

## ANALISI DI LABORATORIO

Criteri microbiologici: linee guida, ricerca e controlli



Come noto, il regolamento (CE) 2073/2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari prescrive agli operatori del settore l'obbligo di provvedere affinché gli alimenti, sia in fase di produzione che di immissione sul mercato, siano conformi ai criteri rispettivamente di igiene del processo e di sicurezza ivi definiti.

Il 3 marzo 2016, la Conferenza Stato-Regioni ha sancito un'intesa che ha portato, in sostanza, ad un aggiornamento delle linee guida 2007 relative all'applicazione del provvedimento, elaborate per assicurare una gestione omogenea in ambito nazionale dei controlli sugli alimenti e sugli stabilimenti di prodotti alimentari.

Risale a marzo di quest'anno, invece, la revisione della norma ISO 6579-1, che descrive le modalità "ufficiali" di isolamento di *Salmonella* spp. Il documento cancella e sostituisce le precedenti ISO 6579:2002 e ISO 6785:2001, riguardanti rispettivamente la ricerca del patogeno negli alimenti e nel latte e suoi derivati.

L'isolamento, la conferma sierologica e la sierotipizzazione di *Salmonella* sono, dal punto di vista epidemiologico, solo il primo passo attraverso cui capire i meccanismi di contaminazione e di trasmissione dell'infezione. La caratterizzazione genotipica dei ceppi isolati è infatti fondamentale per comprendere come si diffondano e moltiplichino i ceppi circolanti di questo patogeno. L'Mlva (*Multiple Locus Variable-number Tandem Repeat Analysis*) e la Pfgc (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*) sono due esempi di metodiche molecolari ampiamente utilizzate a questo scopo.

E per saperne di più sui controlli microbiologici (e non solo) effettuati dal "mondo aziendale", abbiamo intervistato Giovanni Sorlini, responsabile Qualità, Sicurezza e Ambiente di Inalca. L'azienda, che fa parte del Gruppo Cremonini, produce e commercializza ogni anno oltre 500.000 tonnellate di carne, con 7.200 referenze di prodotto: un assortimento di carni bovine, fresche e surgelate, confezionate sottovuoto e in atmosfera protettiva, carni cotte ed elaborati pronti, carni in scatola e estratti di carne, oltre ad un'ampia gamma di sottoprodotti.

52

**CRITERI MICROBIOLOGICI.  
LE RESPONSABILITÀ** – Cristina La Corte

57

**ANALISI DI GLIFOSATE E PESTICIDI  
POLARI IN MATRICI ALIMENTARI  
MEDIANTE LC-MS/MS** – Waters

58

**SALMONELLA. METODI DI ANALISI UFFICIALI  
E NON** – Elena Ramon e Cristina Saccardin

61

**I LABORATORI E L'INNOVAZIONE  
NEI CRITERI MICROBIOLOGICI APPLICABILI  
AGLI ALIMENTI** – Tentamus Agriparadigma

63

**SICUREZZA DELLE CARNI.  
LA PAROLA A INALCA** – Emanuela Giorgi

67

**SISTEMI PER L'ANALISI DELL'ATP:  
COME INDIVIDUARE LA TECNOLOGIA  
DI FOTORILEVAZIONE OTTIMALE** – 3M Italia

68

**BIOGEST: COMPETENZA ED INNOVAZIONE  
A GARANZIA DELLA SICUREZZA  
ALIMENTARE** – Biogest

# Criteri microbiologici

## Le responsabilità

L'Intesa tra il Governo, le Regioni e le Province autonome del 3 marzo 2016

di *Cristina La Corte*

Avvocato ed Esperta di Legislazione degli alimenti

### **Cosa prevede l'aggiornamento delle linee guida del regolamento europeo 2073/2005**

**I**l regolamento (CE) 2073/2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari prescrive agli operatori del settore (Osa) l'obbligo di provvedere affinché gli alimenti, sia in fase di produzione che di immissione sul mercato, siano rispettivamente conformi ai criteri di igiene del processo ed ai criteri di sicurezza ivi definiti.

### **Criteri di sicurezza alimentare e di igiene di processo**

Ai fini del citato provvedimento, s'intende per:

- "criterio di sicurezza alimentare", un criterio che definisce l'accettabilità di un prodotto o di una partita di prodotti alimentari, applicabile ai prodotti immessi sul mercato (capitolo I, allegato I, del regolamento (CE) 2073/2005);
- "criterio di igiene del processo", un criterio

che definisce il funzionamento accettabile del processo di produzione. Questo criterio, che non si applica ai prodotti immessi sul mercato, fissa un valore indicativo di contaminazione al di sopra del quale sono necessarie misure correttive volte a mantenere l'igiene del processo di produzione in ottemperanza alla legislazione in materia di prodotti alimentari (capitolo II, allegato I, del regolamento (CE) 2073/2005).

Gli indicati parametri di sicurezza dovranno essere rispettati per l'intera durata del periodo di conservabilità del prodotto alimentare e, a tal fine e qualora necessario, gli operatori dovranno effettuare studi che comprendano sia prove che evidenze tratte dalla letteratura scientifica, che tengano conto della variabilità intrinseca in funzione del prodotto, dei microrganismi in questione e delle condizioni di lavorazione e conservazione.

**Un "criterio di sicurezza alimentare" definisce l'accettabilità di un prodotto o di una partita di prodotti alimentari, applicabile ai prodotti immessi sul mercato...**

Il mancato rispetto dei criteri di sicurezza alimentare di cui alla parte I dell'allegato I del regolamento (CE) 2073/2005, emergente da prove con risultati insoddisfacenti, deve portare l'operatore al ritiro o al richiamo dal mercato del prodotto o della partita che non si trovasse più sotto il suo controllo ai sensi dell'art. 19 del regolamento (CE) 178/2002, in quanto l'alimento sarebbe da considerarsi "a rischio". I prodotti già immessi sul mercato, e non ancora giunti a livello del dettaglio, possono essere sottoposti a un'ulteriore trasformazione mediante un processo che garantisca l'eliminazione del riscontrato pericolo.

Sempre in caso di risultati insoddisfacenti, l'operatore sarà inoltre tenuto ad adottare tutte le opportune misure correttive definite dal Piano di Autocontrollo aziendale, nonché ogni altra azione necessaria per proteggere la salute del consumatore.

### ...mentre un "criterio di igiene del processo" definisce il funzionamento accettabile del processo di produzione

La frequenza del campionamento può essere adattata alla natura dell'impresa, purché ciò non comprometta la sicurezza dei prodotti.

### Linee guida e aggiornamenti

Ciò premesso, l'esperienza acquisita in anni di applicazione del regolamento (CE) 2073/2005, così come le mutate condizioni e accresciute conoscenze in materia di tecnologia e microbiologia alimentare, hanno condotto alla necessità di procedere ad un aggiornamento delle originarie linee guida nazionali, confluite nel 2007 in un'intesa Stato-Regioni, in modo da assicurare una gestione omogenea in ambito nazionale dei controlli sugli alimenti e sugli stabilimenti di prodotti alimentari.

Pertanto, la Conferenza Stato-Regioni, il 3 marzo 2016, ha sancito una nuova intesa con-

cernente le «Linee guida relative all'applicazione del regolamento (CE) 2073/2005 e successive modifiche ed integrazioni sui criteri microbiologici applicabili agli alimenti». Tali linee guida altro non sono che un aggiornamento delle precedenti, dovuto alle successive modifiche dello stesso regolamento (CE) 2073/2005 che ne hanno in parte modificato ed in parte ampliato i contenuti.

Il documento non muta, tuttavia, i principi e le finalità del regolamento. In particolare, viene confermata la responsabilità principale degli Osa in relazione al raggiungimento degli obiettivi di sicurezza alimentare.

### Struttura

Le nuove Linee guida si compongono di 10 capitoli ed un allegato, a sua volta suddiviso in 3 capitoli, dal taglio decisamente tecnico:

- 1) Premessa.
- 2) Definizioni.
- 3) Criteri generali in materia di applicazione del regolamento (CE) 2073/2005.
- 4) Modalità di trasporto, conservazione e inizio analisi.
- 5) Indicazioni particolari sull'applicazione del regolamento (CE) 2073/2005.
  - 5.1) Campionamento ufficiale per la verifica del criterio di sicurezza *Listeria monocytogenes* in alimenti diversi da quelli destinati ai lattanti e a fini medici speciali.
  - 5.2) Matrice alimentari e/o determinazioni non contemplate dal regolamento (CE) 2073/2005.
  - 5.3) Modalità di applicazione del regolamento (CE) 2073/2005 negli stabilimenti di macellazione e di produzione di carni macinate, preparazioni di carne e carni separate meccanicamente.
  - 5.4) Ricerca di *Salmonella* spp su carcasse al macello: campionamento, analisi, interpretazione dei risultati
    - a) Campionamento e analisi per la ricerca di *Salmonella* sulle carcasse e in carni di pollame.
    - b) Campionamento e analisi per *Salmonella* spp. sulle carcasse di ungulati domestici (suini).
  - 5.5) Ricerca di *Salmonella* spp in carni di pollame nelle fasi successive al macello: campionamento, analisi, interpretazione dei risultati.
  - 6) Attività successive all'acquisizione degli esiti

degli esami di laboratorio.

7) Riduzione della frequenza di campionamento.

8) Attività di controllo ufficiale.

9) Laboratori di analisi.

10) Vigenza delle norme nazionali non in contrasto con i nuovi regolamenti.

- Allegato I

- Metodi per il campionamento non distruttivo di carcasse di ungulati tramite spugnette.

- Metodi per il campionamento non distruttivo di carcasse di ungulati tramite tamponi secchi e umidi.

- Criteri microbiologici applicabili agli alimenti di origine vegetale (campionamento e analisi per la ricerca di *Escherichia coli* *Stec* O157, O26, O111, O103, O145 E O104:H4 su germogli)

### Responsabilità

Come si può osservare già dalla struttura del testo, i vari microrganismi quali, ad esempio, *Listeria monocytogens* e *Salmonella* spp, sono valutati in relazione ai loro rischi specifici ed alla matrice alimentare di riferimento. È inoltre precisato che, considerato che per alcune matrici alimentari il regolamento (CE) 2073/2005 fa riferimento alle modalità di consumo, crude o cotte, le competenti autorità dovranno tener conto delle indicazioni fornite, a tal proposito, in etichetta nonché delle normali condizioni di utilizzo dell'alimento determinate anche in base alle consuetudini locali.

Senza pretesa di esaustività, le Linee guida, richiamando i criteri fondamentali posti alla base del regolamento (CE) 178/2002, precisano che la verifica del rispetto dei criteri di sicurezza applicabili agli alimenti durante tutta la loro *shelf-life* spetta, oltre che all'operatore, all'autorità competente, rappresentando uno strumento di monitoraggio sull'efficacia dei sistemi di autocontrollo aziendale e di verifica della conformità dei prodotti agli standard di sicurezza richiesti dalla vigente normativa comunitaria.

Le autorità competenti, inoltre, verificano le misure attuate dagli Osa a seguito del rilievo di una non conformità ai criteri microbiologici di cui al capitolo I dell'allegato I del regolamento (CE) 2073/2005, accertando, in particolare, il sollecito e capillare ritiro dei prodotti già immessi sul mercato e, se del caso, l'efficacia dei trattamenti ai quali sono sottoposti gli alimenti.

## La verifica del rispetto dei criteri di sicurezza applicabili agli alimenti durante tutta la loro *shelf-life* spetta, oltre che all'Osa, all'autorità competente

Per quel che concerne i criteri di igiene del processo di cui al capitolo II dell'allegato I del regolamento (CE) 2073/2005, essi hanno l'obiettivo di fornire indicazioni agli operatori economici circa la correttezza e l'efficacia dei processi posti sotto il loro controllo. Il mancato rispetto degli stessi deve spingere l'operatore economico ad adottare le necessarie azioni correttive al fine di riportare il processo a regime.

### Controlli ufficiali

Il controllo ufficiale sul rispetto dei criteri di igiene di processo può essere attuato mediante campionamento ed analisi nonché tramite la verifica del corretto operato degli Osa.

Qualora tali verifiche dovessero dare esito non soddisfacente, le modalità di controllo analitico da parte dell'autorità competente dovranno rispettare i criteri di campionamento, analisi e interpretazione dei risultati stabiliti dagli stessi criteri di igiene del processo.

Il superamento dei limiti previsti dall'allegato I, capitolo II, del regolamento (CE) 2073/2005 non comporta di per sé l'erogazione di sanzioni, ma l'Osa dovrà essere invitato, in prima istanza, a rivalutare le proprie procedure al fine di assicurare il raggiungimento degli obiettivi di igiene e sicurezza degli alimenti.

Nel caso di ripetute non conformità ai criteri di igiene di processo, tenuto conto della natura delle stesse, delle caratteristiche del prodotto e del processo e dei dati precedenti relativi all'operatore per quanto riguarda la riscontrata non conformità, l'autorità competente interviene per assicurare che sia posto rimedio alla situazione. Diversamente da quanto previsto in relazione al mancato rispetto dei criteri di sicurezza, per gli alimenti ottenuti presso uno stabilimento per il quale sia stato riscontrato il mancato rispetto dei criteri di igiene di processo non è prevista l'atti-

## Valutazione dei requisiti di sicurezza degli alimenti contaminati da *Escherichia coli* *Stec*, nota ministeriale

Il Ministero della Salute, al fine di una corretta gestione del pericolo rappresentato dalla presenza generica di *Escherichia coli* verocitotossico (*Stec*) e dei suoi particolari sierotipi negli alimenti e per poter dare indicazioni immediate alle autorità competenti al fine di valutare correttamente i referti analitici dei campionamenti ufficiali per *Escherichia coli* *Stec*, ha emesso la nota prot. n. Digisan 0030360-P del 21 luglio 2017, avente ad oggetto "*Escherichia coli* *Stec*: applicazione dell'articolo 14 del regolamento (CE) 178/2002"<sup>1</sup>.

Tale nota riporta le indicazioni fornite dalla bozza delle linee guida "*Draft guidance document on the application of article 14 of regulation (EC) 178/2002 as regards food contaminated with shiga toxin-producing Escherichia coli* *Stec*"<sup>2</sup> (discusse da tempo in sede di Commissione europea, ma non ancora approvate) ed il parere richiesto all'Istituto superiore di Sanità (già laboratorio di riferimento europeo per *E. coli*, compresi i *Stec*), che il Ministero della Salute ritiene possano fornire una guida valida da utilizzare nella gestione della problematica.

L'Istituto superiore di Sanità ha formulato una serie di osservazioni al fine di facilitare l'interpretazione dei risultati analitici relativi alla ricerca di *Escherichia coli* *Stec*, le quali confermano la linea di azione già adottata dalla Regione Piemonte nel 2013 con le "Indicazioni operative per l'interpretazione dei rapporti di laboratorio a seguito di analisi per la ricerca di *Escherichia coli* *Vtec* su alimenti ed in animali destinati alla produzione di alimenti e provvedimenti da adottare a seguito di non conformità"<sup>3</sup>.

In seguito alle analisi per la ricerca di *Escherichia coli* *Stec* sugli alimenti, può accadere che vi sia una positività alle fasi di screening in Pcr per i geni *stx* e/o *eae* e/o per i geni di sierogruppo OXX, ma la contestuale assenza di isolamento culturale del ceppo *Escherichia coli* *Stec*. Questo può avvenire per una serie di ragioni elencate nel documento dell'Iss.

La bozza di Linee guida della Commissione europea sull'applicazione dell'articolo 14 del regolamento (CE) 178/2002 alla gestione del rischio per *Stec* definisce chiaramente che non dovrebbero essere prese in considerazione le positività presunte o presuntive per *Stec* ai fini dell'applicazione di misure restrittive, ma solamente le positività con isolamento del ceppo di *Escherichia coli* recante almeno i geni codificanti le Shiga tossine (*Stx*).

Le azioni correttive da intraprendere, distinte sulla base del profilo di rischio dell'alimento identificato come contaminato da *Stec*, dovrebbero essere attuate:

- per gli alimenti con rischio alto (profilo 1 - alimenti pronti al consumo o alimenti frequentemente o usualmente consumati senza un trattamento in grado di eliminare o ridurre il rischio di infezione da *STEC*): in presenza di un'evidenza di contaminazione da *Stec*, indipendentemente dal sierogruppo o dalla presenza del gene *eae* (isolato di *Escherichia coli* con i geni *Stx*);
- per gli alimenti con rischio basso (profilo 2 - alimenti destinati a cottura o ad altro trattamento in grado di eliminare o ridurre il rischio di infezione da *Stec* e per i quali sia data al consumatore una chiara informazione in questo senso): in presenza di un ceppo *Stec* isolato e appartenente ai principali sierogruppi *Stec* (O157, O111, O103, O145, O26, O104).

L'Iss reputa che tale approccio possa contribuire a ridurre le possibilità di contenzioso legale dovute a positività presuntive di *Stec* negli alimenti, non considerate sufficienti per l'adozione di misure correttive.

(Fonte: CeIRSA)

<sup>1</sup> Vedi [http://www.ceirsa.org/fd.php?path=201708/Nota\\_DGISAN\\_30360\\_del\\_21.07.2017\\_STEC.pdf](http://www.ceirsa.org/fd.php?path=201708/Nota_DGISAN_30360_del_21.07.2017_STEC.pdf)

<sup>2</sup> Vedi [http://www.ceirsa.org/fd.php?path=201708/draft\\_e.coli\\_STEC\\_EC.pdf](http://www.ceirsa.org/fd.php?path=201708/draft_e.coli_STEC_EC.pdf)

<sup>3</sup> Vedi <http://www.ceirsa.org/leggitutto.php?idrif=606>





vazione delle procedure di ritiro o richiamo del prodotto dal mercato. È pertanto opportuno che l'attività di controllo ufficiale svolta nel corso del processo produttivo sia rivolta in via principale alla verifica del rispetto dei criteri di igiene del processo e che il controllo svolto alla fine del processo di produzione o in fase di distribuzione sia indirizzato alla verifica del rispetto dei criteri di sicurezza.

**È opportuno che l'attività di controllo ufficiale svolta nel corso del processo produttivo sia rivolta in via principale alla verifica del rispetto dei criteri di igiene del processo...**

Per quanto riguarda i controlli ufficiali, il regolamento (CE) 2073/2005 prevede che gli Stati membri provvedano affinché siano eseguiti periodicamente in base ad una valutazione dei rischi e con frequenza appropriata. Tali controlli devono essere eseguiti in fasi opportune della produzione, della trasformazione e della distri-

buzione degli alimenti, per garantire che gli operatori del settore rispettino i criteri stabiliti dalla normativa.

Il regolamento (CE) 882/2004, a cui fa riferimento il regolamento (CE) 2073/2005, è stato recentemente abrogato e sostituito dal regolamento (UE) 2017/625 «relativo ai controlli ufficiali e alle altre attività ufficiali effettuati per garantire l'applicazione della legislazione sugli alimenti e sui mangimi, delle norme sulla salute e sul benessere degli animali, sulla sanità delle piante nonché sui prodotti fitosanitari».

L'obiettivo cui mira il nuovo regolamento è quello di stabilire un quadro armonizzato per l'organizzazione dei controlli ufficiali, tenendo conto delle norme del regolamento (CE) 882/2004 e della legislazione settoriale nonché dell'esperienza acquisita con l'applicazione di tali norme.

**...e che il controllo svolto alla fine del processo di produzione o in fase di distribuzione sia indirizzato alla verifica del rispetto dei criteri di sicurezza**



Il controllo ufficiale sul rispetto dei criteri di igiene di processo può essere attuato mediante campionamento ed analisi nonché tramite la verifica del corretto operato degli Osa.

# **Salmonella**

## Metodi di analisi ufficiali e non

Isolamento, sierotipizzazione e caratterizzazione negli alimenti

di *Elena Ramon e Cristina Saccardin*

Laboratorio di riferimento Oie per la salmonellosi, Izs delle Venezie

**Dall'aggiornamento della ISO 6579 ai nuovi metodi per la caratterizzazione di Salmonella nei prodotti alimentari**

58

**A** marzo 2017 è stata pubblicata la revisione della norma ISO 6579-1, che descrive le modalità di isolamento di *Salmonella* spp.. Questo documento cancella e sostituisce le precedenti ISO 6579:2002 e ISO 6785:2001, riguardanti rispettivamente la ricerca di *Salmonella* negli alimenti e nel latte e suoi derivati.

### **L'aggiornamento della ISO 6579**

La norma ISO 6579 comprende anche la parte 2 ovvero il metodo che descrive la conta di *Salmonella* tramite Mpn (*Most Probable Number Repeat*) (ISO TS 6579-2), pubblicato nel 2012, e la parte 3, ovvero il metodo che descrive come sierotipizzare ceppi di *Salmonella* spp. (ISO TR 6579-3:2015).

Nella nuova versione della ISO 6579-1:2017, ol-

tre alle modifiche tecniche apportate al metodo, sono stati inclusi i campioni provenienti dalla produzione primaria, la cui procedura di isolamento era prima descritta nell'*Amendement 1* (Annex D) della stessa ISO. Questa descrive, quindi, il metodo per la ricerca di *Salmonella* spp. in prodotti destinati al consumo umano ed animale, in campioni ambientali eseguiti in aree destinate alla produzione e manipolazione alimentare e in quelli provenienti dalla produzione primaria, come feci, polveri e tamponi.

L'isolamento di ceppi di *Salmonella* responsabili delle forme tifoidee *S. Typhi* e *S. Paratyphi* è ora dettagliato nell'Annex D del nuovo documento. Le modifiche apportate alla nuova versione del testo hanno lo scopo di semplificare il metodo e dare la possibilità di ridurre i tempi di esecuzione e la relativa refertazione delle analisi.

**Le modifiche apportate alla nuova versione della ISO 6579 hanno lo scopo di semplificare il metodo analitico e dare la possibilità di ridurre i tempi di esecuzione e la relativa refertazione delle analisi**

Dal punto di vista tecnico, le modifiche più importanti sono la possibilità di estendere la temperatura di incubazione del prearricchimento dei campioni da 37 °C ad un intervallo che va dai 34 °C ai 38 °C e la possibilità di sostituire, anche per gli alimenti, il brodo di pre-arricchimento selettivo Rvb (*Rappaport Vassiliadis*) con il terreno semisolido MrsV (*Rappaport Vassiliadis Semi-solid medium Modified*).

L'utilizzo del terreno liquido Rvb richiederebbe per tutti i campioni la successiva semina nei terreni di crescita selettivi. La crescita o meno dopo ventiquattro ore di colonie con forma tipica in questi terreni stabilisce la presunta positività o negatività del campione in esame. Viceversa, il terreno semisolido MrsV permette di seminare nei terreni di crescita selettivi solo i campioni che presentano un aspetto del terreno di tipica "presunta positività". In particolare, i campioni contaminati da *Salmonella* mostrano, su terreno MrsV, un caratteristico alone di crescita grigio-biancastro attorno al punto di inoculo del campione prearricchito. L'utilizzo di quest'ultimo terreno comporta, dunque, un risparmio per la riduzione dei reagenti utilizzati (terreni selettivi) e dei tempi di esecuzione richiesti per la semina di più piastre per singolo campione. La presunta positività del campione viene pertanto rilevata in tempi più brevi (circa 2-3 giorni contro 4-5), permettendo una risposta più rapida.

Modifiche di minore rilevanza previste nel nuovo aggiornamento della ISO sono l'eliminazione di una prova biochimica (VP, *Voges Proskauer*) e l'opzionalità di altre due prove biochimiche (B galattosidasi e indolo). Per confermare la presenza di *Salmonella* spp., inoltre, è possibile ora testare un'unica colonia sospetta invece che più colonie provenienti da ogni terreno selettivo utilizzato. L'esecuzione delle prove biochimiche può essere poi effettuata direttamente da colonie ben isolate presenti nel terreno selettivo.

## Nuovi metodi di analisi

L'isolamento, la conferma sierologica e la sierotipizzazione di *Salmonella* sono, dal punto di vista epidemiologico, solo il primo passo attraverso cui capire i meccanismi di contaminazio-

ne e di trasmissione dell'infezione. La caratterizzazione genotipica dei ceppi isolati è infatti fondamentale per comprendere come si diffondono e moltiplichino i ceppi circolanti di *Salmonella*.

L'Mlva (*Multiple Locus Variable-number Tandem Repeat Analysis*) e la Pfgc (*Pulsed Field Gel Electrophoresis*) sono due esempi di metodiche molecolari ampiamente utilizzate a questo scopo.

## La Pfgc

La Pfgc è una metodica di vecchia data ancor oggi usata poiché considerata il "gold standard" per la caratterizzazione molecolare di *Salmonella*.

I batteri come *Salmonella* si moltiplicano per scissione binaria e quando la cellula madre si divide le due cellule figlie acquisiscono lo stesso corredo genetico della madre. Con il trascorrere del tempo e delle generazioni, però, i batteri cominciano ad accumulare mutazioni nel loro corredo genetico. L'accumulo di queste mutazioni porterà alla progressiva diversificazione del genoma delle cellule figlie rispetto a quello della cellula madre di origine.

Il principio su cui si basa la Pfgc sfrutta proprio questa caratteristica, ovvero che un ceppo di *Salmonella* derivato da uno stesso progenitore abbia un corredo genetico uguale, ma leggermente diverso rispetto a ceppi di *Salmonella* dello stesso sierotipo provenienti da fonti differenti.

L'utilizzo di questa metodica permette, quindi, di correlare casi di malattia simili fra loro all'interno di una tossinfezione alimentare e tra tossinfezioni avvenute in ambiti geografici e temporali diversi.

**La metodica Pfgc permette di correlare casi di malattia simili fra loro all'interno di una tossinfezione alimentare e tra tossinfezioni avvenute in ambiti geografici e temporali diversi**



## Gli svantaggi principali della metodica Pfgc sono la complessità dell'esecuzione e il tempo necessario per ottenere un risultato

La Pfgc si basa sull'estrazione del Dna genomico e il suo successivo taglio "controllato" da parte di complessi proteici detti enzimi di restrizione. La caratteristica principale di questi enzimi di restrizione è la loro specificità di taglio; ogni enzima, infatti, può tagliare il Dna genomico solo quando riconosce una sequenza nucleotidica specifica e peculiare per i diversi enzimi. L'utilizzo di uno o più di questi enzimi sul genoma di *Salmonella* produce una serie di frammenti genomici il cui numero e la cui grandezza possono essere confrontati tra i diversi ceppi. Il confronto dei genomi stabilirà il grado di correlazione esistente tra i diversi ceppi.

Gli svantaggi principali di questa metodica sono la complessità dell'esecuzione e il tempo necessario per ottenere un risultato, che può variare da tre a sette giorni. A questo proposito, negli ultimi anni si stanno sviluppando nuove metodiche più semplici e veloci che permettono comunque di caratterizzare con un alto grado di discriminazione ceppi differenti di *Salmonella*.

### L'Mlva

L'Mlva è una di queste nuove metodiche. Il principio si basa sulla misura della variabilità del numero di Vntr ovvero di sequenze geniche ripetute presenti in numero variabile in specifiche regioni del genoma di *Salmonella*. Al momento, una procedura condivisa e standardizzata è disponibile solo per i ceppi di *Salmonella* Typhimurium, la sua variante monofasica e per *Salmonella* Enteritidis, tra i sierotipi epidemiologicamente più rilevanti.

La metodica dell'Mlva prevede l'utilizzo della tecnica di Pcr per l'amplificazione, ovvero la

moltiplicazione dei diversi Vntr presenti nel corredo genetico di *Salmonella*. L'amplificazione viene effettuata utilizzando *primers* marcati, ovvero piccoli frammenti di Dna marcati con particolari fluorofori, specifici per ciascun Vntr esaminato. Lo studio della sequenza genica degli amplificati ottenuti permette di conoscere la variabilità numerica di ciascun Vntr presente nel campione analizzato. Con l'ausilio, poi, di specifici software, ad ogni campione viene così associato un nome, che altro non è che una sequenza di numeri indicanti il numero di ripetizioni presenti per ciascun Vntr analizzato. Anche per questa metodica vale il principio per cui più divisioni sono avvenute a partire dalla cellula madre più sono le probabilità che siano avvenute mutazioni nel corredo cromosomico delle cellule figlie e, quindi, anche nel numero delle ripetizioni dei Vntr presenti nei diversi loci di *Salmonella*.

Per una determinata selezione di Vntr l'analisi del numero di copie rivela, pertanto, le relazioni esistenti tra ceppi di *Salmonella* con identico sierotipo.

A differenza della Pfgc, questa metodica risulta più veloce, economica e di più semplice applicazione; per tale motivo molti laboratori si stanno in questi anni attrezzando per poter eseguire anche questa analisi di subtipizzazione molecolare.

## Rispetto alla Pfgc, la metodica Mlva è più veloce, economica e applicabile con maggior facilità

La tecnica dell'Mlva viene routinariamente utilizzata per la caratterizzazione molecolare dei ceppi di *Salmonella* isolati negli alimenti o come tecnica complementare alla Pfgc negli studi di tossinfezione alimentare, per consentire di differenziare ceppi di *Salmonella* che presentano profili simili in Pfgc.

# Sicurezza delle carni

## La parola a Inalca

Controlli microbiologici, strumentazione e formazione del personale

di *Emanuela Giorgi*  
Coordinatrice redazionale

### **Intervista a Giovanni Sorlini, responsabile Qualità, Sicurezza e Ambiente dell'azienda**

Inalca, società del Gruppo Cremonini, produce e commercializza ogni anno oltre 500.000 tonnellate di carne, con 7.200 referenze di prodotto: un assortimento completo di carni bovine, fresche e surgelate, confezionate sottovuoto e in atmosfera protettiva, carni cotte ed elaborati pronti, carni in scatola e estratti di carne, oltre ad un'ampia gamma di sottoprodotti. Giovanni Sorlini è il responsabile Qualità, Sicurezza e Ambiente dell'azienda.

**• Dott. Sorlini, a quali controlli microbiologici sono sottoposte le carni che entrano nel circuito produttivo di Inalca?**

Inalca ha un proprio laboratorio interno di analisi accreditato che effettua oltre 100.000 analisi all'anno, di cui circa 60.000 microbiologiche. Oltre alle analisi richieste da alcune norme specifiche, come ad esempio il regolamento (CE) 2073/2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari, che si applicano al controllo della sicurezza alimentare del processo produttivo,



Giovanni Sorlini, responsabile Qualità, Sicurezza e Ambiente di Inalca.

vo, l'azienda attua specifici Piani di Autocontrollo igienico su tutte le carni ed altri prodotti alimentari che immette sul mercato.

I principali parametri ricercati sono: carica mesofila totale, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Enterobacteriaceae*, *Campilobacter*, Clostridi solfito riduttori, Lattobacilli, *Pseudomonas*.

**• Di quali tecniche e strumenti di analisi si avvale Inalca per effettuare i controlli microbiologici sulle carni? Ve ne sono alcuni particolarmente innovativi utilizzati dall'azienda?**



Il laboratorio interno di Inalca dispone di strumenti di analisi di biologia molecolare PCR Real time di ultima generazione, con tecniche specifiche e rapide per la ricerca di germi patogeni.

Il laboratorio interno di Inalca dispone di strumenti di analisi tecniche di biologia molecolare PCR Real time di ultima generazione, con tecniche specifiche e rapide per la ricerca di germi patogeni.

Oltre all'affidabilità del metodo, la rapidità di risposta è sicuramente uno degli aspetti più importanti, soprattutto nei casi in cui la singola analisi è legata alla liberazione del lotto prima della distribuzione al consumo.

**Inalca ha un proprio laboratorio interno accreditato, che effettua oltre 100.000 analisi ogni anno, di cui circa 60.000 microbiologiche**

• **Quali sono i principali punti critici di controllo cui presta attenzione l'azienda, a tutela della sicurezza microbiologica delle carni?**

Il sistema interno di autocontrollo si basa su studi di analisi del rischio e controlli dei punti critici del processo produttivo (Haccp), specifici per ciascuna tipologia di prodotto. Un elemento rilevante è costituito dal rigoroso controllo della catena del freddo, sia delle materie prime che dei semilavorati e dei prodotti finiti. Freschezza delle materie prime e rapidità del processo produttivo in adeguate condizioni di temperatura evitano le proliferazioni microbiologiche e costituiscono il primo elemento per la qualità e la sicurezza alimentare dei prodotti.

Non solo freddo, ma anche caldo: Inalca produce, infatti, anche carni in scatola sottoposte a sterilizzazione in autoclave, che ne permettono una conservazione di lungo periodo grazie al totale abbattimento della carica microbica.

• **Quale tipologia di prodotto richiede le maggiori attenzioni (carne fresca, surgelata, in scatola, confezionata sottovuoto e in atmosfera protettiva, elaborati pronti) dal punto di vista della sicurezza microbiologica?**

Ogni prodotto ha il suo specifico sistema di controllo. Nel caso dei prodotti refrigerati e surgelati le caratteristiche igieniche delle materie prime e la gestione della catena del freddo sono i fattori principali. Particolare attenzione è richiesta dalle carni macinate che, per le loro caratteristiche intrinseche dovute al processo di lavorazione, rappresentano un prodotto particolarmente sensibile sotto il profilo microbiologico.

Proprio per questo motivo i piani di controllo di questa categoria rappresentano la quota più significativa di analisi di laboratorio.

Nel caso dei prodotti sottoposti a trattamenti termici, la verifica costante delle condizioni tecniche legate a questo processo sono fondamentali. In queste situazioni si devono gestire in modo combinato catena del freddo e del caldo.

- **Nel caso in cui un campione di carne risulti positivo, qual è la procedura che adotta l'azienda?**

Inalca dispone di un sistema di liberazione attiva dei prodotti finiti da definire preventivamente le azioni da intraprendere in caso di analisi non favorevole. Nel caso in cui un prodotto risulti non conforme per parametri legati alla sicurezza alimentare, si procede alla segregazione dello stesso, esclusione dall'utilizzo e successivamente alla sua distruzione; ove possibile, il prodotto viene recuperato mediante trattamento termico di pastorizzazione o sterilizzazione. In questi casi, oltre alla gestione diretta del prodotto, si effettua sistematicamente l'analisi delle cause che hanno portato all'insorgenza di tale non conformità.

## Le carni macinate sono un prodotto particolarmente sensibile sotto il profilo microbiologico

- **Inalca importa anche carne dall'estero. A cosa si deve questa scelta? Sulla base di quali criteri vengono selezionati i fornitori? Che tipo di analisi vengono effettuate sulla carne importata?**

Inalca è un'azienda globalizzata che si approvvigiona in tutti i principali mercati della carne bovina, ognuno dei quali produce tipologie di prodotto specifiche per determinati segmenti di mercato: grande distribuzione organizzata, Ho.Re.Ca., industria di trasformazione richiedono, infatti, prodotti con diverse caratteristiche qualitative. Inoltre, l'Italia da molti anni non è autosufficiente nella produzione di carni e una quota significativa deve essere importata per le esigenze del mercato. Inalca dispone di procedure specifiche per la validazione iniziale ed il monitoraggio periodico dei propri fornitori, che comprendono controlli sistematici sulla merce acquistata all'arrivo negli stabilimenti, con analisi microbiologiche e verifiche ispettive in campo per il controllo dell'applicazione delle buone prassi igieniche di lavorazione. La validazione iniziale



Inalca opera in Italia attraverso una struttura produttiva costituita da 12 stabilimenti specializzati per linee di lavorazione.

del fornitore prevede la raccolta preliminare di informazioni generali, la sottoscrizione di capitolati tecnici e del codice etico aziendale. In altre parole, un preciso impegno a produrre secondo gli standard definiti da Inalca, nel campo tecnico e secondo i principi di correttezza, trasparenza e lealtà nelle pratiche commerciali e produttive.

- **Inalca è anche un'azienda esportatrice. Quali tecniche di igiene e prevenzione dei rischi adottate nei Paesi in cui esporta i propri prodotti (Federazione Russa, Usa, Canada, Giappone, per citarne alcuni) e particolarmente virtuose "ha fatto proprie"?**

Inalca esporta in tutti i maggiori mercati internazionali e deve sapersi adeguare alle regole locali ed ai rispettivi standard di sicurezza alimentare. Nel caso di Paesi con metodi di controllo igienico-sanitario differenti rispetto a quelli europei, l'azienda ha acquisito e fatto propri nel suo sistema di gestione i vari requisiti, integrandoli nelle procedure aziendali. Attualmente, oltre a quello comunitario, i principali Paesi di esportazione di Inalca richiedono l'applicazione delle norme Usa, come ad esempio l'applicazione dello standard "Ssop" (*Sanitary Standard Operation Procedure*). È il caso di importanti mercati per Inalca, come quello canadese, giapponese e degli Stati panamericani in genere.



- **Il personale addetto ai controlli analitici a quali corsi di formazione viene fatto partecipare?**

Da quanto emerso sopra, penso si capisca che la nostra direzione Sicurezza, Qualità e Ambiente è fortemente presidiata e ovviamente le attività di formazione occupano un ruolo di primo piano. Tutto il personale addetto ai controlli analitici – una squadra di circa 50 persone – possiede titoli di studio in campo scientifico e viene sottoposto ad un percorso di formazione specifico sotto la diretta supervisione del responsabile di laboratorio.

**Tutto il personale addetto ai controlli analitici viene sottoposto ad un percorso di formazione specifico, sotto la diretta supervisione del responsabile di laboratorio**

Vengono inoltre organizzate giornate di partecipazione a convegni, corsi di aggiornamento

e collaborazioni con altri laboratori esterni accreditati, oltre al costante aggiornamento tecnico normativo.

- **Di quali standard di certificazione si avvale l'azienda a garanzia della sicurezza delle proprie carni?**

Inalca è conforme ai principali standard internazionali di sicurezza alimentare ed è sottoposta annualmente a verifiche ispettive da parte di enti terzi indipendenti. I principali standard adottati sono: Ifs, ISO 22000 e ISO 9001 nel campo della qualità e sicurezza alimentare; a questi si aggiungono quelli in campo ambientale e di sicurezza del lavoro.

A tali ispezioni di terza parte si sommano quelle effettuate direttamente da Inalca (verifiche di prima parte) o da parte dei clienti con loro standard specifici (verifiche di seconda parte) ed, infine, le altre verifiche ispettive esterne effettuate dalle varie autorità ufficiali competenti.

Per dare un'idea del numero, se sommiamo le varie tipologie di ispezioni o audit effettuati o ricevuti da Inalca, ogni giorno almeno uno stabilimento subisce un controllo ispettivo.



©shutterstock.com

Per curare la formazione del proprio personale, Inalca organizza giornate di partecipazione a convegni, corsi di aggiornamento e collaborazioni con altri laboratori esterni accreditati.