

Corso ecm: Valutazione critica dei risultati delle analisi microbiologiche sugli alimenti : interazione tra laboratori di analisi, produttori e autorità sanitaria

I conteggi microbici



Dr Roberto Fischetti - Istituto Zooprofilattico
Lazio e Toscana – Sezione di Pisa



Gli studi di cui all'articolo 3, paragrafo 2, comprendono:

— consultazione della letteratura scientifica disponibile e dei dati di ricerca sulle caratteristiche di sviluppo e di sopravvivenza dei microrganismi in questione.

E' fondamentale raccogliere i dati storici delle analisi per disporre di valori reali di partenza

Il programma di gestione campioni-analisi dovrebbe permettere una semplice ed accurata raccolta dei dati.

Per uno **studio completo, dei positivi** in particolare, è inevitabile un'ulteriore raccolta dati su supporto elettronico in modo da poter effettuare vari tipi di statistiche: prevalenza, **quantità patogeni**, aw, pH ecc



METODI CONTEGGIO BATTERICO

Conteggio in piastra : *conteggio diretto: ad ogni colonia corrisponde la conta di 1 germe (es.: L. monocytogenes Reg. 2073).*

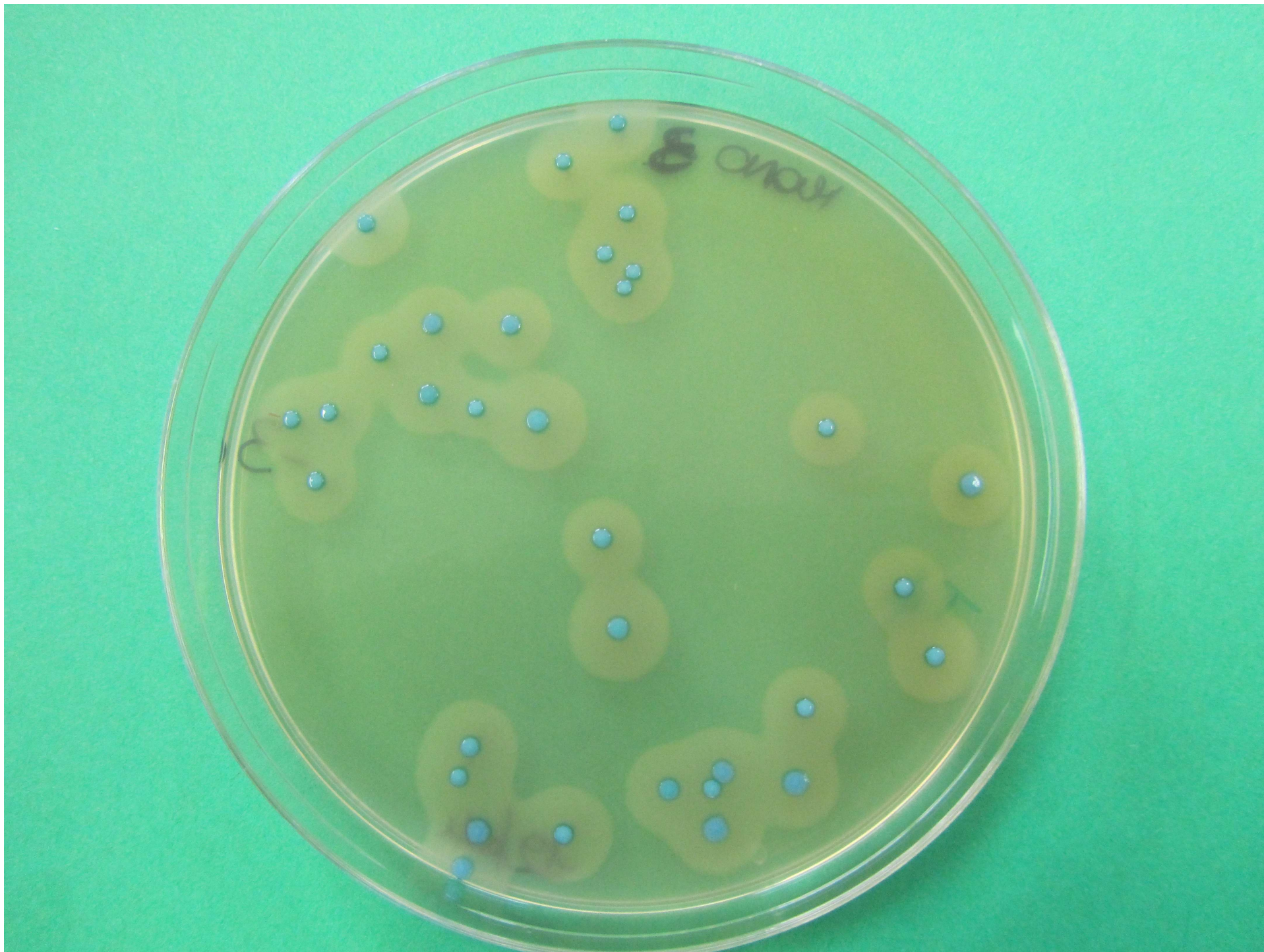
Limite rilevabilità = 10 ufc/g

Conteggio Most Probable Number (MPN) : *è un esame colturale , ma è valutato indirettamente esaminando statisticamente un certo numero di brodocolture (es.: L. monocytogenes OM 1993)*

Limite rilevabilità = 0.003 MPN/g

VANTAGGI MPN : maggiore sensibilità, quindi maggiore capacità di rilevare numeri molto bassi di batteri





Conteggio in piastra

Nel challenge test si usa il conteggio in piastra per contare il germe in oggetto.

CONSEGUENZA:

Siamo costretti a contaminare con quantità iniziali generalmente superiori o molto superiori a quelle normalmente presenti (germi patogeni)

Metodo MPN

Consiste nel valutare i risultati di prove microbiologiche eseguite in un numero variabile di provette o altri contenitori.

Norme ISO prevedono un numero uguale di provette per ogni diluizione e forniscono una tabella di lettura con limiti di confidenza

E' possibile eseguire il metodo con un numero di provette differente per diluizione o anche ad una sola diluizione. Si deve però preparare un foglio di calcolo per ottenere i valori dei conteggi

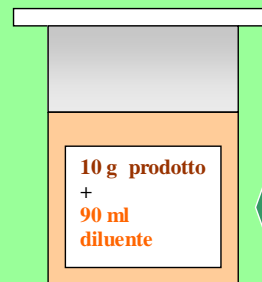
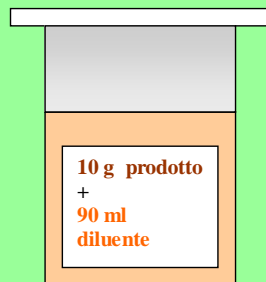
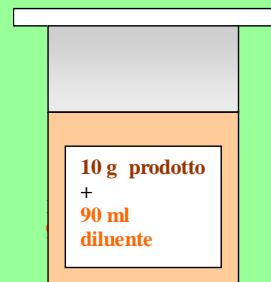
Principio del metodo MPN

In ogni contenitore (o provetta)
viene eseguita una ricerca qualitativa
(presenza-assenza)

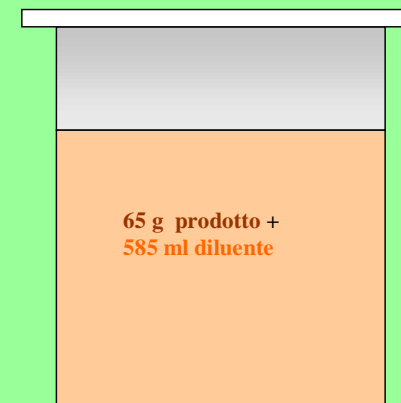
La combinazione degli esiti positivi e negativi
fornisce, attraverso un calcolo statistico, il
conteggio espresso in mpn

CONTEGGIO GERMI PATOGENI metodo MPN AD ALTA SENSIBILITA'

1° serie



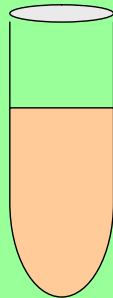
100 ml
X
3



2° serie

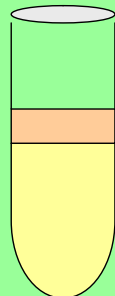
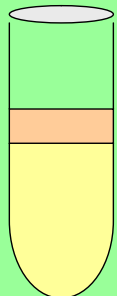
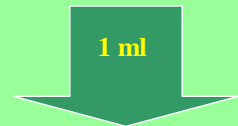


10
ml



1 ml

3° serie



Limite rilevabilità = 0.03 MPN/g

**Perché è necessario
un conteggio
batterico ad alta
sensibilità ?**

[assenzaPATOGENO.xls](#)

Le unità campionarie (UC)

Table 13.1 Effetto della qualità del lotto (% irregolari) sulla probabilità di approvazione (%) per differenti piani di campionamento a 2 classi (EC, 1998).

% campioni non conformi nel lotto	Probabilità di approvare (%) dati piani di campionamento con un totale di "n" campioni e la tolleranza di "c" campioni irregolari			
	n = 1; c = 0	n = 5; c = 0	n = 10; c = 0	n = 60; c = 0
1	99.0	95.1	90.4	54.7
2	98.0	90.4	81.7	30
5	95.0	77.4	59.9	4.6
10	90.0	59.1	34.9	0.18
20	80.0	32.8	10.7	0.00015

The most stringent sampling plan proposed by ICMSF (1986) is the sampling plan for *Salmonella* in baby food. In this plan 60 samples are analysed ($n = 60$) and none are allowed to contain *Salmonella* ($c = 0$). Even in this case there is a 30% chance of accepting products with 2% of sample units contaminated with *Salmonella*.

If the level of contamination in a lot is 0.5% it can be estimated that examination of 600 samples would be necessary for a 95% probability of detecting the contaminated lot. This probability would decrease to 45%, if the level of contamination is 0.1%. It can be concluded that if the level of contamination is not at least in the order of 5% or more, there is very little chance of detecting contaminated lots, and sampling and testing would therefore not improve the safety or decrease the risk. Sampling and microbiological testing is in this situation not suitable means for defining the acceptability of food lots and a MC is meaningless.

Le unità campionarie (UC)

Table 13.1 Effetto della qualità del lotto (% irregolari) sulla probabilità di approvazione (%) per differenti piani di campionamento a 2 classi (EC, 1998).

% campioni non conformi nel lotto	Alimenti in polvere (lattanti, proseguimento) ... e destinati a fini medici speciali : SALMONELLA , CRONOBACTER			
	n = 1; c = 0	n = 5; c = 0	n = 30; c = 0	n = 60; c = 0
1	99.0	95.1	90.4	54.7
2	98.0	90.4	81.7	30
5	95.0	77.4	59.9	4.6
10	90.0	59.1	34.9	0.18
20	80.0	32.8	10.7	0.00015

The most stringent sampling plan proposed by ICMSF (1986) is the sampling plan for *Salmonella* in baby food. In this plan 60 samples are analysed ($n = 60$) and none are allowed to contain *Salmonella*. In this case there is a 30% chance of accepting products with 2% of sample units contaminated with *Salmonella*.

If the level of contamination in a lot is 0.5% it can be estimated that examination of 600 samples would be necessary for a 95% probability of detecting the contaminated lot. This probability would

Conteggio MPN con Unità Campionarie

***Stiamo valutando la possibilità di
conteggiare i germi utilizzando le unità
campionarie positive e considerando
l'insieme delle prove qualitative effettuate
sul campione come un conteggio MPN***

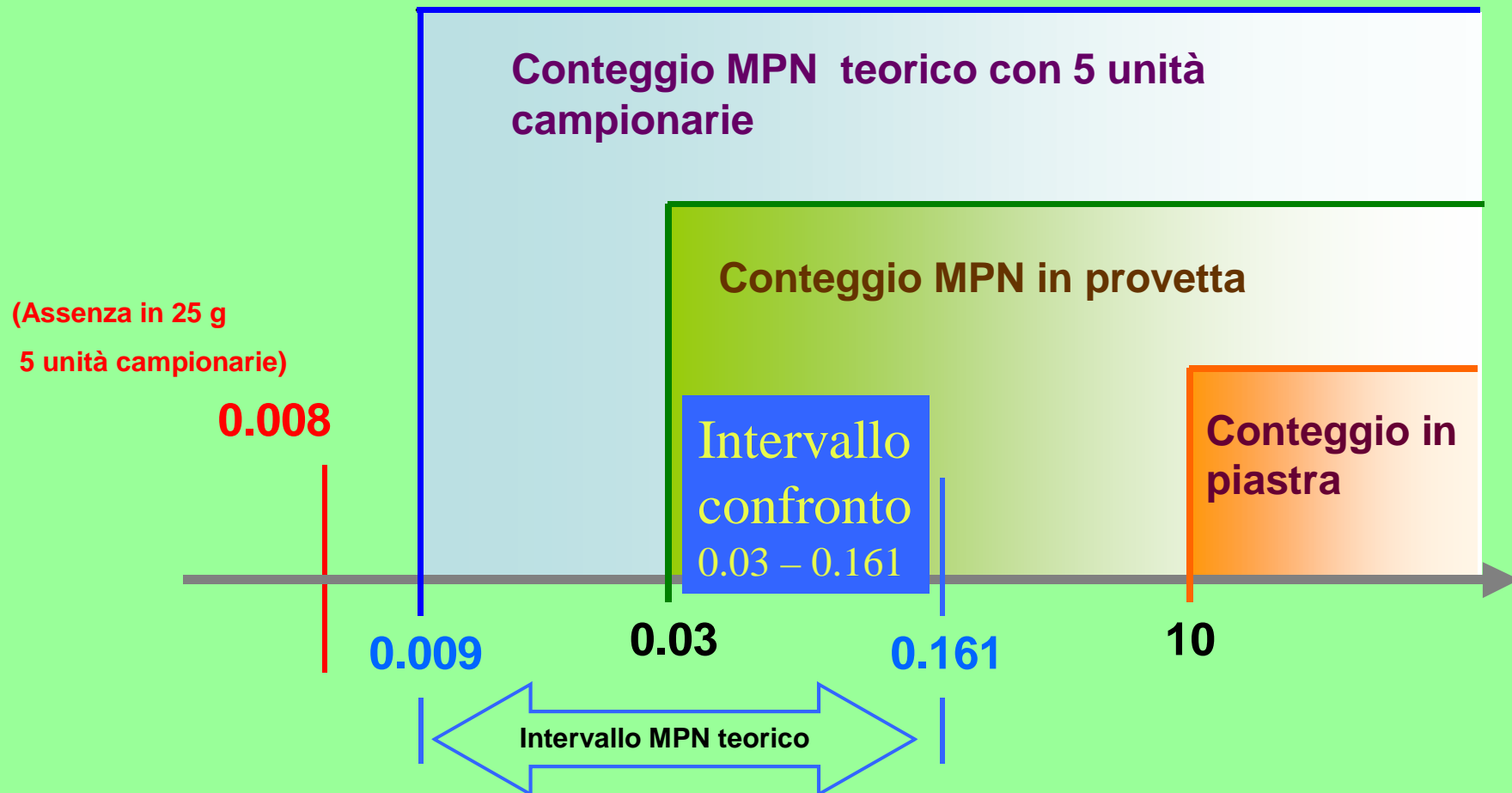
Excel - Calcoli								
Modifica Visualizza Inserisci Formato Strumenti Dati Finestra ?								
fx								
	B	C	D	E	F	G	H	I
		N	P	V	MPN	inf	sup	LN MPN
		n° totale prove(tte)	n° prove(tte) positive	g o ml prelevati				
10 UC		10	1	10	0.011	0.001	0.075	-6.9
		10	2	10	0.022	0.006	0.089	-5.7
		10	3	10	0.036	0.011	0.111	-4.7
		10	4	10	0.051	0.019	0.137	-3.9
		10	5	10	0.069	0.028	0.169	-3.4
		10	6	10	0.092	0.040	0.210	-3.2
		10	7	10	0.120	0.055	0.264	-2.9
		10	8	10	0.161	0.074	0.347	-2.4
		10	9	10	0.230	0.103	0.516	-2.2
		10	10	10	Non valid	#VALORE!	#####	#####
5 UC		5	1	10	0.022	0.003	0.159	-5.7
		5	2	10	0.051	0.013	0.207	-4.7
		5	3	10	0.092	0.028	0.295	-3.9
		5	4	10	0.161	0.054	0.478	-2.9
		5	5	10	Non valid	#VALORE!	#####	#####
2 UC		2	1	10	0.069	0.009	0.512	-4.8
		2	2	10	Non valid	#VALORE!	#####	#####
10 UC		10	1	25	0.004	0.001	0.030	-7.7
		10	2	25	0.009	0.002	0.036	-6.7
		10	3	25	0.014	0.005	0.044	-5.7

MPN

Nelle predizioni
si usa il limite
di confidenza
superiore

Limite di rilevabilità dei diversi metodi
di conteggio microbico – ALIMENTI PRONTI

Esempio con 5 unità campionarie : evidenziato l'intervallo nel quale si può confrontare il conteggio teorico con quello sperimentale



R	S	T	U	V	W	X	Y	Z	AA	AE
grammi per UC	n° UC positive	tot UC campio nate	n° UC positive = S	TOT grammi campio nati	Valori quantitati ve MPN ed UFC	SIGNIFICATIVIT A' patogeno per g rilevato	CONTEGGIO TEORICO			
							valore MPN	limite inf 95%	limite sup 95%	LN MF
			0	0		#VALORE!		#VALORE!	#VALORE!	#VALORE!
			0	0	<0.03	#VALORE!		#VALORE!	#VALORE!	#VALORE!
25	1	5	1	125	<0.03	<0.03	0.009	0.001	0.064	
25	1	5	1	125	0.036	0.036	0.009	0.001	0.064	
25	1	5	1	125	<0.03	<0.03	0.009	0.001	0.064	
25	1	5	1	125	<0.03	<0.03	0.009	0.001	0.064	
25	1	5	1	125	<0.03	<0.03	0.009	0.001	0.064	
			0	0	<0.03	#VALORE!		#VALORE!	#VALORE!	#VALORE!
			0	0	0.036	#VALORE!		#VALORE!	#VALORE!	#VALORE!
			0	0	<0.03	#VALORE!		#VALORE!	#VALORE!	#VALORE!
25	1	5	1	125	<0.03	<0.03	0.009	0.001	0.064	
25	5	5	5	125	2.4	#VALORE!	Non Valido	#VALORE!	#VALORE!	#VALORE!
25	5	5	5	125	0.074	#VALORE!	Non Valido	#VALORE!	#VALORE!	#VALORE!
10	4	5	4	50	0.92	0.92	0.161	0.054	0.478	
			0	0	0.92	#VALORE!		#VALORE!	#VALORE!	#VALORE!
10	1	5	1	50		0	0.022	0.003	0.159	

CONTEGGIO TEORICO										
R	S	T	U	V	W	X	Y	Z	AA	AE
grammi per UC	n° UC positive	tot UC campio nate	n° UC positive = S	TOT grammi campio nati	Valori quantitati ve MPN ed UFC	SIGNIFICATIVIT A' patogeno per g rilevato	valore MPN	limite inf 95%	limite sup 95%	LN MF
			0	0		#VALORE!		#VALORE!	#VALORE!	#VALORE!
			0	0	<0.03	#VALORE!		#VALORE!	#VALORE!	#VALORE!
25	1	5	1	125	<0.03	<0.03	0.009	0.001	0.064	
25	1	5	1	125	0.036	0.036	0.009	0.001	0.064	
25	1	5	1	125	<0.03	<0.03	0.009	0.001	0.064	
25	1	5	1	125	<0.03	<0.03	0.009	0.001	0.064	
25	1	5	1	125	<0.03	<0.03	0.009	0.001	0.064	
			0	0	<0.03	#VALORE!		#VALORE!	#VALORE!	#VALORE!
			0	0	0.036	#VALORE!		#VALORE!	#VALORE!	#VALORE!
			0	0	<0.03	#VALORE!		#VALORE!	#VALORE!	#VALORE!
25	1	5	1	125	<0.03	<0.03	0.009	0.001	0.064	
25	5	5	5	125	2.4	#VALORE!	Non Valido	#VALORE!	#VALORE!	#VALORE!
25	5	5	5	125	0.074	#VALORE!	Non Valido	#VALORE!	#VALORE!	#VALORE!
10	4	5	4	50	0.92	0.92	0.161	0.054	0.478	
			0	0	0.92	#VALORE!		#VALORE!	#VALORE!	#VALORE!
10	1	5	1	50		0	0.022	0.003	0.159	