

IZS

T E R A M O

/

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"

Il challenge test per *Listeria monocytogenes* alla luce del Regolamento UE 2895/24

*Corso La previsione del rischio Webinar
Camcom Torino
17/06/2026*

Francesco Pomilio
Laboratorio Nazionale di riferimento per *Listeria monocytogenes*
IZSAM Teramo

L'allegato I, capitolo 1 (Criteri di sicurezza alimentare), del regolamento (CE) n. 2073/2005 è così modificato:

1) la voce 1.2 è sostituita dalla seguente:

| Categoria alimentare | Microrganismi/ loro tossine, metaboliti | Piano di campiona- mento | | Limiti | | Metodo d'analisi di riferimento | Fase a cui si applica il criterio |
|---|---|--------------------------------|---|------------------------------|---|------------------------------------|--|
| | | n | c | m | M | | |
| «1.2 Alimenti pronti che costituiscono terreno favorevole alla crescita di <i>Listeria monocytogenes</i> diversi da quelli destinati ai lattanti e a fini medici speciali | <i>Listeria monocytogenes</i> | 5 | 0 | 100ufc/g (*) | | EN/ISO 11290-2 (**) | Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità |
| | | 5 | 0 | Non rilevabile in 25 g (***) | | EN/ISO 11290-1 | Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità |

(*) Questo criterio si applica se l'operatore del settore alimentare che produce gli alimenti è stato in grado di dimostrare, con soddisfazione dell'autorità competente, che il livello di *L. monocytogenes* non supererà il limite di 100 ufc/g durante il periodo di conservabilità degli alimenti. L'operatore può fissare durante il processo limiti intermedi sufficientemente bassi da garantire che il limite di 100 ufc/g non sia superato al termine del periodo di conservabilità degli alimenti.

(**) 1 ml di inoculo viene posto su una piastra di Petri di 140 mm di diametro o su tre piastre di Petri di 90 mm di diametro.

(***) Questo criterio si applica quando l'operatore del settore alimentare che produce gli alimenti non è stato in grado di dimostrare, con soddisfazione dell'autorità competente, che il livello di *L. monocytogenes* non supererà il limite di 100 ufc/g durante il periodo di conservabilità degli alimenti.»;

IZS

T E R A M O

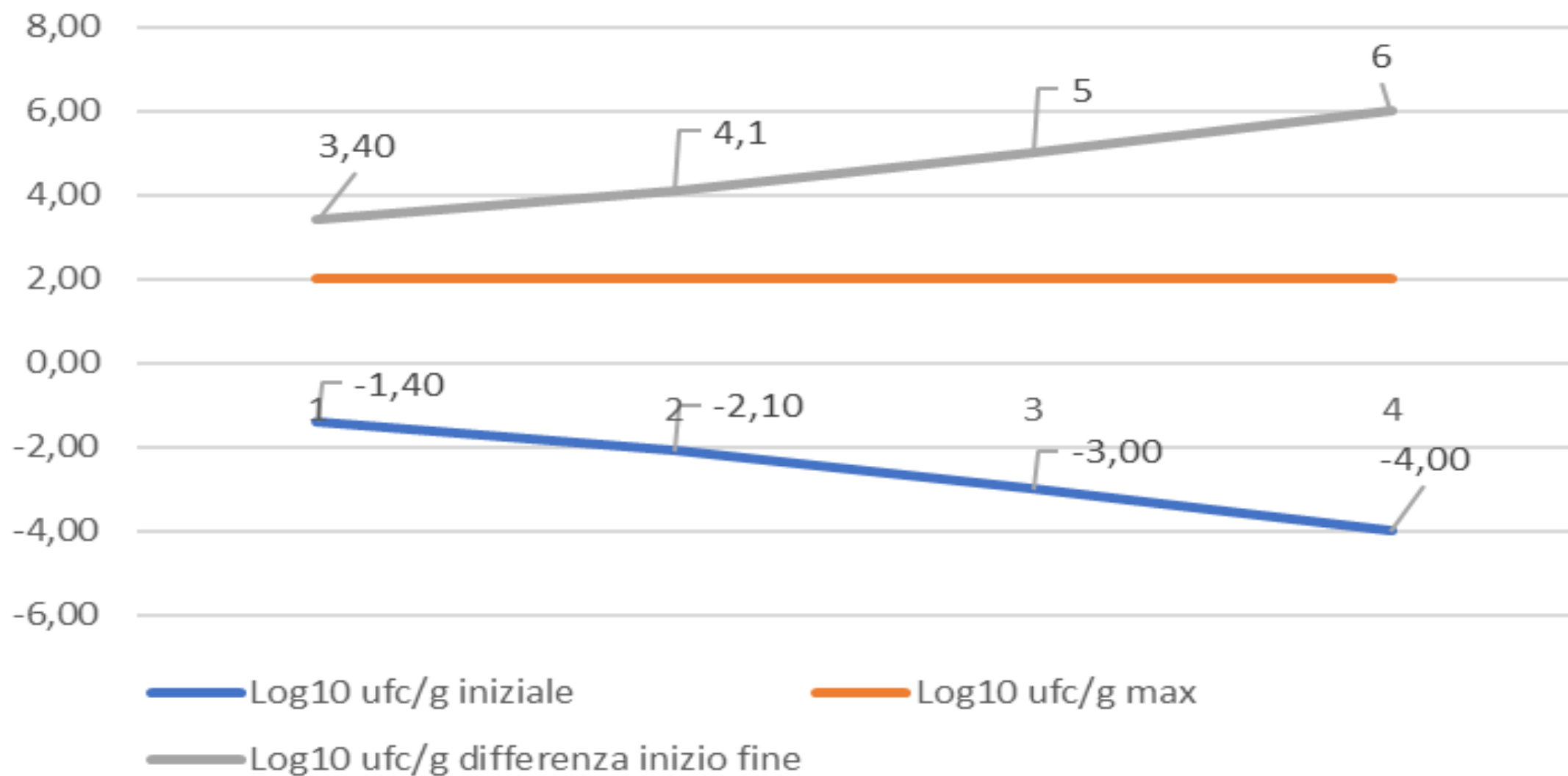
/

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"

Premessa

Perché il legislatore ha inserito questa nuova categoria di criteri relativi agli alimenti pronti che costituiscono terreno favorevole alla crescita di *Listeria monocytogenes* diversi da quelli destinati ai lattanti e ai fini medici speciali

| Risultato in g | Porzione esaminata in g | Log10 ufc/g |
|------------------|-------------------------|-------------|
| Assenza in 25 | 25 g | 1,40 |
| Assenza in 125 | 125 g | 2,10 |
| Assenza in 1000 | 1000 g | 3,00 |
| Assenza in 10000 | 10000 g | 4,00 |



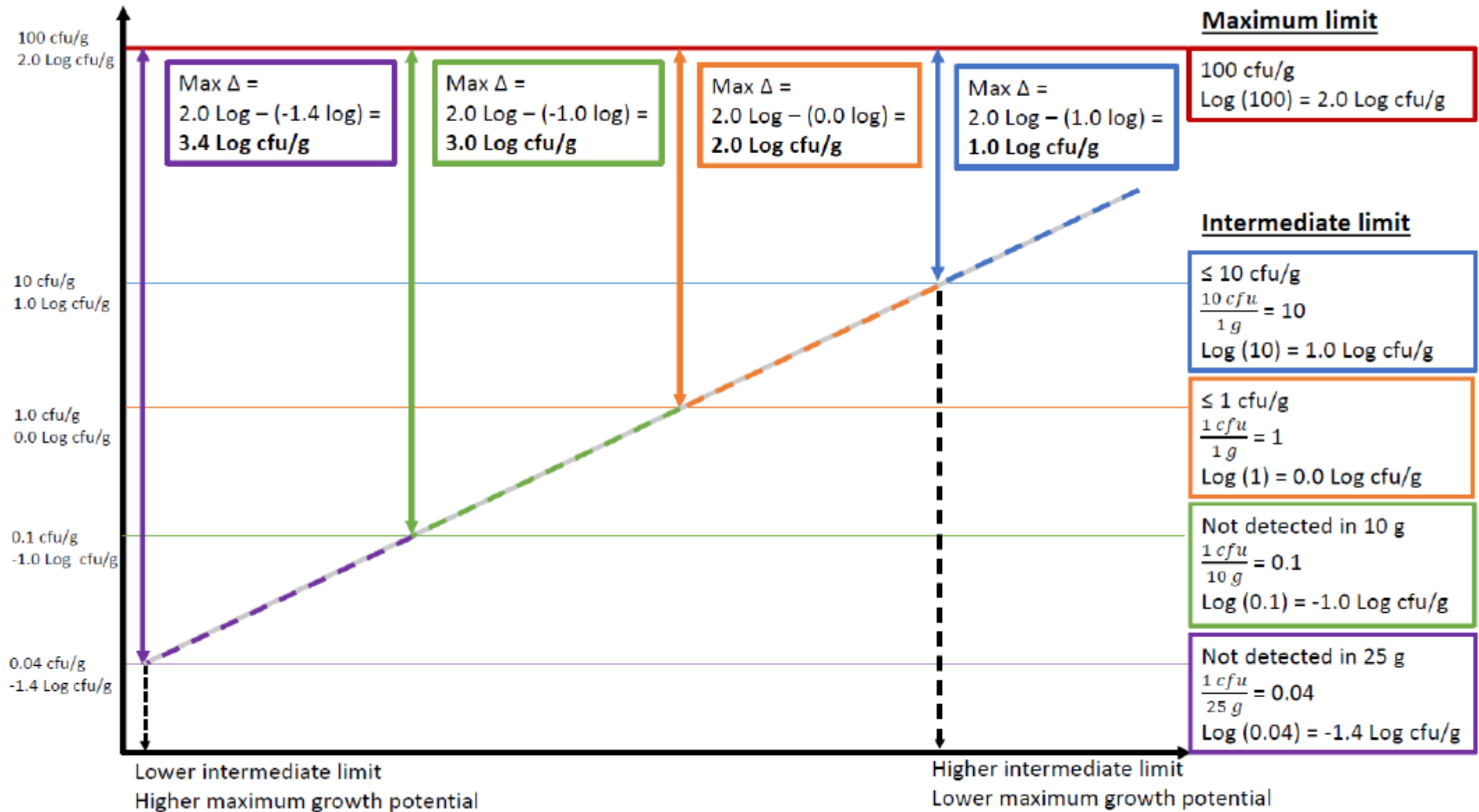


Figure 4. Relation growth potential to possible intermediate limit

- Orientarsi, avere una idea
- **Si PUO'**

| | | | | | |
|--------------------------|------|------|------|------|------|
| Liv iniziale Log10 ufc/g | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| phys state | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Temp °C | 10 | 4 | 4 | 4 | 30 |
| pH | 5 | 7 | 5 | 6 | 5 |
| Aw | 0,99 | 0,99 | 0,99 | 0,99 | 0,99 |
| Replicazione in ore | 15,3 | 18 | 49 | 21,8 | 1,7 |

| | | | | | |
|-------------------------------------|------|------|------|------|------|
| Liv iniziale Log10 ufc/g | 2 | 2 | 2 | 2 | 2 |
| phys state | 1 | 1 | 1 | 1 | 1 |
| Temp °C | 10 | 4 | 4 | 4 | 30 |
| pH | 5 | 7 | 5 | 6 | 5 |
| Aw | 0,99 | 0,99 | 0,99 | 0,99 | 0,99 |
| Replicazione dopo ore | 15,3 | 18 | 49 | 21,8 | 1,7 |
| Numero di replicazioni al giorno | 1,6 | 1,3 | 0,5 | 1,1 | 14,1 |

IZS

T E R A M O

/

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"

Caso reale

- Cosa fare se ho un potenziale di crescita molto vicino a 0,5

IZS

T E R A M O

/

**ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE**
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"

- **I challenge test per Lm costituiscono una parte dei documenti che il produttore deve esibire per dimostrare che la shelf life di un prodotto sia valida**

Documenti di riferimento

- **European Union Reference Laboratory for *Listeria monocytogenes* (EURL Lm). (2025). Set of strains of *Listeria monocytogenes* characterised by their μ_{max} under different broth conditions (Version 2025). Zenodo. <https://doi.org/10.5281/zenodo.15525715>**
- **European Union Reference Laboratory for *Listeria monocytogenes*. 2026. EURL Lm Technical Guidance Document for conducting shelf-life studies on *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods, Version 4, of 01 July 2021 – Amendment 1 of 26 February 2026**
- **EURL Lm Guidance Document to evaluate the competence of laboratories implementing challenge tests and durability studies related to *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. 2023. Version 3 – 10 February 2023**
- **GUIDANCE DOCUMENT on *Listeria monocytogenes* monitoring and shelf-life studies for ready-to-eat foods under Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs**
 - **11. Appendix 1: An example of a FBO documentation checklist to validate the shelf-life of RTE food with respect to *Lm***

Guida EURL Lm per la valutazione della competenza dei laboratori

Contestualmente alla produzione della linea guida EURL *Lm* destinata ai laboratori, l'EURL *Lm* ha prodotto (e poi revisionato negli anni) un documento complementare con l'obiettivo di creare un **approccio armonizzato** a livello europeo per **valutare la competenza dei laboratori che effettuano studi di shelf-life** (test di challenge e studi di durabilità) per conformarsi ai criteri di sicurezza alimentare definiti nel Reg. (CE) n. 2073 / 2005 e s.m.i.

Il documento è destinato ad essere utilizzato:

- dalle Autorità Competenti nazionali (CA),
- NRLs
- altre organizzazioni che sono coinvolte nella valutazione della competenza dei laboratori che effettuano gli studi relativi a *Listeria monocytogenes*.

La valutazione può essere effettuata tramite un audit o sulla base di un **rapporto** di studio di shelf-life.

Competenza dei laboratori che eseguono challenge test

EUURL Lm GUIDANCE DOCUMENT
to evaluate the competence of laboratories
implementing challenge tests and durability studies
related to *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods
Version 3 – 10/02/2023

Hélène Bergis, Ludivine Bonanno, Adrien Asséré, EU Reference Laboratory for
Listeria monocytogenes, ANSES - Food Safety Laboratory, Maisons-Alfort, France

In collaboration with a working group of representatives of National Reference Laboratories (NRLs) for
Listeria monocytogenes:

- Marie Polet, Sciensano (NRL), Belgium
- Toomas Kramareno, Kristjan Soo, Veterinary and Food Laboratory (NRL), Estonia
- Francesco Pomilio, Luigi Iannetti, Gabriella Centorotola, Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise (NRL), Italy
- Taran Skjerdal, Norwegian Veterinary Institute (NRL), Norway
- Regina Heslin, Department of Agriculture, Food and Marine (NRL), Republic of Ireland
- Paul in 't Veld, Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority (NVWA) (c/o NL-NRL), The Netherlands.

- **Versione n.3** della linea guida EUURL Lm, pubblicata a febbraio 2023 (prima versione nel 2012)
- Finalizzata alla valutazione della competenza dei laboratori che eseguono studi di challenge test

Competenza dei laboratori che eseguono challenge test



T E R A M O

/

ISTITUTO
ZOOFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"



- Documento disponibile sul sito
DG-SANTE

EURL *Lm* GUIDANCE DOCUMENT
to evaluate the competence of laboratories
implementing challenge tests and durability studies
related to *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods
Version 3 – 10/02/2023

Hélène Bergis, Ludivine Bonanno, Adrien Asséré, EU Reference Laboratory for
Listeria monocytogenes, ANSES - Food Safety Laboratory, Maisons-Alfort, France

In collaboration with a working group of representatives of National Reference Laboratories (NRLs) for
Listeria monocytogenes:

- Marie Polet, Sciensano (NRL), Belgium
- Toomas Kramarenko, Kristjan Soo, Veterinary and Food Laboratory (NRL), Estonia
- Francesco Pomilio, Luigi Iannetti, Gabriella Centorotola, Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell' Abruzzo e del Molise (NRL), Italy
- Taran Skjerdal, Norwegian Veterinary Institute (NRL), Norway
- Regina Heslin, Department of Agriculture, Food and Marine (NRL), Republic of Ireland
- Paul in 't Veld, Netherlands Food and Consumer Product Safety Authority (NVWA) (c/o NL-NRL), The Netherlands.

https://food.ec.europa.eu/system/files/2023-02/biosafety_fh_mc_guidance-comp-labs.pdf

CONTENT

| | |
|---|----|
| FOREWORD..... | 3 |
| 1. INTRODUCTION | 3 |
| 1.1. Legislative background..... | 3 |
| 1.2. EU Guidance documents..... | 4 |
| 2. SCOPE..... | 5 |
| 3. REFERENCES..... | 6 |
| 4. SHELF-LIFE STUDIES | 8 |
| 4.1. Challenge test assessing the growth potential of <i>Lm</i> | 8 |
| 4.2. Challenge test assessing the maximum growth rate of <i>Lm</i> | 8 |
| 4.3. Durability study | 9 |
| 5. ASSESSMENT OF THE LABORATORY EXPERTISE..... | 10 |
| 5.1. Requirements related to the laboratory..... | 10 |
| 5.1.1. Task of the laboratory | 11 |
| 5.1.2. Review of information from the FBO on the studied product | 11 |
| 5.1.3. Information required before initiating a challenge test / a durability study | 11 |
| 5.2. Drafting of a challenge test report or a durability study report..... | 12 |
| 6. ASSESSMENT OF THE TECHNICAL COMPETENCE OF THE LABORATORY | 13 |
| 6.1. Challenge tests | 13 |
| 6.1.1. Number of batches | 13 |
| 6.1.2. Strains..... | 13 |
| 6.1.3. Preparation of the inoculum..... | 13 |
| 6.1.4. Inoculation of test units..... | 14 |
| 6.1.5. Storage of test units..... | 14 |
| 6.1.6. Physico-chemical measurements of food controls and control units | 15 |
| 6.1.7. Microbiological analyses | 15 |
| 6.1.8. Determination of the growth potential and exploitation of the results | 16 |
| 6.1.9. Determination of the maximum growth rate and exploitation of the results..... | 16 |
| 6.2. Durability studies..... | 17 |
| 6.2.1. Food sampling procedure..... | 17 |
| 6.2.2. Storage conditions and measurements/analyses of food characteristics | 17 |
| 6.2.3. Calculation and exploitation of the results..... | 17 |
| ANNEX 1. Definitions..... | 18 |
| ANNEX 2. Example of a check list to assess the technical competence of the laboratory performing a challenge test | 19 |

Competenza dei laboratori che eseguono challenge test

Competenza dei laboratori che eseguono challenge test

Lo SCOPO principale di questa revisione è quello di:

- **Garantire la coerenza con la nuova versione 4** del documento di orientamento tecnico EURL *Lm* (**EURL *Lm*, 2026**) sui challenge test e sugli studi di durabilità per la valutazione degli studi di shelf-life degli alimenti RTE su *Listeria monocytogenes* (in vigore dal 2021) e **con la nuova norma ISO 20976-1** (in vigore dal 2019)
- **Migliorare il documento** sulla base delle esperienze maturate dalla valutazione degli studi di shelf life.

IZS

T E R A M O

/

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"

Scopo

Il documento deve essere utilizzato dall'Autorità Competente, dal LNR Lm e altre organizzazioni incaricate dalla Autorità Competente o coinvolte nella valutazione di laboratori che conducono studi di shelf life su *Listeria monocytogenes*.

La valutazione potrà essere effettuata tramite un audit o basata sullo studio di un report di un challenge test effettuato dal laboratorio.

Scopo

L'AC può utilizzare questa guida come **STRUMENTO** per valutare l'implementazione della nota n. 5 a piè di pagina riferita al criterio *Lm* del Reg. 2073/2005 che recita così:

*"Questo criterio (1.2 a) si applica se il produttore è in grado di dimostrare, **con soddisfazione dell'autorità competente**, che il prodotto non supererà il limite di 100 ufc/g durante il periodo di conservabilità. L'operatore può fissare durante il processo limiti intermedi sufficientemente bassi da garantire che il limite di 100 ufc/g non sia superato al termine del periodo di conservabilità"*

Competenza dei laboratori che eseguono challenge test: modifiche principali

- In tutto il documento sono state apportate modifiche principalmente per **adeguare le diverse parti** alla nuova versione del TGD (EURL *Lm*, 2026) e dell'ISO (riferimenti, nuovi termini, modifiche alla procedura)
- Si precisa che la valutazione si basa «sulle **capacità/esperienza (expertise)** del laboratorio (personale)» e sulla «**competenza tecnica** (disponibilità di attrezzature, metodi)»
- Il documento è utile per **valutare la validità di un challenge test** (check list in allegato 2)

Requisiti relativi al laboratorio che esegue studi di shelf-life

Conoscenze:

- Microbiologia degli alimenti, processi produttivi, microbiologia predittiva (per quelli che valutano il massimo potenziale di crescita), statistica
- Tutte le norme (Regolamenti, ISO, documenti EURL *Lm*) relativi agli studi di shelf-life

Si raccomanda che il laboratorio sia **accreditato per:**

- Identificazione e numerazione di *Lm* negli alimenti secondo i metodi riportati nel Reg. 2073/2005, art. 5 e al cap. 1 (EN/ISO 11290-1 e EN/ISO 11290-2)
- misurazione dei parametri fisico-chimici e le analisi microbiologiche, come le numerazioni di batteri utili all'interpretazione dei risultati del challenge test

Raccomandazioni per il laboratorio

Se il laboratorio NON E' ACCREDITATO per i metodi di analisi utilizzati nel corso dello studio, deve essere **garantito il livello minimo di assicurazione qualità:**

- documentazione delle buone pratiche di laboratorio,
- eseguire prove di controllo qualità metrologico su tutti gli strumenti (misurazione e taratura degli strumenti)
- partecipazione a Prove Interlaboratorio (Proficiency tests) con esiti soddisfacenti

IZS

T E R A M O

/

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"

Microbiologia predittiva

Per applicare modelli di microbiologia predittiva il laboratorio dovrà possedere la conoscenza di software e la capacità di utilizzarli per l'applicazione sui prodotti oggetto degli studi.

Revisione delle informazioni fornite dall'OSA sul prodotto

L'OSA fornisce al laboratorio i dati sul prodotto (pH, aw, composizione, ecc.)

Laboratorio :

- valutare criticamente le informazioni ricevute
- dovrebbe consigliare sull'opportunità di eseguire **challenge test** o **studio di durabilità**
- dovrebbe progettare il **protocollo sperimentale** secondo **EN ISO 20976-1** e linee guida **EURL Lm**
- potrebbe determinare pH e a_w del prodotto prima della progettazione del challenge o dello studio di durabilità

Informazioni richieste prima di iniziare un challenge test / studio di durabilità

1. Informazioni sullo SCOPO dello studio
2. Studio rilevante per **un singolo** prodotto o per **un prodotto rappresentativo di una gamma di prodotti**
3. Identificazione del prodotto (ETICHETTA):
 - ✓ Nome del prodotto o codice identificativo (per nuovi sviluppi di prodotto)
 - ✓ Peso
 - ✓ Temperatura di conservazione
 - ✓ Elenco degli ingredienti
 - ✓ Data di scadenza o da consumare pref. entro
 - ✓ Foto del prodotto e dell'etichetta
4. Shelf-life del prodotto:
 - ✓ Data di produzione
 - ✓ Shelf-life (data di scadenza o da consumare preferibilmente entro o data di scadenza presunta)

Informazioni richieste prima di iniziare un challenge test / studio di durabilità

5. **Storia del prodotto:**
 - ✓ Nuovo prodotto o nuova formulazione
 - ✓ Prodotto già in commercio
6. **Processo di produzione**
 - ✓ Fasi più importanti del processo (riportare le fasi che inattivano i microrganismi o causa di possibile ricontaminazione)
7. **Confezionamento del prodotto:**
 - ✓ Proprietà del materiale di confezionamento (es. permeabilità, ecc.)
 - ✓ Confezionato in aria / sottovuoto / in atmosfera modificata (composizione del gas)

Informazioni richieste prima di iniziare un challenge test / studio di durabilità

8. Caratteristiche fisico-chimiche del prodotto:

- ✓ Dati (numero di valori, periodo coperto, media, deviazione standard, intervallo) per ciascun fattore di interesse
- ✓ Fattori: pH, aw o sale nella fase acquosa (WPS), concentrazione di conservanti, ecc.

9. Caratteristiche microbiologiche del prodotto:

- ✓ Dati relativi a *Listeria monocytogenes* (numero di valori, periodo coperto, prevalenza, livello di contaminazione, dati che superano il limite di 100 ufc/g)
- ✓ Dati relativi a microrganismi (diversi da *Listeria monocytogenes*) di rilevanza (numero di valori, periodo coperto, livello di contaminazione):
- ✓ Microflora totale, batteri lattici, ecc.
- ✓ Microflora tecnologica (aggiunta di probiotici, colture starter, ecc.)

10. Caratterizzazione della catena del freddo:

- ✓ Temperatura e durata di conservazione: nella produzione, dal produttore al punto vendita, al dettaglio, presso il consumatore
- ✓ Destinazione del prodotto (mercato nazionale e/o altri Stati membri dell'UE)

Redazione di un rapporto di challenge test o di uno studio di durabilità

Alla fine dello studio il laboratorio REDIGE UN RAPPORTO CONCLUSIVO

Contenuti principali del rapporto:

1. Scopo del challenge test o dello studio di durabilità
2. Condizioni in cui è stato effettuato lo studio
3. Risultati ottenuti
4. Conclusioni

Allegati: Panoramica dei dati forniti dall'OSA

IZS

T E R A M O

ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"

Valutazione delle competenze tecniche di un laboratorio. Elementi chiave di un CHALLENGE TEST

Numero di lotti:

POTENZIALE DI CRESCITA: almeno 3 lotti da testare, raccomandato selezionare i lotti in tempi diversi per considerare la variabilità tra lotti. Devono essere rappresentativi della variazione del processo di produzione e degli ingredienti

TASSO MASSIMO DI CRESCITA: quando sono testati < di 3 lotti , deve essere giustificato nel report

Valutazione delle competenze tecniche di un laboratorio. Elementi chiave di un CHALLENGE TEST

Ceppi: Per considerare la variabilità tra ceppi, è raccomandato che il laboratorio conduca il challenge con più ceppi .

- Almeno 2 ceppi
- Usati in una miscela per il calcolo del potenziale di crescita o individualmente per il tasso massimo di crescita
- L'origine dei ceppi deve essere nota inclusa la matrice dalla quale è stato isolato → set ceppi EURL *Lm* preferibile
- Le caratteristiche di crescita, biochimiche e molecolari (tipizzazione) dei ceppi devono essere documentate

Valutazione delle competenze tecniche di un laboratorio. Elementi chiave di un CHALLENGE TEST

Preparazione dell'inoculo:

Il laboratorio deve standardizzare la preparazione dell'inoculo per evitare, per quanto possibile, l'introduzione di bias durante l'inoculazione di *Listeria monocytogenes* nel prodotto.

Numero di subcolture:

• Devono essere effettuate **due subcolture successive** in un terreno appropriato, fino al raggiungimento della **fase stazionaria iniziale**.

Incubare:

- **Prima subcoltura:** alla temperatura ottimale di crescita.
- **Seconda subcoltura:** alla temperatura iniziale di conservazione del prodotto o prossima ad essa.

Per colture miste (per il potenziale di crescita), mescolare uguali concentrazioni di ciascuna seconda subcoltura.

Valutazione delle competenze tecniche di un laboratorio. Elementi chiave di un CHALLENGE TEST

Preparazione dell'inoculo:

Inoculo

- La concentrazione target dell'inoculo deve essere ottenuta diluendo la coltura mista (per il potenziale di crescita) o la seconda subcoltura (per il tasso massimo di crescita) in acqua fisiologica.
- L'inoculo deve essere utilizzato immediatamente e la sua concentrazione deve essere verificata su:
 - Agar selettivo utilizzato per il test, e
 - Agar non selettivo (quando si applica un protocollo di stress all'inoculo).

Valutazione delle competenze tecniche di un laboratorio. Elementi chiave di un CHALLENGE TEST

Inoculo delle Unità di test:

In base alle informazioni fornite dall'OSA:

Il laboratorio deve scegliere, tra i metodi indicati nella norma EN ISO 20976-1 e nella Guida Tecnica EURL Lm, tra:

- Inoculazione in superficie o in profondità
- Con o senza rimozione della confezione

Requisiti operativi:

- Il laboratorio deve giustificare la scelta del metodo in funzione del prodotto studiato.
- Per prodotti mantenuti nella confezione originale, utilizzare attrezzature adeguate (es. setto e siringa).
- Rispettare:
 - Livello target di contaminazione: ~100 cfu/g (intervallo 50–200 cfu/g)
 - Volume di inoculo: $\leq 1\%$ della massa dell'unità di prova

Valutazione delle competenze tecniche di un laboratorio. Elementi chiave di un CHALLENGE TEST

Conservazione delle Unità di test:

- Il controllo della catena del freddo è una fase fondamentale, soprattutto nei challenge test per la valutazione del potenziale di crescita.
- **Combinazione tempo/temperatura:**
Da giustificare in base alla Tabella 4, sezione 6.2.2.6 della *Guida Tecnica EURL Lm, 2026*:
- **A livello produttore:** profilo tempo/temperatura basato sui dati forniti dall'OSA (95° percentile dei dati osservati).
- **A livello vendita al dettaglio e consumatore:** profilo basato su dati nazionali (95° percentile delle osservazioni del Paese).
- **In assenza di dati:** valori predefiniti 7°C – 7°C – 10°C.
- Il laboratorio deve dimostrare che le unità di prova sono conservate secondo il profilo tempo/temperatura definito nel protocollo, utilizzando un sistema di controllo della temperatura.

Valutazione delle competenze tecniche di un laboratorio. Elementi chiave di un CHALLENGE TEST

Misure fisico-chimiche dei Food controls (matrice tal quale) e delle Control units (matrice con fisiologica)

Per caratterizzare il prodotto oggetto del challenge test e verificare la sua rappresentatività rispetto alla produzione abituale, il lab deve.

Parametri da misurare sulla matrice tal quale:

- pH, a_w o NaCl e contenuto di umidità (in alternativa ad a_w)
- Composizione gassosa
- Altri parametri specifici del prodotto che influenzano la crescita di *Listeria monocytogenes*

Misurare gli stessi parametri anche sulle unità di controllo per garantire che la preparazione dei test non modifichi le caratteristiche del prodotto.

Per ogni lotto:

- 1 campione all'inizio del test (food control e control unit)
- 1 campione alla fine del test (control unit)

Valutazione delle competenze tecniche di un laboratorio. Elementi chiave di un CHALLENGE TEST

Analisi microbiologiche

1) Valutare il comportamento di *Lm* artificialmente introdotta:

Metodi di enumerazione:

Utilizzare il metodo di riferimento EN ISO 11290-2 o un metodo alternativo validato secondo EN ISO 16140-2.

Il lab deve documentare il numero di **punti di campionamento** per lotto e il n. di unità di test per punto di campionamento:

- ≥ 5 per la valutazione del potenziale di crescita
- ≥ 8 per la massima velocità di crescita

2) Verificare la contaminazione naturale:

• Analizzare un campione di controllo alimentare al tempo 0, con EN ISO 11290-1 o metodo alternativo validato.



Se *Lm* rilevata, Gestione in base al tipo di test:

Potenziale di crescita: il test può continuare solo se la contaminazione naturale \leq quella artificiale (perché mix di inoculo).

Massima velocità di crescita: il test deve essere interrotto (perché singolo inoculo).

Valutazione delle competenze tecniche di un laboratorio. Elementi chiave di un CHALLENGE TEST

Analisi microbiologiche

3) Caratterizzare microbiologicamente il prodotto oggetto del challenge test per valutare la microflora naturale.

Analisi da eseguire:

- Enumerare, su controlli alimentari e unità di controllo, la microflora naturale rilevante:
 - Microflora totale (*batteri mesofili vitali*) → obbligatoria
 - Batteri lattici
 - Lieviti, se pertinenti al prodotto

Campionamento minimo per lotto:

- 1 campione all'inizio del challenge test
- 1 campione alla fine del test

Il laboratorio deve indicare:

- Tempistiche delle analisi
- Numero di unità di controllo e campioni di controllo alimentare analizzati

Valutazione delle competenze tecniche di un laboratorio. Elementi chiave di un CHALLENGE TEST

Determinazione del potenziale di crescita e utilizzo dei risultati

Per calcolare il potenziale di crescita il lab deve:

- Determinare la concentrazione di *Lm* (\log_{10} cfu/g) nelle unità di prova:
 - 3 campioni a t_0 (inizio del test)
 - 4 campioni tra t_0 e t_{end} (fine test)
- Verificare, per ciascun lotto a t_0 , che la deviazione standard $\leq 0,3 \log_{10}$ cfu/g → altrimenti il test è non conclusivo.
- Calcolare il **potenziale di crescita** con la formula indicata nella norma e nella guida EURL *Lm*.
- Selezionare, tra i valori ottenuti per ogni lotto, **il valore più alto come risultato finale**.

👉 Qualsiasi osservazione che possa influenzare la validità dei dati o delle conclusioni deve essere riportata.

Valutazione delle competenze tecniche di un laboratorio. Elementi chiave di un CHALLENGE TEST

Determinazione del tasso massimo di crescita e utilizzo dei risultati

Per calcolare il tasso massimo di crescita il lab deve:

- **Costruire la curva di crescita** per ciascun ceppo testato individualmente utilizzato (concentrazione di *Lm* in \log_{10} cfu/g vs tempo) ad una **temperatura definita**
- **Adattare un modello primario** a tutti i punti sperimentali usando un **software microbiologico** per stimare il tasso massimo di crescita con il **suo errore standard**
- A partire dal tasso massimo di crescita ottenuto per ogni lotto, calcolare la media di questi valori e mantenere tale valore con la sua deviazione standard quale outcome finale dello studio
- **Estrapolare** il tasso massimo di crescita ottenuto nello studio ad un'altra temperatura usando la formula del modello secondario indicato nel documento tecnico dell'EURL *Lm*, 2021.

Competenza dei laboratori che eseguono challenge test: Annex 2

Annex 2

- E' probabilmente la parte più utile e pratica della guida
- E' stata aggiornata secondo la ISO e il TGD
- E' ora specificato che «tutte le giustificazioni di deviazione dalle specifiche della check-list devono essere aggiunte come commento» al report del challenge test

ANNEX 2. Example of a checklist to assess the technical competence of the laboratory performing a challenge test

The following items, identified in the standard EN ISO 20976-1 and the EURL *Lm* Technical guidance document (TGD), should be specified in experimental design for challenge test.

All justification of a deviation from the specifications of the checklist, must be added as a comment (right column of the table below).

| | Specifications of ISO 20976-1 and EURL <i>Lm</i> TGD | Yes No | | Comment |
|-----------------------------------|---|--------------------------|--------------------------|---------|
| | | | | |
| Batches | | | | |
| Number of batches to be tested | At least 3 batches | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | One batch for μ_{max} , if inter-batch variability of pH and a_w have no significant impact on the growth rate of <i>Lm</i> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | Use of the inter-batch physico-chemical variability calculator | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| Representativeness of the batches | Batches representative of the regular production process variability | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | Batches with the physico-chemical characteristics the most favorable to growth | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | Batches coming from different production days | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| Dispatch of batches | Batches tested at three different days | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | Within 2 days after the production day | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |

Competenza dei laboratori che eseguono challenge test: modifiche principali

Annex 2

- E' probabilmente la **parte più utile e pratica** della guida
- E' stata **aggiornata** secondo la ISO e il TGD
- E' ora specificato che «**tutte le giustificazioni di deviazione dalle specifiche della checklist devono essere aggiunte come commento**» al report del challenge test

Competenza dei laboratori che eseguono challenge test: modifiche principali

| | Specifications of ISO 20976-1 and EURL <i>Lm</i> TGD | Yes | No | Comment |
|--|--|--------------------------|--------------------------|---------|
| Strains | | | | |
| Number of strains | At least 2 strains | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| Selection of the strains | Source of the strains known | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | Strains isolated from food matrix, production environment, outbreaks | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | Strains suitable for the product and storage condition | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | With known growth characteristics | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| Use | In mixture (growth potential) | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | Individually (maximum growth rate) | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| Control of the strains (biochemical, genoserotype, growth) | Control procedures | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | Growth ability tested | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | Cardinal values determined (for μ_{max} determination) | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |

Competenza dei laboratori che eseguono challenge test: modifiche principali

| | Specifications of ISO 20976-1 and | Yes | No | Comment |
|--|---|--------------------------|--------------------------|---------|
| | EURL <i>Lm</i> TGD | | | |
| Preparation inoculum | | | | |
| Preparation of the subcultures | 1 st subculture in broth in optimal condition until the early stationary phase | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | 2 nd subculture at or close to the initial T° of the product, until the early stationary phase | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | Enumeration of each 2 nd subculture | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| Mixture of the subcultures | In equal concentration | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| Dilution of the mixture (Δ) or 2 nd subculture (μ_{max}) | In non-growth promoting diluent (e.g physiological water) | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| Use of the inoculum | Immediately | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | Amount of inoculum large enough for all test units inoculation | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| Enumeration of the inoculum | On the medium (selective agar) used for the test | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | For stressed inoculum, on selective and non selective agar | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |

| | Specifications of ISO 20976-1 and EURL Lm TGD | Yes | No | Comment |
|--|---|--------------------------|--------------------------|---------|
| Inoculation of the test units | | | | |
| Initial level of contamination | Targeted level around 100 cfu/g (between 50-200 ufc/g) | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| Inoculum volume | Volume of the inoculum \leq 1% of the mass of the sample inoculated | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| Methods of contamination | Depackaged products: | | | |
| | • in depth | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | • on the surface | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | • on both | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | For foods with multicomponents: | | | |
| | • contamination of the part(s) likely contaminated with <i>Lm</i> | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | • contamination at the interface of ingredients | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | Repackaging: | | | |
| | • in the initial packaging or with the same material | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | • If other material, properties known and similar to the initial | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | • Same gaseous composition, gas volume and head space | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | Packaged products: | | | |
| • on the surface, or in depth, or both, through a septum | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | | |
| • use of a double septum | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | | |
| Preparation of control units | Addition of a volume of physiological water equivalent to the inoculum volume | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | Preparation of a temperature control unit equipped with a data logger | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | Placed close to the test units during storage | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |

Competenza dei laboratori che eseguono challenge test: modifiche principali

Competenza dei laboratori che eseguono challenge test: modifiche principali

| | Specifications of ISO 20976-1 and EURL Lm TGD | Yes | No | Comment |
|---|--|--------------------------|--------------------------|---------|
| | | | | |
| Storage of the test units | | | | |
| Storage conditions: growth potential | Identification of the stages of the cold chain from manufacturer to consumer | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| Time /storage temperatures | Justified from detailed information given by the FBO | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | Justified from data available at national level | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | Use of the values given in table 4 of the EURL Lm Technical Guidance | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| Storage temperature: maximum growth rate | At a constant temperature | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| Monitoring of the incubators (storage chambers) temperature during the test | Measurements | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |

Competenza dei laboratori che eseguono challenge test: modifiche principali

| | Specifications of ISO 20976-1 and EURL Lm TGD | Yes | No | Comment |
|-----------------------------|---|--------------------------|--------------------------|---------|
| | Minimum number of units required per batch | | | |
| For the growth potential | Minimum number of sampling points: 5 points (including t_0 and t_{end}) | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | Minimum number of test units per sampling point: 1 test unit except at t_0 (3 test units) | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | If 3 batches are analysed at the same day, only 1 test unit at t_0 per batch | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | Minimum number of control units for microbiological analysis: 2 (t_0 and t_{end}) | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | Minimum number of control units for physico-chemical analysis: 2 (t_0 and t_{end}) | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | Number of temperature control units: 1 unit | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| For the maximum growth rate | Minimum number of sampling points: 8 points (with 5 in the exponential phase) | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | Minimum number of test units per sampling point: 1 unit except at t_0 (3 units) | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | • If 3 batches analysed at the same day, only 1 unit at t_0 per batch | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | Minimum number of control units for microbiological analysis: 2 (t_0 and t_{end}) | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | Minimum number of control units for physico-chemical analysis: 2 (t_0 and t_{end}) | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | Number of temperature control units: 1 unit | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |

Competenza dei laboratori che eseguono challenge test: modifiche principali

| | Specifications of ISO 20976-1 and EURL Lm TGD | Yes | No | Comment |
|--|--|--------------------------|--------------------------|---------|
| | | | | |
| Physico-chemical measurements | | | | |
| Parameters measured and number of samples analysed per batch | pH measurement | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | • at least 1 control unit at t_0 and at t_{end} | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | • one food control sample at t_0 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | • use of a standardised method or validated method recognised at international level | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | a_w measurement | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | • at least 1 control unit at t_0 and t_{end} | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | • one food control sample at t_0 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | • use of a standardised method or validated method recognised at international level | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | MAP packaging | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | • measurement of the gas composition | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | • at least 1 control unit at t_0 and at t_{end} | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | • two food control samples at t_0 and t_{end} | | | |
| | Other measured parameters | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |

Competenza dei laboratori che eseguono challenge test: modifiche principali

| | Specifications of ISO 20976-1 and EURL <i>Lm</i> TGD | Yes | No | Comment |
|--|--|--------------------------|--------------------------|---------|
| | | | | |
| Microbiological Analyses | | | | |
| Detection <i>Lm</i> | On 1 food control at t_0 according to: | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | • reference method EN ISO 11290-1 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | • alternative method validated according to ISO 16140-2 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| Enumeration <i>Lm</i> | On 3 test units at t_0 and then on 1 test unit per sampling point according to: | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | • reference method EN ISO 11290-2 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | • alternative method validated according to ISO 16140-2 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | Enumeration limit lowered at 10 cfu/g | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | Verification of the homogeneity of the contamination of <i>Lm</i> at t_0 ($\sigma \leq 0.3$) | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| Enumeration of the total microflora | On at least 1 control unit at t_0 and t_{end} , according to a national or international standard method | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | On 1 food control sample at t_0 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| Enumeration of a specific microflora (recommended) | On at least 1 control unit at t_0 and t_{end} , according to a national or international standard method | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | On 1 food control sample at t_0 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |

Competenza dei laboratori che eseguono challenge test: modifiche principali

| | Specifications of ISO 20976-1 and EURL Lm TGD t | Yes | No | Comment |
|---|---|--------------------------|--------------------------|---------|
| Determination of the growth potential | | | | |
| Calculation method | Calculation of the Lm concentration in \log_{10} at t_0 and at the 4 further sampling points | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | Calculation formula used: $\Delta = \log \max - \log i$ | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | Calculation of the standard deviation at t_0 | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | Determination of Δ for each batch | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | The highest Δ value is retained | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | Significant increase of Lm if $\Delta > 0.5 \log$ cfu/g. | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| Determination of the maximum growth rate | | | | |
| Calculation method | Determination of the growth rate for each batch | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | Lm concentrations expressed in \log_{10} cfu/g and building of the growth curves of Lm | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | Calculation of the maximum growth rate by fitting a primary model to the growth curve | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | Use of a predictive microbiological software | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | Determination of the standard error for each estimated μ_{\max} (1 per batch) | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | The growth rate retained is the mean of the 3 μ_{\max} estimated values with its standard deviation | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| Extrapolation of the results | Extrapolation of the growth rate obtained at the studied T^* , to growth rate at other T^* | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | Determination of the growth of Lm at any realistic time-temperature profile, until the end of the shelf-life of the product | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |

| | Specifications of ISO 20976-1 and | Yes | No | Comment |
|---|---|--------------------------|--------------------------|---------|
| | EURL Lm TGD t | | | |
| Test report | | | | |
| Purpose of the study and Type of challenge-test | Validation of the food shelf-life, scope (single / group of products) | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| Identification of the food | Name of the product or identifiable code for new product development (NPD) | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | Description (composition, structure, packaging, photo) | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | Shelf-life or assigned date for NPD | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | Characteristics of the product (physico-chemical and microbiological) | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | Identification of the batches | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| Data relating to the challenge test | Number of batches tested | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | Number of tested units per batch | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | Strains used | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | Preparation of the inoculum | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | Inoculum concentration | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | Test units preparation: Mass or volume of the test units, volume of inoculum introduced per test unit, ratio met, packaging characteristics | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | Inoculation method | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | Date(s) of inoculation | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | Level of contamination targeted | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | Duration of the test, sampling times | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | Storage temperature/duration and justification | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | Lm enumeration and Lm detection methods used | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | Limit of Lm enumeration | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | Physico-chemical values at t_0 and at t_{end} | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | Methods used | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | Gas atmosphere composition | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| Temperature of the control unit | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | | |
| Concentration of total and associated microflora at t_0 and t_{end} | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | | |
| Enumeration methods for total and associated flora | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | | |

Competenza dei laboratori che eseguono challenge test: modifiche principali

Test report

| | | | | |
|------------|---|--------------------------|--------------------------|--|
| | Concentration of Lm in the test units at each sampling point Growth potential per batch/ retained for product under the storage conditions applied. | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| | Growth rate per batch / retained for the product tested | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |
| Conclusion | State the purpose of the study | <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> | |

Domande frequenti

- **Se un OSA produce un Challenge test su un prodotto a quali altri possiamo applicarlo?**
- **Se un OSA ha prodotto un Challenge test eseguito prima del 2021 possiamo ritenerlo ancora valido?**
- **Quanti challenge deve produrre un OSA per i suoi prodotti?**
- **Il Challenge può essere utilizzato se un prodotto supporta la crescita di Lm?**
- **Altre domande??**

IZS

T E R A M O

/

**ISTITUTO
ZOOPROFILATTICO
SPERIMENTALE
DELL'ABRUZZO
E DEL MOLISE
"G. CAPORALE"**

Grazie per l'attenzione!