

MICROORGANISMI DEGLI ALIMENTI

1

- **CRITERI MICROBIOLOGICI**
- **MICROORGANISMI INDICATORI**
- **CAMPIONAMENTO DEGLI ALIMENTI**
- **CAMPIONAMENTO DEI MICROORGANISMI NEGLI
AMBIENTI DI PRODUZIONE**

**Caratteristiche dell'alimento +
tecnologia di produzione**

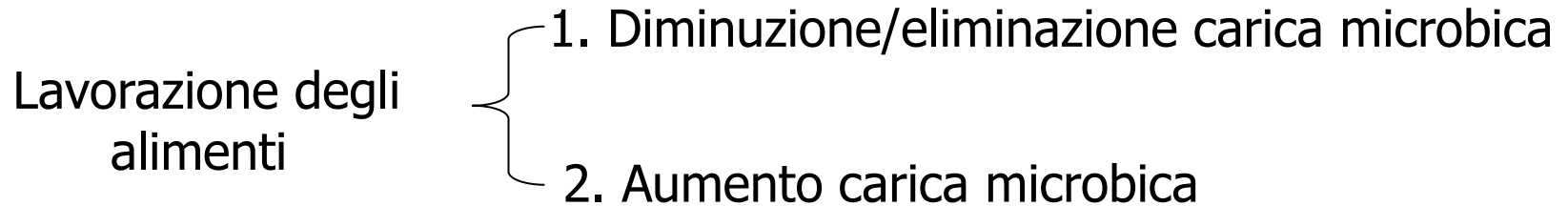


MICROORGANISMI

Esempi:

- **Alimenti essiccati ⇒ bassa carica microbica**
- **Alimenti zuccherini ⇒ assenza microrganismi con bassa tolleranza alla pressione osmotica**
- **Alimenti molto elaborati ⇒ elevato rischio di sviluppo microbico**

- Alimenti poco elaborati: contaminazione derivante dall'ambiente di produzione (raccolta, conservazione, imballaggi,.....)



1. Caso più frequente: pastorizzazione, sterilizzazione, irradiazione,.....

Carica microbica materia prima > carica microbica prodotto finito

Esempio: conserve,.....

2. Eccezione: fermentazione ⇒ incremento volontario della carica microbica dell'alimento

Carica microbica materia prima < carica microbica prodotto finito

Esempio: formaggi,.....

CONTAMINAZIONE MICROBICA DEGLI ALIMENTI

Contaminazione
degli alimenti

- 1. Primaria
- 2. Secondaria

1. **Primaria**: microrganismi naturalmente presenti nell'alimento (**materie prime**)

2. **Secondaria**: microrganismi provenienti dall'ambiente confinato (aria, acqua, suolo, uomo,...)

Esempi:

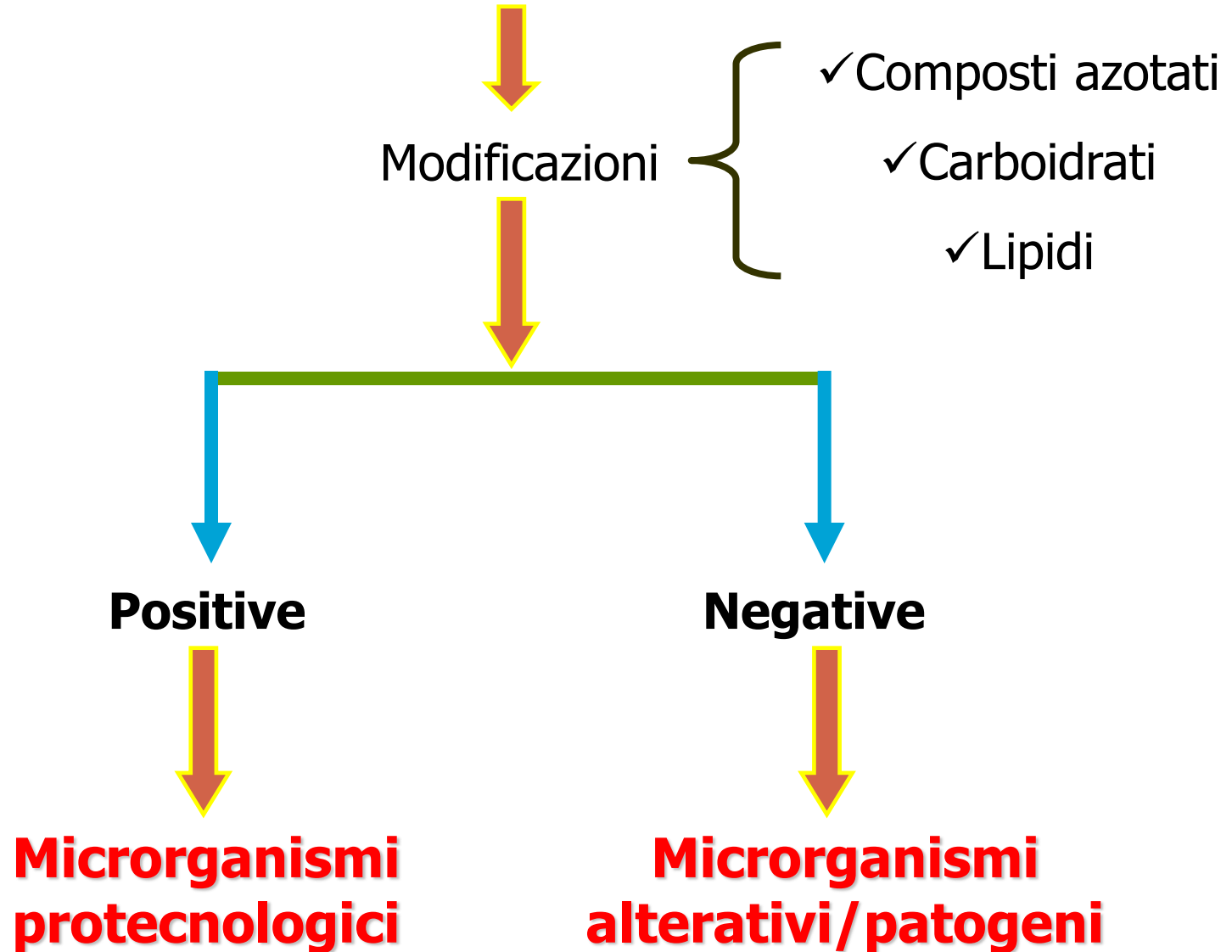
STOCCAGGIO: Depositi non idonei, scarsa pulizia delle celle frigo, con promiscuità degli alimenti.

DURANTE LA MANIPOLAZIONE: Attrezzature e superfici di lavoro contaminate; Promiscuità cotto/crudo, sporco/pulito; Inosservanza delle norme igieniche personali.

DOPO LA PREPARAZIONE: Promiscuità cotto/crudo; Confezionamento in condizioni igieniche inadeguate.

PRESENZA DI INSETTI e RODITORI.

Sviluppo microbico



Microorganismi negli alimenti:

1. Indicatori di tipicità;
2. Indicatori di qualità;
3. Indicatori di salubrità

1. Indicatori di tipicità

Detti anche protecnologici;

Microrganismi utili che caratterizzano il prodotto.

Si distinguono in:

- 1) Naturalmente presenti;
- 2) Selezionati e preparati in laboratorio.

ESEMPI:

- 1) Microrganismi responsabili delle fermentazioni spontanee (siero-innesti e latte-innesti naturali, fermentazioni spontanee di vegetali e salami, lieviti dei mosti,....
- 2) Starter per yogurt, formaggi, salami, vino,

2. Indicatori di qualità

- Indici delle caratteristiche di pulizia e igiene delle tecniche di manipolazione e conservazione
- Espressi come N° microrganismi/g o N° microrganismi/ml
- N° di questi microrganismi o dei loro metaboliti ⇒ la conservabilità fino al momento del consumo (previsione della vita di scaffale), nonché le caratteristiche tipiche

Un microrganismo per essere considerato **indicatore di qualità** deve:

- ❖essere presente e poter essere determinato negli alimenti per i quali deve essere stabilita la qualità;
- ❖la crescita ed il numero deve essere strettamente correlata alla qualità globale dell'alimento;
- ❖deve poter essere determinato facilmente e con rapidità;
- ❖deve essere facilmente distinto da altri microrganismi;
- ❖la crescita non deve essere contrastata da altri componenti o microrganismi presenti

Evoluzione nel tempo degli indici di qualità

Moltiplicazione  provocano alterazioni più o meno manifeste che modificano il prodotto dal punto di vista organolettico

Stasi  prodotto è accettabile

Riduzione  si registra un miglioramento della qualità globale del prodotto evidenziato da un allungamento dei tempi di conservazione.

•Indicatori di qualità più comuni:

- Carica Batterica Totale o Standard (CBT)**
- Coliformi
- muffe

Alimento	Microrganismi indicatori di qualità
Impasto da pane	<i>Bacillus</i> spp,
Formaggi a pasta dura	Clostridi butirrici, <i>Propionibacterium</i> spp.
Vino, birra	Batteri lattici e acetici
Burro	<i>Pseudomonas</i> spp., coliformi, muffe
Succhi di frutta e bibite analcoliche	Lieviti, muffe, batteri lattici

Alimento	Metaboliti indicatori di qualità
Carne bovina sotto vuoto	Cadaverina, putrescina
Succhi di frutta	Diacetile, alcol etilico
Tonno in scatola	Istamina
Conserve vegetali	Acido lattico
Burro, panna	Acidi grassi volatili

CARICA BATTERICA TOTALE (CBT)

- Indice della qualità microbiologia dell'alimento
- Elevata CBT \Rightarrow scarsa qualità
- Alimenti con aspetto normale, ma con elevata CBT \Rightarrow alimento deteriorato

•Limiti:

- Alimenti fermentati contengono naturalmente un'elevata carica microbica \Rightarrow CBT non è un indice utile per determinarne la qualità microbiologica;
- I substrati di solito utilizzati non permettono lo sviluppo di microrganismi esigenti \Rightarrow CBT non utile per determinare questi microrganismi;
- Condizioni di incubazione prediligono batteri aerobi mesofili \Rightarrow altri microrganismi (anaerobi stretti) non vengono rilevati;
- Lieviti e muffe sviluppano meglio a $T <$ e con t di incubazione $>$ \Rightarrow CBT non utile per determinare i funghi.

PROCEDURA

Omogeneizzazione del campione



Diluizioni seriali del campione omogeneizzato



Piastramento



Incubazione a 30° (35-37) per 48 h



Conta di tutte le colonie sviluppate (CFU/g o CFU/ml di alimento)

SUBSTRATI UTILIZZATI

PCA (Plate Count Agar)

Triptone	5 g/L
Estratto di lievito	2,5 g/L
Destrosio	1 g/L
Agar	20 g/L
pH	7

Agar triptosio

Triptosio	20 g/L
NaCl	5 g/L
Glucosio	1 g/L
Tiamina cloridrato	0,005 g/L
Agar	15 g/L
pH	7

3. Indicatori di salubrità

Sono rappresentati da quei microrganismi il cui numero per grammo è un parametro di rischio per il consumatore.

Vengono definiti **patogeni** e sono responsabili di infezioni e intossicazioni alimentari.

La loro moltiplicazione nell'alimento aumenta il rischio di malattia, mentre la loro diminuzione può migliorare la sicurezza d'uso.

Raramente gli indicatori di salubrità causano percettibili alterazioni delle caratteristiche organolettiche.

3. Indicatori di salubrità

Devono rispondere ai seguenti requisiti:

- facile e rapida individuazione;
- facilmente distinguibile da altri microrganismi dell'alimento;
- se non chiaramente patogeni, possederne i medesimi requisiti di crescita e di sviluppo.
- Costante associazione con il patogeno di cui è indicatore.
- Presente in concentrazione correlata con quella del patogeno.
- Esigenze nutrizionali e velocità di crescita \geq a quelle del patogeno; avere una velocità di morte non $<$ di quella del patogeno ($>$ persistenza)

Igiene dei prodotti alimentari: normativa

La sanità è requisito principale di qualità dei prodotti alimentari.

La **Direttiva 43/93/CE** sull'autocontrollo, recepita in Italia dal **DLgs 155/97** e successivamente integrata dalla **Direttiva 2073/2005/CE (pacchetto igiene)**, ha adottato disposizioni per armonizzare le norme generali di igiene dei prodotti alimentari, che riguardano tutte le fasi del processo produttivo e distributivo.

Reg. CE 2073/2005:
**CRITERIO
MICROBIOLOGICO**

definisce
l'accettabilità

prodotto

Partita di
prodotti

processo

In base

assenza

presenza

numero

e/o

microrganismi

Quantità delle relative
tossine/metaboliti

per unità
di massa, volume, area o partita

conformità ai criteri microbiologici

l'ottenimento di risultati soddisfacenti o accettabili

(specificati nell'allegato I, successivamente modificato dal Reg. CE 1441/2007)

nei controlli volti ad accertare la **conformità ai valori fissati** per i criteri

Un criterio microbiologico indica che un determinato microrganismo o gruppo di microrganismi, o tossina microbica deve essere

1. assente o
2. presente al massimo in un determinato numero di unità campionarie o
3. presente a un livello non superiore a un limite prefissato in una quantità specificata di alimenti o di ingredienti.

Il criterio deve inoltre indicare:

- l'identità dell'alimento o dell'ingrediente
- il contaminante al quale si riferisce
- il numero di unità campionarie per le verifiche
- il **metodo analitico** da utilizzare
- i **limiti microbiologici** considerati appropriati
- il **numero di unità** in cui i limiti non possono essere superati
- il punto della catena di produzione/trasformazione al quale si applica
- le azioni da intraprendere quando i limiti non sono rispettati

TIPI DI CRITERI

STANDARD

Criterio microbiologico obbligatorio stabilito per legge, il mancato rispetto del quale costituisce una violazione punibile (ritiro dal commercio, revoca di autorizzazioni a produrre, procedimenti penali).
Esso può contenere limiti sia per microrganismi patogeni sia per microrganismi indicatori.

LINEE GUIDA

Criteri consigliati, spesso adottati dall'industria alimentare o da agenzie governative per monitorare processi produttivi. Sono utilizzati per dimostrare l'efficienza di un processo, in particolare in corrispondenza di punti di controllo critici **(CCP)**, e la conformità con le buone pratiche di produzione **(GMP)**.

Possono includere microrganismi che non hanno un'importanza diretta per la salute umana. Le linee guida, che possono essere anche più restrittive dei criteri previsti per legge, dovrebbero essere impiegate per la validazione di piani di autocontrollo, piuttosto che il monitoraggio di punti di controllo critici, per il quale occorre usare misure di carattere più continuo.

TIPI DI CRITERI

SPECIFICAZIONI

Criterio microbiologico obbligatorio o consigliato usato come requisito per l'acquisto di una materia prima o di un prodotto.

Le specifiche sono formalizzate in un rapporto fra fornitore ed acquirente e il superamento del criterio potrebbe comportare il rifiuto della partita di merce.

CAMPIONAMENTO

- Fondamentale per l'impossibilità di analizzare l'intero lotto.

- **«Regolamento (CE) n. 2073/2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari»**

"Campione: una serie composta di una o più unità o una porzione di materia selezionate tramite modi diversi in una popolazione o in una quantità significativa di materia e destinate a fornire informazioni su una determinata caratteristica della popolazione o della materia oggetto di studio e a costituire la base su cui fondare una decisione relativa alla popolazione o alla materia in questione o al processo che le ha prodotte."

Se il campionamento è effettuato correttamente, i risultati ottenuti dal campione estendibili all'intero lotto

Elementi fondamentali:

- **Unità campionarie:** singola aliquota o confezione di prodotto, scelta casualmente, che verrà poi analizzata;
- **Lotto:** quantità di prodotto alimentare ottenuto, trattato e conservato in condizioni uniformi in un ciclo di produzione omogenea, comunque identificabile, quindi entro un determinato periodo di tempo (turno, giornata lavorativa);
- **Campione rappresentativo:** campione le cui condizioni di produzione si avvicinano quanto più possibile (quali-quantitativamente) a quelle del lotto da cui è stato prelevato, quindi un campione nel quale sono mantenute le caratteristiche della partita dalla quale è prelevato;
- **Campione casuale:** insieme di unità campionarie selezionate da un lotto, seguendo un procedimento che assicuri a ogni unità la stessa probabilità di essere prelevata

Scelta casuale ➔ **Campione realmente rappresentativo**

Eterogeneità possibile anche nella stessa unità campione (esempio liquidi congelati durante il raffreddamento)

Campionamento manuale ➔ Attrezzature semplici, funzione delle caratteristiche del materiale (vd. tabella)

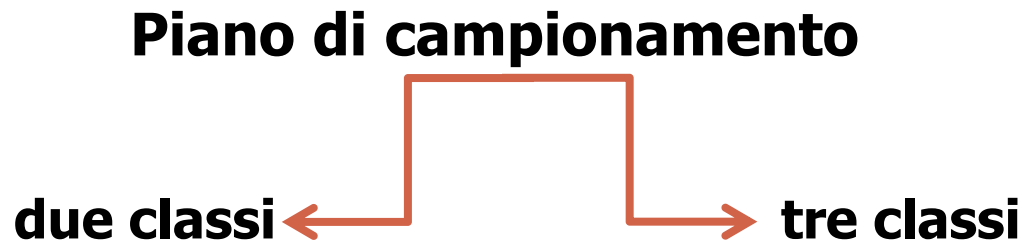
Sonde destinate a specifici prodotti descritte nelle norme che descrivono:

- Modalità analitiche;
- Tipo di materiale compatibile con l'alimento

Materiale	Campionatore
Polveri, granuli, cereali,....	Spatole, cucchiari
<ul style="list-style-type: none"> ■ Sfusi in cumuli o silos ■ Imballati in sacchi, fusti, latte, barattoli 	Sonde a tubo aperto
Confetti, pasticche, dolciumi, granuli,..	Tubo prismatico con feritoie
Prodotti congelati	Coltelli elettrici Rotori a tubo su trapano elettrico
Compatti molli (formaggi, burro, grassi solidi,...)	Sonda a tassello a tubo aperto
Materiali pastosi	Campionatore a pistone
Materiali altamente viscosi	Sonde ad aspirazione (siringhe)

Criterio microbiologico definito dal Codex da indicazioni su:

- 1. Microrganismi e/o loro tossine;**
- 2. Metodi** analitici per la loro identificazione e quantificazione;
- 3. Piano** che indichi quando e dove devono essere prelevati i campioni;
- 4. Limiti microbiologici** per l'alimento in punti specifici della catena alimentare;
- 5. Numero di unità campionarie** che devono essere conformi a questi limiti



PIANO A DUE CLASSI

Basato sul giudizio del tutto o nulla o puramente qualitativo

Applicato per:

ricerca di microrganismi patogeni \Rightarrow assenti in una serie definita (n) di unità campionarie (uc)

Controllo di sterilità di prodotti in contenitori ermetici \Rightarrow i risultati analitici indicano se il prodotto è al di sotto di certi limiti o se li supera

PIANO A TRE CLASSI

Determinazione delle caratteristiche microbiologiche con criterio di tipo quantitativo.

Fasce di valutazione:

Qualità accettabile \Rightarrow contaminazione microbica $<$ a un valore "m" (ufc/g o ml di prodotto)

Qualità marginale \Rightarrow "m" $<$ contaminazione microbica $<$ "M"

Qualità inaccettabile \Rightarrow contaminazione microbica $>$ "M"

Valori guida

Piano a due classi: n , c e m .

Piano a tre classi: n , c , m e M .

n \Rightarrow numero di uc da prelevare da un lotto per soddisfare un piano di campionamento;

c \Rightarrow N° massimo accettabile o consentito di uc che possono superare m ;

Se $c > m$ \Rightarrow lotto da scartare

m \Rightarrow N° o livello massimo di batteri significativi per grammo di prodotto; limite prefissato per una determinata caratteristica microbiologica (es CBT).

Piano a due classi: $m=0$, parametro usato per separare alimenti accettabili da quelli inaccettabili;

Piano a tre classi: $m \neq 0$, parametro usato per separare alimenti di buona qualità da quelli di qualità marginalmente accettabile.

M \Rightarrow presente solo nel piano a tre classi, parametro per separare alimenti di qualità marginalmente accettabile da quelli di qualità inaccettabile. Valori \geq

M \Rightarrow inaccettabile per:

- Pericolo per la salute;
- Indicatori di igiene
- Potenziale alterazione.

Severità piano di campionamento → **Valori attribuiti a n e c**

↑ **n , fissato c** → **Qualità del prodotto migliore per avere stesse probabilità di accettabilità**

Esempio

Piano a due classi

Indicatori di qualità: coliformi

Limite di tolleranza 100 coliformi/g ($m=10^2$) in un piano dove:
 $n=5$ e $c=2$,

Lotto accettato se massimo 2 uc contengono 100 ufc/g

Rifiutato se il numero di uc che contengono 100 ufc/g è ≥ 3

Si può rendere più stringente il piano:

- Aumentando n ($n=10$, $c=2$, $m=10^2$)
- Riducendo c ($n=5$, $c=1$, $m=10^2$)

Per rendere meno stringente un piano di campionamento è possibile:

↑ c , fissato n → ↑ Probabilità di accettabilità per il campione

Piano di campionamento diversificati a seconda del prodotto.

Campionamento sequenziale ⇒ N° unità campione aumenta con la consistenza del lotto

FORMAGGIO A PASTA MOLLE E FILATA

CONSERVANTI

Assenti

LIMITI MICROBIOLOGICI Conformi al D.P.R. 54/97

<u>FORMAGGIO FRESCO MOLLE</u>	<i>n</i>	<i>c</i>	<i>m</i>	<i>M</i>
Listeria monocytogenes	5	0	Assenza in 25 g.	
Salmonelle	5	0	Assenza in 25 g.	
Staphylococcus aureus	5	2	100	1.000
Escherichia coli	5	2	100	1.000
Coliformi a 30° C	5	2	10.000	100.000

n = numero di unità di campionamento da esaminare

c = numero di unità di campionamento nelle quali può essere ammessa la presenza del microorganismo considerato

m = numero germi considerato accettabile

M = numero germi considerato inaccettabile

MICROORGANISMI DEGLI AMBIENTI DI PRODUZIONE

Microrganismi degli
ambienti di produzione



Microrganismi negli
alimenti

Ambienti di produzione
fortemente contaminati



Alimenti di scarsa
qualità microbiologica

Isolamento di patogeni dagli
ambienti di produzione



Elevato rischio di
contaminazione secondaria

**FREQUENZA ELEVATA DEL CAMPIONAMENTO
DAGLI AMBIENTI DI PRODUZIONE
(pavimenti, superfici delle attrezzature,
frigoriferi, locali di conservazione,...)**

Conoscenza delle
attrezzature di lavorazione

Conoscenza di fenomeni di
contaminazione già
verificatisi

Conoscenza dei rischi
potenziali

**Sviluppo di un'efficace
strategia di campionamento**

+

Corretta analisi dei risultati



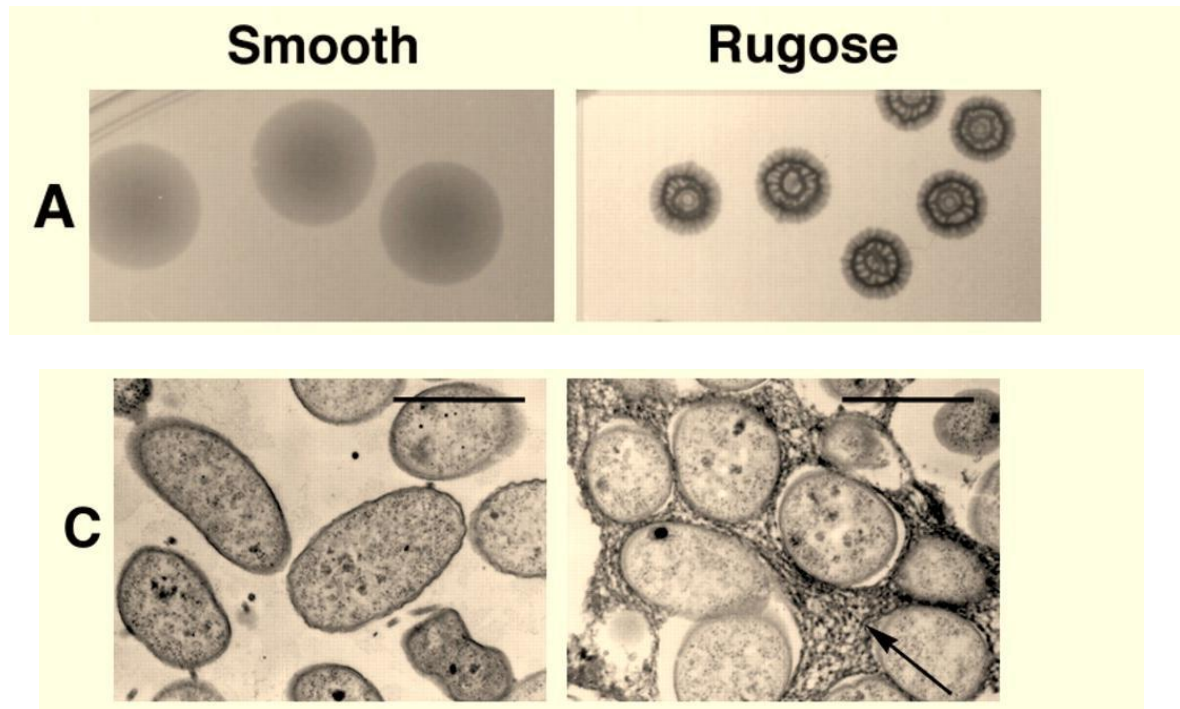
**Individuazione dei
"Punti critici di controllo" di
un'operazione di lavorazione
degli alimenti**

Campionamento degli ambienti di produzione può determinare:

- La popolazione microbica totale. Batteri, muffe e lieviti totali danno indicazioni del grado di pulizia di superfici e pulizia dell'aria. Non esistono limiti standard, ma solo limiti di accettabilità interni all'azienda. Casi particolari:
 - Legionella pneumophila* su griglie, serbatoi e condutture di impianti di ventilazione;
 - Spore di *Bacillus* e *Clostridium* in materiali polverulenti
- Microrganismi indicatori, quali *Enterobacteriaceae*, Coliformi, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*
- Microrganismi *spoilage*;
- Microrganismi patogeni

Strategie dei microrganismi per la sopravvivenza nell'ambiente

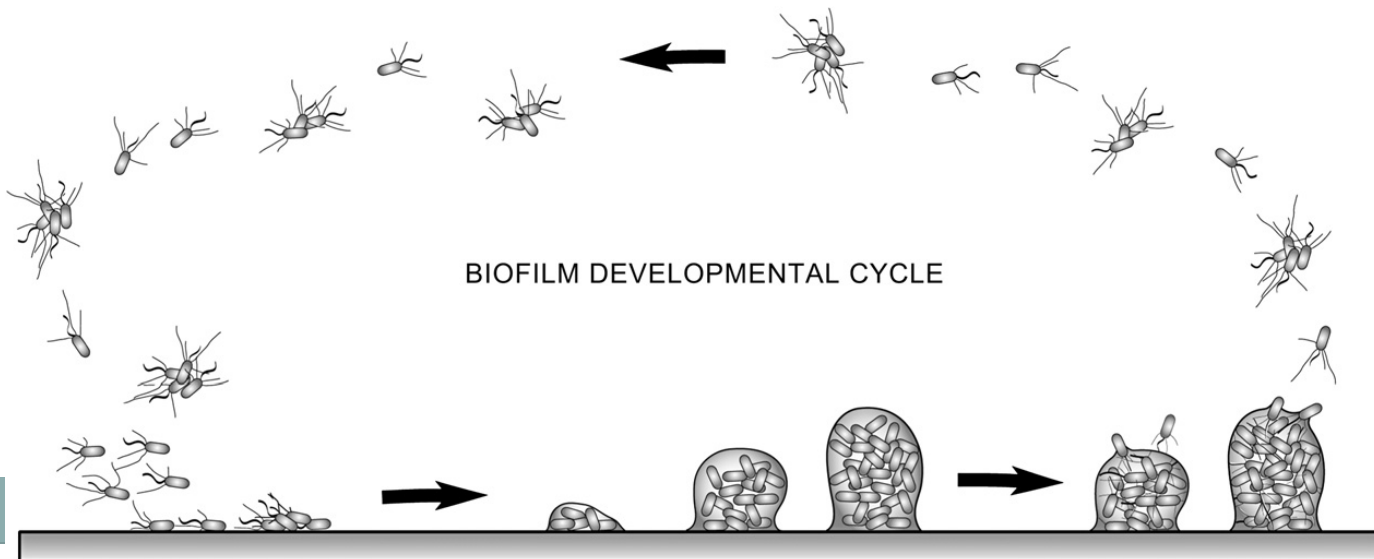
- stato di dormienza - stato VBNC (viable but not culturable): no duplicazione del DNA , no divisione cellulare (*V. cholerae*, *Campylobacter jejuni*)
- formazione di biofilm
- Adattamenti fisiologici (es. produzione di polimeri e capsule)
- Interazioni con protozoi (amebe e ciliati)



Biofilm = matrice biologicamente attiva, formata da cellule microbiche e da sostanze extracellulari adese ad una superficie solida.

Il biofilm si forma:

- in ambienti umidi e non sterili;
- su tutte le superfici;
- la formazione è un processo dinamico:
 1. Contatto dei microrganismi con la superficie (adsorbimento);
 2. Intervento di interazioni superficie-cellula batterica e produzione di esopolisaccaridi \Rightarrow adesione irreversibile;
 3. Fissazione, con liberazione di polisaccaridi extracellulari (formazione di uno strato vischioso, *glicocalice*);
 4. Colonizzazione con formazione del biofilm



- ✓ L'adesione è una situazione favorevole per i microrganismi dal punto di vista metabolico: maggiore disponibilità di nutrienti.
- ✓ I biofilm creano:
 - ✓ Danni agli impianti (incrostazioni di scambiatori di calore, intasamento sistemi di filtrazione,...)
 - ✓ Pericolo per la salute. Microrganismi produttori di biofilm:
 - ✓ *Pseudomonas* spp;
 - ✓ *Staphylococcus* spp;
 - ✓ *Listeria monocytogenes*
 - ✓ *Clostridium* (*C. botulinum*) e *Bacillus* spp;
 - ✓ *Salmonella* spp;
 - ✓ *Lactobacillus* spp;
 - ✓ *Escherichia coli*;
 - ✓ *Yersinia enterocolitica*;
 - ✓ *Campylobacter jejuni*.
- ✓ Cellule batteriche nei biofilm > resistenza a composti antimicrobici rispetto a cellule libere, a seguito di:
 - < velocità di diffusione dei biocidi
 - < diffusività di nutrienti e ossigeno ⇒ alterazione fisiologia cellulare (aumento della resistenza della cellula)

Presenza di patogeni nei campioni ambientali ⇒ precoce avvertimento per gli operatori ⇒ messa in atto di opportune misure correttive per la salvaguardia del prodotto e del consumatore

Criteri di accettabilità dei risultati relativi alla carica microbica ⇒ tipologia di alimento.

In generale:

- Pulizia e sanitizzazione adeguati ⇒ riduzione di 4-5 unità logaritmiche della contaminazione superficiale
- Popolazione microbica residua non $> 10^2$ CFU per area di utensile o superficie campionata

METODI DI CAMPIONAMENTO NEGLI AMBIENTI DI PRODUZIONE

2 punti di campionamento principali:

1. Superfici
2. Aria

Controllo microbiologico delle superfici

Analisi microbiologiche consigliate:

- Carica batterica standard;
- Muffe e lieviti;
- Coliformi e *E. coli*;
- Staphylococcus aureus*;
- Listeria monocytogenes*;
- Salmonella* spp;
- Microrganismi alterativi o patogeni specifici (es. *Pseudomonaceae* e *Bacillaceae*)

Campionamento delle superfici

- Superfici direttamente a contatto con l'alimento: parti di attrezzature, imballaggi, recipienti di conservazione, locali di stagionatura, ...;
- Superfici non a diretto contatto con l'alimento: pareti, pavimenti, indumenti degli operatori.

Scelta del metodo \Rightarrow proprietà delle superfici

Metodi diretti: rilevazione diretta della carica microbica, riferita ad unità di superficie (es. cm^2);

Metodi indiretti: misura di parametri che possono essere correlati al numero di cellule.

Metodi diretti principali:

- Tampone
- Spugna
- Replicate Organism Direct Agar Contact (RODAC)

Metodo del tampone

Metodo più antico.

Tampone con testina di cotone sterile o di alginato.

Formato più comune: testina in cotone ($\sim 0,5$ cm \varnothing , 2 cm di lunghezza) e stick in legno (lunghezza 12-15 cm).

Dopo lo striscio su un'area specifica (di solito 100 cm²), viene immerso in un'opportuno diluente, che viene poi piastrato in uno specifico substrato.

Vantaggi: rapidità, semplicità, economicità;

Limiti: risultati correlati alla tipologia di superficie da esaminare

Metodo della spugna

Usato in caso di:

- Superficie da campionare estesa;
- Ricerca di microrganismi con bassa frequenza

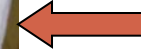
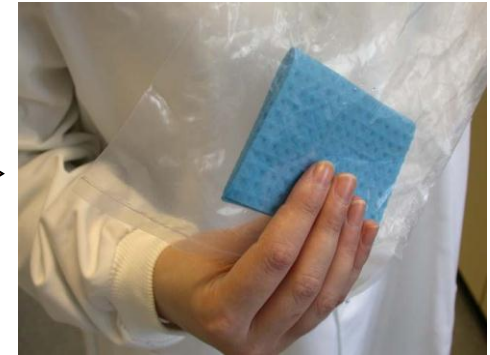
Spugne naturali o sintetiche con superficie di contatto di 5 x 5 cm, prive di agenti antimicrobici e sterili, imbevute di diluente.

Dopo lo striscio, un volume noto del liquido trattenuto dalla spugna viene piastrato.

Campionamento con tamponi



Campionamento con spugna



Metodo RODAC (Replicate Organism Direct Agar Contact)

Impiego di particolari piastre Petri (più spesse del normale).

Usato solo in caso di superfici piate

Le piastre contengono un mezzo agarizzato specifico per i microrganismi da determinare

Nessuna diluizione del campione \Rightarrow mezzo adatto per l'analisi di superfici già sanitizzate o sottoposte a pre-lavaggio.

Non adatto nel caso di superfici fortemente contaminate.



Piastre RODAC



**Campionamento
delle superfici**



**Conta delle
colonie sviluppate**

Metodi indiretti

Bioluminescenza

Metodo basato sulla determinazione dell'ATP (molecola presente in tutte le cellule viventi) per stimare indirettamente la carica microbica.

Per la determinazione dell'ATP si usa il sistema luciferin-luciferasi della lucciola: si misura l'intensità della luce emessa durante una reazione enzimatica tra ATP e luciferasi.

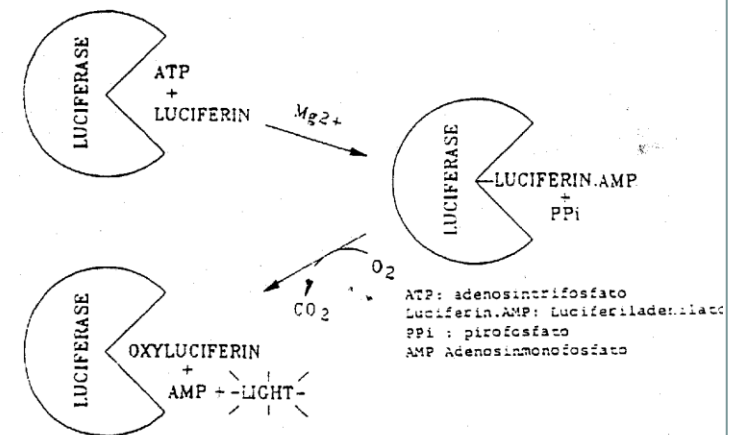
Principio: $ATP + \text{Luciferina} + \text{luciferasi} + O_2 + Mg^{++} \rightarrow \text{luce}$

Concentrazione ATP – luce prodotta

Concentrazione ATP – Sporco presente – Cellule somatiche, Lieviti, Miceti, Batteri

Intensità luce \Rightarrow Bioluminometro

Espresso in Unità luminometriche -----RLU



Reazione di ATP bioluminescenza
Reazione di bioluminescenza batterica.

Procedura

- Striscio della superficie con un tampone;
- Il tampone è posto a contatto con l'enzima;
- Misura della bioluminescenza.



Figura 3
strisciare il tampone sulle superficie



Figura 4
i reattivi e il tampone vengono messi in contatto all'interno della provetta



Figura 5
inserimento provetta nel bioluminometro

Come si utilizza per il controllo igienico delle acque di risciacquo:

- Immergere il tampone nell'acqua di risciacquo
- Inserire il tampone nello stick "Lucipac II" e premere il tappo per forare la membrana che protegge i reattivi
- Inserire la provetta nello strumento "Lumcontrol II", premere il tasto "Enter" e attendere 10 secondi per la lettura

Come si utilizza per il controllo igienico delle mani:

- Strisciare il tampone "Lucipac II" sul palmo della mano (Fig. 6)
- Inserire il tampone nello stick e premere il tappo per forare la membrana
- Scuotere il tampone 3 volte per far scendere il liquido
- Inserire il tampone nel "Lumicontrol II", premere "ENTER" ed attendere 10 secondi (Fig. 7)

Nota:



Figura 6



Figura 7

• **Caratteristiche tecniche**

La tecnica della Bioluminescenza consente di applicare il metodo HACCP, in quanto fornisce, in tempo reale, il risultato relativo al grado igienico della superficie. Questo rende la tecnica applicabile ai controlli nel settore alimentare e farmaceutico.

• **Limiti di riferimento**

Si possono definire standards di riferimento a seconda del grado di rischio per il prodotto in quel particolare punto critico, oppure riferirsi ad altri parametri di produzione. Il tempo di lettura di questo nuovo strumento garantisce una stabilità del risultato per un tempo di 30 minuti. Inoltre i reagenti non si inattivano con i comuni detersivi. La durata dei reattivi è di un anno se conservati a +2 +8 °C e di 4 settimane se conservati a temperatura ambiente.

L'intensità della luce prodotta è direttamente proporzionale al numero di cellule presenti.

Vantaggi: Buono per valutare prerequisiti – HACCP
Valutazione grado di sanificazione
Strumento di facile trasporto
Possibilità di computerizzare le analisi
Metodica semplice, rapida e facile
Risposta in 20" e 5 min

Limite: Scarsa selettività rispetto a metodi diretti: si misura tutto l'ATP presente, senza possibilità di distinguere microrganismi da tessuti animali o vegetali

ATP da cellule somatiche/ATP lieviti 100/1

ATP lieviti/ATP batteri 100/1

scarsa correlazione tra concentrazione ATP e conta batterica.

È utile per avere un'idea globale dello stato di pulizia delle superfici di lavoro, da cui devono essere assenti tutti i residui organici.

Ottimo per valutare stato igienico superfici:

- RLU > 1.200 molto sporco
- 1.200 < RLU < 800 inaccettabile
- 800 < RLU < 400 accettabile
- 400 < RLU < 200 discreto
- RLU < 200 Buono

BIOVALORI DI RIFERIMENTO ESPRESSI IN RLU (UNITA' DI LUCE RELATIVA) PER LETTURE CON BIOLUMINOMETRO

BIOVALORI GUIDA	RLU
"Bianco": tampone immerso in acqua di rubinetto	10 - 50
Superficie molto pulita	< 200
Superficie pulita	da 200 a 500
Superficie non pulita	> 500

Il prelievo deve essere eseguito su una superficie di circa 100 cm² (10 cm x 10 cm).

Determinazione della carica microbica dell'aria

L'aria può essere fonte di contaminazione a seguito di:

- Particelle di sporco sospese in aria che possono veicolare i microrganismi;
- Spore di muffe e batteri sospese nell'aria, a seguito dell'elevata resistenza all'essiccamento
- Operazioni tecnologiche (essiccamento,....)

Qualità microbiologica
dell'aria utilizzata nelle
attrezzature



**Qualità e sicurezza
degli alimenti trattati**

**Fonti di
contaminazione**

- Inadeguata filtrazione dell'aria in ingresso
- Riciclo dell'aria dalla materia prima al prodotto finito
- Assenza di controllo della qualità dell'aria presente negli imballaggi (contaminazione post-processo)

Poiché si tratta di un ambiente poco idoneo alla sopravvivenza delle cellule microbiche, presenza di cellule vitali ma stressate \Rightarrow con i metodi attualmente impiegati si ha una sottostima della popolazione microbica dell'aria.

Analisi microbiologiche consigliate:

- Carica batterica standard;
- Muffe e lieviti;
- Batteri sporigeni (spore di *Bacillus* spp e *Clostridium* spp)

Campionamento dell'aria

Metodo qualitativo: Sedimentazione

- Esposizione all'aria di piastre contenenti mezzi agarizzati per un adeguato tempo di esposizione (ad es. 15 min)
- Sedimentazione ad opera della forza di gravità dei contaminanti dell'aria
- Incubazione delle piastre
- Conta delle colonie sviluppate \Rightarrow proporzionale al livello di contaminazione

Metodo quantitativo: impiego di campionatori d'aria che aspirano un volume noto di aria in un tempo prefissato.

- Getti di aria sono diretti sulle piastre contenenti mezzi agarizzati;
- Le particelle di aria collidono e si attaccano sulla superficie delle piastre;
- Dopo aver inviato un determinato campione di aria ⇒ Incubazione delle piastre
- Conta delle colonie sviluppate ⇒ proporzionale al livello di contaminazione

Vapore acqueo

- Filtrazione attraverso un microfiltro;
- Rilascio dei microrganismi dal filtro mediante un opportuno diluente;
- Determinazione della carica microbica



**Piastra dopo
esposizione all'aria
ed incubazione**



MAS-100



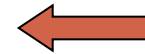
**Aspirazione dell'aria
attraverso una
piastra perforata**



**Invio diretto su piastra
Petri contenente
substrato**



**Conta delle colonie
(cfu/m3)**



Incubazione

Microrganismi metabolicamente danneggiati

Stress ambientali alle cellule microbiche (es. riscaldamento e congelamento subletali) ⇒ danno metabolico ⇒ incapacità di formare colonie su terreni selettivi (cosa che si osserva per cellule non danneggiate).

Per rilevare danni metabolici piastrare su terreno selettivo e non selettivo:

- le colonie su terreno non selettivo derivano da cellule danneggiate e non;
- le colonie su terreno selettivo solo da cellule non danneggiate.

I microrganismi metabolicamente danneggiati possono recuperare durante la coltivazione ⇒ fondamentale il terreno impiegato per individuare *Staphylococcus aureus* in prodotti pastorizzati.

Microrganismi Vitali ma non coltivabili (VBNC)

Se la conta vitale su piastra indica assenza o valori più bassi di microrganismi di quelli reali, 2 possibilità:

- Cellule metabolicamente danneggiate
- Cellule VBNC.

Differenza: in terreno non selettivo le cellule metabolicamente danneggiate recuperano, quelle VBNC no.

Il termine "vitale ma non coltivabile" (VBNC) è stato coniato per descrivere uno stato in cui le cellule batteriche non possono essere coltivate con le comuni tecniche di laboratorio, pur mantenendo le caratteristiche delle cellule vitali, come l'integrità cellulare e alcune attività fondamentali.

La presenza di VBNC è stata dimostrata anche per alcuni patogeni umani come *Escherichia coli*, *Salmonella enteritidis*, *Vibrio cholerae*, *Legionella pneumophila*, *Campylobacter jejuni* e *Listeria monocytogenes*.

Malgrado non si disponga di dati sufficienti per valutare il rischio rappresentato dalle forme VBNC, la loro presenza potrebbe rappresentare un grave problema per la salute pubblica, poiché non essendo coltivabili potrebbero sfuggire ai comuni metodi di indagine.