

## Microbiologia. Un nuovo metodo per l'analisi rapida

Risparmio di tempo, costi e competenze. Questi i vantaggi dell'MBS-HACCP&ACQUE Easy test, un nuovo metodo di analisi microbiologiche, sviluppato dall'Università di Roma Tre, validato su prodotti agroalimentari liquidi o solidi, superfici, acque e, in generale, per il metodo HACCP

a cura di **Giovanni Antonini**  
Direttore del Dipartimento di Biologia  
Università degli Studi "Roma Tre"

Un nuovo metodo di analisi, sviluppato dall'Università Roma Tre, MBS HACCP&Acque Easy Test, potendo sostituire completamente i tradizionali metodi di analisi basati sulla replicazione dei microrganismi o i più recenti metodi rapidi basati sull'utilizzo di sonde antigeniche o nucleotidiche, può permettere a tutti gli operatori del settore alimentare di effettuare autonomamente analisi microbiologiche degli alimenti in tempi rapidi ed a costi ridotti.

Il nucleo centrale della qualità e della sicurezza igienica degli alimenti è costituito dalla qualità microbiologica. Il concetto di "buona qualità microbiologica" di un alimento è intesa come assenza di microrganismi patogeni e/o loro tossine e di microrganismi alterativi, ed è applicabile a tutti i passaggi, dal ricevimento della materia prima, la sua trasformazione, la conservazione, la distribuzione e la somministrazione del prodotto alimentare.

L'aspetto qualitativo non è più considerato un costo aggiuntivo per l'azienda, ma un requisito commerciale indispensabile a causa della sempre maggiore consapevolezza del consumatore e della sua aumentata sensibilità sulla salubrità degli alimenti.

Il processo di cambiamento è storia recente. È iniziato nel 1997 con il Libro Verde intitolato

"Principi generali della legislazione in materia alimentare nell'Unione Europea", proseguito con "Il Libro Bianco sulla sicurezza alimentare" (2000) e con la promulgazione del regolamento CE 178/2002 e dei regolamenti del "Pacchetto Igiene", approdando infine al regolamento CE 2073/2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari, entrato in vigore il 1° gennaio 2006, integrato e parzialmente modificato dal regolamento CE 1441/2007.

Tali norme, che fissano i parametri microbiologici per gli alimenti, si integrano e si completano con il Piano di autocontrollo basato sul metodo HACCP (Hazard Analysis Critical Control Points) – d.lgs. 155/2007 – che stabilisce che tutte le aziende operanti nel settore alimentare applichino un sistema di autocontrollo aziendale, al fine di garantire e mantenere specifici standard di igiene e salubrità dei propri prodotti in tutte le fasi in cui si articola l'attività a partire dalle fasi produttive primarie (raccolta, mungitura, allevamento), fino al consumo da parte dell'utente. Pertanto, è sempre più necessaria nel settore alimentare l'esigenza di verificare rapidamente la presenza o l'assenza di microrganismi patogeni nei prodotti e, quindi, sviluppare metodi di analisi microbiologiche semplici e rapide. In questo ambito si inserisce MBS HACCP&Acque Easy

Test, un prodotto commercializzato dalla ditta MBS srl ([www.emmebiesse.net](http://www.emmebiesse.net)).

MBS HACCP&Acque Easy Test consiste in flaconcini di reazione monouso, fornite in confezione pronta all'uso, in cui la presenza dei batteri in un campione alimentare inserito nel flaconcino viene rivelata da un cambiamento di colore facilmente rilevabile con una semplice ispezione visiva.

## Il metodo di analisi

Il metodo di analisi microbiologica MBS HACCP&Acque Easy Test, sviluppato e brevettato dalla Università Roma Tre, è un sistema colorimetrico rapido per la rilevazione e la conta selettiva dei microrganismi eventualmente presenti nei prodotti agroalimentari, nelle acque e sulle superfici di lavorazione delle materie prime.

L'analisi misura l'attività catalitica degli enzimi ossidoreduttasici del metabolismo primario, permettendo di stabilire una corrispondenza certa tra l'attività enzimatica misurata e la carica microbica presente nel campione in esame.

La procedura analitica è basata sulla rilevazione colorimetrica, attraverso indicatori redox, del

cambiamento dello stato ossidoriduttivo del mezzo di reazione, dovuto all'azione degli enzimi coinvolti nei processi di respirazione e fermentazione. Tali indicatori, infatti, possiedono la caratteristica di cambiare colore (fenomeno detto viraggio) quando viene modificato l'ambiente in cui si trovano (Figura 1).

Come in una reazione enzimatica (ed i microrganismi possono essere considerati reattori multienzimatici), maggiore il numero degli enzimi, minore il tempo di reazione.

Il metodo MBS HACCP&Acque Easy Test, perciò, a differenza dei metodi tradizionali che utilizzano la capacità replicativa dei microrganismi, misura la carica microbica di un campione rilevando l'attività degli enzimi metabolici batterici.

I metodi tradizionali per l'analisi microbiologica degli alimenti basati sulla conta su piastra o sul MPN (Most Probable Number), così come i più recenti metodi basati su sonde antigeniche o nucleotidiche richiedono tecnici altamente qualificati e la necessità di un laboratorio perfettamente attrezzato. Al contrario, con MBS HACCP&Acque Easy Test chiunque e dovunque può effettuare le analisi senza bisogno di altri reattivi o strumentazione (Tabella 1, a pag. 47).

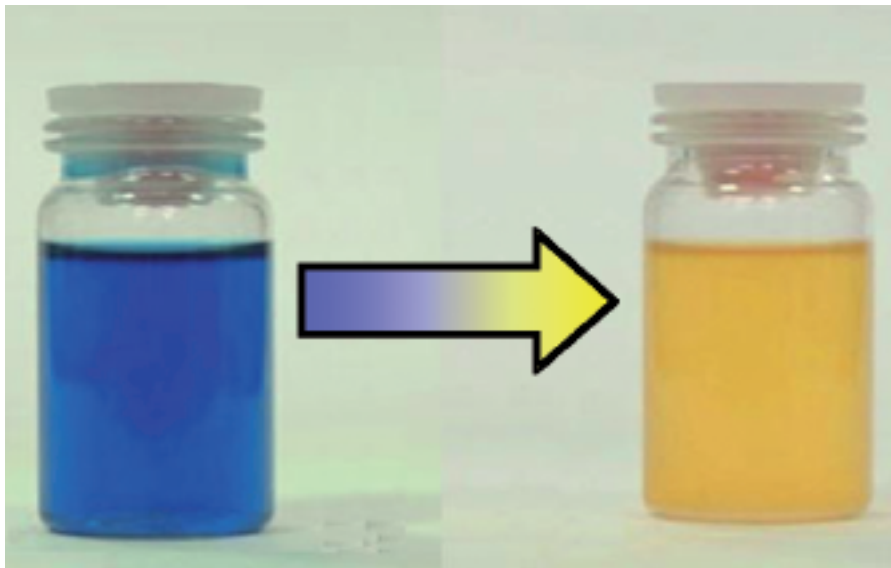


Figura 1 - Il colore del flaconcino di analisi prima (sinistra) e dopo (destra) l'analisi in presenza di microrganismi. Il cambiamento di colore (da blu a giallo) è dovuto al viraggio degli indicatori redox presenti nel flaconcino, che è dovuto all'azione degli enzimi del metabolismo primario dei microrganismi.

Il flaconcino MBS HACCP&Acque Easy Test è monouso e viene fornito in confezione pronta all'uso.

## Caratteristiche

Le caratteristiche principali di MBS HACCP&Acque Easy Test sono:

- la rapidità di esecuzione, da due a cinque volte maggiore rispetto alle metodiche tradizionali che si basano sulla conta delle colonie su terreno agarizzato;
- l'elevata sensibilità che permette di rilevare i differenti microrganismi fino ad un limite teorico di 1 singolo microrganismo presente nel campione, unita ad una elevata selettività, che è maggiore del 99.999% verso i differenti generi microbici;
- la semplicità di esecuzione: non è richiesto, infatti, l'intervento di personale specializzato e l'utilizzo di specifiche attrezzature presenti in un laboratorio di analisi (cappa a flusso laminare, autoclave ecc.);
- l'economicità con un costo globale per analisi inferiore rispetto ai metodi classici.

## Il funzionamento

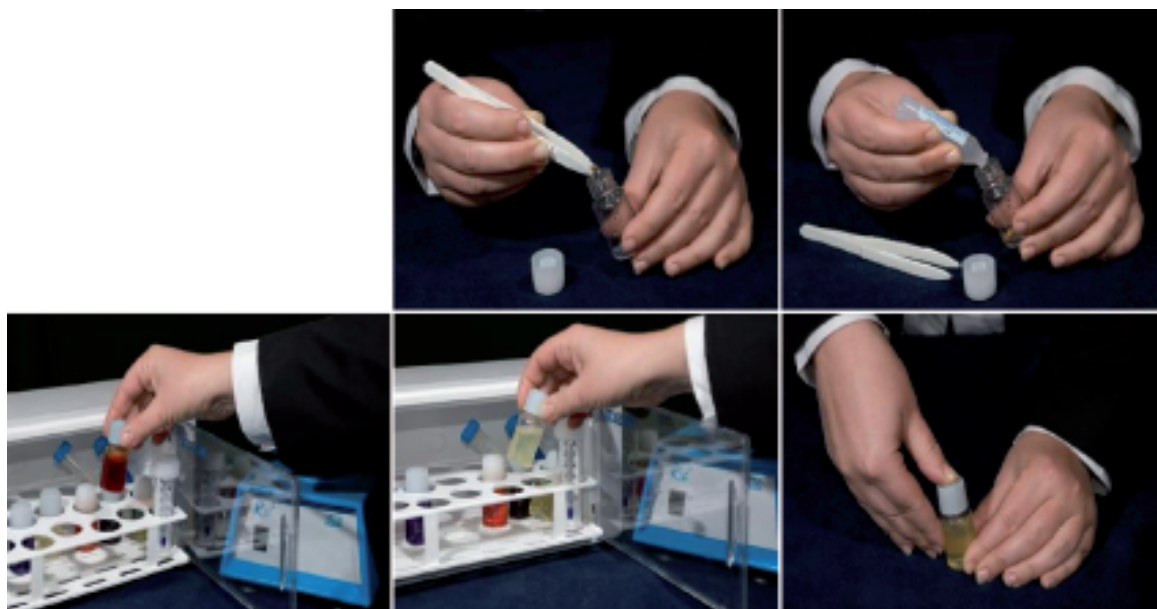
La sequenza della *Figura 2* illustra il funzionamento di MBS HACCP&Acque Easy Test.

MBS HACCP&Acque Easy Test viene fornito in una confezione contenente tutto il materiale per effettuare l'analisi: il flaconcino di analisi ed una fiala sterile di acqua demineralizzata con olio di vasellina F.U.

Nessun altro reattivo, equipaggiamento o strumento è richiesto se non l'uso di un incubatore a 30, 37 o 44 °C, che la MBS srl può fornire anche in comodato d'uso ai suoi clienti.

Per analizzare il campione è sufficiente inserire circa 1 g di campione liquido o solido, senza alcun trattamento preliminare (omogeneizzazione, diluizione ecc.) nel flaconcino. Si aggiunge, quindi, al flaconcino il contenuto della ampolla fornita nella confezione e si pone il flaconcino in termostato. Dopo un periodo di tempo variabile a seconda della tipologia di analisi, si osserva il colore del flaconcino.

Se è rimasto il colore iniziale, vuol dire che il numero di microrganismi è inferiore al valore soglia prefissato ed il campione è idoneo, mentre, inve-



*Figura 2 – Procedura operativa del metodo MBS in 5 fasi. Le fasi illustrate corrispondono a: 1) inserimento del campione; 2) inserimento dell'acqua sterile; 3) inserimento della fiale nel termostato; 4) osservazione dell'eventuale cambiamento di colore della fiala al termine dell'analisi; 5) sterilizzazione post-analisi per lo smaltimento in sicurezza.*

Tabella 1  
**Tipologie di analisi effettuabili con MBS HACCP&Acque Easy Test \***

Carica Batterica Totale
Coliformi
E. coli
Enterobatteriacee
Staphylococcus aureus (Stafilococco coagulasi positivo)
Pseudomonas aeruginosa
Salmonella spp
Listeria spp
Enterococcus faecalis (Streptococco fecale)
Clostridium perfringens
Funghi (Aspergillus spp.)
Lieviti (Saccharomyces spp.)

\* Per ciascuna tipologia è disponibile un differente flaconcino ed una differente tabella di correlazione. Sono inoltre allo studio altre tipologie di analisi.

ce, se ha cambiato colore, il campione non è idoneo perché ha un contenuto di microrganismi superiore al consentito. Effettuata l'analisi, senza aprire il flaconcino, si preme la parte superiore del tappo che contiene uno sterilizzante che distrugge sia i microrganismi che i reattivi ed il fla-

concono può essere smaltito in sicurezza come "Rifiuto Sanitario non pericoloso", ai sensi del decreto ministeriale del 25 maggio 1989. Detti rifiuti, essendo stati sterilizzati ed inattivati, possono essere smaltiti con le stesse modalità previste per i farmaci scaduti.

Tabella 2  
**Tabella di correlazione per la valutazione del risultato\***

Tempo di viraggio (in ore)	Limite della Carica Batterica (CFU)
2	$> 10^8$
4	$10^7$
6	$10^6$
8	$10^5$
10	$10^4$
12	$10^3$
14	$10^2$
16	10
18	$< 10$
$> 18$	0

\* La tabella di correlazione si riferisce ad un valore medio a 37 °C per la Carica Batterica Totale. Sono predisposte tabelle di correlazione differenti per i differenti tipi di analisi.

Tabella 3

## Risparmio sui tempi di analisi: un esempio

Microrganismo in esame	Limite massimo di concentrazione dei microrganismi	Tempo di analisi con metodo tradizionale (ore)	Tempo di analisi con MBS (ore)
Carica batterica totale	10 <sup>6</sup> /g	24	6
E.coli	10 <sup>3</sup> /g	48	14
Staphylococcus aureus	10 <sup>3</sup> /g	72	16
Salmonella spp.	0/25 g	98	36
Listeria spp.	10 <sup>2</sup> /g	120	24

Nel caso fosse necessario svolgere molte analisi in contemporanea o si volesse una esatta determinazione del numero dei microrganismi nel campione, la MBS srl sta iniziando la produzione industriale di un multiletto che può rilevare il cambiamento di colore contemporaneamente in molti flaconcini e correlarlo automaticamente al numero di microrganismi presenti nel campione, fornendo direttamente all'operatore il risultato analitico su PC.

Con MBS HACCP&Acque Easy Test, per valutare il correttamente la carica batterica in un campione, è sufficiente controllare solo una volta, dopo un tempo prefissato in base alle caratteristiche del campione, l'eventuale viraggio del contenuto del flaconcino con la scala cromatica (concetto del valore soglia). Ad esempio, nel caso si voglia controllare che un campione contenga meno di 105 microrganismi, espressi come Unità Formanti Colonie (UFC), basta controllare dopo 8 ore che il colore sia che il colore sia ancora blu o grigio-bluastro e non sia diventato giallo. Se dopo 8 ore il colore è ancora blu, vuol dire che nel campione vi sono meno di 105 CFU, se è divenuto giallo, vuol dire che il campione contiene più di 105 CFU (Tabella 2, a pag. 47).



Figura 3 - Multiletto grazie al quale svolgere più analisi in contemporanea

## Applicazioni

MBS HACCP&Acque Easy Test può essere utilizzato per l'autocontrollo da parte delle industrie alimentari e dai laboratori di analisi accreditati per l'agro-alimentare, ai sensi del sopracitato regolamento CE 2073/2005 (art. 5, comma 5, par. 3 e 4) sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari. Infatti, per effettuare le analisi microbiologiche sugli alimenti è possibile utilizzare metodi innovativi (metodi sviluppati dal laboratorio, o più comunemente "metodi interni"), purché l'utilizzatore dimostri, ai sensi della norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005, che tali metodi siano adatti per lo scopo prefissato e validati.

Tabella 4

## Esempio di risparmio sui costi di analisi\*

	Metodo tradizionale di conta su piastra	Metodo MBS
tempo medio di analisi	28 ore	12 ore
tempo di lavoro del tecnico	1.5 ore	0.5 ore
costo apparecchiature laboratorio	10000 euro	100 euro
ammortamento (400 analisi/anno, 5 anni)	5,00 euro	0,05 euro
costo consumabili per singola analisi	6,00 euro	6,00 euro
costo di lavoro del personale (15 €/ora )	11,25 euro	3,75 euro
costo totale per analisi	22,25 euro	9,80 euro
costo annuale (400 analisi/anno)	8'900 euro	3920 euro

\*L'esempio si riferisce a 2 analisi al giorno

La *Tabella 3* riporta i differenti tempi richiesti per l'analisi di campioni di carne fresca dal metodo analitico tradizionale, basato sulla conta su piastra, e da MBS HACCP&Acque Easy Test.

La *Tabella 4* riporta i differenti costi globali richiesti per l'analisi di coliformi in campioni di alimenti dal metodo analitico tradizionale e da MBS HACCP&Acque Easy Test.

Nel caso fosse necessario svolgere molte analisi in contemporanea o si volesse una esatta determinazione del numero dei microrganismi nel campione, la MBS srl sta iniziando la produzione industriale del multiletto illustrato nella *Figura 3*, che può rilevare il cambiamento di colore contemporaneamente in molti flaconcini e correlarlo automaticamente al numero di microrganismi presenti nel campione, fornendo direttamente all'operatore il risultato analitico su PC.

## Validazioni

MBS HACCP&Acque Easy Test è stato perciò validato (dettagli alla pagina web <http://www.emmebiesse.net/validazione-del-metodo/>) da un laboratorio accreditato SINAL, secondo la norma UNI ENV ISO 13843:2003 (<http://webstore.uni.com>) ("Qualità dell'acqua – Guida per la validazione di metodi microbiologici

ci"), utilizzando come metodo di riferimento adottato quello della conta su terreno selettivo in accordo con la norma ISO 9998:1991 (<http://www.iso.org>).

MBS HACCP&Acque Easy Test è stato anche validato secondo i criteri stabiliti dalla stessa norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005, utilizzando come metodo di riferimento la conta su piastra in accordo con il metodo UNICHIM N. 956:2001(<http://webstore.uni.com>).

In conclusione, MBS HACCP&Acque Easy Test, prodotto e commercializzato dalla MBS srl ([www.emmebiesse.net](http://www.emmebiesse.net)) può rappresentare lo strumento ideale per tutte le aziende alimentari (dalla produzione delle materie prime alla ristorazione collettiva) che vogliono effettuare un autocontrollo sulla qualità microbiologica dei loro prodotti risparmiando tempo e denaro, ma senza dover allestire un laboratorio di microbiologia e dover utilizzare tecnici specializzati.

Nello stesso tempo, MBS HACCP&Acque Easy Test può anche rappresentare un utile strumento complementare per i consulenti HACCP ed i laboratori di analisi accreditati per l'agroalimentare che intendano fornire al cliente risultati di analisi microbiologiche in tempi più rapidi ed a costi inferiori.