
INDICE

	PREMESSA	1
	PREMESSA ISO	2
	INTRODUZIONE	3
1	SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE	4
2	RIFERIMENTI NORMATIVI	4
3	TERMINI E DEFINIZIONI	4
4	PRINCIPIO	6
4.1	Generalità.....	6
	figura 1 Cinetica di crescita microbica con tre fasi principali.....	8
4.2	Stima del potenziale di crescita.....	8
4.3	Stima dei parametri della cinetica di crescita (lag time e tasso di crescita massimo).....	9
5	APPARECCHIATURE	9
6	TERRENI CULTURALI E REAGENTI	10
7	PROGETTAZIONE E CAMPIONAMENTO DELLO STUDIO	10
7.1	Generalità	10
7.2	Impostazione dei criteri decisionali per il potenziale di crescita	10
7.3	Numero di lotti e criteri di selezione	10
7.4	Preparazione delle unità di prova	11
7.5	Numero di unità di prova da inoculare.....	11
8	SELEZIONE DEI CEPPI	11
9	PREPARAZIONE DELL'INOCULO	12
9.1	Generalità	12
9.2	Preparazione delle sospensioni delle cellule vegetative	12
9.3	Preparazione delle sospensioni di spore	12
10	INOCULAZIONE DELLE UNITÀ DI PROVA	13
11	CONTROLLI	13
11.1	Controlli sull'alimento.....	13
11.2	Unità di controllo.....	14
12	CONSERVAZIONE DELLE UNITÀ DI PROVA	14
12.1	Generalità.....	14
12.2	Stima del potenziale di crescita.....	14
12.3	Stima dei parametri della cinetica di crescita (lag time e tasso di crescita).....	15
13	ANALISI	15
14	ESPRESSIONE DEI RISULTATI	16
14.1	Generalità.....	16
14.2	Potenziale di crescita (Δ).....	16
14.3	Stima dei parametri della cinetica di crescita (lag time e tasso di crescita).....	16
15	RAPPORTO DI PROVA	16
15.1	Generalità.....	16

15.2	Scopo dello studio e tipo di "challenge test"	17
15.3	Protocollo sperimentale.....	17
15.4	Analisi del campione.....	17
15.5	Risultati.....	18
15.6	Conclusioni	18
15.7	Documenti di riferimento.....	18
APPENDICE (informativa)	A VALUTAZIONE DELLA VARIABILITÀ INTER-LOTTO BASATA SUL PH E SU a_w	19
APPENDICE (normativa)	B NUMERO MINIMO DI UNITÀ PER PREPARARE LO STUDIO DEL "CHALLENGE TEST"	20
figura	B.1 Numero minimo di unità di prova necessario per lo studio del "challenge test"	20
APPENDICE (informativa)	C ESEMPI DI PROTOCOLLI PER LA PREPARAZIONE DEGLI INOCULI	21
APPENDICE (informativa)	D ESEMPI DI COME STIMARE IL POTENZIALE DI CRESCITA, IL LAG TIME E IL TASSO DI MASSIMA CRESCITA DAI RISULTATI DEI "CHALLENGE TEST"	24
prospetto	D.1	24
prospetto	D.2	24
prospetto	D.3	25
prospetto	D.4 Data point sperimentali ottenuti.....	25
figura	D.1 Cinetica di crescita microbica ottenuta da tre lotti.....	26
prospetto	D.5 Stima dei parametri dei modelli primari	27
APPENDICE (informativa)	E UTILIZZO DELLA SIMULAZIONE PER VALUTARE UNA POPOLAZIONE MICROBICA NELL'AMBITO DI CONDIZIONI DI TEMPERATURA DIVERSE	28
	BIBLIOGRAFIA	29

QUESTO DOCUMENTO È UNA PREVIEW. RIPRODUZIONE VIETATA

PREMESSA

Il presente documento (EN ISO 20976-1:2019) è stato elaborato dal Comitato Tecnico ISO/TC 34 "Food products" in collaborazione con il Comitato Tecnico CEN/TC 275 "Food analysis - Horizontal methods", la cui segreteria è affidata al DIN.

Alla presente norma europea deve essere attribuito lo status di norma nazionale, o mediante pubblicazione di un testo identico o mediante notifica di adozione, al più tardi entro ottobre 2019, e le norme nazionali in contrasto devono essere ritirate al più tardi entro ottobre 2019.

Si richiama l'attenzione alla possibilità che alcuni degli elementi del presente documento possano essere oggetto di brevetti. Il CEN non deve essere ritenuto responsabile di avere citato tali brevetti.

In conformità alle Regole Comuni CEN/CENELEC, gli enti nazionali di normazione dei seguenti Paesi sono tenuti a recepire la presente norma europea: Austria, Belgio, Bulgaria, Cipro, Croazia, Danimarca, Estonia, Finlandia, Francia, Germania, Grecia, Irlanda, Islanda, Italia, Lettonia, Lituania, Lussemburgo, Malta, Norvegia, Paesi Bassi, Polonia, Portogallo, Regno Unito, Repubblica Ceca, Repubblica Ex Jugoslava di Macedonia, Romania, Serbia, Slovacchia, Slovenia, Spagna, Svezia, Svizzera, Turchia e Ungheria.

Notifica di adozione

Il testo della ISO 20976-1:2019 è approvato dal CEN come EN ISO 20976-1:2019 senza alcuna modifica.

QUESTO DOCUMENTO È UNA PREVIEW. RIPRODUZIONE VETRATA

PREMESSA ISO

L'ISO (Organizzazione Internazionale di Normazione) è la federazione mondiale degli organismi di normazione nazionali (membri ISO). L'attività di stesura delle norme internazionali è svolta generalmente attraverso comitati tecnici ISO. Ogni organismo membro interessato ad un argomento per il quale è stato istituito un comitato tecnico ha il diritto di essere rappresentato in tale comitato. Anche le organizzazioni internazionali, governative e non-governative, in collaborazione con l'ISO, partecipano ai suddetti lavori. L'ISO collabora strettamente con l'IEC (Commissione Elettrotecnica Internazionale) su tutti gli argomenti della normazione elettrotecnica.

Le procedure seguite per sviluppare il presente documento, unitamente a quelle seguite per il suo successivo aggiornamento, sono descritte nelle Direttive ISO/IEC, Parte 1. Inoltre si dovrebbe prestare attenzione ai diversi criteri di approvazione necessari per i diversi tipi di documenti ISO. Il presente documento è stato redatto in conformità alle regole editoriali contenute nelle Direttive ISO/IEC, Parte 2. (vedere: www.iso.org/directives).

Si richiama l'attenzione sulla possibilità che alcuni degli elementi del presente documento possano essere oggetto di brevetti. L'ISO non deve essere ritenuto responsabile di aver citato alcuni o tutti questi brevetti. I dettagli sui brevetti identificati durante lo sviluppo del documento sono indicati nell'Introduzione e/o nell'elenco ISO delle dichiarazioni di brevetto ricevute (vedere www.iso.org/patents).

Qualsiasi denominazione commerciale utilizzata nel presente documento costituisce un'informazione fornita a supporto degli utenti e non costituisce un'approvazione.

Per una spiegazione sulla natura volontaria delle norme, sul significato di termini specifici ISO e delle espressioni relative alla valutazione di conformità, nonché informazioni sull'osservanza dell'ISO ai principi dell'Organizzazione Mondiale del Commercio (WTO) nell'ambito delle barriere tecniche per il commercio (TBT) vedere il seguente URL: www.iso.org/iso/foreword.html.

Il presente documento è stato elaborato dal Comitato Tecnico ISO/TC 34, *Food products*, Sottocomitato SC 9 *Microbiology*.

Un elenco di tutte le parti che costituiscono le serie ISO 20976 è disponibile sul sito web dell'ISO.

Qualsiasi riscontro o quesito relativo al presente documento dovrebbe essere indirizzato all'organismo di normazione dell'utilizzatore. Un elenco completo di tali organismi è disponibile all'indirizzo: www.iso.org/members.html.

INTRODUZIONE

In base ai principi generali del Codex Alimentarius sull'igiene dei prodotti alimentari, è responsabilità degli operatori del settore alimentare (FBO) controllare i pericoli microbiologici nei prodotti alimentari e gestire i rischi microbiologici. Pertanto, gli FBO attuano misure di controllo validate [11] nell'ambito del sistema di analisi dei pericoli e punti critici di controllo (HACCP) e svolgono studi per verificare la conformità ai criteri di sicurezza alimentare in tutta la catena alimentare.

Nel quadro della valutazione del rischio microbico (MRA), sono stati sviluppati diversi approcci complementari per stimare i rischi posti dai microrganismi patogeni o deterioranti nella catena alimentare. L'MRA è adottato da organismi di regolamentazione sotto l'egida dell'agenzia internazionale per la definizione delle norme alimentari. Il "challenge test" è uno degli approcci riconosciuti utilizzati per validare le misure di controllo all'interno del sistema HACCP, nonché per valutare la sicurezza microbiologica e la qualità dei prodotti alimentari, i processi di produzione alimentare, le condizioni di conservazione degli alimenti e le raccomandazioni per la preparazione degli alimenti per i consumatori.

Il presente documento fornisce regole tecniche, calcoli e approcci per esaminare la capacità del(dei) microrganismo(i) inoculati che destano preoccupazione di crescere, sopravvivere o essere inattivati nelle materie prime e nei prodotti intermedi o finali in condizioni ragionevolmente prevedibili di processi alimentari, conservazione e uso. L'obiettivo e lo scopo e campo di applicazione del documento sono la determinazione della progettazione sperimentale e la selezione delle condizioni dello studio. Le autorità di regolamentazione possono formulare raccomandazioni diverse, che sono state incluse il più possibile. È tuttavia possibile che si debbano incorporare requisiti specifici per ottenere l'approvazione regolamentare del "challenge test".

Poiché la cinetica di crescita e di inattivazione sono chiaramente diverse, la serie ISO 20976 è costituita da due parti, sotto il titolo generale, *Microbiology of the food chain - Requirements and guidelines for conducting challenge test of food and feed products*:

- *Part 1: challenge test to study growth potential, lag time and maximum growth rate*
- *Part 2: challenge test to study inactivation potential and kinetics parameters* (da sviluppare)

L'utilizzo della serie ISO 20976 prevede competenze in aree pertinenti quali la microbiologia alimentare, la scienza alimentare, la trasformazione e la statistica dei prodotti alimentari. Le competenze statistiche includono una comprensione della teoria del campionamento e della progettazione degli esperimenti, l'analisi statistica dei dati microbiologici e una panoramica dei concetti matematici scientificamente riconosciuti e disponibili utilizzati nella modellizzazione predittiva. Anche se sono disponibili molti modelli matematici per descrivere e prevedere la crescita batterica, il "gamma concept" (γ -concept) [22] è particolarmente utile per ulteriori simulazioni utilizzando i dati generati dal "challenge test", per esempio per valutare la crescita a temperature di conservazione diverse da quella(e) stessa posta(e) a prova, o per contribuire a progettare formulazioni alimentari e condizioni di conservazione migliori, migliorando così la qualità e/o la sicurezza microbica dell'alimento in fase di valutazione.

Per ragioni pratiche, il termine "alimento" comprende i mangimi.

SCOPO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Il presente documento specifica i protocolli per condurre "challenge test" microbiologici per studi sulla crescita di batteri in fase vegetativa e batteri sporigeni in materie prime, prodotti intermedi o prodotti finiti.

L'utilizzo di questo documento può essere esteso a lieviti che non formano micelio.

RIFERIMENTI NORMATIVI

Nel testo si fa riferimento ai seguenti documenti in modo tale che il loro contenuto, in tutto o in parte, costituisca i requisiti per il presente documento. Per quanto riguarda i riferimenti datati, si applica esclusivamente l'edizione citata. Per i riferimenti non datati vale l'ultima edizione del documento a cui si fa riferimento (compresi gli aggiornamenti).

ISO 7218	Microbiology of food and animal feeding stuffs - General requirements and guidance for microbiological examinations
ISO 11133	Microbiology of food, animal feed and water - Preparation, production, storage and performance testing of culture media
ISO 18787: 2017	Foodstuffs - Determination of water activity

TERMINI E DEFINIZIONI

A fini del presente documento, si applicano i seguenti termini e definizioni.

Per l'utilizzo in ambito normativo l'ISO e l'IEC dispongono di banche dati terminologiche ai seguenti indirizzi:

- ISO Online browsing platform: disponibile all'indirizzo <https://www.iso.org/obp>
- IEC Electropedia: disponibile all'indirizzo <http://www.electropedia.org/>

3.1 **spora batterica:** Forma resistente di batterio dormiente fino alla fase di *germinazione* (3.9).

3.2 **lotto:** Gruppo o insieme di alimenti identificabili ottenuti mediante un determinato processo nell'ambito di circostanze praticamente identiche e prodotti in un luogo indicato in un determinato periodo di produzione.

Nota Il lotto è determinato da parametri stabiliti in precedenza dall'organizzazione e può essere descritta da altri termini e definizioni, per esempio il lotto.

[FONTE: Regolamento della Commissione (CE) n. 2073/2005]

3.3 **valore cardinale:** Valori minimi, ottimali e massimi stimati di fattori fisico-chimici (per esempio temperatura, pH, a_w) che caratterizzano la crescita di un determinato ceppo microbico.

3.4 **unità di controllo:** Unità alimentare identica all'*unità di prova* (3.24) ma non contaminata artificialmente (utilizzata come riferimento).

3.5 **challenge test:** Studio della crescita o dell'inattivazione del(dei) microrganismo(i) inoculati artificialmente nell'alimento.

3.6 **data point sperimentale:** Risultato dell'analisi di un'*unità di prova* (3.24) per unità di peso (\log_{10} ufc/g), per unità di volume (\log_{10} ufc/ml) o per unità di superficie (\log_{10} ufc/cm²).

Nota Per casi specifici, i risultati dell'enumerazione possono essere espressi in \log_{10} MPN.

3.7 **fase di crescita esponenziale:** Fase in cui la popolazione microbica si sta moltiplicando esponenzialmente il più rapidamente possibile; la crescita dipende dal terreno colturale e dall'ambiente (temperatura, umidità, ecc.).

Nota La figura 1 descrive le tre fasi della cinetica di crescita microbica.