

ANALISI MICROBIOLOGICA DEGLI ALIMENTI

1

- **DEFINIZIONE**
- **CLASSIFICAZIONE ED IMPIEGO DEI METODI ANALITICI MICROBIOLOGICI**
- **PARAMETRI PER VALUTARE L’AFFIDABILITÀ DI UN METODO**

Definizione di ANALISI MICROBIOLOGICA DEGLI ALIMENTI:

Analisi che mira a stabilire il numero e/o la presenza di specifiche popolazioni microbiche e/o di uno specifico microrganismo e/o di specifici metaboliti microbici (enzimi, tossine) in un alimento.

Disciplina scientifica abbastanza recente: le prime analisi di prodotti lattiero-caseari risalgono al 1930, mentre quelle relative al controllo dei molluschi al 1940. L'interesse analitico per tutti gli altri alimenti a partire dal 1950.

Efficace quando utilizzata come supporto all'implementazione di sistemi di garanzia della qualità (es. HACCP) e alla verifica della loro efficacia.

Considerazioni ecologiche

Analisi chimica:

- le sostanze chimiche dannose sono distribuite uniformemente;
- la loro concentrazione rimane più o meno costante nel tempo (nella maggior parte dei casi).

Analisi microbiologica: fondamentale l'ecologia microbica dell'alimento

La distribuzione dei microrganismi negli alimenti è imprevedibile: **distribuzione casuale**, con stratificazioni microscopiche e spaziali.

Microflora di un alimento: **carattere dinamico**, con aumento o diminuzione di numero durante le varie fasi di un processo produttivo in funzione delle condizioni ecologiche.

Classificazione ed impiego dei metodi analitici microbiologici

Per definire un criterio microbiologico è necessario usare *metodi standard* ⇒ metodi sottoposti a procedure di validazione

Fanno parte dei metodi standard:

- Metodi riportati nei criteri microbiologici emanati dagli Stati (o da comunità di Stati, ad es. CE) o da organizzazioni sovranazionali che rappresentano gli Stati membri (es. OMS, Codex Alimentarius),
- metodi riportati nelle gazzette ufficiali;
- metodi emanati da Enti di Normazione (es. ISO = International Organization for Standardization, ecc.) o da Organismi internazionali o nazionali di riconosciuta rilevanza nel settore (es. FDA = Food and Drugs Administration, ecc.).

In assenza di metodi standard, si può ricorrere a:

- metodi basati sulla letteratura scientifica;
- metodi interni;
- metodi commerciali, purché presentino requisiti minimi di affidabilità (sottoposti almeno a validazione interna).

ISO =International Standard Organization

Ente che elabora norme volontarie riconosciute a livello mondiale in tutti i settori, tranne l'elettrico e l'elettronico.

Organizzazione non governativa nata nel 1947, costituita dagli enti nazionali di normazione di 146 paesi, con Sede centrale a Ginevra (Svizzera). L'attività normativa si sviluppa nei Comitati Tecnici (TC) cui fanno parte esperti dei diversi settori di interesse.

Esperti nominati dagli Enti nazionali di Normazione possono provenire sia dal settore privato che da quello pubblico.

UNI - Ente Nazionale Italiano di Unificazione

Svolge attività normativa in tutti i settori industriali, commerciali e del terziario ad esclusione di quello elettrico ed elettrotecnico.

Il ruolo dell'UNI, quale Organismo nazionale italiano di normazione, è stato riconosciuto dalla Direttiva Europea 83/189/CEE del marzo 1983. L'UNI partecipa, in rappresentanza dell'Italia, all'attività normativa degli organismi sovranazionali di normazione: ISO (International Organization for Standardization) e CEN (Comité Européen de Normalisation).

Classificazione metodi microbiologici

I metodi microbiologici si classificano come:

- **metodi di screening**: capacità di fornire indicazioni presuntive sulla presenza /assenza di un microrganismo e/o tossina;
- **metodi di conferma**: identificazione del microrganismo.

Controllo positivo = microrganismo simile al microrganismo target dell'analisi

Controllo negativo = microrganismo che non produce le reazioni tipiche del microrganismo target dell'analisi, ma che sviluppa sui substrati utilizzati per l'analisi

L'analisi dei controlli positivi e negativi consente all'analista di:

- Verificare la correttezza della procedura;
- Testare la qualità dei substrati e dei reagenti

L'affidabilità di un metodo è saggiata tramite una procedura di validazione in cui si individuano le caratteristiche del metodo:

- precisione,
- accuratezza,
- sensibilità,
- specificità,
- praticabilità ed applicabilità,
- robustezza.

Per la validazione di un metodo:

- analisi di materiali di riferimento certificati;
- confronto con altri metodi normati, anche mediante saggi interlaboratorio.

Precisione

Precisione di un metodo = grado di concordanza tra i risultati ottenuti analizzando uno stesso materiale da saggio con uno stesso metodo, in numerose prove indipendenti sotto condizioni definite.

Tale termine comprende i concetti di:

Ripetibilità: concordanza tra i risultati ottenuti sullo stesso materiale da saggio in diverse prove da uno stesso operatore, in uno stesso laboratorio, con lo stesso metodo, le stesse apparecchiature, in un breve intervallo di tempo.

Riproducibilità: concordanza tra i risultati ottenuti sullo stesso materiale da saggio in diverse prove effettuate da operatori diversi, in laboratori diversi, con lo stesso metodo, in un più ampio intervallo di tempo.

Accuratezza

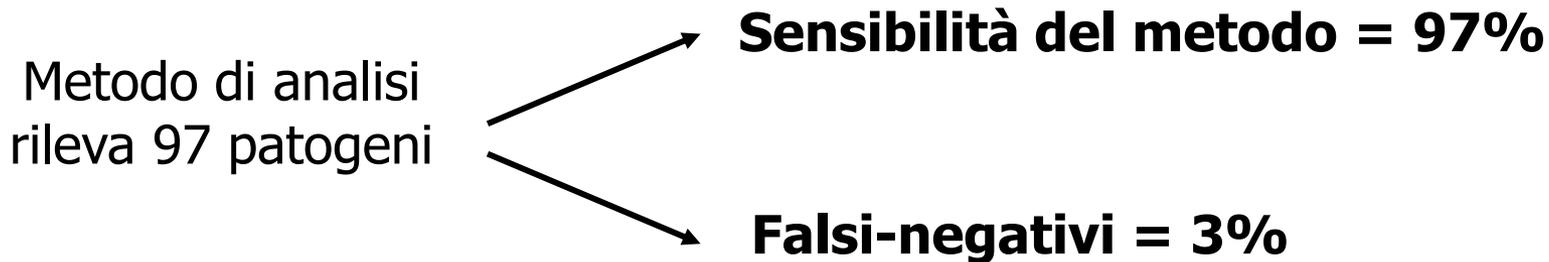
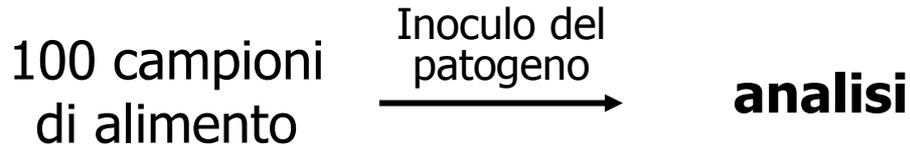
Accuratezza di un metodo = grado di concordanza fra il valore medio di una serie sufficientemente ampia di misure ed il valore vero o di riferimento (dedotto con sistemi diversi ma di provata affidabilità); espressa come percentuale del valore vero.

In microbiologia molto difficile la preventiva determinazione del valore vero, a seguito della continua modificazione della vitalità dei microrganismi e della dinamica di trasformazione delle biomolecole.

Sensibilità del metodo

Sensibilità = proporzione dei risultati positivi ottenuti quando il metodo è applicato a campioni che contengono il microrganismo *target* dell'analisi

Esempio



Inoltre:

Sensibilità del metodo = concentrazione minima rilevabile del microrganismo target nell'alimento contaminato

Metodo con alta sensibilità \Rightarrow rilevazione di patogeni presenti in numero più basso di quelli rilevabili da un metodo con bassa sensibilità

Specificità del metodo

Specificità = Stima della capacità di un metodo di individuare selettivamente un determinato analita o microrganismo bersaglio, quindi capacità del metodo di distinguere il microrganismo target nel campione analizzato dagli altri microrganismi

Esempio

100 campioni di alimento
contenenti microrganismi
ma non il target \longrightarrow **analisi**

Metodo di analisi
rileva 5 patogeni

Specificità del metodo = 95%

Falsi-positivi = 5%

Robustezza

È la misura della capacità di un metodo di rimanere valido in seguito a piccole variazioni delle condizioni operative.

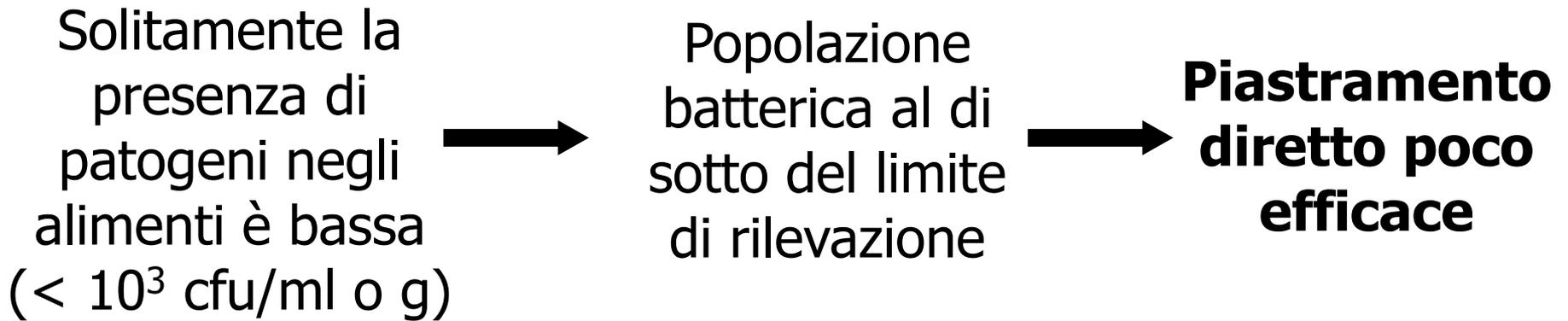
Praticabilità ed applicabilità

I metodi devono essere fattibili, quindi devono utilizzare reagenti e attrezzature commercialmente disponibili e con un costo accessibile.

Classificazione dei terreni in microbiologia

- **Semplici:** permettono lo sviluppo di numerose specie, affini per esigenze colturali, sviluppo indistinto di tutti i microrganismi presenti nel campione;
- **di arricchimento:** terreni liquidi che, sopprimendo la flora competitiva, favoriscono la crescita della specie desiderata. Il loro uso può essere preceduto da altri terreni liquidi, pre-arricchimenti, solo con funzioni rivitalizzanti;
- **selettivi:** contengono sostanze che favoriscono la crescita delle sole specie che le tollerano, inibendo le altre;
- **differenziali:** consentono di distinguere le specie attraverso variazioni di colore delle colonie, a seguito di reazioni biochimiche;
- **selettivi e differenziali,** lasciano crescere solo poche specie e queste, in seguito a reazioni biochimiche, presentano colonie con caratteristiche diverse.
- **di trasporto,** semisolidi, privi di sostanze nutritive, destinati a far sopravvivere i microrganismi nei campioni durante il trasporto.

DETERMINAZIONE DI PATOGENI NEGLI ALIMENTI



Analisi microbiologica per la rilevazione di patogeni negli alimenti determinano PRESENZA o ASSENZA



METODI DI RILEVAZIONE

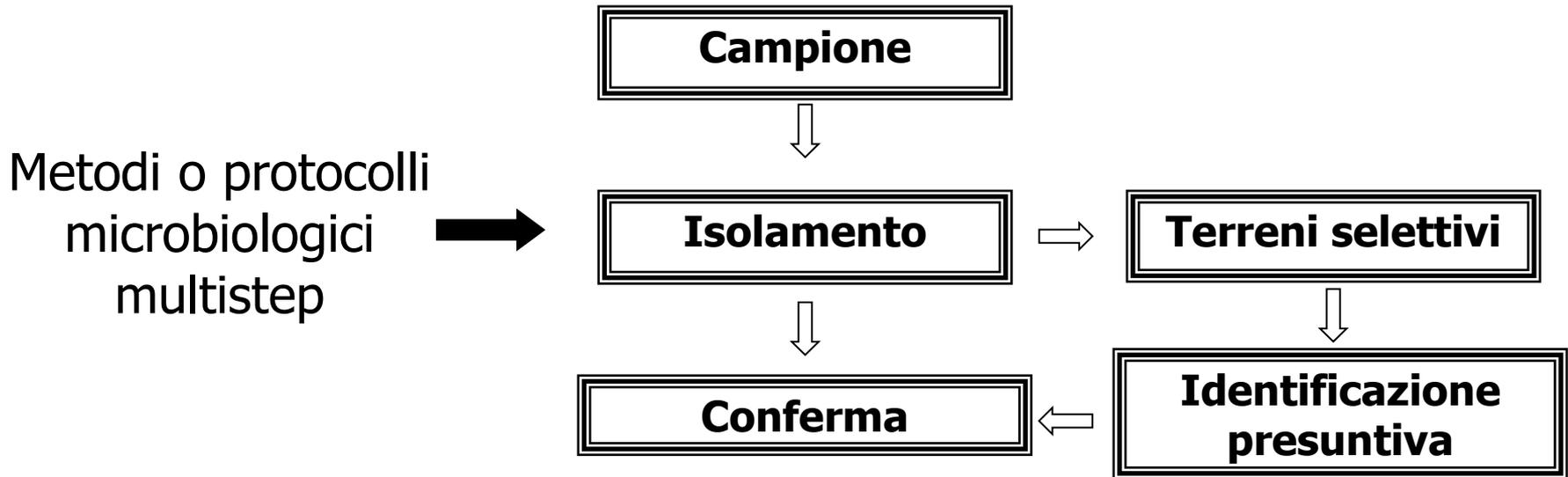
Patogeni che causano infezioni assenti da:

- Alimenti pronti al consumo
- Materie prime.

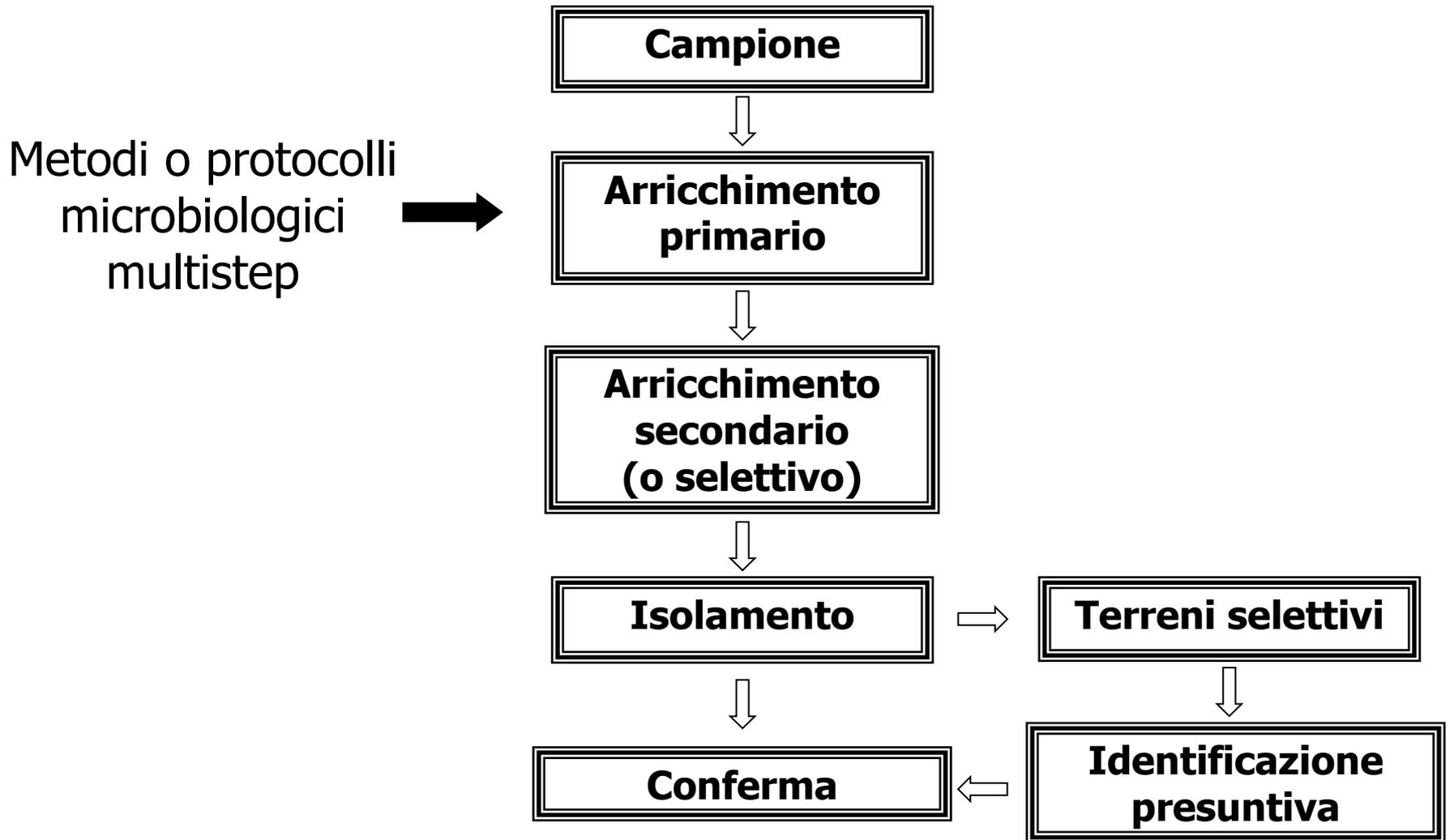
Bassa popolazione di microrganismi che causano intossicazione tollerati in caso di:

- Assenza di produzione di tossine nell'alimento
- Presenza di una fase di lavorazione che elimina o previene lo sviluppo del patogeno nell'alimento

PROCEDURA PER LA RILEVAZIONE DI **MICROORGANISMI** NEGLI ALIMENTI



PROCEDURA PER LA RILEVAZIONE DI **PATOGENI** NEGLI ALIMENTI



METODI DI RILEVAZIONE DI MICRORGANISMI NEGLI ALIMENTI

Metodi

