MBS-HACCP&ACQUE EASY TEST

SISTEMA BASE

MANUALE D'USO

M.B.S. Srl – Polo Tecnologico Tiburtino – Via Giacomo Peroni 386, 00131 Roma (IT)
C.F. e P.I. 09423051003, tel. +39.06.40040358 – fax +39.06.40040364
info@emmebiesse.net – www.emmebiesse.net

INDICE

1 INTRODUZIONE 3

2 DICHIARAZIONE DI ESCLUSIONE DI RESPONSABILITÀ 4

3 MODALITÀ DI UTILIZZO 4

3.1 Preparazione della fiala di analisi 5

3.2 Inserimento del campione 5

3.2.1 Campione solido 5

3.2.2 Campione liquido 6

3.2.3 Tampone di superficie 6

3.3 Controllo dell'esito dell'analisi 7

3.4 Sterilizzazione post-analisi 7

4 NOTE SULLE ANALISI MICROBIOLOGICHE 8

5 APPENDICE I 9

1 INTRODUZIONE

Gentile Utente, grazie per avere acquistato **MBS-HACCP&ACQUE EASY TEST**, un innovativo sistema colorimetrico rapido per eseguire analisi microbiologiche sugli alimenti e sulle acque, sviluppato in collaborazione con l'Università degli Studi Roma Tre.

Il metodo di analisi si basa sull'osservazione del cambiamento di colore della sospensione formatasi nella fiala di analisi in cui viene inserito il campione da analizzare: la sospensione cambia colore (vira) se sono presenti microrganismi; maggiore è la quantità di microrganismi, più rapido è il cambiamento di colore.

Il metodo MBS è stato validato secondo la norma ISO 16140:2003 "Microbiology of food and animal feeding stuffs – Protocol for the validation of alternative methods".

Sono disponibili i reagenti per la ricerca selettiva dei seguenti microrganismi:

1. Conta batterica totale – **CBT-L01**;
2. Coliformi – **CO-L02**;
3. *Escherichia coli* – **EC-L22**;
4. Enterobacteriaceae – **EB-L03**;
5. *Staphylococcus aureus* – **SP-L04**;
6. *Pseudomonas aeruginosa* – **PAO-L05**;
7. *Salmonella* spp. – **SL-L06**;
8. *Listeria* spp. – **LY-L07**;
9. *Enterococcus* spp. – **EF-L09**;
10. Lieviti – **SC-L11**.

Nota Bene: prima dell'uso si consiglia di scaricare le Schede di Dati di Sicurezza dal link: http://www.emmebiesse.net/schede-sicurezza/.

2 DICHIARAZIONE DI ESCLUSIONE DI RESPONSABILITÀ

MBS-HACCP&ACQUE Easy Test dovrà essere destinato solo all'uso per il quale è stato espressamente previsto; ogni altro uso è da considerarsi improprio e quindi pericoloso. È obbligo dell'utilizzatore osservare sotto la propria responsabilità le leggi e le disposizioni vigenti in materia di igiene e sicurezza.
MBS Srl, pertanto, declina ogni responsabilità per eventuali danni che possono, direttamente o indirettamente, derivare a persone, animali o cose in seguito all'impiego del prodotto.

3 MODALITÀ DI UTILIZZO

Il kit viene fornito in una confezione contente tutto il materiale per effettuare l'analisi: blister contenenti le fiale di analisi (fiala), blister contenenti i tappi sterilizzanti ed i fialoidi di acqua demineralizzata e vaselina (fialoide)
Tuttavia è necessario disporre anche di un incubatore termostatico da batteriologia programmabile a 30°, 37° o 44 °C.

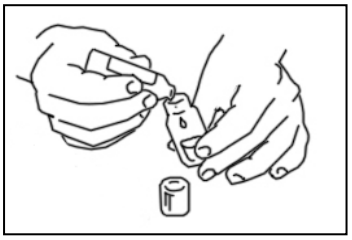
Prima di manipolare le fiale e di procedere con l'analisi si raccomanda un'accurata pulizia delle mani.
Inoltre, **si consiglia di attenersi alla normativa vigente per le procedure di campionamento e di seguire le indicazioni riportate nei paragrafi seguenti.**

Lo svolgimento dell'analisi può essere schematizzato in 5 fasi: preparazione della fiala di analisi, inserimento del campione, inizio analisi, fine analisi, sterilizzazione; la procedura operativa si differenzia per la tipologia di campione da analizzare: **campione solido, campione liquido** o **tampone di superficie**.

Nota Bene: per la ricerca di Salmonella spp. in 25 g di campione con il brodo di arricchimento selettivo ESL-A32, seguire le istruzioni operative riportate nell'Appendice I.

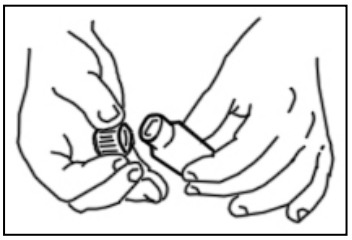
3.1 Preparazione della fiala di analisi

Tagliare con delle forbici il blister delle fiale per separarne una; aprirlo sollevando il cartoncino e prelevare la fiala.



Rimuovere il tappo provvisorio dalla fiala; aprire il fialoide di acqua e vaselina fornito, ed inserirne l'intero contenuto nella fiala.

Tagliare con delle forbici il blister dei tappi sterilizzanti per separarne uno; aprirlo sollevando il cartoncino e prelevare il tappo, avendo cura di non toccarne la parte interna per evitare contaminazioni.



Chiudere la fiala con il tappo sterilizzante e smaltire il tappo provvisorio in gomma.

Agitare capovolgendo la fiala più volte fino al completo dissolvimento del reagente (eventualmente anche con il vortex).

Nota Bene: nella fiala si sviluppano 2 fasi liquide: quella superiore costituita da olio di colore bianco trasparente (non varia durante l'analisi), quella inferiore costituita dall'acqua della fiala con cui viene disciolto il reagente. Il colore della seconda fase si svilupperà pienamente entro 15-20 minuti dal dissolvimento del reagente ed è quello che deve essere osservato per la valutazione del risultato dell'analisi.

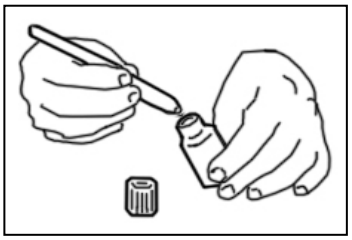
3.2 Inserimento del campione

3.2.1 Campione solido

Prelevare una piccola aliquota dell'alimento (corrispondente approssimativamente ad 1 g) con un utensile in uso durante la lavorazione dell'alimento stesso ed inserirla nella fiala di analisi (in alternativa si possono utilizzare pinzette sterili, eventualmente fornite

su richiesta).

Agitare accuratamente il campione capovolgendo la fiala più volte e, successivamente, inserirla nell'incubatore termostatico.



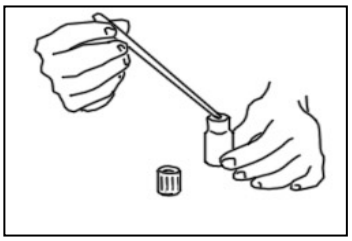
Nota Bene: la dimensione o il peso esatto del campione da esaminare non hanno importanza. Tuttavia il campione deve essere ridotto in frammenti molto piccoli (della dimensione massima di 2-3 mm). La variabilità statistica dell'esame microbiologico di campioni alimentari è tale che nessun metodo di analisi (compreso il metodo di riferimento) ha una variabilità inferiore a ± 60-70 %. Quindi, l'analisi ha lo stesso valore intrinseco se invece di 1 g si inseriscono nella fiala 2 g o 0.5 g. Questa variabilità è dovuta sia al metodo di analisi, sia al campione, sia agli stessi microrganismi poiché questi spesso crescono raggruppati in colonie e quindi non sono dispersi uniformemente nel mezzo.

Nota Bene: per l'inserimento del campione nella fiala, si consiglia di utilizzare un utensile in uso durante la lavorazione dell'alimento stesso in quanto, così facendo, si potranno evidenziare eventuali contaminazioni dell'alimento dovute a cause estrinseche.

3.2.2 Campione liquido

Prelevare con una pipetta pasteur sterile monouso (fornita su richiesta) circa 1 ml del liquido da esaminare ed introdurlo nella fiala.

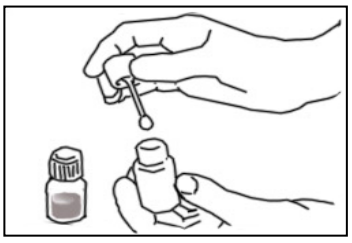
Agitare accuratamente il campione capovolgendo la fiala più volte e, successivamente, inserirla nell'incubatore termostatico.



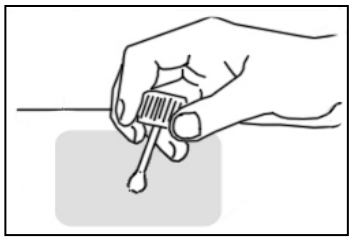
3.2.3 Tampone di superficie

Tagliare con delle forbici il blister dei tamponi con la soluzione neutralizzante (TM-A14) per separarne uno; aprirlo sollevando il cartoncino e prelevare il flacone.

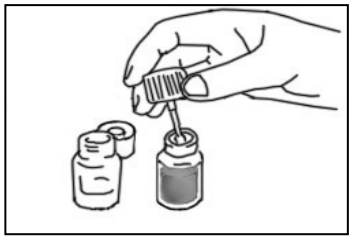
Aprire il flacone e strofinare il tampone sulla superficie da



analizzare cercando di coprire un'area quadrata di circa 10 cm di lato.



Inserire il tampone nella fiala di analisi e agitare accuratamente capovolgendola più volte; successivamente inserire la fiala nell'incubatore termostatico.



Nota Bene: non reinserire il tampone nel flacone contenente la soluzione neutralizzante.

Nota Bene: con il tappo della fiala di analisi è possibile richiudere il flacone contenente la soluzione neutralizzante prima di smaltirlo.

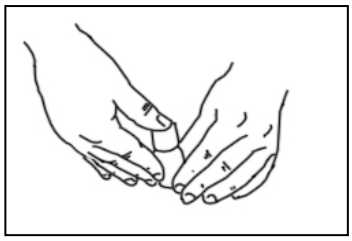
3.3 Controllo dell'esito dell'analisi

Se non si utilizza il dispositivo MBS-MR, è sufficiente controllare il colore della fiala di analisi una sola volta, trascorso un determinato numero di ore. La durata dell'analisi dipende, oltre che dal tipo di analisi, anche dal limite operativo di carica batterica accettabile nel campione (nelle Schede Controllo Qualità sono riportati, **a titolo puramente indicativo**, i limiti generalmente accettati per la tipologia di campione in esame, desunti dalla normativa vigente).

L'esito dell'analisi è da considerarsi positivo se, e solo se, si verifica il **viraggio completo** del contenuto della fiala.

3.4 Sterilizzazione post-analisi

Al termine dell'analisi, senza aprire la fiala, premere con forza la parte superiore del tappo ed agitare per circa 10 secondi.



Dopo una decina di minuti il contenuto della fiala risulta completamente sterilizzato.

Nota Bene: l'aggiunta dello sterilizzante può causare un cambiamento di colore.

Nota Bene: dopo sterilizzazione, la fiala può essere smaltita come rifiuto avente codice CER 180107 [Rifiuti prodotti dal settore sanitario e veterinario o da attività di ricerca collegate (tranne rifiuti di cucina e di ristorazione non direttamente provenienti dal trattamento terapeutico) - Rifiuti dei reparti di maternità e rifiuti legati a diagnosi, trattamento e prevenzione delle malattie negli esseri umani - Sostanze chimiche diverse da quelle di cui alla voce 18 01 06] e classe di pericolosità HP4.

4 NOTE SULLE ANALISI MICROBIOLOGICHE

Alimenti con caratteristiche chimico-fisiche particolari (es: basso peso specifico, forte acidità/alcalinità, elevata viscosità, marcata colorazione…) potrebbero interferire con l'analisi in modalità caso-specifiche.
In queste circostanze, si consiglia di diluire 1g o 1ml di campione in 10ml di solvente sterile idoneo (acqua peptonata tamponata, acqua distillata, soluzione fisiologica…) e di analizzarne 1ml; si noti che non è necessario rispettare esattamente le quantità indicate, poiché la variabilità statistica dell'analisi microbiologica è circa del 60–70%.
Nel caso in cui, dopo aver effettuato la diluizione, il campione non si sciolga completamente o si formino dei "fiocchi", è necessario prelevarne 1g e procedere secondo le modalità descritte precedentemente.
Al termine dell'analisi, è possibile risalire all'eventuale contaminazione iniziale tenendo conto della diluizione effettuata, così come previsto anche dai metodi di riferimento (ISO 7218:2007).

- Esempio 1
  Alimento: Insalata
  Tipologia di analisi: *Escherichia coli* (EC-L22)
  Fattore diluizione: 10; diluire circa 1g di alimento in 10ml di solvente
  Risultato analisi: 1.43E02 CFU/g

Contaminazione effettiva: **1.43E03 CFU/g**, ovvero 1.43E02 x **10** (fattore di diluizione).

Analogamente, prodotti contenenti additivi alimentari, come conservanti, regolatori di acidità, antiossidanti, emulsionanti, etc., potrebbero influenzare lo svolgimento dell'analisi. Si dovrà, pertanto, cercare la soluzione più opportuna per ogni singolo caso, oppure si dovrà effettuare la diluizione del campione, come sopra riportato.

- Esempio 2
  Alimento: Maionese
  Tipologia di analisi: Carica Batterica Totale a 30 °C (CBT-L01)
  Fattore diluizione: 10; diluire circa 1g di alimento in 10ml di solvente
  Risultato analisi: 2.58E04 CFU/g
  Contaminazione effettiva: **2.58E05 CFU/g**, ovvero 2.58E04 x **10** (fattore di diluizione).

5 APPENDICE I

La presente procedura si applica per l'impiego congiunto della fiala di analisi SL-L06 – *Salmonella* spp. e del flacone ESL-A32 – *Preparato monodose per Brodo di Arricchimento selettivo di Salmonella*.

Per procedere con la fase di arricchimento di un campione alimentare sono necessari:

- un flacone di ESL-A32;
- un sacchetto di plastica sterile ad alta resistenza (es: sacchetti da stomacher), non fornito con il kit;
- soluzione fisiologica sterile (NaCl 0.9%), non fornita con il kit.

Sciogliere il contenuto di un flacone ESL-A32 in 225 ml di soluzione fisiologica sterile.

Pesare 25 g dell'alimento da analizzare in un sacchetto di plastica sterile ed aggiungere il brodo di arricchimento ricostituito.
Miscelare o omogeneizzare per circa 2 minuti; incubare a 37 °C ± 1 °C per 18 h ± 2 h.
Inoculare 1 ml della coltura ottenuta nella fiala SL-L06, e proseguire l'analisi seguendo le istruzioni operative precedentemente descritte.

Dopo massimo 48 ore l'analisi è conclusa con 2 soli esiti possibili:

- viraggio al giallo della fiala di analisi, che indica la **presenza** di *Salmonella* spp.;
- nessun viraggio, che indica l'**assenza** di *Salmonella* spp.

Nota Bene: qualora si riscontrasse la presenza di Salmonella spp., si consiglia di effettuare dei test di conferma, come previsto dalla ISO 6579:2002.