

MBS-HACCP&ACQUE EASY TEST
SISTEMA BASE

MANUALE D'USO

INDICE

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUZIONE | 3 |
| 2 | DICHIARAZIONE DI ESCLUSIONE DI RESPONSABILITÀ | 4 |
| 3 | MODALITÀ DI UTILIZZO | 4 |
| 3.1 | Preparazione della fiala di analisi | 5 |
| 3.2 | Inserimento del campione | 5 |
| 3.2.1 | <i>Campione solido</i> | 5 |
| 3.2.2 | <i>Campione liquido</i> | 6 |
| 3.2.3 | <i>Tampone di superficie</i> | 6 |
| 3.3 | Controllo dell'esito dell'analisi | 6 |
| 3.4 | Sterilizzazione post-analisi | 8 |
| 4 | NOTE SULLE ANALISI MICROBIOLOGICHE | 8 |
| 5 | APPENDICE I – BRODO DI ARRICCHIMENTO SELETTIVO DI SALMONELLA | 11 |

1 INTRODUZIONE

Gentile Utente, grazie per avere acquistato **MBS-HACCP&ACQUE EASY TEST**, un innovativo sistema colorimetrico rapido per eseguire analisi microbiologiche sugli alimenti e sulle acque, sviluppato in collaborazione con l'Università degli Studi Roma Tre.

Il metodo di analisi si basa sull'osservazione del cambiamento di colore della sospensione formatasi nella fiala di analisi in cui viene inserito il campione da analizzare: la sospensione cambia colore (vira) se sono presenti microrganismi; maggiore è la quantità di microrganismi, più rapido è il cambiamento di colore.

Il metodo MBS è stato validato secondo la norma ISO 16140:2003 "Microbiology of food and animal feeding stuffs – Protocol for the validation of alternative methods".

Sono disponibili i reagenti per la ricerca selettiva dei seguenti microrganismi:

1. Conta batterica totale – **CBT-L01**;
2. Coliformi – **CO-L02**;
3. *Escherichia coli* – **EC-L22**;
4. Enterobacteriaceae – **EB-L03**;
5. *Staphylococcus aureus* – **SP-L04**;
6. *Pseudomonas aeruginosa* – **PAO-L05**;
7. *Salmonella* spp. – **SL-L06**;
8. *Listeria* spp. – **LY-L07**;
9. *Enterococcus* spp. – **EF-L09**;
10. Lieviti – **SC-L11**.

Nota Bene: prima dell'uso si consiglia di scaricare le Schede di Dati di Sicurezza dal link: <http://www.emmebiesse.net/schede-sicurezza/>.

2 DICHIARAZIONE DI ESCLUSIONE DI RESPONSABILITÀ

MBS-HACCP&ACQUE Easy Test dovrà essere destinato solo all'uso per il quale è stato espressamente previsto; ogni altro uso è da considerarsi improprio e quindi pericoloso. È obbligo dell'utilizzatore osservare sotto la propria responsabilità le leggi e le disposizioni vigenti in materia di igiene e sicurezza.

MBS Srl, pertanto, declina ogni responsabilità per eventuali danni che possono, direttamente o indirettamente, derivare a persone, animali o cose in seguito all'impiego del prodotto.

3 MODALITÀ DI UTILIZZO

Il kit viene fornito in una confezione contenente tutto il materiale per effettuare l'analisi: blister di fiale di analisi (fiala), blister di tappi sterilizzanti colorati ed i fialoidi di acqua demineralizzata e olio di vaselina (fialoide).

Tuttavia è necessario disporre anche di un incubatore termostatico da batteriologia programmabile a 30°, 37° o 44 °C.

Prima di manipolare le fiale e di procedere con l'analisi si raccomanda un'accurata pulizia delle mani.

Inoltre, **si consiglia di attenersi alla normativa vigente per le procedure di campionamento e di seguire le indicazioni riportate nei paragrafi seguenti.**

Lo svolgimento dell'analisi può essere schematizzato in 4 fasi: preparazione della fiala di analisi, inserimento del campione, analisi e controllo dell'esito, sterilizzazione; la procedura operativa si differenzia per la tipologia di campione da analizzare: **campione solido e liquido o tampone di superficie.**

Nota Bene: per la ricerca di Salmonella spp. in 25 g di campione con il brodo di arricchimento selettivo ESL-A32, seguire le istruzioni operative riportate nell'Appendice I.

3.1 Preparazione della fiala di analisi

Tagliare con delle forbici il blister delle fiale per separarne una; aprirlo sollevando il cartoncino e prelevare la fiala.

Rimuovere il tappo provvisorio dalla fiala; aprire il fialoide di acqua e vaselina fornito ed inserire l'intero contenuto nella fiala; chiudere con il tappo di gomma.



Agitare capovolgendo la fiala più volte fino al completo dissolvimento del reagente (eventualmente anche con il vortex).

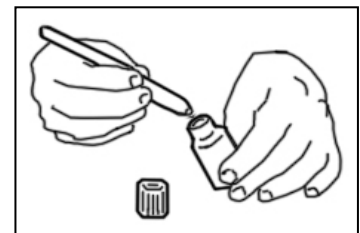
Rimuovere il tappo provvisorio dalla fiala ed inserivi il campione secondo le modalità riportate nei paragrafi successivi.

Nota Bene: nella fiala si sviluppano 2 fasi liquide: quella superiore costituita dall'olio di vaselina di colore bianco trasparente (non varia durante l'analisi), quella inferiore costituita dall'acqua del fialoide con cui viene disciolto il reagente.

3.2 Inserimento del campione

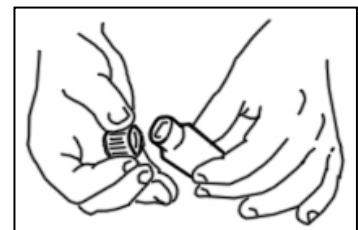
3.2.1 Campione solido

Prelevare 1 g di campione con un utensile in uso durante la lavorazione dell'alimento stesso ed inserirlo nella fiala (in alternativa si possono utilizzare pinzette sterili, eventualmente fornite su richiesta).



Tagliare con delle forbici il blister dei tappi sterilizzanti per separarne uno; aprirlo sollevando il cartoncino e prelevare il tappo, evitando contaminazioni.

Chiudere la fiala con il tappo sterilizzante e smaltire il tappo provvisorio in gomma.



Agitare accuratamente il campione capovolgendo la fiala più volte.

Incubare in termostato alla temperatura di interesse (30°C, 37°C, 44°C).

Nota Bene: per l'inserimento del campione nella fiala, si consiglia di adoperare un utensile in uso durante la lavorazione dell'alimento stesso in quanto, così facendo, si

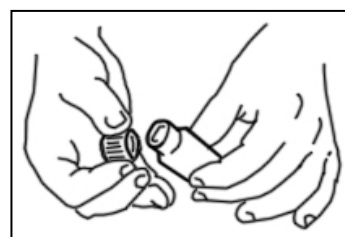
potranno evidenziare eventuali contaminazioni dell'alimento dovute a cause estrinseche.

3.2.2 Campione liquido

Prelevare con una pipetta pasteur sterile monouso (fornita su richiesta) 1 ml del liquido da esaminare ed introdurlo nella fiala.



Tagliare con delle forbici il blister dei tappi sterilizzanti per separarne uno; aprirlo sollevando il cartoncino e prelevare il tappo, evitando contaminazioni.



Chiudere la fiala con il tappo sterilizzante e smaltire il tappo provvisorio in gomma.

Agitare accuratamente il campione capovolgendo la fiala più volte.

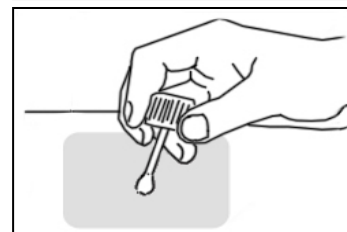
Incubare in termostato alla temperatura di interesse (30°C, 37°C, 44°C).

3.2.3 Tampone di superficie

Tagliare con delle forbici il blister dei tamponi e (TM-A14) per separarne uno; aprirlo sollevando il cartoncino e prelevare il flacone.



Aprire il flacone e strofinare il tampone sulla superficie da analizzare cercando di coprire un'area quadrata di circa 10 cm di lato.



Inserire il tampone in una fiala di analisi, precedentemente preparata, e agitare accuratamente capovolgendola più volte.

Incubare in termostato alla temperatura di interesse (30°C, 37°C, 44°C).



3.3 Controllo dell'esito dell'analisi

La lettura dei risultati ottenuti con l'**MBS-HACCP&ACQUE EASY TEST - SISTEMA BASE** viene eseguita tramite il controllo visivo del cambiamento di colore (viraggio)

delle fiale di analisi.

La correlazione tra il tempo di viraggio e la concentrazione batterica presente nel campione (Colony Forming Units CFU per g, ml, 100cm²), a seconda della tipologia di matrice (Acqua, Carne, Pesce, Latticini, Vegetali, Superfici e Altro) è possibile mediante la consultazione delle Schede di controllo qualità, specifiche per ogni reagente (consultabili dal link <https://www.emmebiesse.net/schede-controllo-qualita/>).

La lettura dei risultati varia a seconda della tipologia di analisi di interesse che può essere quantitativa o qualitativa.

L'**analisi quantitativa** consente di quantificare la concentrazione di microrganismi per unità di volume. In questo caso il colore delle fiale di analisi deve essere monitorato approssimativamente ogni 3 ore fino al tempo di viraggio o, in assenza di viraggio, fino al tempo massimo di analisi (corrispondente a 0 CFU/g, ml o 100cm²). Il completo viraggio della fiala (vedi Schede Controllo Qualità) è indicativo di un esito positivo dell'analisi, ovvero la presenza dei microrganismi di interesse nel campione; la persistenza del colore iniziale delle fiale di analisi (vedi Schede Controllo Qualità) è indicativo di un esito negativo dell'analisi, ovvero l'assenza dei microrganismi di interesse nel campione. Nel caso di un esito positivo dell'analisi, la concentrazione batterica all'interno del campione può essere calcolata utilizzando le tabelle di correlazione reagenti-specifiche.

L'**analisi qualitativa** consente invece di valutare la presenza/assenza dei microrganismi di interesse o valutare se la contaminazione microbica nel campione sia inferiore o superiore a un determinato limite di concentrazione.

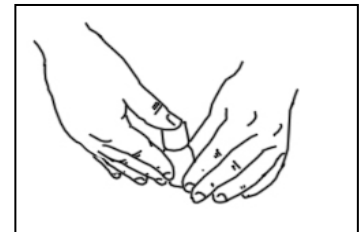
In questo caso sarà sufficiente controllare il colore della fiala di analisi una sola volta. Il tempo di osservazione corrisponde al tempo di viraggio associato alla concentrazione di interesse, individuabile tramite le tabelle di correlazione presenti nelle Schede controllo qualità. La durata dell'analisi dipende quindi dal tipo di analisi e dal limite operativo di carica batterica di interesse. Il completo viraggio della fiala (vedi Schede Controllo Qualità), nel tempo di osservazione di interesse, è indicativo di un esito positivo dell'analisi, ovvero della presenza di una concentrazione di microrganismi maggiore del limite di concentrazione prescelto; il risultato verrà espresso come CFU/g, ml or 100cm² > limite di concentrazione.

La persistenza del colore iniziale delle fiale di analisi (vedi Schede di controllo qualità) è invece indicativo di un esito negativo dell'analisi ovvero della presenza di una concentrazione di microrganismi minore del limite di concentrazione prescelto; il risultato verrà espresso come $CFU/g, ml \text{ or } 100cm^2 < \text{limite di concentrazione}$.

Nelle Schede Controllo Qualità sono riportati, **a titolo puramente indicativo**, i limiti generalmente accettati per la tipologia di campione in esame, desunti dalla normativa vigente.

3.4 Sterilizzazione post-analisi

Al termine dell'analisi, senza aprire la fiala, premere con forza la parte superiore del tappo ed agitare per circa 10 secondi. Dopo una decina di minuti il contenuto della fiala risulta completamente sterilizzato.



Nota Bene: l'aggiunta dello sterilizzante può causare un cambiamento di colore.

Nota Bene: dopo sterilizzazione, la fiala può essere smaltita come rifiuto avente codice CER 180107 [Rifiuti prodotti dal settore sanitario e veterinario o da attività di ricerca collegate (tranne rifiuti di cucina e di ristorazione non direttamente provenienti dal trattamento terapeutico) - Rifiuti dei reparti di maternità e rifiuti legati a diagnosi, trattamento e prevenzione delle malattie negli esseri umani - Sostanze chimiche diverse da quelle di cui alla voce 18 01 06] e classe di pericolosità HP4.

4 NOTE SULLE ANALISI MICROBIOLOGICHE

Alimenti con caratteristiche chimico-fisiche particolari (es: basso peso specifico, forte acidità/alcalinità, elevata viscosità, marcata colorazione...) potrebbero interferire con l'analisi in modalità caso-specifiche. Inoltre data l'intrinseca variabilità microbiologica di alcune matrici alimentari si consiglia di eseguire un'omogeneizzazione preliminare del campione. A tale scopo è necessario diluire 10 g di campione in 90 ml di diluente sterile

(acqua peptonata tamponata, acqua distillata, soluzione fisiologica etc.), omogeneizzare e successivamente procedere all'analisi su 1ml dell'omogenato.

Nota Bene: Per le analisi di tipo quantitativo è possibile risalire all'eventuale contaminazione iniziale del campione non diluito tenendo conto della diluizione effettuata, così come previsto anche dai metodi di riferimento (ISO 7218:2007).

Esempio 1

Alimento: Insalata

Tipologia di analisi: *Escherichia coli* (EC-L22), quantitativa

Fattore di diluizione: 10; diluendo 10 g di alimento in 90 ml di diluente

Risultato analisi: 1.43E02 CFU/g

Contaminazione effettiva: **1.43E03 CFU/g**, ovvero 1.43E02 x **10** (fattore di diluizione).

Anche per le analisi di tipo qualitativo il fattore di diluizione deve essere considerato nella scelta dei limiti di concentrazione e dei tempi di osservazione. Il limite di concentrazione da considerare deve essere valutato tenendo conto che il campione analizzato è 10 volte meno concentrato del campione non diluito. Il risultato finale dovrà essere comunque riferito al campione non diluito.

Esempio 2

Alimento: Insalata

Tipologia di analisi: Coliformi (CO-L02), qualitativa

Limite di concentrazione: 10³ CFU/g

Tempo di osservazione: 16,35 ore

Fattore di diluizione: 10; diluendo 10 g di alimento in 90 ml di diluente

Limite di concentrazione: 10² CFU/g = 10³ : 10

Tempo di osservazione: 20,50 ore

Risultato analisi: CFU/g > 10³ CFU/g o CFU/g <10³

Analogamente, prodotti contenenti additivi alimentari, come conservanti, regolatori di acidità, antiossidanti, emulsionanti, etc., potrebbero influenzare lo svolgimento

dell'analisi. Si dovrà, pertanto, cercare la soluzione più opportuna per ogni singolo caso, oppure si dovrà effettuare la diluizione del campione, come sopra riportato.

5 APPENDICE I – BRODO DI ARRICCHIMENTO SELETTIVO DI SALMONELLA

La presente procedura si applica per l'impiego congiunto della fiala di analisi SL-L06 – *Salmonella* spp. e del flacone ESL-A32 – *Preparato monodose per Brodo di Arricchimento selettivo di Salmonella*.

Per procedere con la fase di arricchimento di un campione alimentare sono necessari:

- un flacone di ESL-A32;
- un sacchetto di plastica sterile ad alta resistenza (es: sacchetti da stomacher), non fornito con il kit;
- soluzione fisiologica sterile (NaCl 0.9%), non fornita con il kit.

La procedura operativa da seguire è la seguente:

1. Sciogliere il contenuto di un flacone ESL-A32 in 225 ml di soluzione fisiologica sterile.
2. Pesare 25 g dell'alimento da analizzare in un sacchetto di plastica sterile ed aggiungere il brodo di arricchimento ricostituito.
3. Miscelare o omogeneizzare per circa 2 minuti; incubare a $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ per $18\text{ h} \pm 2\text{ h}$.
4. Inoculare 1 ml della coltura ottenuta nella fiala SL-L06, e proseguire l'analisi seguendo le istruzioni operative precedentemente descritte.

Dopo massimo 48 ore l'analisi è conclusa con 2 soli esiti possibili:

- viraggio al giallo della fiala di analisi, che indica la possibile **presenza** di *Salmonella* spp.;
- nessun viraggio, che indica l'**assenza** di *Salmonella* spp.

Nota Bene: qualora si riscontrasse la presenza di Salmonella spp., si consiglia di effettuare dei test di conferma, come previsto dalla ISO 6579:2008.