di correzione può essere utilizzato anche nelle situazioni dinamiche. In questo caso la formula risulterà:

$$y_{i+1} = y_i + c_f \cdot \mu \left(\text{ef}_1 \left(\frac{t_i + t_{i+1}}{2} \right), \text{ef}_2 \left(\frac{t_i + t_{i+1}}{2} \right), \dots \right) \cdot h$$

Se sono disponibili i profili dinamici delle variabili esterne, il fattore di correzione può essere modificato finché lo scarto quadratico medio tra il modello predittivo originale e quello corretto sia il più piccolo possibile.

Il fattore di correzione può essere riferito ad una categoria alimentare, fc_f (*food corrective factor*), o ad un singolo prodotto, c_f (*corrective factor*). Il fc_f è ottenuto dalla media geometrica dei fattori

di correzione ottenuti nei singoli prodotti che appartengono alla stessa categoria alimentare.

Al fine di poter gestire le informazioni che riguardano i microorganismi, le variabili esterne dell'ambiente in cui si trovano, i parametri dei modelli di microbiologia predittiva, i dati sulla caratterizzazione degli alimenti e dei processi produttivi, è necessario, *in primis*, organizzare i dati in modo sistematico ed convenzionale, in modo che la fruibilità e l'accessibilità dei dati siano immediate e che sia possibile applicare ai dati i *software* per la modellazione in modo facile e veloce.

2. MATERIALI E METODI

2.1. Raccolta e organizzazione di dati

2.1.1. Database

La matrice alimentare può essere complessa e potrebbe essere difficile quantificare o anche solo catalogare quali e in che modo le componenti dell'ambiente siano in grado di modulare la dinamica dei microorganismi. Anche la grande dispersione dei dati e l'incertezza di misura, che caratterizzano sia i parametri che definiscono le variabili ambientali degli alimenti sia le evoluzioni batteriche (lag pHase o μ etc.) (Ratkowsky, 2004), non contribuiscono a facilitare il compito di chi deve gestire tali informazioni per garantire la sicurezza alimentare (Nauta, 2002). Tuttavia, tali informazioni risultano indispensabili per una corretta e rapida analisi del rischio. Risulta così necessario disporre di un sistema informatico che permetta di governare i dati sulla sicurezza alimentare in modo strutturato e sistematico. Le informazioni devono essere classificate su supporto elettronico in modo da costruire un archivio ordinato e consultabile in tempo reale e che i programmi informatici possano essere applicabili ai dati raccolti.

A questo scopo sono stati creati i programmi informatici di microbiologia predittiva. Tali programmi sono basati essenzialmente su due pilastri: modelli matematici e dati dalla microbiologia classica. Il processo per creare un programma da applicare ai dati empirici può essere schematizzato nel modo seguente (Tamplin *et al.*, 2003):

- dati grezzi: raccolta di dati microbiologici generati in diversi terreni e substrati;
- *database*: una banca dati organizzata con una rigorosa logica e sintassi, la sua compilazione richiede la comprensione dei dati, un giudizio competente e conoscenze informatiche;
- *browser*: un programma per navigare nel *database*. Il programma deve permettere di interrogare la banca dati ottenendo come *output* una esemplificazione chiara dei dati ritrovati;

- *software* di microbiologia predittiva: deve generare le predizioni attraverso equazioni matematiche.

I campi “*fields*” di una banca dati per la costruzione di modelli di microbiologia predittiva sono creati per rappresentare il sistema ambiente/risposta microbiologica. La compilazione di questi campi richiede la capacità e la conoscenza di catalogare e riportare i fattori dominanti e quelli meno significativi in grado di modulare la dinamica dei microorganismi. In un certo senso i *fields* di un *database* sono le variabili matematiche e la relazione tra i diversi *fields* rappresenta l’equazione matematica che li lega.

Senz’altro al fine di essere facilmente fruibile è indispensabile che una banca dati sia pubblicamente consultabile.

In un’interessante *review* sui sistemi informativi per la gestione della sicurezza alimentare (McMeekin *et al.*, 2006) Baranyi suggerisce che un *database* per la sicurezza alimentare rispetti tre caratteristiche:

- “*the milky-way effect*”, se, considerando singolarmente alcuni dati non si riesce a valutare e quantificare la loro potenzialità, unendoli, tuttavia, si può discernere, dal loro insieme, una logica che li connette. Il riferimento alla via lattea è dovuto al fatto che, se si considera solo un segmento di cielo stellato, non si può prevedere che ci sia e quale direzione abbia la via lattea, ma, considerando la volta stellata nel suo insieme, la via lattea apparirà nettamente;
- “*the platonian effect*”, come Platone suggerì per primo, il pensiero scientifico necessita di semplificazioni, così in un *database* chi contribuisce ad archiviare e catalogare i dati deve riconoscere quali siano i fattori che possano influenzare il sistema ambiente/risposta e quali possano essere omessi;
- “*the Gutenberg effect*”: come nel 15^{mo} secolo l’evento della stampa diffuse il libro stampato, così Internet poté garantire che le informazioni circolassero universalmente. In questo modo i dati raccolti in un *database* sulla sicurezza alimentare devono avere la possibilità di essere facilmente e velocemente consultabili, aggiornabili, confrontabili, scaricabili e applicabili a programmi di microbiologia predittiva.

Tutte queste caratteristiche sono racchiuse in un'iniziativa chiamata *ComBase*; si tratta di un *database* (*Common e Combined database*) per applicare ai dati ottenuti dalla microbiologia classica, challenge test e studi di cinetica batterica in diversi substrati, i concetti della microbiologia predittiva (Baranyi and Tamplin, 2004). L'idea è nata nel 2003 da una collaborazione tra FSA (*Food Standard Agency*) e IFR (*Institute of Food Research*) in Inghilterra; l'USDA (*Agricultural Research Service*) e ERRC (*Eastern Regional Research Center*) negli Stati Uniti. Dal 2006 collabora al progetto anche il centro di ricerca australiano sulla sicurezza alimentare AFSCCE (*Australian Food Safety Center of Excellence*).

In *ComBase* si trovano circa 40.000 profili dinamici riguardanti il comportamento dei microorganismi negli alimenti e in brodi di coltura, raccolti principalmente nei laboratori del FSA e del USDA per supportare gli studi di microbiologia predittiva e l'analisi quantitativa del rischio (QMRA). I dati che alimentavano il *Predictive Microbiology Programme* (UK, 1985-1992), ed il *PMP (Pathogen Modelling Program, USA)*, hanno formato la base della banca dati *Combase*. L'iniziativa è stata lanciata nel 2003 (4th *Predictive Modelling Conference*, Quimper, France, June 16, 2003).

Grazie a progetti finanziati dalla Comunità Europea (QLK1-CT-2002-30513: *e-ComBase*) vengono periodicamente organizzati *workshop* per divulgare la conoscenza e le potenzialità di *Combase*.

Comprendendo l'importanza di alimentare costantemente banca dati, Università ed Istituti di ricerca, tra cui IZSLER, supportano l'iniziativa di *Combase* fornendo i propri dati sperimentali.

Per archiviare e catalogare i dati è necessario conoscere e seguire regole contenute nel manuale d'uso disponibile in rete per trasferire tutte le informazioni ottenute sia dalla dinamica di comportamento dei microorganismi sia dal substrato in cui si trovano nel "*Combase format*". L'uniformità dei dati facilita la comparazione tra diverse serie di dati e permette di interrogare velocemente la banca dati a seconda di quali fattori determinanti si vogliono considerare.

2.1.2. *Combase*: la struttura

Combase è una struttura formata da un insieme di tabelle connesse fra loro in diversi fogli di lavoro di Microsoft Excel® e

successivamente trasferite in tabelle di Access®. I fogli di Excel sono dotati di macro utili a disporre, verificare, analizzare o modellare i nuovi dati inseriti. La versione di Access è integrata da un *browser* per estrarre i dati in modo veloce ed efficace (Fig. 3).

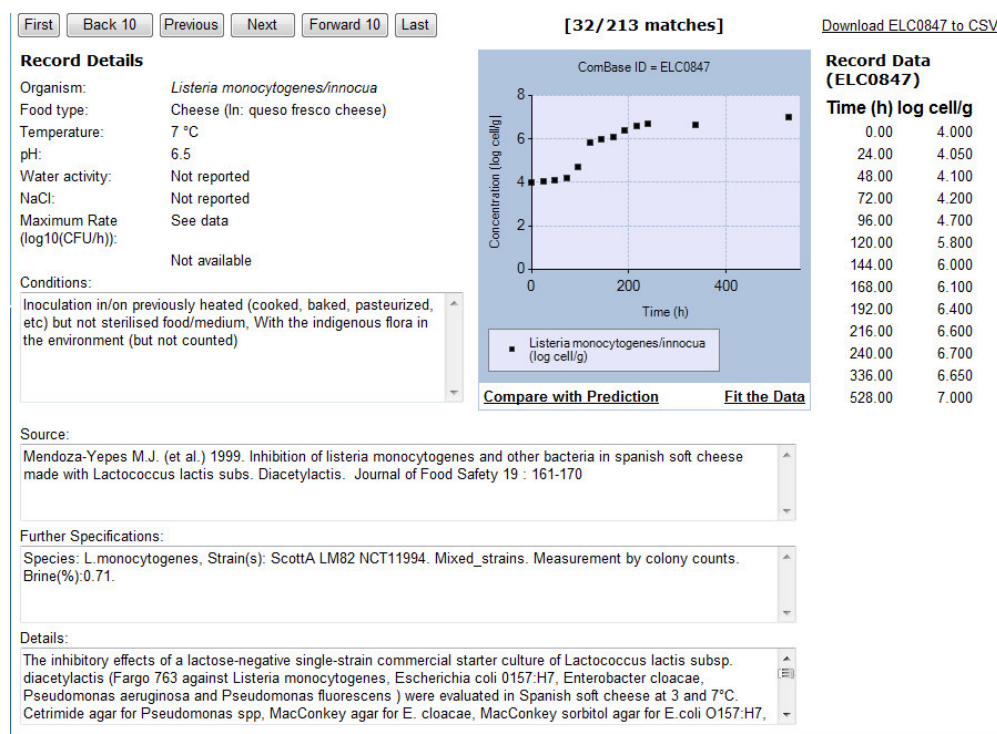


Fig.3: Risposta microbiologica in un substrato alimentare: output del *Combase browser*.

Un record in *Combase* è l'insieme di informazioni generate dall'ambiente e dalla risposta microbiologica. La complessità del sistema non permette spesso la definizione di una caratteristica in modo univoco, cioè che essa possa essere espressa da una parola chiave o da un numero. Nel database questo problema è stato risolto permettendo di inserire una lista di parole chiave separate da una virgola per descrivere ogni variabile.

I dati che descrivono l'ambiente e la risposta microbiologica sono generalmente "tempo dipendenti" e richiedono di essere inseriti attraverso "tabelle dinamiche" come ad esempio la lista (tempo, valore) di un profilo microbiologico (Fig. 4) o chimico-fisico.

Key	time	logc
LM_br	0	7.69
LM_br	47.5	6.47
LM_br	120	4.96
LM_br	144	4.72
LM_br	192	4.16
LM_br	215	4.57
LM_br	288	3.88
LM_br	312	4.72
LM_br	503	3.14
LM_br	671	2.7

key organism logc

Lm_br Lm 0;7.69;47.5;6.47;120;4.96;144;4.72;192;4.16;215;4.57;288;3.88;312;4.72;503;3.14;671;2.7

Fig. 4: Dati sperimentali organizzati nel formato *Combase*. Ogni insieme di dati che descrive la variazione del logaritmo della concentrazione batterica in un ambiente è identificato da una chiave univoca. I dati in colonna sono inseriti in un foglio di lavoro che prende il nome del microorganismo considerato. Attraverso la macro *CBMacros* i dati in colonna possono essere trasferiti in un'unica cella nel foglio di lavoro Master e viceversa.

La tabella (foglio di lavoro) principale prende il nome di **Master**, le intestazioni delle colonne rappresentano i campi “*fields*” e molti di questi sono collegati ad un ulteriore foglio corrispondente che contiene le informazioni rilevanti. Ad esempio, l'intestazione ***condition*** (caratteristiche del substrato) è anche il nome di un foglio di lavoro dove in colonna sono riportate tutte le caratteristiche ambientali secondarie che possono influenzare l'andamento dei microorganismi.

Esempi delle informazioni contenute nel “campo” *condition* sono: la presenza di conservanti e in che concentrazione, di acidi organici, la presenza di flora competitiva, di metaboliti dei batteri lattici, come le batteriocine, la modalità di conservazione dell'alimento, in anaerobiosi, o con altre miscele di atmosfera modificata, l'aggiunta di saccarosio o altri zuccheri, il tipo di trattamento termico che ha subito l'alimento, se crudo, pastorizzato o sterilizzato, se è a tagliato o intero etc.

Mentre l'intestazione ***property*** è collegata con un foglio di lavoro dove sono elencate le caratteristiche del microorganismo che è stato numerato.

Le informazioni riportate sono relative alla popolazione batterica. Ad esempio, è riportato se i microorganismi appartengono

I campi del Master sono divisi in tre categorie:

1. campi amministrativi: nome dei microorganismi, peculiarità della specie batterica, origine dei dati, dettagli dell'esperimento, metodo di conta utilizzato, durata dell'esperimento, note sulla qualità dei dati;
2. campi riguardanti l'ambiente in cui si trovano i microorganismi: temperatura, pH, a_w , (fattori primari), substrato (terreno colturale, o categorie alimentari), requisiti dell'alimento (fattori ambientali secondari in grado di modificare il comportamento dei microorganismi), commenti su altri fattori non catalogati che potrebbero aver influenzato l'andamento batterico;
3. i campi riguardanti la risposta microbiologica: il logaritmo della concentrazione batterica e le sue variazioni durante il periodo considerato nell'esperimento, la velocità specifica (positiva per la crescita e negativa per la morte batterica).

Una copia dimostrativa con la macro (*CBMacros*) (Fig.6) per gestire i dati può essere scaricata dal sito www.combase.cc gratuitamente.

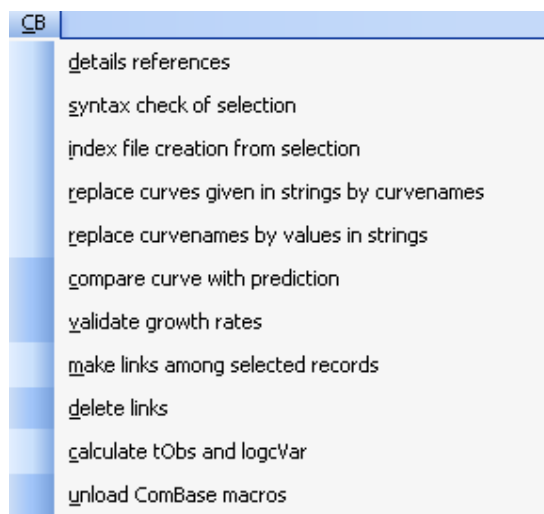


Fig. 6: Elenco delle operazioni contenute nella *CBMacros* per l'elaborazione dei dati di microbiologia predittiva.

Compilando i campi del foglio di lavoro Master e i dettagli della sperimentazione correttamente e rispettando la rigida sintassi del database, si possono utilizzare le facilitazioni del *software* (*CBMacros*) per l'elaborazione dei dati con modelli matematici di microbiologia predittiva.

Ad esempio, i profili dinamici riportati in colonne di dati possono essere trasferiti su un'unica cella separando i valori con il punto e virgola, limitando così molti errori di battitura e di compilazione.

Durante il periodo del dottorato di ricerca sono stati archiviati in *Combase* 12.000 *records*, riguardanti caratterizzazioni di prodotti tradizionali italiani, *challenge test* su alimenti e brodi di coltura. I dati organizzati nella banca dati hanno rappresentato la base per gli studi di applicazione e validazione di modelli di microbiologia predittiva precedentemente pubblicati o sviluppati durante il medesimo corso di studi.

Tra le agevolazioni che più facilitano le operazioni di calcolo c'è la riorganizzazione dei dati ambientali e di risposta batterica, contenuti in *Combase*, in nuovi fogli di lavoro di Excel® (*index file*) dove si possono applicare altri *software* per il calcolo dei modelli primari di microbiologia predittiva in particolare la macro *DMfit* (*Dinamic modelling fit*).

2.2. Utilizzo di mezzi informatici per la costruzione di modelli di microbiologia predittiva

2.2.1. DMfit

DMfit è un programma che permette di adattare (*to fit*) le curve dove una fase lineare è preceduta o seguita da una fase stazionaria. *DMfit* ed è stata creata all'IFR per calcolare, principalmente, la velocità di crescita e di morte dei microorganismi nei substrati alimentari ed è un modello dinamico (Baranyi and Roberts, 1994)

I dati sperimentali possono essere rappresentati da equazioni lineari, ad una o due fasi, o da curve sigmoidi con uno o due punti di flesso. Il programma ed il manuale tecnico sono scaricabili in Internet dal sito dell'IFR (www.ifr.ac.uk). I quattro parametri principali dell'equazione del modello Baranyi, su cui si basa il programma *DMfit* sono:

- μ , lag , y_0 , y_{end} , (velocità, fase lag, $logc$ iniziale, $logc$ finale);

e i due parametri dei punti di flesso sono:

- $nCurv$ e $mCurv$.

Se i valori n e m corrispondono a 0 si ha una semplice equazione lineare, se corrispondono ad un numero 20 si ha un'equazione bifasica con un punto di rottura netto (*break-point*). Per il modello classico di Baranyi questi valori sono rispettivamente $n=0$ e $m=10$.

Il programma permette di modificare parametri n e m avendo così la possibilità di un'espressione dei dati "cosciente" e ragionata, eliminazione della fase lag o impostazione di andamenti lineari (Baranyi and Roberts 2000) (Fig. 7).

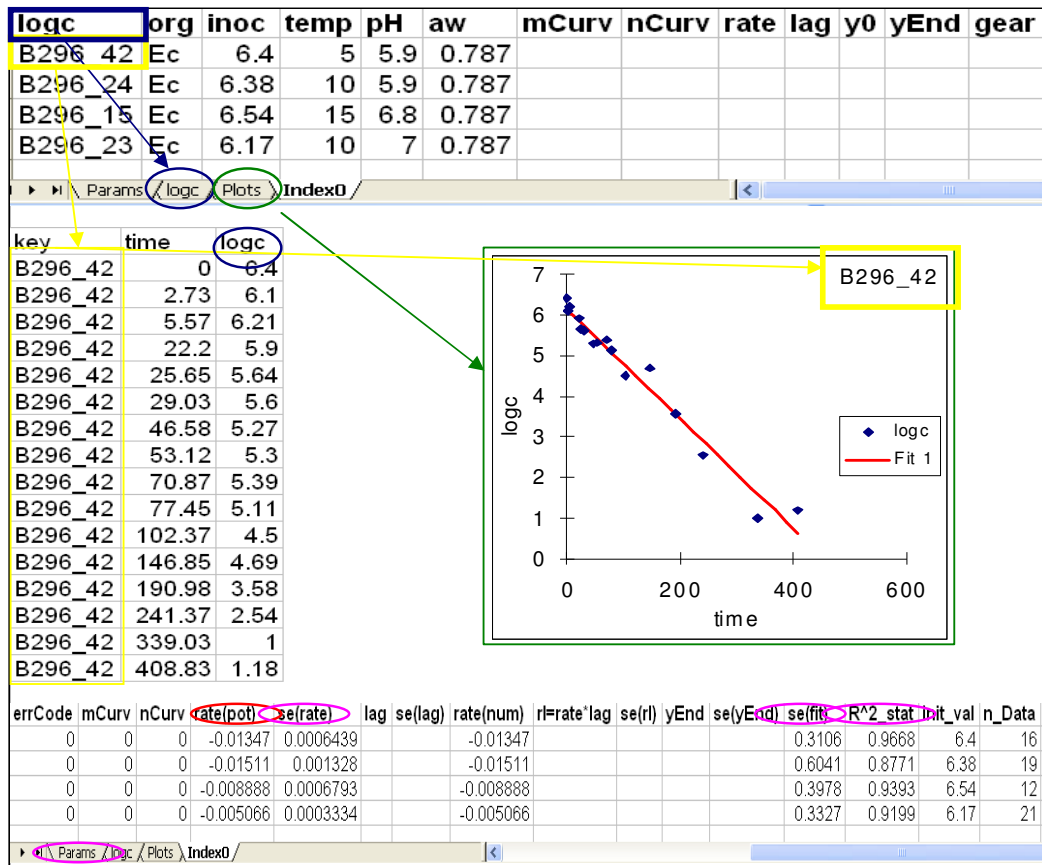


Fig. 7: Rappresentazione schematica del programma DMfit per l'analisi dei dati microbiologici per la costruzione di modelli di microbiologia predittiva, modelli primari. Il grafico rappresenta una semplice regressione lineare dei dati, l'equazione a seconda dei dati grezzi può essere una sigmoide o una funzione lineare bi o tri fasica.

DMfit calcola i parametri per ottenere, interpolando i dati sperimentali, l'equazione che descriva l'andamento delle osservazioni con uno scarto il più piccolo possibile tra i dati e la funzione che li rappresenta (concetto della regressione lineare).

Il programma, oltre a fornire dati numerici e calcoli statistici, come errore standard della pendenza (se-velocità), del modello (se-fit) e R^2 , rappresenta i dati grezzi e la funzione che li descrive in *plot*.

Il calcolo di velocità di crescita (μ o *velocità*), tempo di duplicazione (Td), tempo di riduzione decimale (D), fase lag o *shoulder*, errore del modello (ES) ed errore relativo ($Er=ES$ di un valore/valore stesso) sono stati calcolati utilizzando il programma DMfit e scegliendo, a seconda della sperimentazione, quale fosse l'equazione che rappresentasse al meglio i dati grezzi.

2.2.2. Polinomi multivariati

Per modellare come il logaritmo della variazione dei parametri che descrivono la crescita (*growth velocità*) o la morte (*D value*) dei microorganismi siano influenzate da uno o più fattori esterni si possono utilizzare programmi che attraverso la regressione dei dati generano polinomi multivariati (Tamplin *et al*, 2003).

Per l'analisi dei dati generati e raccolti durante il periodo di dottorato è stato utilizzato un *software* reperibile gratuitamente in Internet dal nome:

Essential Regression and Experimental Design Version 2.2 (www.geocities.com/SiliconValley/Network/1032/).

La procedura di eliminazione a ritroso dei parametri non significativi $\alpha < 0.05$ è stata adottata (Fig.8).

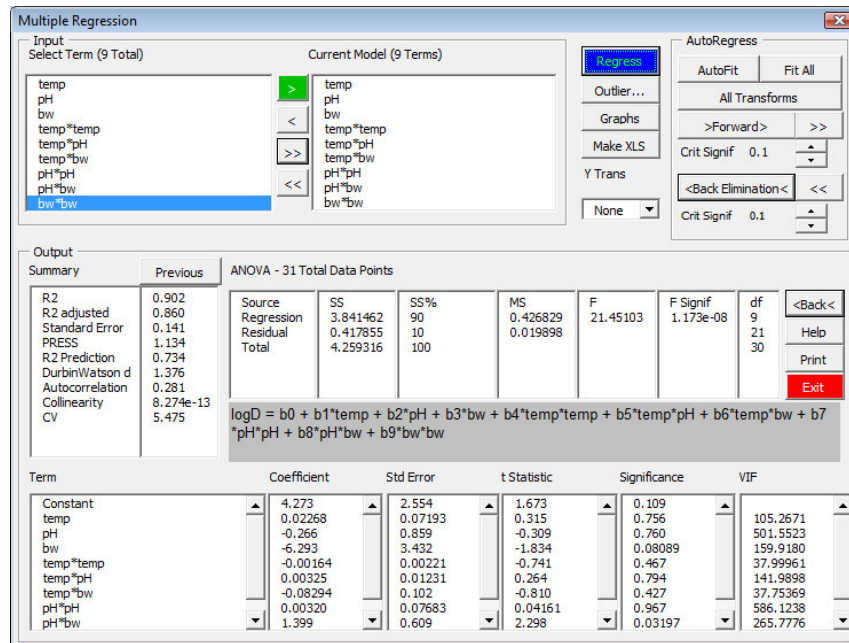


Fig. 8: Output del programma di regressione multivariata Essential Regression. Un polinomio di secondo ordine per tre variabili definite (temp, pH, b_w) ha 10 parametri. I parametri non significativi $\alpha < 0.05$ sono eliminati dal programma. input del programma di regressione multivariata.

2.2.3. Combase predictor

Utilizzando i records contenuti nella banca dati *Combase* sono stati sviluppati diversi modelli secondari di microbiologia predittiva (Baranyi *et al.*, 1995). *Combase Predictor* raccoglie circa 20 modelli di crescita batterica in funzione della temperatura statica o dinamica, del pH, dell' a_w , o concentrazione salina. Anche questo programma è consultabile attraverso il sito www.combase.cc.

Alcuni modelli comprendono altre variabili secondarie quali la concentrazione di nitriti, di acido lattico, o percentuale di CO_2 . Sono presenti anche 6 modelli che calcolano la velocità di morte batterica in funzione della temperatura statica o dinamica, del pH e dell' a_w e due modelli dove la morte batterica non è in funzione della temperatura letale ma del pH e dell' a_w .

Combase Predictor è un programma interattivo, è possibile inserire il profilo tempo temperatura direttamente in rete e si ottiene la

visualizzazione della curva di crescita, o di morte, di un microorganismo nel brodo di coltura (Fig. 9).

Alcuni tra i modelli di crescita batterica in condizioni statiche contenuti in *Combase Predictor* sono stati validati con prodotti tipici italiani a base di latte e di carne durante il periodo di dottorato.

Dove possibile, è stata moltiplicata la *velocità* ottenuta dal modello per un fattore di correzione caratteristico per l'alimento considerato, in modo che la predizione si avvicinasse maggiormente alla situazione verificatasi nell'alimento (Baranyi and Pin, 1999).

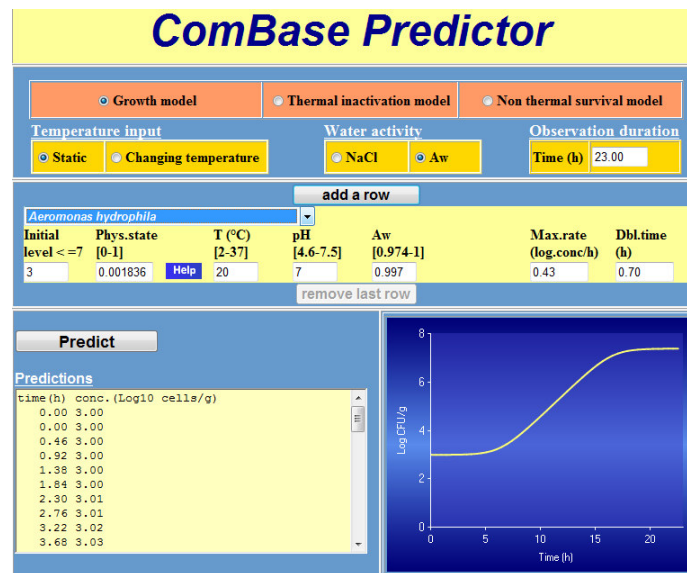


Fig. 9: Combase predictor, la maschera interattiva www.combase.cc.

2.2.4. *Salmonellae predictor*

Presso il DSA dell'IZSLER nel 2005 con la collaborazione, del Dr. Baranyi, Cosciani Cunico *et al.*, 2006b, è stato messo a punto un modello secondario per predire il tempo di riduzione decimale della *Salmonella* spp. in condizioni di a_w sempre più sfavorevoli per il microorganismo.

Il polinomio quadratico che descrive l'abbattimento di *Salmonella* spp in funzione di temperatura, pH e a_w è risultato essere (Cosciani Cunico *et al.*, 2005).

$$\log D = -10.38 - 0.34 * ef_1 + 7.35 * ef_2 - 0.44 * ef_3 - 0.07 * (ef_1 * ef_2) + 0.44 * (ef_1 * ef_3) + 3.75 * (ef_2 * ef_3) - 0.0066 * ef_1 - 0.79 * ef_2^2 + 25.15 * ef_3^2 \pm 0.17$$

Il modello è stato validato nel corso del dottorato con diversi tipi di salame. Le produzioni si differenziavano una dall'altra, in particolare, per il diverso profilo di diminuzione di a_w a seconda del loro processo produttivo (www.ars-alimentaria.it).

2.3. Sviluppo di un modello predittivo per determinare il tempo di riduzione decimale di *E. coli* O157:H7 in funzione di pH e a_w .

Un esempio di come, durante il progetto di dottorato, è stato sviluppato un nuovo modello di microbiologia predittiva utilizzando i dati estratti da *Combase* e i *software* ad essa collegati è riportato in modo schematico.

Il modello ottenuto è stato successivamente validato confrontando i dati teorici a quelli osservati durante la contaminazione sperimentale con *Escherichia coli* O157:H7 in salami e formaggi tipici italiani.

Gli step per la costruzione del polinomio che descrivesse la riduzione del tempo decimale di *Escherichia coli* O157:H7 in funzione di pH e a_w sono elencati di seguito.

1. Estrazione dei dati sul comportamento del microorganismo di interesse dal *database* conoscendo il *range* delle caratteristiche intrinseche ed estrinseche del prodotto alimentare a cui si vuole applicare il modello
2. Calcolo dei parametri di crescita o morte del microorganismo in brodi colturali con condizioni ambientali costanti (modello primario)
3. Interpolazione dei dati per determinare, attraverso l'analisi della regressione, il polinomio che rappresentasse al meglio come le variabili ambientali influenzino i parametri di crescita o di morte dei microorganismi ($\epsilon <$).

1) Sono stati estratti da *Combase records*, con un intervallo di temperatura tra 4 e 15°C, a_w tra 0.785 e 0.967 e un pH tra 4.5 e 7, caratterizzati da uniformità di metodo di conta e substrato.

Ogni chiave (*key*), ad esempio B296_42, rappresenta un esperimento, un profilo dinamico, la numerazione (log ufc/ml) di *E. coli* nel tempo.

2) Utilizzando il programma *DMfit*, e modificando i parametri m e n per ottenere un'equazione lineare che descriva la cinetica di morte dei microorganismi, è stata calcolata la velocità di morte e da questa il D value ($D=-1/\text{velocità}$) e il suo logaritmo (Fig. 10).

Il programma riporta anche i risultati dell'analisi statistica per l'interpolazione dei dati e l'espressione dei dati grezzi, $b_w=(\text{Gibson et al., 1994})$, e della curva di regressione in grafici (Fig. 11a e Fig. 11b).

logc	org	inoc	temp	pH	aw	bw	rate	logD	se(fit)	R^2_stat	n_Data
B296_42	Ec	6.4	5	5.9	0.787	0.4615	-0.0135	1.87	0.3106	0.9668	16
B296_24	Ec	6.38	10	5.9	0.787	0.4615	-0.0151	1.82	0.6041	0.8771	19
B296_15	Ec	6.54	15	6.8	0.787	0.4615	-0.0089	2.05	0.3978	0.9393	12
B296_23	Ec	6.17	10	7	0.787	0.4615	-0.0051	2.3	0.3327	0.9199	21
B409_120	Ec	6.17	10	7	0.787	0.4615	-0.0051	2.3	0.3327	0.9199	21
B296_29	Ec	6.22	10	5.9	0.841	0.3987	-0.009	2.05	0.615	0.8604	22
B296_18	Ec	6.56	15	6.7	0.861	0.3728	-0.0041	2.39	0.5169	0.8792	13
B296_12	Ec	6.35	15	6.8	0.861	0.3728	-0.0047	2.33	0.3398	0.9399	22
B296_31	Ec	6.03	5	6.9	0.861	0.3728	-0.0028	2.56	0.3552	0.9328	29
B296_22	Ec	6.13	10	6.9	0.861	0.3728	-0.0027	2.57	0.37	0.9136	20
B296_43	Ec	6.57	5	5.5	0.88	0.3464	-0.0076	2.12	0.461	0.9263	19
B296_30	Ec	6.26	10	5.5	0.88	0.3464	-0.0053	2.28	0.4982	0.8719	25
B296_34	Ec	5.92	5	5	0.889	0.3332	-0.0025	2.6	0.5506	0.799	33
B409_127	Ec	6.51	5	6.3	0.898	0.3194	-0.0013	2.9	0.3737	0.8841	26
B409_136	Ec	6.35	10	6.4	0.898	0.3194	-0.0025	2.61	0.2875	0.9745	24
B296_28	Ec	6.68	10	5	0.931	0.2627	-0.0023	2.63	0.362	0.9382	30
B296_17	Ec	6.69	15	5	0.931	0.2627	-0.0035	2.46	0.3726	0.9361	25
B409_98	Ec	6.47	5	6.8	0.931	0.2627	-0.0009	3.04	0.287	0.9374	33
B409_90	Ec	6.64	10	6.8	0.931	0.2627	-0.001	2.98	0.262	0.9602	28
B409_79	Ec	6.73	15	6.8	0.931	0.2627	-0.0012	2.92	0.2695	0.9641	27
B409_139	Ec	6.42	10	5.5	0.939	0.247	-0.0022	2.67	0.3159	0.9235	21
B409_130	Ec	6.57	5	5.6	0.939	0.247	-0.0018	2.75	0.3959	0.922	26
B409_93	Ec	6.62	10	5.9	0.947	0.2302	-0.0009	3.06	0.1592	0.9772	27
B409_106	Ec	6.53	5	6	0.947	0.2302	-0.0009	3.03	0.2166	0.9652	28
B409_83	Ec	6.63	15	6	0.947	0.2302	-0.0015	2.83	0.2288	0.9785	27
B409_105	Ec	6.63	5	5	0.967	0.1817	-0.0016	2.8	0.4598	0.9191	23
B296_20	Ec	6.31	10	5.3	0.967	0.1817	-0.0009	3.03	0.2754	0.7978	25
B409_92	Ec	6.62	10	6	0.967	0.1817	-0.001	3.01	0.4421	0.8796	28
B296_33	Ec	6.13	5	6.1	0.967	0.1817	-0.0012	2.93	0.212	0.9827	31
B296_21	Ec	6.42	10	6.9	0.967	0.1817	-0.0013	2.89	0.4113	0.7303	22

Fig. 10: Calcolo della rate e del logD value per ogni record estratto da *Combase*. L'output del programma riporta alcuni dati statistici sulla validità del modello (ES, R²)

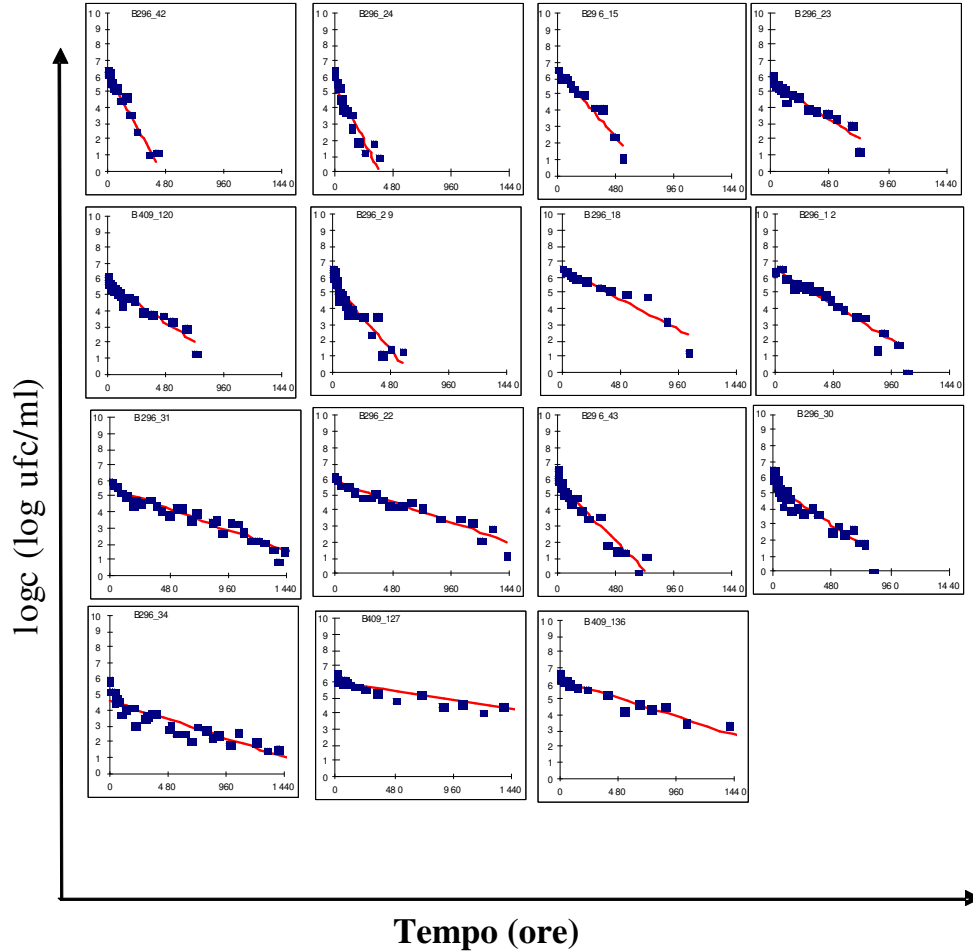


Fig. 11a: Confronto fra *logc* nel tempo a diverse condizioni di *pH*, *temp*, *a_w* (tra 0.787 e 0.898) e fit del modello primario.

Quadrato blu (■): valore di *logc E. coli* O157:H7 osservato

Linea rossa continua (—): *fit* del modello primario.

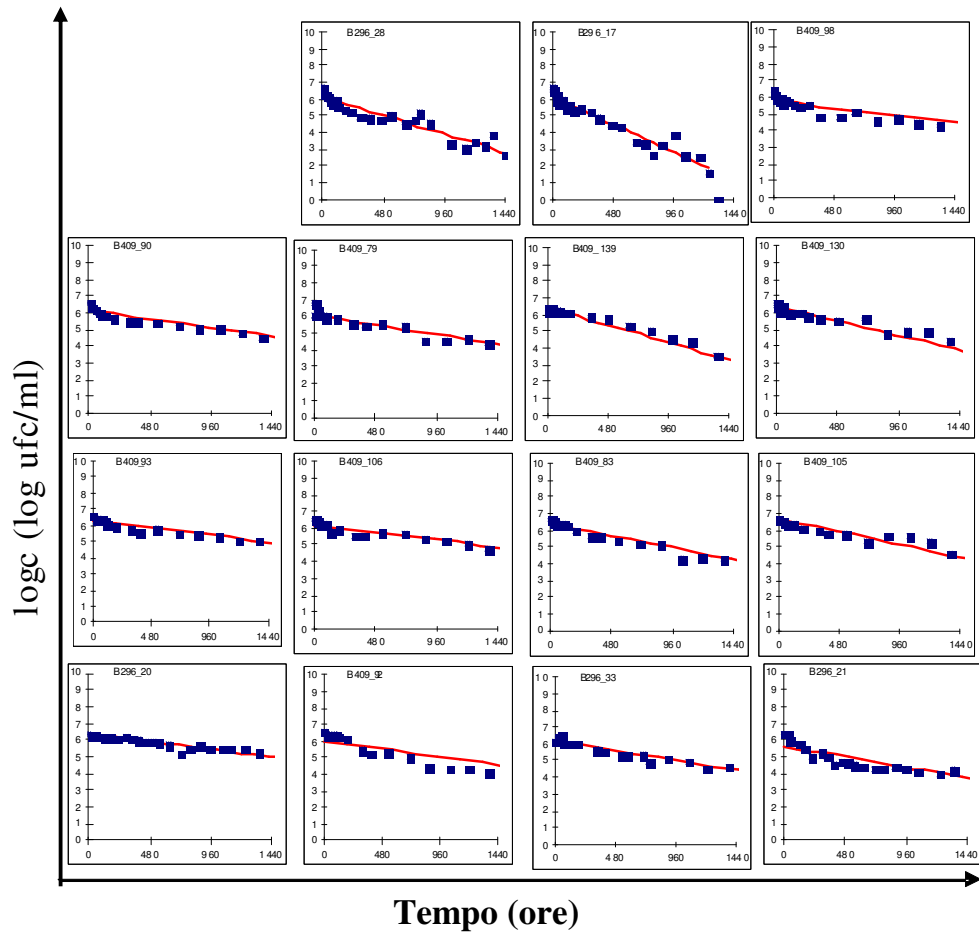


Fig. 11a: Confronto fra $\log c$ nel tempo a diverse condizioni di pH , $temp$, a_w (tra 0.931 a 0.967) e fit del modello primario.

Quadrato blu (■): valore di $\log c$ *E. coli* O157:H7 osservato

Linea rossa continua (—): fit del modello primario.

3) Analizzando i dati si stabilisce che esiste una relazione diretta tra aumento della velocità di morte (riduzione del tempo di abbattimento decimale) e la diminuzione di acqua libera nel substrato (Fig. 12).

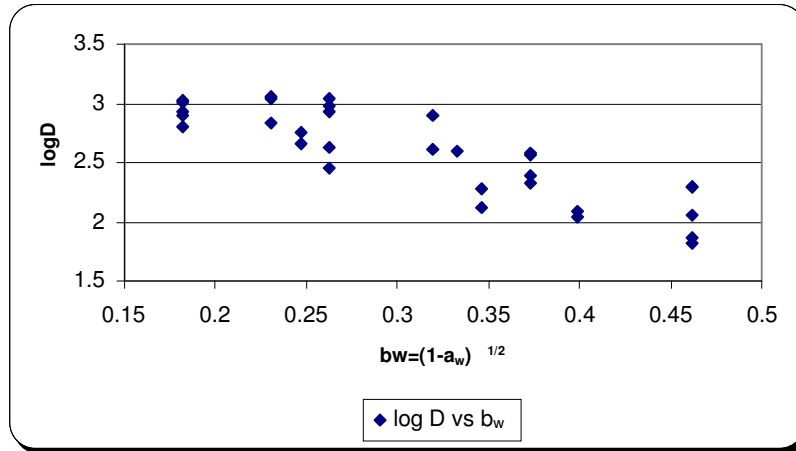


Fig. 12: **Logaritmo del D value di *E. coli* O157:H7 osservato rispetto alla disponibilità di a_w nel terreno colturale.**

Rombi blu (♦): log di *E. coli* O157:H7 a seconda della valore di b_w ; $b_w = \sqrt{(1 - a_w)}$, (Gibson *et al.*, 1994).

Utilizzando il programma di regressione multivariata *Essential Regression and Experimental Design Version 2.2*, sono stati calcolate quali altri variabili, singole o in relazione fra loro, influenzassero la velocità di morte del patogeno.

Il risultato è stato quello di verificare che, per il *range* considerato (4-15°C), la temperatura non influenza la morte di *E. coli* O157:H7 in modo significativo, e che il fattore dominante risulta la riparametrizzazione del valore a_w , $b_w = \sqrt{(1 - a_w)}$. Il modello ha la forma di un polinomio quadratico a tre parametri (eq. 1):

$$\log D = 3.174 - 3.89 \cdot b_w + 0.694 \cdot \text{pH} \cdot b_w - 6.807 \cdot b_w^2 \quad \pm 0.14 \quad \text{eq.1}$$

Il modello, ottenuto dai dati microbiologici, risulta robusto grazie al R^2_{adj} di 0.86 e all'ES di 0.14.

Di seguito è riportato (Fig. 13) l'output del programma con i calcoli statistici riferiti al modello e a ciascun parametro.

$$\log D = b_0 + b_1 \cdot bw + b_2 \cdot pH \cdot bw + b_3 \cdot bw \cdot bw$$

Summary

R	0.935
R ²	0.874
R ² adjusted	0.860
Standard Error	0.142
# Points	31
PRESS	0.73
R ² for Prediction	0.832
Durbin-Watson d	1.407
First Order Autocorrelation	0.250
Collinearity	0.001
Coefficient of Variation	5.526
Precision Index	45.713

ANOVA

Source	SS	SS%	MS	F	F Signif	df
Regression	3.787	87	1.262	62.38	2.89189E-12	3
Residual	0.546	13	0.02024			27
LOF Error	0.490	11 (90)	0.02725	4.3831	0.01428	18
Pure Error	0.05595	1 (10)	0.00622			9
Total	4.334	100				30

$\log D = b_0 + b_1 \cdot bw + b_2 \cdot pH \cdot bw + b_3 \cdot bw \cdot bw$

	P value	Std Error	-95%	95%	t Stat	VIF
b0	3.174	2.41948E-10	0.325	2.507	3.842	9.753
b1	-3.890	0.08969	2.210	-8.424	0.644	-1.760 65.19
b2	0.694	1.61317E-05	0.132	0.422	0.965	5.237 12.36
b3	-6.807	0.05211	3.350	-13.68	0.06685	-2.032 63.02

Fig. 13: Output del programma di regressione multivariata.

2.4. Contaminazioni sperimentali: challenge tests

2.4.1. Microorganismi patogeni utilizzati per contaminare gli alimenti

L'ipotetica presenza di microorganismi patogeni negli alimenti è un problema sia per la salute umana sia per il commercio delle produzioni alimentari. Diverse normative adottate dalla Comunità Europea (reg. CE 178/2002, 2073/2005 e successive modifiche), si occupano dell'igiene degli alimenti che gli stabilimenti di produzione devono rispettare per commercializzare i prodotti. Gli Stati Uniti, il Giappone e l'Australia, solo per citare alcuni esempi, richiedono garanzie ancora maggiori per accettare l'importazione dei prodotti di origine animale da altre nazioni (www.cfsan.fda.gov, FSIS 2001, Daminelli *et al.*, 2008).

I challenge test realizzati presso il laboratorio di Tecnologia Alimentare, al DSA dell'IZSLER, hanno avuto lo scopo di valutare nel tempo l'andamento di alcuni tra i microorganismi patogeni per gli alimenti di maggior rilevanza epidemiologica quali la *Salmonella* Typhimurium, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 (Luzzi *et al.*, 2007, Pontello *et al.*, 1998, Cowdem *et al.*, 1989, Danielsson Tham *et al.*, 2004, FAO/WTO 2004, Gerner-Smidt *et al.*, 2008, Galli Volonterio, 2005, Cantoni *et al.*, 1988).

La realizzazione delle contaminazioni sperimentali è risultata, per molte sperimentazioni, in linea con i requisiti presentati nel documento della Comunità Europea presentato come bozza delle linee guida per la contaminazione sperimentale di prodotti RTE con *L. monocytogenes* ed inviato a centri di ricerca sulla sicurezza alimentare e stabilimenti di produzione (SANCO/1628/2008, 2008).

2.4.2. Preparazione dell'inoculo

La preparazione di ogni ceppo di microorganismo patogeno per l'inoculo è stata allestita con il medesimo protocollo. Le colonie congelate e conservate nella ceppoteca dell'IZSLER hanno subito diversi passaggi in terreno BHI (OXOID CM1032), fino al raggiungimento della fase stazionaria di crescita; successivamente, 10

ml di terreno colturale ad una concentrazione di $\approx 10^9$ ufc/ml sono stati distribuiti in Roux contenenti BHI agar ed incubate a $37^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ per 24-48 h.

La patina batterica nelle Roux è stata lavata con palline di vetro di 2 mm di diametro e 5 ml di soluzione fisiologica sterile. Il numero di Roux inoculate è stato proporzionale alla concentrazione batterica e al volume di inoculo che si voleva raggiungere nell'alimento.

La tabella 2 riporta l'elenco dei ceppi (*strains*) utilizzati nelle contaminazioni sperimentali. Quando possibile l'alimento è stato contaminato oltre che con *strain* provenienti da collezioni certificate (ATCC) con ceppi isolati da alimenti della stessa categoria merceologica o dall'ambiente di lavorazione.

Organismo	Ceppi	Sigla	Isolato da
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC_19115	Lm_At	
	IZS_N°_217741/2_06	Lm_m1	carne di maiale
	IZS_N°_274792_06	Lm_m2	Salamelle
	IZS_N°_144664_05	Lm_m3	impasto del salame
	IZS_N°_162061_05	Lm_m4	salame
	IZS_N°_71846_5	Lm_m5	salame
	IZS_N°_34985/2_07	Lm_d1	formaggio
	IZS_N°_32929/2_07	Lm_d2	formaggio
	IZS_N°_33495/2_04	Lm_d3	formaggio
<i>Escherichia coli</i> O157:H7	ATCC_35150	Ec_At	
	IZS_N°_643	Ec_m1	Carne macinata di bovino
	IZS_N°_648	Ec_m2	Carne macinata di bovino
	IZS_N°_181181_07	Ec_d1	latte
	IZS_N°_279534_06	Ec_d2	burro
<i>Salmonella</i> Typhimurium	ATCC_6994	Ss_At	
	IZS_N°_215943_06	Ss_m1	Salamelle
	IZS_N°_110870_07	Ss_m2	Salamelle
	IZS_N°_110980_03	Ss_m3	Salamelle
	IZS_N°_215365_04	Ss_m4	Salamelle
	ZS_N°_43259/2_08	Ss_d1	latte

Tab. 2: Elenco dei ceppi utilizzati nelle contaminazioni sperimentali.

2.4.3. Protocollo sperimentale

Sono stati valutati i profili dei microorganismi in diverse condizioni a seconda dell'alimento considerato. Tutti i challenge test (tranne per il Grana Padano) sono stati allestiti presso il laboratorio di Tecnologia con materia prima ed esperienza tecnica apportate direttamente dallo stabilimento interessato alla contaminazione sperimentale.

Il laboratorio è attrezzato con celle di stagionatura dove temperatura ed umidità relativa possano essere modulate nel tempo, in modo che il prodotto contaminato subisca il processo di produzione e stagionatura il più possibile simile a quello nello stabilimento d'origine.

La modalità di contaminazione, i ceppi inoculati e la concentrazione batterica di patogeno nell'alimento, sono variati a seconda della finalità della sperimentazione.

Di seguito è riportata la sintesi dei challenge test considerati nel progetto di dottorato per validare modelli di microbiologia predittiva.

2.4.3.1 Alimenti che supportano la crescita di *L. monocytogenes*

2.4.3.1.a) *ready to eat* (RTE), contaminati e conservati a diverse temperature;

(a) Mortadella Bologna al naturale.

Entrambi i prodotti sono stati contaminati superficialmente con una sospensione di ceppi misti, Lm_At, Lm_m1, Lm_m2, di circa 10^4 ufc/ml e successivamente porzionati e confezionati sottovuoto. Le analisi sono state fatte in triplo (Finazzi *et al.*, 2008).

(b) Nervetti al naturale.

Il prodotto è stato contaminato superficialmente con una sospensione di ceppi misti, Lm_At, Lm_m3, Lm_m4, circa 10^4 ufc/ml e successivamente porzionato sottovuoto. Le analisi sono state fatte in triplo.

(c) Ricotta salata

Il prodotto è stato contaminato superficialmente con una sospensione di ceppi misti, Lm_At, Lm_d1, Lm_d2, di circa 10^3 ufc/ml e successivamente porzionato sottovuoto. Le analisi sono state fatte in triplo.

2.4.3.1.b) Alimenti crudi o precotti, conservati a diverse temperature.

(a) Hamburger di tacchino

Il prodotto è stato contaminato nell'impasto con una sospensione pura, Lm_At, di circa 10^3 ufc/ml e successivamente porzionato e conservati in sacchetti sterili a 4°C e 8°C. Le analisi sono state fatte in doppio.

(b) Zampone precotto tagliato a fette e messo sottovuoto

Il prodotto è stato contaminato superficialmente con una sospensione pura, Lm_At, di circa 10^3 ufc/ml e successivamente porzionato, confezionato sottovuoto e conservato a: 4°C; 10°C; 15°C; 20°C (Cosciani Cunico *et al.*, 2008c). Le analisi sono state fatte in doppio.

2.4.3.2 Alimenti in cui *L. monocytogenes* diminuisce di concentrazione grazie alla temperatura di processo.

(a) Grana Padano, dal latte alla messa in fascera.

Il latte per la produzione del formaggio Grana Padano è stato contaminato in caldaia con una sospensione mista, Lm_At, Lm_d3, ad una concentrazione di circa 10^7 ufc/ml (Boni *et al.*, 2004). Le analisi sono state fatte in triplo.

2.4.3.3 Alimenti in cui *S. Typhimurium*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, diminuiscono di concentrazione grazie a fattori secondari dinamici (a_w , pH).

La materia prima, impasto del salame o latte già pastorizzato, è stata suddivisa, quando possibile, in aliquote che sono state successivamente e rispettivamente contaminate con ceppi misti di ciascun patogeno. Le analisi sono state fatte in triplo (salame piccante in doppio). Nelle sperimentazioni che hanno riguardato i formaggi il latte pastorizzato è stato contaminato con tutte le specie di patogeni considerate. La produzione degli alimenti contaminati è avvenuta utilizzando materia prima e personale tecnico forniti dalla ditta produttrice. La temperatura di stagionatura, per le tipologie di salami considerati nelle contaminazioni sperimentali, variava tra i 9°C e i 14°C. Ogni salume è stato stagionato in celle climatizzate (Piardi) con umidità relativa e temperatura modulabili, per un periodo tra i 21 e i 70 giorni, a seconda delle proprie caratteristiche di processo (Cosciani Cunico *et al.*, 2006 a; Cosciani Cunico *et al.*, 2008 a; Cosciani Cunico *et al.*, 2008 b; Cosciani Cunico *et al.*, 2004b; Daminelli *et al.* 2004).

2.4.3.3.a) Salame nostrano:

- (a) contaminato con miscela di ceppi di *L. monocytogenes* (Lm_At, Lm_m3, Lm_m4),
- (b) contaminato con miscela di ceppi di *E. coli* O157:H7 (Ec_At, Ec_m1, Ec_m2),
- (c) contaminato con miscela di ceppi di *S. Typhimurium* (Ss_At, Ss_m1, Ss_m2);

2.4.3.3.b) Salamini alla cacciatore DOP:

- (a) contaminato con miscela di ceppi di *L. monocytogenes* (Lm_At, Lm_m5),
- (b) contaminato con miscela di ceppi di *E. coli* O157:H7 (Ec_At, Ec_m1, Ec_m2),

(c) contaminato con miscela di ceppi di *S. Typhimurium* (Ss_At, Ss_m3, Ss_m4).

2.4.3.3.c) Salame Milano:

(a) contaminato con miscela di ceppi di *E. coli* O157:H7 (Ec_At, Ec_m1, Ec_m2),

(b) contaminato con miscela di ceppi di *S. Typhimurium* (Ss_At, Ss_m1, Ss_m2).

2.4.3.3.d) Salame della bergamasca:

(a) contaminato con ceppo di *L. monocytogenes* (Lm_At),

(b) contaminato con miscela di ceppi di *E. coli* O157:H7 (Ec_At, Ec_m1, Ec_m2),

(c) contaminato con ceppo di *S. Typhimurium* (Ss_At).

2.4.3.3.e) Salame piccante:

(a) contaminato con ceppo di *S. Typhimurium* (Ss_At).

2.4.4. Caratteristiche intrinseche ed estrinseche del prodotto alimentare.

Per ogni produzione alimentare, contaminata e non, analizzata presso il DSA sono rilevate le caratteristiche intrinseche ed estrinseche del prodotto. A seconda del tipo di sperimentazione, che sia uno studio di shelf-life o di contaminazione durante il processo di produzione, il prodotto finito o la materia prima utilizzata per produrlo, rappresentano il tempo 0 dell'esperimento.

La raccolta dei dati su ingredienti e fasi di processo è stata effettuata da veterinari che, direttamente nello stabilimento, hanno raccolto tutte le informazioni che potessero servire per descrivere le

modulazioni del comportamento dei microorganismi in quella matrice alimentare (progetto di ricerca finalizzata: “Rilievi di campo (processi e prodotti) e attivazione di prassi di sorveglianza epidemiologica degli allevamenti per l'alimentazione del sistema informativo sulla sicurezza alimentare”, 2006; progetto di ricerca finalizzata: “Messa a punto e attivazione di modelli di sorveglianza epidemiologica e gestione del rischio a livello di produzione primaria e di trasformazione in prodotti tradizionali del territorio”, 2007).

L'eventuale utilizzo di conservanti, o di colture starter, per migliorare la resa e la qualità della produzione, e in che percentuale, sono state registrate come informazioni che potessero influenzare la dinamica dei batteri di interesse (Manzoni, 2006).

2.4.5. Determinazioni chimico-fisiche e microbiologiche dei prodotti alimentari.

Il profilo dinamico delle variabili, chimiche, chimico-fisiche e microbiologiche é stato valutato per la durata della sperimentazione in ogni campione.

Il pH e a_w degli alimenti sono misurati seguendo procedure standardizzate all'interno del DSA. Sono riportati i valori medi, la deviazione standard, e la numerosità dei dati, o è rappresentato in grafico il profilo dinamico della variabile.

Il pH è stato determinato mediante strumento con compensazione automatica della temperatura (Hanna Instruments HI 223), e la determinazione a_w mediante apparecchiatura della Ditta Testo 650 con sonda fattore k (T 95).

I microorganismi patogeni, i batteri lattici e le altre flore indigene sono stati isolati, in doppio, su terreni selettivi e non, seguendo procedure ISO, come nel caso di *Listeria monocytogenes* (ISO 11290-2:1998/Amd1, 2004), o metodi certificati interni del DSA (accreditati SINAL). In particolare i terreni selettivi e i tempi di incubazione sono stati per:

Listeria monocytogenes:

numerazione su terreno ALOA (Oxoid CM0856) dopo incubazione a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ per 48 ore \pm 2 ore delle colonie caratteristiche;

Salmonella spp.:

numerazione su terreno Hektoen (Oxoid CM0419) dopo incubazione a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ per 48 ore \pm 2 ore delle colonie caratteristiche

Escherichia coli O157:H7

numerazione su terreno CT-SMAR (Oxoid CM0856) dopo incubazione a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ per 24 ore \pm 2 ore delle colonie caratteristiche;

Carica Batterica mesofila aerobia:

numerazione su terreno PCA (Oxoid CM0325) dopo incubazione a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ per 48 ore di tutte le colonie cresciute

Micrococcaceae

Numerazione su terreno Baird-Parker agar (Oxoid CM0275) dopo incubazione a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ per 48 ore di tutte le colonie cresciute di colore nero;

Enterobacteriaceae

Numerazione su terreno VRBG agar (OxoidCm0485) dopo incubazione a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ per 24 ore \pm 2 ore delle colonie caratteristiche;

Lieviti e Muffe

numerazione su terreno OGYEA (Oxoid CM0545) dopo incubazione a 21°C per 5 giorni delle colonie caratteristiche;

Lattobacilli mesofili:

numerazione su terreno MRS Agar (Oxoid CM0361) dopo incubazione in anaerobiosi (Gaspak System) a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ per 72 ore.

Il numero di lotti di prodotto contaminato o caratterizzato è stato, quando possibile, di 3, il controllo nelle sperimentazioni è stato rappresentato da un lotto unico, tuttavia le determinazioni chimiche e chimico-fisiche si svolgevano su almeno un altro lotto dell'alimento contaminato.

2.4.6. Forma e pezzatura del prodotto, processo di produzione, confezionamento e temperatura di stoccaggio.

Tutte le informazioni che potessero servire per descrivere le modulazioni del comportamento di un microorganismo nel prodotto

alimentare sono state raccolte. Le fasi di processo, come il rapporto tempo, temperatura durante la produzione e lo stoccaggio del prodotto finito, e la modalità di confezionamento dello stesso, sono state descritte dettagliatamente nelle schede di processo pubblicate successivamente sul sito “Ars Alimentaria” (www.ars-alimentaria.it).

Alcuni fra i prodotti i cui processi sono stati archiviati, sono stati contaminati con il consenso e l’ausilio della ditta produttrice.

La validazione dei modelli di microbiologia predittiva, attraverso contaminazioni sperimentali di alcuni prodotti con caratteristiche estrinseche ed intrinseche note, permette, conoscendo le variabili di processo di altre produzioni, di applicare i modelli anche a questi.

2.4.7. Contaminazione dell’alimento

Il numero di unità campionarie e la durata dell’esperimento è variato a seconda dell’alimento contaminato, la contaminazione è stata superficiale o diretta a seconda del prodotto; sono state seguite le procedure riportate nella bozza della linea guida sui challenge test (SANCO/1628/2008, 2008).

Per valutare la crescita di *L. monocytogenes* la concentrazione finale nel substrato alimentare desiderata è stata di circa 10^{3-4} ufc/g; mentre per valutare l’abbattimento dei patogeni durante il processo di produzione e stagionatura, la concentrazione finale nel prodotto è stata di circa 10^{7-8} ufc/g.

In ogni sperimentazione è stata accertata l’assenza di patogeno nella materia prima.

Il calendario dei prelievi è stato studiato consultando i modelli di microbiologia predittiva, in modo da avere un numero sufficiente di osservazioni in ciascuna delle fasi (*lag-shoulder*, crescita o morte specifica, *plateaux*, *tail*) caratteristiche dei microorganismi (10-15 campioni)

2.4.8. Calcolo della velocità di crescita o di morte dei microorganismi inoculati nel substrato alimentare

Ambiente costante nel tempo

Il programma *DMfit* è stato utilizzato per calcolare la velocità (*rate*) di crescita o di morte dei microorganismi patogeni e per

ottenere i dati statistici riguardanti il modello primario, come l'errore standard del modello (*ES of fit*;) e l'errore relativo della *rate* ($ES_{rel} = ES_{rate}/rate$), verificando che l'alimento mantenesse pressoché invariati, durante la sperimentazione, i parametri dominanti in grado di modificare la crescita o la morte dei batteri. I parametri del modello Baranyi (n e m) sono stati modificati per eliminare la fase lag, quando era necessario; in molti casi l'andamento è stato rappresentato da una curva spezzata (retta bi-fasica).

Ambiente dinamico, a_w , pH e temperatura variano nel tempo.

Nel caso in cui si è dovuta calcolare la velocità di morte dei microorganismi patogeni inoculati in alimenti che modificano le loro caratteristiche intrinseche durante il processo di trasformazione, la *rate* (o le sue ri-parametrizzazioni) è stata calcolata tramite un polinomio secondario. Successivamente, considerando che in piccoli intervalli di tempo la *rate* è costante, è stato calcolato il *logc* nel tempo, con il metodo numerico di secondo ordine alle differenze centrali (Brown, 1993).

2.4.9. Espressione dei risultati

Per ogni prodotto contaminato è riportato un grafico dove sono espressi:

1. i dati osservati della popolazione del microorganismo patogeno e, se presente, di una popolazione indigena dominante, espressi come *logc* e la loro regressione lineare;
2. la predizione del modello;
3. la predizione corretta da un fattore specifico;
4. il profilo di pH o a_w .

Per motivi di sintesi non sono riportati i profili dei microorganismi, che sono stati isolati dagli alimenti, la cui presenza non è risultata essere significativa per la modulazione del comportamento del patogeno. I dati di tutte le caratterizzazioni e contaminazioni sperimentali sono comunque pubblicati sul sito *ars-alimentaria*.

A seconda del tipo di sperimentazione, dal valore della *rate* osservata e predetta sono stati calcolati:

1. il tempo per arrivare a 100 ufc/g, $T_{100} = \log(100/C_0)/rate$
2. Il tempo di riduzione decimale, $D = -1/rate$

2.4.10. Validazione dei modelli

Per validare i modelli predittivi è stato calcolato il fattore di accuratezza A_f , il Bias B_f , la discrepanza percentuale $D\%$ fra modello e il dato sperimentale, tramite la formula (Fig. 14) presentata da Baranyi e Pin (1999) modificata (log anziché ln).

L'accuratezza è la radice quadrata dello scarto quadratico medio tra il logaritmo della velocità specifica predetta e quella osservata. Il valore è poi riportato elevandolo su base 10. Il bias è la media tra gli scarti non elevati al quadrato degli stessi parametri. La discrepanza percentuale $D\%$ esprime la deviazione tra il dato osservato e predetto (Pin *et al.*, 1999).

$$A_f = \exp \left(\sqrt{\frac{\sum_{k=1}^m (\ln f(x^{(k)}) - \ln \mu^{(k)})^2}{m}} \right)$$
$$B_f = \exp \left(\frac{\sum_{k=1}^m (\ln f(x^{(k)}) - \ln \mu^{(k)})}{m} \right)$$

Fig. 14: Formula per calcolare l'Accuracy factor (A_f) ed il Bias factor (B_f) tra i dati ottenuti del modello e quelli osservati (Baranyi *et al.*, 1999).

2.4.11. Fattore di correzione sperimentale

Il Dr. Le Marc, utilizzando i dati di *Combase*, ha calcolato il fattore di correzione c_f fra la velocità specifica di crescita generata da modelli predittivi, per *L.monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 e *Salmonella* spp., e la velocità osservata in diverse categorie alimentari, dove le caratteristiche esterne rimangono costanti nel tempo, contaminate con questi patogeni. Il dato è risultato dalla media geometrica delle

deviazioni tra velocità del modello e velocità osservata nell'alimento (comunicazione personale).

Le categorie alimentari dove è stato possibile calcolare il fc_f sono state: formaggi, salumi cotti, salsicce, carne di manzo e carne di pollo.

Il fattore di correzione è stato considerato nella validazione dei modelli predittivi negli alimenti contaminati che hanno supportato la crescita di *L. monocytogenes*, come prosciutti e formaggi.

Sperimentalmente è stato calcolato il fc per la velocità di morte predetta (velocità istantanea) dai modelli che descrivono la sopravvivenza dei microorganismi dovuta a profili dinamici di pH e a_w , dipendente da pH e a_w , in modo che la deviazione tra questa e la velocità osservata dai dati sperimentali fosse la minore possibile.

La media geometrica dei valori di fc sperimentali, rispettivamente per *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7 e *S. Typhimurium*, potrebbe essere applicata ai modelli di microbiologia predittiva per la categoria “salami”.

3. RISULTATI

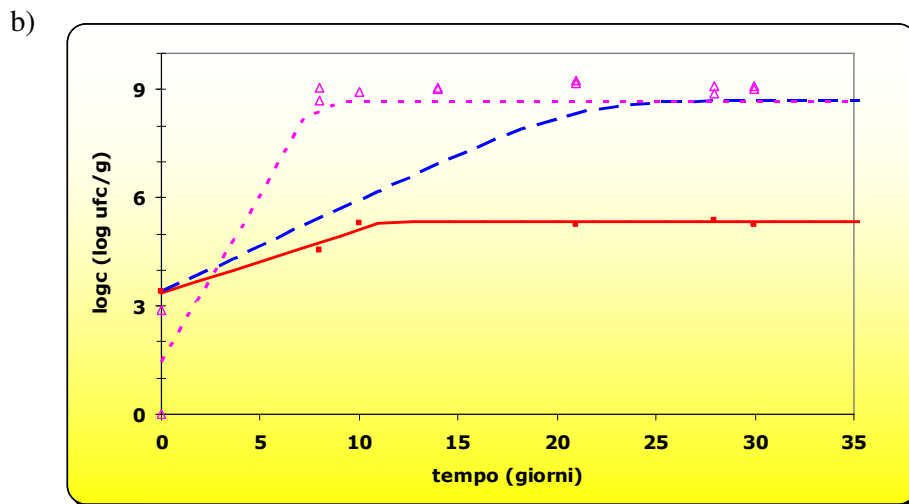
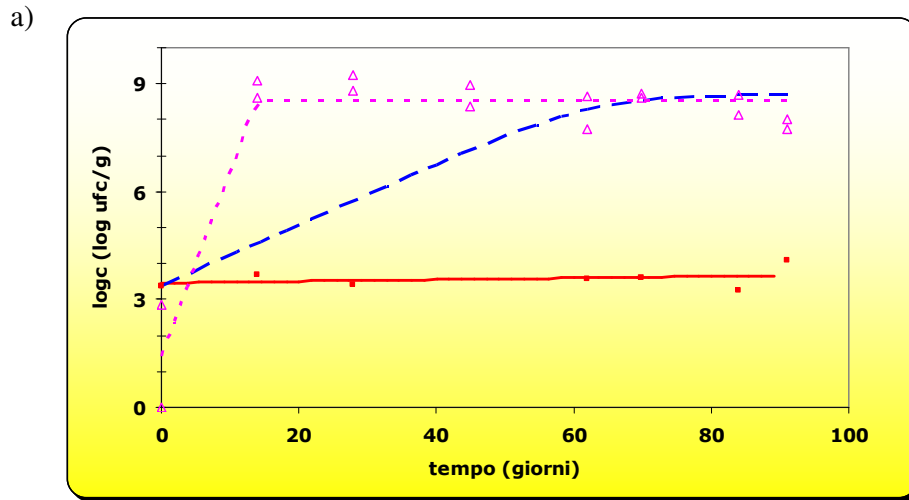
3.1. Challenge test e validazione di modelli predittivi

3.1.1. Alimenti che supportano la crescita di *L. monocytogenes*

I risultati descrivono la variazione nel tempo del logaritmo della concentrazione ($\log c$) di *L. monocytogenes* e della flora indigena osservata in diversi prodotti alimentari, durante contaminazioni sperimentali. I dati osservati sono confrontati con la simulazione generata da modelli predittivi che si basano sui fattori ambientali esterni dominanti. Per alcune categorie alimentari, la predizione del modello è stata modificata da un fattore di correzione (f_{cf}) tipico per l'alimento ed il microorganismo. La validazione dei modelli matematici è avvenuta confrontando il logaritmo della velocità osservata rispetto al logaritmo della velocità predetta come suggerito da Baranyi (1999) (Fig.re da 15 a 23; Tab.le da 3 a 7)

3.1.1.1 Ready to eat (RTE): alimenti pronti al consumo

3.1.1.1.a) Mortadella Bologna IGP



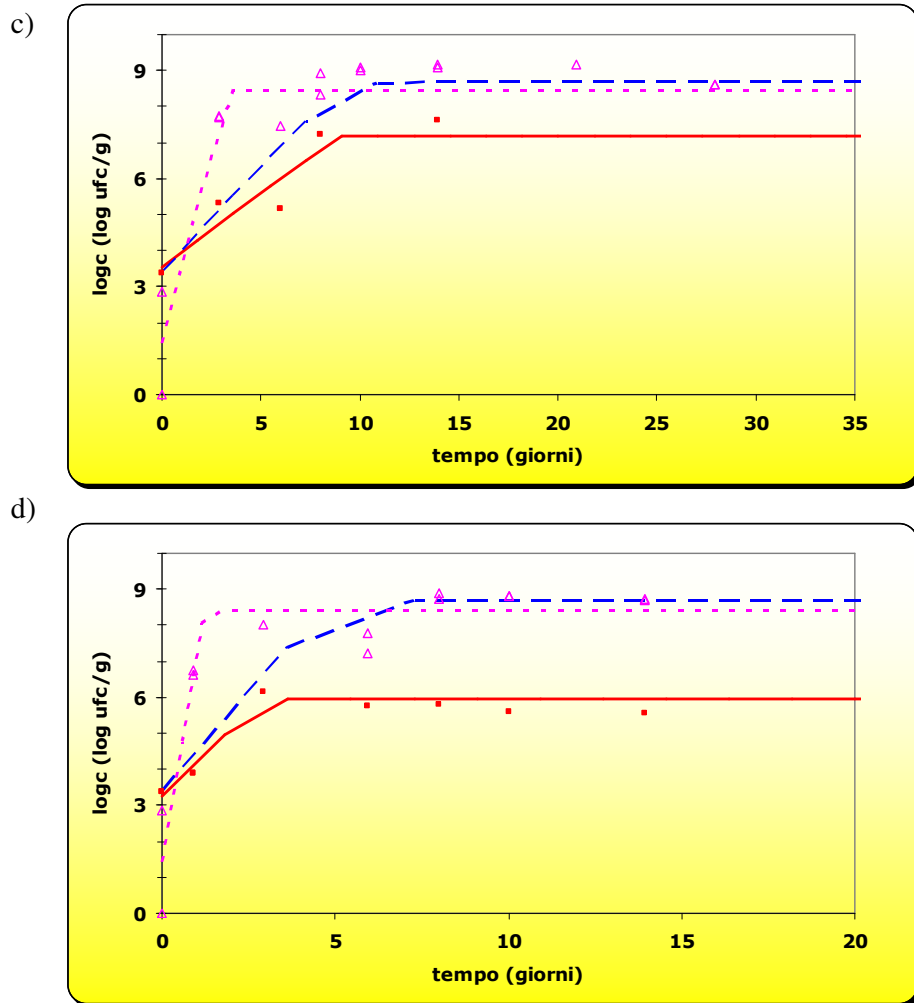


Fig. 15: Confronto fra predizione e risultati osservati nella contaminazione sperimentale di Mortadella di Bologna affettata, durante la shelf life a diverse temperature, a) 4°C; b) 10°C; c) 15°C; d) 20°C; utilizzando una miscela di ceppi di *L. monocytogenes* (Lm_At, Lm_m1, Lm_m2), Lm.

Quadrati e linea continua rossi (■, —): valore di *logc* di Lm osservato e il loro *fit* lineare.

Triangoli e linea punteggiata rosa (△, - -): valore di *logc* di LAB osservato e il loro *fit* bi-fasico.

Linea tratteggiata blu (- -): predizione del *logc* di *L. monocytogenes* generata da un modello secondario (www.combase.cc) con pH di 5.94 e a_w 0.98 (pari ai valori medi nell'alimento addizionati del ES). Fattore di correzione calcolato, dati in Combase, $fc_f=0.5$

T°	<i>rete Lm pred (1/d)</i>	<i>T_{100 pred} (d)</i>	<i>rate Lm obs (1/d)</i>	ESfit	ESrel (ESrate/rate)	T _{100 obs} (d)
4	0.081	16.56	0.0023	0.28	1.42	887.45
10	0.25	7.85	0.18	0.23	0.17	11.26
15	0.58	3.43	0.4	0.56	0.22	4.9
20	1.11	1.80	0.93	0.43	0.20	2.15

Tab. 3: Confronto fra predizione e risultati osservati nella contaminazione sperimentale di Mortadella di Bologna affettata, durante la shelf life a diverse temperature, 4°C; 10°C; 15°C; 20°C; utilizzando una miscela di ceppi di *L. monocytogenes* (Lm_At, Lm_m1, Lm_m2), Lm.

rate Lm pred: valore della *rate* di *L. monocytogenes* predetta dal modello secondario.

T_{100 pred}: tempo predetto per arrivare a 100 ufc/g di *L. monocytogenes*.

rate Lm obs: valore della *rate* di Lm osservata.

T_{100 ufc/g obs}: tempo osservato per arrivare a 100 ufc/g di *L. monocytogenes*.

ESfit: errore standard del *fit*.

ESrel errore relativo della *rate* osservata (errore standard del valore della *rate* diviso il valore della *rate*).

pH

Il valore di pH medio, rilevato su 60 campionamenti, durante la contaminazione sperimentale, è stato di 5.65, l'ES di 0.29 e il pH max (pH medio + ES) di 5.94.

a_w

Il valore di a_w medio, rilevato su 60 campionamenti, durante la contaminazione sperimentale, è stato di 0.969, l' ES di 0.011 e l' a_w max (a_w medio + ES) di 0.979.

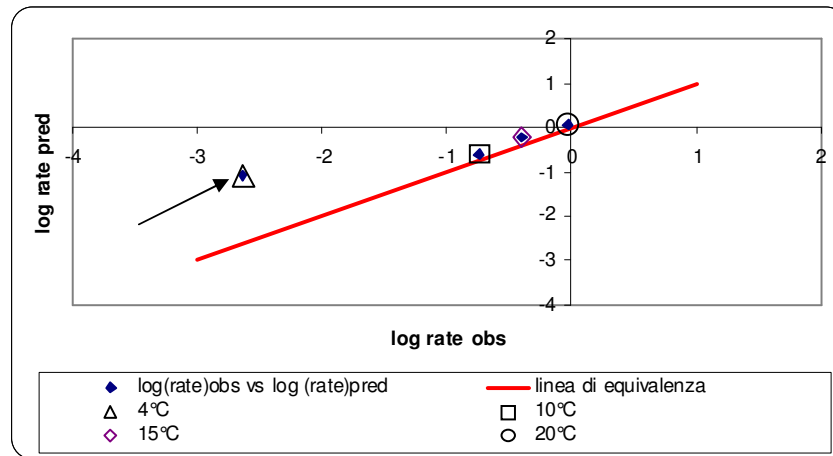
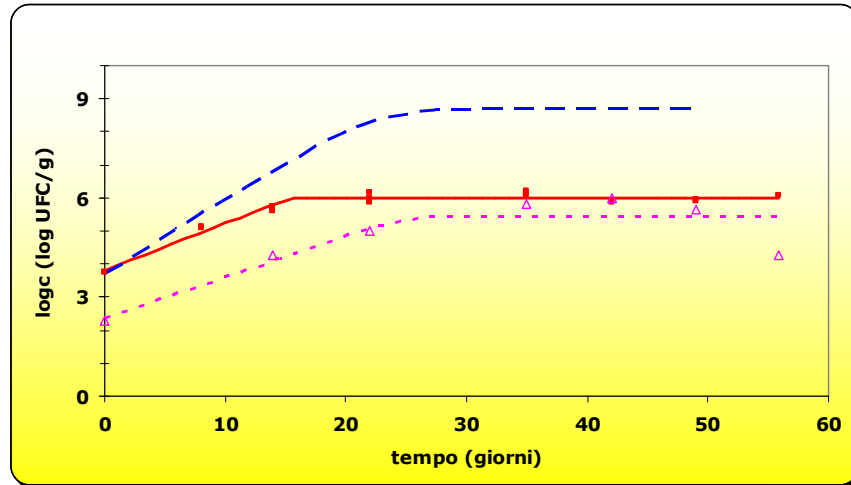


Fig. 16: Confronto fra il logaritmo della rate osservata e il logaritmo della rate predetta nella contaminazione sperimentale di Mortadella di Bologna affettata, durante la shelf life a diverse temperature, 4°C; 10°C; 15°C; 20°C; utilizzando una miscela di ceppi di *L. monocytogenes* (Lm_At, Lm_m1, Lm_m2), Lm.

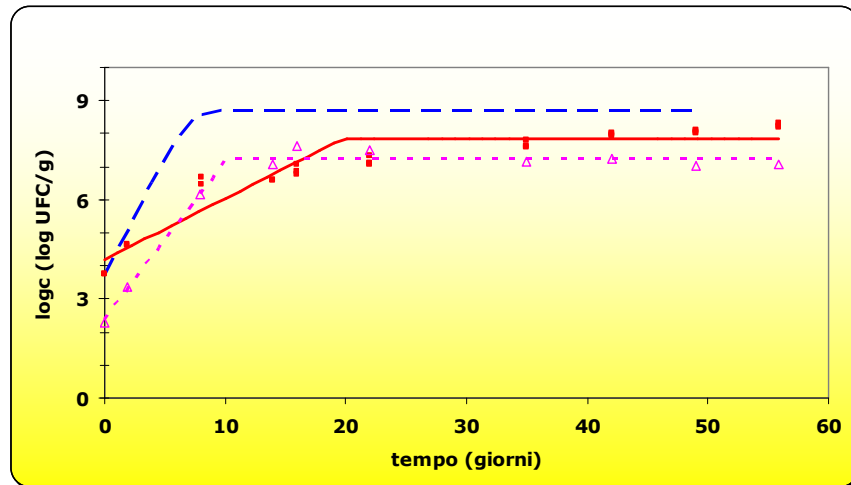
La freccia indica i risultati ottenuti a 4°C dove la variazione di *log*c di Lm non è stata significativa.

3.1.1.1.b) Nervetti

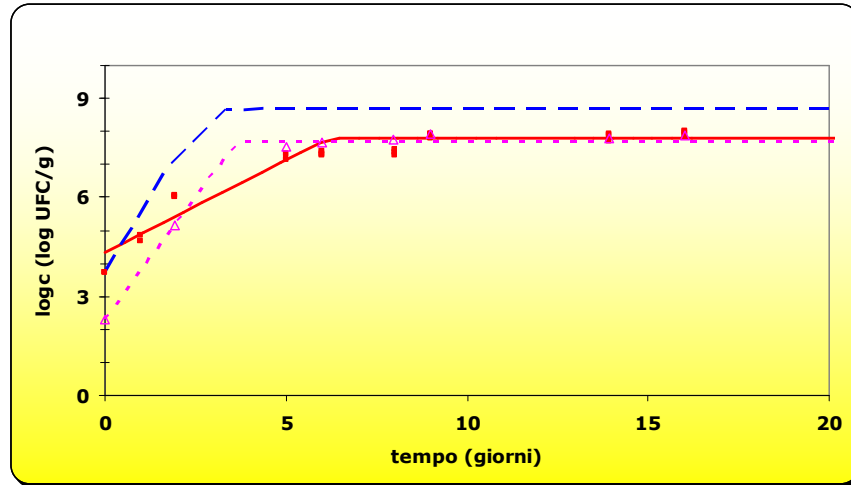
a)



b)



c)



d)

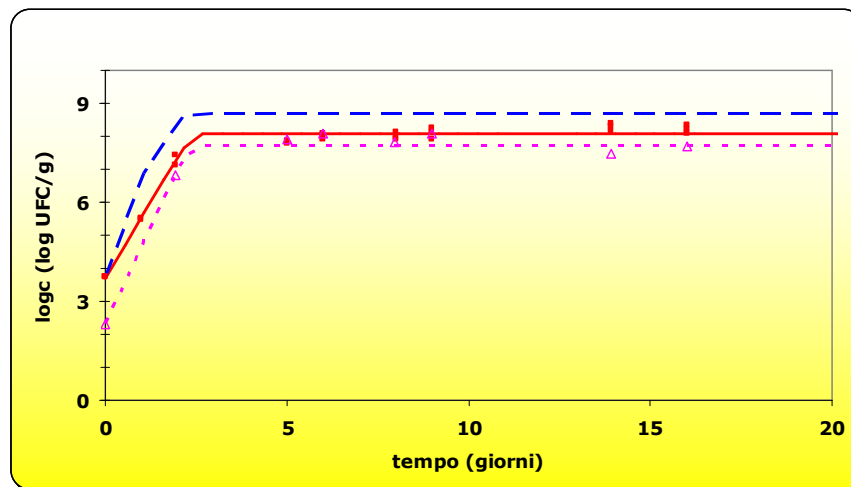


Fig. 17: Confronto fra predizione e risultati osservati nella contaminazione sperimentale di Nervetti, durante la shelf life a diverse temperature, a) 4°C; b) 10°C; c) 15°C; d) 20°C; utilizzando una miscela di ceppi di *L. monocytogenes* (Lm_At, Lm_m3, Lm_m4), Lm.

Quadrati e linea continua rossi (■, —): valore di *logc* di Lm osservato e il loro *fit* lineare.

Triangoli e linea punteggiata rosa (△, - -): valore di *logc* di LAB osservato e il loro *fit* bi-fasico.

Linea tratteggiata blu (— —): predizione del *logc* di *L. monocytogenes* generata da un modello secondario (www.combase.cc) con pH di 6.07 e a_w 0.979 pari ai valori medi nell'alimento addizionati del ES). Non c'è fattore di correzione per questa categoria alimentare.

pH

Il valore di pH medio, rilevato su 70 campionamenti, durante la contaminazione sperimentale è stato di 5.96, con ES di 0.11 e il pH max (pH medio + ES) di 6.07.

a_w

Il valore di a_w medio, rilevato in 70 campionamenti, durante la contaminazione sperimentale, è stato di 0.969, con ES di 0.01 e l' a_w max (a_w medio + ES) di 0.979.

T°	<i>rete Lm pred</i> (1/d)	<i>T₁₀₀ pred</i> (d)	<i>rate Lm obs</i> (1/d)	ESfit	ESrel (ESrate/rate)	T ₁₀₀ obs (d)
4	0.22	9.09	0.14	0.13	0.3	14.29
10	0.71	2.82	0.18	0.44	0.09	11.11
15	1.86	1.08	0.56	0.51	0.1	3.57
20	2.93	0.68	1.83	0.17	0.04	1.09

Tab. 4: Confronto fra predizione e risultati osservati nella contaminazione sperimentale di Nervetti, durante la shelf life a diverse temperature, 4°C; 10°C; 15°C; 20°C; utilizzando una miscela di ceppi di *L. monocytogenes* (Lm_At, Lm_m3, Lm_m4), Lm.

rate Lm pred: valore della *rate* di *L. monocytogenes* predetta dal modello secondario.

T₁₀₀ pred: tempo predetto per arrivare a 100 ufc/g di *L. monocytogenes*.

rate Lm obs: valore della *rate* di Lm osservata.

T_{100ufc/g} *obs*: tempo osservato per arrivare a 100 ufc/g di *L. monocytogenes*.

ESfit: errore standard del *fit*.

ESrel errore relativo della *rate* osservata (errore standard del valore della *rate* diviso il valore della *rate*).

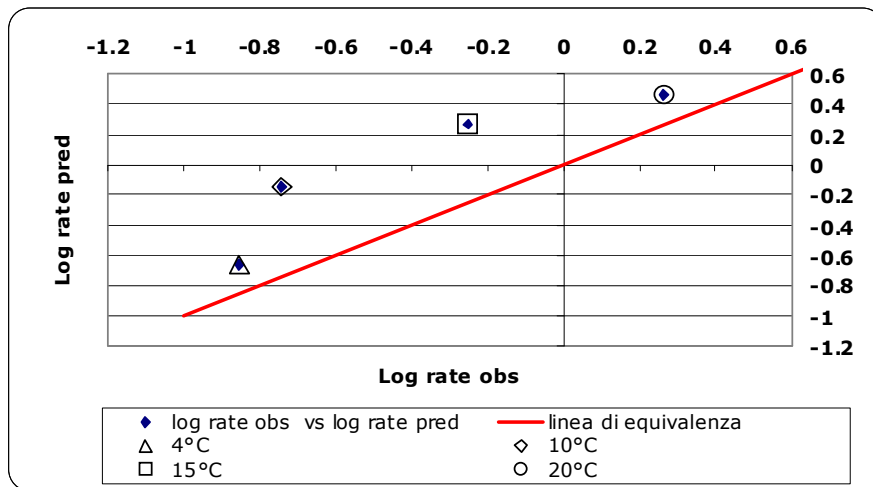
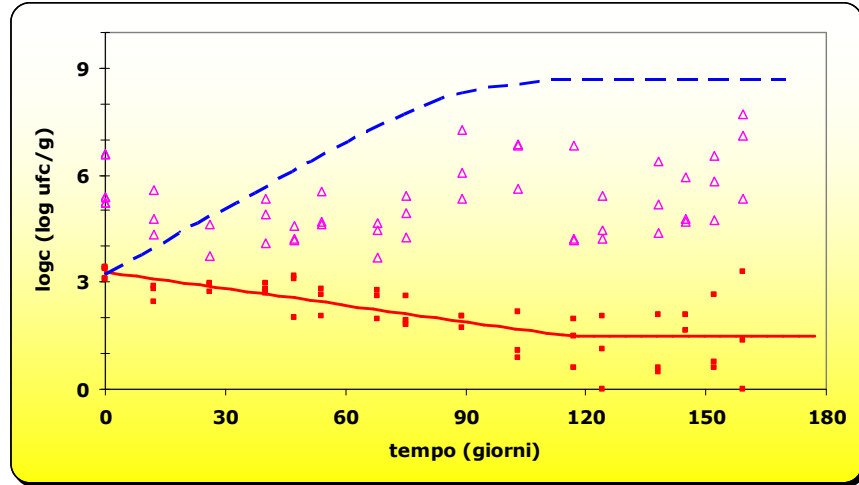


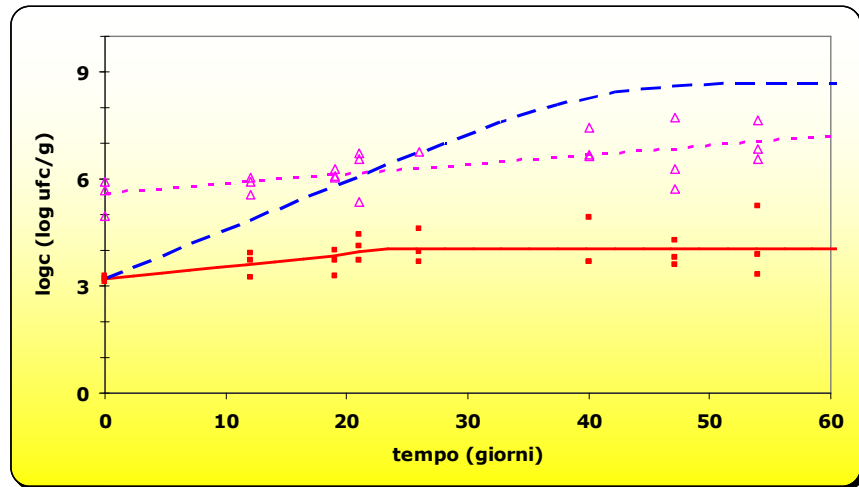
Fig. 18: Confronto fra il logaritmo della rate osservata e il logaritmo della rate predetta nella contaminazione sperimentale di Nervetti, durante la shelf life a diverse temperature, 4°C; 10°C; 15°C; 20°C; utilizzando una miscela di ceppi di *L. monocytogenes* (Lm_At, Lm_m3, Lm_m4), Lm.

3.1.1.1.c) Ricotta salata

a)



b)



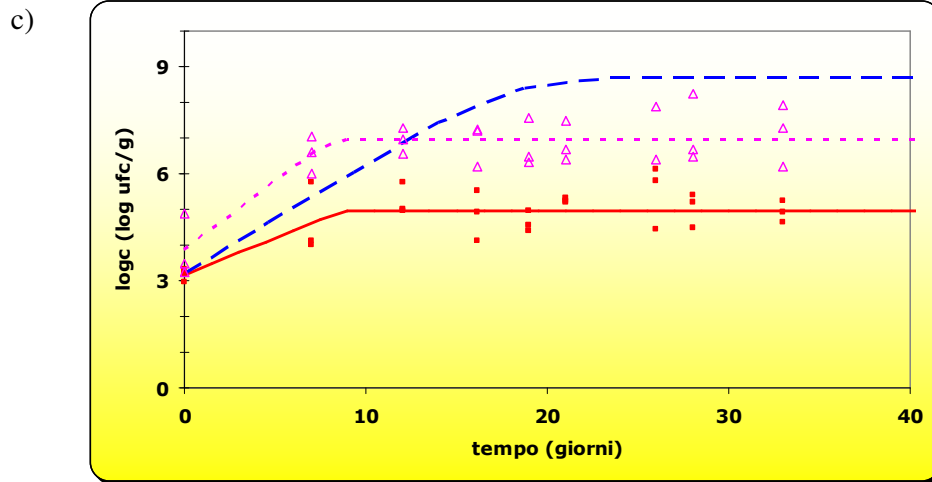


Fig. 19: Confronto fra predizione e risultati osservati nella contaminazione sperimentale di Ricotta salata, durante la shelf life a diverse temperature, a) 0°C; b) 4°C; c) 8°C; utilizzando una miscela di ceppi di *L. monocytogenes* (Lm_At, Lm_d1, Lm_d2), Lm.

Quadrati e linea continua rossi (■, —): valore di *logc* di Lm osservato e il loro *fit* lineare. Notare che i quadrati rossi sull'asse orizzontale indicano valori di *logc* N/D (non rilevati).

Triangoli e linea punteggiata rosa (△, - -): valore di *logc* di LAB osservato e il loro *fit* bi-fasico.

Linea tratteggiata blu (— —): predizione del *logc* di *L. monocytogenes* generata da un modello secondario (www.combase.cc) con pH di 6.32 e a_w 0.964 (pari ai valori medi nell'alimento addizionati del ES). Fattore di correzione per i formaggi $fc_f=0.65$ (dati Combase).

pH

Il valore di pH medio, rilevato su 133 campionamenti, durante la contaminazione sperimentale, è stato di 6.09, con ES di 0.23 e il pH max (pH medio + ES) di 6.32.

a_w

Il valore di a_w medio, rilevato su 126 campionamenti, durante la contaminazione sperimentale, è stato di 0.947, con ES di 0.017 e la a_w max (a_w medio + ES) di 0.964.

T°	rete Lm pred (1/d)	T ₁₀₀ pred (d)	rate Lm obs (1/d)	ESfit	ESrel (ESrate/rate)	T ₁₀₀ obs (d)
0	0.062	32.4	-0.015	0.64	0.2	///
4	0.14	14.7	0.035	0.59	0.59	56.54
8	0.38	5.23	0.21	0.49	0.27	9.52

Tab. 5: Confronto fra predizione e risultati osservati nella contaminazione sperimentale di Ricotta salata, durante la shelf life a 0°C, 4°C, 8°C, utilizzando una miscela di ceppi di *L. monocytogenes* (Lm_At, Lm_d1, Lm_d2), Lm.

rate Lm pred: valore della *rate* di *L. monocytogenes* predetta dal modello secondario.

T₁₀₀ pred: tempo predetto per arrivare a 100 ufc/g di *L. monocytogenes*.

rate Lm obs: valore della *rate* di Lm osservata.

T_{100ufc/g} obs: tempo osservato per arrivare a 100 ufc/g di *L. monocytogenes*.

ESfit: errore standard del *fit*.

ESrel errore relativo della *rate* osservata (errore standard del valore della *rate* diviso il valore della *rate*).

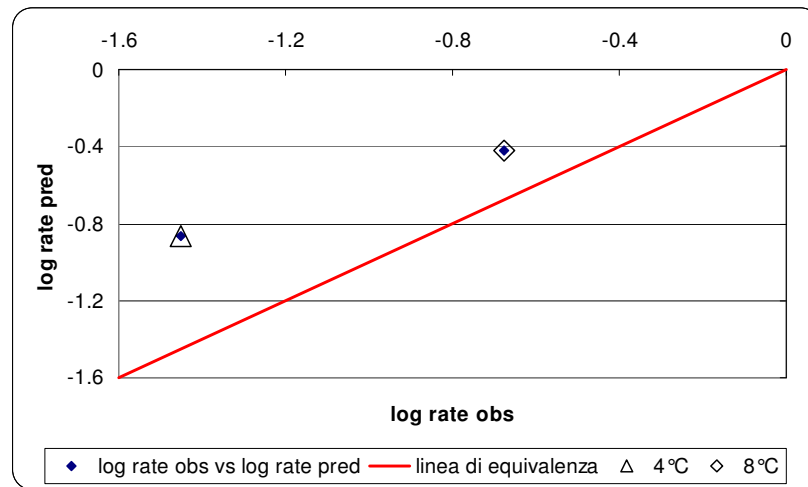
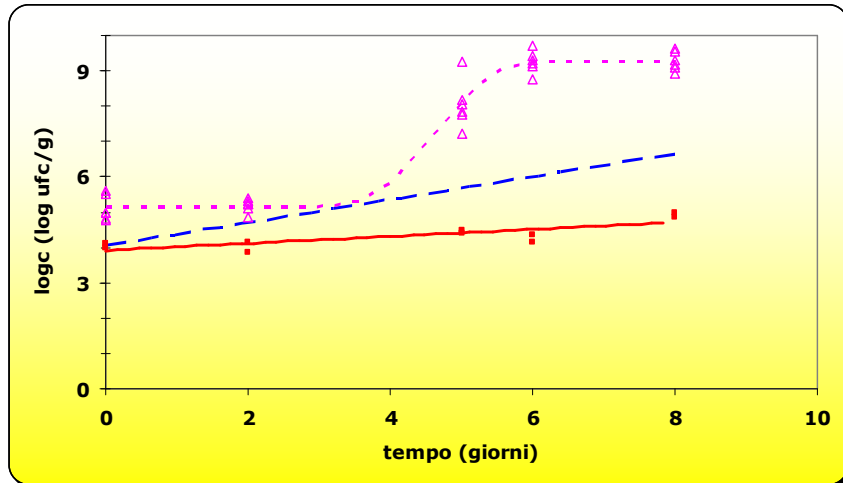


Fig. 20: Confronto fra il logaritmo della rate osservata e il logaritmo della rate predetta nella contaminazione sperimentale di Ricotta salata, durante la shelf life a 4°C e 8°C, utilizzando una miscela di ceppi di *L. monocytogenes* (Lm_At, Lm_d1, Lm_d2), Lm.

3.1.1.2 Alimenti crudi o precotti, a diverse temperature di conservazione

3.1.1.2.a) Hamburger di tacchino

a)



b)

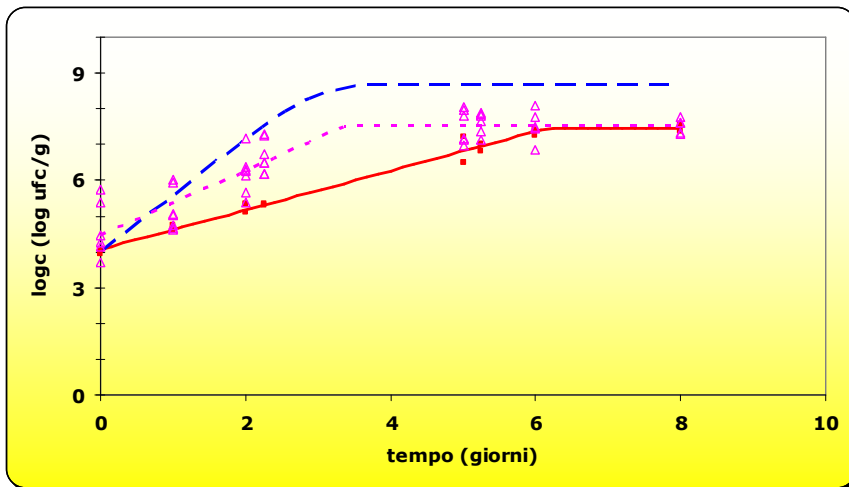


Fig. 21: **Confronto fra predizione e risultati osservati nella contaminazione di hamburger di tacchino, durante la shelf life a diverse temperature, a) 4°C; b) 12°C; utilizzando un unico ceppo di *L. monocytogenes* (Lm_At), Lm.**

Quadrati e linea continua rossi (■, —): valore di *logc* di Lm osservato e il loro *fit* lineare. Triangoli e linea punteggiata rosa (△, - -): valore di *logc* di LAB osservato e il loro *fit* bi-fasico. Linea tratteggiata blu (— —): predizione del *logc* di *L. monocytogenes* generata da un modello secondario (www.combase.cc) con pH di 6.78 e a_w 0.982 (pari ai valori medi nell'alimento addizionati del ES). Non è stato calcolato il fattore di correzione per questo prodotto.

pH

Il valore di pH medio, rilevato su 55 campionamenti, durante la contaminazione sperimentale, è stato di 6.36, con ES di 0.42 e il pH max (pH medio + ES) di 6.78.

a_w

Il valore di a_w medio, rilevato su 30 campionamenti, durante la contaminazione sperimentale, è stato di 0.967, con ES di 0.015 e la a_w max (a_w medio + ES) di 0.982.

T°	<i>rete Lm pred</i> (1/d)	<i>T₁₀₀ pred</i> (d)	<i>rate Lm obs</i> (1/d)	ESfit	ESrel (ESrate/rate)	T ₁₀₀ obs (d)
4	0.32	6.16	0.099	0.21	0.23	20.15
12	1.58	1.26	0.55	0.17	0.04	3.64

Tab. 6: Confronto fra predizione e risultati osservati nella contaminazione sperimentale di hamburger di tacchino, durante la shelf life a 4°C, 12°C, utilizzando un unico ceppo di *L. monocytogenes* (Lm_At), Lm.

rate Lm pred: valore della *rate* di *L. monocytogenes* predetta dal modello secondario.

T₁₀₀ pred: tempo predetto per arrivare a 100 ufc/g di *L. monocytogenes*.

rate Lm obs: valore della *rate* di Lm osservata.

T_{100ufc/g} obs: tempo osservato per arrivare a 100 ufc/g di *L. monocytogenes*.

ESfit: errore standard del *fit*.

ESrel errore relativo della *rate* osservata (errore standard del valore della *rate* diviso il valore della *rate*).

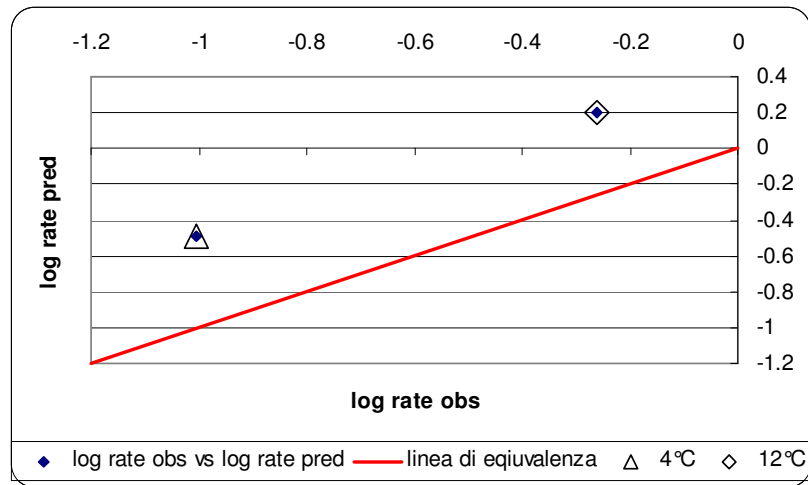
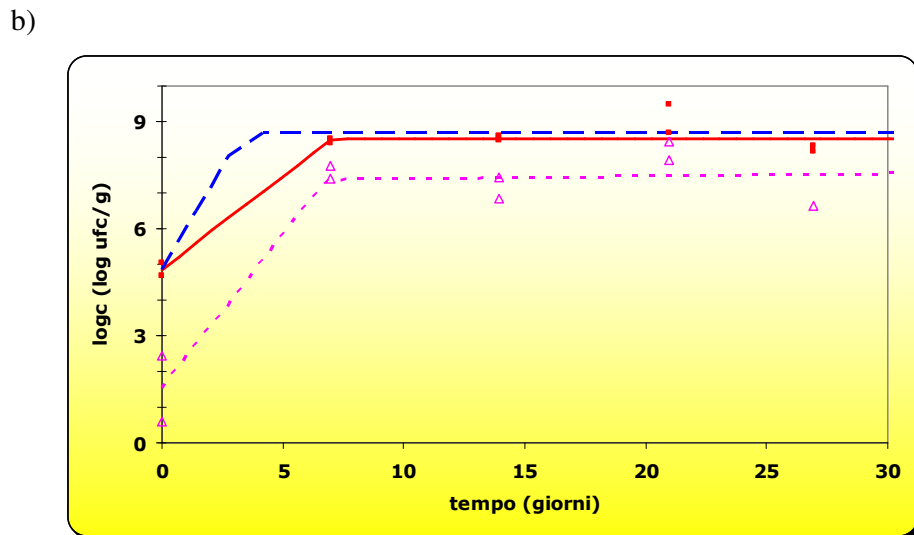
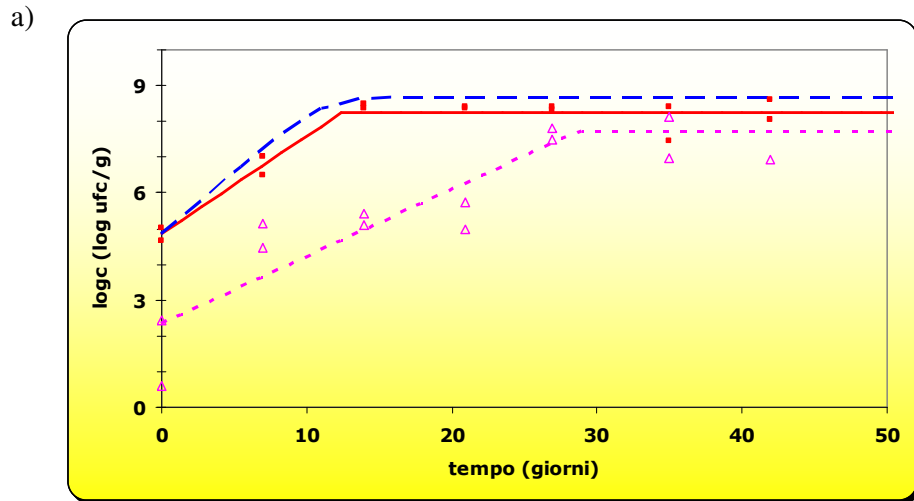
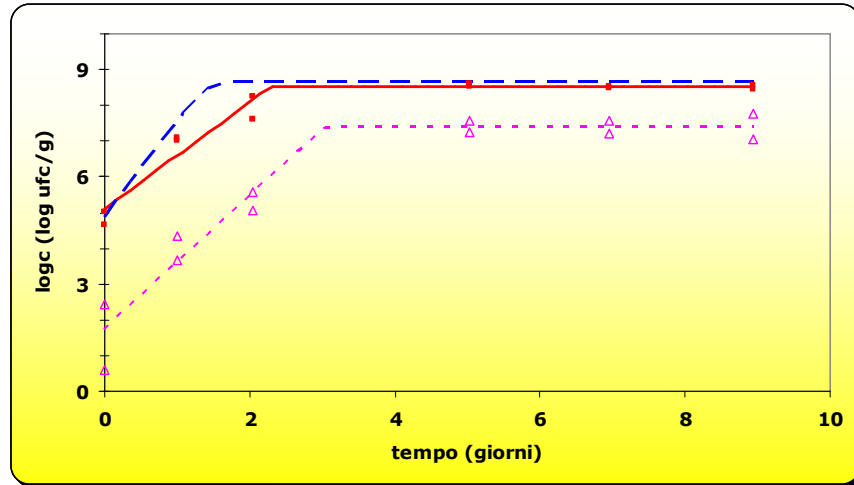


Fig. 22: Confronto fra il logaritmo della rate osservata e il logaritmo della rate predetta nella contaminazione sperimentale di hamburger di tacchino, durante la shelf life a 4°C e 12°C, utilizzando un ceppo unico di *L. monocytogenes* (Lm_At), Lm.

3.1.1.2.b) Zampone precotto



c)



d)

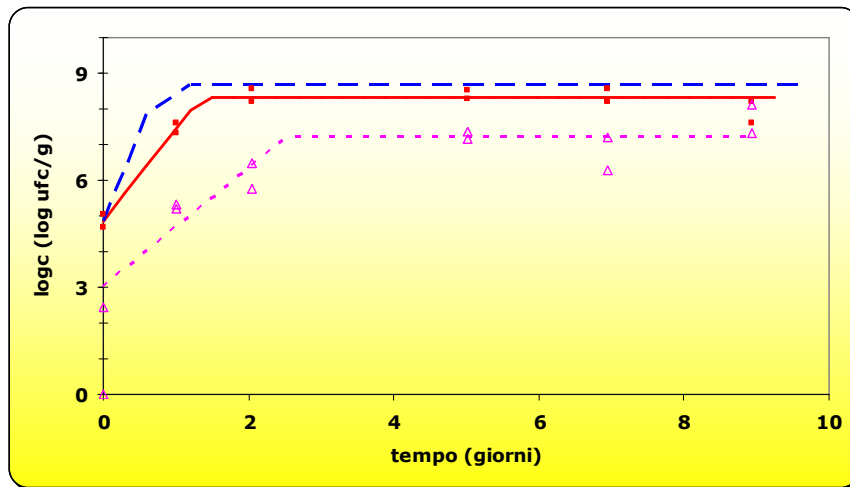


Fig. 23: Confronto fra predizione e risultati osservati nella contaminazione sperimentale di zampone precotto, durante la shelf life a diverse temperature, a) 4°C; b) 10°C; c) 15°C; d) 20°C; utilizzando un unico ceppo di *L. monocytogenes* (Lm_At), Lm.

Quadrati e linea continua rossi (■, —): valore di *logc* di Lm osservato e il loro *fit* lineare.

Triangoli e linea punteggiata rosa (△, - -): valore di *logc* di LAB osservato e il loro *fit* bi-fasico.

Linea tratteggiata blu (- -): predizione del *logc* di *L. monocytogenes* generata da un modello secondario (www.combase.cc) con pH di 6.69 e a_w 0.986 (pari ai valori medi nell'alimento addizionati del ES). Non è stato calcolato il fattore di correzione per questo prodotto.

pH

Il valore di pH medio, rilevato su 88 campionamenti, durante la contaminazione sperimentale, è stato di 6.44, con ES di 0.26 e il pH max (pH medio + ES) di 6.69.

a_w

Il valore di a_w medio, rilevato su 108 campionamenti, durante la contaminazione sperimentale, è stato di 0.976, con ES di 0.09 e la a_w max (a_w medio + ES) di 0.986.

T°	<i>rate Lm pred</i> (1/h)	<i>T₁₀₀ pred</i> (h)	<i>rate Lm obs</i> (1/h)	ESfit	ESrel (ESrate/rate)	<i>T₁₀₀ obs</i> (h)
4	0.34	141.17	0.27	0.32	0.17	175.79
10	1.17	40.95	0.52	0.40	0.11	92.13
15	2.75	17.41	1.50	0.32	0.10	31.9
20	5.07	9.47	2.61	0.28	0.11	18.36

Tab. 7.: **Confronto fra predizione e risultati osservati nella contaminazione sperimentale di zampone precotto, durante la shelf life a diverse temperature, 4°C, 10°C, 15°C, 20°C; utilizzando un unico ceppo di *L. monocytogenes* (Lm_At), Lm.**

rate Lm pred: valore della *rate* di *L. monocytogenes* predetta dal modello secondario.

T₁₀₀ pred: tempo predetto per arrivare a 100 ufc/g di *L. monocytogenes*.

rate Lm obs: valore della *rate* di Lm osservata.

T₁₀₀ obs: tempo osservato per arrivare a 100 ufc/g di *L. monocytogenes*.

ESfit: errore standard del *fit*.

ESrel errore relativo della *rate* osservata (errore standard del valore della *rate* diviso il valore della *rate*).

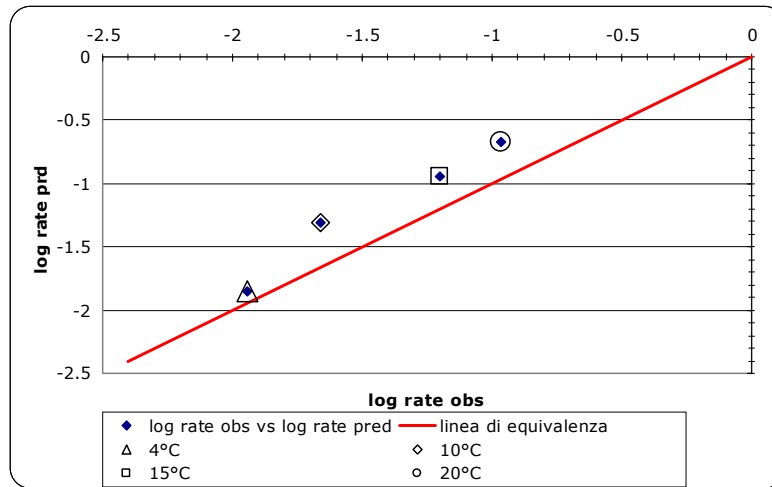


Fig. 24: Confronto fra il logaritmo della *rate* osservata e il logaritmo della *rate* predetta nella contaminazione sperimentale di hamburger di tacchino, durante la shelf life a 4°C, 10°C, 15°C, 20°C, utilizzando un ceppo unico di *L. monocytogenes* (Lm_At), Lm.

3.1.1.3 Alimenti in cui *L. monocytogenes* diminuisce grazie alla temperatura durante il processo di produzione.

I risultati descrivono la variazione nel tempo del logaritmo della concentrazione (*logc*) di *L. monocytogenes* durante un trattamento termico letale per il microorganismo. I dati osservati sono confrontati con la simulazione generata da un modello dinamico generato considerando il profilo di temperatura del processo (Fig. 24).

3.1.1.3.a) Grana Padano DOP, dal latte alla messa in fascera.

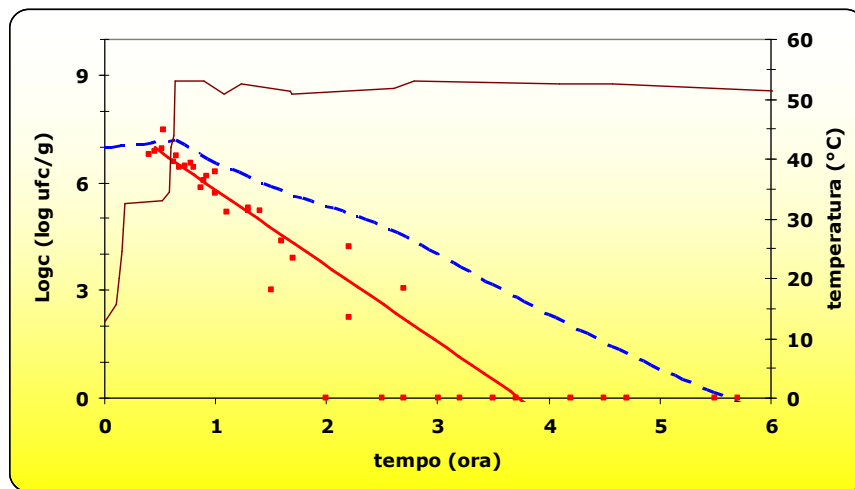


Fig. 25: **Confronto fra predizione e risultati osservati nella contaminazione sperimentale di Grana Padano DOP durante il processo di produzione, utilizzando una miscela di ceppi di *L. monocytogenes* (Lm_At, Lm_d3).**

Linea marrone continua (—): *temp* (varia al variare del tempo, ambiente dinamico).

Quadrati e linea continua rossi (■, —): valore di *logc* di Lm osservato e il loro *fit* lineare. Notare che i quadrati rossi sull'asse orizzontale indicano valori *logc* N/D (non rilevati).

Linea tratteggiata blu (---): predizione del *logc* di *L. monocytogenes* generata da un modello dinamico (Le Marc *et al.*, 2002) dove *temp* e pH sono tempo-dipendenti.

La velocità di morte calcolata dalla regressione lineare dei dati osservati, *logc* di *L. monocytogenes* inoculata nel prodotto, è risultata

pari a -2.13 (1/h) con un ESrel di 0.09. e un ESfit di 0.56. Il tempo di riduzione decimale osservato, *D value*, pari a 28.22min \pm 2.5min.

3.1.1.4 Alimenti in cui *S. Typhimurium*, *E. coli* O157:H7, *L. monocytogenes*, diminuiscono di concentrazione grazie a fattori secondari che variano nel tempo (a_w , *pH*).

La popolazione dei microorganismi patogeni varia al variare dei fattori esterni in cui si trova; i risultati riportano i profili di *pH* e a_w misurati durante la fermentazione e la stagionatura dei prodotti considerati nelle contaminazioni sperimentali. I valori del log della concentrazione (ufc/g) dei microorganismi osservati (*logc*) e il loro *fit* lineare.

I dati osservati sono confrontati con la simulazione generata da modelli secondari di microbiologia predittiva grazie ai quali, conoscendo il profilo dinamico dei fattori ambientali esterni, si può prevedere quale sarà l'andamento della popolazione batterica considerata. La velocità istantanea di morte, varia se *pH* e a_w cambiano nel tempo, la *rate* è stata poi modificata con un fattore di correzione *cf* in modo che la deviazione tra i dati osservati e quelli del modello fosse più piccola possibile, applicando il principio del minimo scarto quadratico medio (Fig.re da 25 a 41).

3.1.1.4.a) Salame nostrano, vendibile dopo 42 giorni di stagionatura

(a) contaminato con *L. monocytogenes*

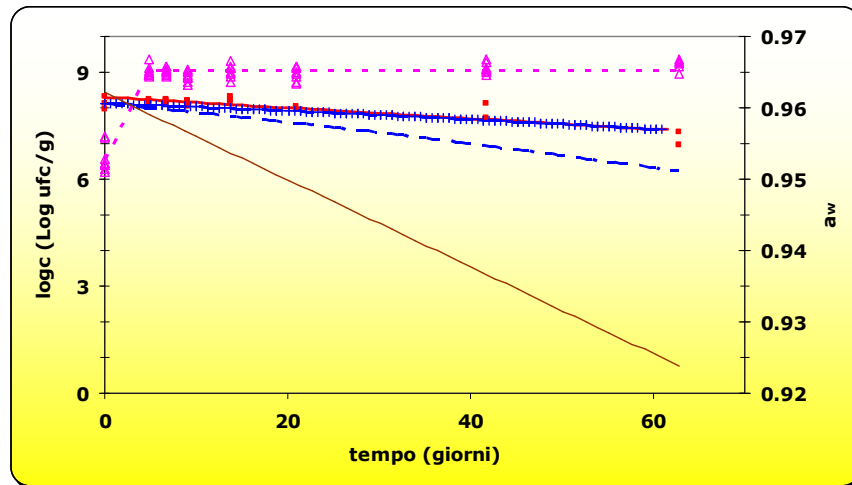


Fig. 26: Confronto fra predizione e risultati osservati nella contaminazione sperimentale di Salame nostrano, durante il processo di stagionatura, utilizzando una miscela di ceppi di *L. monocytogenes* (Lm_At, Lm_m3, Lm_m4), Lm.

Linea marrone continua (—): a_w (varia al variare del tempo, ambiente dinamico).

Quadrati e linea continua rossi (■, —): valore di $logc$ di Lm osservato e il loro fit lineare.

Triangoli e linea punteggiata rosa (Δ , - -): valore di $logc$ di LAB osservato e il loro fit bi-fasico.

Linea tratteggiata blu (- -): predizione del $logc$ di *L. monocytogenes* generata da un modello dinamico (www.combase.cc) dove a_w e/o il pH sono tempo-dipendenti.

Linea blu tratteggiata e crociata (-+- -+-): come sopra, ma le velocità istantanee predette sono modificate, durante la simulazione, da un fattore di correzione cf pari a 0.4.

La velocità di morte calcolata dalla regressione lineare dei dati osservati è stata, per la popolazione di *L. monocytogenes*, di -0.015 (1/d) con un ESrel di 0.12 ed un ESfit di 0.17. Il D value osservato è stato di $43.83 \text{ d} \pm 6.62 \text{ d}$.

(b) contaminato con *E. coli* O157:H7

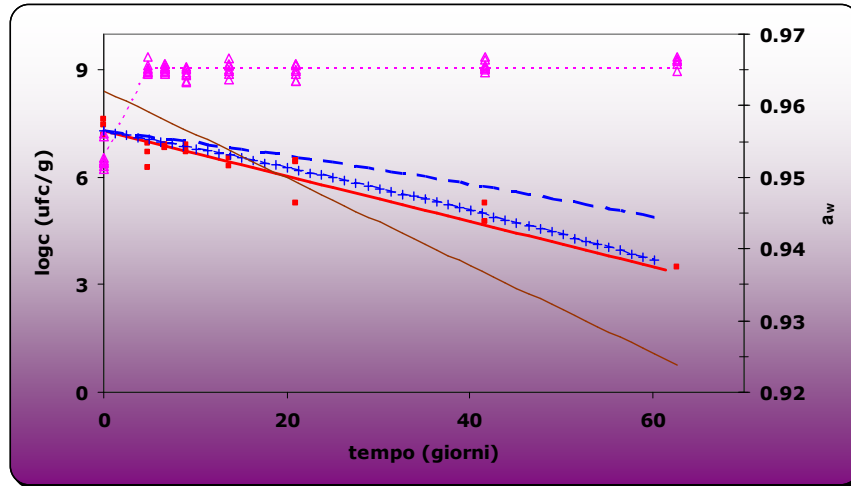


Fig. 27: Confronto fra predizione e risultati osservati nella contaminazione sperimentale di Salamini alla cacciatora DOP, durante il processo di stagionatura, utilizzando una miscela di ceppi di *E. coli* (Ec_At, Ec_m1, Ec_m2), Ec.

Linea marrone continua (—): a_w (varia al variare del tempo, ambiente dinamico).
Quadrati e linea continua rossi (■, —): valore di $logc$ di Ec osservato e il loro *fit* lineare.

Triangoli e linea punteggiata rosa (Δ , - -): valore di $logc$ di LAB osservato e il loro *fit* bi-fasico.

Linea tratteggiata blu (- -): predizione del $logc$ di *E. coli* generata da un modello dinamico (elaborato nella tesi) dove a_w e/o il pH sono tempo-dipendenti.

Linea blu tratteggiata e crociata (-+- -+-): come sopra, ma le velocità istantanee predette sono modificate, durante la simulazione, da un fattore di correzione *cf* pari a 1.5

La velocità di morte calcolata dalla regressione lineare dei dati osservati è stata, per la popolazione di *E. coli* O157:H7, di -0.063 (1/d) con un ESrel di 0.06 ed un ESfit di 0.36. Il D value osservato è stato di $15.87d \pm 1.03d$.

(c) contaminato con *S. Typhimurium*

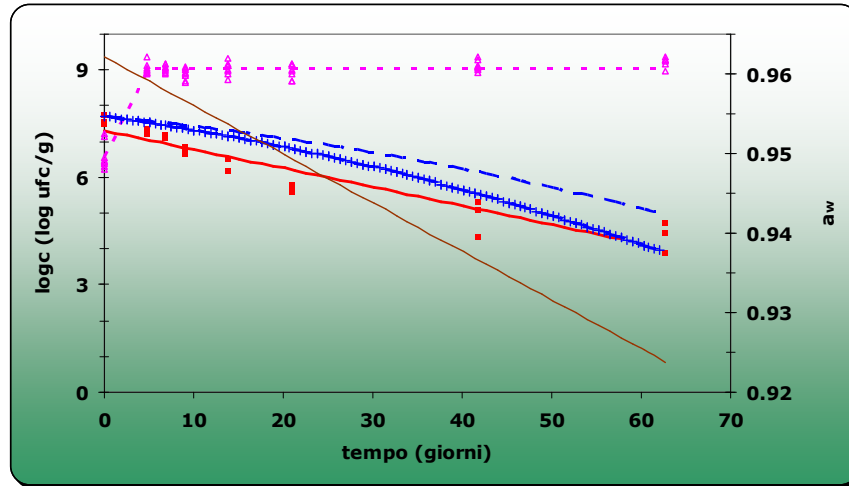


Fig. 28: Confronto fra predizione e risultati osservati nella contaminazione sperimentale di salame nostrano, durante il processo di stagionatura, utilizzando una miscela di ceppi di *S. Typhimurium* (Ss_At, Ss_m1, Ss_m2), Ss.

Linea marrone continua (—): a_w (varia al variare del tempo, ambiente dinamico).
Quadrati e linea continua rossi (■, —): valore di $logc$ di Ss osservato e il loro *fit* lineare.

Triangoli e linea punteggiata rosa (Δ , - -): valore di $logc$ di LAB osservato e il loro *fit* bi-fasico.

Linea tratteggiata blu (- -): predizione del $logc$ di *S. Typhimurium* generata da un modello dinamico (Cosciani Cunico *et al.*, 2005) dove a_w e/o il pH sono tempo-dipendenti.

Linea blu tratteggiata e crociata (-+- -+-): come sopra, ma le velocità istantanee predette sono modificate, durante la simulazione, da un fattore di correzione *cf* pari a 1.35

La velocità di morte calcolata dalla regressione lineare dei dati osservati è stata, per la popolazione di *S. Typhimurium*, di -0.052 (1/d) con un ESrel di 0.07 ed un ESfit di 0.37. Il D *value* osservato è stato di 19.07 d \pm 1.36d.

pH

Il profilo di pH, rilevato su 32 campionamenti, durante la contaminazione sperimentale, è stato calcolato tramite la regressione lineare dei dati ed espresso da una curva bifasica, (eq.2) che cambia pendenza *break point (bp)* dopo 4.3 giorni, ed ha un ES di 0.13; ($y = \text{pH}$, $x = \text{tempo (d)}$):

$$\begin{cases} y_1 = -0.11 \cdot x + 5.85 \\ y_2 = 0.06 \cdot x + 5.38 \end{cases} \quad \text{eq. 2}$$

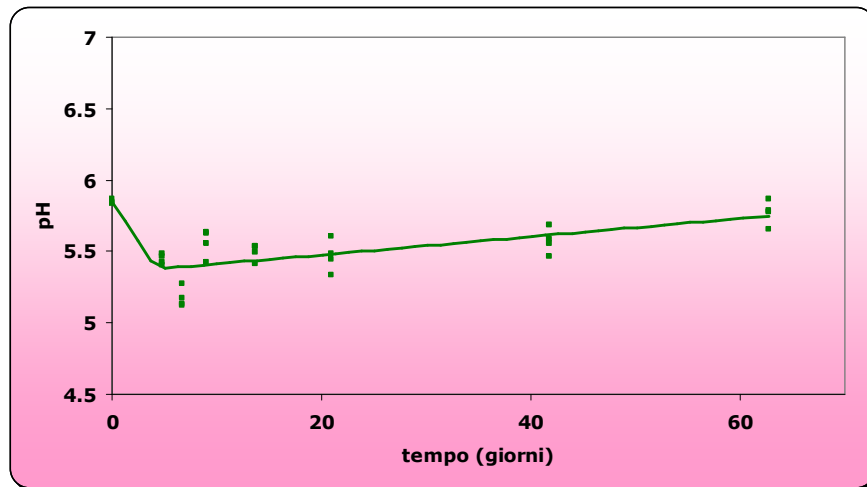


Fig. 29: **Profilo di pH nel Salame nostrano.**

Quadrati e linea continua verdi (■,—): valori di pH e la loro regressione lineare bifasica.

a_w

Il profilo di a_w è stato calcolato tramite la regressione lineare dei dati, 32 campionamenti, ed espresso come la retta con ES di 0.012 descritta nell'equazione 3; ($y = a_w$, $x = \text{tempo (d)}$):

$$y = 0.962 - 0.00061 \cdot x \quad \text{eq. 3}$$

3.1.1.4.b) Salamini alla cacciatora DOP, vendibili dopo 21 giorni di stagionatura

(a) contaminato con *L. monocytogenes* ;

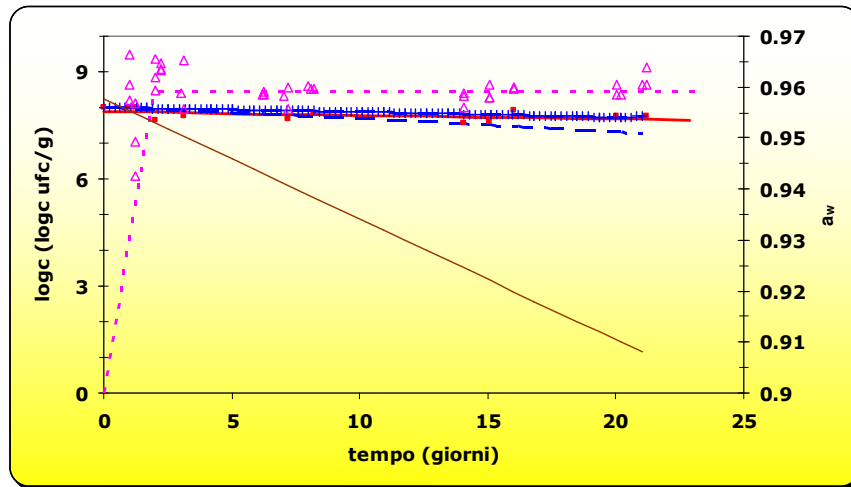


Fig.30: Confronto fra predizione e risultati osservati nella contaminazione sperimentale di Salamini alla cacciatora DOP, durante il processo di stagionatura, utilizzando una miscela di ceppi di *L. monocytogenes* (Lm_At, Lm_m5), Lm.

Linea marrone continua (—): a_w (varia al variare del tempo, ambiente dinamico).

Quadrati e linea continua rossi (■, —): valore di $\log c$ di Lm osservato e il loro *fit* lineare.

Triangoli e linea punteggiata rosa (Δ , - -): valore di $\log c$ di LAB osservato e il loro *fit* bi-fasico.

Linea tratteggiata blu (- -): predizione del $\log c$ di *L. monocytogenes* generata da un modello dinamico (www.combase.cc) dove a_w e/o il pH sono tempo-dipendenti.

Linea blu tratteggiata e crociata (-+- -+-): come sopra, ma le velocità istantanee predette sono modificate, durante la simulazione, da un fattore di correzione *cf* pari a 0.34.

La velocità di morte calcolata dalla regressione lineare dei dati osservati è stata, per la popolazione di *L. monocytogenes*, di -0.0098 (1/d) con un ESrel di 0.58 ed un ESfit di 0.15. Il D value osservato è stato di $102.57d \pm 60.21d$.

(b) contaminato con *E. coli* O157:H7

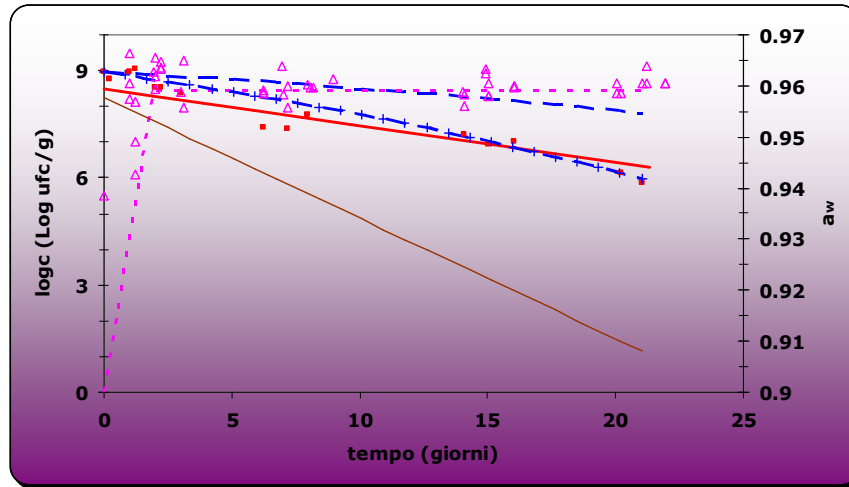


Fig. 31: Confronto fra predizione e risultati osservati nella contaminazione sperimentale di Salamini alla cacciatora DOP, durante il processo di stagionatura, utilizzando una miscela di ceppi di *E. coli* (Ec_At, Ec_m1, Ec_m2), Ec.

Linea marrone continua (—): a_w (varia al variare del tempo, ambiente dinamico).
Quadrati e linea continua rossi (■, —): valore di $logc$ di Ec osservato e il loro fit lineare.

Triangoli e linea punteggiata rosa (Δ , - -): valore di $logc$ di LAB osservato e il loro fit bi-fasico.

Linea tratteggiata blu (- -): predizione del $logc$ di *E. coli* generata da un modello dinamico (elaborato nella tesi) dove a_w e/o il pH sono tempo-dipendenti.

Linea blu tratteggiata e crociata (-+- -+-): come sopra, ma le velocità istantanee predette sono modificate, durante la simulazione, da un fattore di correzione cf pari a 2.5

La velocità di morte calcolata dalla regressione lineare dei dati osservati è stata, per la popolazione di *E. coli* O157:H7, di -0.18 (1/d) con un ESrel di 0.04 ed un ESfit di 0.2. Il D value osservato è stato di 5.43 d \pm 0.2d.

(c) contaminato con *S. Typhimurium*

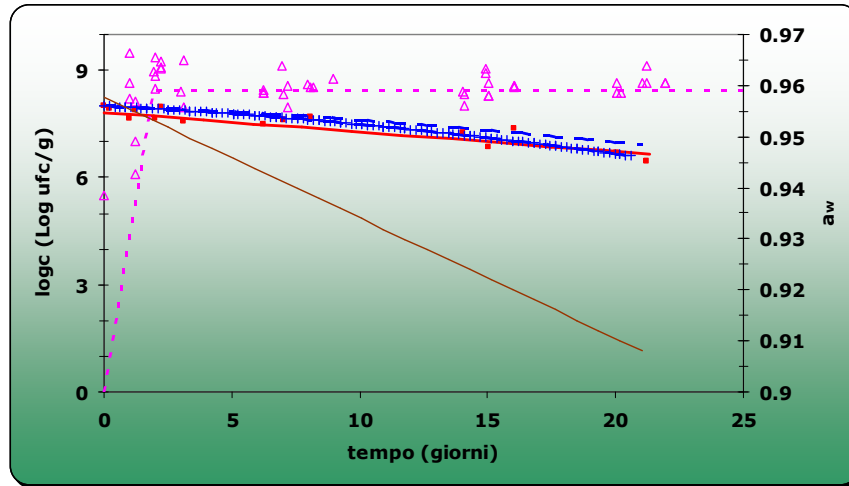


Fig. 32: **Confronto fra predizione e risultati osservati nella contaminazione sperimentale di Salamini alla cacciatora DOP durante il processo di stagionatura, utilizzando una miscela di ceppi di *S. Typhimurium* (Ss_At, Ss_m3, Ss_m4), Ss.**

Linea marrone continua (—): a_w (varia al variare del tempo, ambiente dinamico).
Quadrati e linea continua rossi (■, —): valore di $logc$ di Ss osservato e il loro *fit* lineare.

Triangoli e linea punteggiata rosa (Δ , - -): valore di $logc$ di LAB osservato e il loro *fit* bi-fasico.

Linea tratteggiata blu (— —): predizione del $logc$ di *S. Typhimurium* generata da un modello dinamico (Cosciani Cunico *et al.*, 2005) dove a_w e/o il pH sono tempo-dipendenti.

Linea blu tratteggiata e crociata (-+- -+-): come sopra, ma le velocità istantanee predette sono modificate, durante la simulazione, da un fattore di correzione *cf* pari a 1.3

La velocità di morte calcolata dalla regressione lineare dei dati osservati è stata, per la popolazione di *S. Typhimurium*, di -0.052 (1/d) con un ESrel di 0.07 ed un ESfit di 0.37. Il D *value* osservato è stato di 19.07 d \pm 1.36d.

pH

Il profilo di pH, rilevato su 34 campionamenti, durante la contaminazione sperimentale, è stato calcolato tramite la regressione lineare dei dati ed espresso da una curva bifasica, (eq. 4) che cambia pendenza *break point* (bp) dopo 2.47 giorni, ed ha un ES di 0.11; ($y = \text{pH}$, $x = \text{tempo (d)}$):

$$\begin{cases} y_1 = -0.34 \cdot x + 5.9 \\ y_2 = 0.023 \cdot x + 5.07 \end{cases} \quad \text{eq.4}$$

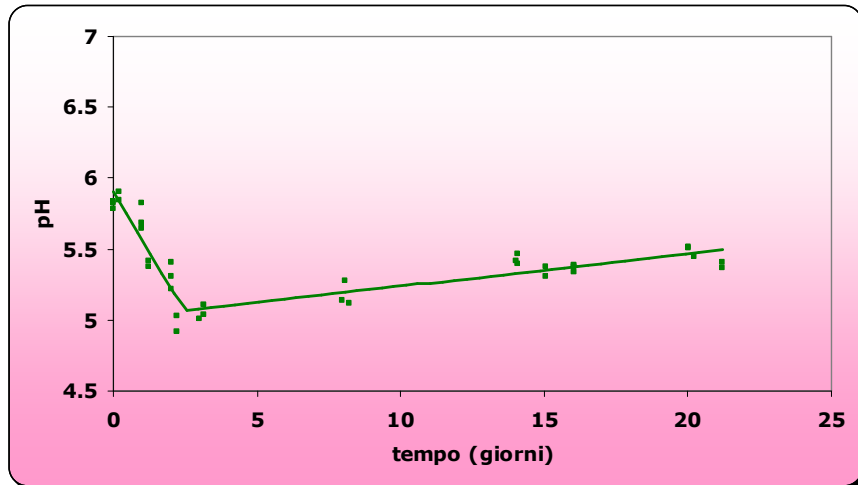


Fig. 33: **Profilo di pH nei Salamini alla cacciatore DOP.**

Quadrati e linea continua verdi (■,—): valori di pH e la loro regressione lineare bifasica.

a_w

Il profilo di a_w è stato calcolato tramite la regressione lineare dei dati, 34 campionamenti, ed espresso come la retta, con ES di 0.011, descritta nell'(eq.5); ($y = a_w$, $x = \text{tempo (d)}$):

$$y = 0.958 - 0.002 \cdot x \quad \text{eq.5}$$

3.1.1.4.c) Salame Milano, vendibile dopo 60 giorni di stagionatura

(a) contaminato con *E. coli* O157:H7

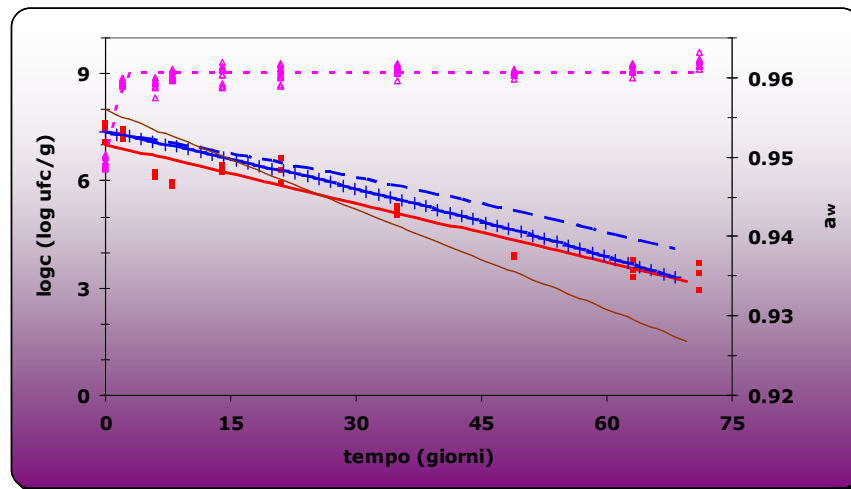


Fig. 34: Confronto fra predizione e risultati osservati nella contaminazione sperimentale di Salame Milano, durante il processo di stagionatura, utilizzando una miscela di ceppi di *E. coli* (*Ec_At*, *Ec_m1*, *Ec_m2*), *Ec*.

Linea marrone continua (—): a_w (varia al variare del tempo, ambiente dinamico).
Quadrati e linea continua rossi (■, —): valore di $logc$ di *Ec* osservato e il loro *fit* lineare.

Triangoli e linea punteggiata rosa (Δ , - -): valore di $logc$ di LAB osservato e il loro *fit* bi-fasico.

Linea tratteggiata blu (- -): predizione del $logc$ di *E. coli* generata da un modello dinamico (elaborato nella tesi) dove a_w e/o il pH sono tempo-dipendenti.

Linea blu tratteggiata e crociata (-+ -+): come sopra, ma le velocità istantanee predette sono modificate, durante la simulazione, da un fattore di correzione *cf* pari a 1.25

La velocità di morte calcolata dalla regressione lineare dei dati osservati, è stata, per la popolazione di *E. coli*, O157:H7, di -0.055 (1/d) con un ESrel di 0.06 ed un ESfit di 0.43. Il D value osservato è stato di $18.17d \pm .1.1d$.

(b) contaminato con *S. Typhimurium*

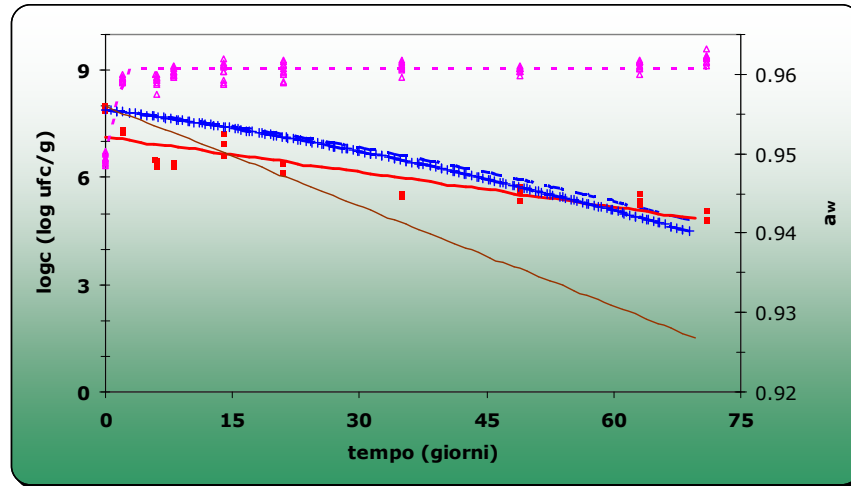


Fig. 35: Confronto fra predizione e risultati osservati nella contaminazione sperimentale di Salame Milano, durante il processo di stagionatura, utilizzando una miscela di ceppi di *S. Typhimurium* (Ss_At, Ss_m1, Ss_m2), Ss.

Linea marrone continua (—): a_w (varia al variare del tempo, ambiente dinamico).
Quadrati e linea continua rossi (■, —): valore di $logc$ di Ss osservato e il loro *fit* lineare.

Triangoli e linea punteggiata rosa (Δ , - -): valore di $logc$ di LAB osservato e il loro *fit* bi-fasico.

Linea tratteggiata blu (- -): predizione del $logc$ di *S. Typhimurium* generata da un modello dinamico (Cosciani Cunico *et al.*, 2005) dove a_w e/o il pH sono tempo-dipendenti.

Linea blu tratteggiata e crociata (-+- -+-): come sopra, ma le velocità istantanee predette sono modificate, durante la simulazione, da un fattore di correzione *cf* pari a 1.1

La velocità di morte calcolata dalla regressione lineare dei dati osservati, è stata, per la popolazione di *S. Typhimurium*, di -0.03 (1/d) con un ESrel di 0.1 ed un ESfit di 0.44. Il D *value* osservato è stato di $30.66 \text{ d} \pm 3.05 \text{ d}$.

pH

Il profilo di pH, rilevato su 40 campionamenti, durante la contaminazione sperimentale, è stato calcolato tramite la regressione lineare dei dati ed espresso da una curva bifasica (eq. 6) che cambia pendenza, *break point* (*bp*), dopo 2.82 giorni ed ha un ES di 0.06; ($y = pH$, $x = \text{tempo (d)}$):

$$\left\{ \begin{array}{l} y_1 = -0.27 * x + 5.83 \\ y_2 = 0.03 * x + 5.06 \end{array} \right. \quad \text{eq.6}$$

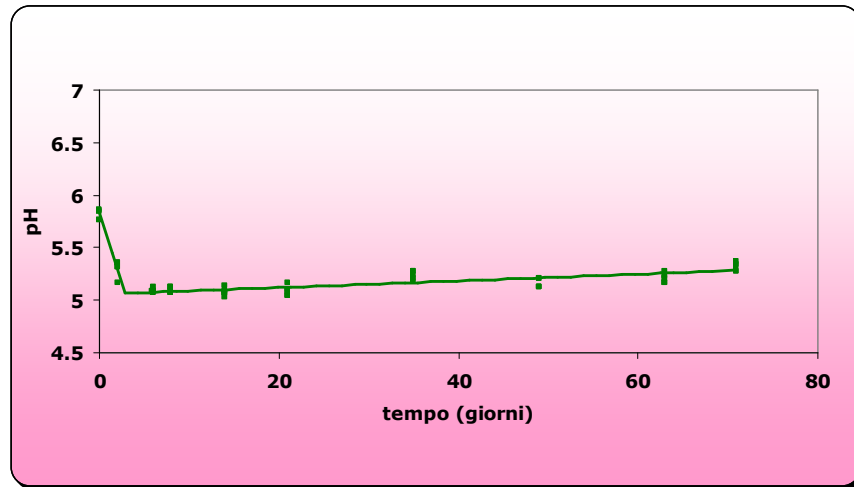


Fig. 36: **Profilo di pH nel Salame Milano.**

Quadrati e linea continua verdi (■,—): valori di pH e la loro regressione lineare bifasica.

a_w

Il profilo di a_w è stato calcolato tramite la regressione lineare dei dati, 40 campionamenti, ed espresso come la retta, con ES di 0.013, descritta nell'(eq.7); ($y = a_w$, $x = \text{tempo (d)}$):

$$y = 0.956 - 0.00042 * x \quad \text{eq.7}$$

3.1.1.4.d) Salame della bergamasca, vendibile dopo 42 giorni di stagionatura

(a) contaminato con *L. monocytogenes*

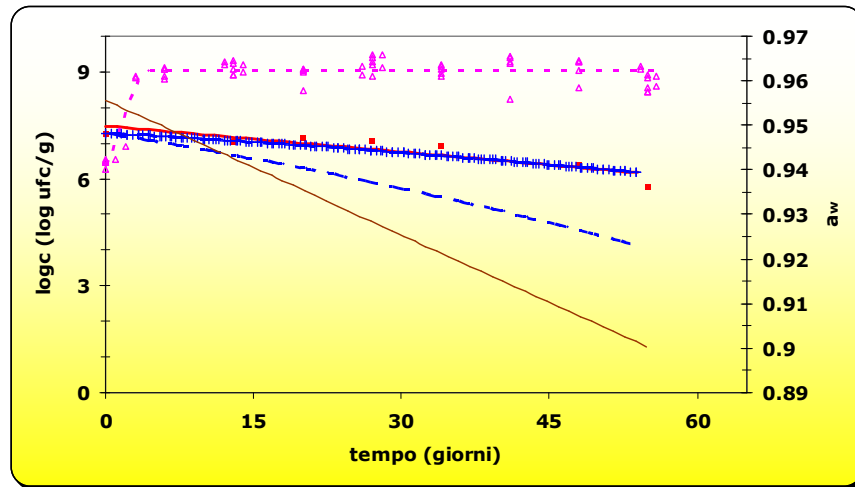


Fig. 37: Confronto fra predizione e risultati osservati nella contaminazione sperimentale di Salame della bergamasca, durante il processo di stagionatura, utilizzando un ceppo di *L. monocytogenes* (Lm_At), Lm.

Linea marrone continua (—): a_w (varia al variare del tempo, ambiente dinamico).
Quadrati e linea continua rossi (■, —): valore di $\log c$ di Lm osservato e il loro *fit* lineare.

Triangoli e linea punteggiata rosa (Δ , - -): valore di $\log c$ di LAB osservato e il loro *fit* bi-fasico.

Linea tratteggiata blu (- -): predizione del $\log c$ di *L. monocytogenes* generata da un modello dinamico (www.combase.cc) dove a_w e/o il pH sono tempo-dipendenti.

Linea blu tratteggiata e crociata (-+- -+-): come sopra, ma le velocità istantanee predette sono modificate, durante la simulazione, da un fattore di correzione *cf* pari a 0.35.

La velocità di morte calcolata dalla regressione lineare dei dati osservati è stata, per la popolazione di *L.mocytogenes* di -0.029 (1/d) con un ESrel di 0.19 ed un ESfit di 0.35. Il D value osservato è stato di $34.42d \pm 6.45d$.

(b) contaminato con *E. coli*

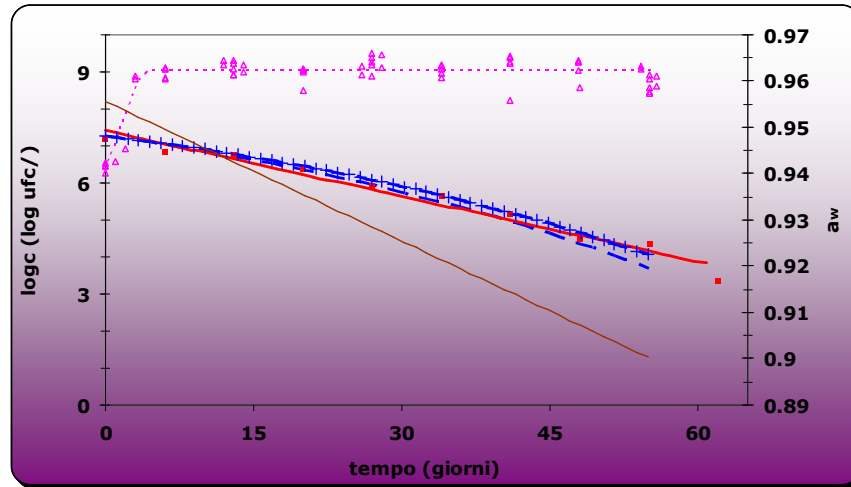


Fig. 38: Confronto fra predizione e risultati osservati nella contaminazione sperimentale di Salame della bergamasca, durante il processo di stagionatura, utilizzando una miscela di ceppi di *E. coli* (Ec_At, Ec_m1, Ec_m2), Ec.

Linea marrone continua (—): a_w (varia al variare del tempo, ambiente dinamico).
Quadrati e linea continua rossi (■, —): valore di $logc$ di Ec osservato e il loro *fit* lineare.

Triangoli e linea punteggiata rosa (Δ , - -): valore di $logc$ di LAB osservato e il loro *fit* bi-fasico.

Linea tratteggiata blu (- -): predizione del $logc$ di *E. coli* generata da un modello dinamico (elaborato nella tesi) dove a_w e/o il pH sono tempo-dipendenti.

Linea blu tratteggiata e crociata (-+- -+-): come sopra, ma le velocità istantanee predette sono modificate, durante la simulazione, da un fattore di correzione *cf* pari a 0.9

La velocità di morte calcolata dalla regressione lineare dei dati osservati è stata, per la popolazione di *E. coli*, di -0.059 (1/d) con un ESrel di 0.06 ed un ESfit di 0.24. Il D value osservato è stato di 16.95 d \pm 1.08d.

(c) contaminato con *S. Typhimurium*

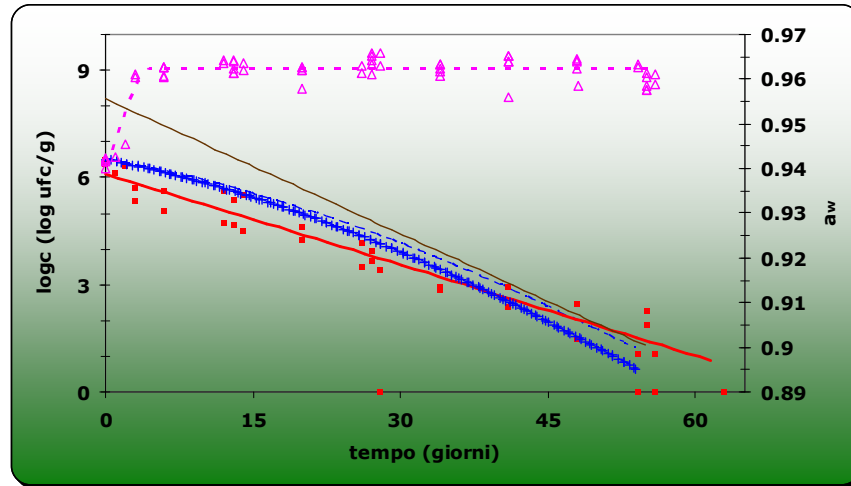


Fig. 39: Confronto fra predizione e risultati osservati nella contaminazione sperimentale di Salame della bergamasca, durante il processo di stagionatura, utilizzando un singolo ceppo di *S. Typhimurium* (Ss_At), Ss.

Linea marrone continua (—): a_w (varia al variare del tempo, ambiente dinamico).
Quadrati e linea continua rossi (■, —): valore di $logc$ di Ss osservato e il loro fit lineare. Notare che i quadrati rossi sull'asse orizzontale indicano valori di $logc$ N/D (non rilevati).

Triangoli e linea punteggiata rosa (Δ , - -): valore di $logc$ di LAB osservato e il loro fit bi-fasico.

Linea tratteggiata blu (- -): predizione del $logc$ di *S. Typhimurium* generata da un modello dinamico (Cosciani Cunico *et al.*, 2005) dove a_w e/o il pH sono tempo-dipendenti.

Linea blu tratteggiata e crociata (-+- -+-): come sopra, ma le velocità istantanee predette sono modificate, durante la simulazione, da un fattore di correzione cf pari a 0.9

La velocità di morte calcolata dalla regressione lineare dei dati osservati è stata, per la popolazione di *S. Typhimurium*, di -0.0857 (1/d) con un ESrel di 0.05 ed un ESfit di 0.4058. Il D value osservato è stato di $11.78 \text{ d} \pm 0.40 \text{ d}$.

pH

Il profilo di pH, rilevato su 61 campionamenti, durante la contaminazione sperimentale, è stato calcolato tramite la regressione lineare dei dati ed espresso da una curva bifasica, (eq. 8) che cambia pendenza *break point* (*bp*), dopo 4.2 giorni ed ha un ES di 0.06; ($y = \text{pH}$, $x = \text{tempo (d)}$):

$$\begin{cases} y_1 = -0.12 * x + 5.6 \\ y_2 = -0.00047 * x + 5.09 \end{cases} \quad \text{eq. 8}$$

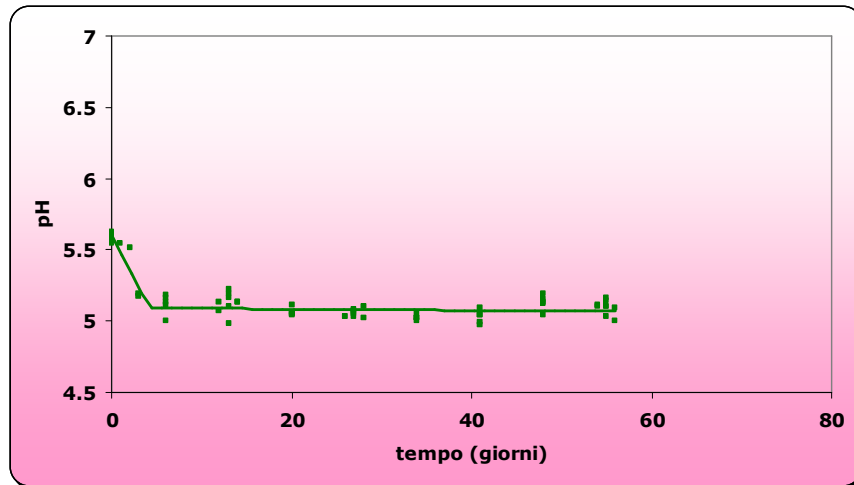


Fig. 40: **Profilo di pH nel Salame della bergamasca.**

Quadrati e linea continua verdi (■,—): valori di pH e la loro regressione lineare bifasica.

a_w

Il profilo di a_w è stato calcolato tramite la regressione lineare dei dati, 61 campionamenti, ed espresso come la retta, con ES di 0.007, descritta nell'(eq. 9); ($y = a_w$, $x = \text{tempo (d)}$):

$$y = 0.956 - 0.001 * x \quad \text{eq. 9}$$

3.1.1.4.e) Salame piccante

(a) contaminato con *S. Typhimurium*

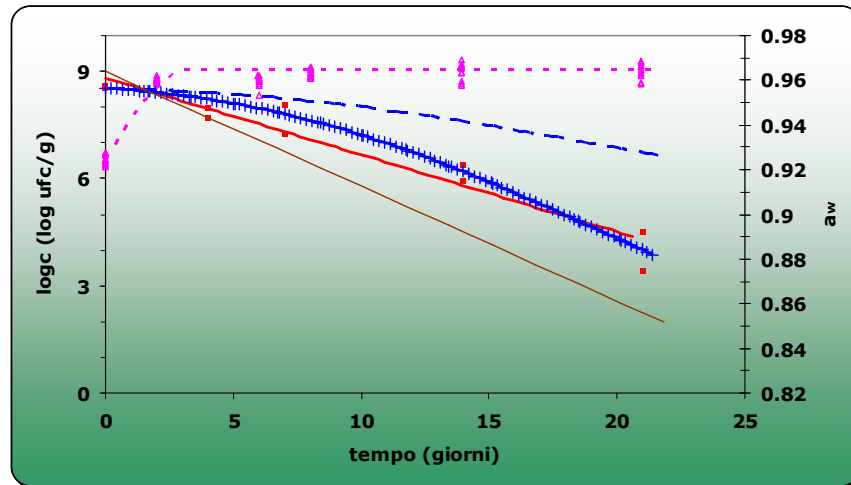


Fig. 41: Confronto fra predizione e risultati osservati nella contaminazione sperimentale del Salame piccante, durante il processo di stagionatura, utilizzando un singolo ceppo di *S. Typhimurium* (Ss_At), Ss.

Linea marrone continua (—): a_w (varia al variare del tempo, ambiente dinamico).
Quadrati e linea continua rossi (■, —): valore di $\log c$ di Ss osservato e il loro *fit* lineare.

Triangoli e linea punteggiata rosa (Δ , - -): valore di $\log c$ di LAB osservato e il loro *fit* bi-fasico.

Linea tratteggiata blu (- -): predizione del $\log c$ di *S. Typhimurium* generata da un modello dinamico (Cosciani Cunico *et al.*, 2005) dove a_w e/o il pH sono tempo-dipendenti.

Linea blu tratteggiata e crociata (-+- -+-): come sopra, ma le velocità istantanee predette sono modificate, durante la simulazione, da un fattore di correzione *cf* pari a 2.5

La velocità di morte calcolata dalla regressione lineare dei dati osservati è stata, per la popolazione di *S. Typhimurium*, di -0.22 (1/d) con un ES rel di 0.1 ed un ESfit di 0.48. Il D *value* osservato è stato di $4.64d \pm 0.44d$.

pH

Il profilo di pH, rilevato su 15 campionamenti, durante la contaminazione sperimentale, è stato calcolato tramite la regressione lineare dei dati ed espresso da una curva bifasica (eq. 10), che cambia pendenza *break point* (*bp*), dopo 5.54 giorni ed ha un ES di 0.021; ($y = \text{pH}$, $x = \text{tempo (d)}$):

$$\begin{cases} y_1 = -0.13 \cdot x + 5.4 \\ y_2 = 0.024 \cdot x + 5.95 \end{cases} \quad \text{eq. 10}$$

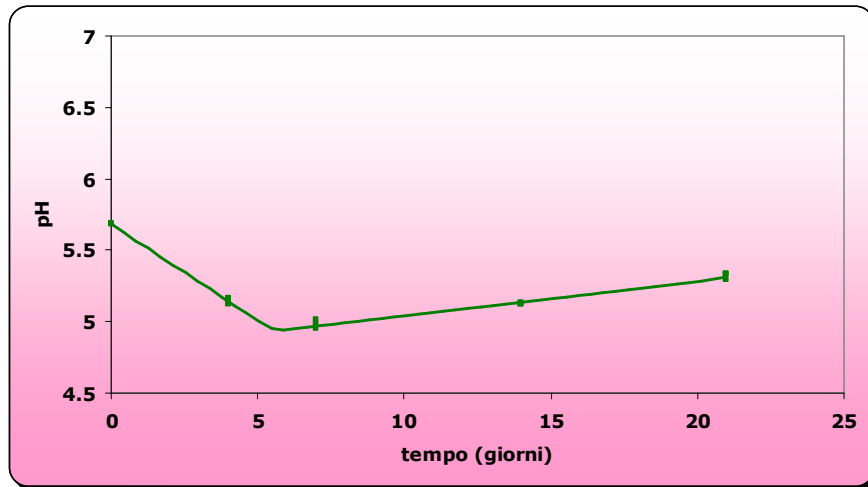


Fig.. 42: **Profilo di pH nel Salame piccante.** Quadrati e linea continua verdi (■,—): valori di pH e la loro regressione lineare bifasica.

a_w

Il profilo di a_w è stato calcolato tramite la regressione lineare dei dati, 15 campionamenti, ed espresso come la retta, con ES di 0.01, descritta nell'(eq. 11); ($y = a_w$, $x = \text{tempo (d)}$):

$$y = 0.957 - 0.0041 \cdot x \quad \text{eq.11}$$

4. CONCLUSIONI

4.1. Risposta microbiologica negli alimenti

Le variabili che modulano l'evoluzione dei microorganismi negli alimenti sono pressoché infinite. Esse dipendono sia dalle caratteristiche del substrato che dai batteri stessi. L'interazione tra microorganismi e matrice alimentare crea quello che in inglese è definito “*food complexity*”. Essi sono entrambi insieme non omogenei che interagiscono fra loro. La cinetica dei microorganismi, infatti, dipende dallo stato fisiologico dei batteri, dalla presenza e interazione tra diverse popolazioni presenti nella matrice alimentare e conseguente produzione di metaboliti e dalle caratteristiche intrinseche ed estrinseche dell'alimento stesso (temperatura, *pH* e *a_w*, disponibilità di ossigeno, presenza di nutrienti conservanti etc.) (Galli Volonterio, 2005). Inoltre, il comportamento dei microorganismi varia contestualmente al variare dei fattori dominanti o secondari che caratterizzano gli alimenti e i loro processi di produzione. Da ciò consegue che per elaborare l'insieme di dati ‘risposta microbiologica/substrato alimentare’ creando relazioni e link tra questi, per qualsiasi fine, analisi del rischio, sicurezza alimentare o standardizzazione di processi, è necessario che i dati raccolti siano archiviati in formati convenzionali in modo che possano essere “computerizzati” e fruibili.

McMeekin e colleghi, in una *review* (2006) dal titolo “*Information system in food management*”, sottolineano che è osservando e gestendo un'enorme quantità “*deluge*” di dati che si possono mettere in relazione informazioni e ottenere risposte che piccole serie di dati isolati raccolti in singoli laboratori, non riuscirebbero a dare.

L'alimentazione di *Combase*, la più grande banca dati mondiale per la microbiologia degli alimenti è stato uno fra i risultati della tesi di dottorato. Sono stati raccolti circa 12.000 *records* attraverso dati microbiologici, chimici e chimico-fisici, generati al Dipartimento di Sicurezza Alimentare dell'IZSLER.

I dati raccolti, durante il progetto di dottorato, su prodotti italiani a base di latte e di carne, riguardanti la microbiologia alimentare, le caratteristiche chimico-fisiche dei prodotti, dei processi

di produzione, costituiscono, infatti, un insieme di informazioni “risposta microbiologica/substrato”, unico per vastità e fruibilità.

4.2. Validazione dei modelli matematici

Attraverso *challenge test* su diversi prodotti a base di latte o di carne, è stata studiata la cinetica di crescita di *L. monocytogenes* a diverse temperature. I dati osservati sono stati confrontati con quelli generati da modelli matematici dinamici, che simulano il comportamento del microorganismo conoscendo i fattori dominanti che caratterizzano il substrato in cui si trova (www.combase.cc).

I modelli di microbiologia predittiva si dividono in due categorie, quelli probabilistici e quelli basati sulla cinetica dei microorganismi. I primi stabiliscono quale è la probabilità che ha un microorganismo di essere presente o di crescere/morire in un substrato. Mentre, i secondi determinano, considerando noto il *logc* iniziale della popolazione batterica, contemplando, o no, la fase di adattamento al substrato, quanto è il *logc* ad un tempo *t* conoscendo le caratteristiche del substrato in cui si trova.

I modelli predittivi dinamici sono sempre conservativi, cioè si basano su risposte microbiologiche generate in brodi di coltura inoculati preferibilmente con ceppi selezionati e adattati per essere resistenti alle variabili esterne estreme. La predizione è considerata *safe* quando, nel caso della crescita batterica, la velocità predetta è maggiore di quella osservata; mentre, nel caso di morte dei microorganismi, quando la velocità di morte predetta è inferiore a quella osservata.

Inoltre, per valutare la dinamica di comportamento di *L. monocytogenes* durante la shelf life di diversi prodotti alimentari, sono stati presi in considerazione modelli predittivi sulla cinetica di comportamento, escludendo la fase lag, al fine di considerare la situazione più rischiosa per il consumatore (tutti i microorganismi sono immediatamente pronti alla duplicazione e la fase di crescita esponenziale è immediata). Il modello predittivo è rappresentativo dei dati sperimentali tanto più il fattore di accuratezza (A_f) è uguale ad 1 ed il bias e la D% a 0 (Baranyi *et al.* 1999).

La matrice alimentare, nel suo complesso, limita la crescita o la morte dei microorganismi in modo tanto più significativo tanto più il valore di A_f si discosta da 1.

In linea con quanto descritto, anche dai dati osservati nelle contaminazioni sperimentali di alimenti che hanno supportato la crescita di *L. monocytogenes* la predizione è risultata *safe* (Fig.re: 15, 17, 19, 21, 23).

Nei prodotti RTE alla temperatura di conservazione di 4°C, il limite di 100ufc/g, stabilito dal regolamento CE 2073/2005, è stato raggiunto dai nervetti cotti e cubettati conservati sottovuoto, con shelf-life di 60gg, dopo circa 15 gg di conservazione (Tab. 4). Nella ricotta salata con shelf-life di 6 mesi, il limite legale, calcolato dalla velocità di crescita iniziale, sarebbe raggiunto dopo circa 60gg (Tab. 5), tuttavia, durante la sperimentazione si è osservato il raggiungimento della fase di *plateaux* dopo circa 25 gg, con una differenza tra il *logc* iniziale e il *logc* a 25 giorni inferiore a 2 log. La concentrazione di *L. monocytogenes*, raggiunta durante la contaminazione sperimentale sulla ricotta salata (a 0°C, 4°C, 8°C), è stata di 2-3 log inferiore a quella trovata nello stesso prodotto durante un'allerta europea del 2008 (Boni, comunicazione personale). Il dato suggerisce che il prodotto sia stato conservato a temperature di abuso termico spinto o che l'ecosistema del prodotto fosse in qualche modo alterato. Infatti, è evidente come la flora lattica sia stata in questo prodotto un forte inibitore per lo sviluppo del patogeno (Fig. 19) (Giraffa *et al.*, 1994).

Anche la discrepanza fra i valori di *logc* di *L. monocytogenes* predetti dai modelli matematici e quelli osservati nelle contaminazioni sperimentali, di Mortadella e Ricotta Salata alle basse temperature, trova una logica spiegazione (Fig.re 15, 19). Nelle condizioni limite “*growth not growth*” del microorganismo in un substrato, infatti, è possibile che la simulazione del modello preveda una crescita del microorganismo quando invece nel challenge test, per differenza di ceppi e di substrato, il *logc* della popolazione non varia sostanzialmente (Baranyi *et al.*, 2001)

Confrontando la velocità di crescita calcolata dal modello predittivo e quella osservata durante le contaminazioni sperimentali, attraverso il calcolo dell'accuratezza dei modelli, è stato evidente come questa fosse molto migliore quando la simulazione, oltre che a

considerare i fattori dominanti presi in considerazione dal modello, contemplasse anche il fattore di correzione proprio dell'alimento (f_{cf}), calcolato empiricamente da sperimentazioni su alimenti appartenenti alla medesima categoria. Il fattore di correzione per la categoria salumi cotti ($f_{cf}=0.5$), sostanzialmente, dimezza la *rate* di *L. monocytogenes* predetta.

L'accuratezza del modello, A_f , calcolata nel *challenge test* di Mortadella a diverse temperature (Fig. 15), è risultata di 1.35 ($bias=0.74$, $D\%=35\%$) (Fig. 16); il modello rappresenta i dati con il 35% di margine di errore, in linea con la discrepanza che si trova tra modello e alimento naturale in letteratura (Pin *et al.*, 1999). Mentre, confrontando i log delle *rate* osservate e quelle predette dal modello nella contaminazione con *L. monocytogenes* di Nervetti conservati a diverse temperature (Fig 17), è evidente che la poca affinità tra modello e dato osservato non dipenda dalla predizione in sé (valida a 4°C e a 20°C) (Fig. 18), ma all'errore del calcolo della velocità di crescita osservata nell'alimento per insufficienti campionamenti nella fase esponenziale di crescita batterica (Tab.4). Il fattore di accuratezza per i Nervetti dove non è contemplato l'effetto della matrice alimentare, è di $A_f=2.63$, $bias=0.47$, dato che si discosta dai dati ritrovati in letteratura. Anche per la ricotta salata lo SE del modello per calcolare la *rate* osservata (SE a 4°C=0.49; SE a 8°C=0.59) (Tab.5) non ha permesso di valutare se il modello fosse rappresentativo dei dati osservati, $A_f=2.84$ $bias=0.23$ (Fig. 19), o se ci fosse un altro fattore nell'alimento in grado di condizionare il comportamento di *L. monocytogenes* in modo costante (Mellefont *et al.*, 2008) (flora indigena, batteriocine) (Fig.20).

Il dato ottenuto calcolando il fattore di accuratezza nella sperimentazione su hamburger di tacchino (Fig. 22) ha evidenziato come, omettendo la fase lag nella simulazione della predizione del comportamento dei microorganismi, si generi una predizione eccessivamente *safe* ($A_f=3.1$, $bias=0.325$) (Fig. 43) e che l'elevata concentrazione di batteri lattici presenti nel prodotto ha creato un fattore di competizione in grado di rallentare la crescita del patogeno (Fig. 21) (Mellefont *et al.*, 2007; Amit *et al.*, 2008).

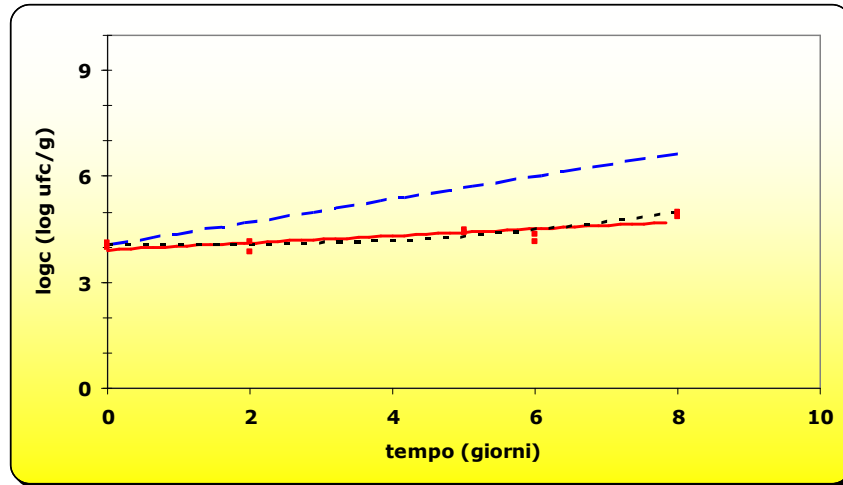


Fig.. 43: **Confronto fra predizione e risultati osservati nella contaminazione di hamburger di tacchino, durante la shelf life 4°C; utilizzando un unico ceppo di *L. monocytogenes* (Lm_At), Lm.**

Quadrati e linea continua rossi (■, —): valore di *logc* di Lm osservato e il loro *fit* lineare.

Linea tratteggiata blu (— —): predizione del *logc* di *L. monocytogenes* generata da un modello secondario (www.combase.cc) con pH di 6.78 e a_w 0.982 (pari ai valori medi nell'alimento addizionati del ES).

Linea punteggiata nera (- - -): come sopra includendo la fase lag nel modello predittivo.

Come intuitivamente si può dedurre, in un alimento precotto, come lo Zampone, la flora indigena è più scarsamente rappresentata (Fig. 23), da ciò consegue che i dati simulati dai modelli predittivi, che contemplano solo i fattori dominanti estrinseci ed intrinseci del prodotto, siano più rappresentativi. Infatti, l' A_f calcolato nello zampone precotto contaminato è risultato di 1.85, con un *bias* di 0.56, dato che si avvicina a quelli trovati in letteratura (Fig.24).

In tutte le sperimentazioni considerate, un abuso termico, anche moderato, ha favorito la crescita di *L. monocytogenes*. La temperatura, infatti, è il fattore dominante in grado di influenzare l'andamento del patogeno, tuttavia nel regolamento comunitario CE 2073/2005, per definire le categorie fra i prodotti RTE che supportano o non supportano la crescita di questo microorganismo, la temperatura non è messa in relazione alle caratteristiche intrinseche del prodotto.

Come riportato da McMeekin nel capitolo “*An Essay on the Unrealized Potential of Predictive Microbiology*”, nel libro edito da McKellar & Lu (2003), i modelli predittivi possono essere, non solo uno strumento utile e rapido nella gestione della sicurezza alimentare per adempiere i requisiti dettati da normative e regolamenti (Daminelli *et al.*, 2007), ma anche un’integrazione sostanziale dei piani di HACCP dei singoli produttori per migliorare o modificare i processi produttivi.

Infatti, i modelli dinamici, dove la *rate* predetta è istantanea, cioè varia al variare dell’ambiente esterno, sono un utile sostegno alla validazione dei processi produttivi. I risultati riportati dalla sperimentazione durante il processo del Grana Padano DOP, in fase di cottura e giacenza sottosiero della cagliata, hanno dimostrato come il profilo termico generi un abbattimento di 7 cicli logaritmici in circa 5 ore e mezza (Ahmed *et al.*, 1990), modificando la temperatura del processo si può valutare fino a che il rapporto tempo temperatura generi una predizione *safe* (Fig.25).

Mentre modelli matematici che descrivono il comportamento dei microorganismi in funzione del profilo termico sono descritti più frequentemente in letteratura (Baranyi and Roberts, 1994 b, Baranyi and Roberts, 1995, Ratkowsky *et al.*, 1982, Radovan *et al.*, 2008), modelli dinamici che predicono la morte dei microorganismi in funzione di fattori secondari quali a_w e pH sono più rari (Carrasco *et al.*, 2006; Cosciani Cunico *et al.*, 2005). Tuttavia, in un ambiente controllato, in cui il *range* delle variabili esterne è limitato, il modello generato durante il progetto di dottorato sulla sopravvivenza di *E. coli* O157:H7 in funzione di pH e a_w è risultato robusto (R^2 (adj) 0.86) e con una discrepanza accettabile (14%) per la predizione di questo patogeno in alimenti che devono la stabilità alla fermentazione e all’abbassamento di a_w (eq 1).

I modelli sulla sopravvivenza di *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium*, *E. coli* O157:H7, in funzione della temperatura, pH acido e scarsa disponibilità di a_w , sono stati validati su cinque tipi di salami, differenti per ingredienti, tecnologia, e processo di produzione (www.ars-alimentaria.it).

Per *L. monocytogenes* la predizione è risultata *un-safe* in tutte le tipologie di prodotto, l’alimento ha creato un fattore di protezione per

questo patogeno (gram+), mentre per *Escherichia coli* O157:H7 e *Salmonella* Typhimurium (gram-), la predizione generalmente è stata una *safe prediction* (Fig.re 26-28,30-32, 34, 35, 37-39, 40).

La riduzione logaritmica osservata, calcolata dalla differenza del logc iniziale e del logc al momento in cui il prodotto può essere messo in commercio, è risultata per *E. coli* O157:H7 di 2.85 ± 0.75 , per *S. Typhimurium* 2.98 ± 1.15 , in linea con i dati in letteratura (Ellajosyula *et al.*, 1998, Hinkens *et al.*, 1996, Faith *et al.* 1997, Clavero *et al.*, 1996, Pond *et al.*, 2001) e per *L. monocytogenes* 0.5 ± 0.3 .

I dati osservati, rapportati ai valori ottenuti dalla simulazione del modello predittivo, hanno evidenziato come il fattore moltiplicativo della *rate* c_f , che sostanzialmente è l'indice di quanto la matrice alimentare nella sua complessità influenzi il comportamento del microorganismo rispetto al brodo di coltura, corregga il fattore di accuratezza del modello in modo sensibile. Infatti, il modello predittivo per la sopravvivenza di *L. monocytogenes* passa da $A_f=3.52$ con *bias* di 0.29 ad $A_f=1.26$ con *bias* di 0.9; per la sopravvivenza di *S. Typhimurium* da $A_f=1.61$ con *bias* di 1.41 ad $A_f=1.21$ con *bias* di 1.05 e per la sopravvivenza di *E. coli* O157:H7 da $A_f=1.77$ con *bias* di 1.47 ad $A_f=1.0821$ con *bias* di 0.97 (Figure 44, 45, 46)

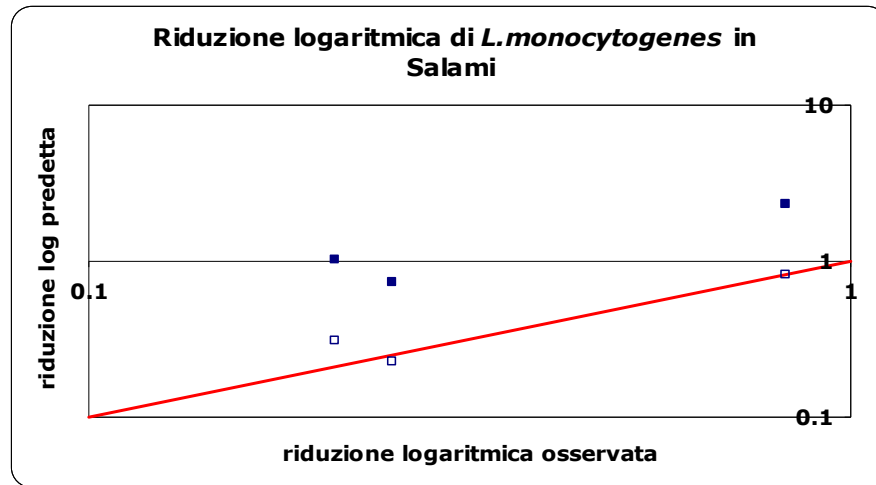


Fig.. 44: **Effetto del fattore di correzione, sulla deviazione dei dati, osservati e predetti, rispetto alla linea di equivalenza, per la sopravvivenza di *L. monocytogenes* in diversi salami.**

Quadrati blu pieni (■): differenza, su scala logaritmica, tra il logc iniziale e i logc al tempo di commercializzazione osservato sperimentalmente e predetto dal modello, in diverse tipologie di salami.

Quadrati blu vuoti (□): come sopra ma modificando il modello con il fattore di correzione.

Il fattore di correzione per questo prodotto è circa costante, la media geometrica è risultata di 0.38.

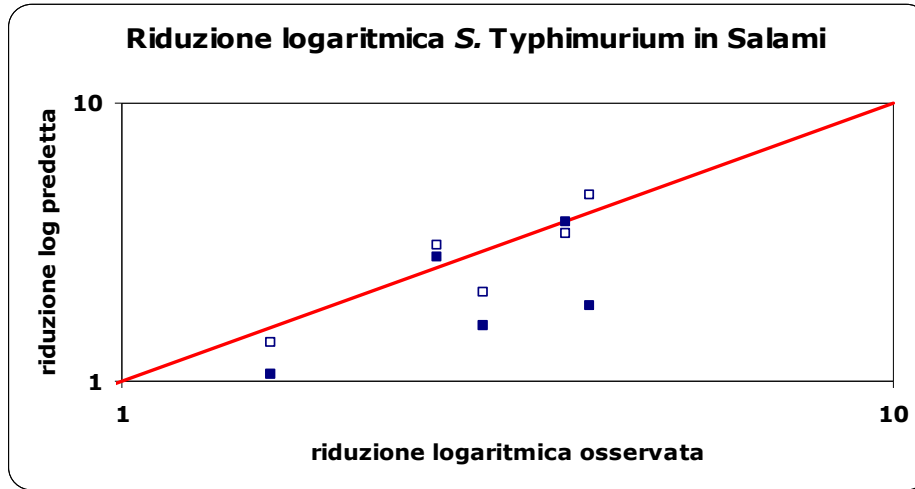


Fig.. 45: **Effetto del fattore di correzione, sulla deviazione dei dati, osservati e predetti, rispetto alla linea di equivalenza, per la sopravvivenza di *S. Typhimurium* in diversi salami.**

Quadrati blu pieni (■): differenza, su scala logaritmica, tra il logc iniziale e i logc al tempo di commercializzazione osservato sperimentalmente e predetto dal modello, in diverse tipologie di salami.

Quadrati blu vuoti (□): come sopra ma modificando il modello con il fattore di correzione.

Il fattore di correzione per questo prodotto è variato da 0.9 a 2.5 con una media geometrica di 1.34

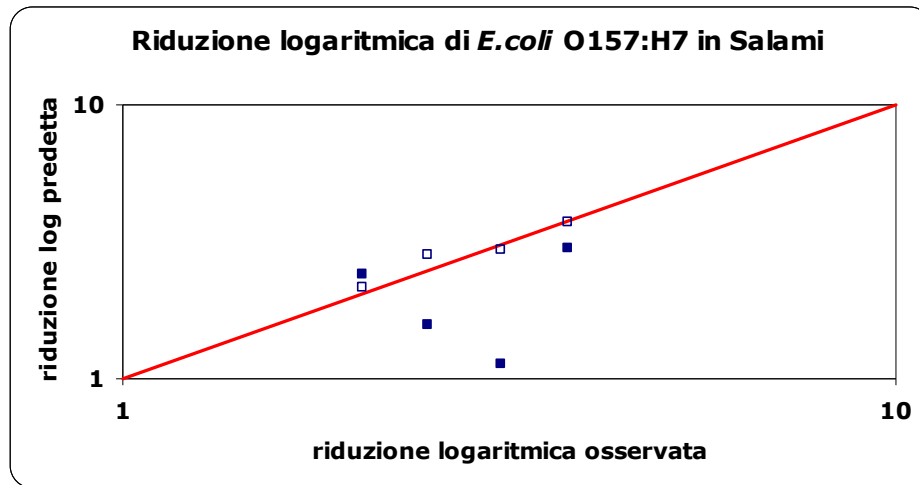


Fig. 46: Effetto del fattore di correzione, sulla deviazione dei dati, osservati e predetti, rispetto alla linea di equivalenza, per la sopravvivenza di *E. coli* O157:H7 in diversi salami.

Quadrati blu pieni (■): differenza, su scala logaritmica, tra il logc iniziale e i logc al tempo di commercializzazione osservato sperimentalmente e predetto dal modello, in diverse tipologie di salami.

Quadrati blu vuoti (□): come sopra ma modificando il modello con il fattore di correzione.

Il fattore di correzione per questo prodotto è variato da 0.8 a 2.5 con una media geometrica di 1.34. Una spiegazione alla marcata diminuzione del logc di *S. Typhimurium* nel salame piccante (Fig. 41), potrebbe derivare dall'effetto peperoncino piccante (*Capsicum annum*) utilizzata nell'impasto, che se pur potrebbe essere vettore di tale patogeno, (Hara-Kudo *et al.*, 2006) sembrerebbe avere effetti negativi per la sua sopravvivenza (Davidson *et al.*, 2001)

I modelli dinamici si sono dimostrati validi per predire la sopravvivenza di *L. monocytogenes*, *S. Typhimurium* ed *E. coli* O157:H7, tre tra i più significativi patogeni di origine alimentare, in prodotti a base di carne che devono la propria stabilità alla fermentazione e alla riduzione di acqua libera durante la stagionatura (Pin *et al.*, 1999); la media geometrica dei c_f , calcolata durante la validazione dei modelli, potrebbe essere considerata il fc_f per questa categoria alimentare.

4.3. Prospettive future

La microbiologia predittiva è una scienza quantitativa basata sulla risposta dei microorganismi in funzione del substrato dove si trovano; i modelli matematici sono uno strumento per velocizzare le decisioni che la gestione della sicurezza alimentare richiede, e per supportarle. L'utilizzo delle simulazioni generate dai modelli può ridurre i costi che le contaminazioni sperimentali richiedono e può implementare i disegni sperimentali per ottenere dati più significativi.

I modelli dinamici, che descrivono l'evoluzione dei microorganismi al variare delle caratteristiche della matrice alimentare, adattandosi al processo di produzione, potrebbero essere applicati "in linea". Infatti, conoscendo la dinamica di comportamento dei microorganismi di interesse, possono essere modulate la tecnologia o la destinazione del prodotto finito (Fig. 47).

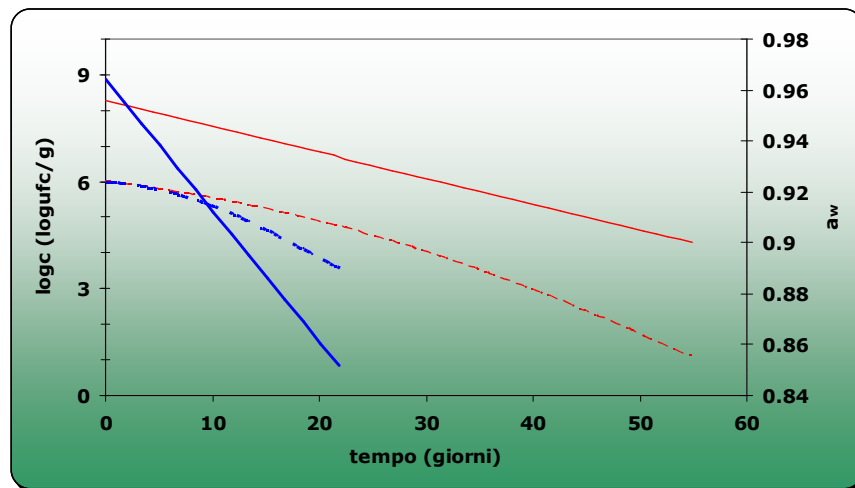


Fig.. 47: **Andamento di *S. Typhimurium* predetto in due tipologie di salami**

Linea continua sottile rossa (—): profilo di a_w nel salame della bergamasca.

Linea continua spessa blu (—): profilo di a_w nel salame piccante.

Linea tratteggiata sottile rossa (- -): predizione del $logc$ di *S. Typhimurium* per il salame della bergamasca.

Linea tratteggiata spessa blu (- -): predizione del $logc$ di *S. Typhimurium* nel salame piccante.

Tuttavia la microbiologia predittiva non è un'arte magica. I modelli vanno usati con cognizione di causa, solo in *range* controllati dove la dinamica di comportamento dei microorganismi è definita.

Anche se i mezzi informatici e i *software* di microbiologia predittiva sono di facile consultazione ed immediati, l'applicazione, la validazione di modelli matematici e l'interpretazione corretta dei dati, necessita di un'approfondita conoscenza della tecnologia e della microbiologia alimentare. Le caratteristiche estrinseche ed intrinseche dei prodotti alimentari e l'accuratezza nella descrizione dei processi produttivi sono informazioni indispensabili per poter valutare quali siano effettivamente in quel substrato i fattori dominanti in grado di modulare il comportamento dei microorganismi.

La prospettiva futura è quella di poter inserire nei modelli predittivi anche il fattore di biocompetizione e di poter quantificare quanto la struttura della matrice alimentare influenzi la dinamica del comportamento degli stessi.

L'approccio dinamico dei modelli applicati ai salumi può essere considerato anche per altre categorie di prodotti dove il profilo di pH e a_w varia nel tempo, come ad esempio, nel Taleggio (Fig. 48).

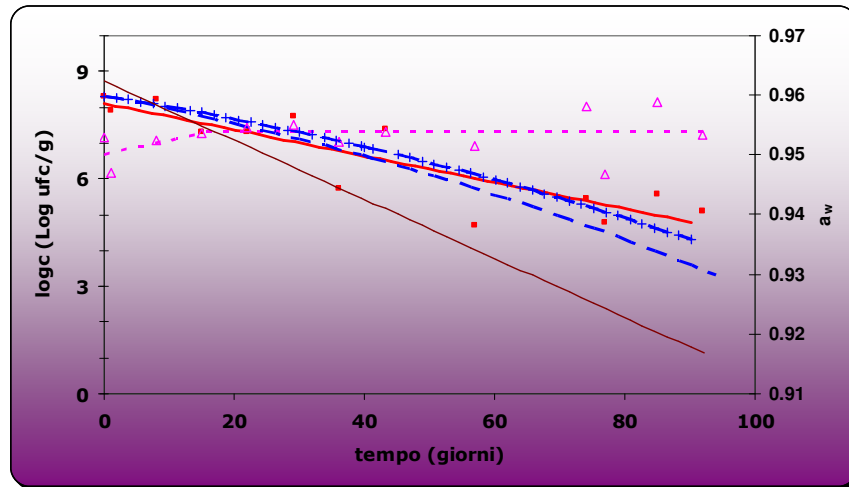


Fig. 48: **Confronto fra predizione e risultati osservati nella contaminazione sperimentale di Taleggio DOP, durante il processo di stagionatura, utilizzando una miscela di ceppi di *E. coli* (*Ec_At*, *Ec_d1*, *Ec_2*), *Ec*.**

Linea marrone continua (—): a_w (varia al variare del tempo, ambiente dinamico).
Quadrati e linea continua rossi (■, —): valore di $logc$ di *Ec* osservato e il loro *fit* lineare.

Triangoli e linea punteggiata rosa (Δ , - -): valore di $logc$ di LAB osservato e il loro *fit* bi-fasico.

Linea tratteggiata blu (- -): predizione del $logc$ di *E. coli* generata da un modello dinamico (elaborato nella tesi) dove a_w e/o il pH sono tempo-dipendenti.

Linea blu tratteggiata e crociata (-+- -+-): come sopra, ma le velocità istantanee predette sono modificate, durante la simulazione, da un fattore di correzione *cf* pari a 1.1

5. RINGRAZIAMENTI

Ringrazio il Prof. Sansebastiano per avermi incoraggiato a proseguire gli studi e per essere sempre stato presente in tutti questi anni.

Ringrazio il Dr. Boni per avermi dato la possibilità di intraprendere un percorso formativo così interessante e stimolante e per avermi istruito, ascoltato e corretto con pazienza ed interesse.

Ringrazio il Dr. Baranyi per tutto quello che mi ha insegnato in questi anni e per la sua disponibilità incondizionata.

Ringrazio la Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche nelle persone del Prof. Lodetti, Dr. Capretti e Prof. Gualandi, per aver finanziato i miei studi.

Ringrazio i miei colleghi, vicini e lontani, perché senza i loro consigli e il loro aiuto non avrei portato a termine il progetto di dottorato. In particolare ringrazio Paolo e Guido, Francesca, Paola, Stefania, Ale, Silavana, Renato, Laura, Silvia, Emanuela, Federica, Franca, Sonia, Emanuela, Monica, Fausto, Rosanna, Anna, Silvia, Yvan che pur di aiutarmi sta imparando l'italiano, Elena la mia sorella spagnola, Carmen, Susie, Aline, Maria.

Ai miei genitori i più grandi sostenitori, i miei ringraziamenti più affettuosi.

Ai miei fratelli, alla mia famiglia allargata, ai miei amici e alle mie amiche più cari un ringraziamento un ringraziamento speciale per l'affetto con cui mi hanno incoraggiato in questi anni

Dedico a Michele e ai nostri bambini questo lavoro, non ce l'avrei mai fatta senza di loro.

6. BIBLIOGRAFIA

- Ahmed EY and Marth EH (1990) Fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of Parmesan cheese *J Dairy Sci* 73:3351-3356
- Amit P, Labuza TP, Diez-Gonzalez F (2008) Evaluating the growth of *Listeria monocytogenes* in refrigerated ready-to-eat frankfurters: influence of strain, temperature, packaging, lactate and diacetate, and background microflora *J Food Prot* (71) 9:1806-1816
- Baranyi J & Roberts TA (1994b) A dynamic approach to predicting bacterial growth in food, *Int J. Food Microbiol* 23: 277-294
- Baranyi J (2003) International Master in Food Safety of Animal Products, Bologna, Italia
- Baranyi J and Pin C (2001) A parallel study on modelling bacterial growth and survival curves, *J Theor Biol* 210: 327-336
- Baranyi J and Roberts TA (1995b) Mathematics of predictive food microbiology, *Int J Food Microbiol* 26: 199-218
- Baranyi J and Roberts TA (2000) Principles and application of predictive modelling of the effects of preservation factors on micro-organisms. In: *The microbiological safety and quality of foods*. Ed. Lund B, Baird-Parker and Gould G., Aspen Publishers Inc
- Baranyi J and Roberts TA (2004) Predictive Microbiology–Quantitative Microbial Ecology, *Culture* 25:16-19
- Baranyi J and Tamplin M (2004) ComBase: A Common Database on Microbial Responses to Food Environments, *J Food Prot*, (67) 9: 1834-1840
- Baranyi J, Pin C, Ross T (1999) Validating and comparing predictive models, *Int J Food Microbiol* 48 159-166
- Baranyi J, Roberts TA (1994) An approach to predicting bacterial growth in food, *Int J. Food Microbiol* 23: 277-294
- Baranyi J, Roberts TA and McClure PJ (1993) A non-autonomous differential equation to model bacterial growth, *Food Microbiol* 10: 43-59
- Baranyi J, Robinson TP, Kaloti A, Mackey BM (1995a) Predicting growth of *Brochothrix thermosphacta* at changing temperature, *Int J Food Microbiol* 27(1):61-75

- Baranyi J, Ross T, Roberts TA and McMeekin T (1996a) The effects of overparameterisation on the performance of empirical models used in Predictive Microbiology, *Food Microbiol* 13: 83-91
- Baranyi J., Gibson A. M., Pitt J. I., Eyles M. J., and Roberts T. A. (1996). Predictive models as means of measuring the relatedness of some *Aspergillus* species, *Food Microbiol* 14, 347-351.
- Bigelow WA (1921) Logarithmic nature of thermal death curves. *Journal of Infectious Diseases* 29, 538
- Boni P, Colombo S, Bonometti E (1996) Presenza di *Escherichia coli* O157:H7 (VTEC) in alimenti di origine animale, *Atti della Società Italiana delle Scienze Veterinarie* (L) Perugia, 25-28 settembre
- Boni P, Daminelli P, Cosciani Cunico E, Monastero P, Bertasi B, Rossi F, Bornati L (2004) Analysis of *Listeria monocytogenes*, *Salmonella typhimurium* and *enteritidis* and *Staphylococcus aureus* death rate in Grana Padano DOP cheese, *Veterinary Public Health and food Safety* Roma 22-23 Novembre
- Brown D (1993) *Models in biology: mathematics, statistic, and computing* Ed. da John Wiley & Sons Ltd
- Buchanan RL, Smith JL and Long W (2000) Microbial risk assessment: dose-response relations and risk characterization, *Int J of Food Microbiol* 58: 159-172
- Cantoni C, Comi G. Valenti M (1988) Attualità su *L. monocytogenes* nei formaggi, *Ind Alim* 27: 266
- Carrasco E, Garcia-Gimeno R, Seselovsky R, Valero A, Perez F, Zurera G, Todd E (2006) Predictive model of *Listeria Monocytogenes* growth rate under different temperatures and acids, *Food science and technology international* (12) 1: 47-56
- Clavero MR and Beuchat LR (1996) Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in broth and processed salami as influenced by pH, water activity, and temperature and suitability of media for its recovery, *Appl Environ Microbiol* 62(8): 2735-2740
- Cosciani Cunico E (2006a) Use of predictive microbiology to describe pathogens behaviour in typical Italian foods. The 11th workshop on developments in the Italian PhD research in food and science and technology. 27 -29 Sept Università di Teramo, Mosciano Sant'Angelo, Italy

- Cosciani Cunico E (2008a) Use of predictive microbiology to describe pathogens behaviour in typical Italian foods. *The 13th workshop on developments in the Italian PhD research in food and science and technology and biotechnology*, 10-12 Sept Centro Ricerche Soremartec Ferrero Alba (CN)
- Cosciani Cunico E, Bonometti E., Finazzi G, Daminelli P (2008b) Survival of *Salmonella typhimurium* in some Italian meat products. *The 21th International ICFMH Symposium Evolving microbial food quality and safety* 1 - 4 Sept Aberdeen Scotland
- Cosciani Cunico E, Bonometti E, Finazzi G (2008c) Validation of *Listeria* predictive growth model with Italian meat product, The 21th International ICFMH Symposium Evolving microbial food quality and safety 1 - 4 Sept 2008 Aberdeen Scotland
- Cosciani Cunico E, Daminelli P, Boni P, Baranyi J (2004a) Predicting the survival of *Salmonella* in Italian salami , 2nd *Central European Congress of Food*, Budapest 26-28 Aprile
- Cosciani Cunico E, Finazzi G, Abrati F, Bonometti E, Daminelli P, Monti A, Bortolotti M, Boni P (2004b) *L. monocytogenes*, *E. coli* O157:H7, *S. dublin* e *S. typhimurium* nel salame della bergamasca: calcolo del D value e validazione del modello predittivo VI° *Convegno nazionale SiDiLV* Abano (PD)
- Cosciani Cunico E, Le Marc Y, Daminelli P, Boni P, Baranyi J (2006b) Development and Validation of a Model for the Survival of *Salmonella* spp in Italian Salami, *The 20th International ICFMH Symposium food safety and food biotechnology: diversity and global impact* 29 Aug - 02 Sept 2006 Alma Mater Studiorum, Bologna, Italy
- Cosciani Cunico E, Monastero P, Finazzi G, Daminelli P, Boni P, Le Marc Y, Baranyi J (2005) Concetti di microbiologia predittiva: sopravvivenza di *Salmonella* spp. nel salame, *Industrie Alimentari* (44): 1-10
- Cowden JM, O'Mahony M, Bartlett CL, Rana B, Smyth B, Lynch D, Tillett H, Ward L, Roberts D, Gilbert RJ (1989) *Epidemiol Infect*, 103(2):219-225
- Daminelli P, Bertasi B, Finazzi G, Losio MN, Boni P, Cosciani Cunico E (2007) *Listeria monocytogenes* in alimenti ready-to-eat la normativa comunitaria e la regolamentazione per l'esportazione verso gli USA, *Industrie Alimentari* (XLVI): 1-6

- Daminelli P, Finazzi G, Cosciani Cunico E, Losio MN, Bertasi B, Boni P (2008) Sicurezza alimentare: compiti, ruolo e strumenti del veterinario ispettore negli stabilimenti di trasformazione, *Industrie Alimentari* XLVII: 148-143
- Daminelli P, Losio NM, Abrati F, Bonometti E, Bornati L, Cosciani Cunico E, Monastero P, Panteghini C, Boni P (2004) Dinamica della sopravvivenza di *Salmonella enteritidis* e *Salmonella typhimurium* nella tecnologia del salame al peperoncino artificialmente contaminato V° *Convegno nazionale SiDiLV* Pisa
- Danielsson Tham ML, Eriksson E, Helmersson S, Leffler M, Ludtke L, Steen M, Sorgjerd S, Tham W (2004) Causes Behind a Human Cheese-Borne Outbreak of Gastrointestinal Listeriosis, *Foodborne Pathogens and Disease* 1(3): 153-159
- Davidson PM (2001) Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*, 2nd Ed (MP Doyle, LR Beuchat and TJ Montville, eds) pp 602–603, ASM Press, Washington, DC
- Ellajosyula KE, Doores S, Mills EW, Wilson RA, Anantheswaran RC, Knabel SJ (1998) Destruction of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhimurium* in Lebanon bologna by interaction of fermentation, pH, heating temperature, and time, *J Food Prot* 61(2): 152-157
- Esty JR and Meyer KF (1922) The heat resistance of the spores of *B. botulinus* and allied anaerobes, *J Infectious Diseases* 31:650
- Faith, NG, Parniere N, Larson T, Lorang TD, and Luchansky JB (1997) Viability of *E. coli* O157:H7 in pepperoni during the manufacture of sticks and the subsequent storage of slices at 21, 4 and –20°C under air, vacuum and CO₂, *Int J Food Microbiol* 37:47-54
- FAO/WHO (2004) Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready to eat foods. Technical Report, *Microbiological Risk Assessment Series* 5 1726 5274
- Finazzi G, Daminelli P, Cosciani Cunico E, Bonometti E (2008) Behaviour of *Listeria monocytogenes* in sliced Mortadella stored at different temperature in presence of sodium lactate. *The 21th International ICFMH Symposium Evolving microbial food quality and safety* 1 - 4 Sept Aberdeen Scotland
- FSIS (2001) Performance Standards for the Production of Processed Meat and Poultry Products 66 FR 12590

- Galli Volonterio A (2005) *Microbiologia degli alimenti*. Casa Editrice Ambrosiana Milano
- Genegeorgis C, Carniciu M, Dutulescu D, Farver TB (1991) Growth and survival of *Listeria monocytogenes* in market cheeses stored at 4 to 30°C. *J Food Prot* 54(9): 662-668
- Gerner-Smidt P, Whichard JM (2008) Foodborne disease trends and reports, *Foodborne Pathog Dis* 5: 551-4
- Gibson A M, Baranyi J, Pitt I, Eyles M J and Roberts (1994) Predicting fungal growth: the effect of water activity on four species of *Aspergillus*, *Int J Food Microbiol* 23: 419-431
- Gibson AM, Bratchell N and Roberts TA (1988) Predicting microbial growth: growth responses of salmonellae in a laboratory medium as affected by pH, sodium chloride and storage temperature, *Int J Food Microbiol* 6: 155-178
- Giraffa G, Neviani E, Torri Tarelli G (1994) Antilisterial activity by Enterococci in a model predicting the temperature evolution of Taleggio, an Italian Soft cheese, *J Dairy Sci* 77: 1176-1182
- Glass KA, Kaufman KM, Johnson EA (1998) Survival of bacterial pathogens in pasteurized process cheese slices stored at 30°C, *J Food Protect* 61:290-294
- Hara-Kudo Y, Ohtsuka K, Onoue Y, Otomo Y, Furukawa I, Yamaji A, Segawa Y, Takatori K (2006) Salmonella Prevalence and Total Microbial and Spore Populations in Spices Imported to Japan, *Int Association for Food Protection* 69: 2519-2523
- Hinkens JC, Faith NG, Lorang TD, Bailey P, Buege D, Kaspar C, Luchansky JB (1996) Validation of pepperoni processes for control of *E. coli* O157:H7. *J Food Prot* 59 (12): 1260-66
- ISO 11290-2 1998 / Amendment 1 (2004). Modification of the enumeration medium, *ISO*, Geneva
- Le Marc Y, Huchet V, Bourgeois CM, Guyonnet, J P, Mafart P, Thuault D (2002) Modelling the growth kinetics of *Listeria* as a function of temperature, pH and organic acid concentration. *Int J Food Microbiol* 73, 219-237

- Luzzi I, Galetta P, Massari M, Rizzo C, Dionisi AM, Filetici E, Cawthorne A, Tozzi AE, Argentieri M, Bilei S, Busani L, Gnesivo C, Pendenza A, Piccoli A, Napoli P, Loffredo M, Santarelli E, Ciofi Degli Atti ML (2007) An Easter outbreak of *Salmonella typhimurium* DT 104A associated with traditional pork salami in Italy, *Eurosurveillance*.(12) 4:702
- Manzoni M (2006) *Microbiologia industriale* Casa Editrice Ambrosiana, Milano
- McKellar RC, and Lu (2003) In: *McKellar RC and Lu X Modelling Microbial responses in Foods*. CRC, Boca Raton, Fla
- McMeekin TA (2003) An Essay on the Unrealized Potential of Predictive Microbiology. In: *McKellar RC and Lu X Modelling Microbial responses in Foods*. CRC, Boca Raton, Fla.
- McMeekin TA, Baranyi J, Bowman J, Dalgaard P, Kirk M, Ross T, Schmid S, Zwietering MH (2006) Information System in food safety management, *Int. J. Food Microbiol.* 112:181-194
- McMeekin TA, Olley JN, Ross T and Ratkowsky DA (1993) *Predictive Microbiology*, John Wiley & Sons Ltd Chichester, UK
- Mellefont LA, McMeekin TA, Ross T (2008) Effect of relative inoculum concentration on *Listeria monocytogenes* growth in coculture *J Food Microbiol* 112(2): 157-168
- Mellefont LA, Ross T (2007) Effect of potassium lactate and potassium lactate-sodium diacetate blend on *Listeria monocytogenes* in modified atmosphere packaged sliced ham, *J Food Prot* 70(10): 2297-2305
- Nauta M (2002) Modelling bacterial growth in quantitative microbial risk assessment. Is it possible?, *Int J of Food Microbiol* 38: 45-54
- Oliver SP, Jayarao BM, Almeida RA (2005) Foodborne pathogens in milk and the dairy farm environment: food safety and public health implications, *Foodborne Pathog Dis.* 2:115-129
- Pin C, Sutherland JP, Baranyi J (1999) Validating predictive models of food spoilage organisms, *J Appl Microbiol* 87: 491-499
- Pond TJ, Wood D, Mumin I, Barbut S, Griffiths MW. (2001) Modeling *E coli* 0157:H7 survival in uncooked, semi-dry fermented sausage. *J Food Prot* 64:759-766

- Pontello M, Sodano L, Nastasi A, Mammina C, Astuti M, Domenichini M, Belluzzi G, Soccini E, Silvestri MG, Gatti M, Gerosa E, Montagna A (1998) A community-based outbreak of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium associated with salami consumption in Northern Italy, *Epidemiology And Infection*, Cambridge University Press, (120)3:209-214
- Radovan G, Kreyenschmidt J, Bruckner S (2008) Mathematical modelling for predicting the growth of *Pseudomonas* spp. in poultry under variable temperature conditions, *Int J Food Microbiol* (127) 3: 290-297
- Ramsaran H, Chen J, Brunke B, Hill A, and Griffiths MW (1998) Survival of bioluminescent *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157-H7 in soft cheeses, *J Dairy Sci* 81:1810-1817
- Ratkowsky DA (2004) Model fitting and uncertainty, In: McKeller RC, Lu X *Modeling Microbial Responses in Foods*. CRC Press, Boca Raton, USA, 63–150
- Ratkowsky DA, Lowry RK, McMeekin TA, Stokes AN, Chandler RE (1983) Model for bacterial culture growth rate throughout the entire biokinetic temperature range, *J Bacteriol* 154: 1222-1226
- Ratkowsky DA, Olley J, McMeekin TA, Ball A (1982). Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures, *J Bacteriol* 149: 1-5
- Reg. (CE) n. 178/2002 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 28 gennaio 2002 che stabilisce i principi generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare - *GUCE* 1.2.2002 L 31/1
- Reg. (CE) n. 2073/2005 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 15 novembre 2005 relativo ai criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari - *GUCE* 22.12.2005 L 338/1
- Reg. (CE) n. 854/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 29 aprile 2004 che stabilisce norme specifiche per l'organizzazione dei controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano, come modificato dal Reg. (CE) n. 1663/2006 - *GUCE* 25.6.2006 L 226/83
- Ross T, Dalgaard P (2003) Secondary models. In: McKeller RC, Lu X, *Modeling Microbial Responses in Foods*, CRC Press, Boca Raton, USA: 63–150
- Ross T, McMeekin T, Baranyi J (2000) Predictive microbiology and food safety *In: Encyclopedia of food microbiology*, Ed. Robinson R, Batt CA, Patel PD Academic Press, London

Ross T, McMeekin TA (1994) Predictive microbiology – a review, *Int J Food Microbiol* 23:241-264

Rosso L, Lobry JR, Bajard S, Flandrois JP (1995) Convenient model to describe the combined effects of temperature and pH on microbial growth, *Appl Environ Microbiol* (61) 2: 610-616

Ryser T, Marth EH (1987) Fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of camembert cheese, *J Food Prot* 50 (5): 372-378

SANCO/1628/2008 (2008) Working document, draft of the guidance document on the shelf-life studies for ready-to-eat foods, under regulation (EC) no 2073/2005 of the 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs

Scott WJ (1936) The growth of microorganisms on ox muscle, The influence of water content of substrate on rate of growth at -1 °C, *J Counc Sci Ind Res (Aust)* 9: 177-182

Smulders FJM (2006) *Towards a risk based chain control, Food Safety Assurance and Veterinary Public Health*, Wageningen Academic Publisher, The Netherlands

Tamplin M, Baranyi J and Paoli G (2003) Software programs to increase the utility of predictive microbiology information In: *Modelling Microbial responses in Foods*". Ed. McKellar RC, Lu X, CRC, Boca Raton, Fla.

www.ars-alimentaria.it

www.cdc.gov Centers for Disease Control and Prevention

www.cfsan.fda.gov Center for Food Safety and Applied Nutrition

www.combase.cc.

www.geocities.com/SiliconValley/Network/1032/

www.ifr.ac.uk/safety/dmfit

www.wok.mimas.ac.uk/

Zwietering MH (2008) Simple is not stupid and complex is not always better, *The 21th International ICFMH Symposium Evolving microbial food quality and safety* 1 - 4 Sept Aberdeen Scotland

Zwietering, MH, Jongenburger I, Rombouts FM, and Van't Riet K (1990) Modelling of the bacterial growth curve *Appl Environ Microbiol* 56:1875-1881