

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI PADOVA

**DIPARTIMENTO DI SANITÀ PUBBLICA, PATOLOGIA
COMPARATA ED IGIENE VETERINARIA**

TESI DI LAUREA IN MEDICINA VETERINARIA

**UN SISTEMA RAPIDO ED INNOVATIVO PER L'ANALISI
MICROBIOLOGICA DEGLI ALIMENTI:
LA CITOMETRIA A FLUSSO
PROVE SPERIMENTALI DI VALIDAZIONE**

Relatore: **Prof. Valerio Giaccone**

Correlatore: **Dott. Marcello Ferioli**

Laureando: **Alessandro Zerbetto**

Indice

<i>Abstract</i>	5
Capitolo 1: Introduzione ed Obiettivi	7
Capitolo 2: Rassegna Bibliografica	13
2.1 Fonti Di Inquinamento	13
2.2 Composizione Della Flora Microbica Inquinante	14
2.3 Interazione Tra Flora Microbica E Substrato	16
2.4 La Tecnica Classica	18
2.4.1 Dalla Nascita ad Oggi	18
2.4.2 Le Prove Qualitative	19
2.4.3 Le Prove Quantitative	20
2.4.4 Tecnica Classica Modificata	23
2.4.5 Tecnica Classica Automatizzata	24
2.5 Le Tecniche Alternative	26
2.5.1 Le Tecniche Biochimiche	26
2.5.2 Le Tecniche Microscopiche	27
2.5.3 Le Tecniche Immunoenzimatiche	27
2.5.4 Metodi di Analisi Basati sull'Utilizzo dei Batteriofagi	29
2.5.5 Le Tecniche di Biologia Molecolare	30
2.5.6 Le Tecniche Future	31
2.6 La Citometria a Flusso	33
2.6.1 Introduzione al Metodo	33
2.6.2 Descrizione della Tecnica	33
2.6.3 Utilizzo dei Fluorofori	36
2.6.4 Interpretazione dei Dati	37
2.6.5 Vantaggi del Metodo: le Cellule VBNC	38
2.6.6 Applicazioni Industriali	40
Capitolo 3: Parte Sperimentale	45
3.1 Materiali Utilizzati	46
3.1.1 Tecnica Classica	46
3.1.2 Citometria a Flusso	46
3.2 Metodi	50

3.2.1 Tecnica Classica	50
3.1.2 Citometria a Flusso	50
3.3 Risultati	56
3.3.1 Presentazione dei Dati.....	57
3.3.2 Regressione Lineare.....	59
3.3.2 Distribuzione Normale.....	60
3.3.3 Calcolo della Concordanza Mediante Utilizzo del T-Test	62
3.4 Conclusioni	64
Bibliografia.....	75
Webgrafia	85

Abstract

Flow cytometry is a powerful technique for the rapid analysis of single cells, based on light scattering and fluorescent measurements. The power of flow cytometry is the possibility to determine a wide range of single cell parameters in a very short time.

The flow cytometry could be applied also in food microbiology, but we need to have a validation of the method, comparing it with the traditional methodologies.

This work is a validation of the method applied to the total microbial count in meat, compared with the classical technique of determination of TVC in solid media. In the first part it contains the bases of both the procedures, in the second one the statistical analysis of data for specificity, sensibility, correlation and repeatability.

A short review of the other alternative techniques in commerce is also content, with main strengths and weaknesses of that.

The results obtained confirm that the flow cytometry could be employed in the determination of TVC in foods, as a quite good alternative to the classical method.

Capitolo 1

Introduzione ed Obiettivi

Tutti noi abbiamo per istinto atavico la capacità di capire, utilizzando i nostri sensi, quando un alimento può essere mangiato: bastano un colore anormale, un odore diverso da quello a cui siamo abituati o altre alterazioni sensoriali, ed ecco che subito decidiamo di non utilizzare l'alimento. Purtroppo per noi esistono molteplici agenti patogeni (batteri, tossine, spore, virus, ecc.) che non alterano le caratteristiche organolettiche degli alimenti, ma che sono comunque in grado di causare malattia alimentare. Per ovviare a questo limite delle nostre capacità sensoriali, diventa necessario arginare il più possibile la contaminazione di suddetti agenti negli alimenti e, quando ciò non possa avverarsi, andare alla loro ricerca.

Visto il possibile rischio per la popolazione correlato alla presenza di agenti causa di malattia alimentare, fin dal 1890, il nostro Stato si è fatto dovere di regolamentare l'igiene alimentare, dalla produzione, alla trasformazione, alla vendita diretta. Nel tempo i regolamenti hanno subito notevoli modifiche, visti i continui episodi di malattia alimentare che, nonostante l'evoluzione delle tecniche sperimentali di analisi degli alimenti, continuano ad imperversare in tutto il mondo. Si pensi, ad esempio, che la WHO (*World Health Organization*, Organizzazione Mondiale della Sanità) ritiene che le malattie dovute da alimenti non idonei al consumo umano costituiscano molto probabilmente il problema di salute pubblica più diffuso al mondo. Negli Stati Uniti ogni anno 76 milioni di persone contraggono una malattia alimentare, e lo 0,4% di essi chiede assistenza sanitaria alla rete ospedaliera, con conseguenti elevati dispendi economici: si calcolano 400 miliardi di dollari spesi all'anno dagli USA *solo per le malattie alimentari*, dato affiancato dai 5 miliardi di euro in Italia (Giaccone, 2007).

La legislazione ha seguito un proprio corso evolutivo sovente correlato a determinati scandali che hanno influenzato l'opinione pubblica, rendendo necessaria l'attuazione di normative via



Figura 1.1: quadro paraparetico tipico di sindrome della mucca pazza.

via più stringenti. Nessuno di noi probabilmente dimenticherà mai le influenze aviare e suina, la “sindrome della mucca pazza” [Figura 1.1], gli episodi di alimenti tossici come i polli alla diossina, la morte di un ragazzo di 15 anni per del mascarpone al botulino...

Inoltre, in questi ultimi anni, è esploso e si sta confermando sempre più il fenomeno della cosiddetta *ristorazione collettiva* [Figura 1.2]: ormai tantissime persone, in tutto il mondo

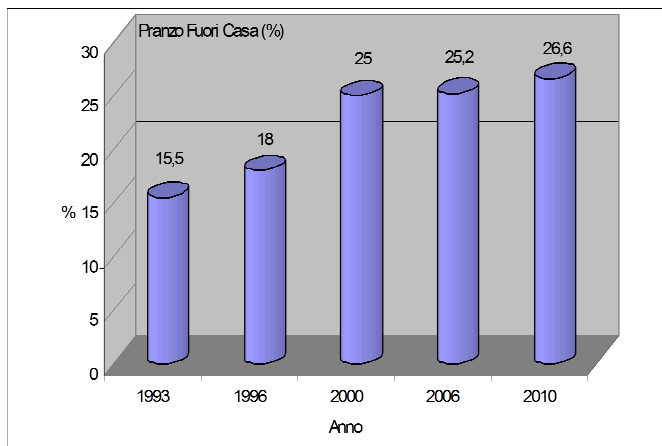


Figura 1.2: come è cambiato il nostro stile alimentare. Il pranzo veniva consumato fuori casa dal 15,5% degli italiani nel 1993, contro il 26,6% del 2010. Fonte: ISTAT.

occidentale, fanno almeno un pasto al giorno lontani da casa, in luoghi pubblici come mense, ristoranti, bar, ecc.: i controlli sono in pratica sempre più necessari, altrimenti un singolo alimento non idoneo al consumo umano può causare malattia in una moltitudine di persone.

Attualmente la produzione degli alimenti è regolata dal “Pacchetto Igiene”, insieme di normative comunitarie entrato in vigore in tutti i Paesi UE tra il 2006 e il 2008. Esso prevede controlli lungo tutta la catena di produzione, ad onere dei produttori, i quali in pratica “certificano” che il loro prodotti sono salubri e, di conseguenza, commerciabili. I controlli riguardano materie prime, semilavorati, prodotti finiti, superfici di lavoro e, in particolare per gli alimenti di origine animale, anche mangimi e animali vivi: tutta la catena alimentare viene controllata, perché in ognuna delle sue fasi può avvenire una contaminazione, che accompagnerà il prodotto lungo tutta la filiera alimentare.

Molte di queste aziende non dispongono di un proprio laboratorio d’analisi per l’effettuazione dei controlli sanitari, perciò si affidano a laboratori accreditati secondo precise norme ISO comunitarie.

Le analisi sugli alimenti si dividono in due principali categorie:

- **ricerca di agenti patogeni vivi:** sono prove che determinano la presenza di determinati agenti, soprattutto batteri, in grado di causare malattia alimentare; in certi casi basta sapere se l'agente c'è, visto il suo enorme potenziale patogeno (prove *qualitative*); in altri casi bisogna riuscire a calcolare quante cellule batteriche sono contenute nell'alimento, ovvero andare a determinare la Carica Microbica (prove *quantitative*);
- **ricerca di sostanze nocive o tossiche** per l'uomo: ad esempio tossine batteriche, metalli pesanti, rifiuti industriali, sostanze cancerogene, fitosanitari, ecc..

La normativa prevede che il produttore, a proprie spese, effettui le suddette ricerche, e che solo *dopo* il completamento di queste possa commercializzare il prodotto alimentare. Alcune ricerche sono obbligatorie sempre e per tutti gli alimenti, altre sono obbligatorie solo per alcuni alimenti, altre ancora sono facoltative.

Per quanto riguarda i prodotti di origine animale, ed in particolare la carne, oggetto principale di questo studio, la normativa prevede l'obbligo di effettuare:

- prove qualitative per: *Salmonella spp*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter spp*, *Escherichia coli O157*;
- prove quantitative per: CMT (Carica Microbica Totale), coliformi (indici di contaminazione fecale), *Pseudomonas spp* (principale agente putrefattivo della carne);
- ricerca di residui tossici secondo il PNR (Piano Nazionale Residui).

Le tecniche per eseguire queste ricerche nascono verso la fine del 1800, con l'invenzione da parte di Petri delle omonime capsule [Figura 1.3]: da oltre un secolo, infatti, questo strumento è la base di tutta la microbiologia. Nel tempo ovviamente ha subito numerose modifiche e miglioramenti, ma il principio è rimasto praticamente invariato.

La capsula è formata attualmente da due parti complementari in plastica (usa e getta) o vetro (riutilizzabile dopo sterilizzazione termica), una base ed un coperchio, ed al suo interno avviene la "semina" dei campioni da analizzare. L'uso di appositi terreni di coltura rende possibile il raggiungimento di svariati obiettivi.

Negli ultimi anni diversi metodi alternativi e più moderni sono stati creati in tutto il mondo, e



Figura 1.3: capsula Petri in vetro.

si sono candidati come successori della tecnica classica in piastra Petri, ma non sempre hanno ricevuto molti consensi. L'avanzamento delle tecnologie disponibili e la necessità sempre più pressante, da parte dei produttori, di ridurre i tempi per effettuare le analisi, sta però da tempo spingendo le principali aziende microbiologiche mondiali a trovare metodi innovativi di ricerca, che diano risultati comparabili a quelli della tecnica classica, ma in periodi minori, e magari mantenendo i costi a livelli accessibili a tutti. Questo perché, per le aziende alimentari, avere i risultati prima significa, in brevi termini, diminuire le spese.

L'obiettivo di questa tesi è stato l'utilizzo di una di queste metodiche alternative di analisi degli alimenti: la **Citometria a Flusso**. Le prove pratiche sono state effettuate comparando i risultati con quelli della tecnica classica, e si è giunti ad una vera e propria validazione del metodo.

Seguono la descrizione della tecnica classica, della citometria a flusso, ed i risultati delle prove sperimentali. Sono presenti anche dei brevi richiami alle altre metodiche alternative presenti attualmente sul mercato.

Saranno fatti, dove possibile, commenti oggettivi su pregi e difetti delle varie metodiche, anche se il presente lavoro non si vanta di poter essere la base per scegliere come attrezzare un laboratorio d'analisi, ma solo uno spunto per conoscerne le caratteristiche principali.

Capitolo 2

Rassegna Bibliografica

2.1 Fonti Di Inquinamento

Le analisi sugli alimenti vengono effettuate perché, purtroppo, in un qualunque punto del processo produttivo, essi possono essere contaminati da agenti di diversa natura e pericolosità. Questo punto può collocarsi ovunque, nello spazio e nel tempo, durante ognuna delle fasi di produzione. Per la carne, ad esempio, la ricerca dell'origine di un agente è difficoltosa e spesso impossibile, vista l'eterogeneità delle possibili fonti d'inquinamento:

- nell'animale vivo: i mangimi, la lettiera, gli altri animali, gli operatori, ecc.;
- nel processo di macellazione: gli operatori, gli strumenti, i macchinari utilizzati, le condizioni di temperatura e umidità dell'ambiente di lavoro, ecc.;
- nella trasformazione in prodotto finale: gli operatori, gli strumenti e i macchinari, le superfici di lavoro, l'igienicità dei procedimenti, ecc.;
- nel trasporto e nella vendita al dettaglio: soprattutto fattori ambientali (temperatura, umidità, ecc.), di solito non implicati nell'inquinamento diretto dell'alimento, ma che possono favorire la crescita di determinati agenti patogeni.

La semplice chiave di lettura è che un'azienda è impossibilitata ad effettuare analisi su ognuna di queste fasi: sarebbe un enorme dispendio di tempo e risorse.

Considerate queste problematiche, una possibile risoluzione può essere il controllo sistematico e perfettamente eseguito sulle materie prime. La suddetta procedura ha alcuni vantaggi: permette di evidenziare al meglio la fonte d'inquinamento, e soprattutto dà la possibilità di perfezionare l'igiene, in modo tale da evitare che il problema si ripresenti in futuro. Ovviamente il tutto ben *prima* che il prodotto sia ultimato, evitando inutili sprechi di denaro (Miller *et al.*, 2008).

Per i successivi punti di cui è composto il processo produttivo, teoricamente un rigido rispetto del manuale HACCP (*Hazard Analysis Critical Control Point*, controllo dei pericoli e individuazione dei punti di controllo dei pericoli stessi) e delle BPL (Buone Prassi Lavorati-

ve, come l'igiene personale, la pulizia degli strumenti e delle superfici, ecc.) *dovrebbero* essere sufficienti (Arvanitoyannis & Traikou, 2005); (Van der Spiegel *et al.*, 2004).

Il condizionale è però d'obbligo. Purtroppo si è sempre di fronte a problemi difficilmente tangibili, invisibili, e quindi insidiosi. Un controllo casuale dei prodotti finiti, in numero statisticamente rilevante rispetto al totale dello stesso lotto, è ritenuto comunque indispensabile.

2.2 Composizione Della Flora Microbica Inquinante

La popolazione microbica inquinante gli alimenti è molto variabile, sia per tipo che per distribuzione. Viene normalmente divisa in flora *patogena* e flora *saprofita* (o innocua). Bisogna però tenere conto che, potenzialmente, anche microrganismi tendenzialmente innocui, in determinate situazioni, possono rappresentare un rischio per la salute umana. Contano, ad esempio, la carica microbica infettate, le condizioni del sistema immunitario del soggetto, il ceppo e la virulenza del microbo, ecc.

Vista la possibilità di numerose combinazioni tra i fattori sopra elencati, si ritiene più opportuno parlare di microrganismi probabili patogeni, improbabili patogeni, alteranti, tendenzialmente utili e neutri (Giaccone, 2007).

I microrganismi probabili patogeni sono quelli che, per potenziali intrinseci, causano molto spesso malattia alimentare se ingeriti. Vengono anche definiti "*patogeni per vocazione*" (Tauxe, 2002). Spesso non inducono modificazioni sensoriali all'alimento così marcate da renderlo sgradevole. I principali batteri probabili patogeni

sono: *Salmonella*, *Campylobacter*, *Listeria* [Figura 2.1], *Escherichia*, *Bacillus*, *Vibrio*, *Staphylococcus*, *Clostridium*, *Aeromonas*, *Yersinia*. Solitamente la loro carica infettante iniziale è bassa, anche meno di 1 ufc/g, e per dare malattia devono prima moltiplicarsi nel

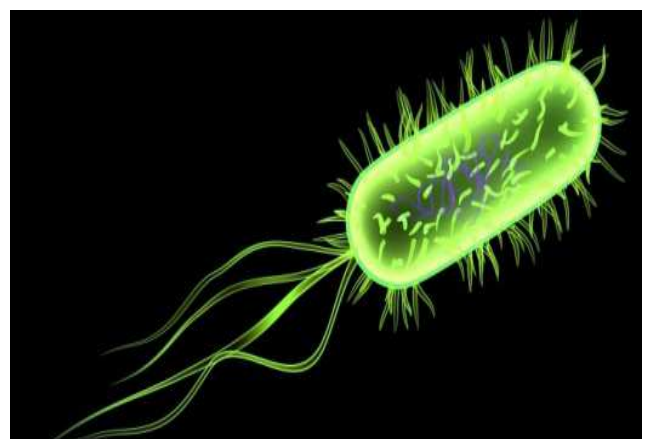


Figura 2.1: ricostruzione computerizzata dell'aspetto di *Listeria monocytogenes*.

substrato: conta, perciò, la composizione dell'alimento, che potrà favorire la crescita di una o più specie batteriche patogene.

Altri germi collocati in questo gruppo sono:

- virus: *Norovirus* (causanti gastroenterite acuta), *Heparnavirus* (virus dell'epatite infettiva A);
- protozoi: *Giardia*, *Entamoeba*, *Cryptosporidium*, *Cyclospora*.

Sono racchiusi tra i **microrganismi improbabili patogeni** tutti quei microbi che, solitamente, non danno origine a malattia alimentare. Possono esserne causa in determinate situazioni, come per sovraccrescite incontrollate, o in caso di stati di immunodeficienza del soggetto. Sono spesso anche batteri alteranti.

I **batteri alteranti** causano deterioramento della composizione molecolare dell'alimento per l'azione di enzimi litici endogeni e/o extracellulari (esogeni). Macroscopicamente possono manifestarsi come modificazioni di colore, aroma, sviluppo di gas (di solito CO₂), che in ogni caso rendono l'alimento diverso dallo standard o sgradevole all'uomo. Anche in questo caso sono necessarie cariche raggiungibili solo dopo moltiplicazione della flora inquinante sul substrato alimentare. Sono microrganismi alteranti:

- batteri: le *Enterobacteriaceae*, *Pseudomonas*, *Alteromonas*, alcuni *Clostridium* ed alcuni *Bacillus*;
- moltissime muffe;
- lieviti: *Torula*, *Debaryomyces*.

I **batteri utili** sono invece quelli che, grazie al loro pattern enzimatico, modificano un alimento conferendogli caratteristiche sia sensoriali sia nutrizionali gradevoli, spesso tipiche e ricercate dai consumatori. Solitamente stanno alla base del processo produttivo degli alimenti fermentati, come formaggi, salumi, bevande alcoliche, ecc. I più conosciuti rappresentati di questo segmento microbico sono i batteri lattici [Figura 2.2].

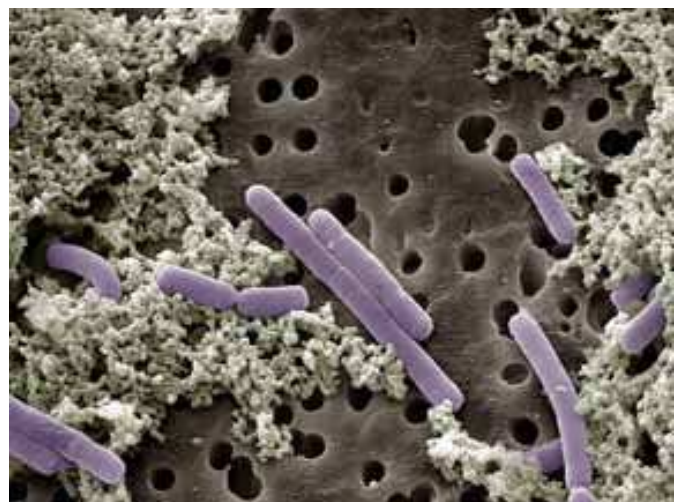


Figura 2.2: *Lactobacillus casei* al microscopio elettronico.

Infine, i **microrganismi neutri** sono quelli che giungono sull'alimento provenendo dall'ambiente (polveri, acqua, strumenti) e che non rivestono un ruolo particolare: non sono né patogeni, né alteranti, né utili. Contribuiscono, in pratica, a far aumentare la Carica Microbica Totale. Sono principalmente muffe, lieviti e batteri (*Micrococcacee*, *Bacillacee*, *Corynebacterium*).

2.3 Interazione Tra Flora Microbica E Substrato

I batteri interagiscono con gli alimenti che inquinano sfruttandone le fonti energetiche [Figura 2.3]. Queste vengono destinate per perseguire l'obiettivo fondamentale di ogni essere vivente: riprodursi. La riproduzione batterica avviene per scissione binaria, ovvero ogni singola cellula si divide formandone due, che a loro volta si divideranno formandone quattro, da quattro si passa ad otto, e così via, teoricamente all'infinito. Questa sequenza

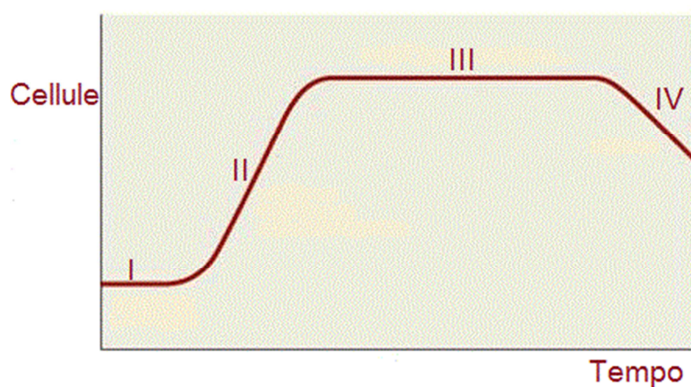


Figura 2.3: Curva di popolazione microbica in un nuovo substrato. I: Fase di Latenza; II: Fase di Crescita Esponenziale; III: Fase Stazionaria; IV: Fase di Morte Cellulare.

viene facilmente descritta dalla formula $y=x^2$, graficamente rappresentata da una parabola, ed è denominata **fase di crescita esponenziale** della popolazione batterica (*Fase II*). Essa è però preceduta da una **fase di latenza** (*Fase I*) dei microrganismi, paragonabile ad un adattamento al substrato. Ogni specie batterica, infatti, ha le proprie esigenze, in termini di fonti di Carbonio, di

Ossigeno, di Azoto, e ovviamente di energia. La fase di latenza va a selezionare, nel contesto della popolazione microbica, le linee più adatte al substrato, e solo queste saranno in grado di raggiungere la fase di crescita esponenziale.

A seguito di queste prime fasi, altre due si succedono, e sono caratterizzate da una lenta ma inesorabile decadenza della popolazione batterica. Prima c'è una **fase stazionaria**

(Fase III), la cui lunghezza è molto variabile e dipende da svariati fattori: la specie batterica, ma soprattutto la quantità residua di fonti energetiche del substrato e la concentrazione delle sostanze di rifiuto prodotte dal metabolismo cellulare. Quando l'energia inizia a scarseggiare, e i rifiuti invece abbondano, inizia il quarto ed ultimo periodo, la **fase di morte cellulare** (Fase IV) (Monod, 1949).

Spesso, però, la crescita dei microrganismi nel substrato può essere limitata da elementi di controllo, come possono essere i processi conservativi effettuati dall'uomo per allungare la *shelf life* (conservabilità) degli alimenti: uso del sotto vuoto, trattamenti termici (pastorizzazione, sterilizzazione, refrigerazione, congelamento, ecc.), stress osmotici (utilizzo di solventi quali sale o zucchero), pH acidi o alcalini, e molti altri, anche più di uno insieme (Giaccone, 2007).

In questi casi alcuni procarioti sono in grado di trasformarsi, acquisendo forme di resistenza alle avversità ambientali, a volte dalla tenacità davvero straordinaria, come le spore [Figura 2.4]. Altri microbi, invece, adottano delle modificazioni strutturali dalla minor drasticità, ma che consentono una resistenza molto maggiore di quella posseduta da una cellula normale. Queste variazioni fenotipiche si instaurano molto velocemente, come risposta agli stress ambientali, e mirano soprattutto all'utilizzo di tutte le energie possibili per il mantenimento dell'omeostasi cellulare, ma possono, d'altra parte, essere rapidamente rimosse, una volta che l'agente stressante si annulla. Un esempio può essere l'apparentemente istantanea riattivazione di *Pseudomonas* (principale agente alterante della carne), una volta che una confezione sotto vuoto è stata aperta (Eyles *et al.*, 1993).



Figura 2.4: Clostridium difficile (al centro) mentre forma una spora (in rosso, al suo interno).

2.4 La Tecnica Classica

2.4.1 Dalla Nascita ad Oggi

La microbiologia moderna nasce con gli studi di Louis Pasteur e Robert Koch [Figura 2.5], nella seconda metà del XIX secolo. Fu l'assistente di quest'ultimo, Julius Richard Petri, ad inventare la famosa ed omonima piastra, da oltre un secolo il principale strumento del microbiologo.

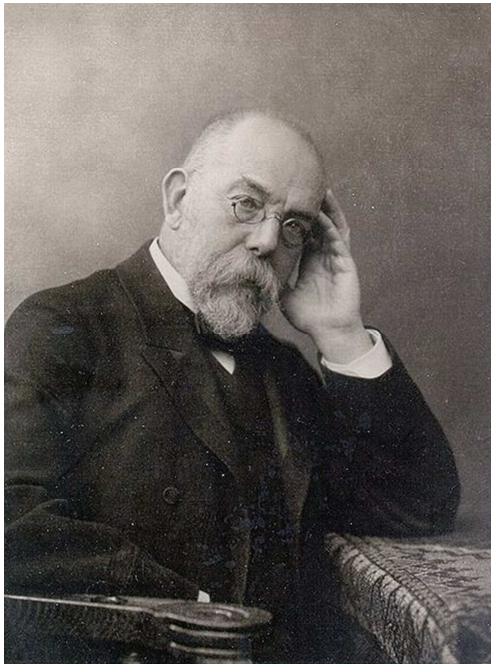


Figura 2.5: Robert Koch.

In questi anni gli sviluppi a cui è andata incontro la tecnica classica sono moltissimi, ma la base è praticamente rimasta invariata:

- si utilizza una piastra Petri sterile;
- al suo interno si inserisce una certa quantità di terreno di coltura;
- si “semina” il campione da analizzare, contenente i batteri da ricercare;
- si attende che questi si riproducano, fino a formare delle colonie visibili ad occhio nudo;
- si procede all'identificazione ed all'enumerazione delle colonie.

Le maggiori innovazioni hanno riguardato soprattutto i terreni di coltura: ampliando le conoscenze sui microrganismi, si è arrivati a produrre terreni sempre più specifici, con finalità svariate, quali l'identificazione, l'isolamento, la crescita e la numerazione dei microbi ricercati.

Gli obiettivi raggiungibili sono comunemente raggruppati in due categorie: le **Prove Qualitative** e le **Prove Quantitative**, ed è effettivamente il terreno di coltura a fare la differenza. Le tecniche sono applicabili a moltissimi substrati, quali gli alimenti di origine animale, ma anche l'acqua, i mangimi, le superfici di lavoro, ecc. (Harrigan, 1998).

La procedura è ormai standardizzata e conosciuta in tutto il mondo, e per questo è ancora considerata il *Gold Standard*, ovvero la tecnica d'analisi d'elezione. Per questo motivo è utilizzata ovunque come metodo di paragone e validazione delle metodologie alternative.

I principali limiti, mai del tutto risolti dalla nascita del metodo, sono la laboriosità del processo, l'utilizzo di liquidi e materiali usa e getta in quantità elevate, la necessità di tempi lunghi per la raccolta dei dati. In particolare, per ovviare alla lentezza del metodo, le principali aziende microbiologiche hanno proposto, in questi ultimi decenni, metodi alternativi, aventi la capacità di giungere a risultati paragonabili con la tecnica classica, ma in tempi minori (Feng, 1996), dando la possibilità di intervenire con una maggior tempestività in caso di non conformità (Rosmini *et al.*, 2004).

2.4.2 Le Prove Qualitative

Sono prove effettuate per andare alla ricerca di uno o più particolari microrganismi. Ci si avvale di terreni di coltura specifici, in grado di fornire le condizioni ambientali più favorevoli possibile per la crescita dei target, solitamente: *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter spp.*, *Escherichia coli O157*.

Le prove, secondo normativa standardizzata ISO, si dividono in tre parti:

- uno stadio di pre-arricchimento dei campioni, di durata variabile, da alcune ore ad una notte intera, effettuato in acqua peptonata; ha lo scopo di fornire energia ai microrganismi, dando la possibilità a quelli parzialmente danneggiati di ripararsi ed essere pronti per la crescita esponenziale;
- la semina in piastra Petri con terreni specifici, che concedono la crescita dei microrganismi ricercati, impedendola nel contempo agli altri batteri; si devono raggiungere cariche di 10^4 - 10^6 ufc/g (unità formanti colonia per grammo), per rendere possibile la terza ed ultima fase;
- la purificazione delle colonie, e la successiva conferma della positività del campione attraverso ricerche morfologiche, biochimiche, fisiologiche o sierologiche (Jasson *et al.*, 2010).

Di solito la positività in piastra è indicata da variazioni visibili del terreno di coltura, ad esempio del colore [Figura 2.6]. Il processo è legato alla presenza di determinate molecole nel terreno, le quali vengono metabolizzate da specifici enzimi dei batteri target della ricerca, con conseguente modificazione sterica e liberazione di cromogeni (*colour reactions*), fluorogeni (*fluorescent reactions*), o entrambi (Schonenbrucher *et al.*, 2008; Manafi, 1996). Il tempo necessario per effettuare lo studio va da 1 a 4 giorni per la crescita in piastra, e può arrivare a 5-7 per la conferma della positività.

Le prove qualitative di solito sono utilizzate per la ricerca di microrganismi patogeni per l'uomo, e mirano essenzialmente a stabilire la presenza o assenza dell'agente nella matrice analizzata (Harrigan, 1998).

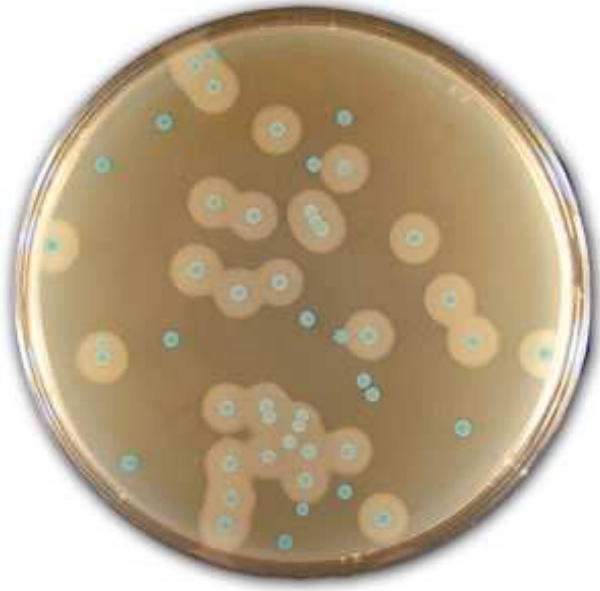


Figura 2.6: piastra positiva per *Listeria monocytogenes*. Il terreno differenziale (OCLA, *Oxoid Chromogenic Listeria Agar*) evidenzia la presenza di *Listeria spp* per la colonia azzurra, e quella di *L. monocytogenes* per l'alone bianco circostante.

2.4.3 Le Prove Quantitative

Le prove quantitative effettuate sugli alimenti hanno lo scopo di quantificare il numero di *Unità Formanti Colonia* (ufc) per grammo, contenute nel campione. Il risultato è la Carica Microbica Totale (CMT), espresso in ufc/g. Solitamente, oltre alla CMT, viene effettuata la quantificazione dei *coliformi totali*, ovvero dei microrganismi di origine fecale presenti nell'alimento.

La tecnica classica per l'effettuazione delle prove quantitative è lunga e laboriosa, e può essere divisa in stadi:

- viene preso un campione della matrice da analizzare, di solito 10 o 25 grammi;
- il campione viene inserito in **un sacchetto per stomacher (vedi oltre)** con filtro, assieme ad acqua peptonata (liquido ricco di fonti energetiche utilizzabili dai batteri), in quantità tale da diluire il campione 1:10 (quindi rispettivamente 90 o 225 grammi);
- il tutto, all'interno del sacchetto, viene "stomacato", ovvero viene inserito in un apparecchio che omogeneizza il contenuto;
- viene prelevata una parte, di solito 1 ml, del liquido risultante, all'interno del filtro.

Il campione stomacato contiene, in 1 ml, una quantità pari a un decimo della CMT dell'alimento da analizzare [Figura 2.7]. Nella carne, però, questa diluizione non è sufficiente: si è di fronte a cariche di 10^4 - 10^6 ufc/g, addirittura 10^7 - 10^8 nei macinati. In piastra Petri, oltre un numero di circa 300 ufc, il risultato non è più contabile, perché le colonie sono troppe e vanno a formare una specie di nebbia, dove una loro distinzione è impossibile. Altresì un numero inferiore alle 4 colonie potrebbe essere troppo basso, in quanto, sotto questo limite, anche piccole variazioni nel numero di batteri inseriti in piastra può corrispondere a grandi errori nella CMT finale, soprattutto se le diluizioni sono elevate (International Standard Organization, 2007). È quindi necessario procedere con le diluizioni, facendo sì che il numero di colonie stia tra le 4 e le 300 circa. Per effettuare ciò:

- Il liquido prelevato dal sacchetto per *stomacher*, ovvero 1 ml, viene diluito in 9 ml di acqua peptonata;
- Così facendo abbiamo raggiunto una diluizione 1:100;
- Prelevando 1 ml da questa nuova soluzione, si può giungere ad una diluizione 1:1000, aggiungendo altri 9 ml di acqua peptonata;
- Si procede in questo senso, fino al raggiungimento della diluizione necessaria [Figura 2.8].

Solitamente la diluizione da raggiungere è legata, in laboratorio, alla matrice organica analizzata ed alla sua provenienza (da che allevamento/macello, da quale caseificio, ecc.). Non è possibile pensare, infatti, che per ogni campione vengano analizzate tutte le diluizioni: sarebbe un inutile spreco di tempo e denaro. Si procede all'analisi effettiva solo delle diluizioni che più probabilmente rispecchiano la CMT del campione, nei confronti dei dati in archivio e delle esperienze del personale. Di solito vengono effettuate tre colture in piastra per ogni campione.

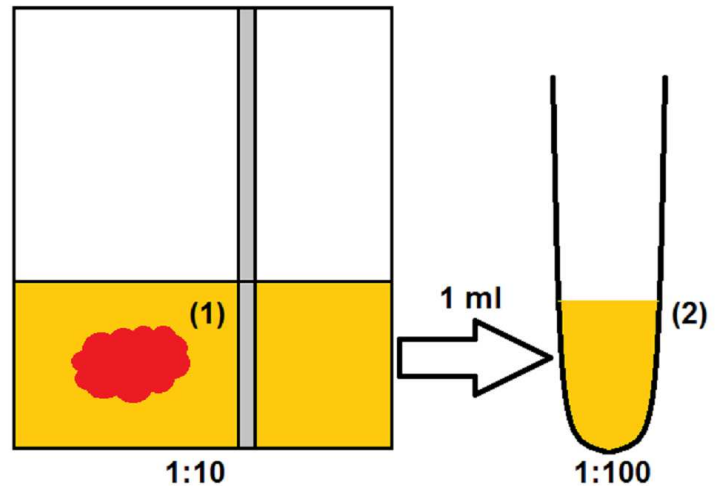


Figura 2.7: primo passo per l'effettuazione della prova quantitativa in tecnica classica. Il campione viene omogeneizzato nel sacchetto per *stomacher* (1), dopodiché si preleva una aliquota da trasferire in provetta (2). In basso sono presenti i gradi di diluizione.

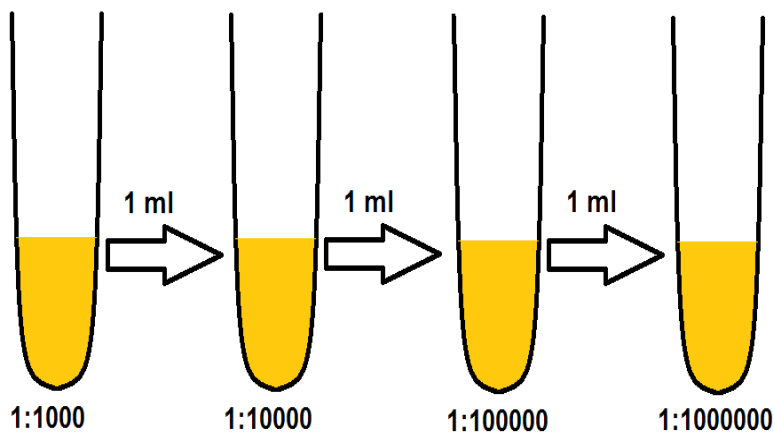


Figura 2.8: prelevando 1 ml da una provetta e aggiungendo altri 9 ml di acqua peptonata si aumenta il grado della diluizione. Si procede in questo senso fino al raggiungimento della diluizione desiderata.

Una volta raggiunte le diluizioni desiderate, si procede alla semina:

- Si prende 1 ml dalla provetta contenente la soluzione diluita;
- Si semina in piastra, aggiungendo una quantità pari a circa 10-15 ml di terreno di coltura (terreno *Plate Count Agar* per la CMT, *m-Endo Agar* per i coliformi);
- La piastra viene messa ad incubare a 37 C° per 48-72 ore;
- Al termine del periodo d'incubazione, si effettua la conta delle colonie cresciute sul terreno;
- In base al numero delle colonie ed alla diluizione effettuata si ottiene il valore della CMT in ufc/g.

Se più di una piastra è risultata contabile, la CMT sarà la media tra esse. Se nessuna piastra ha dato risultati apprezzabili, il campione va nuovamente analizzato (Harrigan, 1998). Inoltre, se nel terreno sono cresciute tre o meno colonie, il dato non è utilizzabile come carica, ma solo come indice di presenza batterica nel campione analizzato (International Standard Organization, 2007).

È evidente come la tecnica sia lunga e laboriosa per gli operatori. Inoltre ci si può facilmente trovare di fronte a numerosi campioni da analizzare, ognuno col suo preciso numero di provette per le diluizioni e con tre piastre in incubatore: sarà necessaria la creazione di una rigida scaletta per effettuare le operazioni, altrimenti facilmente si può andare incontro al mescolamento dei campioni.

La prova quantitativa in metodica classica è comunque considerata la tecnica d'elezione praticamente in tutto il mondo. Per effettuarla al meglio servono una discreta esperienza e manualità, oltre ad una mente lucida per ottimizzare i tempi morti. L'organizzazione di una procedura interna per effettuare la rintracciabilità dei campioni è indispensabile.

2.4.4 Tecnica Classica Modificata

Senza dover modificare *in toto* la tecnica classica, sono state proposte delle procedure per velocizzare lo stadio di arricchimento, necessario soprattutto ai fini delle ricerche qualitative. Molte industrie produttrici di reagenti per i laboratori, infatti, hanno messo in commercio dei terreni (in brodo o in gel semisolido) in grado di diminuire i tempi, come ad esempio il substrato *One Broth* per *L. monocytogenes* (Oxoid) (Jasson *et al.*, 2009)

Sono presenti anche metodi per velocizzare la terza fase delle prove qualitative, ovvero la conferma della positività. Si tratta di tubi microscopici all'interno dei quali è inoculata la soluzione acquosa da confermare, che provvedono automaticamente ad analizzare i batteri ed a fornire i risultati. Ad esempio: il kit API®, fornito da BioMérieux (Jasson *et al.*, 2010). Anche le tecniche immunoenzimatiche possono essere utilizzate a questo scopo (vedi oltre) (Miller *et al.*, 2008).

Negli ultimi anni sono state proposte altre modifiche alla tecnica classica; esse non permettono vere e proprie diminuzioni del tempo necessario al raggiungimento dei risultati, ma possono rendere più semplice la vita di laboratorio, specialmente quando la mole di lavoro è elevata.

Le 3M™ Petrifilm™ [Figura 2.9] sono piastre molto sottili, preformate, contenenti il terreno di coltura in forma di gel. In pratica, di diverso dalla normale tecnica classica, hanno solamente lo spessore molto limitato, che occupa meno spazio in incubatore. Vengono utilizzate per le ricerche quantitative (Nero *et al.*, 2008). Molto simili sono le Compact Dry (Nissui Pharmaceutical Co., LTD), utilizzate però per scopi qualitativi, grazie alla presenza di terreni differenziali (Kodaka *et al.*, 2009).



Figura 2.9: confezione di una 3M™ Petrifilm™ per *E. coli*.

Le SimPlate® (BioControl Systems) sono terreni di coltura evoluti, dotati di un'elevata sensibilità, utilizzati per prove sia qualitative che quantitative. Sono in grado di mettere in

luce la presenza di determinati batteri attraverso una reazione enzimatica, compiuta dai batteri nei confronti del substrato. Questa comporta una modificazione del colore del terreno, anche in presenza di pochi microrganismi target (in teoria ne dovrebbe bastare uno). Inoltre si può arrivare alla conta di 738 colonie per piastra, ovvero oltre il doppio dei terreni standard (Nero, et al., 2002).

Il Colilert® (IDEXX Laboratoires) è un terreno di coltura modificato, in grado di effettuare le prove qualitative per i coliformi e per *E. coli* simultaneamente. La sua matrice è composta da fonti di carbonio metabolizzabili solo dagli enzimi β -galattosidasi e β -glucuronidasi, di cui sono forniti rispettivamente i coliformi ed *E. coli*. Pochi altri microrganismi hanno queste capacità metaboliche, e questa scarsa rimanenza è soppressa selettivamente dal substrato. La presenza dei coliformi viene identificata dal colore del terreno, che vira verso il giallo; *E. coli*, invece, produce una tipica fluorescenza (Kampfer *et al.*, 2008; Fricker *et al.*, 1997).

La tecnologia Soleris™ (Neogen), infine, sfrutta le modificazioni indotte dalla crescita microbica sul terreno di coltura. Lo spettro fotometrico dei componenti varia al variare della sua composizione, e viene monitorato da uno strumento ottico ad intervalli regolari. La quantità di batteri presenti nel campione da analizzare è inversamente proporzionale al tempo necessario perché i cambiamenti nel substrato avvengano, perciò possono esserci anche notevoli variazioni sulla tempistica (Alles *et al.*, 2009).

2.4.5 Tecnica Classica Automatizzata

Per tentare di ridurre i tempi d'esercizio, senza però dover ricorrere a metodi nuovi, magari costosi, molti laboratori hanno adottato sistemi automatizzati per la preparazione dei terreni di coltura, per la diluizione seriale, per la conta delle colonie (Glynn *et al.*, 2006).

In particolare molto diffuso è il *System* (*WASP Spiral System*, DW Scientific, srl), macchinario applicabile alle prove quantitative, che permette notevoli risparmi, come tempo e materiale. Il *System* è uno strumento in grado di effettuare, semi-automaticamente, la semina dei campioni nei terreni di coltura. È fornito di una base rotante, sulla quale si inserisce la piastra Petri col terreno. Sopra la piastra è presente un ago, dal quale fuoriesce il campione da analizzare (in soluzione acquosa) [Figura 2.10]. L'ago si muove dal centro verso l'esterno, mentre la piastra ruota, andando a depositare il campione sul terreno formando una spirale. Inoltre, il campione viene depositato in quantità via via decrescente, e viene così effettuata una diluizione automatica. La piastra viene messa ad incubare come

nella tecnica classica, ma il risparmio di tempo e materiale per la preparazione è notevole. Una volta terminato il periodo d'incubazione, la lettura della piastra avviene con l'ausilio di specifici schemi di riferimento, forniti dalla casa madre (Robinson *et al.*, 2004).



Figura 2.10: dettaglio del System: la base rotante su cui è inserita la piastra Petri e l'ago.

Il Tempo® (Bio-Mérieux) è un'altra tecnica automatizzata per effettuare le prove quantitative, che, alla sua uscita, si era presentata come una metodica ottimale, ma che non ha del tutto soddisfatto alcuni addetti ai lavori. Si compone di un terreno ed una scheda (*card*), specifici per l'obiettivo dell'analisi. Il campione da analizzare viene inoculato, con il terreno, nella scheda. Quest'ultima riproduce in *micrometodo* la tecnica MPN (*Most Probable Number*), ma forma 16 risultati anziché 3, aumentando la precisione della CMT. La conta della carica batterica è effettuata dal Tempo® Reader in via automatica, e si basa su indicatori del pH fluorescenti, l'attività dell'enzima β -glucuronidasi, ecc. Viene quindi eliminata la lettura diretta del campione da parte dell'operatore, con considerevole risparmio di tempo (Paulsen *et al.*, 2008; Torlak *et al.*, 2008).

2.5 Le Tecniche Alternative

Segue una breve e schematica carrellata delle tecniche alternative proposte dalle principali aziende microbiologiche mondiali.

2.5.1 Le Tecniche Biochimiche

Sono metodiche in grado di dare simultaneamente risultati qualitativi e quantitativi, anche se questi ultimi sono poco precisi. Si dividono a seconda della tecnica utilizzata, che può essere l'impedenza elettrica o la bioluminescenza dell'ATP.

Il primo metodo sfrutta le modificazioni effettuate dalla crescita microbica nei confronti del substrato. La formazione di composti diversi da quelli iniziali, a seguito del metabolismo batterico, causa una variazione nell'impedenza elettrica del terreno, misurabile attraverso specifici strumenti. La tempistica con cui si verifica questo cambiamento nelle proprietà fisiche del substrato avviene con una velocità inversamente proporzionale rispetto alla carica microbica del campione. Perciò, riferendoci a DT prestabiliti (*Detection Time*, tempi di determinazione dell'impedenza) e a come varia il grado d'impedenza, è possibile risalire matematicamente alla CMT. L'utilizzo di substrati specifici dà la possibilità di concedere la crescita solo a determinati microrganismi target, in modo tale da giungere all'effettuazione di prove qualitative e quantitative nello stesso tempo (Grossi *et al.*, 2008); (Szita *et al.*, 2007).



Figura 2.11: L'Hy-Lite 2, strumento che utilizza il principio della bioluminescenza dell'ATP.

La seconda metodica va a quantificare l'emissione di luce dell'ATP [Figura 2.11], correlata alla reazione tra la molecola luciferina e lo specifico enzima luciferasi. L'effetto è la formazione di bioluminescenza, misurata come RLUs (*Relative Light Units*, unità luminescenti relative).

L'intensità della luminescenza è direttamente proporzionale alla quantità di ATP presente, la cui concentrazione è legata alla CMT. Bisogna ricordare, però, che l'ATP è la molecola energetica biologica universale, quindi tutte le cellule presenti in un substrato la producono e la conservano. Inoltre, solo cariche elevate, sopra a 10^4 ufc/g, rendono la misurazione dell'ATP applicabile, altresì con precisione scarsa. La tecnica, però, è ampiamente applicata, per le sue caratteristiche (valore stimato, correlato a tutte le cellule presenti nel substrato), all'analisi dell'igiene delle superfici di lavoro, in quanto fornisce i risultati in meno di 5 minuti (Chen & Godwin, 2006; Fukuda *et al.*, 2005). Nell'industria casearia la tecnica può essere applicata per la quantificazione rapida delle cellule somatiche del latte (Niza-Ribeiro *et al.*, 2000).

2.5.2 Le Tecniche Microscopiche

Le tecniche di quantificazione batterica basate su principi microscopici sono principalmente due: la citometria a flusso, di cui sarà ampiamente discusso più avanti, e la DEFT.

La DEFT (*Direct Epifluorescent Filter Technique*) è un metodo di conta cellulare basato sulla filtrazione del campione in soluzione acquosa. Il diametro dei pori del filtro è tale da impedire il passaggio dei batteri, che andranno ad accumularsi su di esso. Sulla membrana filtrante sono posizionate delle “*microsfere fluorescenti*”, che interagiscono con i microrganismi. Un raggio luminoso viene diretto verso la superficie del filtro per esaminarla e quantificare l'intensità della fluorescenza e, quindi, la carica batterica. La metodica impiega circa un'ora per fornire i risultati, ma è preceduta da operazioni manuali che allungano la tempistica. È stata applicata alla ricerca della carica microbica sul latte crudo (Rosmini *et al.*, 2004; Sierra *et al.*, 1997).

2.5.3 Le Tecniche Immunoenzimatiche

Le tecniche immunoenzimatiche sono basate sull'elevata specificità di legame tra Ag (antigeni, contenuti nel campione) e Ab (anticorpi, aggiunti per effettuare l'analisi). La scelta di adeguati Ab è indispensabile per la precisione del test; in ogni caso, solitamente, la procedura prevede che i risultati positivi siano da presumere come tali, e che vadano confermati tramite altre metodiche. Spesso è indispensabile un pre-arricchimento, data la ne-

cessità di elevate cariche di Ag microbico (10^4 - 10^5 ufc/g). Molte tecniche sono disponibili nell'ambito dell'analisi degli alimenti, tra cui le più diffuse sono: LFD, ELISAs, ELFAs, IMS.

I *Lateral Flow Devices* (LFD) sono apparecchiature formate, di norma, da una membrana porosa, la quale intrappola le proteine (Ag) target della ricerca, per la presenza dello specifico Ab. Il contatto rende possibile la formazione di un segnale facilmente individuabile nell'apposita finestra di visualizzazione. Il test è molto semplice da usare, e richiede solo pochi minuti per la realizzazione (Posthuma-Trumpie *et al.*, 2009).

L'*Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA) è una metodica biochimica che sfrutta i principi del legame Ag-Ab, coadiuvati da una reazione enzimatica. Viene divisa in vari stadi:

- nel primo, una quantità ignota di Ag (contenuta nel campione) viene messa a contatto con l'Ab, specifico per l'antigene ricercato;
- viene effettuato un lavaggio, in modo tale da sciacquare via ciò che non si è legato all'Ab;
- è successivamente aggiunto un enzima, in grado di legarsi all'Ab (a sua volta legato all'Ag);
- viene eseguito un nuovo lavaggio, con la finalità di eliminare la parte di enzima non legata all'Ab;
- un ultimo substrato viene aggiunto, specifico per l'enzima (legato all'Ab), che viene scisso e forma un segnale facilmente visualizzabile (ad esempio: una linea) [Figura 2.12].

Il completamento di un test ELISA richiede circa 2-3 ore (Kumar *et al.*, 2008; Szabo, *et al.*, 2008); sono inoltre disponibili in commercio macchinari in grado di effettuarlo automaticamente, facendo così diminuire i tempi, aumentando nel contempo il grado di ripetibilità e standardizzazione del processo. L'ELFA (*Enzyme Lynked Fluorescent Assay*), in pratica, è sovrapponibile all'ELISA, ma, nell'ultimo passo, va a produrre un segnale fluorescente per indicare la positività del test. Nella fattispecie, il sistema VIDAS® (Bio-Mérieux), è uno strumento automatizzato che sfrutta le basi dell'ELFA, permettendo il raggiungimento dei risultati in un tempo che va da 45 a 120 minuti, a seconda del microrganismo target (Sewell *et al.*, 2003); (Keith, 1997).

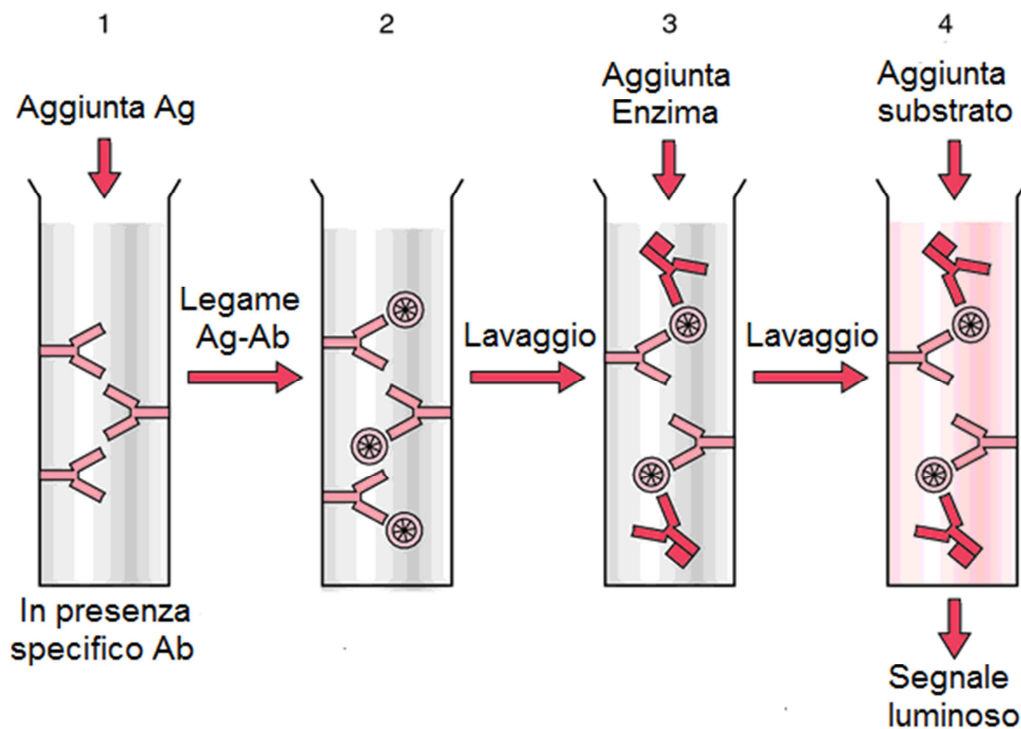
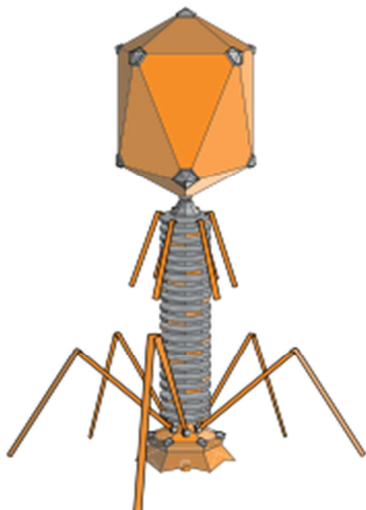


Figura 2.12: Schema riassuntivo sul funzionamento di un test ELISA.

Una metodica innovativa è l'IMS (*ImmunoMagnetic Separation and concentration*). Utilizza delle microsferiche magnetiche, a cui è legato un Ab specifico per l'Ag ricercato. La presenza della componente magnetica dà la possibilità di isolare le cellule target senza dover ricorrere a centrifugazione, facendo sì che non sia necessario un precedente stadio di prearricchimento (Seo *et al.*, 1998; Bolton *et al.*, 1996). Il risparmio di tempo è notevole: circa 24 ore. Le applicazioni della tecnica più sfruttate sono quelle specifiche per *E. coli* O157:H7 e per *Salmonella* spp.

2.5.4 Metodi di Analisi Basati sull'Utilizzo dei Batteriofagi



I batteriofagi sono virus che infettano i batteri [Figura 2.13]. Sono germi altamente ospite-specifici, e non è raro che essi possano infettare un solo batterio; ciò è legato a particolari meccanismi di riconoscimento, correlati alla composizione molecolare della superficie microbica (Gray & Bhunia, 2005; Favrin *et al.*, 2003). Si possono sfruttare queste proprietà, ad esempio mediante

Figura 2.13: un virus batteriofago.

l'inclusione nei virus di particelle magnetiche, per rendere possibile l'isolamento di specifici microrganismi target della ricerca. Studi effettuati su questa tecnica ne hanno dimostrato le elevate performance, superiori a quelle dei test ELISAs ed ELFAs, mantenendo comunque ottimi parametri di sensibilità (Kretzer *et al.*, 2007; Hagens & Loessner, 2007). Il principio dell'utilizzo diagnostico dei batteriofagi è stato messo in pratica dalla Bio-Mérieux, con la commercializzazione del VIDAS® UP, evoluzione del VIDAS®, che fornisce l'analisi qualitativa dei campioni per *E. coli* O157 (Wu, 2008).

2.5.5 Le Tecniche di Biologia Molecolare

Le metodiche che sfruttano la biologia molecolare stanno assumendo sempre maggiore importanza nell'analisi microbiologica degli alimenti, grazie alla loro elevata specificità, accompagnata da tempistiche più brevi della tecnica classica. Le più diffuse sono la FISH e la PCR.

La FISH, ovvero *Fluorescent In Situ Hybridization*, è praticamente l'unica metodica di biologia molecolare "non PCR" utilizzata. Si basa sulla ricerca di specifiche sequenze di RNA ribosomiale (rRNA). La scelta di ricercare frammenti oligonucleotidici di RNA e non DNA non è casuale: l'elevata concentrazione intracellulare fornisce ottima sensibilità alla tecnica; inoltre l'RNA è strettamente correlato alla vitalità cellulare. I principi d'utilizzo si basano su:

- trattamento chimico attraverso reagenti specifici;
- ibridizzazione dell'RNA mediante l'inserimento di frammenti oligonucleotidici contenenti molecole fluorescenti;
- lavaggio accurato, cosicché vengano rimossi i frammenti non legati;
- visualizzazione del campione al microscopio, per evidenziarne la fluorescenza

. Le case produttrici forniscono kit specifici per diversi possibili target. Il procedimento è di solito preceduto da un pre-arricchimento, usualmente della durata di una nottata. A seguito i risultati sono raggiungibili in circa 3 ore (Bottari *et al.*, 2006; Wagner *et al.*, 2003).

La PCR (*Polymerase Chain Reaction*) è però la principale metodica di biologia molecolare utilizzata sul pianeta. La sua realizzazione risale agli anni '80, ed è basata sulla capacità dell'enzima DNA-polimerasi di copiare sequenze di DNA (Mullis & Faloona, 1987). I frammenti di DNA da amplificare sono specifici, in base agli obiettivi della ricerca, e ven-

gono denominati “*primer*”. L’amplificazione dei *primer* avviene per stadi. Tra uno stadio e l’altro sono applicati dei trattamenti termici, che vanno a dividere le due catene nucleotidiche del DNA; successivamente si aggiunge l’enzima, il quale si lega alle catene spaiate di genoma, procedendo alla replicazione. È evidente come, per ogni singolo stadio, la quantità di DNA target venga duplicata, perché da ogni singola catena verrà formata una doppia elica, successivamente divisa da un nuovo trattamento termico, e così via. È stato dimostrato che è sufficiente la presenza di una singola sequenza di DNA per arrivare a formarne circa un milione in poche ore (Hanna *et al.*, 2005; Harris & Griffiths, 1992).

Solitamente i risultati vengono visualizzati tramite elettroforesi in gel di agarosio, dove il DNA amplificato è mostrato da bande correlate al suo peso atomico [Figura 2.14].

Negli anni '90 nasce l’evoluzione della PCR, ovvero la *Real Time PCR*. L’utilizzo di sequenze nucleotidiche, fornite di molecole fluorescenti alle estremità, permette la continua quantificazione della fluorescenza emanata, indice dell’attività enzimatica (Hanna *et al.*, 2005). È stata anche messa a punto una metodica di ricerca multipla, la *MPCR (Multiple PCR)*, in grado di amplificare simultaneamente più di un *primer*. È indubbiamente un grande vantaggio, in quanto dà la possibilità di ricercare più parametri in un’unica prova, come diversi fattori di virulenza (Fach *et al.*, 2009) o di effettuare diversi isolamenti (Kawasaki *et al.*, 2009).

La PCR promette ottime cose, ma anch’essa ha dei limiti. La tempistica è minore, rispetto alla tecnica classica, ma sono comunque necessarie 6-8 ore per raggiungere i risultati, quasi sempre preceduti da 24 ore di pre-arricchimento (Rodriguez-Lazaro *et al.*, 2007). Inoltre, se il campione risulta positivo, è sempre consigliata una prova mediante tecnica classica per la conferma.

2.5.6 Le Tecniche Future

Le tecniche messe a punto in questi ultimi anni e candidate a diffondersi nei laboratori di microbiologia di tutto il mondo sono principalmente due: i *Microarrays* e i *Biosensori*.

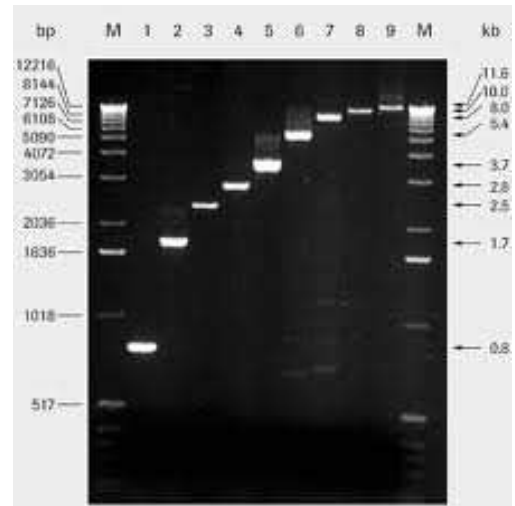


Figura 2.14: risultato di un test PCR: le bande dalla 1 alla 9 corrispondono ai primer amplificati, diversificati per peso atomico. Lo spessore della banda è legato alla quantità effettiva di primer.

I *Microarrays* sono sistemi miniaturizzati per l'analisi simultanea di catene nucleotidiche. Queste vengono ibridizzate da sonde oligonucleotidiche, immobilizzate ad un supporto solido, solitamente una piastra di vetro o sintetica, ed analizzate. Un'amplificazione mediante PCR precedente allo studio è solitamente consigliata per aumentare la sensibilità delle analisi (Keramas *et al.*, 2003). Il principale problema del *microarray* è la scarsa compatibilità del sistema con campioni di cibo dalla matrice complessa, ma ha dalla sua svariati pregi: la capacità di identificare genotipo, patogenicità e caratteristiche anche di diversi microrganismi sullo stesso supporto solido, oltre alla possibilità di differenziare quali geni vengono espressi in ogni momento (solitamente si effettuano queste prove a seguito di eventi stressanti, per osservare come varia l'espressione genica del microrganismo) (Ikeda *et al.*, 2006). I *microarray* sono in grado di analizzare le innumerevoli interazioni avvenute tra geni microbici, mRNA e molecole target, producendo così in brevi tempi enormi quantità di dati: è necessario perciò fare molta attenzione alla preparazione dei campioni, in quanto anche piccole modificazioni ambientali possono produrre grosse moli di dati errati (Kostrzynska & Bachand, 2006). L'evoluzione più recente del *microarray* è la messa in produzione di sistemi utilizzabili per i test di routine in microbiologia degli alimenti, come ad esempio il Premi®System per *Salmonella* (DSM Nutritional Products): esso permette l'identificazione dei principali serovar e sierotipi di *Salmonella*, fornendo il risultato in circa otto ore (Wattiau *et al.*, 2008).

I biosensori, invece, sono sistemi di analisi in grado di combinare il controllo di parametri biologici con indici fisici ed elettrochimici: sono composti da materiali biologici, come enzimi, anticorpi, acidi nucleici, immobilizzati su di un supporto solido situato nei pressi di una unità ricevente. L'interazione tra il supporto biologico e specifiche molecole target della matrice batterica del campione produce un segnale di diverso tipo: elettrico, ottico, termico, ecc. Esso viene recepito dal ricevitore, con una intensità direttamente proporzionale alla quantità di molecole target (Nordstrom *et al.*, 2008; Maraldo & Mutharasan, 2007). Oltre ad impiegare poco tempo per fornire i risultati, sembra che siano destinati a diventare metodi anche molto economici, in quanto le analisi avvengono per volumi di campione davvero molto piccoli (e quindi sono minori i reagenti utilizzati: si parla di nanolitri!); in aggiunta ci sono le possibilità di automatizzare (e quindi standardizzare) le procedure e di effettuare ricerche multiple contemporaneamente (Zhang *et al.*, 2009; Lazcka *et al.*, 2007).

2.6 La Citometria a Flusso

2.6.1 Introduzione al Metodo

L'idea e la concezione della tecnica su cui si basa la citometria a flusso viene comunemente correlata a Mack Jett Fulwyler (Arndt-Jovin & Cram, 2005). A quei tempi era professore all'Università della Florida, e tra i vari progetti che stava avanzando, erano presenti anche quelli ora definiti come i principi della tecnica analizzata in questo lavoro. Nel 1965 ultimò la costruzione del *Los Alamos Volume Sorter*, strumento in grado di separare elettronicamente le cellule in base al loro volume (Auer, 2007). Nel 1970 avviene la prima messa in commercio di un citometro a flusso: il "Citografo", in grado di distinguere e separare le cellule vive da quelle morte utilizzando un raggio laser, mentre nel 1974 viene prodotto il primo strumento in grado di analizzare contemporaneamente più di una lunghezza d'onda rifratta in modo totalmente automatizzato (Auer, 2007).

Ovviamente il metodo, in oltre trent'anni di ulteriori sviluppi, ha raggiunto livelli tecnici all'avanguardia, aumentando l'automazione e la varietà dei substrati analizzabili.

2.6.2 Descrizione della Tecnica

La citometria a flusso [in *Figura 2.15*: come si presenta l'apparecchio] è una metodologia di analisi microbiologica **quantitativa**, dotata di elevata **rapidità d'esecuzione**. È basata su

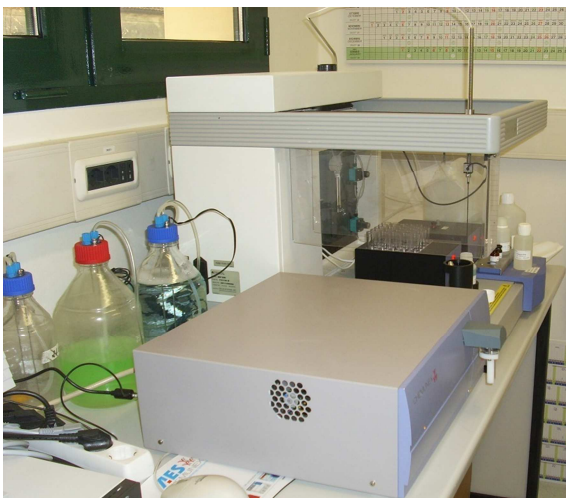


Figura 2.15 : il *BactiFlow®*, strumento impiegato per lo studio.

un sistema formato da svariati componenti:

- un capillare: al suo interno scorre un fluido formante un flusso laminare uniforme; il diametro del capillare è tale da costringere le cellule batteriche a procedere in fila;
- una fonte luminosa: solitamente un laser, che illumina il flusso laminare all'interno del capillare;
- un *marker* luminescente: detto anche *fluoroforo* (o *cromogeno*, o semplicemente

- colorante); è una molecola che, dopo aver interagito con le cellule del campione, emana una luce ad una particolare lunghezza d'onda (λ), quando illuminata dal laser;
- alcuni filtri ottici: detti anche filtri o specchi dicroici, ovvero lenti in grado di deviare la luce a diverse angolazioni in base alla sua λ ;
 - un ricevitore della fonte luminosa (uno per ogni possibile destinazione della luce deviata dai gruppi ottici);
 - un processore di elaborazione dei dati: unità con la finalità di numerare quante volte ogni ricevitore è stato colpito dalla fonte luminosa deviata; solitamente è un pc con adeguato software.

Da come si può vedere le componenti indispensabili per il corretto funzionamento del sistema sono molte e di elevata complessità [*Figura 2.16*].

Il capillare, in realtà, è solo una componente dell'impianto idraulico dell'apparecchio, il quale, *in toto*, preleva una parte del campione in soluzione acquosa da analizzare, lo invia al capillare, ed infine lo scarta come rifiuto. Il centro dell'impianto idraulico è, però, proprio il capillare. Il suo diametro, di 250 micron, coadiuvato dal flusso laminare in cui i batteri sono immersi, costringe ogni cellula ad attraversarlo in fila indiana. Questo fa sì che i microbi vengano singolarmente illuminati dalla sorgente luminosa: grazie a questo importantissimo fattore, la citometria a flusso è una tecnica quantitativa effettivamente in grado di contare una cellula per volta (Shapiro, 2003).

La fonte luminosa è solitamente un laser, il cui spettro d'emissione luminoso, in λ , è ottimizzato in base alla popolazione cellulare da analizzare o, nel caso del loro utilizzo, dal tipo di *marker* fluorescente (Shapiro, 2000). La luce prodotta dal laser è perpendicolare al flusso capillare e, dopo aver attraversato una cellula all'interno del capillare, può:

- procedere dritta (entro un angolo di 10°): si parla di *Forward Scatter* (FS), parametro legato alle dimensioni cellulari;
- deviare lateralmente: luce definita *Side Scatter* (SS), indice correlato alla complessità della cellula.

Esistono alcuni tipi di citometro a flusso, molto sofisticati, in grado di dividere le cellule in soluzione in diverse sotto-popolazioni, in base alle loro caratteristiche di FS e SS, eventualmente anche in condizioni sterili (Shapiro, 2003).

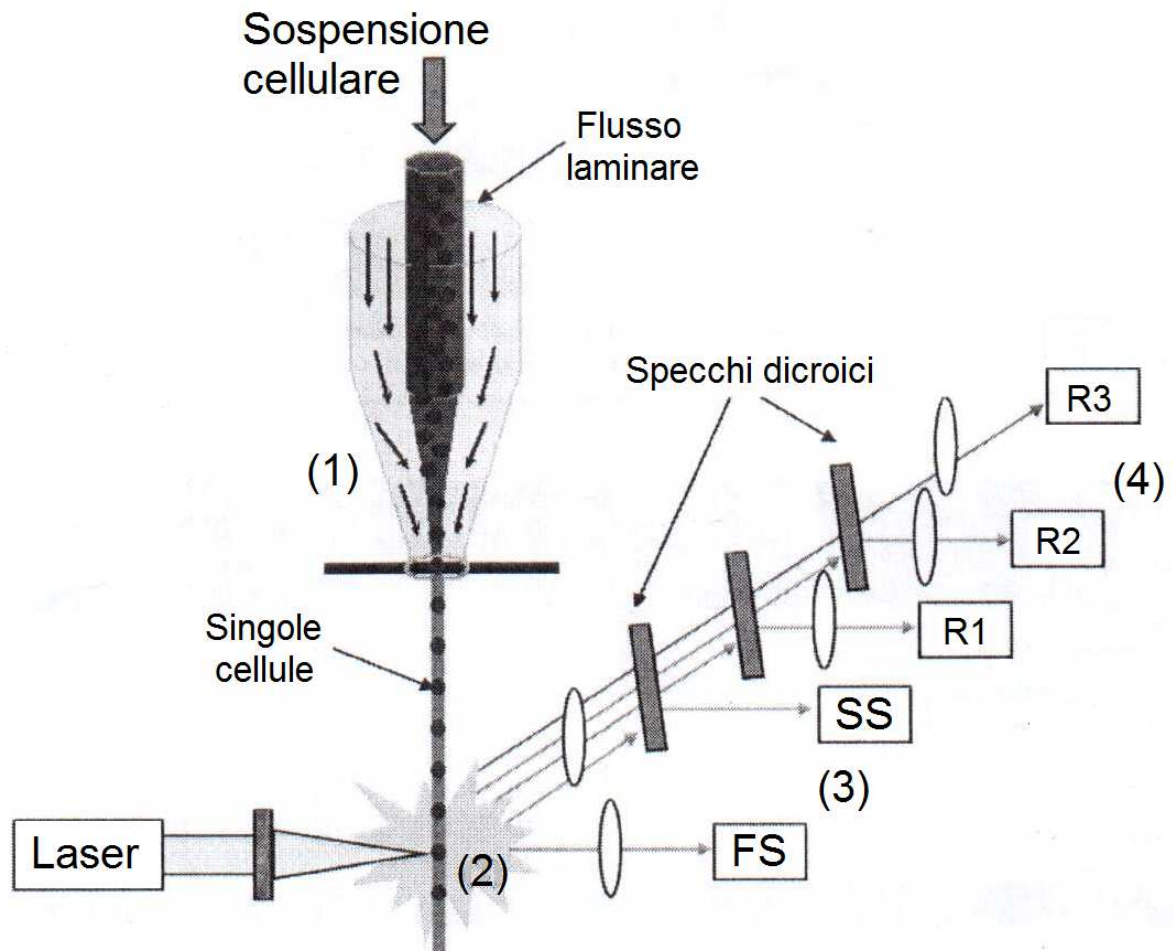


Figura 2.16: Rappresentazione schematica del funzionamento di un citometro a flusso. Le cellule in sospensione sono costrette ad attraversare il capillare (1) in fila indiana, di modo tale da essere illuminate singolarmente dal laser. Una volta colpite dal raggio luminoso producono degli indici di rifrazione (2) tipici in base alle proprie caratteristiche strutturali, che andranno ad eccitare i ricevitori *Forward* e *Side Scatter* (3). Altre informazioni sono ottenibili direzionando la luce verso ulteriori ricevitori (4) da uno o più specchi dicroici. (tratto da *Biochemical Engineering Journal*, 48).

I ricevitori sono strutture in grado di trasformare il segnale luminoso che li raggiunge in segnale elettrico e di inviarlo poi al processore per l'elaborazione delle informazioni.

La componente finale dell'impianto è il processore di elaborazione dei dati, solitamente integrato in un personal computer. Saranno necessari anche un software (di solito fornito dalla casa costruttrice) ed un hardware adeguati. Il software trasforma le informazioni elettriche in dati e grafici facilmente investigabili, rendendo disponibili tutte le valutazioni quantitative sui campioni analizzati. La calibrazione giornaliera dello strumento è indispensabile

per massimizzarne l'efficienza; sono inoltre consigliate delle prove con campioni negativi e positivi, come prove preliminari di funzionalità del sistema (Baumgarth & Roederer, 2000).

2.6.3 Utilizzo dei Fluorofori

Ulteriori obiettivi sono raggiungibili attraverso l'utilizzo di specifici *markers* associati alla citometria a flusso. Queste molecole hanno permesso di fare enormi passi in avanti, soprattutto per l'analisi quantitativa di campioni alimentari. Si tratta di sostanze in grado di interagire con le cellule batteriche in soluzione acquosa e, solo dopo questa fase di "**attivazione**", di modificare la loro struttura, in modo tale da essere facilmente distinguibili dalla matrice che le circonda, ad esempio con l'emissione di particolari λ . Il termine *fluoroforo* è correlabile all'emissione di luce fluorescente, emanata dalla molecola quando illuminata dal laser. La λ irradiata dal fluoroforo attivato è costante e sempre ripetibile, il che è un enorme vantaggio rispetto alla tecnica priva di esso.

I fluorofori devono avere determinate caratteristiche, importantissime per il corretto risultato delle analisi: luminescenza elevata, facilmente rilevabile; non devono interagire col campione, se non nei casi per i quali sono stati progettati, ovvero per l'attivazione; essere atossici, in modo tale da non modificare la popolazione cellulare viva del campione; essere solubili in acqua (i campioni, solitamente, sono analizzati in soluzione acquosa) (Shapiro, 2000; Baumgarth & Roederer, 2000).

L'attivazione dei cromogeni può avvenire (Haughland, 2002):

- mediante legame specifico con molecole o componenti cellulari (acidi nucleici, lipidi, proteine);
- per accumulo all'interno di compartimenti cellulari;
- modificando la loro struttura in base a modificazioni chimiche dell'ambiente cellulare (ad esempio il pH, la polarità di membrana, l'attività enzimatica);
- sono stati anche prodotti cromogeni legati a anticorpi o oligonucleotidi, in grado di determinare la presenza di specifiche sequenze di DNA, RNA o di Antigeni microbici.

Per questo studio è stato usato un cromogeno della serie *ChemChrome®*, composta da diverse molecole specifiche per svariati substrati: carne, ma anche acqua, latte, succo di frutta, ecc..

Il ChemChromeV23®, utilizzato in questo lavoro, entra liberamente all'interno del citoplasma cellulare per diffusione, e qui viene scisso dagli enzimi esterasi delle cellule in soluzione acquosa del campione, in due subunità. Una di queste emetterà una luce fluorescente di λ specifica (con picco a 522 nm), selezionata dal filtro dicroico e diretta verso il ricevitore.

La scelta dell'enzima esterasi come attivatore non è casuale, ed è diffusa a molti altri fluorofori. L'esterasi, infatti:

- è un enzima ubiquitario, contenuto praticamente in tutte le specie batteriche conosciute;
- perde la sua integrità strutturale, e quindi anche quella funzionale, dopo breve tempo dalla morte cellulare;
- opera la scissione completa del cromogeno all'interno del citoplasma, quindi solo in caso di perfetta integrità di membrana.

Queste tre caratteristiche fondamentali rendono l'enzima esterasi il target ottimale, in grado di evidenziare le cellule batteriche vive presenti nel campione.

Purtroppo alcune componenti cellulari possono andare incontro ad un fenomeno di autofluorescenza, in grado di interferire con la luminescenza dei fluorofori; hanno questa capacità, ad esempio, il NADH ridotto, il triptofano, l'elastina, la clorofilla. Uno studio preliminare, per mettere in luce le specifiche soglie di λ di queste varie molecole autofluorescenti, è quindi necessario per discriminare le informazioni corrette da quelle fuorvianti (Baumgarth & Roederer, 2000).

2.6.4 Interpretazione dei Dati

La caratterizzazione dei parametri cellulari è possibile grazie all'utilizzo congiunto dei dati di rifrazione della luce (FS, SS) e di quelli di fluorescenza.

La rifrazione della luce, ed in particolare la modalità con cui questo fenomeno avviene, è legata a svariate caratteristiche cellulari, tra cui le principali sono le dimensioni cellulari e la complessità cellulare, ovvero la rugosità della membrana, la grandezza del nucleo, la presenza di granuli citoplasmatici, la grandezza degli organelli citoplasmatici, ecc.

Come già prima accennato, l'FS è indice della grandezza cellulare, mentre l'SS della sua complessità. L'utilizzo di questi parametri, ci fornisce la possibilità di distinguere, ed eventualmente separare, popolazioni cellulari di diverso tipo, ad esempio batteri e lieviti, ma anche batteri di specie diverse, a seconda delle capacità e delle caratteristiche dello

strumento usato. Ovviamente, quanto maggiore è il numero di parametri investigabili, tanto maggiore sarà la precisione con cui avviene la separazione, anche se ne conseguirà un aumento dei costi di acquisto dello strumento (vista la sua sempre aumentata complessità).

L'utilizzo dei fluorofori dà la possibilità di ampliare il numero di dati rilevabili sul campione, quali l'attività e la funzionalità metabolica. In base al tipo ed al numero di fluorofori utilizzati, sarà sempre maggiore la mole di informazioni valutabili, ma contemporaneamente possono aumentare alcuni artefatti: la luce, una volta deviata verso un ricevitore, giunge meno intensamente al secondo, ancora meno al terzo, e così via. Sono necessari, perciò, sofisticati metodi di elaborazione dei dati, in grado di annullare queste difficoltà (Longobardi Givan, 2001).

2.6.5 Vantaggi del Metodo: le Cellule VBNC

Il vantaggio maggiore della tecnica di citometria a flusso, quando associata all'utilizzo di fluorofori, sta nella possibilità di mettere in luce tutti quegli stadi interposti tra vita e morte cellulare: andando ad investigare l'integrità della struttura cellulare, ma anche le sue capacità metaboliche e riproduttive, si possono discriminare, infatti, questi stadi intermedi (Nebe-von Caron *et al.*, 1998).

L'attività metabolica viene normalmente indagata prendendo in considerazione gli enzimi esterasi, come precedentemente spiegato (Jepras *et al.*, 1995; Fuller *et al.*, 2000).

Il parametro più spesso utilizzato, per accertarsi dello stato vitale cellulare, però, è il potenziale di membrana. Il suo valore, che oscilla tra 100 e 200 mVolt, è considerato un buon indicatore della vitalità dei microrganismi (Dinsdale & Lloys, 1995). Questa differenza di potenziale è creata dalla cellula, grazie al suo intervento sugli ambienti intra- ed extra-cellulari: essa modifica, infatti, la concentrazione ionica dei due compartimenti, utilizzando energia sotto forma di ATP. Solo le cellule vive e vitali sono in grado di mantenere stabile il potenziale di membrana, ma una sua diminuzione non implica necessariamente la morte cellulare. Quando il valore giunge a zero, significa che la membrana è danneggiata, e gli ioni hanno perciò la possibilità di spostarsi liberamente da un comparto all'altro (Shapiro, 2000).

Il potenziale di membrana viene analizzato attraverso fluorocromi liposolubili, che entrano nelle cellule in base alla carica di membrana. L'intensità della fluorescenza emanata è direttamente correlabile al grado di accumulo, e quindi all'integrità e al potenziale di membrana. Entrambi questi parametri sono indici della vitalità del microrganismo (Shapiro, 2003).

Gli studi effettuati con la citometria a flusso su potenziale di membrana, attività metabolica, integrità strutturale, ecc., hanno permesso la differenziazione di diversi stadi intermedi, interposti tra vita e morte cellulare. Già nel 1996 Davey e Kell dimostrarono la presenza delle cosiddette VBNC (*Viable But Not Culturable cells*), ovvero di cellule vive ma non investigabili con le tecniche di analisi classiche ("non coltivabili") (Davey & Kell, 1996).

Si tratta di cellule che hanno subito, in un momento variabile della loro vita, uno stress: il danno subito le ha, ad esempio, parzialmente danneggiate. La loro risposta è quella di entrare in uno stadio vitale dove bloccano la loro capacità riproduttiva, sfruttando tutte le energie residue per tentare una riparazione dei danni. Tonon e Lonvaud-Funel dichiararono, nel 2000, che le cellule sono in grado di assumere stadi non coltivabili per resistere agli stress, e sopravvivere. In questi stadi i microrganismi perdono la loro capacità di riprodursi nei terreni di coltura aspecifici, che invece supportano le cellule normali, ma mantengono le loro attività metaboliche, restando effettivamente vivi e vitali (Tonon & Lanvaud-Funel, 2000).

La risposta allo stress varia in base alla sua natura ed anche alla specie batterica presa in considerazione. Tra le cause, shock termici e chimici, stress osmotici e disidratazione sono stati classificati come causa della modificazione dei microrganismi in VBNC (Ueckert *et al.*, 1997).

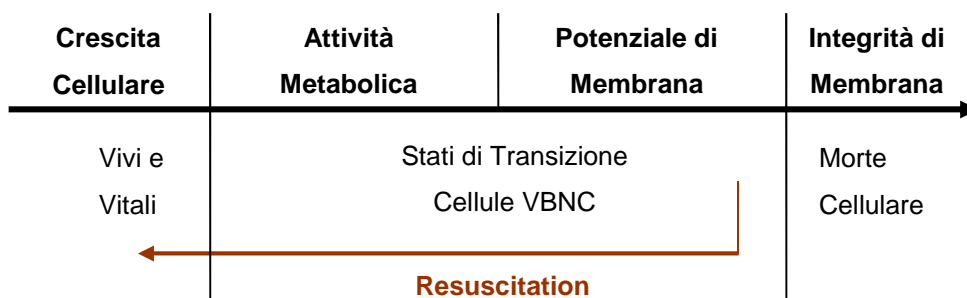


Figura 2.17: tabella riguardante gli stadi vitali raggiungibili da un batterio (al centro), i parametri cellulari utilizzabili per analizzare i vari stadi (in alto); è evidenziato il fenomeno di *Resuscitation* delle cellule VBNC. (Tratto da *Biochemical Engineering Journal*, 48).

La capacità dei batteri di trasformarsi in VBNC li rende in grado di rimanere vivi, ma di sfuggire all'analisi secondo metodica classica, dove la loro crescita esponenziale è necessaria, altrimenti la colonia non sarà in grado di raggiungere dimensioni tali da essere visibile ad occhio nudo (Quiros *et al.*, 2007). Bisogna però sottolineare che, una volta raggiunto un substrato più specifico per il microrganismo rispetto al terreno di cultura, una cellula VBNC può andare incontro ad un processo denominato “*resuscitation*” [Figura 2.17] (Lleo *et al.*, 2001; Reissbrodt *et al.*, 2002). A seguito di questa nuova modificazione, il batterio riacquista la capacità di riprodursi in modo esponenziale; se la specie in considerazione è patogena per l'uomo, può potenzialmente rappresentare un rischio per la salute pubblica, perché sfuggita alle analisi, ma presente nell'alimento liberamente commercializzato. In aggiunta ai rischi sanitari, un microrganismo inquinante può causare altre problematiche: in un alimento che deve, ad esempio, subire un processo di fermentazione durante la sua produzione (come la birra), può determinare alterazioni delle caratteristiche proprie del prodotto (come il gusto, o il colore), con conseguenti gravi danni economici per l'azienda (Quiros *et al.*, 2009).

Una delle peculiarità, ed effettivamente uno dei pregi maggiori, della citometria a flusso, è la capacità di rintracciare le cellule VBNC, grazie all'utilizzo dei fluorofori. Questo in parte giustifica perché, come si vedrà nel capitolo “Risultati”, le CMT dei campioni analizzati con il metodo della citometria a flusso, siano (a volte anche sensibilmente) più elevate di quelle risultanti dalla tecnica classica su piastra Petri (Kell *et al.*, 1998).

2.6.6 Applicazioni Industriali

Oltre alle applicazioni che più riguardano l'ambito dell'ispezione degli alimenti, la citometria a flusso viene ampiamente applicata nell'industria farmaceutica e nell'ambito medico. Non solo per assicurarsi sulla sterilità dei farmaci, ma anche per investigare con precisione l'efficacia degli antibiotici, cioè come questi modifichino la capacità di sopravvivenza dei microrganismi, come ne alterino l'espressione genica e le proprietà patogene. Recentemente Qin e collaboratori hanno ridotto al minimo i falsi positivi per *Mycobacterium tuberculosis* (agente causa della TBC, malattia infettiva purtroppo ancora presente in tutto il terzo mondo), grazie all'utilizzo della citometria a flusso, coadiuvata dall'utilizzo contemporaneo di due fluorocromi (Quin *et al.*, 2008).

L'applicazione nell'industria produttrice di bevande alcoliche è molto aumentata, anche se gli studi specifici sono abbastanza ridotti (Malacrinò *et al.*, 2001). Oltre all'utilizzo nella produzione della birra, ci si sta espandendo verso le produzioni di vino e sidro (Herrero *et al.*, 2006). Bisogna ricordare che, soprattutto nel vino, la popolazione microbica è alquanto varia, comprendendo batteri, ma anche parecchi lieviti ed alcune muffe. Grazie all'utilizzo simultaneo dei parametri di rifrazione e dei fluorofori, si può arrivare ad una netta catalogazione dei microrganismi, ed a poter definire una valutazione delle loro capacità metaboliche e, quindi, fermentative.

Un'altra applicazione possibile è quella legata all'analisi delle acque (Vives-Rego, Lebaron, & Nebe-von-Caron, 2000) e dell'ambiente (Porter *et al.*, 1997). Uno studio effettuato comparando i risultati della tecnica classica con quelli della citometria a flusso, utilizzando i fluorofori, ha evidenziato che circa il 70% della popolazione microbica totale è composta da cellule VBNC (Yoshida & Hiraishi, 2004). Il lavoro sottolinea come, ancora una volta, l'analisi mediante tecnica classica, possa a volte non essere sufficiente per proteggere la salute.

Nella produzione alimenti di origine animale la citometria a flusso è stata ampiamente applicata nell'industria casearia, con i seguenti obiettivi:

- in questo ambito, moltissimi prodotti vengono fatti fermentare, e gli *starter* sono i LAB (*Lactic Acid Bacteria*); la tecnica permette di tenere sotto controllo la loro qualità (di solito sono conservati refrigerati per diverse settimane, e questo può far calare la loro vitalità, e quindi la loro capacità fermentativa (Papadimitriou *et al.*, 2006);
- consentire l'analisi degli alimenti, sia come prodotti intermedi che come prodotti finiti (Gunasekera *et al.*, 2000);
- tenere sotto controllo le infezioni da batteriofagi, virus che possono causare gravi danni economici, per la loro capacità di distruggere le cellule batteriche (Michelsen *et al.*, 2007).

La tecnica, in questi ambiti, può avere delle limitazioni se utilizzata da sola, come l'incapacità di evidenziare la presenza di batteri patogeni (è una tecnica quantitativa) e/o di spore. La combinazione della tecnica con la FISH (*Fluorescent In Situ Hybridization*, vedi Capitolo 2.5.5) dà la capacità di ampliare le possibilità di analisi, e quindi di azzerare i possibili rischi (Gunasekera *et al.*, 2003).

Per quanto riguarda la carne, obiettivo principale di questo studio, la citometria a flusso è ancora scarsamente utilizzata. In Germania viene sfruttata per darne una prima valuta-

zione qualitativa in base al suo valore di CMT. In Italia la tecnica non è mai stata applicata alla carne, tanto che questo è il primo lavoro effettuato su questa matrice organica.

Capitolo 3

Parte Sperimentale

Come già spiegato precedentemente, in Capitolo 1, l'obiettivo dello studio è stato quello di effettuare delle prove di validazione della tecnica di Citometria a Flusso. Le prove sperimentali sono state effettuate nel periodo tra novembre 2010 ed aprile 2011, presso il laboratorio di analisi degli alimenti "Eptanord" srl, con sede a Conselve (PD).

I campioni sono stati esaminati al fine di ottenere la CMT sia in tecnica classica che in tecnica alternativa. Sono stati studiati in totale 86 campioni, di quattro specie diverse (Bovino, Suino, Pollo, Tacchino), diretti al laboratorio stesso per le analisi obbligatorie secondo normativa vigente, per un totale di 191 risultati comparativi.

Per avere la maggiore linearità possibile tra i risultati, i campioni sono stati analizzati mediante le due tecniche praticamente in contemporanea. A volte i giorni di effettuazione delle analisi effettuate dal laboratorio e di quelle di validazione non corrispondevano: in questi casi le prove in tecnica classica venivano ripetute nella giornata adibita alla validazione, altrimenti venivano utilizzati i dati sulla CMT risultanti dalle analisi ufficiali del laboratorio.

Per la validazione si è seguito un protocollo di validazione del *D-Count*® (strumento che differisce dal BactiFlow®ALS solo perché il numero di campioni analizzabili è maggiore) utilizzato nel 2006 in Germania dal *BAV Institut für Hygiene und Qualitätssicherung GmbH*. Le prove sperimentali avevano le seguenti finalità:

- misurazione della **specificità** della tecnica, ovvero della capacità di misurare esattamente la CMT;
- misurazione della **sensibilità**, cioè della minima concentrazione di microrganismi in grado di essere rilevata dallo strumento;
- misurazione della **ripetibilità**, ovvero della linearità e costanza dei risultati ottenuti analizzando gli stessi campioni più volte;
- misurazione dell'**accuratezza**, cioè della deviazione dei risultati rispetto alla tecnica utilizzata come paragone.

3.1 Materiali Utilizzati

3.1.1 Tecnica Classica

Per la procedura della tecnica classica sono stati utilizzati:

- piastre Petri in plastica;
- terreno di coltura PCA (*Plate Count Agar*);
- sacchetti per *stomacher* filtrati e relativo macchinario d'utilizzo;
- provette sterili;
- acqua peptonata;
- incubatore a 37 ± 2 C°.

3.1.2 Citometria a Flusso

Per l'effettuazione delle analisi mediante citometria a flusso sono stati necessari diversi strumenti e numerosi reagenti, raccolti nella seguente tabella [*Tabella 1*].

<i>Strumenti</i>		
		BactiFlow® (<i>ALS System, Code 400-A0001-01</i>)
		<i>Stomacher</i> e appositi sacchetti con filtro
		Agitatore magnetico
		<i>Vortex</i>
		Centrifuga
		Incubatore a 37 ± 2 C°
		Micropipetta da 250 μ L
<i>Reagenti</i>		
	Enzyme Mix	<i>M1 (Code 200-R3069-02)</i>
		<i>Diluent M (Code 200-R3063-01)</i>
		<i>ChemSol M2 (Code 200-R2070-01)</i>
		<i>ChemSol M3 (Code 200-R2071-01)</i>

	Soluzioni Tampone	<i>ChemSol A7 (Code 300-R3082-02)</i>
		<i>ChemSol B24 (Code 400-R2051-01)</i>
		<i>CS26A (Code 400-R1405-01)</i>
		<i>Diluent R (Code 400-R6008-01)</i>
		<i>CSR (Code 300-R4095-01)</i>
		<i>Isored (Code 300-R3079-01)</i>
		<i>Acqua Peptonata</i>
	Cromogeno	<i>ChemChromee V23 (Code 400-R1007-01)</i>
	Soluzioni Pulenti	<i>Cleaning 5 (Code 300-R3107-02)</i>
		<i>ChemSol S (Code 300-R3065-01)</i>
		<i>ChemSol S 50X</i>
		<i>Cleaning 3 (Code 300-R3064-01)</i>
		<i>Antifoam (Code 300-R3101-01)</i>
	Soluzione per Calibrazione	<i>Standard G (Code 300-R5095-01)</i>
Consumabili		
		<i>Provette Sterili da 20 ml (Code 300-C1013-01)</i>
		<i>Tappi per Provette (Code 300-C1012-01)</i>
		<i>ChemFilter 25 per Provette (Code 300-C2004-01)</i>
		<i>Siringa Sterile</i>
		<i>Filtri Sterili da 0,2 µm per Siringa</i>
		<i>Bicchierini Sterili da 50 ml</i>
		<i>Puntali per Micropipetta</i>

Tabella 1: i materiali necessari per il corretto funzionamento del *BactiFlow*®.

Il BactiFlow®ALS è lo strumento chiave di questo lavoro. Esso è formato da tre principali elementi: l'analizzatore, il campionatore ed un personal computer.

L'**analizzatore** è il cuore dello strumento. Le sue componenti sono quelle descritte in Capitolo 2.6.2, ovviamente progettate per la ricezione ottimale di quelle λ emanate dai fluorofori attivati (picco a 522 nm).

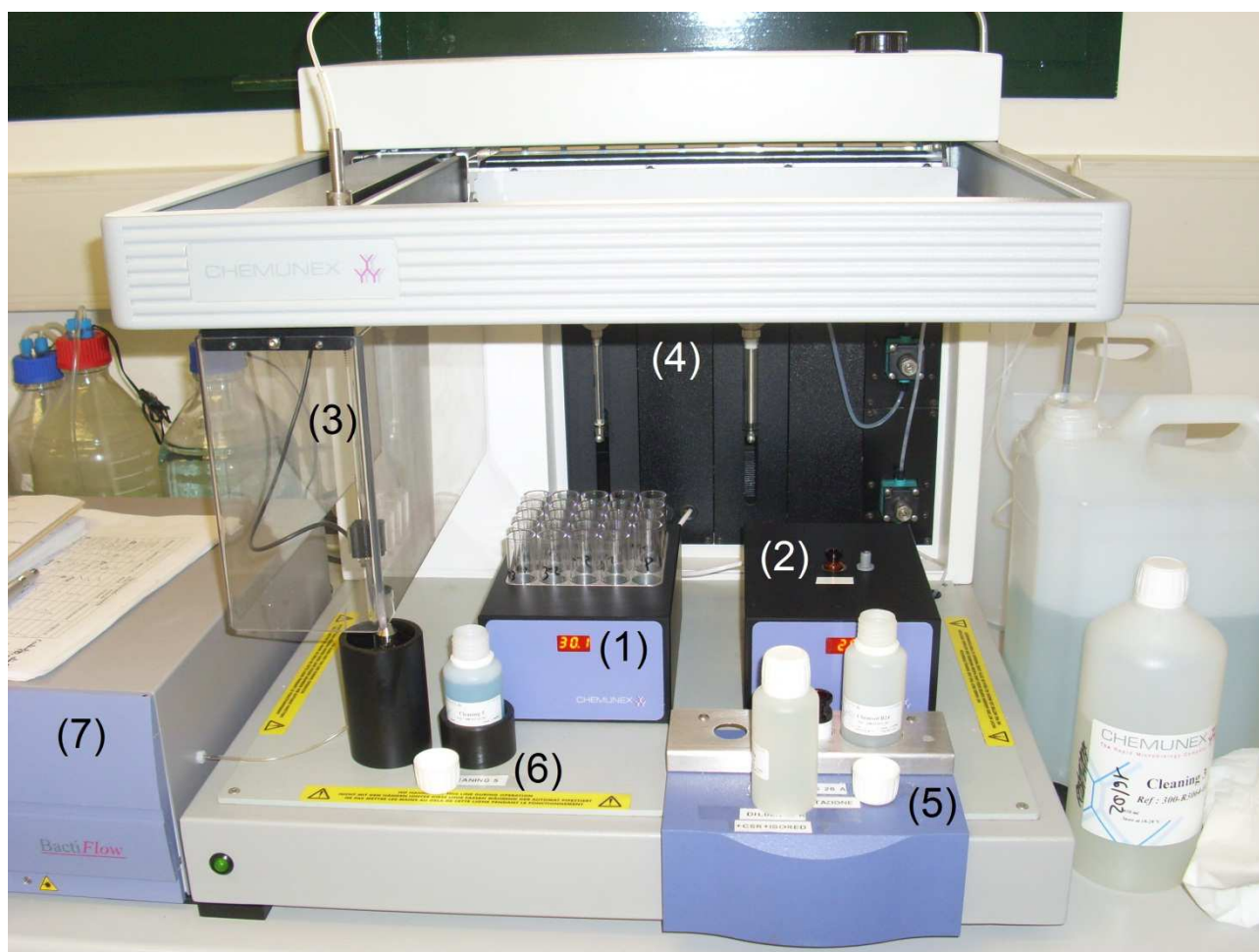


Figura 3.1: particolare del Campionatore: il rack riscaldato per i campioni (1), quello raffreddato per il cromo-
geno (2), la siringa semovibile (3), il sistema di stantuffi (4), la sede per il collocamento dei reagenti finali (5) e del
diluente per la pulizia dell'analizzatore (6); quest'ultimo (7) si intravede a sinistra del campionatore.

A monte dall'analizzatore è posizionato il **campionatore** (ALS: *Automated Labelling System*) [Figura 3.1], componente che provvede automaticamente alle ultime operazioni di trattamento dei substrati, oltre all'invio dell'aliquota di campione al capillare. Al suo interno sono presenti:

- Il *rack* riscaldato da 25 posti, dove andranno posizionate le provette contenenti i campioni da analizzare;
- altri appositi spazi dove inserire i reagenti, in particolare la sede raffreddata dove collocare il cromogeno;
- un braccio semovente contenente l'ago aspiratore, in grado di muoversi nelle tre dimensioni;
- due stantuffi che, creando il vuoto, permettono l'aspirazione da parte dell'ago di reagenti e campioni;
- le apposite connessioni con i diluenti per la pulizia e il raccoglitore degli scarti;
- l'unità di comunicazione con la cella di analisi.

Il campionatore è una componente molto utile che dà la possibilità all'operatore di risparmiare una buona quantità di tempo, eventualmente utilizzabile per la preparazione di nuovi campioni da analizzare.

Il **personal computer** contiene il software di utilizzo dello strumento fornito dalla casa madre. Per questo lavoro è stato utilizzato l'applicazione *A4726-01*. Il programma di utilizzazione prevede tre illustrazioni grafiche dei risultati: in forma di tabella, di grafico e di tabella avanzata. Inoltre dà la possibilità di modificare numerosi settaggi di analizzatore e campionatore, anche se, vista la loro elevata complessità, è consigliabile effettuare dei ritocchi solo sotto supervisione di un tecnico specializzato.

3.2 Metodi

3.2.1 Tecnica Classica

Le analisi condotte per ottenere la CMT in tecnica classica sono state effettuate con due metodiche:

- i campioni sono stati analizzati dal personale di laboratorio di Eptanord mediante tecnica classica automatizzata, con metodologia *System* (Capitolo 2.4.5);
- gli altri mediante tecnica classica semplice (Capitolo 2.4.3).

3.1.2 Citometria a Flusso

La procedura di utilizzo del BactiFlow®ALS è fornita dalla casa produttrice, e per questo lavoro è stato utilizzato il protocollo *P4726-01*. Quest'ultimo prevede un elevato numero di passaggi, aventi lo scopo di portare il campione nelle dovute condizioni di analisi in soluzione acquosa, oltre a limitare i possibili falsi positivi, agendo:

- nei confronti delle cellule non batteriche presenti nel substrato;
- contro le macroproteine del campione.

Entrambi questi elementi della matrice carnea sono, infatti, in grado di interferire con la valutazione della CMT, creando un cosiddetto “rumore di fondo”, e vanno soppressi.

Le operazioni preliminari di ogni giornata, però, sono quelle di pulizia e settaggio dello strumento.

La pulizia preliminare si effettua utilizzando il *ChemSol S* (o eventualmente il *ChemSol S 50X*, analogo del precedente da diluire):

- si inserisce l'apposito ago aspiratore all'interno della tanica del reagente;
- si aggiungono 15-35 gocce di *Antifoam* nella bottiglia dei rifiuti (sono schiumogeni dal potenziale elevato);
- si dà l'ordine di effettuare la procedura tramite il software.

A seguito della pulizia, ogni giorno lo strumento deve essere calibrato. Per questo scopo si utilizza lo *Standard G*, soluzione contenente numerose microsfere di cromogeno. L'operazione viene effettuata per verificare il corretto funzionamento di tutti i componenti

dello strumento. Prima della calibrazione è bene agitare la confezione di *Standard G* con il *Vortex*: le microsfele contenenti il cromogeno sono formate da lattice, sostanza che tende a formare una microsospensione in soluzione acquosa, e questo piccolo accorgimento farà sì che si distribuiscano uniformemente nel flacone.

Terminate le operazioni preliminari, si può procedere alla preparazione dei campioni. Oltre alla fase analoga alla tecnica classica (campione in sacchetto per *stomacher* con acqua peptonata stomacato), molte altre fasi vanno eseguite.

Preparazione *Enzyme Mix*

L'*Enzyme Mix* ha lo scopo di eliminare dal campione le cellule non batteriche presenti, possibili fonti di falsi positivi. Si va a creare un insieme di enzimi specifici per le cellule eucariote, che formano la matrice carnea. Sono necessari 3 bicchierini sterili da 50 ml, l'agitatore magnetico, la siringa sterile e il filtro sterile da 0,2 µm, oltre ovviamente ai materiali presenti in [*Tabella 1*], sotto l'indicazione *Enzyme Mix*.

- si identificano i bicchierini sterili come 1,2 e 3;
- si posiziona nel bicchierino 1 la barra magnetica, e si aggiungono poi 0,5 grammi di *M1* e 5 mL di *Diluent M*;
- si mescola il tutto con l'apposito strumento per 15 minuti a temperatura ambiente;
- al termine si aspira il liquido con la siringa, e lo si trasla nel bicchierino 2 filtrandolo col filtro sterile;
- il diametro dei pori del filtro, di 0,2 µm, non permette il passaggio di eventuali batteri presenti, e va perciò a sterilizzare la soluzione enzimatica; per questo è consigliabile effettuare le operazioni sotto cappa;
- si prelevano 3,5 mL del liquido presente nel bicchierino 2, e li si trasferisce nel 3;
- si aggiungono 486 µL di *ChemSol M2* e 195 µL di *ChemSol M3*;
- l'*Enzyme Mix* è pronto.

Trattamento della Matrice Carnea

Il trattamento prevede l'aggiunta di 108 µL di *Enzyme Mix* al campione di carne prelevato dal sacchetto per *stomacher* (1 ml). L'operazione viene effettuata nei tubi sterili da 20 ml, che poi vanno chiusi con gli appositi tappi, e agitati per omogeneizzare il contenuto. A seguito i campioni vanno incubati a 37 ± 2 C° per 15 minuti.

Concentrazione per Centrifugazione

Una volta terminato il trattamento della matrice le operazioni manuali vanno a concludersi con la centrifugazione dei campioni:

- si aggiungono, per ogni campione, 6 mL di *ChemSol A7*;
- si rimettono i tappi alle provette, e si mescola vigorosamente il tutto;
- si preparano nuove provette sterili da 20 mL, in numero pari a quelle dei campioni analizzati, e le si fornisce di *ChemFilter*;
- si trasferiscono i contenuti delle provette finora utilizzate in quelle preparate col filtro;
- si va a centrifugare a 2000 G per 8 minuti;
- la centrifugazione ha concentrato i batteri sul fondo della provetta, e tutto il liquido diventa quindi surnatante, da eliminare assieme ai filtri;
- le provette vanno ora posizionate nell'apposito *rack* riscaldato dello strumento, dopo aver controllato che la temperatura sia normale ($30^{\circ} \pm 2^{\circ} \text{ C}$).

Preparazione Reagenti per l'Analisi

Oltre ai campioni, nello strumento vanno inseriti altri reagenti: ovviamente i cromogeni, ma anche altri diluenti e solventi che renderanno le operazioni più rapide, mascherando inoltre il rumore di fondo. Si utilizzano:

- *ChemChrome V23*: il cromogeno, da posizionare nel *rack* raffreddato ($< 5^{\circ} \text{ C}$);
- *Cleaning 5*: liquido pulente la cella di misurazione tra un'analisi e la seguente;
- *ChemSol B24*: facilita la solubilizzazione del fluoroforo;
- *CS26A*: soluzione capace di minimizzare il rumore di fondo;
- *CSR + Diluent R*: soluzione riducente col compito di bloccare i cromogeni non penetrati nelle cellule batteriche; vista la sua elevata ossidabilità, vengono aggiunte 15 gocce di paraffina (*Isored*), che formano uno strato superficiale non penetrabile dall'aria.

I reagenti vanno inseriti negli appositi spazi del campionatore.

Le operazioni manuali preliminari, con un po' di pratica e lo sfruttamento dei tempi morti, possono essere effettuate in circa 90 minuti.

Analisi dei Campioni

Una volta settato il software (applicazione A4726-01), con l'inserimento del numero dei campioni da analizzare ed alcuni dati di riferimento, l'operazione di analisi può iniziare. Le fasi automatizzate prevedono:

- aggiunta di 30 μL di *ChemChrome V23* e 2740 μL di *ChemSol B24* ad ogni campione, e mescolamento;
- incubazione a 30° C (nel *rack*) per 12 minuti;
- aggiunta di 140 μL di *CS26A* e di 90 μL di soluzione riducente, e mescolamento;
- incubazione di 3 minuti;
- aspirazione di 318 μL di campione e sua iniezione nella cella d'analisi;
- analisi effettiva di 100 μL di campione;
- pulizia dei condotti con 2 mL di *Cleaning 5* a seguito di ogni operazione di lettura.

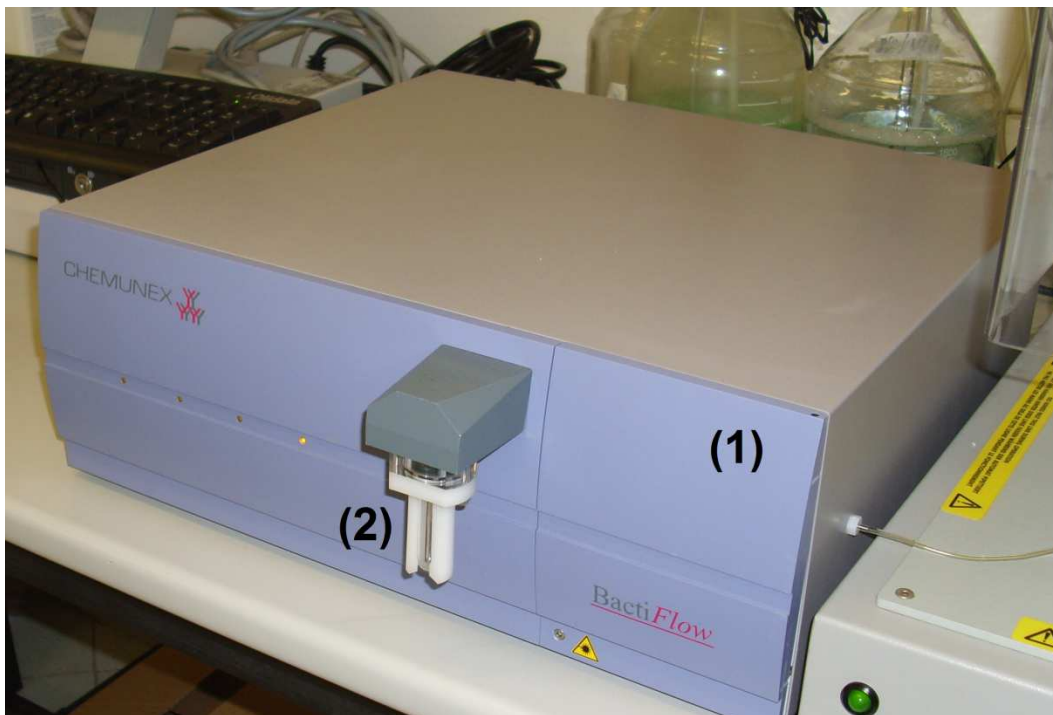


Figura 3.2: l'analizzatore (1) e l'apposita sede per l'attacco della provetta da 20 ml (2).

Eventualmente lo strumento contiene un apposito attacco per i tubi da 20 ml, permettendo l'effettuazione manuale di queste operazioni [Figura 3.2].

Il *rack* del BactiFlow® può contenere al massimo 25 campioni e, in modalità automatica, impiega circa 90 minuti per la loro completa analisi. La casa madre consiglia, però, di analizzare al massimo 23 campioni per volta, aggiungendo sempre un campione noto negativo ed uno positivo, per verificare ad ogni prova la corretta efficacia dello strumento.

	(2) Sample ID	(3) Time	(4) Lot Nr	Sampling	Manuf.	Comments	(5) Counts/g	
01	COUNTERFEIT:Negativo	14:59:06					40	V
02	COUNTERFEIT:Positivo	15:01:40					128608920!	V
03	COUNTERFEIT:Hamburge	15:04:40	7582				104310375!	V
04	COUNTERFEIT:Hamburge	15:07:40	7582				153907842!	V
05	COUNTERFEIT:Salsicci	15:11:12	7624				68509	V
06	COUNTERFEIT:Salsicci	15:14:23	7624				121821	V
07	COUNTERFEIT:Salsicci	15:16:57	7625				15906686!	V
08	COUNTERFEIT:Salsicci	15:19:57	7625				14021974!	V
09	COUNTERFEIT:Coscia P	15:22:57	7673				13363197!	V
10	COUNTERFEIT:Coscia P	15:25:57	7673				13502797!	V
11	COUNTERFEIT:Coscia P	15:28:58	7674				3224017!	V
12	COUNTERFEIT:Coscia P	15:31:58	7674				2989349!	V
13	COUNTERFEIT:Coscia P	15:35:30	7677				425494	V
14	COUNTERFEIT:Coscia P	15:38:37	7677				442247	V
15	COUNTERFEIT:Fegato P	15:41:16	7678				8845624!	V
16	COUNTERFEIT:Fegato P	15:44:16	7678				10224844!	V
17	COUNTERFEIT:Busto Ta	15:47:16	7679				1759742!	V
18	COUNTERFEIT:Busto Ta	15:50:17	7679				1683205!	V
19	COUNTERFEIT:Petto Po	15:53:48	7676				180192	V
20	COUNTERFEIT:Petto Po	15:56:56	7676				176299	V

Figura 3.3: risultati di una sessione di analisi mediante citometria a flusso, rappresentata sotto forma di tabella. Sono presenti i dati della sessione (1), i campioni (2), l'orario di analisi di ognuno (3), il numero di lotto per la ricerca crociata dei risultati con Eptanord (4), il valore della carica in n° cellule/g (5). La "V" sta a rappresentare che l'analisi è validata, cioè si può considerare corretta in base agli standard della casa madre.

Risultati

Le CMT di 23 campioni possono essere ottenute in circa 3 ore di lavoro, tempo davvero molto ridotto, soprattutto se lo si confronta con le 48-72 ore necessarie in tecnica classica. I risultati non vengono più espressi in ufc ma in n° di batteri per g o ml [Figura 3.3].

Questa differenza è da molti autori considerata il motivo per il quale le CMT in citometria siano, a volte anche sensibilmente, più elevate di quelle in tecnica classica. La presenza di VBNC è data come assodata, ma non è indagabile in piastra Petri, in quanto *molto probabilmente* queste cellule non saranno in grado di raggiungere la fase di crescita esponenziale necessaria per la formazione di una colonia visibile ad occhio nudo. Non a caso il test di validazione effettuato dal *BAV Institut für Hygiene und Qualitätssicherung GmbH* prevedeva la ripetizione delle conte in tecnica classica dopo sei giorni di incubazio-

ne (144 ore), sottolineando che, dopo questo ulteriore intervallo di tempo, le CMT delle due tecniche tendevano ad avvicinarsi. Ciò è giustificabile dal fatto che sei giorni anziché tre a volte possono essere sufficienti perché le cellule in VBNC possano intraprendere il processo di *resuscitation*. Lo studio, inoltre, si concluse con la piena validazione del metodo di citometria a flusso, in Germania attualmente ancora considerato l'unico accreditato per la CMT nella carne (oltre alla tecnica classica).

3.3 Risultati

I risultati delle prove di validazione, riportati nella loro esatta completezza in *allegato 1*, sono stati sottoposti ad una analisi statistica dei dati, con lo scopo di ottenere (come già precedentemente accennato): specificità, sensibilità, ripetibilità ed accuratezza.

È da sottolineare il fatto che sono stati analizzati solo 109 sui 184 dati. Perché, come mostrato in [*Grafico 1*], le prime sessioni di raccolta dati hanno dato risultati decisamente peggiori delle seguenti: si parte con differenze medie tra i valori superiori a 0,8 log, mentre successivamente si scende e si resta circa sul 0,5. Il problema è giustificabile col fatto che l'operatore ha avuto la necessità di imparare ad utilizzare lo strumento, vista la sua oggettiva complessità. Viene, perciò, rimarcata nuovamente l'esigenza di avere un operatore apposito e formato per l'analisi dei campioni mediante citometria a flusso.

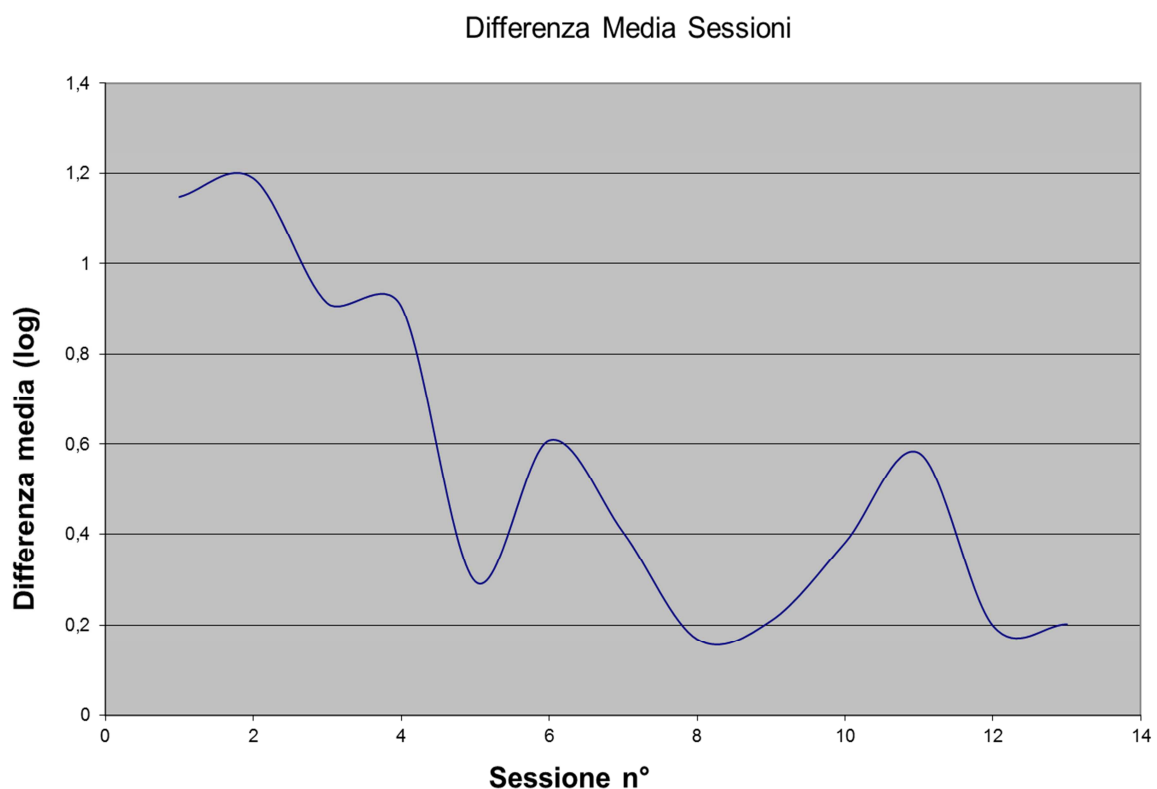


Grafico 1: differenze medie tra le sessioni in valore logaritmico. Notare l'elevata differenza iniziale e la sua successiva riduzione.

I dati analizzati, perciò, provengono dalle sessioni a partire da quella del 21/02/2011. Sono stati sottoposti ai seguenti test:

- studio delle differenze tra i valori logaritmici dei dati appaiati per valutare la correlazione.
- analisi di **regressione lineare**, per valutare sensibilità, specificità e correlazione;
- analisi di **distribuzione normale**, con indice di confidenza del 95%, per valutare la ripetibilità mediante l'indice r ;
- analisi mediante **t-test** per dati appaiati, per valutare la specificità.

3.3.1 Presentazione dei Dati

I risultati hanno dimostrato una buona concordanza tra i dati. Nonostante la loro analisi sia stata fatta partire dalla sessione di raccolta dati del 23/02, ugualmente alcuni di essi mostrano differenze elevate, anche sopra al grado logaritmico, ma sono probabilmente da associare ad errori nella manualità dell'operatore. In ogni caso la maggior parte dei dati presenti ha una divergenza spesso inferiore ai 0,5 gradi logaritmici, come evidenziato nel [Grafico 2].

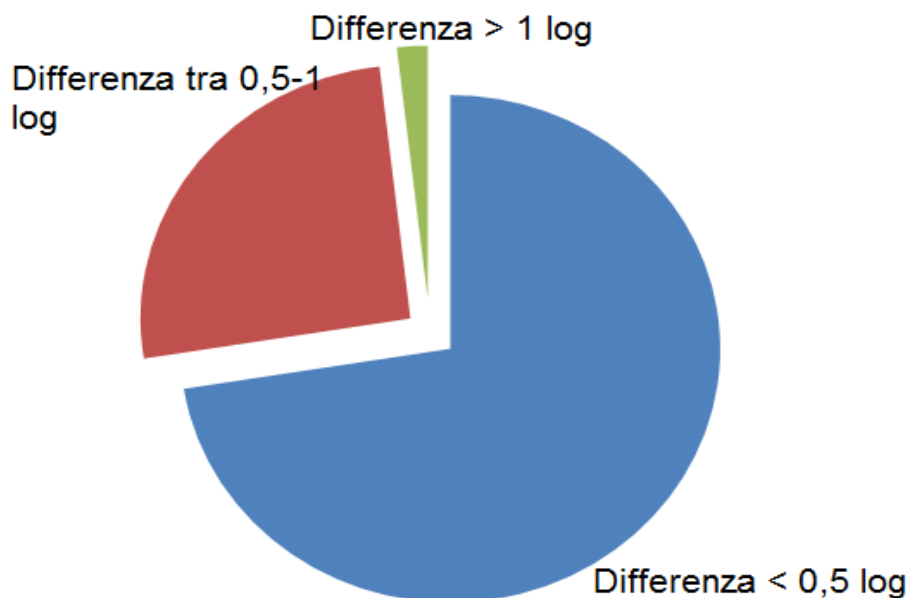


Grafico 2: rappresentazione delle differenze tra i risultati in valore logaritmico. Il 73% delle differenze è inferiore a 0,5 log (area blu), il 26% sta tra 0,5 e 1 grado logaritmico (area rossa), l'1% è superiore al grado logaritmico (area verde).

La differenza tra i valori è correlabile a:

- non omogenea distribuzione dei batteri nella soluzione acquosa;
- errori procedurali.

Da sottolineare il fatto che, nella maggior parte dei casi (74 su 109), i valori della CMT rilevati tramite citometria a flusso tendevano ad essere più elevati di quelli in tecnica classica [Grafico 3]. Ciò può essere legato, oltre a fattori casuali, anche alla probabile presenza di cellule vive, ma non vitali (VBNC), nei substrati esaminati.

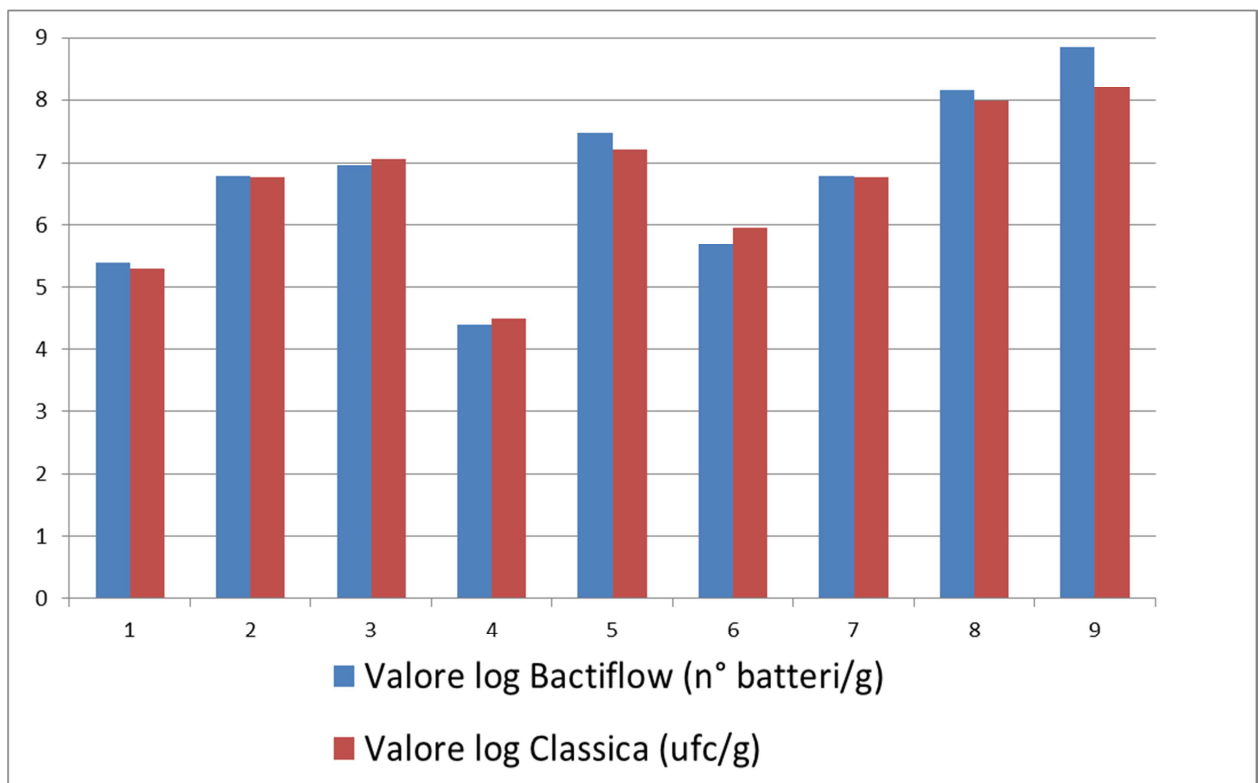


Grafico 3: Dettaglio della sessione del 25/03/2011. Notare la lieve differenza tra i valori delle CMT in tecnica classica ed in tecnica alternativa, oltre alla tendenza dei risultati di citometria di essere più elevati (6 su 9).

3.3.2 Regressione Lineare

I risultati delle analisi, trasformati nei corrispettivi valori logaritmici in base 10, sono stati analizzati mediante regressione lineare [Grafico 4].

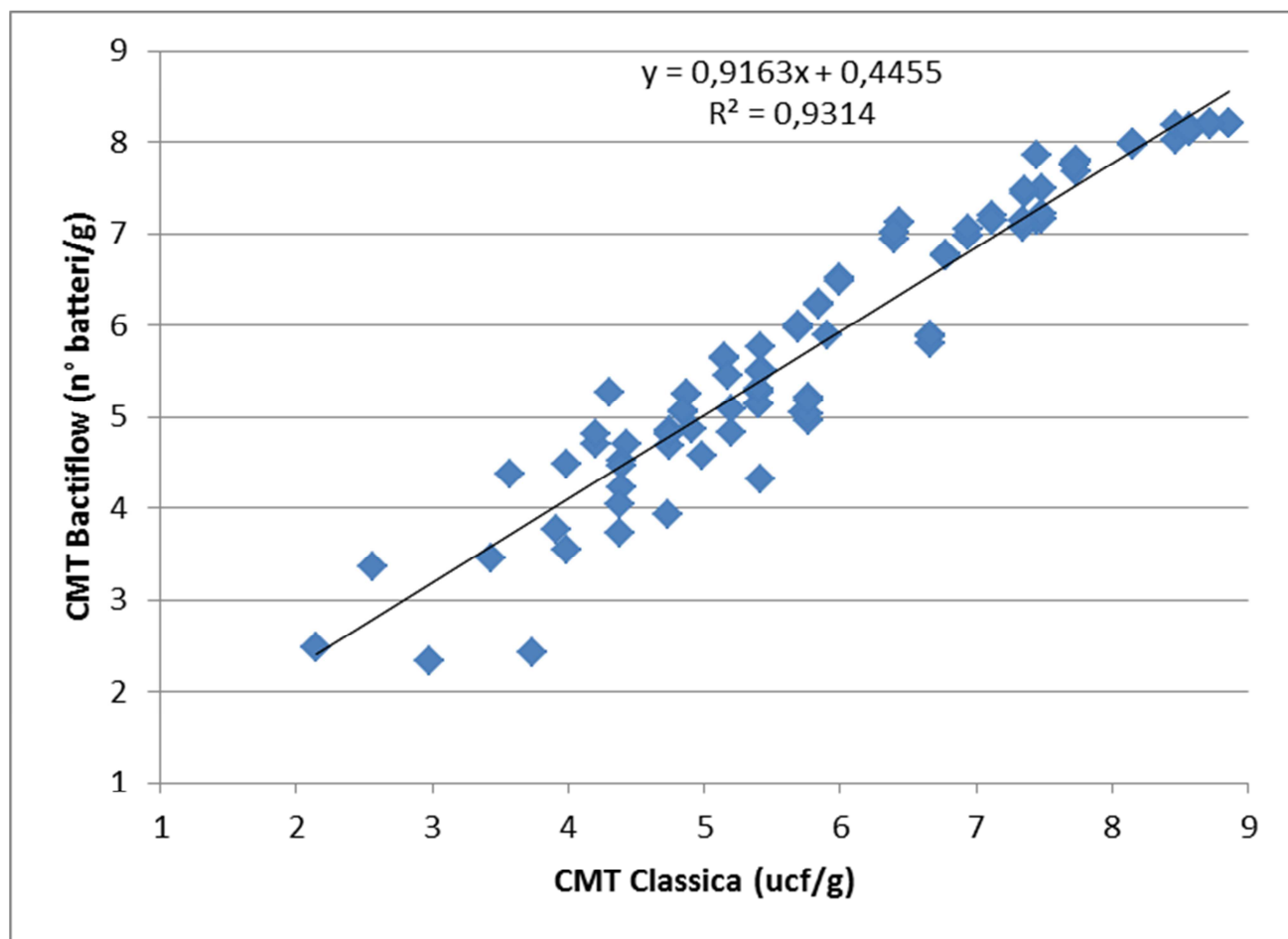


Grafico 4: Analisi di regressione lineare comparante le CMT in tecnica classica ed in tecnica alternativa.

R^2 è un parametro compreso tra 0 ed 1 che rappresenta la discrepanza presente tra i dati delle due tecniche paragonate. In pratica è l'errore o dispersione dei punti nel grafico rispetto alla retta, la quale rappresenta la correlazione dei dati in forma di funzione. Ovviamente una perfetta corrispondenza dei dati con errore zero è impossibile (ed irreali) da ottenere. La necessità è quella di ottenere valori di R^2 il più vicino possibile ad 1. Lo studio ha conseguito un R^2 pari a 0,93, dato ottimo e che comprova la bontà della metodica.

3.3.2 Distribuzione Normale

La distribuzione normale è stata utilizzata per studiare la ripetibilità dei processi analitici. Dopo aver calcolato la media delle misurazioni, sono state ottenute la deviazione standard, la ripetibilità e l'indice di confidenza (con intervallo di confidenza del 95%).

N° Campione	CMT Classica log (ufc/g)	CMT BactiFlow log (n° batteri/g)
Macinato 1A	8,41	7,97
Macinato 1B	8,04	7,98
Macinato 1C	8,14	7,97
Macinato 1D	8,14	7,99
Macinato 1E	8,08	8,00
Media (m)	8,16	7,98
Deviazione Standard (D _s)	0,146	0,01
Ripetibilità (r)	0,41	0,03
Intervallo di Confidenza del 95% (da m-r a m+r)	Da 7,76 A 8,58	Da 7,95 A 8,01
Intervallo di confidenza (2*r)	0,82	0,06
N° Campione	CMT Classica log (ufc/g)	CMT BactiFlow log (n° batteri/g)
Macinato 2A	7,36	6,95
Macinato 2B	7,30	7,00
Macinato 2C	7,04	6,99
Macinato 2D	7,11	7,03
Macinato 2E	7,48	7,06
Media (m)	7,26	7,01
Deviazione Standard (D _s)	0,18	0,04
Ripetibilità (r)	0,50	0,12
Intervallo di Confidenza del 95% (da m-r a m+r)	Da 6,76 A 7,76	Da 6,89 A 7,13
Intervallo di confidenza (2*r)	1,00	0,25

Tabella 2: risultati delle prove di ripetibilità. Sono rappresentate le CMT trasformate in valore logaritmico ed i risultati dell'analisi statistica dei dati.

La ripetibilità (r), come da protocollo, è uguale a 2,8 volte la deviazione standard. In entrambe le prove effettuate, come evidenziato nelle tabelle precedenti, il suo valore è inferiore per quanto riguarda la citometria a flusso rispetto alla tecnica classica. Il suo calcolo permette di ottenere l'intervallo di confidenza del 95%, che in entrambi i casi risulta essere decisamente minore in tecnica alternativa (0,06 contro 0,82 nella prima prova; 0,25 contro 1,00 nella seconda) [Tabella 2]. L'automazione di parte delle procedure di analisi può essere la base per spiegare questa elevata differenza: minor possibilità di errore e quindi maggior linearità dei risultati.

In ogni caso la visualizzazione grafica dei dati è completamente sovrapponibile, come mostrato in [Grafico 5] ed in [Grafico 6]. Viene di nuovo rimarcato l'ottimo indice di comparazione dei dati.

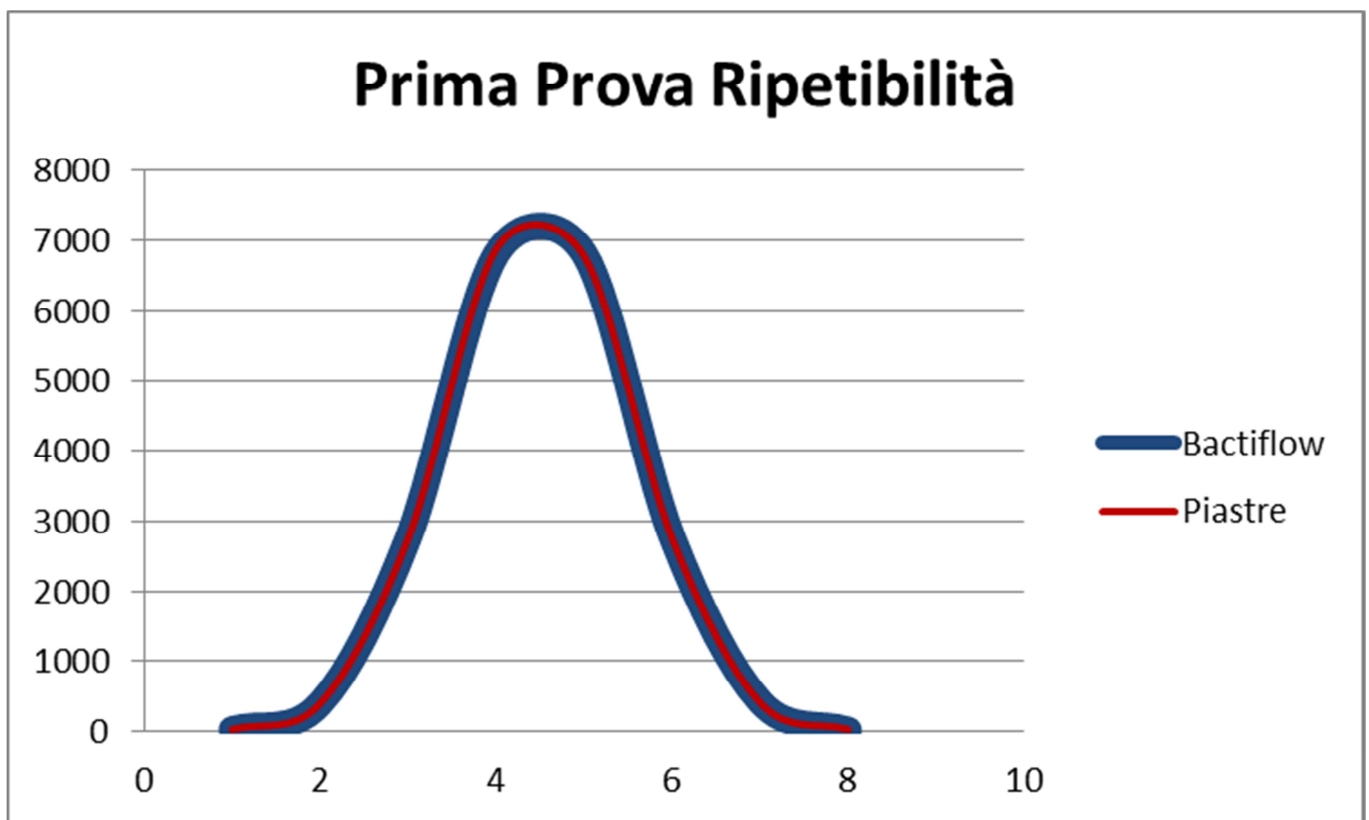


Grafico 5 : Distribuzione normale rappresentata graficamente sotto forma di curva Gaussiana della prima prova di ripetibilità. Notare l'elevato grado di comparabilità tra i dati.

Seconda Prova Ripetibilità

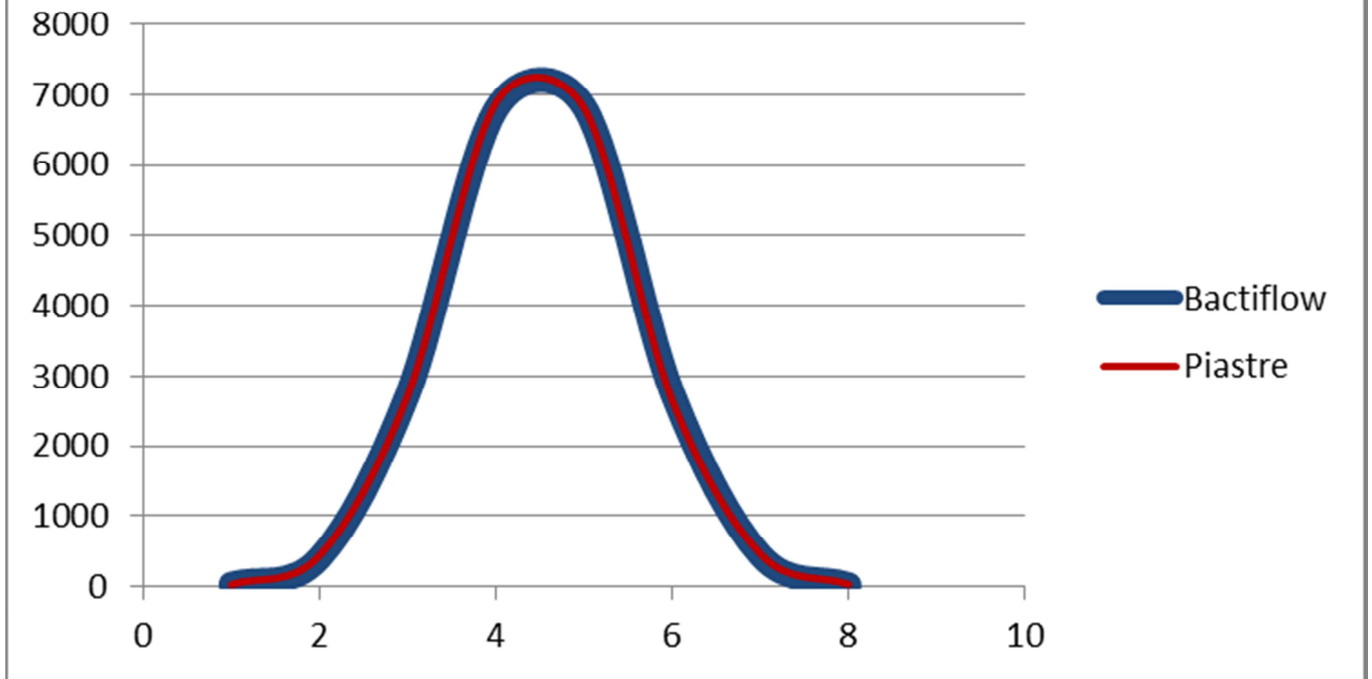


Grafico 6: Rappresentazione grafica della distribuzione normale della seconda prova di ripetibilità sotto forma di curva Gaussiana. Si può notare nuovamente l'elevato grado di sovrapposizione dei dati di ripetibilità.

3.3.3 Calcolo della Concordanza Mediante Utilizzo del T-Test

Il t-test è una metodica statistica che confronta due popolazioni uguali, alle quali sono state applicate due diverse metodiche, per evidenziare se queste sono significativamente differenti: ad esempio due popolazioni di animali da reddito, con uguali caratteristiche soggettive (età, sesso, ecc.) ed ambientali (temperatura, umidità, ecc.), a cui vengono somministrate due diversi tipi di alimentazione, per valutare quale gruppo avrà maggiori *performance*. Dopo n giorni viene valutato l'indice di accrescimento dei soggetti. Il t-test va a valutare *con quanta probabilità* la differenza tra i pesi dei due gruppi è legata al caso o alla diversa alimentazione. Questa probabilità è espressa dal valore p . Quanto minore è p , tanto minore sarà la probabilità che le differenze siano legate al caso. Proseguendo con l'esempio, un valore p di 0,05 indica che c'è un 5% di possibilità che le differenze siano dovute a fattori casuali, e che c'è invece una possibilità del 95% che siano legate alla diversa alimentazione.

Ovviamente il t-test è applicabile a moltissimi casi, ed è stato utilizzato per verificare la bontà delle analisi. In [Tabella 3] sono presenti i risultati. Da ricordare che i dati di partenza erano quelli già trasformati in valore logaritmico.

	Variabile 1	Variabile 2
Media	5,8659	6,1600
Varianza	1,3964	1,1728
Correlazione di Pearson	0,9589	
Valore t	-4,0697	
p (T<=t) due code	< 0,001	

Tabella 3: contiene i risultati delle analisi statistiche sulla concordanza mediante t-test.

Come si può vedere dal valore di p in tabella, c'è un 0,1% di probabilità che le differenze tra i valori siano legati al caso. Significa che nel 99,9% dei casi (cioè in pratica sempre) le differenze tra i dati siano legate alla metodica utilizzata. Ciò, in ogni caso, è più che normale, vista l'enorme differenza tra i principi sui quali sono basate le metodologie.

Ora bisogna chiedersi: i due metodi danno risultati quasi sicuramente differenti, proprio per la loro intrinseca diversità. Come visto precedentemente, però, i risultati sono comunque sovrapponibili. Quindi perché un laboratorio dovrebbe preferire la citometria a flusso rispetto alla tecnica classica? Non è l'ambizione del suddetto lavoro rispondere a questa domanda, ma bisogna considerare gli enormi vantaggi tempistici ottenibili con la tecnica alternativa, soprattutto in un mondo lavorativo sempre più veloce come il nostro. Starà a chi di dovere prendere una decisione molto importante per il futuro del proprio laboratorio, in base al budget (parametro non indifferente!) ed alla mole di lavoro a cui è sottoposto.

3.4 Conclusioni

L'analisi dei dati effettuata evidenzia la bontà della metodica analitica. Le CMT risultanti sono correlabili a quelle ottenute in tecnica classica, come sottolineato dalla loro analisi statistica. Ciò è stato riscontrato anche dal *BAV Institut für Hygiene und Qualitätssicherung*, che in particolare ha rimarcato l'elevato grado di correlazione tra i dati ottenuti con le due tecniche, specialmente nel *range* tra 5×10^3 e 10^6 , intervallo ottimale per quanto riguarda le analisi microbiologiche sulla carne cruda. I risultati ottenuti in questo lavoro hanno comunque dato buone correlazioni anche sopra questi limiti. Il tutto in tempistiche notevolmente più brevi (3 ore contro 48-72), dando eventualmente la possibilità di effettuare azioni correttive in tempi ristretti. Questo parametro è il pregio maggiore della tecnica: permette di tenere sotto controllo, ad esempio in aziende produttrici di alimenti, la qualità delle materie prime praticamente in tempo reale. Di norma le analisi microbiologiche vengono effettuate sui prodotti finiti, per motivi legati alla procedura produttiva aziendale ed alle caratteristiche della tecnica classica. Grazie alla citometria, invece, si possono effettuare *prima* che la produzione sia partita, evitando inutili perdite di denaro, ad esempio, se il campione ha subito una forte contaminazione a monte della produzione. Molte aziende, infatti, sfruttano queste proprietà come controllo interno dell'igiene di produzione, su materie prime, intermedi e prodotti finiti.

Il grado di automazione della tecnica dà la possibilità di effettuare un elevato numero di analisi al giorno, oltre a standardizzare il metodo ed a permettere una diminuzione del grado di errore legato alle manualità presenti in tecnica classica.

Ovviamente la tecnica ha anche dei difetti. Il [*Grafico 1*] testimonia come sia necessario conoscere metodica e strumento per ottenere risultati accettabili per l'ufficializzazione e la delibera dei prodotti analizzati. Un periodo di pratica dell'operatore è indispensabile: la casa produttrice consiglia sempre almeno due settimane per esercitarsi ad usare lo strumento.

Anche se, effettivamente, il più grosso problema della citometria a flusso è legato ai costi. Per un laboratorio il suo acquisto è un investimento imponente, che ammonta a svariate migliaia di euro, ed è una spesa da non sottovalutare anche il suo utilizzo: molti dei reagenti sono soggetti a preparazioni particolari, alcuni anche con materiali rari, che quindi ne

fanno aumentare il valore. È da consigliare perciò praticamente solo a laboratori che abbiano la possibilità di ammortizzare i costi in tempi ristretti, cioè a quelli che effettuano molte analisi di CMT giornaliera.

La metodica, come tutte quelle presenti sul mercato, ha perciò pregi e difetti. Starà all'addetto decidere se e su cosa effettuare un investimento per potenziare il proprio laboratorio, in base alla mole di lavoro a cui è sottoposto, alla matrice maggiormente analizzata, al budget, ecc.

Allegato 1: tabella risultati.

Data	N° campione	Substrato	CMT Classica (ufc/g)	CMT BactiFlow (n°batteri/g)	CMT Classica log (ufc/g)	CMT BactiFlow log (n°batteri/g)	Differenza log (BactiFlow - Classica)
26/01/2011	1	Coscia Suina	1200	137173	3,079181246	5,137268637	2,058087391
26/01/2011	2	Macinato	780000	3635660	5,892094603	6,560583262	0,668488659
26/01/2011	3	Lonza Maiale	16000	83372	4,204119983	4,92102022	0,716900237
26/01/2011	4	Coscia Suina	1200	171837	3,079181246	5,235116682	2,155935436
26/01/2011	5	Coscia Suina E-2	120	10076	2,079181246	4,003288159	1,924106913
26/01/2011	6	Coscia Suina E-3	12	1231	1,079181246	3,090258053	2,011076807
26/01/2011	7	Macinato	780000	3276450	5,892094603	6,515403545	0,623308942
26/01/2011	8	Macinato E-2	78000	548337	4,892094603	5,739047552	0,846952949
26/01/2011	9	Macinato E-3	7800	25303	3,892094603	4,403172015	0,511077413
26/01/2011	10	Lonza Maiale	16000	56151	4,204119983	4,749357495	0,545237512
26/01/2011	11	Lonza Maiale E-2	1600	6284	3,204119983	3,798236176	0,594116194
26/01/2011	12	Lonza Maiale E-3	160	427	2,204119983	2,630427875	0,426307892
26/01/2011	13	Petto Pollo	700	66979	2,84509804	4,825938659	1,980840619
26/01/2011	14	Petto Pollo E-2	70	4874	1,84509804	3,687885525	1,842787485
26/01/2011	15	Petto Pollo E-3	7	189	0,84509804	2,276461804	1,431363764
26/01/2011	16	Fesa	200000	1076674	5,301029996	6,032084226	0,73105423
26/01/2011	17	Fesa E-2	20000	108548	4,301029996	5,035621826	0,73459183
26/01/2011	18	Fesa E-3	2000	7238	3,301029996	3,859618579	0,558588583
26/01/2011	19	Pancetta Suina	100	794	2	2,899820502	0,899820502
26/01/2011	20	Pancetta Suina -2	10	379	1	2,57863921	1,57863921
26/01/2011	21	Pancetta Suina -3	1	10	0	1	1

Data	N° campione	Substrato	CMT Classica (ufc/g)	CMT BactiFlow (n°batteri/g)	CMT Classica log (ufc/g)	CMT BactiFlow log (n°batteri/g)	Differenza log (BactiFlow - Classica)
09/02/2011	22	Wurstel	5200	42634	3,716003344	4,629756081	0,913752737
09/02/2011	23	Petto Pollo -1	310000	885937	5,491361694	5,94740284	0,456041146
09/02/2011	24	Petto Pollo -2	31000	95755	4,491361694	4,981161461	0,489799767
09/02/2011	25	Petto Pollo -3	3100	23270	3,491361694	4,366796383	0,875434689
09/02/2011	26	Hamburger Pollo -1	510000	53940	5,707570176	4,731910942	-0,975659234
09/02/2011	27	Hamburger Pollo -2	51000	111875	4,707570176	5,048733048	0,341162872
09/02/2011	28	Ossobuco	5100	55012	3,707570176	4,740457434	1,032887258
09/02/2011	29	Ragu Anatra -2	2600000	1406074	6,414973348	6,148008178	-0,26696517
09/02/2011	30	Ragu Anatra -3	260000	116061	5,414973348	5,064686308	-0,35028704
09/02/2011	31	Ragu Anatra -4	26000	5848	4,414973348	3,767007364	-0,647965984
Data							
16/02/2011	32	Carne	1600000	510180	6,204119983	5,707723429	-0,496396553
16/02/2011	33	Carne -2	160000	27535	5,204119983	4,439885081	-0,764234902
16/02/2011	34	Carne -3	16000	2542	4,204119983	3,405175546	-0,798944436
16/02/2011	35	Macinato	900000	74965	5,954242509	4,874858545	-1,079383964
16/02/2011	36	Macinato -2	90000	7504	4,954242509	3,875292825	-1,078949684
16/02/2011	37	Macinato -3	9000	1032	3,954242509	3,013679697	-0,940562812
16/02/2011	38	Bistecc.a	120000	1648	5,079181246	3,216957207	-1,862224039
16/02/2011	39	Bistecc.a -2	12000	690	4,079181246	2,838849091	-1,240332155
16/02/2011	40	Bistecc.a -3	1200	40	3,079181246	1,602059991	-1,477121255
16/02/2011	41	Macinato	2200	5322	3,342422681	3,72607487	0,383652189
16/02/2011	42	Macinato -2	220	566	2,342422681	2,752816431	0,41039375
16/02/2011	43	Macinato -3	22	10	1,342422681	1	-0,342422681
Data							
18/02/2011	44	Arista	10	30	1	1,477121255	0,477121255
18/02/2011	45	Arista -2	1	1	0	0	0
18/02/2011	46	Soppressa	1100000	1350288	6,041392685	6,130426408	0,089033723
18/02/2011	47	Soppressa -2	110000	208789	5,041392685	5,319707614	0,278314929
18/02/2011	48	Polpette	630000	169888	5,799340549	5,230162704	-0,569177846
18/02/2011	49	Polpette -2	63000	8169	4,799340549	3,912168896	-0,887171653
18/02/2011	50	Braciola	230	200	2,361727836	2,301029996	-0,06069784
18/02/2011	51	Braciola -2	23	20	1,361727836	1,301029996	-0,06069784
18/02/2011	52	Polpette	19000	10196	4,278753601	4,008429827	-0,270323774
18/02/2011	53	Polpette -2	1900	1054	3,278753601	3,022840611	-0,25591299

Data	N° campione	Substrato	CMT Classica (ufc/g)	CMT BactiFlow (n°batteri/g)	CMT Classica log (ufc/g)	CMT BactiFlow log (n°batteri/g)	Differenza log (BactiFlow - Classica)
23/02/2011	54	Salsiccia -1	270000	321355	5,431363764	5,506985062	0,075621297
23/02/2011	55	Salsiccia -2	27000	50108	4,431363764	4,699907069	0,268543305
23/02/2011	56	Salsiccia -3	2700	2799	3,431363764	3,447002898	0,015639134
23/02/2011	57	Carne -1	810000	767295	5,908485019	5,884962368	-0,023522651
23/02/2011	58	Carne -2	81000	74210	4,908485019	4,870462432	-0,038022587
23/02/2011	59	Carne -3	8100	5906	3,908485019	3,771293443	-0,137191576
23/02/2011	60	Macinato -1	540000	109741	5,73239376	5,040368913	-0,692024846
23/02/2011	61	Macinato -2	54000	8497	4,73239376	3,929265618	-0,803128142
23/02/2011	62	Macinato -3	5400	268	3,73239376	2,428134794	-1,304258966
23/02/2011	63	Macinato -1	96000	37827	4,982271233	4,577801899	-0,404469334
23/02/2011	64	Macinato -2	9600	3455	3,982271233	3,538448052	-0,443823181
23/02/2011	65	Macinato -3	960	218	2,982271233	2,338456494	-0,643814739
23/02/2011	66	Macinato -1	3700	23123	3,568201724	4,364044179	0,795842455
23/02/2011	67	Macinato -2	370	2333	2,568201724	3,367914739	0,799713015
Data							
18/03/2011	68	Hamburger	290000000	104335614	8,462397998	8,018432576	-0,443965422
18/03/2011	69	Hamburger 2	290000000	153922998	8,462397998	8,187303514	-0,275094484
18/03/2011	70	Salsiccia	160000	68509	5,204119983	4,835747628	-0,368372354
18/03/2011	71	Salsiccia 2	160000	121821	5,204119983	5,08572216	-0,118397822
18/03/2011	72	Salsiccia	13000000	15906686	7,113943352	7,201579708	0,087636356
18/03/2011	73	Salsiccia 2	13000000	14021974	7,113943352	7,146809157	0,032865805
18/03/2011	74	Coscia Pollo	2700000	13363197	6,431363764	7,125910371	0,694546607
18/03/2011	75	Coscia Pollo 2	2700000	13502797	6,431363764	7,130423739	0,699059974
18/03/2011	76	Coscia Pollo	1000000	3229039	6	6,50907329	0,50907329
18/03/2011	77	Coscia Pollo 2	1000000	2989349	6	6,475576621	0,475576621
18/03/2011	78	Coscia Pollo	140000	425791	5,146128036	5,629196477	0,483068442
18/03/2011	79	Coscia Pollo 2	140000	442247	5,146128036	5,645664896	0,49953686
18/03/2011	80	Fegato Pollo	2500000	8845624	6,397940009	6,946728475	0,548788466
18/03/2011	81	Fegato Pollo 2	2500000	10224844	6,397940009	7,009656691	0,611716682
18/03/2011	82	Busto Tacchino	700000	1759742	5,84509804	6,245449	0,40035096
18/03/2011	83	Busto Tacchino 2	700000	1683205	5,84509804	6,226137013	0,381038973
18/03/2011	84	Petto Pollo	75000	180192	4,875061263	5,255735506	0,380674242
18/03/2011	85	Petto Pollo 2	75000	176299	4,875061263	5,246249849	0,371188586
18/03/2011	86	Coscia Pollo	16000	49440	4,204119983	4,694078462	0,489958479

Data	N° campione	Substrato	CMT Classica (ufc/g)	CMT BactiFlow (n°batteri/g)	CMT Classica log (ufc/g)	CMT BactiFlow log (n°batteri/g)	Differenza log (BactiFlow - Classica)
18/03/2011	87	Coscia Pollo 2	16000	63138	4,204119983	4,800290821	0,596170838
18/03/2011	88	Carne	70000	111385	4,84509804	5,046826709	0,201728669
18/03/2011	89	Carne 2	70000	114354	4,84509804	5,05825136	0,21315332
Data							
25/03/2011	90	Carne Bovina	250000	186445	5,397940009	5,270550741	-0,127389268
25/03/2011	91	Carne Bovina bis	250000	138769	5,397940009	5,142292459	-0,25564755
25/03/2011	92	Carne Bovina ter	250000	136380	5,397940009	5,134750686	-0,263189323
25/03/2011	93	Carne Bovina quater	250000	202582	5,397940009	5,306600854	-0,091339154
25/03/2011	94	Macinato Bov	6000000	5607457	6,77815125	6,748765952	-0,029385298
25/03/2011	95	Macinato Bov bis	6000000	6036130	6,77815125	6,780758585	0,002607334
25/03/2011	96	Macinato Bov ter	6000000	5663327	6,77815125	6,753071638	-0,025079612
25/03/2011	97	Macinato Bov	8800000	9592188	6,944482672	6,981917682	0,03743501
25/03/2011	98	Macinato Bov bis	8800000	9526977	6,944482672	6,978955117	0,034472445
25/03/2011	99	Macinato Bov ter	8800000	11197860	6,944482672	7,049135033	0,104652361
25/03/2011	100	Macinato BovAd	25000	32763	4,397940009	4,515383662	0,117443653
25/03/2011	101	Macinato BovAd bis	25000	28587	4,397940009	4,456168582	0,058228573
25/03/2011	102	Macinato BovAd ter	25000	16974	4,397940009	4,229784198	-0,168155811
25/03/2011	103	Macinato BovSui	28000000	71784374	7,447158031	7,856029917	0,408871886
25/03/2011	104	Macinato BovSui ter	28000000	13773360	7,447158031	7,139039899	-0,308118132
25/03/2011	105	Macinato BovSui	30000000	14286460	7,477121255	7,15492463	-0,322196625
25/03/2011	106	Macinato BovSui bis	30000000	31322028	7,477121255	7,495849873	0,018728619
25/03/2011	107	Macinato BovSui ter	30000000	16103121	7,477121255	7,206910056	-0,270211198
25/03/2011	108	Petto Pollo	490000	922618	5,69019608	5,965021923	0,274825843
25/03/2011	109	Petto Pollo bis	490000	964357	5,69019608	5,984237837	0,294041757
25/03/2011	110	Petto Pollo ter	490000	986972	5,69019608	5,994304832	0,304108752
Data							
01/04/2011	111	Macinato Misto Su+Bo	140000000	97292373	8,146128036	7,988078796	-0,15804924
01/04/2011	112	Macinato Misto Su+Bo	140000000	90905790	8,146128036	7,958591545	-0,18753649
01/04/2011	113	Macinato Misto Su+Bo	140000000	97406575	8,146128036	7,988588273	-0,157539763
01/04/2011	114	Macinato Misto Su+Bo	140000000	98086517	8,146128036	7,991609313	-0,154518722
01/04/2011	115	Macinato Misto Su+Bo	140000000	97715828	8,146128036	7,989964916	-0,156163119
01/04/2011	116	Macinato Misto Su+Bo	720000000	161206594	8,857332496	8,207382802	-0,649949694
01/04/2011	117	Macinato Misto Su+Bo	720000000	161826166	8,857332496	8,209048745	-0,648283752
01/04/2011	118	Macinato Misto Su+Bo	720000000	158426228	8,857332496	8,199827082	-0,657505414

Data	N° campione	Substrato	CMT Classica (ufc/g)	CMT BactiFlow (n°batteri/g)	CMT Classica log (ufc/g)	CMT BactiFlow log (n°batteri/g)	Differenza log (BactiFlow - Classica)
01/04/2011	119	Macinato Misto Su+Bo	720000000	160694937	8,857332496	8,206002194	-0,651330303
01/04/2011	120	Macinato Misto Su+Bo	370000000	127890437	8,568201724	8,106838071	-0,461363653
01/04/2011	121	Macinato Misto Su+Bo	370000000	130107649	8,568201724	8,114302829	-0,453898895
01/04/2011	122	Macinato Misto Su+Bo	370000000	144776488	8,568201724	8,160698037	-0,407503687
01/04/2011	123	Macinato Misto Su+Bo	370000000	136111256	8,568201724	8,133894042	-0,434307683
01/04/2011	124	Macinato Bov Scelto	55000000	61785511	7,740362689	7,790886643	0,050523953
01/04/2011	125	Macinato Bov Scelto	55000000	60482256	7,740362689	7,781627982	0,041265293
01/04/2011	126	Macinato Bov Scelto	55000000	46046845	7,740362689	7,663199879	-0,077162811
01/04/2011	127	Macinato Bov Scelto	55000000	63526064	7,740362689	7,802951948	0,062589258
01/04/2011	128	Macinato Bov	52000000	55884272	7,716003344	7,747289598	0,031286254
01/04/2011	129	Macinato Bov	52000000	56278072	7,716003344	7,750339211	0,034335867
01/04/2011	130	Macinato Bov	52000000	58183418	7,716003344	7,76479923	0,048795887
01/04/2011	131	Macinato Bov	52000000	55451990	7,716003344	7,743917136	0,027913793
01/04/2011	132	Macinato Misto Bo+Su	520000000	154062313	8,716003344	8,187696414	-0,52830693
01/04/2011	133	Macinato Misto Bo+Su	520000000	159502680	8,716003344	8,202767985	-0,513235359
01/04/2011	134	Macinato Misto Bo+Su	520000000	159061004	8,716003344	8,201563719	-0,514439624
01/04/2011	135	Macinato Misto Bo+Su	520000000	157535791	8,716003344	8,197379238	-0,518624106
01/04/2011	136	Macinato Scelto Bov	260000	323703	5,414973348	5,510146724	0,095173376
01/04/2011	137	Macinato Scelto Bov	260000	311230	5,414973348	5,493081453	0,078108105
01/04/2011	138	Macinato Scelto Bov	260000	583407	5,414973348	5,765971636	0,350998288
01/04/2011	139	Macinato Scelto Bov	260000	20554	5,414973348	4,312896352	-1,102076996
01/04/2011	140	Carne Bovina	55000	47956	4,740362689	4,680842952	-0,059519738
01/04/2011	141	Carne Bovina	55000	65231	4,740362689	4,814454036	0,074091347
01/04/2011	142	Carne Bovina	55000	71183	4,740362689	4,852376287	0,112013598
01/04/2011	143	Carne Bovina	55000	70885	4,740362689	4,850554344	0,110191654
01/04/2011	144	Carne Bovina	55000	63784	4,740362689	4,804711751	0,064349062
01/04/2011	145	Mac Scelto Rifatto	4600000	782536	6,662757832	5,893504326	-0,769253506
01/04/2011	146	Mac Scelto Rifatto	4600000	633381	6,662757832	5,801665031	-0,8610928
01/04/2011	147	Mac Scelto Rifatto	4600000	759715	6,662757832	5,880650701	-0,78210713
01/04/2011	148	Carne bov Rifatta	590000	91140	5,770852012	4,959709024	-0,811142987
01/04/2011	149	Carne bov Rifatta	590000	162268	5,770852012	5,210232883	-0,560619128
01/04/2011	150	Carne bov Rifatta	590000	106323	5,770852012	5,026627222	-0,74422479
01/04/2011	151	Carne bov Rifatta	590000	147144	5,770852012	5,167742558	-0,603109454
01/04/2011	152	Petto Pollo	24000	10723	4,380211242	4,030316306	-0,349894936

Data	N° campione	Substrato	CMT Classica (ufc/g)	CMT BactiFlow (n°batteri/g)	CMT Classica log (ufc/g)	CMT BactiFlow log (n°batteri/g)	Differenza log (BactiFlow - Classica)
01/04/2011	153	Petto Pollo	24000	5361	4,380211242	3,729245807	-0,650965434
01/04/2011	154	Petto Pollo	140	298	2,146128036	2,474216264	0,328088228
01/04/2011	155	Petto Pollo	140	298	2,146128036	2,474216264	0,328088228
01/04/2011	156	Petto Pollo	20000	184057	4,301029996	5,264952339	0,963922343
01/04/2011	157	Petto Pollo	9800	30686	3,991226076	4,486940281	0,495714205
01/04/2011	158	Petto Pollo	150000	285651	5,176091259	5,455835749	0,27974449
Data							
15/04/2011	159	Carne	410000	1388700	5,612783857	6,142608436	0,529824579
15/04/2011	160	Carne bis	410000	1124649	5,612783857	6,051017001	0,438233145
15/04/2011	161	Petto	370000	2372824	5,568201724	6,375265526	0,807063802
15/04/2011	162	Petto bis	370000	2211520	5,568201724	6,344690871	0,776489147
15/04/2011	163	Pollo	820000	2123193	5,913813852	6,326989474	0,413175621
15/04/2011	164	Pollo bis	820000	1874997	5,913813852	6,273000577	0,359186725
15/04/2011	165	Busto	7000	1935105	3,84509804	6,286704535	2,441606495
15/04/2011	166	Busto bis	7000	1894644	3,84509804	6,277527619	2,432429579
15/04/2011	167	Coscia	10000	2018799	4	6,305093081	2,305093081
15/04/2011	168	Coscia bis	10000	2247924	4	6,351781624	2,351781624
15/04/2011	169	Petto	95000	1744396	4,977723605	6,241645082	1,263921477
15/04/2011	170	Petto bis	95000	1850166	4,977723605	6,267210696	1,28948709
15/04/2011	171	Petto	6700	1788500	3,826074803	6,252488944	2,426414142
15/04/2011	172	Petto bis	6700	1911310	3,826074803	6,281331132	2,455256329
15/04/2011	173	Petto	570000	728208	5,755874856	5,862255446	0,10638059
15/04/2011	174	Petto bis	570000	1938732	5,755874856	6,287517779	0,531642923
15/04/2011	175	Petto	180000	113453	5,255272505	5,054815984	-0,200456521
15/04/2011	176	Petto bis	180000	108417	5,255272505	5,035097386	-0,220175119
15/04/2011	177	Alette	590000	821641	5,770852012	5,914682102	0,143830091
15/04/2011	178	Alette bis	590000	762521	5,770852012	5,882251809	0,111399797
15/04/2011	179	Intero	19000	22639	4,278753601	4,354857239	0,076103639
15/04/2011	180	Intero bis	19000	19063	4,278753601	4,280191248	0,001437647
Data							
19/04/2011	181	Macinato 1	23000000	27166866	7,361727836	7,434039541	0,072311705
19/04/2011	182	Macinato 1 bis	23000000	29285808	7,361727836	7,466657211	0,104929375
19/04/2011	183	Macinato 2	22000000	11581129	7,342422681	7,063750899	-0,278671782
19/04/2011	184	Macinato 2 bis	22000000	13732035	7,342422681	7,137734902	-0,204687779

20/04/2011 (Prove Ripetibilità)

Campione	CMT Classica (ufc/g)	CMT BactiFlow (n°batteri/g)	CMT Classica log (ufc/g)	CMT BactiFlow log (n°batteri/g)
Macinato 1A	260000000	93881333	8,414973348	7,972579247
Macinato 1B	110000000	95100201	8,041392685	7,978181435
Macinato 1C	140000000	94027981	8,146128036	7,973257111
Macinato 1D	140000000	98158462	8,146128036	7,991927745
Macinato 1E	120000000	99187606	8,079181246	7,996457408
Macinato 2A	23000000	9017912	7,361727836	6,955105993
Macinato 2B	20000000	10047940	7,301029996	7,002077033
Macinato 2C	11000000	9683413	7,041392685	6,986028455
Macinato 2D	13000000	10909700	7,113943352	7,037812808
Macinato 2E	30000000	11674810	7,477121255	7,067249821

Bibliografia

- Alles, S.; Shrestha, N.; Ellsworth, A.; Rider, A.; Foti, D.; Knickerbrocker, J.; Mozola, M. (2009). Validation of the Soleris (R) yeast and mold test for semiquantitative determination of yeast and mold in selected foods. *Journal of AOAC International*, 92, 1396-1415.
- Arndt-Jovin, D., & Cram, L. (2005). Mack Jett Fulwyler, Pioneer of Flow Cytometry and Flow Sorting (1936–2001). *International Society for Analytical Cytology*, 67A, 53-60.
- Arvanitoyannis, I., & Traikou, A. (2005). A comprehensive review of the implementation of hazard analysis control point (HACCP) to the production of flour and flour-based products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 327-370.
- Baumgarth, N., & Roederer, M. (2000). A practical approach to multicolour flow cytometry for immunophenotyping. *Journal of Immunological Methods*, 243, 77-97.
- Bolton, F., Crozier, I., & Williamson, J. (1996). Isolation of *Escherichia coli* O157 from raw meat products. *Letters of Applied Microbiology*, 23, 317-321.
- Bottari, B., Ercolini, D., Gatti, M., & Neviani, E. (2006). Application of FISH technology for microbiological analysis: current state and prospects. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73, 485-494.
- Chen, F., & Godwin, S. (2006). Comparison of a rapid ATP bioluminescence assay and standard plate count methods for assessing microbial contamination of consumers' refrigerator. *Journal of Food Protection*, 69, 2534-2538.
- Davey, H., & Kell, D. (1996). Flow cytometry and cell sorting of heterogeneous microbial populations: the importance of single-cell analyses. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 60, 641-696.
- Diaz, M., Herrero, M., Garcia, L., & Quiros, C. (2010). Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal*, 48, 385-407.
- Dinsdale, M., & Lloys, D. (1995). Yeast viability during cider fermentation: two approaches to the measurement of membrane potential. *Journal of the Institute of Brewing*, 101, 453-458.
- Eyles, M., Moir, C., & Davey, J. (1993). The effects of modified atmospheres on the growth of psychrotrophic *Pseudomonas* on a surface in a model system. *International Journal of Food Microbiology*, 20, 97-107.

- Fach, P., Micheau, P., Mazuet, C., Perelle, S., & Popoff, M. (2009). Development of real-time PCR tests for detecting botulinum neurotoxins A, B, E, F producing *Clostridium botulinum*, *Clostridium baratii* and *Clostridium butyricum*. *Journal of Applied Microbiology*, 107, 465-473.
- Favrin, S., Jassim, S., & Griffiths, M. (2003). Application of novel immunomagnetic separation-bacteriophage assay for the detection of *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli* O157:H7 in food. *International Journal of Food Microbiology*, 85, 63-71.
- Feng, P. (1996). Emergence of rapid methods for identifying microbial pathogens in foods. *Journal of AOAC International*, 79, 809-812.
- Fricker, E., Illingworth, & Fricker, C. (1997). Use of two formulation of Colilert and QuantiTray TM for assessment of the bacteriological quality of water. *Water Research*, 31, 2495-2499.
- Fukuda, S., Tatsumi, H., Igimi, S., & Yamamoto, S. (2005). Improved bioluminescent enzyme immunoassay for the rapid detection of *Salmonella* in chicken meat samples. *Letters in Applied Microbiology*, 41, 379-384.
- Fuller, M.E.; Streger, S.H.; Rothmel, M.F.; Mailloux, B.J.; Hall, J.A.; Onstott, T.C.; Fredrickson, J.K.; Balwill, D.I.; Deflaun, M.F. (2000). Development of a vital fluorescent staining method for monitoring bacterial transport in subsurface environments. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 4486-4496.
- Giaccone, V. (2007). Corso di Igiene e Tecnologia degli Alimenti.
- Glynn, B., Lahiff, S., Wernecke, M., Barry, T., Smith, & Maher, M. (2006). Current and emerging molecular diagnostic technologies applicable to bacterial food safety. *International Journal of Dairy Technology*, 59, 126-139.
- GmbH, B. I. (2006). Offenburg.
- Gray, K., & Bhunia, A. (2005). Specific detection of cytopathogenic *Listeria monocytogenes* using a two-step method of immunoseparation and cytotoxicity analysis. *Journal of microbiological methods*, 60, 259-268.
- Grossi, M., Lanzoni, M., Pompei, A., Lazzarini, R., Matteuzzi, D., & Ricco, B. (2008). Detection of microbial concentration in ice-cream using the impedance technique. *Biosensors and Bioelectronics*, 23, 1616-1623.
- Gunasekera, T., Attfield, D., & Veal, P. (2000). A Flow Cytometry Method for Rapid Detection and Enumeration of Total Bacteria in Milk. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 1228-1232.

- Gunasekera, T., Veal, D., & Attfield, P. (2003). Potential for broad applications of flowcytometry and fluorescence techniques in microbiological and somatic cell analyses of milk. *International Journal of Food Microbiology*, 85, 269-279.
- Hagens, S., & Loessner, M. (2007). Application of bacteriophages for detection and control of foodborne pathogens. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 76, 513-519.
- Hanna, S., Connor, C., & Wang, H. (2005). Real-time polymerase chain reaction for the food microbiologist: technologies, applications and limitations. *Journal of Food Science*, 70, R49-R53.
- Harrigan, W. (1998). *Laboratory methods in food microbiology, 3rd edition*. San Diego: Academic Press.
- Harris, L., & Griffiths, M. (1992). The detection of foodborne pathogens by the polymerase chain-reaction (PCR). *Food Research International*, 25, 457-469.
- Haughland, R. (2002). *Handbook of fluorescent probes and research chemicals, 9th edition*. Oregon: Molecul Probes Inc.
- Havelaar, A., Brul, S., de Jong, A., de Jonge, A., Zwietering, M., & ter Kuile, B. (2010). Future challenges to microbial food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 139, 79-94.
- Herrero, M., Quiros, C., Garcia, L., & Diaz, M. (2006). Use of flow cytometry to follow the physiological states of microorganisms in cider fermentation processes. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 6725-6733.
- Ikeda, M., Yamaguchi, N., Tani, K., & Nasu, M. (2006). Detection of food poisoning bacteria in fresh vegetables using DNA microarray. *Journal of Health Science*, 52, 36-42.
- International Standard Organization, I. 7. (2007). *Microbiology of food and animal feeding stuff - general requirements of guidance for microbiological examination*. ISO 7218:2007.
- Jasson, V., Jacxsens, L., Luning, P. R., & Uyttendaele, M. (2010). Alternative microbial methods: an overview and selection criteria. *Food Microbiology*, 27, 710-730.
- Jasson, V., Raikovic, A., Debevere, J., & Uyttendaele, M. (2009). Kinetics of resuscitation and growth of *Listeria monocytogenes* as a tool to select appropriate enrichment conditions as a prior step to rapid detection methods. *Food Microbiology*, 26, 88-93.

- Jepras, R., Carter, J., Pearson, S., Paul, F., & Wilkinson, M. (1995). Development of a robust flow cytometry assay for determining numbers of viable bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 2696-2701.
- Kampfer, P.; Nienhauser, A.; Packroff, G.; Wernicke, F.; Mehling, A.; Nixdorf, K.; Friedler, S.; Kolauch, C.; Esser, M. (2008). Molecular identification of coliform bacteria isolated from drinking water reservoirs with traditional methods and the Colilert-18 system. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 211, 374-384.
- Kawasaki, S.; Fratamico, P.M.; Horikoshi, N.; Okada, Y.; Takeshita, K.; Sameshita, T.; Kawamoto, S. (2009). Evaluation of a multiplex PCR system for simultaneous detection of *Salmonella* spp, *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in foods and in food subjected to freezing. *Foodborne Pathogens and Disease*, 6, 81-89.
- Keith, M. (1997). Evaluation of an automated enzyme-linked fluorescent immunoassay system for the detection of *salmonellae* in foods. *Journal of Food Protection*, 60, 682-685.
- Kell, D., Arseny, S., Kapreylants, A., Weichart, D., Harwood, C., & Barer, M. (1998). Viability and activity in readily culturable bacteria: a review and discussion of the practical issue. *Antoine von Leeuwenhoek*, 73, 169-187.
- Keramas, G.; Bang, D.D.; Lund, M.; Madsen, M.; Rasmussen, S.E.; Bunkenborg, H.; Telleman, P.; Christensen, C.B.V. (2003). Development of a sensitive DNA microarray suitable for rapid detection of *Campylobacter* spp. *Molecular and Cellular Probes*, 17, 187-196.
- Kodaka, H., Teramura, M., Mizuochi, S., Saito, M., & Matsuoka, H. (2009). Evaluation of the compact dry VP method for screening raw seafood for total *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of Food Protection*, 72, 169-173.
- Kostrzynska, M., & Bachand, A. (2006). Application of DNA microarray technology for detection, identification and characterization of food-borne pathogens. *Canadian Journal of Microbiology*, 52, 1-8.
- Kretzer, J.W.; Lehmann, R.; Schmelcher, M.; Banz, M.; Kim, K.P.; Korn, C; Loessner, M.J. (2007). Use of a high-affinity cell wall-binding domains of bacteriophage endolysins for immobilization and separation of bacterial cells. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 1992-2000.

- Kumar, R., Surendan, P., & Thampuran, N. (2008). Evaluation of culture, ELISA and PCR assays for the detection of *Salmonella* in seafood. *Letters in Applied Microbiology*, 46, 221-226.
- Lazcka, O., Del Campo, F., & Munoz, F. (2007). Pathogen detection: a perspective of traditional methods and biosensors. *Biosensors and Bioelectronics*, 22, 1205-1217.
- Lleo, M. B., Tafi, M., Signoretto, C., Boaretti, M., & Canepari, P. (2001). Resuscitation rate in different enterococcal species in the viable but non-culturable state. *Journal of Applied Microbiology*, 91, 1095-1102.
- Longobardi Givan, A. (2001). *Flow cytometry: First Principles, 2nd edition*. New York: John Wiley & Sons.
- Malacrinò, P., Zapparoli, G., Torriani, S., & Dellaglio, F. (2001). Rapid detection of viable yeasts and bacteria in wine by flow cytometry. *Journal of Microbiological Methods*, 45, 127-134.
- Manafi, M. (1996). Fluorogenic and chromogenic enzyme substrates in culture media and identification tests. *International Journal of Food Microbiology*, 31, 45-58.
- Maraldo, D., & Mutharasan, R. (2007). 10-minute assay for detecting *Escherichia coli* O157:H7 in ground beef samples using piezoelectric-excited millimeter-size cantilever sensors. *Journal of Food Protection*, 70, 1670-1677.
- McMeekin, T., Hill, C., Wagner, M., Dahl, A., & Ross, T. (2010). Ecophysiology of food-borne pathogens: essential knowledge to improve food safety. *International Journal of Food Microbiology*, 139, 64-78.
- Michelsen, O., Cuesta-Dominguez, A., Albrechtsen, B., & Jensen, P. (2007). Detection of bacteriophage-infected cells of *Lactococcus lactis* using flow cytometry. *Applied and Environmental Microbiology*, 73, 7575-7581.
- Miller, R., Speegle, L., Oyarzabal, O., & Lastovica, A. (2008). Evaluation of three commercial latex agglutination tests for identification of *Campylobacter* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, 46, 3546-3547.
- Monod, J. (1949). The growth of bacterial cultures. *Annual Review of Microbiology*, 3, 371-394.
- Mullis, K., & Faloona, F. (1987). Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 155, 335-350.
- Nebe-von Caron, B., Stephens, P., & Badley, R. (1998). Assessment of bacterial viability status by flow cytometry and single cell sorting. *Journal of Applied Microbiology*, 84, 988-998.

- Nero, L.A.; Beloti, V.; Barros, M.D.F.; de Santana, E.H.W.; Pereira, M.S.; Gusmao, V.V.; de Morales, L.B. (2002). Assessment of the efficiency of SimPlate™ total plate count color indicator (TPC CI) to quantify mesophilic aerobic microorganism in pasteurized milk. *Brazilian Journal of Microbiology*, 33, 44-48.
- Nero, L., Rodrigues, L., Vicoso, G., & Ortolani, M. (2008). Performance of petrifilm aerobic count plates on enumeration of lactic acid bacteria in fermented milks. *Journal of Rapid Methods & Automation in Microbiology*, 16, 132-139.
- Niza-Ribeiro, J., Louza, A., Santos, P., & Lima, M. (2000). Monitoring the microbiological quality of raw milk through the use of an ATP bioluminescence method. *Food Control*, 11, 209-216.
- Nordstrom, M.; Keller, S.; Lillemose, M.; Johansson, A.; Dohn, S.; Haefliger, D.; Blagoi, G.; Havsteen-Jakobsen, M.; Boisen, A. (2008). SU-8 cantilevers for biochemical sensing: fabrication, characterisation and development of novel readout methods. *Sensors*, 8, 1595-1612.
- Papadimitriou, K., Pratsinis, H., Nebe-von-Caron, G., Kletsas, D., & Tsakalidou, E. (2006). Rapid assessment of the physiological status of *Streptococcus macedonicus* by flowcytometry and fluorescence probes. *International Journal of Food Microbiology*, 111, 197-205.
- Paulsen, P., Borgetti, C., Schopf, E., & Smulders, F. (2008). Enumeration of *Enterobacteriaceae* in various food with a new automated most-probable-number method compared with petrifilm and international organization for standardization procedure. *Journal of Food Protection*, 71, 376-379.
- Porter, J., Deere, D., Hardman, M., Edwards, C., & Pickup, R. (1997). Go with the flow-use of flow cytometry in environmental microbiology. *FEMS Microbiology Ecology*, 24, 93-101.
- Posthuma-Trumpie, G., Korf, J., & van Amerogen, A. (2009). Lateral flow (immuno) assay; its strenghts, weakness, opportunities and threats. A literature survey. *Analytical and Bionalytical Chemistry*, 393, 569-582.
- Quin, D., He, X., Wang, K., & Tan, W. (2008). Using Fluorescent nanoparticles and SYBR Green I based two-color cytometry to determine *Mycobacterium tuberculosis* avoiding false positives. *Biosensors and Bioelectronics*, 24, 626-631.
- Quiros, C., Herrero, M., Garcia, L., & Diaz, M. (2007). Application of flow cytometry to segregated kinetic modelling based on the physiological states of microorganisms. *Applied and Enviromental Microbiology*, 73, 3993-4000.

- Quiros, C., Herrero, M., Garcia, L., & Diaz, M. (2009). Taking advantage of the flow cytometry technique for improving malolactic starters production. *European Food Research and Technology*, 228, 543-552.
- Reissbrodt, R.; Rienaeker, I.; Romanova, J.M.; Freestone, P.P.E.; Haigh, R.D.; Lyte, M.; Tschape, H.; Williams, P.H. (2002). Resuscitation of *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium and enterohemorrhagic *Escherichia coli* from the viable but nonculturable state by heat-stable enterobacterial autoinducer. *Applied and Environmental Microbiology*, 68, 4788-4794.
- Robinson, S., Wright, E., Williams, N., Hart, C., & French, N. (2004). Development and application of a spiral plating method for the enumeration of *Escherichia coli* O157 in bovine faeces. *Journal of Applied Microbiology*, 97, 581-589.
- Rodriguez-Lazaro, D.; Lombard, B.; Smith, H.; Rzezutka, A.; D'Agostino, M.; Kobilinsky, R.; Schroeter, A.; Malorny, B.; Miko, A.; Guerra, B.; Davison, J.; Kobilinsky, A.; Hernandez, M.; Bertheau, Y; Cook, N (2007). Trends in analytical methodology in food safety and quality: monitoring microorganisms and genetically modified organisms. *Trends in Food Science & Technology*, 18, 306-319.
- Rosmini, M., Signorini, M., Schneider, R., & Bonazza, J. (2004). Evaluation of two alternative techniques for counting mesophilic aerobic bacteria in raw milk. *Food Control*, 15, 39-44.
- Schonenbrucher, V., Mallison, E., & Bulte, M. (2008). A comparison of standard cultural methods for the detection of foodborne *Salmonella* species including three new chromogenic plating medium. *International Journal of Food Microbiology*, 123, 61-66.
- Seo, K., Brackett, R., Frank, J., & Hiliard, S. (1998). Immunomagnetic separation and flow cytometry for rapid detection of *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Food Protection*, 61, 812-816.
- Sewell, A., Warburton, D., Boville, A., Daley, E., & Mullen, K. (2003). The development of an efficient and rapid enzyme linked fluorescent assay method for the detection of *Listeria spp.* from foods. *International Journal of Food Microbiology*, 81, 123-129.
- Shapiro, H. (2000). Microbial analysis at the single-cell level: tasks and techniques. *Journal of Microbiological Methods*, 42, 3-16.
- Shapiro, H. (2003). *Practical flow cytometry, 4th edition*. New York: Wiley-Liss.
- Sierra, M., Sheridan, J., & McGuire, L. (1997). Microbial quality of lamb carcasses during processing and the acridine orange direct count technique (a modified DEFT) for

- rapid enumeration of total viable counts. *International Journal of Food Microbiology*, 36, 61-67.
- Szabo, I., Scherer, K., Roesler, U., Appel, B., Nockler, K., & Hensel, A. (2008). Comparative examination and validation of ELISA test systems for *Salmonella typhimurium* diagnosis of slaughtering pigs. *Journal of Food Microbiology*, 124, 65-69.
- Szita, G., Gyenes, M., Soos, L., Felfalvi, T., Bekesi, L., CsikO, G., et al. (2007). Detection of *Pseudomonas aeruginosa* in water samples using a novel synthetic medium and impedimetric technology. *Letters in Applied Microbiology*, 45, 42-46.
- Tauxe, R. (2002). Emerging foodborne pathogens. *International Journal of Food Microbiology*, 78, 31-41.
- Tonon, T., & Lanvaud-Funel, A. (2000). Metabolism of arginine and its positive effect on growth and revival of *Oenococcus oeni*. *Journale of Applied Microbiology*, 89, 526-531.
- Torlak, E., Akan, I., & Gokmen, M. (2008). Comparison of TEMPO (R) EC and TBX medium for the enumeration of *Escherichia coli* in cheese. *Letters in Applied Microbiology*, 47, 566-570.
- Ueckert, J., Nebe-von Caron, G., Bos, A., & ter Steeg, P. (1997). Flow cytometry analysis of *Lactobacillus plantarum* to monitoring lag times, cell division and injury. *Letters in Applied Microbiology*, 25, 295-299.
- Van der Spiegel, M., Luning, P., Ziggers, G., & Jongen, W. (2004). Evaluation of performance measurement instruments on their use for food quality systems. *Critical Review in Food Science and Nutrition*, 44, 501-512.
- Vives-Rego, G., Lebaron, P., & Nebe-von-Caron, G. (2000). Current and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. *Federation of European Microbiological Societies (FEMS) Microbiology Reviews*, 24, 429-448.
- Wagner, M., Horn, M., & Daims, H. (2003). Fluorescence in situ hybridisation for the identification and characterisation of prokaryotes. *Current Opinion in Microbiology*, 6, 302-309.
- Wattiau, P., Weijers, T., Andreoli, P., Schliker, C., Veken, H., Maas, H., et al. (2008). Evaluation of the Premi (R) test for *Salmonella*, a commercial low-density DNA microarray system intended for routine identification and typing of *Salmonella enterica*. *International Journal of Food Microbiology*, 123, 293-298.

- Wu, V. (2008). A review of microbial injury and recovery methods in food. *Food Microbiology*, 25, 735-744.
- Yoshida, N., & Hiraishi, A. (2004). An improved redox dye-staining method using 5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride for detection of metabolically active bacteria in activated sludge. *Microbes and Environments*, 19, 61-70.
- Zhang, X., Guo, Q., & Cui, D. (2009). Recent advances in nanotechnology applied to biosensors. *Sensors*, 9, 1033-1053.

Webgrafia

www.byoweb.usu.edu (ultima consultazione: 17/06/2012)
www.canada.blogosfere.it (ultima consultazione: 06/11/2011)
www.cyto.purdue.edu (ultima consultazione: 17/06/2012)
www.coleparmer.com (ultima consultazione: 17/06/2012)
www.dna-rna.net (ultima consultazione: 18/06/2012)
www.dwscientific.co.uk (ultima consultazione: 18/06/2012)
www.foodhaccp.com (ultima consultazione: 17/06/2012)
www.gastrocaserta.it (ultima consultazione: 18/06/2012)
www.istat.it (ultima consultazione: 06/11/2011)
www.medical-dictionary.thefreedictionary.com (ultima consultazione: 18/06/2012)
www.mypersonaltrainer.it (ultima consultazione: 18/06/2012)
www.oxid.com (ultima consultazione: 18/06/2012)
www.solutions.3mitalia.it (ultima consultazione: 18/06/2012)
www.wikipedia.org (ultima consultazione: 17/06/2012)