

# Analisi microbiologiche

METODI ALTERNATIVI AL MPN

Campeis Francesca

Il consumo di molluschi bivalvi poco cotti o crudi, può causare malattie nel consumatore attraverso l'ingestione di patogeni fecali.

Un parametro utilizzato come indicatore per valutare la salubrità dell'alimento è il conteggio di *Escherichia coli*.

Tramite questo indicatore è quindi possibile anche prevenire il rischio all'esposizione di batteri patogeni.



# ESCHERICHIA COLI

- Bastoncelli, Gram neg
- Coliformi aerobi/anaerob facoltativi
- Capacità di svilupparsi in presenza di sali biliari
- Capacità di metabolizzare il lattosio con produzione di acido e gas
- Produttore di  $\beta$ -galattosidasi e  $\beta$ -glucuronidasi



In Europa gli standard microbiologici per la determinazione di E. coli sono dettati:

dal Reg 854/2004 (classificazione delle acque)

e

dal Reg 2073/2005 (il controllo microbiologico degli alimenti)

Il metodo di riferimento per la conta di E. coli è un conteggio MPN in base alla ISO TS 16649-3 (Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of b-glucoronidase positive Escherichia coli)



# Preparazione del campione

selezionare per l'analisi solo  
molluschi vivi

Pulire i molluschi con acqua  
corrente rimuovendo vari  
sedimenti



Fare un ultimo lavaggio in  
acqua distillata sterile



Aprire con un bisturi i  
molluschi cercando di lavorare  
in condizioni di sterilità.

Preparare un pool di almeno  
75g (almeno 7 soggetti): polpa  
+ liquido intervalvare

# Tecnica corrente MPN

## Principio del metodo:

- Fornisce una stima statistica della densità batterica
- Si basa sulla combinazione dei tubi positivi e negativi
  - Prova selettiva: terreno e temperatura
  - Lettura: presenza/assenza

Per ottenere un'informazione semi-quantitativa, si esamina una serie di volumi scalari in replica.

La precisione di questo metodo non è elevata, ma l'imprecisione del metodo può essere evitata aumentando il numero di inoculi in parallelo.

# Tecnica corrente MPN

## Protocollo:

10g di omogenato + 90 mL di SSP

effettuare delle diluizioni seriali (dalla diluizione 0 alla -3) in serie di 5 tubi di terreno MMG

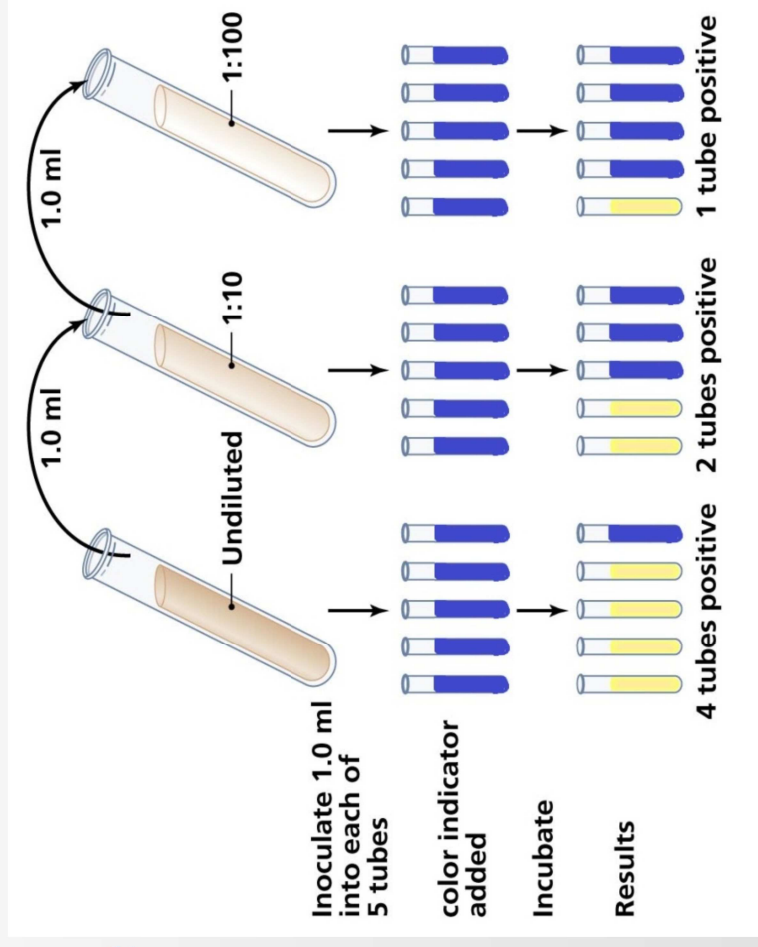
Incubare a 37°C per 24h

Provetta positiva=viraggio al giallo

Confermare le provette + su piastre di TBX e incubare le piastre a 44°C per 24h.

Contare le colonie di colore blu/verde

calcolare il codice MPN e leggere il numero corrispondente di *E. coli* sull'apposita tabella



DELEZIONI	VOLUME INOCULATO	ESCHERICHIA COLI B- GLUCORONIDASI POSITIVI	
		lettura MMCO MMOS	lettura TIBX
0	10 ml	5	5
-1	1ml	4	1
-2	1ml	1	0
-3	1ml	0	0
-4	1ml		
-5	1ml		
-6	1ml		
Risultato MPN/100 g		1400	330
DATA LETTURA		28/11/2014	28/11/2014
Siga operatore		AF	AF

ESEMPI DI LETTURA MPN:

5520 5320 5100

5620 5551

INTERVALLO DI CONFINENZA AL 95%

MAGIORE DI 110

MINORE DI 930

Uso	Number of tubes giving positive reaction		MPN (per 100g)	95% confidence limits	
	5 of 10	5 of 10		Lower	Upper
1	0	0	0	0	0
2	0	1	0	0	0
3	0	2	0	0	0
4	1	0	0	0	0
5	1	0	1	0	0
6	1	1	0	0	0
7	1	1	1	0	0
8	2	0	0	0	0
9	2	1	0	0	0
10	2	2	0	0	0
11	3	0	0	0	0
12	3	1	0	0	0
13	3	2	0	0	0
14	4	0	0	0	0
15	4	1	0	0	0
16	4	2	0	0	0
17	5	0	0	0	0
18	5	1	0	0	0
19	5	2	0	0	0
20	6	0	0	0	0
21	6	1	0	0	0
22	6	2	0	0	0
23	7	0	0	0	0
24	7	1	0	0	0
25	7	2	0	0	0
26	8	0	0	0	0
27	8	1	0	0	0
28	8	2	0	0	0
29	9	0	0	0	0
30	9	1	0	0	0
31	9	2	0	0	0
32	10	0	0	0	0
33	10	1	0	0	0
34	10	2	0	0	0
35	11	0	0	0	0
36	11	1	0	0	0
37	11	2	0	0	0
38	12	0	0	0	0
39	12	1	0	0	0
40	12	2	0	0	0
41	13	0	0	0	0
42	13	1	0	0	0
43	13	2	0	0	0
44	14	0	0	0	0
45	14	1	0	0	0
46	14	2	0	0	0
47	15	0	0	0	0
48	15	1	0	0	0
49	15	2	0	0	0
50	16	0	0	0	0
51	16	1	0	0	0
52	16	2	0	0	0
53	17	0	0	0	0
54	17	1	0	0	0
55	17	2	0	0	0
56	18	0	0	0	0
57	18	1	0	0	0
58	18	2	0	0	0
59	19	0	0	0	0
60	19	1	0	0	0
61	19	2	0	0	0
62	20	0	0	0	0
63	20	1	0	0	0
64	20	2	0	0	0
65	21	0	0	0	0
66	21	1	0	0	0
67	21	2	0	0	0
68	22	0	0	0	0
69	22	1	0	0	0
70	22	2	0	0	0
71	23	0	0	0	0
72	23	1	0	0	0
73	23	2	0	0	0
74	24	0	0	0	0
75	24	1	0	0	0
76	24	2	0	0	0
77	25	0	0	0	0
78	25	1	0	0	0
79	25	2	0	0	0
80	26	0	0	0	0
81	26	1	0	0	0
82	26	2	0	0	0
83	27	0	0	0	0
84	27	1	0	0	0
85	27	2	0	0	0
86	28	0	0	0	0
87	28	1	0	0	0
88	28	2	0	0	0
89	29	0	0	0	0
90	29	1	0	0	0
91	29	2	0	0	0
92	30	0	0	0	0
93	30	1	0	0	0
94	30	2	0	0	0
95	31	0	0	0	0
96	31	1	0	0	0
97	31	2	0	0	0
98	32	0	0	0	0
99	32	1	0	0	0
100	32	2	0	0	0

# Metodi alternativi!

Esistono altri metodi per il conteggio di E. coli che però non sono abbastanza sensibili per queste matrici.

Sono stati studiati e approvati dalle Linee guida europee altri due metodi:

- conta in piastra (UFC) redatto dal CEFAS

*The Centre for Environment, Fisheries and Aquaculture Science*

- metodo impedometrico (BacTrac 4300)

redatto da Ifremer

*National Reference Laboratory for monitoring bacteriological and viral contamination of bivalve molluscs*



# Conteggio di E.coli: conta in piastra (UFC)

E' stato effettuato uno studio di validazione per dimostrare l'equivalenza

della ISO 16649:2

(Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of b-glucuronidase positive Escherichia coli – Part 2: colony count technique at 44°C using 5-bromo-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-glucoronide)

e la ISO 16649:3

(Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of b-glucuronidase positive Escherichia coli – Part 3: Most probable number technique using 5-bromo-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-glucoronide)

rispetto all'applicazione ai molluschi bivalvi\*.

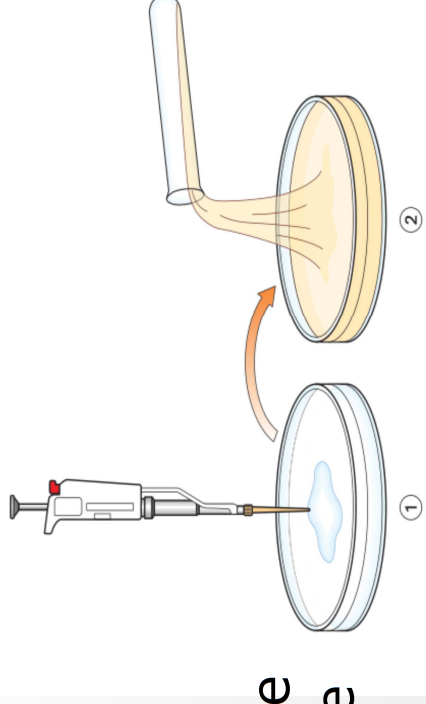
Il protocollo è stato approvato ed applicabile a campioni che hanno un livello di E. coli compreso tra 200UFC/100g e 18000 UFC/100g.

\* validata per tutti i molluschi bivalvi, tranne le vongole per cui è in corso di studio.

# Conteggio di E.coli: conta in piastra (UFC)

## Principio del metodo:

isolamento su un terreno solido selettivo e differenziale e conteggio di colonie tipiche



## Preparazione del campione:

stessa pool=75-100g=m

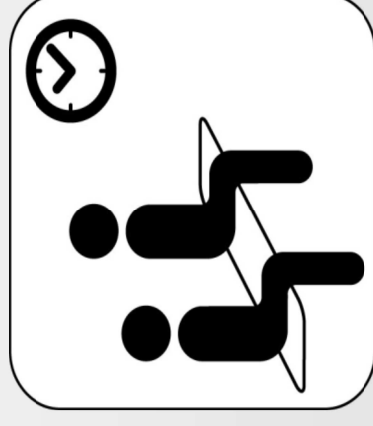
## Protocollo:

aggiungere al pool BPW (o SSP) pari a 1 x m e omogeneizzare per 1-2 min

Dispensare 2mL della coltura in 5 piastre vuote (= 10mL)

Versare il terreno cromogenico TBX

Incubare per 4h a 37°C + 18-24h a 44°C

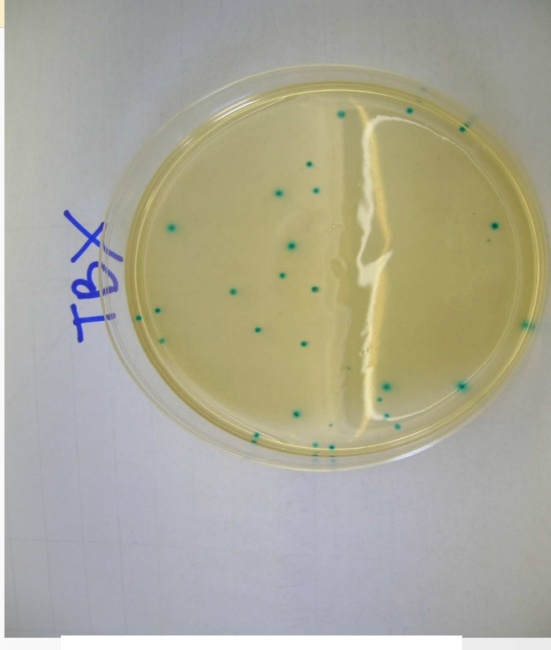




# Conteggio di E.coli: conta in piastra (UFC)

## Risultati:

Dopo incubazione contare le colonie tipiche di E. coli blu/verdi presenti in ciascuna piastra.



Il n° di E. coli presente nel campione è calcolato :

$$N \text{ UFC}/100\text{g} = (\Sigma c / V) \times tv \times 100/\text{m}$$

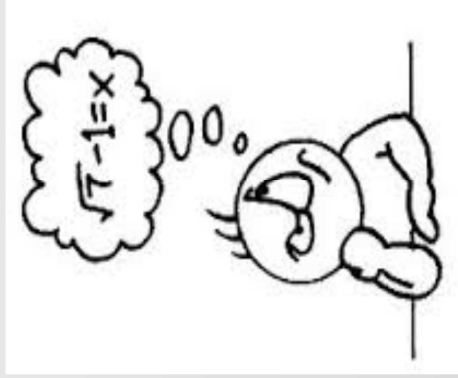
Dove:

$\Sigma c \rightarrow$  n° tot delle colonie tipiche contate

$V \rightarrow$  volume tot dell'inoculo nelle piastre in mL

$tv \rightarrow$  peso tot della sospensione iniziale 1:1

$m \rightarrow$  peso del campione iniziale in g



# Conteggio di E.coli: metodo impedometrico

## Impedometria:

Si basa sulla misura delle variazioni di conducibilità elettrica in un mezzo.

Il metabolismo microbico utilizza substrati nutritivi scomponendole in molecole più piccole

Questi composti elettricamente carichi alterano la conducibilità nel brodo e ne abbassano la resistenza (diminuzione dell'impedenza)

Questa riduzione può essere misurata utilizzando degli elettrodi.

Se agli elettrodi viene applicato un voltaggio di corrente alternata, può essere misurata

*misurazione dei cambiamenti nell'unità di tempo*



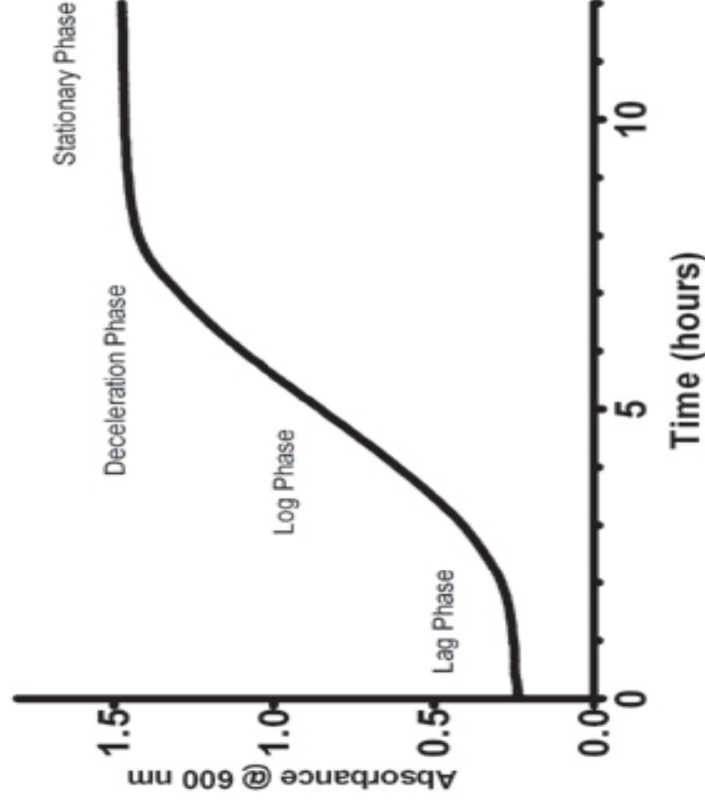
# Conteggio di E.coli: metodo impedometrico

## Principio del metodo:

E. coli crescendo producono dei cataboliti che hanno una carica ionica diversa  $\Rightarrow$  variazione di conducibilità nel mezzo di coltura  
*variazione di impedenza*  
proporzionale al n° di E. coli

Lo strumento rileva l'andamento di crescita (tipica curva) e la valutazione attraverso il IDT *tempo di rilevazione dell'impedenza*  
inversamente proporzionale al log di E. coli

Se E. coli alti  $\Rightarrow$  diminuisce IDT (meno tempo)  
Se E. coli bassi  $\Rightarrow$  aumenta IDT (più tempo)



# Conteggio di E.coli: metodo impedometrico

Preparazione del campione: stessa pool=75-100g=m

## Protocollo:

aggiungere SSP al pool nel rapporto di  
1:2 = camp:diluyente

Omogeneizzare con agitatore di tipo peristaltico

Lasciare riposare l'omogenato per 15-20 min

trasferire 30mL della parte liquida in un sacchetto sterile e aggiungere 70mL di SSP.

Trasferire 7,5 mL di questa coltura in una cella di misurazione (analisi in doppio).

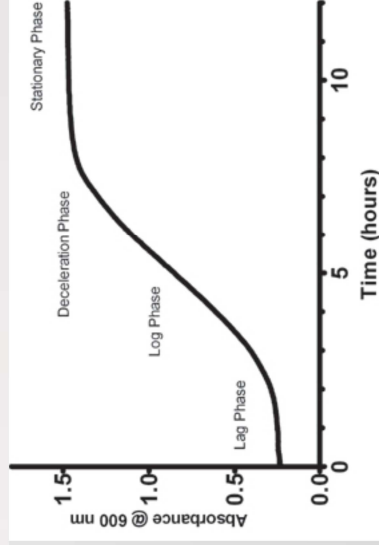


# Conteggio di E.coli: metodo impedometrico

Inserire le celle  
nell'apparecchio e  
impostare i dati  
del/i campione/i  
nel software  
apposito  
(temperatura a  
44°C)



La misura dell'impedenza terminerà 2 ore dopo aver raggiunto il plateau, in modo da ottenere una curva completa (fasi iniziale, esponenziale e stazionaria).

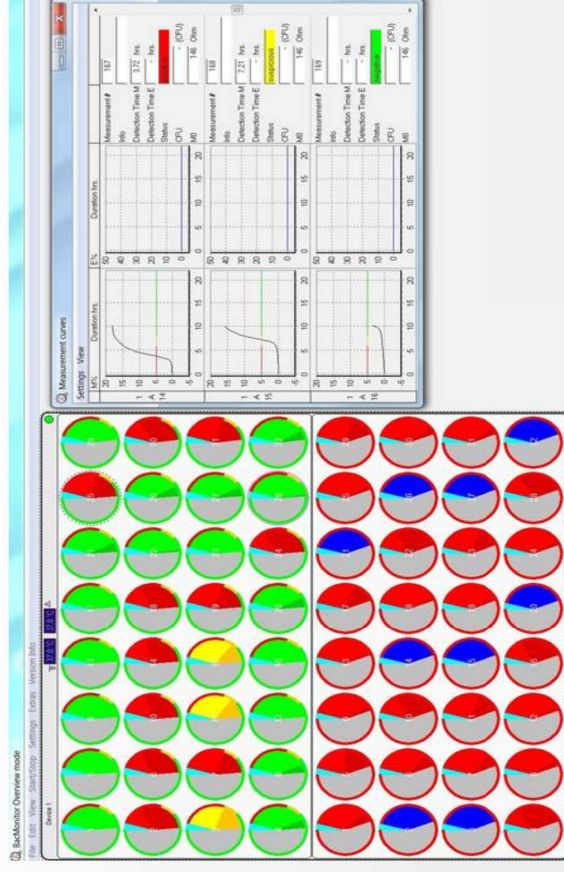




# Conteggio di E.coli: metodo impedometrico

## Risultati:

il programma BacEval elabora la curva di crescita e calcola il numero di E. coli, ma è possibile dare un risultato soltanto se il numero delle due celle di misurazione è ritenuto valido.



Il dato è considerato valido se la curva di crescita non presenta variazioni non interpretabili, altrimenti il dato è invalido o non espresso.

Se dall'analisi in doppio si hanno due dati validi il risultato del numero di Escherichia coli sarà dato dalla media geometrica.

Limiti di quantificazione:  $1,3 \times 10^2$  UFC/100g  
e  $4,0 \times 10^5$  UFC/100g



Grazie per l'attenzione!

