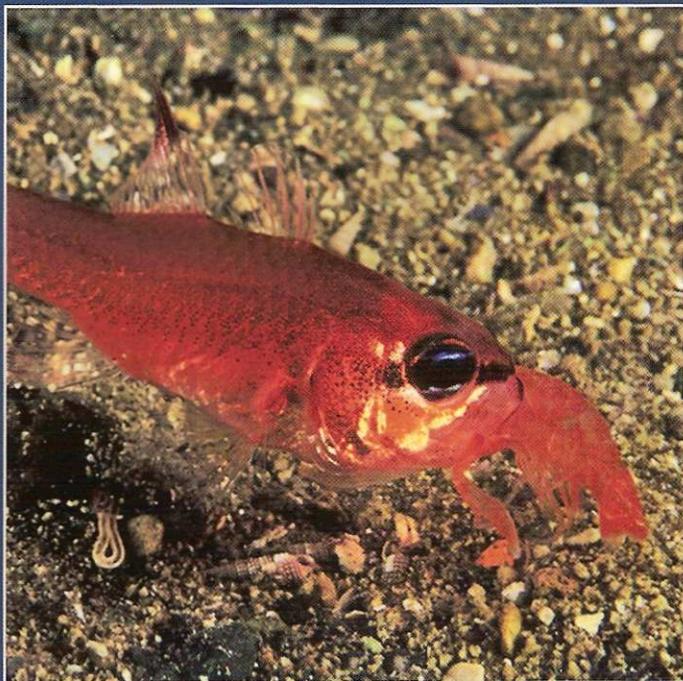


BIOLOGI ITALIANI



ORGANO UFFICIALE DELL'ORDINE NAZIONALE DEI BIOLOGI



"IN CASO DI MANCATO RICEPIUTO, RINVIARE A UFFICIO POSTE ROMA ROMANINA PER LA RESTITUZIONE AL MITTENTE PREVIO ADDEBITO" - ROMA - ISSN 0392-2510

Il metodo di analisi *Micro Biological Survey* (MBS) per la rilevazione selettiva e la conta di microrganismi negli alimenti

S. Salvucci¹, F. R. Priolisi¹, E. Lo Cicero¹, M.T. Massucci¹, A. Mari¹, A. Antonini¹, A. Capodaglio¹,
E. Codega², M. Mereghetti², M. Albano², R. Messi³, G. Tarsitani⁴,
M.F. Giardi⁵, F. Giansanti⁵, G. Persiani⁶, G. Marinelli⁶, L. Leboffe⁷, M. Marini Padovani⁷, G. Antonini⁷

¹MBS srl, Roma

²Settore analisi alimentare e ambientali. Laboratorio di Analisi Mediche Sant'Ambrogio s.r.l. Cinisello Balsamo (Milano)

³Dipartimento di Fisica e INFN, Università di Roma Tor Vergata, Roma

⁴Dip di Scienze di Sanità Pubblica "G.Sanarelli", Sapienza Università di Roma, Roma

⁵Dipartimento di Biologia di Base ed Applicata, Università di L'Aquila, L'Aquila

⁶Dipartimento di Medicina Interna e Sanità Pubblica, Università di L'Aquila, L'Aquila

⁷Dipartimento di Biologia, Università Roma Tre, Roma

Introduzione

È noto come la nuova tecnica internazionale UNI CEI EN ISO/IEC 17025 abbia utilizzato criteri decisamente innovativi oltre che di indubbia efficacia, relativamente alla scelta dei metodi di prova. Tali criteri appaiono di estrema utilità in particolare nel settore della sicurezza dei prodotti destinati alla alimentazione. In tale ambito nel contesto di metodi microbiologici, non di rado non è possibile fare riferimento a metodi normativi per prove relative a determinati substrati, oppure i metodi disponibili non appaiono adeguati alla fondamentale esigenza di garantire la attendibilità dei risultati in tempi compatibili con le decisioni che devono essere conseguentemente intraprese.

In questo contesto si inserisce il metodo Micro Biological Survey (MBS) contraddistinto dal requisito fondamentale della rapidità in grado di rilevare l'eventuale presenza di una contaminazione batterica ed ottenere risultati anche il giorno stesso dell'analisi.

Il metodo Micro Biological Survey (MBS) è un sistema colorimetrico rapido, sviluppato dall'Università degli Studi Roma Tre, per la rilevazione e conta selettiva dei microrganismi in prodotti agroalimentari le cui caratteristiche principali sono di seguito esplicitati.

- Misurare l'attività catalitica di enzimi ossidoreduttasici del metabolismo primario, permettendo quindi di stabilire una corrispondenza inequivoca tra attività enzimatica misurata e carica microbica presente nel campione.
- Permettere, a parità di selettività rispetto alle metodiche tradizionali di riferimento che si basano sulla replicazione cellulare, una sensibile riduzione dei tempi di analisi.
- Consentire determinazioni quantitative anche su campioni solidi senza ricorrere alla determinazione dell'MPN (Most Probable Number).
- Avere una sensibilità tale da rilevare i differenti microrganismi, fino al limite teorico di 1 CFU/ml.
- Risultare economico (costo globale di una singola prova decisamente inferiore a quello dei metodi tradizionali), oltre che di facile esecuzione e tale da poter essere applicata anche in strutture analitiche non dotate di particolari attrezzature.

Metodologia di analisi

La procedura analitica del metodo colorimetrico quantitativo Micro Biological Survey (MBS) è basata sulla rilevazione colorimetrica, attraverso indicatori redox, del cambiamento dello stato ossidoriduttivo del mezzo di reazione, dovuto all'azione degli enzimi del metabolismo primario (ossidoreduttasi coinvolte nella respirazione e fermentazione) posseduti dai microrganismi.

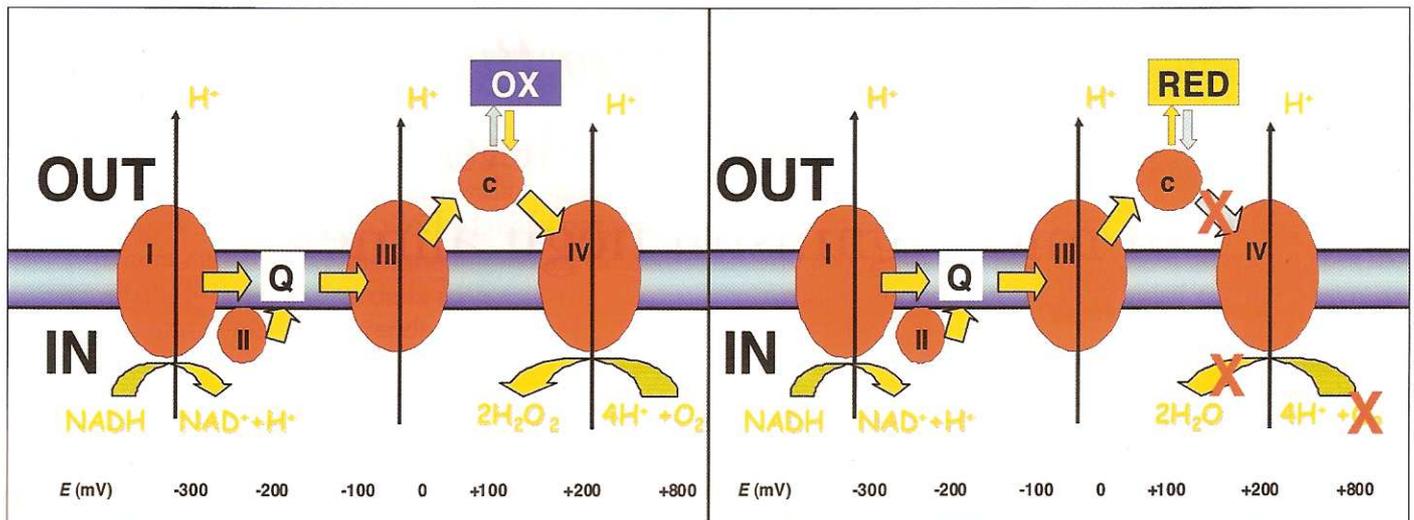


Fig. 1 - Flusso degli elettroni nella catena respiratoria in presenza di ossigeno (sinistra) ed in assenza di ossigeno (destra) e correlazione con lo stato redox dell'indicatore. Nella figura è rappresentata la catena respiratoria mitocondriale che presenta molte analogie con quelle dei differenti microrganismi. Il trasferimento di elettroni avviene secondo la scala di potenziale indicata con approssimazione in basso. L'energia libera derivante dal trasferimento di elettroni viene utilizzata dai Complessi I, III e IV per traslocare protoni contro gradiente (pompa protonica), generando il potenziale elettrochimico utilizzato dalla cellula per tutti i processi bioenergetici. In presenza di ossigeno (pannello di sinistra), il flusso di elettroni passa dal Complesso I al Complesso III ad opera di un trasportatore Q (analogo del coenzima Q) e dal Complesso III al Complesso IV ad opera di una proteina esterna alla membrana (che nei mitocondri è il citocromo c) e dal Complesso IV (ossidasi terminale che nei mitocondri è la Citocromo ossidasi) all'ossigeno in modo che non si liberino pericolosi intermedi di riduzione dell'ossigeno. L'indicatore redox che è in grado di scambiare elettroni con il citocromo c rimane nella forma ossidata (OX). In assenza di ossigeno (pannello di destra), il flusso di elettroni passa dal Complesso I al Complesso III al Complesso IV ma non può essere trasferito all'ossigeno. L'indicatore redox che è in grado di scambiare elettroni con il citocromo c viene trasformato nella sua forma ridotta (RED).

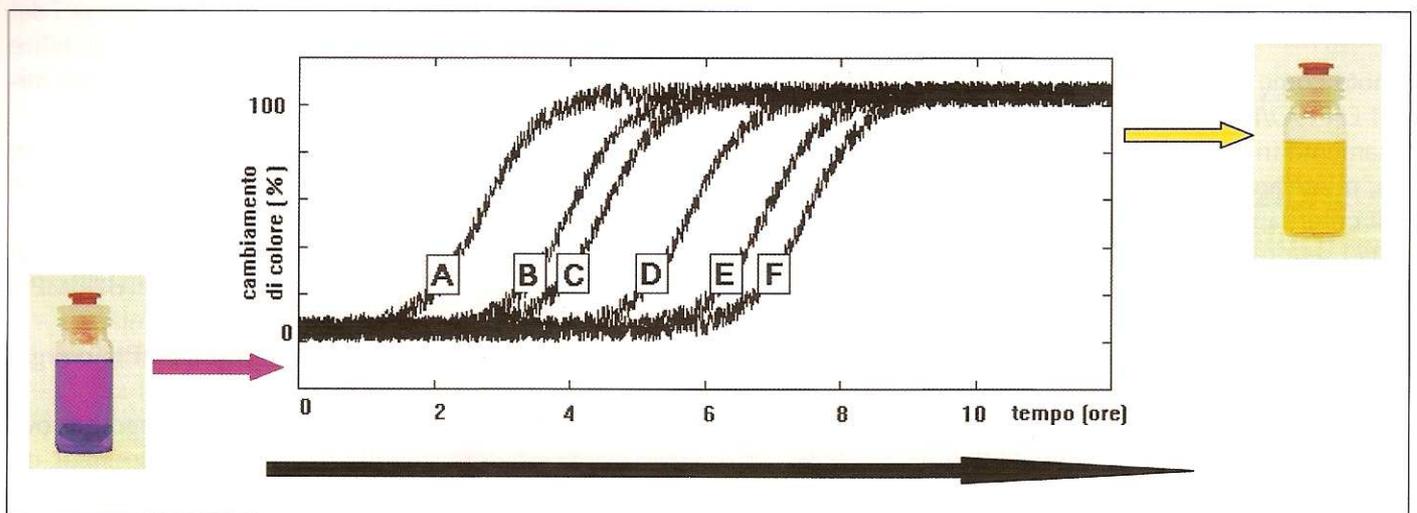


Fig. 2 - Variazione di colore in funzione del tempo trascorso dall'analisi. La lettera sulla traccia indica i differenti campioni. Alcuni campioni contaminati con quantità scalari di microrganismi sono stati posti in 6 differenti fiale di reazione (denominate A; B; C; D; E; F). All'inizio dell'analisi il contenuto delle fiale apparirà di colore viola. Con il passare del tempo, e dopo un tempo inversamente proporzionale al contenuto di batteri nel campione, il colore del campione all'interno della fiala è virato verso il colore giallo.

Infatti, vengono utilizzate sostanze riducenti ed indicatori redox in grado di scambiare elettroni con i componenti della catena respiratoria; finché è presente ossigeno, l'indicatore rimarrà nello stato ossidato. Solo quando l'ossigeno sarà terminato, l'indicatore verrà ridotto e cambierà colore (Fig. 1).

Analogamente a quanto avviene per un dosaggio di un enzima, viene fornito un substrato e misurato il prodotto.

Gli indicatori redox hanno la proprietà di cambiare colore quando viene modificato lo stato ossidoriduttivo del mezzo. Il metodo colorimetrico quantitativo MBS perciò misura la carica batterica di un campione rilevando l'attività degli enzimi batterici del metabolismo primario, mentre i metodi tradizionali utilizzano la capacità replicativa dei microrganismi. Altri metodi colorimetrici attualmente in uso si basano sulle proprietà

cataliche di enzimi del metabolismo secondario (es. beta-glucuronidasi) e permettono una analisi quantitativa solo ricorrendo alla complessa procedura del Most Probable Number (MPN).

Il metodo colorimetrico MBS permette di determinare in modo semplice e preciso le cariche microbiche presenti nel campione. Infatti, è noto che il tempo necessario per il viraggio è inversamente correlato con il logaritmo del numero di microrganismi presenti nel campione da analizzare.



Fig. 3 - Fiala monouso che viene fornita pronta all'uso, sterile e contenente tutti i reagenti necessari per l'analisi. La fiala ha una capacità totale di circa 13 ml e deve essere riempita con il campione da esaminare (ca. 1 g) e con 10 ml di acqua sterile che viene fornita in un fialoide presente nella confezione.

Una carica elevata di microrganismi (es. brodocoltura in fase stazionaria) fa virare l'indicatore in poche ore, mentre concentrazioni batteriche minori fanno virare l'indicatore in tempi via via più lunghi. L'assenza del viraggio dopo 12-15 ore viene interpretato come l'assenza dei microrganismi.

Questo fenomeno è analogo a quello osservabile in una qualsiasi reazione enzimatica in cui maggiore è la quantità di enzima presente, minore è il tempo necessario al compimento della reazione stessa (Fig. 2).

Procedura operativa

Il metodo si basa sull'utilizzo di una fiala monouso che viene fornita pronta all'uso, sterile e contenente tutti i reagenti necessari per l'analisi (Fig. 3). La procedura operativa del metodo avviene in 6 fasi (Fig. 4).

In dettaglio, le 6 fasi della procedura operativa sono:

1. **Introduzione del campione** Dopo apertura della fiala di reazione, il campione viene introdotto in quantità adeguata. È preferibile inserire circa 1 g di prodotto ma non è necessario pesare il campione in quanto, per la variabilità statistica della contaminazione microbiologica del campione, qualunque quantità di campione tra 0.5 e 1.5 g sarà idonea per l'analisi. È importante notare che possono essere inseriti campioni solidi senza alcun pre-trattamento, in quanto vengono rilevati anche batteri aggregati o presenti all'interno del campione. In caso di alimenti fortemente colorati può essere opportuno ridurre la quantità di campione da esaminare.

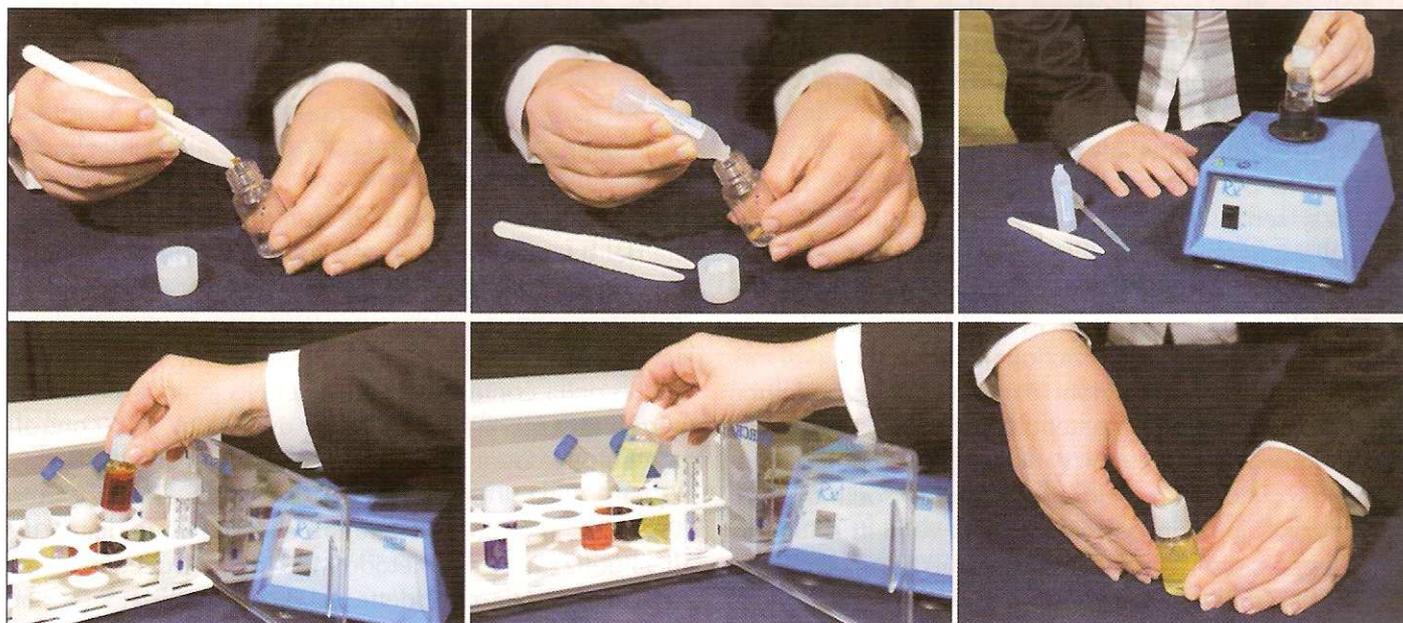


Fig. 4 - Procedura operativa del metodo MBS in 6 fasi: Le 6 fasi illustrate corrispondono a: 1) inserimento del campione. 2) Inserimento dell'acqua sterile. 3) Agitazione per dissolvere il reagente contenuto nella fiala. 4) Inserimento della fiala nel termostato. 5) Osservazione dell'eventuale cambiamento di colore della fiala al termine dell'analisi. 6) Sterilizzazione post-analisi per lo smaltimento in sicurezza.

2. **Inserimento dell'acqua sterile** Nella confezione viene anche fornito un fialoide in PET contenente 10 ml di acqua sterile che l'operatore deve inserire nella fiala di reazione premendo leggermente le pareti del fialoide.
3. **Agitazione** Dopo l'inserimento del campione e dell'acqua sterile, la fiala di reazione viene chiusa ed agitata brevemente per permettere il completo dissolvimento del reagente. In circa 10 minuti si svilupperà il colore di inizio analisi, in cui l'indicatore redox è completamente ossidato.
4. **Inserimento della fiala nel termostato.** La fiala deve quindi essere inserita in un termostato per favorire la crescita dei microrganismi. La temperatura di analisi può variare tra i 30 °C per l'analisi della carica batterica mesofila ed i 44°C per l'analisi dei coliformi fecali, anche se per la maggior parte delle analisi è opportuno riferirsi alla temperatura di 37°C.
5. **Termine dell'analisi.** Per valutare esattamente la concentrazione batterica si potrebbe osservare ad intervalli di tempo prefissati (ad esempio 1 ora) il colore del contenuto della fiala di reazione. In base ad una tabella di correlazione (che l'utilizzatore del metodo, ai sensi della norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025, dovrà aver provveduto a verificare nelle proprie condizioni di utilizzo), ad ogni tempo di viraggio corrisponde una ben determinata concentrazione microbica. Tuttavia, nella pratica è preferibile controllare solo una volta, dopo un tempo prefissato in base alle caratteristiche del campione l'eventuale viraggio del contenuto della fiala con la scala cromatica (concetto del valore soglia). Ad esempio, nel caso si voglia controllare che un campione contenga meno di 1×10^5 microrganismi, basta controllare dopo 8 ore che il colore sia ancora quello iniziale (blu o grigio-blua-stro) e non abbia raggiunto il colore giallo che indica la positività del campione.
6. **Sterilizzazione post-analisi.** La auto-sterilizzazione post-analisi permette lo smaltimento della fiala in sicurezza, senza ulteriori problemi. Dopo una qualsiasi analisi microbiologica, il materiale biologico che è stato utilizzato per l'analisi deve essere reso innocuo prima della sua eliminazione. In laboratorio questo viene ottenuto con una sterilizzazione in autoclave. Nel metodo MBS la sterilizzazione è ottenuta utilizzando uno sterilizzante chimico contenuto nel tappo serbatoio del flaconcino. Come sterilizzante chimico in polvere viene utilizzato sodio dicloroisocianuro (o sodio dicloro-s-triazinetriene) in polvere che una volta in soluzione sviluppa cloro (cloro libero circa il 60% in peso). È un prodotto poco tossico verso l'uomo (LD50 p.o. 5 g/kg) utilizzato nella disinfezione dell'acqua, nei detersivi per lavastoviglie e per la sterilizzazione dei biberon e delle tettarelle dei neonati. Le prove sperimentali effet-

tuate su flaconcini utilizzati indicano che 15 minuti dopo aver dissolto il reagente nel flaconcino, tutto il suo contenuto è stato sterilizzato.

Selettività

Per inibire la crescita dei microrganismi indesiderati e stimolare lo sviluppo dei microrganismi oggetto degli studi, possono essere importate sostanze organiche (es. tensioattivi), antibiotici (es. polimixina) ed anche sali minerali particolari (es. CsCl) o presenti in quantità non fisiologiche (es. NaCl). Pertanto, il grado di selettività del metodo colorimetrico quantitativo MBS è analogo a quello ottenibile con metodiche tradizionali. Sono attualmente disponibili i reattivi per la conta selettiva di:

1. Carica batterica totale mesofila (validato)
2. *Escherichia coli* e coliformi (validati)
3. Enterobatteri (in validazione)
4. *Staphylococcus aureo* (in validazione)
5. *Pseudomonas aeruginosa* (in validazione)
6. *Salmonella spp* (in validazione)
7. *Listeria spp.* (in validazione)
8. *Enterococcus faecalis* (*Streptococco*) *fecale* (in validazione)
9. Muffe e lieviti (in validazione)
10. Reattivi per la conta selettiva di altri microrganismi (*E. coli* 0157, *Clostridi solfito riduttori*, *Legionella spp.*) sono in fase di sperimentazione.

Per valutare il grado di selettività, per ogni reattivo è stata determinata la quantità minima di microrganismi in grado di indurre un cambiamento di colore (risposta positiva) dopo 24 ore. Il risultato è illustrato nella Tabella 1.

Validazione primaria

Per valutare l'accuratezza, la riproducibilità e la sensibilità del metodo MBS è stata svolta una prima validazione condotta secondo la norma ISO ENV ISO 13843 ("Water quality. Guidance on validation of microbiological methods"). Il metodo di riferimento adottato è stato quello della conta su terreno selettivo in accordo con la norma ISO 9998 ("Practices for evaluating and controlling colony count media used in water quality tests"). Ai sensi della norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025, (punto 5.4 "Metodi di prova e taratura e validazione dei metodi") l'utilizzatore del metodo MBS dovrà procedere autonomamente alla cosiddetta validazione secondaria che consiste essenzialmente nella dimostrazione di essere in grado di applicare correttamente il Metodo MBS e garantire che tale metodo soddisfi le esigenze di analisi.

Tab. 1 - Matrice della selettività dei reattivi sviluppati per il metodo MBS. Per ogni reattivo (righe) è stata determinata la quantità minima dei differenti microrganismi (colonne) in grado di indurre una risposta positiva entro il tempo limite di 24 ore. NO indica l'assenza di cambiamento di colore.

Reattivo	Microorganismo (limite inferiore di rilevamento) CFU / Campione							
	CBT	Coli	ST.Aerug	Ps.Aerug	Enterob	Salmonella	Listeria	Liev. funghi
CBT	~ 1	~ 1	~ 1	~ 1	~ 1	~ 1	~ 1	~ 1
Coli	No	~ 1	No	No	No	No	No	No
St. Aureo	No	No	~ 1	10 ⁶	No	No	No	No
Ps. Aeruginosa	No	10 ⁵	10 ⁶	~ 1	No	10 ⁵	10 ⁵	No
Entero - Batteri	No	~ 1	No	10 ⁵	~ 1	~ 1	No	No
Salmonella	No	No	No	No	No	~ 1	No	No
Listeria	No	No	No	No	No	No	~ 1	No
Lieviti e funghi	No	10 ⁸	No	10 ⁸	No	No	No	~ 1

Tab. 2 - Analisi della varianza ad un fattore

Sorgente della variazione	Gradi di libertà (DF)	Somma dei quadrati (SS)	Media quadratica (MS=SS/DF)	valore di F (**/)**
tra i metodi	(2-1)=1	(A)= 2.612e-4	2.612e-4*	0.0147
tra le osservazioni	(30-2)=28	(C)= 0.4992	0.0178 **	
totale	(30-1)=29	(A+C=B)= 0.4995	0.0172	

Tab. 3 - Analisi della varianza a due fattori

Sorgente della variazione	Gradi di libertà (DF)	Somma dei quadrati (SS)	Media quadratica (MS=SS/DF)	valore di F (**/)**
campioni (5)	4	0.0870 (S)	0.0217	
analisi (2)	1	2.66e-4 (M)	2.66e-2	
interazioni	4*1=4	8.58e-2 (I)	2.15e-2 *	0.264
errore	20	3.25e-1 (R)	1.63e-2 **	

Il metodo colorimetrico MBS è stato confrontato con il metodo delle conte su piastra per la rilevazione e conta differenziale di microrganismi totali e di coliformi in campioni di acqua superficiale. I campioni naturali di acqua superficiale erano naturalmente contaminati con microrganismi fino a 1×10^6 CFU/ml con diluizione successive in brodo lattosato fino a 10^{-8} . La prova è stata eseguita su Coliformi, definiti come gruppo di bacilli Gram negativi, negativi al test della ossidasi e positivi a quello della catalasi, resistenti agli acidi biliari e capaci di utilizzare il lattosio con formazione finale di acidi organici e gas.

Nella conta su piastra sono state considerate positive solo le colonie di colore rosso mattone visibili dopo 36 ore su terreno solido MacConkey. Nel metodo colorimetrico MBS è stato considerato positivo il cambiamento di colore (rosso → giallo).

Analisi statistica:

1. analisi della varianza ad un fattore (ANOVA test):

Paragone tra due tipi di analisi, considerando la diluizione per tutte le osservazioni effettuate (Tabella 2).

$F(1,28)=0.0147$. Poiché limite 1% per 1,28 gradi di libertà = 4.17 **le differenze tra i metodi non sono statisticamente significative.**

2. Analisi della varianza a due fattori Paragone tra due tipi di analisi, ciascuna provata a più diluizioni o su differenti campioni, usando più determinazioni per la stessa diluizione o per lo stesso campione (Tabella 3).

$F(4,20)=0.264$. Poiché limite 1% per 4,20 gradi di libertà = 2.87; **le differenze tra i metodi non sono statisticamente significative.**

3. stima dell'incertezza E' stata valutata la ripetibilità di differenti misure su una stessa diluizione del campione. Poiché nella conta colorimetrica i campioni vengono osservati ogni 30 minuti, viene assunto un errore massimo possibile di 0.5 ore.

Conta su piastra: Media quadratica dello scarto relativo=0.3363.

Conta colorimetrica: Media quadratica dello scarto relativo=0.0537.

L'incertezza sulla misura è maggiore per il metodo delle conte su piastra.

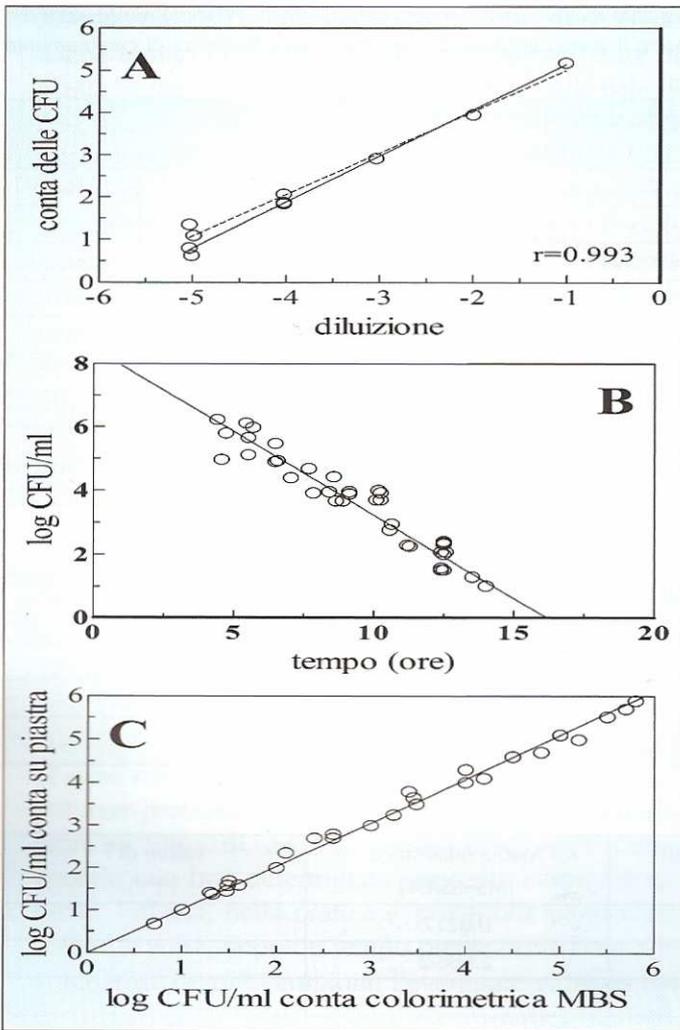


Fig. 5 - Analisi grafica:

PANNELLO A linearità della risposta ottenuta mediante la conta su piastra delle CFU/ml. Il logaritmo della conta su piastra delle CFU per ml è stato messo in grafico contro la diluizione. La regressione lineare ha dato un alto valore di correlazione ($r=0.993$). La pendenza della retta (linea continua=1.04) ha dato un valore vicino al valore teorico (linea tratteggiata=1.00), probabilmente per una leggera sottostima alle diluizioni maggiori. Dalla regressione lineare si ricava anche la stima del contenuto iniziale del campione: $10^{(6.09)}=1.23 \times 10^6$. Facendo la media delle conte (tenendo in considerazione le diluizioni) si ottiene: $1.05 + 0.46 \times 10^6$ (ovvero $+ 43\%$).

PANNELLO B Retta di correlazione tra concentrazione di coliformi (espressa come log cfu/ml) e tempo occorso per il cambiamento di colore. La correlazione tra i tempi e le concentrazioni dei coliformi (r) è uguale a 0.977, molto vicino al valore limite di 1.0. La regressione lineare dei punti fornisce l'equazione della retta: $\log \text{CFU/ml} = 8.48 - 0.53 \times \text{tempo (ore)}$.

PANNELLO C Paragone grafico tra i metodi Il logaritmo delle conte su piastra delle CFU/ml ottenuti alle differenti diluizioni, è stato messo in grafico rispetto al logaritmo della conta con metodo colorimetrico, espresso anch'esso come CFU/ml. Questo grafico permette una immediata visualizzazione della corrispondenza tra due metodi di analisi. La linea retta rappresenta la corrispondenza tra le conte effettuate con il metodo della conta su piastra ed il metodo colorimetrico. Il valore ottenuto (1.005) è molto vicino al valore teorico di completa corrispondenza (1.00). Inoltre, l'alto valore di correlazione ($r=0.982$) indica una piccola dispersione dei punti sperimentali che risultano vicini alla retta.

Analisi grafica (Fig. 5)

Una seconda validazione è stata condotta secondo i criteri stabiliti dalla norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025. Le prove per validare il metodo MBS di nuova formulazione, sono state effettuate utilizzando, quale materiale di riferimento, colture di microrganismi NCTC a titolo noto certificati. Il metodo di riferimento adottato è stata la conta su piastra in accordo con il metodo UNICHIM N. 956 (2001) "Water intended for human consumption". L'analisi statistica dei dati ha confermato i dati ottenuti dalla prima validazione, evidenziando precisione e sensibilità del metodo MBS fino al limite teorico di 1 CFU/ml (Figura 6).

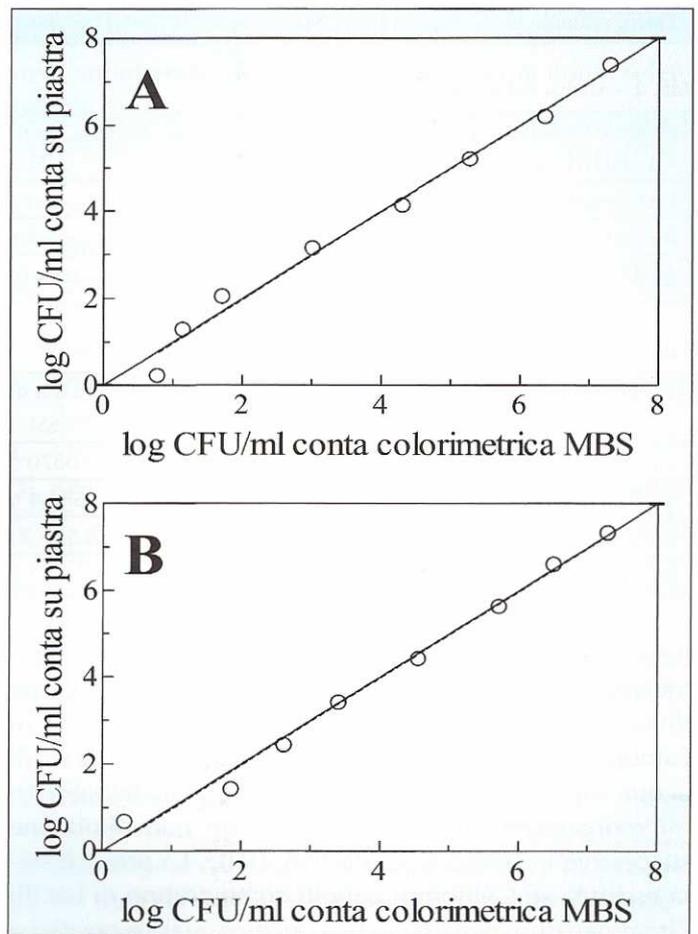


Fig. 6 - Paragone grafico tra i metodi Il logaritmo delle conte su piastra delle CFU/ml ottenuti alle differenti diluizioni utilizzando colture di microrganismi NCTC a titolo noto certificati, è stato messo in grafico rispetto al logaritmo della conta con metodo colorimetrico, espresso anch'esso come CFU/ml. Questo grafico permette una immediata visualizzazione della corrispondenza tra due metodi di analisi. La linea retta rappresenta la corrispondenza tra le conte effettuate con il metodo della conta su piastra ed il metodo colorimetrico. I valori ottenuti (1.002 e 0.998) sono molto vicini al valore teorico di completa corrispondenza (1.00). Inoltre, l'alto valore di correlazione ($r=0.98$) indica una piccola dispersione dei punti sperimentali che risultano vicini alla retta.

Pannello sopra A: Carica batterica mesofila

Pannello sotto B: Coliformi

Risultati su campioni reali

1. Analisi delle superfici: L'analisi delle superfici con il metodo MBS è stata effettuata utilizzando un tamponcino portato sulla superficie da esaminare e quindi inserito nel flaconcino. L'analisi di controllo è stata effettuata con le piastre RODAC per l'analisi delle superfici. L'analisi è stata effettuata in un ristorante in tre momenti differenti, corrispondenti a tre differenti situazioni lavorative: all'apertura mattutina del ristorante (T0), dopo lavorazione, ovvero al termine del pranzo di mezzogiorno (T1) e dopo la pulizia intermedia che viene effettuata tra il pranzo di mezzogiorno e la cena serale (T2) (Figg. 7 e 8). E' interessante notare come la maggior differenza tra le analisi effettuate con il metodo MBS e quelle con la conta su piastre RODAC si ha sulle superfici rugose, in cui evidentemente la piastra RODAC sottostima la carica batterica perché non riesce a prelevare i microrganismi localizzati nella rugosità tra gli interstizi.

2. Analisi degli alimenti: L'analisi di alimenti con il metodo MBS è stata effettuata inserendo direttamente 1 g di ciascun alimento nel flaconcino. L'analisi di controllo è stata effettuata utilizzando la tecnica di conta su piastra dopo omogenizzazione del campione ed allestimento di diluizioni seriali (Fig. 9). Il tempo necessario per l'analisi con il metodo MBS è stato messo in relazione al logaritmo delle CFU ottenuto con il metodo della conta su piastra. Le linee parallele indicano i limiti di confidenza 90%. La dispersione dei punti sperimentali è da attribuirsi alla incertezza intrinseca del metodo della conta su piastra che è risultata circa 10 volte superiore rispetto alla incertezza del metodo MBS.

3. Analisi delle acque superficiali: L'analisi di campioni di acqua superficiale (fiume, torrente, lago, acquitrino) con il metodo MBS è stata effettuata inserendo direttamente 1 ml di acqua nel flaconcino utilizzando una pipetta sterile. L'analisi di controllo è stata effettuata utilizzando la tecnica di conta su piastra dopo allestimento di diluizioni seriali (Fig. 10).

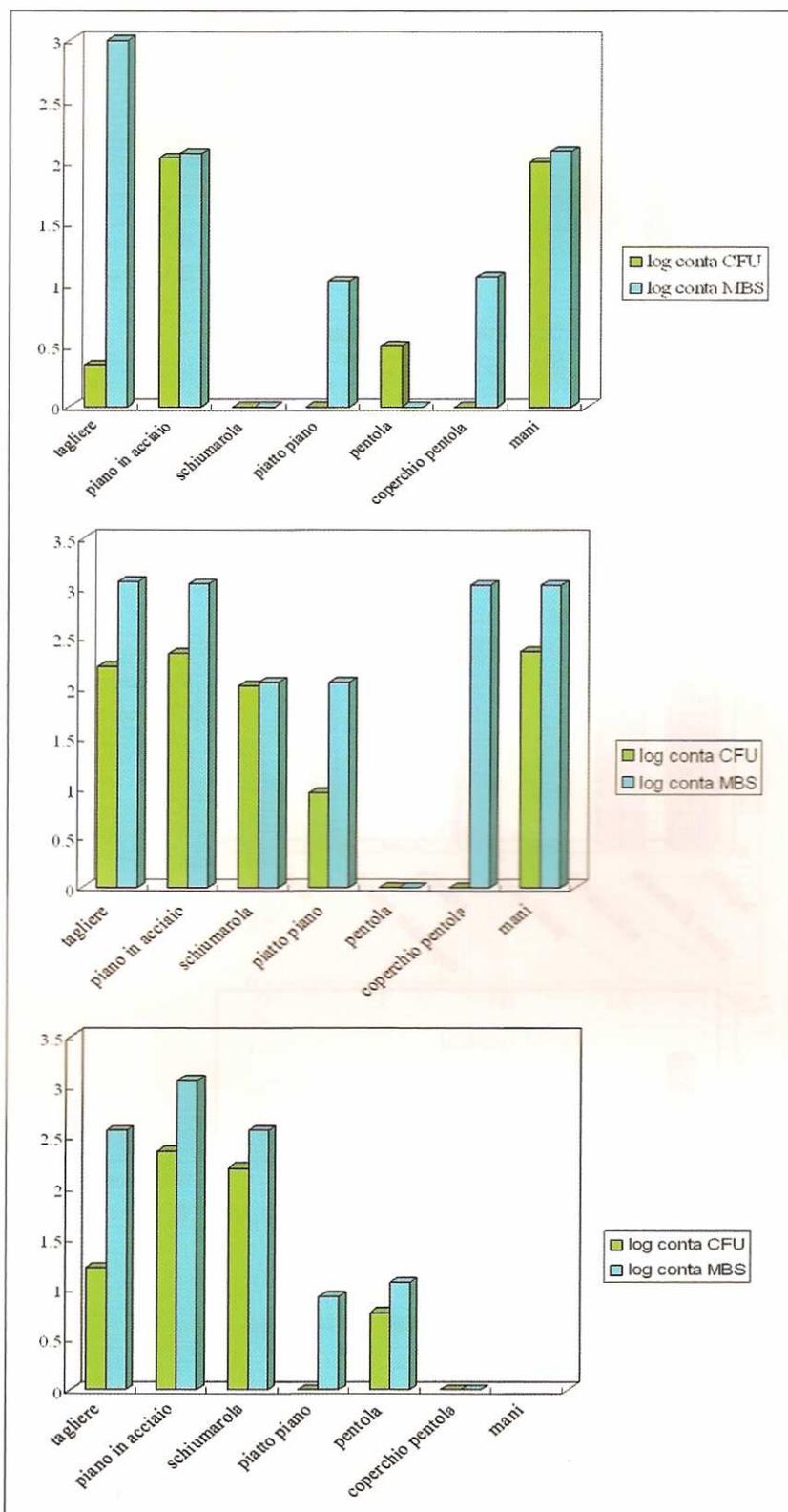


Fig. 7 - Analisi delle superfici (Carica batterica totale). Sono riportati a confronto il logaritmo delle CFU ottenuto con il metodo MBS e quello ottenuto con il metodo della conta su piastra. L'analisi delle superfici con il metodo MBS è stata effettuata utilizzando un tamponcino strofinato sulla superficie da esaminare e quindi inserito nel flaconcino. L'analisi di controllo è stata effettuata con le piastre RODAC. L'analisi è stata effettuata in un ristorante in tre momenti differenti, corrispondenti a tre differenti situazioni lavorative: all'apertura mattutina del ristorante (T0), dopo lavorazione, (T1) e dopo la pulizia intermedia (T2).

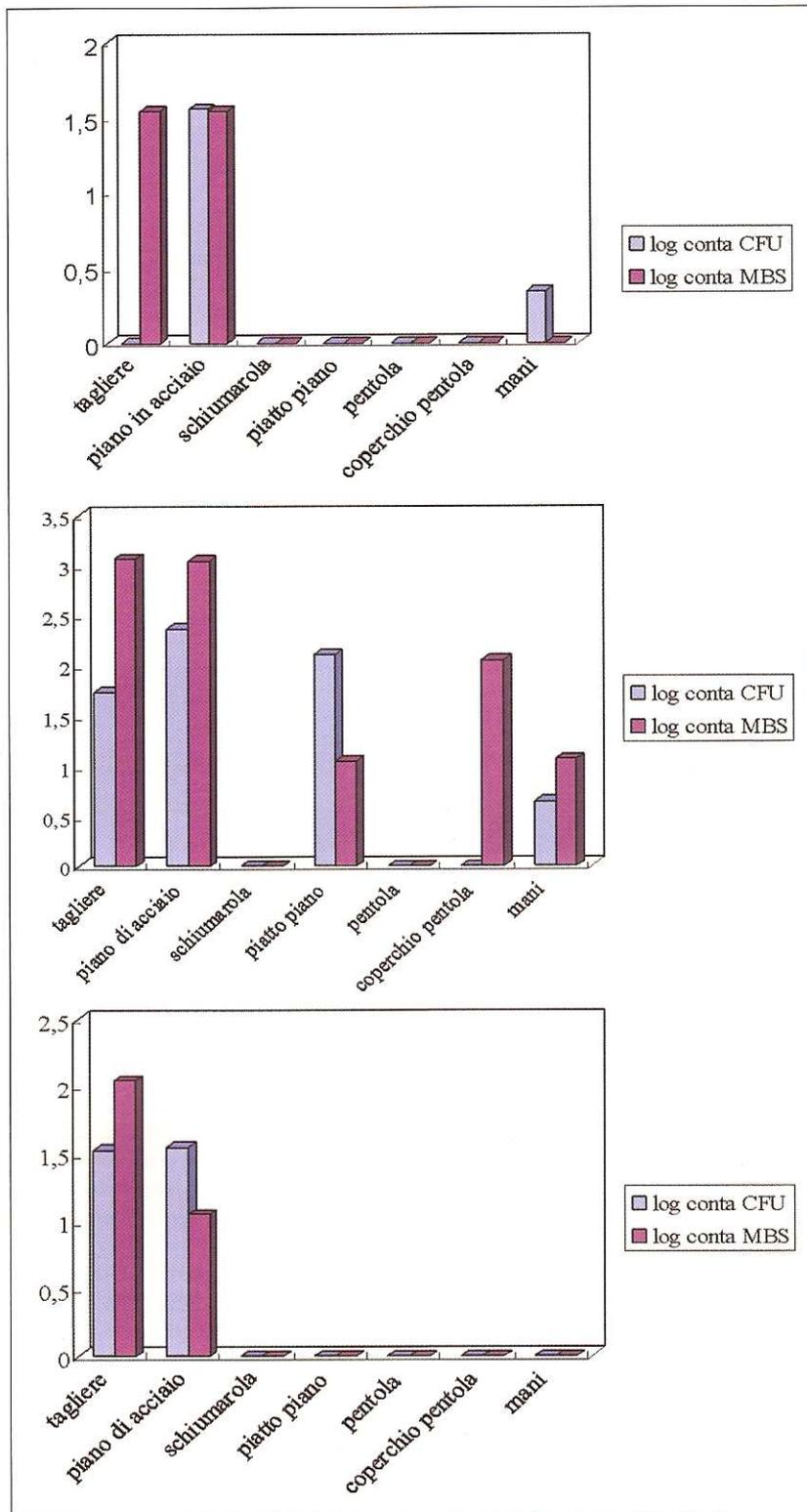


Fig. 8 - Analisi delle superfici (Coliformi). Sono riportati a confronto il logaritmo delle CFU ottenuto con il metodo MBS e quello ottenuto con il metodo della conta su piastra. L'analisi delle superfici con il metodo MBS è stata effettuata utilizzando un tamponcino strofinato sulla superficie da esaminare e quindi inserito nel flaconcino. L'analisi di controllo è stata effettuata con le piastre RODAC. L'analisi è stata effettuata in un ristorante in tre momenti differenti, corrispondenti a tre differenti situazioni lavorative: all'apertura mattutina del ristorante (T0), dopo lavorazione, (T1) e dopo la pulizia intermedia (T2).

Il tempo necessario per l'analisi con il metodo MBS è stato messo in relazione al logaritmo delle CFU ottenuto con il metodo della conta su piastra. Le linee parallele indicano i limiti di confidenza 90%. La dispersione dei punti sperimentali è da attribuirsi alla incertezza intrinseca del metodo della conta su piastra che è risultata circa 10 volte superiore rispetto alla incertezza del metodo MBS.

Conclusioni

Il metodo Micro Biological Survey (MBS) è stato sviluppato con lo scopo di agevolare i controlli delle superfici e dell'acqua.

Caratteristiche peculiari del metodo MBS sono pertanto:

- Rapidità di accesso ai risultati (i tempi risultano da 2 a 5 volte inferiori rispetto ai metodi di impostazione tradizionale);
- Semplicità d'uso: Chiunque e dovunque può effettuare le analisi senza bisogno di altri reattivi o strumentazione;
- Semplicità operativa;
- Sensibilità (sono in grado di rilevare la presenza anche di un solo germe presente nel campione sottoposto a prova);
- Selettività;
- Economicità (il costo di ogni singola analisi risulta da 2 a 4 volte inferiore rispetto ai metodi tradizionali).

Il confronto con gli altri metodi analitici in uso mette in risalto le caratteristiche peculiari del metodo MBS di seguito esplicitate:

1. I metodi tradizionali di conta su piastra, hanno il vantaggio che la moltiplicazione dei microrganismi si può facilmente osservare ad occhio nudo. D'altra parte, tali metodi richiedono una grande competenza da parte degli operatori ed una operatività abbastanza complessa.
2. L'utilizzo di sonde molecolari quali anticorpi o sequenze nucleotidiche (anche con l'ausilio di PCR per aumentarne la sensibilità) sono quelli che hanno avuto un impatto maggiore in campo microbiologico. Infatti sono in genere molto rapidi (anche un'ora) e la rapidità e la sensibilità possono essere incrementate grazie all'impiego di sistemi automatici o semi-automatici.

In questo caso gli inconvenienti, oltre alla necessità di personale ed attrezzature specialistiche, sono rappresentati da un alto limite di sensibilità (metodiche immunologiche) e/o difficoltà e alti costi di analisi (metodiche genetiche).

Soprattutto l'alto costo ne limita l'utilizzo in campo alimentare ad indagini sulla presenza di particolari microrganismi. Inoltre, non distinguono tra batteri vivi o morti ed anche la quantificazione esatta del numero dei batteri non è sempre possibile.

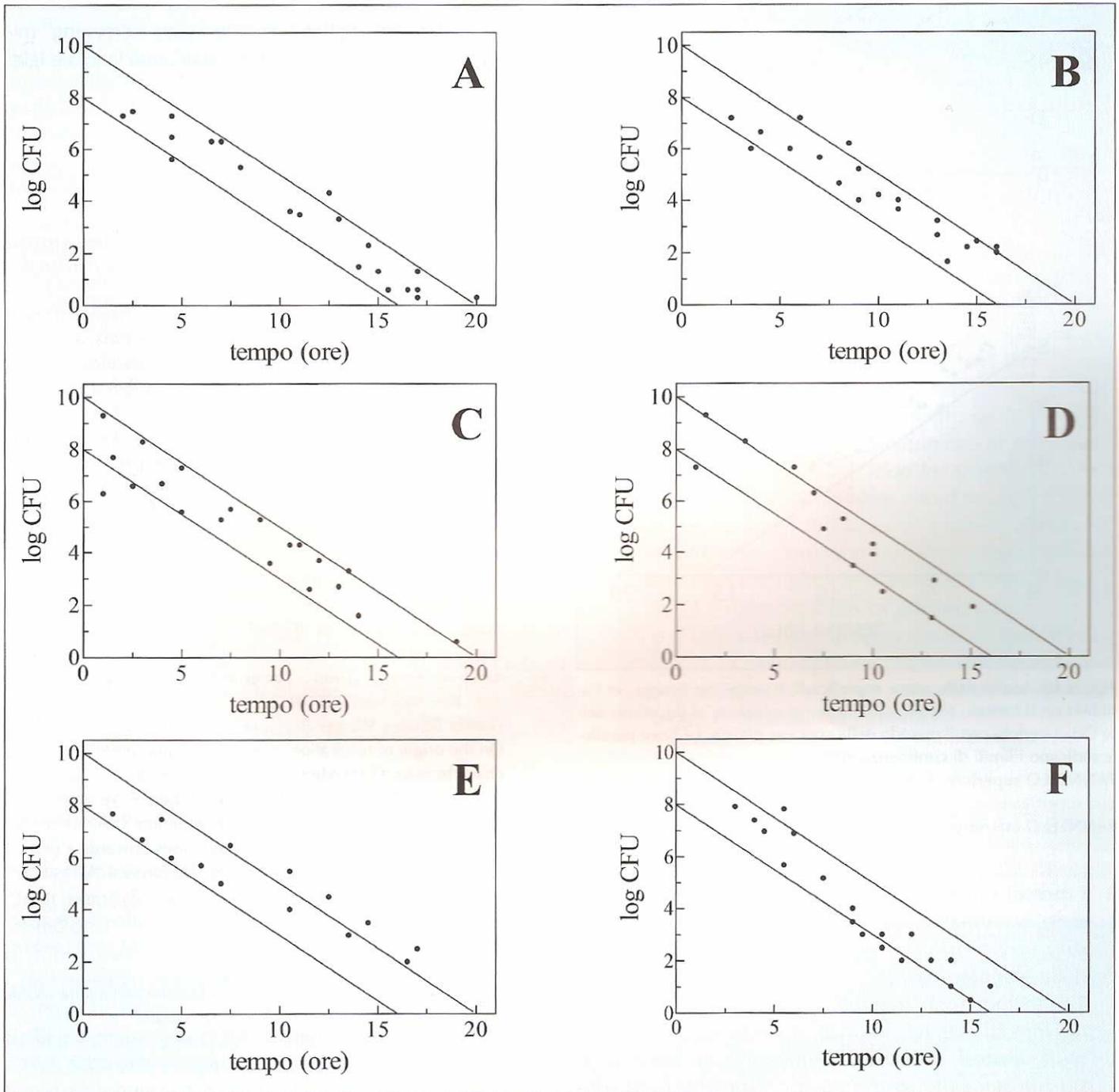


Fig. 9 - Analisi degli alimenti. Il tempo necessario per l'analisi con il metodo MBS è stato messo in relazione al logaritmo delle CFU ottenuto con il metodo della conta su piastra. Le linee parallele indicano i limiti di confidenza 90%.

- PANNELLO A:** Conta batterica totale mesofila su 1 g di ricotta
- PANNELLO B:** Conta coliformi su 1 g di ricotta
- PANNELLO C:** Conta batterica totale mesofila su 1 g di carne
- PANNELLO D:** Conta coliformi su 1 g di carne
- PANNELLO E:** Conta batterica totale mesofila su 1 g di verdura
- PANNELLO F:** Conta coliformi su 1 g di verdura

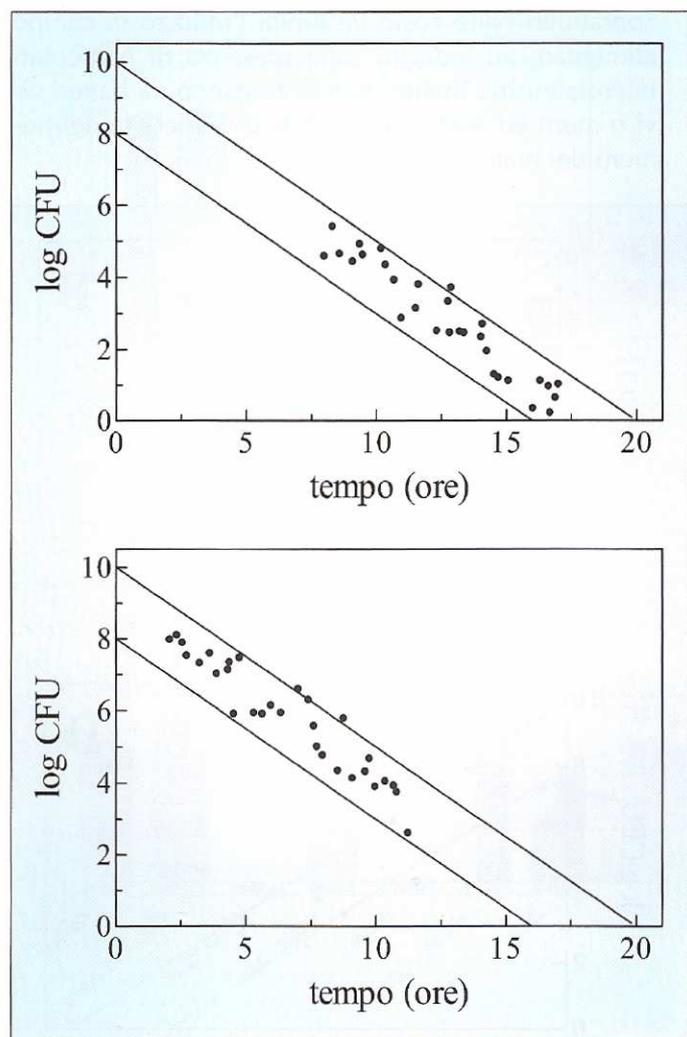


Figura 10: Analisi delle acque superficiali. Il tempo necessario per l'analisi con il metodo MBS è stato messo in relazione al logaritmo delle CFU ottenuto con il metodo della conta su piastra. Le linee parallele indicano i limiti di confidenza 90% .

PANNELLO superiore: Conta batterica totale mesofila su 1 ml di acqua superficiale

PANNELLO inferiore: Conta coliformi su 1 ml di acqua superficiale

3. I metodi colorimetrici attualmente disponibili si basano essenzialmente sul rilevamento del metabolismo secondario dei microrganismi (es. rilevazione della glucuronidasi).

Tali metodi sono semplici e mediamente più rapidi dei metodi classici. Tuttavia, si rivelano spesso come molto costosi, richiedono l'utilizzo in un laboratorio specificatamente attrezzato con strumentazioni sofisticate ed'inoltre, i metodi basati sul cambiamento di fluorescenza possono essere utilizzati solo con campioni liquidi che non abbiano particolare colorazione o torbità.

Per tali motivi, il metodo MBS potrebbe realmente costituire un supporto nelle pratiche di controllo degli alimenti, in particolare come momenti di "screening"

senza sostituirsi completamente alle analisi effettuate con i metodi di riferimento, sicuramente molto precisi ma spesso lunghi e complessi e tali da poter essere attuati solo in laboratori specificatamente attrezzati.

Il Metodo MBS può rappresentare invece un valido supporto nelle procedure di autocontrollo per tutte le aziende agroalimentari che vogliono effettuare uno "screening" microbiologico sui propri prodotti per assicurare la totale igienicità delle proprie produzioni.

Bibliografia

- 1) Brian E. Schultz and Sunney I. Chan (2001). "Structures and proton-pumping strategies of mitochondrial respiratory enzymes". *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 30:23-65
- 2) Francesca Berlutti, Franco Rosso, Pietro Bosso, Francesco Gianfanti, Maria Ajello, Alfredo De Rosa, Ernesto Farina, Giovanni Antonini, Piera Valenti (2003). "Quantitative evaluation of bacteria adherent to polyelectrolyte HEMA-based hydrogels". *J Biomed Mater Res* 67A: 18-25
- 3) Francesca Berlutti, Maria Ajello, Pietro Bosso, Clara Morea, Petrucca Andrea, Antonini Giovanni and Valenti Piera (2004). Both lactoferrin and iron influence aggregation and biofilm formation in *Streptococcus mutans*. *BioMetals* 17: 271-278
- 4) Giovanni Antonini; Francesco Malatesta; Paolo Sarti (2007). Twenty-five years of cytochrome oxidase research in Rome with Maurizio Brunori. *IUBMB Life*, 59:8, 570 - 577
- 5) E. C. Slater (2003). Keilin, Cytochrome and the Respiratory Chain. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 278, pp. 16455-16461
- 6) Yasuhiro Anraku (1988). Bacterial electron transport chains. *Ann. Rev. Biochem.* 57:101-32
- 7) Gunter Schafer, Werner Purschke, Christian L. Schmidt (1966). On the origin of respiration: electron transport proteins from archaea to man. *FEMS Microbiology Reviews* 18 :173-188
- 8) Manuela M. Pereira, Filipa L. Sousa, Andreia F. Veríssimo, Miguel Teixeira (2008). Looking for the minimum common denominator in haem-copper oxygen reductases: towards a unified catalytic mechanism. *Biochimica et Biophysica Acta* 1777: 929-934
- 9) Norma ISO 9998 (1991) Water quality — Practices for evaluating and controlling microbiological colony count media used in water quality tests
- 10) Norma UNI ENV ISO 13843 (2003) – Qualità dell'acqua – Guida per la validazione di metodi microbiologici
- 11) Norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025 (2000) - Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura.
- 12) Metodo UNICHIM N. 956 (2001) "Water intended for human consumption".
- 13) Regolamento della Commissione Europea (Reg. n. 2073/2005) sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari Pubblicato nella G.U.U.E. 22 dicembre 2005, n. L 338.
- 14) D.Lgs. n. 193/2007 Attuazione della direttiva 2004/41/CE relativa ai controlli in materia di sicurezza alimentare e applicazione dei regolamenti comunitari nel medesimo settore. G.U. della Repubblica italiana - n. 261 del 09/11/2007.