

## PROVE INTRA E INTERLABORATORIO (PIVRAM)

Paolo Aureli

Laboratorio Alimenti- Istituto Superiore di Sanità

### Introduzione

Il recepimento delle direttive comunitarie nel settore della tutela igienico-sanitaria degli alimenti sta modificando in maniera sostanziale il sistema di valutazione dei prodotti alimentari attualmente in uso. In sintesi, per effetto delle direttive indicate in Tab. 1 i produttori di alimenti sono obbligati ad attuare un autocontrollo avvalendosi dei principi su cui si basa il sistema HACCP e sono incoraggiati a predisporre l'elaborazione di manuali in materia di corretta prassi igienica (Direttiva Igiene 93/43/CEE del 14 giugno 1993; Ministero della Sanità, Circolare n.21 del 26 luglio 1996). Anche l'autorità incaricata del controllo ufficiale deve provvedere alla sua esecuzione sulla base dei principi informativi del sistema HACCP per assicurare che le imprese produttrici non eludano l'autocontrollo o non lo applichino in maniera corretta (D.L. 3 marzo 1993 n.123 art. 1 e 2).

**Tabella 1** Norme che regolano la produzione e la commercializzazione delle derrate alimentari.

NORME ORIZZONTALI	NORME VERTICALI
<p><i>Direttiva 93/43/CEE - Igiene dei prodotti alimentari</i></p>	<p><i>DPR n° 227 del 1 marzo 1992 - Regolamento di attuazione della direttiva 88/657/CEE che fissa i requisiti relativi alla produzione e agli scambi di carni macinate, della carne di peso inferiore a 100 grammi e delle carni preparate</i></p>
<p><i>D.L. n°123 del 3 marzo 1993 - Attuazione della direttiva 89/397/CEE relativa al controllo ufficiale dei prodotti alimentari</i></p>	<p><i>D.L. n°530 del 30 dicembre 1992 - Attuazione della direttiva 91/492/CEE che stabilisce le norme sanitarie applicabili alla produzione e commercializzazione dei molluschi bivalvi vivi</i></p>
	<p><i>D.L. n° 531 del 30 dicembre 1992 - Attuazione della direttiva 91/493/CEE concernente le norme sanitarie applicabili alla produzione e commercializzazione dei prodotti della pesca</i></p>
	<p><i>D.L. n° 531 del 30 dicembre 1992 - Attuazione della direttiva 92/5/CEE che modifica e aggiorna la direttiva 77/99/CEE relativa ai problemi sanitarie in materia di scambi intracomunitari di prodotti a base di carne e modifica la direttiva 64/433/CEE</i></p>
	<p><i>D.L. n° 65 del 4 febbraio 1993 -Attuazione delle direttiva 89/437/CEE concernente i problemi igienici e sanitari relativi alla produzione ed immissione sul mercato degli ovoprodotti</i></p>
	<p><i>Direttiva 92/46/CEE che stabilisce le norme sanitarie per la produzione e la commercializzazione di latte crudo ,di latte trattato termicamente e di prodotti a base di latte</i></p>

Per la verifica della conformità delle derrate alimentari alle direttive, i laboratori incaricati del controllo ufficiale devono, se possibile, utilizzare metodi di analisi convalidati (Direttiva del Consiglio 93/99/CEE del 29 ottobre 1993). A questo scopo ciascun Paese dell'Unione può servirsi di metodi provati e scientificamente validi assicurandone la convalida (ufficializzazione dei metodi). Questa libertà di scelta che le Autorità Comunitarie concedono ai Paesi Membri è comunque vincolata al fatto che i metodi non devono essere di ostacolo alla libera circolazione dei prodotti riconosciuti conformi alla regolamentazione in applicazione di modalità o, qualora emanati, di metodi comunitari (Direttiva del Consiglio 85/591/CEE del 20 dicembre 1985 art 2). E' indispensabile, poi, che i metodi ufficiali di ciascun Paese siano, ove possibile, conformi ai criteri previsti ai paragrafi 1 e 2 dell'allegato alla Direttiva del Consiglio 85/591/CEE. Non mi soffermerò sui metodi di analisi e sui problemi ad essi connessi, specialmente su quelli legati alla possibilità di adottare nell'autocontrollo i metodi rapidi alternativi a quelli ufficiali, in quanto verranno sviluppati in altri interventi; tuttavia, vorrei approfittare di questa circostanza per richiamare l'attenzione su un aspetto di base legato alla convalida dei metodi di analisi. E' tradizione che la fissazione di un metodo di analisi passi attraverso l'adempimento di precisi atti tecnico-amministrativi che si concludono con la emanazione della norma relativa. Questa impostazione è oggetto di numerose e recenti critiche soprattutto perché non consente all'analista di scegliere e, di conseguenza, lo obbliga ad utilizzare in determinate circostanze un metodo non completamente appropriato; non gli consente di poter utilizzare metodologie avanzate, specialmente se il metodo "ufficiale" è datato; ed, infine, non gli permette di poter ricorrere all'automazione. Proprio per superare le limitazioni insite nel metodo di analisi ufficiale, sarebbe, invece, opportuno che le autorità preposte allo studio ed emanazione di metodi ufficiali considerassero la possibilità di normare il complesso dei "criteri" ai quale i metodi dovrebbero soddisfare. I vantaggi di questo approccio sono a mio avviso evidenti: si eliminerebbero le lungaggini dell'ufficializzazione dei vari tipi di metodi finalizzati ad uno stesso scopo e nel contempo si assicurerebbe la continua attualità del metodo utilizzato. Questa impostazione ha già trovato una concreta applicazione nelle "United Kingdom Regulations" dove viene fissato un limite per le aflatoxine nelle nocciole, fichi e derivati (1991) senza che sia specificato un particolare metodo di analisi da utilizzare per quantificarlo; tuttavia, viene indicato un set di caratteristiche analitiche (Tab. 2), così qualunque sia il metodo utilizzato dall'analista per verificare la conformità dell'alimento alle disposizioni di legge, esso dovrà comunque soddisfare le performances stabilite.

**Tabella 2** *United Kingdom Regulations: The Aflatoxins in Nuts, Nuts products, Dried Figs and Dried Fig Products Regulations, 1991*

Limite di legge	4 $\mu$ /kg
Limite di rilevabilità	$\leq$ 2 $\mu$ /kg
Ripetibilità (Coefficiente di variazione)	$\leq$ 40%
Riproducibilità (Coefficiente di variazione)	$\leq$ 60%
Recupero	$\geq$ 70 %

Dopo questa digressione sui metodi, riprenderò il discorso sui cambiamenti in atto nel sistema di valutazione degli alimenti per richiamare l'attenzione su un ultimo aspetto che scaturisce dalle modifiche imposte dalle norme comunitarie. Infatti, per garantire la qualità dei risultati i laboratori incaricati di effettuare i controlli ufficiali delle derrate alimentari devono essere conformi entro il 1 novembre 1998 ai criteri stabiliti dalla norma europea EN 45001 e alle procedure operative standard (POS) previste nei capitoli 3 ed 8 dell'allegato II al decreto legislativo 27 gennaio 1992 n. 120 e debbono essere sottoposti a verifiche casuali da parte di personale responsabile dei controlli di qualità al fine di valutarne la conformità ai principi OCSE 2 e 7 che disciplinano la buona prassi di laboratorio.

Questi obblighi riguardano anche i laboratori cui l'azienda alimentare affida l'autocontrollo: essi, infatti, devono essere riconosciuti dal Ministero della Sanità, che allo stato attuale ne prevede l'inserimento in uno speciale elenco solo sulla base di una autocertificazione di conformità alla norma europea EN 45001 e alle POS.

La complessità delle trasformazioni in atto per effetto di quanto sopra riportato può giustificare la loro incompleta realizzazione tanto più che solo di recente è stata pubblicata la legge 6 febbraio 1996 n. 52 (comunitaria 94) art. 33 che prevede che siano stabiliti i requisiti e le modalità di verifica dei laboratori competenti per le attività di controllo ufficiale dei prodotti alimentari e che siano individuati gli organismi responsabili della valutazione dei suddetti laboratori.

Invece, in altri paesi dell'Unione (ad esempio Regno Unito, Olanda, Paesi Scandinavi) le trasformazioni del sistema di controllo sono ad uno stadio più avanzato tanto è vero che sono già stati identificati gli Istituti preposti alla verifica dei laboratori responsabili del controllo ufficiale nonché sono stati stabiliti i protocolli cui i laboratori che intendono svolgere analisi microbiologiche ufficiali devono uniformarsi. In questi protocolli è previsto che la valutazione dei laboratori sia vincolata alla partecipazione ad un "quality assesment o proficiency testing".

## **Il controllo di qualità nel laboratorio di analisi microbiologica degli alimenti**

L'analisi microbiologica di un alimento non si limita come è noto alla sola quantificazione della carica microbica ma più spesso prevede il riconoscimento e, talvolta la numerazione, di una piccola carica patogena in presenza di una elevata flora microbica accessoria. Generalmente poi i germi patogeni o altri microrganismi marker dell'igiene del prodotto possono essere distribuiti in maniera casuale nell'alimento. E' possibile, quindi, che per queste ragioni l'analisi di un alimento possa portare a risultati difforni con serie ripercussioni per il consumatore (influenza sulla salute) e per il produttore (influenza sulla stabilità e sicurezza del prodotto). Pertanto, ogni laboratorio che vuol produrre in modo continuo dati analitici affidabili deve far ricorso a sistemi e modalità di misura accurati, affidabili e adeguati allo scopo.

Per raggiungere questo obiettivo il laboratorio deve sviluppare ed adottare con continuità non solo un programma di monitoraggio delle procedure, della strumentazione e dei reagenti utilizzati ma deve anche provvedere ad utilizzare, ove possibile, metodi validati e materiali di riferimento possibilmente certificati, a redigere una raccolta (manuale) dettagliata dei singoli metodi di analisi, comprensiva delle procedure di

controllo dei reagenti e dei terreni impiegati, e ad addestrare il personale al loro uso. In una parola il laboratorio deve attuare il controllo di qualità. Inoltre, per garantirsi che il controllo della qualità si svolga in maniera appropriata deve attivare un sistema di assicurazione della qualità cui compete tale verifica.

Con questi adempimenti il laboratorio può essere “accreditato” dall’organismo nazionale cui sarà affidato il compito di valutare i laboratori per cui i risultati prodotti potranno valere non solo dal punto di vista scientifico ma anche legale.

### **Le prove intra ed interlaboratorio**

Per quanto sopra detto appare, dunque, necessario che il laboratorio attui un programma sistematico di analisi in cui campioni a composizione nota siano esaminati dallo staff del laboratorio di modo che sia possibile valutarne l’abilità ad operare ad un certo livello di competenza. A questo proposito le verifiche possono essere fatte ricorrendo a due tipi di prove: una, intralaboratorio, con cui si può verificare con una certa frequenza la qualità operativa del laboratorio in modo da accertare l’esistenza di una costanza dei risultati (ripetibilità); l’altra, quella interlaboratorio, con cui si può assicurare la sovrapposibilità dei risultati dell’analisi microbiologica con quelli ottenuti da altri laboratori (riproducibilità).

Le prove intralaboratorio consistono nell’esame di campioni controllati o di riferimento, di campioni “ciechi”, o infine, di quelli con “doppio cieco”. In generale, e’ preferibile scegliere per le prove le matrici alimentari che solitamente vengono esaminate dal laboratorio. Così se un dato tipo di alimento viene esaminato con frequenza, si può accantonarne una aliquota da utilizzare successivamente come campione di controllo. Per saggiare le capacità dell’analista si può anche far ricorso al campione “cieco”, cioè ad un campione la cui composizione è nota solo alla direzione del laboratorio; oppure può essere utile ricorrere ad un campione “doppio cieco” cioè ad un campione di cui l’analista ignora non solo la composizione ma anche la vera finalità per cui lo analizza. Sui pregi e difetti della scelta dei diversi tipi di campioni esiste un’ampia gamma di opinioni e non sembra opportuno aggiungere un altro commento se non quello di scegliere in base alla convenienza. E’ opportuno, però, che venga effettuata almeno un’analisi del campione test insieme a quelle di routine quando un determinato prodotto viene analizzato dal laboratorio meno di una volta a settimana. Se, invece, il laboratorio effettua più di una analisi a settimana di quel campione, la frequenza del test intralaboratorio dovrebbe essere almeno il 10 % dei campioni di routine esaminati con un minimo di una prova test a settimana.

La prova interlaboratorio, invece, è quella in cui più laboratori misurano in maniera quali/quantitativa una grandezza di uno o più aliquote di un campione, stabile ed omogeneo, distribuito da organismi esterni ai laboratori. Appartengono a questa categoria di prove quelle effettuate per valutare le prestazioni di un metodo oppure per assegnare un valore di riferimento (valore vero) ad una grandezza (concentrazione o attributo) di un materiale in esame o, infine, per migliorare la prestazione del laboratorio. Quest’ultimo tipo di prova, quella di cui si parlerà più diffusamente in questa relazione, consiste in uno o più misure che un gruppo di laboratori fa su uno o più campioni omogenei e stabili con un metodo predefinito o con quello in uso nel laboratorio stesso.

In generale, i campioni di analisi di questo tipo di prove vengono distribuiti da organismi “esterni” ai laboratori stessi e la partecipazione alle prove può essere usata come parte del sistema di accreditamento o di certificazione del laboratorio o più semplicemente per stimarne l’accuratezza e la precisione dei risultati o, ancora, a scopo addestrativo per consentire al laboratorio di valutare le proprie prestazioni. Quando le prove vengono condotte dagli Istituti, cui le Autorità hanno affidato la valutazione dei laboratori, cui compete il controllo ufficiale, come parte del programma di accreditamento, i campioni vengono analizzati sia dal laboratorio che deve essere accreditato che dal laboratorio incaricato della sua valutazione. I risultati ottenuti in una serie di prove dal laboratorio da accreditare sono confrontati con quelli dell’Istituto incaricato dell’accreditamento che fungono da standard. Attraverso le carte di controllo (rappresentazione grafica dei risultati delle prove effettuate in un intervallo di tempo) viene valutata l’accuratezza e la precisione del laboratorio che deve essere accreditato o, nei casi più estremi, quella del singolo analista.

Non è stato ancora concordato a livello internazionale un protocollo per le prove interlaboratorio tra i laboratori che effettuano l’analisi microbiologica così come invece è stato fatto per i laboratori che svolgono analisi chimiche [Thompson M. & Wood R. *International Harmonized protocol for proficiency testing of (chemical) analytical laboratories*. J.AOAC Int. 1993 76, 926-940]. Tuttavia, gli Istituti di alcuni paesi dell’Unione Europea, che stanno già organizzando tali prove per i laboratori del proprio sistema di controllo ufficiale o in alcuni casi anche per gli “esterni”, si rifanno allo schema proposto per l’analisi chimica; esso prevede le tappe indicate nella Tab. 3.

**Tabella 3.** *Protocollo dei “proficiency testing schemes”*

- |   |
|---|
| <ol style="list-style-type: none"> <li>1. Preparazione del campione, test di omogeneità e validazione del materiale di prova da parte del coordinatore</li> <li>2. Distribuzione del materiale in maniera cadenzata</li> <li>3. Analisi del campione da parte dei partecipanti e registrazione dei risultati</li> <li>4. Analisi statistica dei risultati e valutazione delle prestazioni da parte dell’organizzatore esterno</li> <li>5. Comunicazione dei risultati ai partecipanti</li> <li>6. Segnalazione di prestazioni insufficienti</li> <li>7. Revisione della performance dello schema da parte dell’organizzatore</li> <li>8. Avvio di un’altra prova</li> </ol> |
|---|

### **Il programma interlaboratorio di validazione dell’analisi microbiologica**

*Lo schema* - La possibilità di svolgere test di validazione anche per i laboratori di analisi microbiologica degli alimenti è stata per lungo tempo preclusa dalle difficoltà incontrate nel preparare campioni appropriati. Infatti, due requisiti essenziali debbono essere soddisfatti per la realizzazione di queste prove: la omogeneità del campione e la costanza del numero e del tipo dei microrganismi per un certo periodo di tempo, specialmente quando si impiegano popolazioni miste.

Oggi, queste difficoltà sono state superate ricorrendo ad una accurata selezione dei ceppi più adatti allo scopo e a varie tecniche di stabilizzazione di microrganismi vivi quali la liofilizzazione del sistema microbico di prova in un opportuno mezzo di sospensione; la disidratazione di microbi opportunamente protetti e la successiva

addizione ad un prodotto alimentare precedentemente sterilizzato e disidratato; l'inoculazione di una sospensione microbica refrigerata in un alimento sterilizzato e addizionato di un adatto sistema conservante etc.

Negli ultimi mesi il Laboratorio Alimenti ha ritenuto opportuno varare un programma di prove interlaboratorio limitato agli laboratori incaricati del controllo ufficiale. Per la realizzazione del programma si è avvalso della collaborazione del Food Hygiene Laboratory che offriva materiale di prova che meglio si adattava alla situazione italiana.

È stato così scelto uno schema basato sull'analisi di campioni che simulano alimenti, liofilizzati in piccole vials di vetro, contenenti una popolazione microbica mista comprendente generalmente una specie patogena mescolata con varie specie commensali. Ciascun partecipante ha ricevuto dall'organizzatore dello schema più volte l'anno un set di campioni, generalmente due, identificati con un numero di codice, accompagnati da una scheda-questionario da restituire completa delle risposte. Utilizzando il proprio protocollo analitico, il partecipante veniva invitato a comunicare entro una data prestabilita i risultati conseguiti. In base ai risultati l'organizzazione proponente lo schema attribuiva un punteggio con cui il partecipante poteva monitorare la propria performance.

Questo schema, proprio per le sue caratteristiche intrinseche offre una ampia flessibilità operativa. Infatti, grazie alla stabilità dei campioni liofilizzati, ciascun partecipante può scegliere di iniziare le prove quando lo desidera e di richiedere di ripetere l'analisi del campione per indagare le cause di un eventuale insuccesso; inoltre, la stessa liofilizzazione non è di alcun ostacolo nella preparazioni di campioni contenenti bassi livelli di patogeni (<10-100 cfu/ml) in presenza di una alta carica microbica competitiva (ad esempio  $10^5$  cfu/ml) con cui allestire prove sia per valutare il numero complessivo/relativo dei microrganismi che la presenza/assenza di una determinata specie.

Tenendo conto dei compiti che i laboratori cui compete la vigilanza degli alimenti sono chiamati a svolgere, nell'approntare le prove di seguito descritte è stato scelto uno schema disegnato per simulare le difficoltà che si incontrano nell'isolamento e identificazione di un basso numero di germi patogeni, o in generale di patogeni, in alimenti.

Lo schema prevede la contemporanea presenza di un rappresentante dei tre gruppi di microrganismi di cui alla tabella 4 in ciascuna prova. Ovviamente sarebbe stato possibile ricorrere a schemi diversi se si fosse voluto perseguire un altro obiettivo riproducendo situazioni meno complesse, come ad esempio la ricerca di germi indicatori o la determinazione di vari tipi di cariche microbiche.

**Tabella 4 - Gruppi di microrganismi utilizzati nello schema**

<b>Patogeni</b>	<i>Salmonella</i> , <i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Yersinia enterocolitica</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Bacillus cereus</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Staphylococcus aureus</i>
<b>Germi indicatori</b>	Coliformi, <i>E.coli</i> , <i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Enterococcus spp.</i> , Stafilococchi, Clostridi solfito-riduttori
<b>Germi per valutazioni quantitative</b>	Carica aerobia e anaerobia totale, coliformi, batteri lattici, lieviti e muffe, <i>Enterobacteriaceae</i>

Con il tipo di schema scelto è stato attuato il programma pilota denominato PIVRAM (Programma di Validazione dei Risultati dell'Analisi Microbiologica) che ha comportato nel primo anno operativo quattro distribuzioni di campioni simulanti alimenti. In ciascuna distribuzione sono stati inviati ai partecipanti due distinti campioni incogniti con il modulo di richiesta e di registrazione dei risultati unitamente alle istruzioni per la reidratazione del campione. Per orientare il laboratorio nella scelta dei test più appropriati veniva fornita una breve descrizione del campione. Ogni laboratorio partecipante poteva analizzare ciascun campione secondo il proprio protocollo analitico con l'unica limitazione di comunicare i risultati tassativamente entro una data prestabilita. Ciascuna risposta veniva trasformata in codice numerico valutativo per poter fornire al laboratorio indicazioni sull'andamento della prova.

Nelle distribuzioni del primo anno le prove si sono concentrate nella ricerca dei seguenti patogeni: *C. jejuni*, *S. aureus*, *Salmonella virchow*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enteritidis*, *Yersinia enterocolitica*, *Bacillus cereus*.

*I partecipanti* - Nel complesso hanno partecipato alle quattro distribuzioni sia i PMP che gli IZS( rapporto 3:1). La partecipazione degli Istituti Zooprofilattici è stata fortemente concentrata nel Nord Italia. La regione con il più alto numero di laboratori partecipanti è stata la Emilia Romagna seguita dalla Lombardia e dalla Toscana.

#### *Risultati e commenti*

*I prova* - Il primo campione (0045) prevedeva la presenza contemporanea di due patogeni target, il *B.cereus* e lo *S.aureus*. Ai laboratori partecipanti si richiedeva di ricercare i patogeni significativi e numerarli; inoltre, si richiedeva di determinare la carica aerobia e la conta dell'*E.coli*. Nel secondo campione (0046), invece, il germe target era la *L. monocytogenes* associata a microrganismi coccacei.

Nelle tabelle 5 e 6 sono sintetizzati i risultati ottenuti dai partecipanti mentre in quella 7 sono schematizzati i commenti. E' da sottolineare il fatto che la media della conta mesofila ottenuta dai partecipanti è più elevata di quella trovata dal laboratorio standard probabilmente perchè le analisi non sono state effettuate entro 20 minuti dalla reidratazione dei campioni. Questo difformità dal risultato standard ritorna anche in altre prove svolte successivamente. Nel campione 0045, nessuno dei partecipanti ha dichiarato la presenza dell'*E.coli*, mentre la erronea presenza dello *S.aureus* evidenziato da alcuni partecipanti nella prova 0046 può essere dovuta a fenomeni di contaminazione crociata con il campione 0045 verificatesi durante lo svolgimento delle due prove o alla presenza dell'*Enterococcus faecalis* che forma colonie nere sul BP agar e che da' risposte falsamente positive per *S.aureus* quando vengono impiegati alcuni kit commerciali a scopo diagnostico. Il ricorso al test della catalasi avrebbe consentito di discriminare le due specie.

**Tabella 5 - Campione 0045**

*Caratteristiche del campione:* Residui alimentari di un ricevimento di nozze che hanno causato in parecchi partecipanti nausea e vomito nelle 2.6 ore successive al consumo. Gli alimenti campione presentavano un pH di 6,8 ed una  $a_w$  di 0,97. Il campione e' stato preparato dall'organizzatore miscelando e liofilizzando una popolazione di *B. cereus*, *S.aureus*, *E.faecalis*, *Lc. lactis*

	parametro ricercato	terreno e incubazione	media dei conteggi cfu/ml	range delle conte cfu/ml
Organizzatore	conta aerobia totale	PCA 30°C/72 h	$6,02 \times 10^5$	$4,7 \times 10^5$ - $8,9 \times 10^5$
Partecipanti		?	$1,09 \times 10^9$	$5,0 \times 10^3$ - $9,0 \times 10^{10}$
Organizzatore	conta <i>S.aureus</i>	BPA 35°C/48h	$2,87 \times 10^5$	$1,6 \times 10^5$ - $3,6 \times 10^5$
Partecipanti		?	$7,42 \times 10^5$	$5,0 \times 10^3$ - $9,0 \times 10^{10}$
Organizzatore	conta <i>B.cereus</i>	PEMBA 35°C/24h	$1,97 \times 10^4$	$1,5 \times 10^4$ - $2,2 \times 10^4$
Partecipanti		?	$3,92 \times 10^5$	$1,0 \times 10^2$ - $1,5 \times 10^7$

**Tabella 6 - Campione 0046**

*Caratteristiche del campione:* Un campione pronto conservato in frigorifero ad una temperatura di 7.5°C al momento del campionamento. Il campione presentava un pH di 6,5 ed una  $a_w$  di 0,98. Al momento del prelievo il campione era scaduto da 8 giorni. Il campione e' stato preparato dall'organizzatore miscelando e liofilizzando una popolazione di *L.monocytogenes*, *Micrococcus varians/roseus*, *E.faecalis* *Lc. lactis*

	parametro ricercato	terreno e incubazione	media dei conteggi cfu/ml	range delle conte cfu/ml
Organizzatore	conta aerobia totale	PCA 30°C/72 h	$5,11 \times 10^5$	$4,4 \times 10^5$ - $6,7 \times 10^5$
Partecipanti		?	$6,41 \times 10^7$	$1,36 \times 10^4$ - $5,1 \times 10^9$
Organizzatore	conta <i>Listeria monocytogenes</i>	Oxford agar 30°C/48h	$1,08 \times 10^4$	$5,4 \times 10^3$ - $1,7 \times 10^4$
Partecipanti		?	$1,32 \times 10^5$	20 - $1,1 \times 10^6$

**Tabella 7.** Commenti schematici I Prova: campioni 0045-0046

	Numero	Percentuale
Risposte 0045	84	
Laboratori che trovano <i>Bacillus cereus</i> e <i>S.aureus</i>	48/60	80
Laboratori che trovano <i>Bacillus sp</i> e <i>S.aureus</i>	4/60	7,7
Laboratori che non trovano <i>Bacillus cereus</i> *	7/60	11,7
Laboratori che non trovano <i>S.aureus</i> **	1/60	1,2
Laboratori che trovano <i>E.coli</i>	0/60	0

\*ceppo dalle caratteristiche morfologiche tipiche

\*\* ceppo Dnasi e coagulasi positivo

	Numero	Percentuale
Risposte 0046	84	
Laboratori che isolano <i>Listeria sp</i>	77/83	92,8
Laboratori che non identificano correttamente <i>L.monocytogenes</i>	3/77	9,1
Laboratori che non identificano <i>Listeria sp.</i>	5/77	6,5

*II prova* - Il campione 0053 (Tab. 8) conteneva 10-30 cfu/ml di *Salmonella* e una alta ( $10^5$  cfu/ml) flora accessoria prevalentemente costituita da *Ps. aeruginosa*. In questo caso i partecipanti che hanno utilizzato il Rappaport-Vassiliadis broth senza rispettare la temperatura di incubazione ( $T < 41,5^\circ\text{C}$ ) hanno avuto difficoltà a isolare la *Salmonella* per l'abbondante crescita della *Pseudomonas* (bassa percentuale di risposte positive Tab. 10); ugualmente in difficoltà nell'isolare la salmonella si è trovato chi ha utilizzato un terreno di arricchimento a base di selenito. La *Salmonella* poteva essere isolata adottando il seguente protocollo: 25 ml di campione in 225 ml di acqua peptonata tamponata incubata 16 ore a  $35^\circ\text{C}$ , subculturando 0,1 ml in 10 ml di Rappaport-Vassiliadis incubato a  $41,5^\circ\text{C}$  e isolando il germe dopo 24 e 48 ore in BGA e Xilosio-Lisina-Desossicolato agar (XLD), quest'ultimo terreno si sarebbe rivelato particolarmente vantaggioso dato il tipo di ceppo utilizzato per la prova.

Nel campione 0054 (Tab. 9) il germe target era la *Y.enterocolitica* che forma colonie caratteristiche sul CIN, cefsulodina irgasan novobiocina agar. Il ceppo utilizzato per la prova era un ceppo ureasi negativo e quindi un ceppo non patogeno; la sua presenza nell'alimento crudo è da considerare come una contaminazione naturale mentre la presenza in quello cotto indica una ricontaminazione a valenza igienica. Anche in questo prova la percentuale di risposta è risultata non ottimale (inferiore al 90% vedi tabella 10). È assai probabile che questo possa dipendere dal tipo di terreno utilizzato dai partecipanti. Anche se il laboratorio di riferimento ha utilizzato la metodica ISO 6391. 1988 *Enumeration of E.coli -colony count technique using membranes* nella numerazione dell'*E coli* il risultato dei partecipanti nel suo complesso non si discosta di molto dal valore atteso.

*III prova* - Il campione 0057 conteneva il *Campylobacter* in elevata carica ( $10^4$  cfu/ml) e una flora accessoria anch'essa abbondante,  $10^5$ /ml (Tab.11), comprendente la *Pseudomonas*. Per la ricerca del *Campylobacter* spp sarebbe stato opportuno utilizzare

l'arricchimento selettivo in Preston broth ed isolarlo utilizzando il Blaser-Wang, Butzel Preston o Skirrow agar o il desossicolato carbone attivo cefoperazone modificato agar (m-CCDA), incubati a 42°C in microaerofilia (Tab.13). Certi ceppi di *Pseudomonas* crescono sui terreni selettivi quali lo Skirrow agar utilizzati per il *Campylobacter*. Il ceppo di *Campylobacter* utilizzato per la prova si distingue bene dalla *Pseudomonas*. 10 laboratori su 50 riportano organismi non presenti nella fiala inviata ma in quella numerata come 0058. E' possibile dunque che ci siano stati fenomeni di contaminazione crociata durante lo svolgimento delle prove. Il campione 0058 conteneva come germe target *S.aureus* unitamente ad una popolazione saprofitaria prevalente (Tab.12) che comprendeva anche *L.innocua*. Quei laboratori che hanno identificato la *L.monocytogenes* nel campione 0058 dovrebbero rivedere la procedura utilizzata (test dell'emolisi etc) (Tab. 13) per la conferma di specie.

**Tabella 8 - Campione 0053**

*Caratteristiche del campione:* Un campione di maionese preparato con uova fresche. Quattro persone manifestano dolori addominali e diarrea 24 ore dopo aver consumato una insalata preparato con questa salsa. Il campione e' stato preparato dall'organizzatore miscelando e liofilizzando una popolazione di *S.enteritidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Hafnia alvei*, *Citrobacter freundii* e *Klebsiella oxytoca*

	parametro ricercato	terreno e incubazione	media dei conteggi cfu/ml
Organizzatore	conta aerobia totale	PCA 30°C/72 h	1,81 x 10 <sup>5</sup>
Partecipanti		?	4,07 x 10 <sup>5</sup>
Organizzatore	conta enterobacteriacee	VRBG 35°C/24h	1,82 x 10 <sup>5</sup>
Partecipanti		?	1,29 x 10 <sup>5</sup>

**Tabella 9 - Campione 0054**

*Caratteristiche del campione:* Un campione di salsicce preparate con carne di maiale cruda conservate a 5,1°C e prelevate dopo 14 giorni dalla data di scadenza. Il campione è stato preparato dall'organizzatore miscelando e liofilizzando una popolazione di *Y. enterocolitica*, *Citrobacter freundii*, *Enterobacter agglomerans*, *E. coli*

	Parametro ricercato	terreno e incubazione	media dei conteggi cfu/ml
Organizzatore	conta aerobia totale	PCA 30°C/72 h	2,39 x 10 <sup>5</sup>
Partecipanti		?	2,82 x 10 <sup>5</sup>
Organizzatore	conta E.coli	MMGA* (4 h a 35°C) TBA** 44°C/24h	4,36 x 10 <sup>4</sup>
Partecipanti		?	9,33 x 10 <sup>3</sup>

\* Mineral modified glutamate agar

\*\* Tryptone bile agar

**Tabella 10 - Commenti schematici II Prova: campioni 0053-0054**

	Numero	Percentuale
Risposte 0053	100	
Laboratori che isolano la <i>Salmonella</i> sp.* · **	60/100	60,0
Risposte 0054	72	
Laboratori che isolano la <i>Y. enterocolitica</i> <sup>° · °°</sup>	53/72	73,6

\* un laboratorio trova anche la *Yersinia* sp.

\*\* un laboratorio trova solo la *Listeria* sp

° un laboratorio trova anche la *Listeria* sp.

°° due laboratori trovano rispettivamente solo *Bacillus* sp. e *S.aureus*

**Tabella 11** Campione 0057

*Caratteristiche del campione:* Un dessert preparato con latte non pastorizzato. Il campione è stato preparato dall'organizzatore miscelando e liofilizzando una popolazione di *Campilobacter jejuni*, *Pseudomonas aeruginosa*, *E.coli*, *Enterobacter cloacae*

	test	terreno e incubazione	media dei conteggi cfu/ml	range delle conte cfu/ml
Organizzatore	conta aerobia totale	PCA 30°C/72 h	$2,4 \times 10^5$	$1,58 \times 10^5$ - $3,16 \times 10^5$
Partecipanti		?	$4,07 \times 10^5$	$1,9 \times 10^4$ $6,7 \times 10^6$
Organizzatore	conta coliformi	VRBG 35°C/24h	$1,82 \times 10^5$	$1,0 \times 10^5$ $3,16 \times 10^5$
Partecipanti		?	$2,0 \times 10^5$	$1,1 \times 10^3$ $1,4 \times 10^6$

**Tabella 12** Campione 0058

*Caratteristiche del campione:* Un alimento refrigerato pronto che è stato a lungo manipolato per la sua preparazione. Il campione è stato preparato dall'organizzatore miscelando e liofilizzando una popolazione di *S.aureus*, *L. innocua*, *B.circulans* e *L. delbruckii*

	test	terreno e incubazione	media dei conteggi cfu/ml	range delle conte cfu/ml
Organizzatore	conta aerobia totale	PCA 30°C/72 h	$2,88 \times 10^5$	$2,00 \times 10^5$ - $3,98 \times 10^5$
Partecipanti		?	$5,22 \times 10^5$	$8,00 \times 10^3$ $8,7 \times 10^6$

**Tabella 13.** Commenti schematici III Prova: campioni 0057-0058

	Numero	Percentuale
Risposte 0057	49	
Laboratori che isolano la <i>Salmonella</i> sp.*	9/49	18,4
Risposte 0058	98	
Laboratori che isolano la <i>Y. enterocolitica</i> <sup>o</sup>	94/98	95,9
Laboratori che isolano anche <i>L.monocytogenes</i>	9/94	9,6

\* 10 laboratori (20%) trovano *S.aureus*.

<sup>o</sup> un laboratorio trova solo la *Listeria monocytogenes*

IV prova - La *Salmonella virchow* (Tab. 14 e 16) era presente nel campione 0065 in concentrazione di 30-50 cfu/ml. XLD agar unitamente al BGA erano i terreni di scelta per l'isolamento della salmonella in questo campione. Nel campione 0072 (Tab.15) invece l'organismo target era la *L. monocytogenes*. Quasi tutti i partecipanti hanno identificato correttamente il germe non trovando alcuna ostacolo nella presenza di una abbondante flora microbica accessoria.

**Tabella 14 - Campione 0065**

Caratteristiche del campione: Un piatto a base di carne di pollo che puo' aver causato diarrea in due persone dopo 24 ore dal consumo. Il campione e' stato preparato dall'organizzatore miscelando e liofilizzando una popolazione di *S.virchow*, *Enterobacter sakazaki* e *Citrobacter freundii*

	parametro ricercato	terreno e incubazione	media dei conteggi cfu/ml	range delle conte cfu/ml
Organizzatore		PCA 30°C/72 h	$3,4 \times 10^4$	$2,6 \times 10^4$ $5,6 \times 10^4$
Partecipanti	conta aerobia totale	?	$6,4 \times 10^4$	$2,0 \times 10^3$ $2,6 \times 10^6$

**Tabella 15 - Campione 0072**

*Caratteristiche del campione:* Un formaggio molle preparato con latte pastorizzato, con pH di 6,2, mantenuto a 5,8°C fino al momento del prelievo.  
 Il campione è stato preparato dall'organizzatore miscelando e liofilizzando una popolazione di *L.monocytogenes*, *Lct. acidophilus*, *B.pumilus* e *Morganella morganii*

	parametro ricercato	terreno e incubazione	media dei conteggi cfu/ml	range delle conte cfu/ml
Organizzatore	conta aerobia totale	PCA 30°C/72 h	1,1 x 10 <sup>5</sup>	6,1 x 10 <sup>4</sup> - 1,8 x 10 <sup>5</sup>
Partecipanti		?	3,0 x 10 <sup>5</sup>	1,0 x 10 <sup>4</sup> - 8,0 x 10 <sup>6</sup>

**Tabella 16 - Commenti schematici IV Prova: campioni 0065-0072**

	Numero	Percentuale
Risposte 0065	100	
Laboratori che isolano la <i>Salmonella</i> sp.	98/100	93,4
Laboratori che non isolano la <i>Salmonella</i> sp	2/100	2,0
Laboratori che non identificano la <i>S. virchow</i>	5/98	5,1
Risposte 0072	98	
Laboratori che isolano la <i>Listeria</i> sp.	97/98	98,9
Laboratori che sbagliano l'identificazione della <i>L.m.</i>	2/97	2
Laboratori che non identificano completamente <i>L.m.</i>	4/97	4,1
Laboratori che isolano <i>L.monocytogenes</i> ma anche <i>B.cereus</i>	2/97	2

## Conclusioni

Si sono dovute superare non poche difficoltà sia di tipo organizzativo che burocratico perché potesse svolgersi il primo anno di vita del progetto pilota PIVRAM ma i dati sopraindicati sono lì a testimoniare che ha assolto la funzione per cui era stato programmato e quindi incoraggiano a proseguire nell'esperienza in attesa di poter varare un autonomo programma nazionale.

Così anche per il 1996-97 si proseguirà con quattro distribuzioni ognuna caratterizzata da due campioni. Non sarà possibile almeno per il momento allargare il numero dei laboratori partecipanti e soprattutto non sarà possibile coinvolgere anche quei laboratori riconosciuti dal Ministero della Sanità trattandosi di progetto a totale carico dell'amministrazione dell'Istituto.