

Esercitazioni di Microbiologia degli Alimenti - “Controllo & Qualità degli Alimenti”.

Criteri microbiologici e Piani di Campionamento

Per giudicare la qualità e la sicurezza microbiologica di un alimento si valuta la presenza o il numero di microrganismi indicatori o patogeni, ma per dare un giudizio obiettivo ci si deve riferire a dei criteri microbiologici precisi, per cui le analisi microbiologiche degli alimenti mirano fondamentalmente ad accertare che l'alimento rispetti specificati criteri microbiologici.

Un “criterio microbiologico” stabilisce i limiti della presenza o assenza di specifici microrganismi o loro tossine negli alimenti.

Un generico “criterio microbiologico” stabilisce che un determinato microrganismo o gruppo di microrganismi, o tossina microbica deve essere assente, essere presente solo in un determinato numero di unità campionarie o essere presente ad un livello non superiore ad un limite prefissato in un numero o quantità specificata di alimenti o di ingredienti.

Un criterio microbiologico deve fornire le seguenti informazioni:

- ✓ le caratteristiche per identificare l'alimento;
- ✓ il tipo, la specie o il gruppo di organismi da ricercare;
- ✓ i metodi analitici da usare;
- ✓ il piano di campionamento;
- ✓ i limiti microbiologici applicabili per lo specifico prodotto,
- ✓ Il punto della catena di produzione/trasformazione al quale si applica
- ✓ le azioni da intraprendere quando i limiti non sono rispettati

I criteri microbiologici sono usati per accertare la sicurezza microbiologica di un alimento, il rispetto dell'applicazione di norme di Buona Fabbricazione e Distribuzione degli alimenti (GMPD), l'effetto della conservazione sulla qualità degli alimenti, l'adattabilità di un ingrediente o alimento per usi particolari. Essi possono essere stabiliti da apposite leggi nazionali o Europee, da accordi di tipo commerciale, da organizzazioni specifiche (organizzazioni scientifiche, Codex alimentarius).

I criteri microbiologici possono essere sia ***obbligator*** che ***consigliati***.

I ***criteri obbligatori*** non possono essere superati e l'alimento che non rispetta i limiti specificati deve essere sottoposto ad alcune azioni come il ritiro dal consumo, la distruzione o destinato alla produzione di alimenti diversi da quello a cui era destinato.

I ***criteri consigliabili*** consentono di esprimere un giudizio di accettabilità e servono come campanello di allarme per mettere in evidenza anomalie di processo, distribuzione, di conservazione o vendita, quindi forniscono soltanto un'indicazione dell'esistenza di difetti nei piani di autocontrollo applicati.

A partire dal 1 gennaio 2006, i criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari sono stabiliti dal “Regolamento (CE) n. 2073/2005 della Commissione, del 15 novembre 2005, sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari”.

Il campo di applicazione del Regolamento è riportato nell’Articolo 1, che recita:

“Il presente regolamento stabilisce i criteri microbiologici per taluni microrganismi e le norme di attuazione che gli operatori del settore alimentare devono rispettare nell’applicazione delle misure di igiene generali e specifiche di cui all’articolo 4 del regolamento (CE) n. 852/2004. L’autorità competente verifica il rispetto delle norme e dei criteri di cui al presente regolamento conformemente al regolamento (CE) n. 882/2004, senza pregiudizio del suo diritto di procedere a ulteriori campionamenti ed analisi per la rilevazione e la misura della presenza di altri microrganismi, delle loro tossine o dei loro metaboliti, o come verifica dei processi, per i prodotti alimentari sospetti, o nel contesto dell’analisi del rischio”.

Il Regolamento riporta, inoltre, definizioni importanti, alcune delle quali si riportano di seguito:

- ✓ **«criterio microbiologico»**, un criterio che definisce l’acceptabilità di un prodotto, di una partita di prodotti alimentari o di un processo, in base all’assenza, alla presenza o al numero di microrganismi e/o in base alla quantità delle relative tossine/metaboliti, per unità di massa, volume, area o partita;
- ✓ **«criterio di sicurezza alimentare»**, un criterio che definisce l’acceptabilità di un prodotto o di una partita di prodotti alimentari, applicabile ai prodotti immessi sul mercato;
- ✓ **«criterio di igiene del processo»**, un criterio che definisce il funzionamento accettabile del processo di produzione. Questo criterio, che non si applica ai prodotti immessi sul mercato, fissa un valore indicativo di contaminazione al di sopra del quale sono necessarie misure correttive volte a mantenere l’igiene del processo di produzione in ottemperanza alla legislazione in materia di 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;
- ✓ **«conformità ai criteri microbiologici»**, l’ottenimento di risultati soddisfacenti o accettabili di cui all’allegato I nei controlli volti ad accertare la conformità ai valori fissati per i criteri mediante il prelievo di campioni, l’effettuazione di analisi e l’attuazione di misure correttive, conformemente alla legislazione in materia di prodotti alimentari e alle istruzioni dell’autorità competente».

ELEMENTI CHE SPECIFICANO UN CRITERIO MICROBIOLOGICO

- ✓ il tipo di alimento (matrice)
- ✓ il piano di campionamento : numero (n) di unità campionarie da esaminare e numero di unità campionarie nel quale è ammesso il superamento del limite (c)
- ✓ il valore tollerato (limite) o intervallo (m M) per unità di massa, area o lotto nell'unità campionaria
- ✓ il metodo di analisi
- ✓ la fase del processo dove viene effettuata la verifica
- ✓ le azioni correttive da adottare in caso di N.C.

MICROORGANISMI/TOSSINE DA VERIFICARE AI FINI DELLA SICUREZZA ALIMENTARE

- ✓ *Listeria monocytogenes*
- ✓ *Salmonella spp*
- ✓ *Enterotossine stafilococciche*
- ✓ *Enterobacter sakazakii*
- ✓ *E.coli*
- ✓ *Istamina*

MICROORGANISMI/TOSSINE DA VERIFICARE AI FINI DELL'IGIENE DI PROCESSO

- ✓ *Conteggio colonie aerobiche*
- ✓ *Salmonella spp*
- ✓ *Enterobacteriacee*
- ✓ *E.coli*
- ✓ *Stafilococchi coagulasi positivi*

PIANI DI CAMPIONAMENTO

I criteri microbiologici sono strettamente connessi al piano di campionamento. Infatti, quando si esamina un alimento per la presenza di un microrganismo, i limiti che esso deve rispettare fanno riferimento ad un campione rappresentativo del lotto produttivo (o unità campionaria). Dunque, *i criteri microbiologici che definiscono l'accettabilità di un determinato prodotto alimentare, dettano il piano di campionamento da adottare, con particolare riferimento al numero di campioni da sottoporre ad analisi.* Esistono **piani di campionamento a due e a tre classi.**

Piani di campionamento a due classi

In questo tipo di piano di campionamento, il campione può ricadere in una di due classi: **accettato o rifiutato.** Dunque **questi piani vengono usati per decisioni presenza/assenza.**

Gli attributi ideali per questi piani sono:

n: numero di unità da campionare e da sottoporre ad analisi; per unità campionaria (u.c.) deve intendersi una porzione singola o confezione di prodotto alimentare scelta a caso su cui si eseguiranno le analisi;

m: numero limite di batteri che determina l'inaccettabilità del lotto;

c: numero massimo di unità campionarie che possono superare il valore di m accettate per esprimere l'idoneità del lotto.

Di seguito è riportato un esempio per illustrare come si interpretano i risultati di un piano a 2 classi.

Es. n=5 c=2 m=0

Il lotto è fuori dai criteri se più di 2 u.c. presentano il microrganismo.

In genere in questi piani c=0, per cui il campione è accettato solo se tutte le u.c. non superano il limite m.

Criteria di sicurezza alimentare (Esempi di Piani di Campionamento a due classi)

Categoria alimentare	Microrganismi	Piano di campionamento		Limiti		Metodo d'analisi di riferimento	Fase a cui si applica il criterio
		n	C	m	M		
Carne macinata e preparati a base di carne destinati ad essere consumati crudi.	<i>Salmonella</i>	5	0	Assente in 25 g		EN/ISO 6579	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità.
Carne macinata e preparazioni a base di carne di pollame destinate ad essere consumate cotte.	<i>Salmonella</i>	5	0	Assente in 25 g		EN/ISO 6579	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità.
Carne macinata e preparazioni a base di carne di animali diversi dal pollame destinate ad essere consumate cotte.	<i>Salmonella</i>	5	0	Assente in 10 g		EN/ISO 6579	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità.
Carni separate meccan.	<i>Salmonella</i>	5	0	Assente in 10 g		EN/ISO 6579	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità.

Piani di campionamento a tre classi.

Il campione può ricadere nelle seguenti tre classi:

da 0 a m;

da m a M;

al di sopra di M.

Le tre classi qualitative per le n unità campionarie sono identificabili con le seguenti lettere:

m: valore limite del numero di batteri; il risultato è considerato soddisfacente se il numero di batteri in tutte le unità campionarie analizzate è inferiore ad m;

M: valore massimo del numero di batteri tollerato; il risultato è considerato insoddisfacente se il numero di batteri in una o più delle unità campionarie analizzate è superiore ad M;

c: numero delle unità campionarie il cui valore può essere compreso tra m ed M; il campione viene considerato ancora accettabile se il numero di batteri delle altre unità campionarie è pari o inferiore ad m.

Il piano di campionamento a tre classi consente una maggiore flessibilità nell'interpretazione di risultati positivi, ammettendo la possibilità che una piccola proporzione dei campioni analizzati (c) possa superare, entro un certo limite, il valore massimo consentito (m).

Si considerino i seguenti esempi:

Esempio. Supponiamo che per un dato alimento sono fissati i seguenti criteri microbiologici:

n=5; c=2; m=5x10³; M=2x10⁴.

L'analisi microbiologica su ciascuna delle cinque unità campionarie analizzate fornisce i seguenti risultati:

UFC/g= (1) 9,5x10²; (2) 3,5x10³; (3) 1,5x10⁴; (4) 2,1x10⁴; (5) 4,3x10⁵.

Giudizio di accettabilità dell'alimento: l'alimento non è accettabile in quanto una delle u.c. (la n° 5) supera il valore massimo del numero di batteri tollerato (M=2x10⁴).

Come già detto, il Regolamento (CE) n. 2073/2005 distingue i criteri microbiologici in «criteri di sicurezza alimentare» (definiscono l'accettabilità di un prodotto o di una partita di prodotti alimentari) e «criteri di igiene del processo» (definiscono il funzionamento accettabile del processo di produzione).

Criteria di Igiene di Processo (Esempi di Piani di Campionamento a tre classi)

Categoria alimentare	Microrganismi	Piano di campionamento		Limiti		Fase a cui si applica il criterio	Azione in caso di risultati insoddisfacenti
		n	C	M	M		
Carne macinata	Conteggio delle colonie aerobiche	5	2	5x10 ⁵ ufc/g	5x10 ⁶ ufc/g	Fine del processo di lavorazione	Miglioramento delle condizioni igieniche durante la produzione e miglioramento della scelta e/o dell'origine delle materie prime
	<i>E. Coli</i>	5	2	50 ufc/g	500 ufc/g	Fine del processo di lavorazione	//
Preparati a base di carne	<i>E. Coli</i>	5	2	500 ufc/g o cm ²	5 000 ufc/ g o cm ²	Fine del processo di lavorazione	//

Nel Capitolo 1 dell'allegato I al Regolamento sono riportati i criteri microbiologici e i criteri di igiene del processo che vanno applicati ai singoli prodotti alimentari. Per ogni categoria alimentare, sono riportati: i microrganismi e/o loro tossine e metaboliti da ricercare; il numero di unità campionarie da analizzare; i limiti m ed M massimi che vanno rispettati per l'accettabilità del campione; il metodo di analisi da applicare; la fase a cui si applica il criterio di accettabilità. Il Regolamento 2073/2005 riporta inoltre, **nel Capitolo 2, i criteri di igiene dei processi di produzione delle seguenti categorie di alimenti:**

Carni e prodotti a base di carne:

- Carcasse di bovini, ovini, caprini ed equini.
- Carcasse di suini.
- Carcasse di bovini, ovini, caprini e equini.
- Carcasse di pollame (broilers e tacchini).
- Carne macinata.
- Carni separate meccanicamente (CSM).
- Preparazioni a base di carne.

Sono riportati limiti per i seguenti microrganismi o popolazioni di microrganismi: Conteggio delle colonie aerobiche; Enterobacteriaceae; Salmonella; Escherichia coli. In caso di risultati insoddisfacenti sono indicate anche le azioni da mettere in atto per riportare i valori nei limiti prefissati (ad esempio: “Miglioramento delle condizioni igieniche della macellazione e revisione dei controlli del processo, dell’origine degli animali e delle misure di biosicurezza nelle aziende di origine”).

Campionamento Superficiale / Profondo

Contaminazione delle carcasse

Le carni al termine delle operazioni di macellazione, toelettatura e sezionamento risultano sempre più o meno contaminate da una svariata flora microbica, la quale può invadere le masse muscolari sia in vita che durante la macellazione o post mortem.

La ***contaminazione in vita e durante la macellazione*** è sempre ***profonda***, la ***contaminazione post mortem*** è sempre ***superficiale***.

L’esame batteriologico eseguito su campioni prelevati dalle superfici permette di giudicare il rispetto delle norme igieniche dal momento della macellazione fino al termine della conservazione rivelando cioè le contaminazioni conseguenti alle condizioni ambientali.

L’esame delle carni prelevate al momento del consumo deve essere eseguito sul materiale in esame senza tener conto della superficie o della profondità, dato che a questo livello interessa la contaminazione generale dell’intero alimento.

Norme di campionamento per le carcasse di bovini, suini, ovini, caprini ed equini

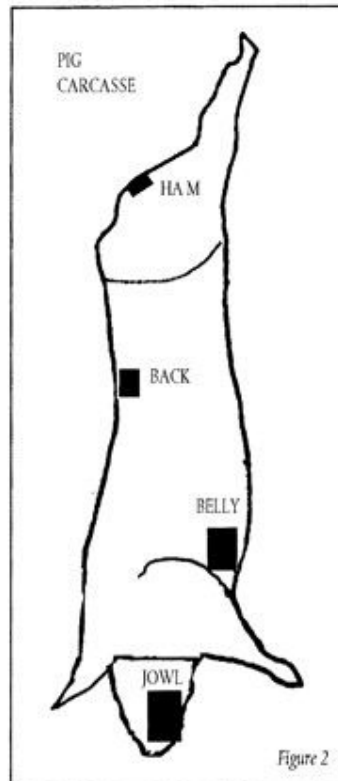
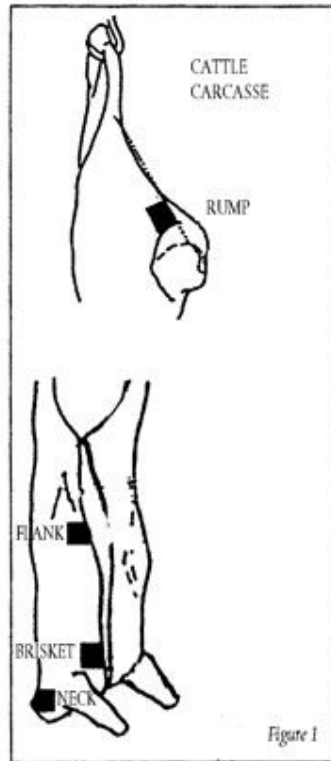
I metodi di campionamento distruttivo e non distruttivo, la scelta dei siti di prelievo dei campioni e le regole per la loro conservazione e il trasporto sono indicati nella norma ISO 17604.

In ogni sessione di campionamento sono prelevate casualmente cinque carcasse. I siti nei quali sono prelevati i campioni sono scelti tenendo conto della tecnica di macellazione utilizzata in ciascun impianto.

Quando si procede al campionamento per la ricerca di enterobatteriacee e il conteggio di colonie aerobiche, i prelievi sono effettuati in **quattro siti di ogni carcassa**. Si prelevano con metodo distruttivo quattro campioni di tessuto che costituiscono un totale di 20 cm². Qualora a questo scopo sia utilizzato il metodo non distruttivo, l’area campione è di almeno 100 cm² (50 cm² per le carcasse di piccoli ruminanti) per sito di campionamento.

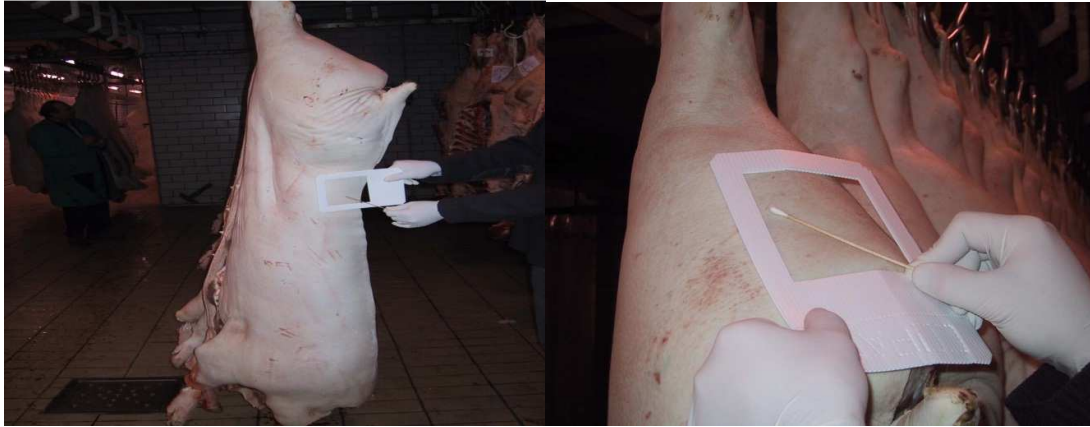
Punti di campionamento indicativi per l'esame delle carcasse

- ✓ **bovini:** collo, punta di petto, pancia e scamone (figure 1)
- ✓ **ovini e caprini:** pancia, costato, punta del petto e petto
- ✓ **suini:** lombo, guanciale, faccia mediale della coscia (prosciutto) e pancetta (figura2) .
- ✓ **cavallo:** pancia, punta di petto, lombo, scamone.



Carcassa di suino 1-Guanciale

Carcassa di suino 2- Pancetta



Carcassa di suino 3- Lombo

Carcassa di suino 4 - Prosciutto

Campionamento Batteriologico delle carcasse nei macelli (bovini , ovini, suini, equini)

Per il metodo distruttivo, si dovrebbero prelevare dalla carcassa, dopo le operazioni di macellazione ma prima dell'inizio del raffreddamento, quattro campioni di tessuto per un totale di 20 cm². Parti di tessuto si possono ottenere mediante una sonda di carotaggio sterile (2,5 cm) o asportando dalla carcassa, con uno strumento sterile, una fetta di 5 cm² e uno spessore massimo di 5 mm. Presso il macello i campioni devono essere collocati in modo asettico in un contenitore per campioni o in un sacchetto di diluizione di plastica, e quindi essere trasferiti al laboratorio e successivamente omogeneizzati.

Se si ricorre ad un metodo non distruttivo, i tamponi devono essere inumiditi prima della raccolta del campione. Per inumidire i tamponi deve essere utilizzato come diluente una soluzione acquosa sterile con lo 0,1 % di peptone + lo 0,85 % di diluente NaCl. Ogni tampone dovrebbe coprire un'area di campionamento pari ad almeno 100 cm² per ogni sito di prelievo. Il tampone viene inumidito per almeno 5 secondi nel diluente, strofinato inizialmente in senso verticale, poi orizzontale e quindi diagonale, per non meno di 20 secondi, sull'intera superficie della carne delineata da un delimitatore. Si raccomanda di esercitare la maggior pressione possibile. Successivamente all'operazione con tampone umido, la procedura di campionamento viene ripetuta con un tampone asciutto.

Frequenze di campionamento per le carcasse

- ✓ Frequenze, modalità di campionamento e analisi microbiologiche sono parte integrante delle procedure HACCP;
- ✓ Il campionamento deve essere effettuato a fine macellazione prima che le carcasse siano refrigerate;
- ✓ Le carcasse da campionare devono essere scelte con un sistema del tutto casuale;
- ✓ Il giorno del campionamento dovrà variare nell'arco della settimana per avere una visione dei risultati nel controllo di processo;

- ✓ La frequenza di campionamento Frequenza deve essere settimanale per la **Carica Microbica Totale** e quella delle **Enterobatteriacee**;
- ✓ La frequenza puo' essere ridotta a una volta ogni due settimane qualora si ottengano risultati soddisfacenti per sei settimane consecutive.

Categoria alimentare	Microorganismi	Piano di campionamento (*)		Limiti (?)		Metodo d'analisi di riferimento (!)	Fase a cui si applica il criterio	Azione in caso di risultati insoddisfacenti
		n	c	m	M			
2.1.1 Carcasse di bovini, ovini, caprini ed equini (*)	Conteggio delle colonie aerobiche			3,5 log ufc/cm ² log medio giornaliero	5,0 log ufc/cm ² log medio giornaliero	ISO 4833	Carcasse dopo la macellazione, ma prima del raffreddamento	Miglioramento delle condizioni igieniche nella procedura di macellazione e revisione dei controlli del processo
	<i>Enterobatteriacee</i>			1,5 log ufc/cm ² log medio giornaliero	2,5 log ufc/cm ² log medio giornaliero	ISO 21528-2	Carcasse dopo la macellazione, ma prima del raffreddamento	Miglioramento delle condizioni igieniche della macellazione e revisione dei controlli del processo

Campionamento batteriologico delle carcasse - Ricerca di Salmonella

Norme di campionamento per le carcasse di bovini, suini, ovini, caprini, equini.

Quando si prelevano campioni per la ricerca di Salmonella, è utilizzato un metodo di prelievo con spugna abrasiva. L'area campione è di almeno 100 cm² per sito selezionato. Quando i campioni sono prelevati sulle carcasse da diversi siti, prima di essere esaminati sono aggregati.

Norme di campionamento per le carcasse di pollame.

Per le analisi per la ricerca di Salmonella, in ogni sessione di campionamento sono prelevate casualmente almeno 15 carcasse dopo raffreddamento. Da ciascuna carcassa sono prelevati campioni di pelle di collo del peso di circa 10 g. In ogni occasione i campioni di pelle di collo prelevati da tre carcasse sono aggregati prima di essere esaminati, in modo da formare 5 campioni finali di 25 g.

Frequenza di campionamento per la Salmonella

Frequenza ridotta a 1 volta ogni due settimane, se i risultati sono favorevoli per 30 settimane consecutive. La frequenza di campionamento per la ricerca della salmonella può inoltre essere ridotta se vi è un programma di controllo nazionale o regionale della salmonella e se tale programma prevede prove che sostituiscano suddetto campionamento. La frequenza di campionamento può essere ulteriormente ridotta se il programma di controllo nazionale o

regionale della Salmonella dimostra che la prevalenza di Salmonella è bassa negli animali acquistati dal macello.

In base all'analisi del rischio, l'autorità competente potrà esentare i piccoli macelli dal rispetto delle frequenze previste per i campionamenti.

Contaminazione endogena delle carni

Esame batteriologico profondo delle carni

Materiale da utilizzare come campioni per le analisi microbiologiche:

- ✓ Carne
- ✓ Visceri.

Esame batteriologico profondo Bovini ed Equini :

Carne:

- Dal quarto anteriore: un cubo di muscolo compatto con lato minimo di 10 cm, con aponeurosi e tessuto connettivo
- Dal quarto posteriore, in posizione diagonalmente opposta all'anteriore

Fegato: Il lobo di Spigelio (bovini); un pezzo adeguatamente grande prelevato dal margine acuto (equini).

Milza: Una parte grande come una mano

Rene

Esame batteriologico profondo Ovini, Caprini, Suini:

Carne

- Dal quarto anteriore: un pezzo di muscolo compatto, possibilmente spesso con aponeurosi e tessuto connettivo
- Dal quarto posteriore, in posizione diagonalmente opposta a quella anteriore

Fegato: almeno la metà dell'organo

Milza: *intera*

Rene

Esame batteriologico profondo

- ✓ Linfonodi non incisi con i rispettivi involucri connettivali ed adiposi;
- ✓ Linfonodi prescapolare, precrurale e popliteo;
- ✓ Linfonodi sternale craniale, grande iliaco e ischiatico.

Esame batteriologico profondo

I campioni di carne (prelevati a 6 ore dalla macellazione) e le frattaglie (prelevate subito dopo la macellazione) sono mantenute e trasportate a T° di refrigerazione al laboratorio di analisi accompagnate da un verbale di prelievo.

L'esame batteriologico profondo serve per accertare la sanità delle carni.

Permette di escludere la presenza di germi patogeni e di residui di sostanze inibenti. Rappresenta un momento importante, e limitato a situazioni precedentemente menzionate, della visita ispettiva post mortem degli animali al macello.