



UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI MILANO

**DIPARTIMENTO DI SCIENZE AGRARIE
E AMBIENTALI - PRODUZIONE,
TERRITORIO, AGROENERGIA**

*Corso di Laurea in
Valorizzazione e Tutela dell'Ambiente e del Territorio Montano*

**L'ATTIVITÀ DI CONTROLLO
DEGLI ALIMENTI SVOLTA
DALL'ISTITUTO
ZOOFILATTICO
SPERIMENTALE DELLA
LOMBARDIA E DELL'EMILIA
ROMAGNA**

Relatore: Prof. Ivano De Noni

Elaborato di
Layla Bontempi
Matr. n° 741969

Anno accademico 2015-2016

<i>PREFAZIONE</i> a cura del Professore e relatore Ivano De Noni	PAG. 5
<i>INTRODUZIONE</i>	PAG. 7
<i>PRODUZIONI ALIMENTARI</i>	
<ul style="list-style-type: none">• cos'è un alimento?• produzioni animali• produzioni vegetali• mangimi	PAG. 8
<i>QUALITÀ ALIMENTO</i>	
<ul style="list-style-type: none">• sicurezza alimentare• tossinfezione• tossina botulinica	PAG. 14
<i>HACCP e CONTROLLI QUALITATIVI</i> analisi dei rischi e controllo dei punti critici _ HACCP: analisi post processo:	
<ul style="list-style-type: none">• ASL: prevenzione• NAS: controlli antifrode• l'istituto zooprofilattico italiano:	PAG. 17
<i>ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA ROMAGNA</i>	PAG. 22
<i>ANALISI DI LABORATORIO SUGLI ALIMENTI</i>	
<ul style="list-style-type: none">• analisi chimiche:• analisi microbiologiche qualitative/quantitative<ul style="list-style-type: none">◦ analisi tradizionali: selezione e conta batterica)◦ analisi innovative: determinazione immunologica e microbiologia molecolare	PAG. 32
<i>SPERIMENTAZIONE ANIMALE</i>	
<ul style="list-style-type: none">• Posizione della comunità scientifica• Posizione dei movimenti animalisti• alternative	PAG. 57
<i>CONCLUSIONI RELATIVE AL TIROCINIO</i>	PAG. 62
<i>RINGRAZIAMENTI</i>	PAG. 63
<i>BIBLIOGRAFIA</i>	PAG. 64

PREFAZIONE a cura del Professore e relatore Ivano De Noni

I rischi di contaminazione delle produzioni alimentari sono molto alti e posso portare a gravi casi di tossinfezioni. Necessaria è la rigorosa e continua adozione di misure di controllo per prevenire le malattie trasmesse dagli alimenti e il deterioramento degli stessi. Generalmente i problemi di contaminazione alimentare sono di origine microbica, causati dalla cattiva igiene del processo. Il progresso tecnologico degli ultimi decenni ha determinato una miglior comprensione dei rischi e una maggiore attenzione alla sicurezza e qualità microbiologica degli alimenti portando allo sviluppo di metodologie, quali l'HACCP o controllo dei punti critici, basate sull'individuazione e gestione dei punti critici durante la preparazione e lavorazione degli alimenti. Il controllo del prodotto finito verifica l'effettiva sicurezza dell'alimento prodotto e l'efficienza delle procedure HACCP impiegate per la sua produzione. Questo tipo di controllo viene effettuato tramite analisi eseguite in laboratori interni o esterni all'azienda alimentare. Nel secondo caso si tratta di verifiche e controlli richiesti da parte degli enti facenti parte del Servizio Sanitario Nazionale (SSN) e addetti al controllo alimentare. Tra questi troviamo:

- l'ASL che si fa carico della prevenzione e della formazione nel settore alimentare;
- il corpo carabinieri NAS addetti al controllo delle frodi e contraffazioni alimentari;
- gli Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IZS) che effettuano le analisi di laboratorio ufficiali.

Gli IZS rappresentano un importante strumento tecnico e operativo di cui dispone il SSN per la sanità animale, il controllo della salute e della qualità degli alimenti di origine animale, l'igiene degli allevamenti e attività correlate. Gli IZS hanno anche la funzione di ricerca scientifica e accertamento dello stato sanitario degli animali collaborando con servizi veterinari e ASL.

Gli IZS sono 10 con 87 sezioni diagnostiche periferiche. Di seguito vengono descritte le attività di controllo sugli alimenti svolte nella sede centrale a Brescia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna "Bruno Ubertini" (IZSLER), presso il quale è stato svolto il tirocinio.

Compiti primari dell'IZSLER sono: il servizio diagnostico delle malattie, le attività di controllo degli alimenti destinati all'uomo e di ricerca applicata in materia di igiene degli allevamenti e miglioramento delle produzioni. La sede bresciana dell'IZSLER è articolata in 3 aree a loro volta suddivise in reparti (strutture complesse) e laboratori (strutture semplici):

- Diagnostica (Batterologia - Virologia - Agenti ad alta diffusione e biotecnologie diagnostiche - Genomica - Proteomica)
- Controllo degli Alimenti e delle Trasformazioni (chimica degli alimenti di origine animale - chimica degli alimenti di origine vegetale e mangimi - Microbiologia - chimica applicata alle tecnologie alimentari - tecnologia acidi nucleici applicata agli alimenti - produzioni primarie)
- Attività di Servizio (animali da laboratorio - produzione terreni - produzione vaccini e reagenti - substrati cellulari e immunologia cellulare)

Il controllo delle produzioni alimentari è l'area di maggior rilievo dell'istituto sia per quanto riguarda il supporto alle attività pianificate dagli organi del SSN, che le attività di autocontrollo delle aziende. Questa attività di controllo è soprattutto di tipo microbiologico. L'IZSLER fornisce quindi una gamma di servizi che comprende un'ampia attività analitica a supporto del servizio veterinario pubblico, dei produttori, dei trasformatori e degli altri operatori nel campo alimentare.

Le analisi microbiologiche non si basano sulla ricerca di ogni singolo microrganismo, lavoro pressoché impossibile, bensì sulla ricerca di: agenti patogeni, o responsabili del deterioramento, e più rappresentativi per eventuali loro tossine; e batteri considerati indicatori, ovvero microrganismi la cui presenza può essere indicativa di una compresenza di patogeni. Altro fattore importante di controllo è la carica microbica totale di un alimento che può essere indicatore della qualità dei processi produttivi.

Tutti i metodi di analisi utilizzati sono riconosciuti e approvati per le loro caratteristiche di accuratezza, precisione e specificità. I metodi comprendono analisi tradizionali e analisi innovative. Tra le analisi tradizionali ritroviamo le conte microbiche. Consistono nel seminare una quantità standard di campione su un terreno colturale di differenti tipi in base alle richieste nutrizionali del microrganismo, alla necessità di isolarlo dagli altri presenti e di identificarlo per mezzo di sue particolari reazioni metaboliche. Alternativa alla enumerazione vera e propria è la tecnica del most probable number (MPN) che si ottiene seminando differenti concentrazioni di campione in un terreno liquido; in base alla modalità di crescita delle varie provette viene assegnato un codice numerico e attraverso apposite tabelle registrate si può risalire al numero di microrganismi contenuti.

Nelle analisi innovative troviamo la determinazione immunologica di cui fanno parte i test ELISA che identificano e quantificano specifici microrganismi attraverso il legame antigene-anticorpo. Si utilizzano anticorpi specifici per ciò che deve essere ricercato e un marcatore, di tratta generalmente di sostanze che, si legano al complesso antigene-anticorpo, se è presente, e sviluppano colorazione o fluorescenza rilevata poi attraverso fotometri. Altra importante parte delle analisi innovative è svolta mediante la polimerasi chain reaction (PCR) che permette di identificare nel campione correttamente preparato la presenza di specifiche sequenze nucleotidiche relative al microrganismo in esame, con elevati valori di specificità e efficienza. Tra le varie tecniche PCR esistenti quella maggiormente utilizzata è la PCR real-time o PCR quantitativa in tempo reale, che oltre all'identificazione della presenza della determinata sequenza è in grado di quantificarne il contenuto nel campione.

INTRODUZIONE

Le conoscenze di base della microbiologia alimentare, in particolare sulla sopravvivenza dei patogeni, le loro possibilità di sviluppo e di produzione di tossine, sono aumentate fortemente negli ultimi trenta anni. La ricerca nello stesso periodo ha sviluppato un'ampia gamma di metodi per evidenziare e controllare i microrganismi responsabili delle tossinfezioni alimentari.

Tuttavia, le statistiche epidemiologiche dimostrano che l'incidenza delle malattie di origine alimentare è addirittura aumentata durante lo stesso trentennio e che il numero di patogeni alimentari è praticamente raddoppiato.

Le cause che continuano a sostenere l'incidenza delle tossinfezioni alimentari possono essere sostanzialmente riassunte nei seguenti punti:

- emergenza di nuovi patogeni,
- sviluppo da parte dei patogeni esistenti di resistenze,
- correlazioni di episodi gastroenterici da patogeni tradizionali con prodotti alimentari di "nuova formulazione" e prodotti alimentari industriali di tipo "tradizionale".

L'incidenza di episodi di malattie trasmesse da alimenti di produzione industriale è nettamente inferiore a quella dovuta agli alimenti preparati nei sistemi di ristorazione collettiva o preparazione domestica, viceversa il numero delle persone potenzialmente coinvolte è notevolmente alto. È perciò necessaria la rigorosa e continua adozione di misure di controllo per prevenire le malattie trasmesse dagli alimenti ed il deterioramento conseguente agli eventuali difetti del ciclo produttivo.

Fondamentalmente esistono tre tipi di intervento per ridurre i rischi della contaminazione alimentare:

- educazione alle norme igieniche del personale addetto
- ispezione delle attrezzature e degli ambienti di lavoro
- controllo di qualità per mezzo di analisi microbiologiche e/o chimiche

PRODUZIONI ALIMENTARI

COS'È UN ALIMENTO?

Si definisce alimento ogni sostanza o insieme di sostanze assimilata da un organismo vivente per la propria nutrizione. Nel senso dell'alimentazione umana, indica tutto ciò che mangiamo e beviamo ai fini del sostentamento fisico.

L'alimentazione consiste nell'assunzione da parte di un organismo delle sostanze indispensabili per il suo metabolismo e le sue funzioni vitali quotidiane.

Dagli alimenti l'organismo estrae le sostanze utili al suo metabolismo. Sono i principi nutritivi, tutti o in parte, a seconda dell'organismo considerato, indispensabili alla vita: glucidi (o carboidrati), lipidi (o grassi), protidi (o proteine), vitamine, sali minerali, acqua.

Per gli esseri umani gli alimenti sono molteplici, selezionati nel corso dei millenni in funzione della loro reperibilità e della loro possibilità di fornire sostentamento biologico.

La sicurezza e la salute alimentare sono monitorate dalle agenzie internazionali, come l'internazionale Association for Food Protection, World Resources Institute, World Food Programme, Food and Agriculture Organization, e l'internazionale Food Information Council. Essi affrontano questioni come la sostenibilità, la diversità biologica, i cambiamenti climatici, l'economia alimentare, la crescita della popolazione, l'approvvigionamento idrico e l'accesso al cibo.

Il cibo è un diritto umano derivato dal International Covenant on Economic, Social and Cultural Rights o Patto internazionale relativo ai diritti economici, sociali e culturali (ICESCR), riconoscendo il "diritto ad un adeguato standard di vita, incluso cibo adeguato", così come il "diritto fondamentale di essere libero dalla fame".

Gli alimenti sono ottenuti tradizionalmente attraverso l'agricoltura, l'allevamento la pesca, la caccia, ed altri metodi in funzione dal luogo di origine. Nel corso del tempo vi è stata, attraverso una lenta presa di consapevolezza, di una tendenza crescente verso pratiche agricole più sostenibili.

Alcuni alimenti possono essere utilizzati direttamente, molti altri subiscono specifiche preparazioni, per ottenerne una maggiore digeribilità, per motivi di sicurezza sanitaria, per rendere il loro sapore più gradevole. Una preparazione può contribuire ad aumentare il gusto o l'estetica, un'altra può contribuire a conservare più a lungo l'alimento.

Gli alimenti confezionati sono preparati al di fuori delle mura domestiche e destinati all'acquisto. Si va dal caso più semplice del macellaio che prepara la carne, al più complesso, prodotto dalla moderna industria alimentare internazionale. Le prime tecniche erano limitate a conservare, confezionare e trasportare gli alimenti disponibili e riguardavano principalmente al suo trattamento con il sale, con lo zucchero, con l'aceto, con il fumo, fino alla fermentazione e alla caseificazione.

L'era moderna vide la nascita dell'industria alimentare. Questo sviluppo crebbe smisuratamente grazie ai nuovi consumi di massa e le emergenti nuova tecnologia, come la molatura, la conservazione, il confezionamento l'etichettatura, e il trasporto. Questo portò al vantaggio di disporre di alimenti già preparati, ma a scapito della loro qualità.

Avanzate tecnologie sono intervenute a modificare l'industria alimentare: sistemi di controllo computerizzati, metodi sofisticati di lavorazione ed imballaggio, progressi nella logistica e nella distribuzione, possono ulteriormente aumentare la qualità dei prodotti, migliorare la sicurezza degli alimenti, e ridurre i costi.

PRODUZIONI ANIMALI

Carni

Il termine carne è usato comunemente per intendere le parti commestibili degli animali e può comprendere perciò anche gli organi interni, interiora o frattaglie. Nel linguaggio comune e in molte normative il termine esclude i prodotti ittici e della pesca.

Dal punto di vista merceologico, la qualità delle carni è definita da diversi fattori variabili in dipendenza della specie animale, del sesso, dell'età e dell'alimentazione: colore, dato dalla concentrazione di mioglobina, dalla struttura delle fibre muscolari e dalla quantità di grasso di marezzatura. Odore, in genere non forte nel quale si avvertono le sfumature dovute all'alimentazione, ma alcune specie presentano aromi più forti come la carne di capra, che ha odore muschiato; quella di selvaggina, un caratteristico odore di selvatico. Consistenza alla quale contribuisce anche il grasso presente, oltre all'età dell'animale. Finezza, che dipende dalla quantità e dal tipo di tessuto connettivo presente nei muscoli. Succosità, dovuta all'acqua liberata dalla carne durante la masticazione.

Tra questi aspetti, il colore è quello che definisce una prima suddivisione delle carni: carni rosse, le carni degli animali da macello adulti e di alcuni volatili; carni bianche, invece quelle di pollo, tacchino, coniglio, quelle dei pesci e quelle degli animali giovani. In aggiunta a queste e a seconda degli usi locali, sono utilizzate per il consumo alimentare le carni di animali selvatici individuate comunemente come "selvaggina" e spesso denominate "carni nere".

Nel totale delle carni consumate a livello mondiale la più diffusa è la carne suina, seguita dal pollame e in seguito dalla carne bovina e da quella ovina. L'importanza relativa di queste varie fonti di carne nella dieta varia da regione a regione e nelle diverse culture.

L'attuale media globale dei consumi di carne è di circa 100 grammi al giorno per persona, ma con molte differenze tra le popolazioni.

La carne è tenuta in grande considerazione nella maggior parte delle comunità. Ha un valore di prestigio, è spesso considerata come l'alimento centrale intorno al quale pianificare i pasti. I diversi tipi di carne sono spesso la base di occasioni festive e celebrative e in generale la carne è considerata come un alimento ad alto valore nutritivo sia dalla popolazione in generale, sia dalla comunità scientifica.

In molte aree del pianeta le condizioni di produzione della carne sono avverse a una buona qualità di queste: trasporti su lunghe tratte con poche soste, stalle di scarsa qualità, scarsa igiene, mancanza di refrigerazione adeguata nelle fasi della macellazione, fattori che oltre a determinare un peggioramento della qualità organolettica a causa di possibili contaminazioni microbiche possono compromettere definitivamente la salubrità del prodotto con conseguenti rischi per la salute umana.

Salumi insaccati

Salume è un termine italiano per definire un alimento a base di carne cruda o cotta, con l'aggiunta quasi sempre di sale, talvolta di grasso animale, erbe e spezie ed eventualmente altri ingredienti e conservanti. Se chiuso in un contenitore si chiama insaccato (tradizionalmente vengono usati gli intestini dell'animale, anche se oggi si utilizzano anche materiali sintetici). Viene conservato in diversi modi, a seconda che sia crudo, cotto, stagionato o affumicato.

I salumi possono provenire dalla carne di diversi animali di allevamento (bovino, oca, capra, asino, pecora) e selvaggina (cinghiale, cervo, capriolo).

Latte

Il latte è un liquido bianco secreto dalla ghiandola mammaria delle femmine dei mammiferi, che si caratterizzano come distinta classe zoologica anche per questa fondamentale particolarità.

Il suo scopo è dare nutrimento ai cuccioli durante le prime fasi della loro vita. Dal punto di vista chimico, il latte rientra nella famiglia dei colloidali, un'emulsione per l'esattezza, poiché contiene al

suo interno macromolecole, ovvero composti aventi grandezza superiore ai 500 nm come, ad esempio, proteine e acidi nucleici.

A seconda della specie animale, il latte ha diverse componenti di cui la quantità varia considerevolmente. Le principali:

- Acqua. In tutti i casi il componente principale.
- Grassi. Principalmente saturi, costituiti da fosfolipidi, steroli e trigliceridi. La variabilità della composizione è comunque interspecifica, intraspecifica, differente per stadio di lattazione e stagione, nonché legata al tipo di alimentazione.
- Glucidi. per la quasi totalità lattosio, con minime percentuali di glucosio.
- Proteine. Per i due terzi caseina. Le proteine sieriche o sieroproteine, separabili dalla caseina quando si coagula il latte, rappresentano la frazione non sedimentabile e sono di elevatissimo valore nutrizionale e biologico.
- Sostanze minerali, in forma solubile e insolubile.
- Vitamine. principalmente del complesso B, C e PP
- Sostanze "aromatiche" (non in senso chimico, ma altri composti, volatili e no, responsabili di gusto e profumo).
- Cellule somatiche.
- Batteri flora saprofito tipica della stalla, anche lattici.

Spesso confusi, il latte fresco e il latte crudo sono due prodotti diversi, non solo dal punto di vista organolettico e nutrizionale, ma anche legale a causa del differente processo produttivo e distributivo.

Viene definito latte fresco pastorizzato il latte che perviene crudo allo stabilimento di confezionamento e che, ivi sottoposto a un solo trattamento termico entro 48 ore dalla mungitura, al consumo definite caratteristiche fisico-chimiche e microbiologiche che il produttore deve garantire ad ogni lotto. Le condizioni igieniche di trattamento fino alla vendita devono soddisfare i criteri HACCP stabiliti dall'OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità) relativi alla garanzia di gestione dei rischi sanitari.

Il latte crudo non è trattato termicamente ed è prodotto nel rispetto delle norme igieniche alla stalla; presenta naturalmente una flora batterica in ragione delle condizioni igieniche di mungitura e della gestione del raffreddamento nonché dello stato igienico degli impianti e della loro gestione.

Il latte, per la sua composizione è un substrato ideale per la crescita dei microrganismi. Inoltre essendo un prodotto di origine animale, può facilmente albergare agenti infettivi ed essere quindi veicolo di malattie trasmissibili dagli animali all'uomo (zoonosi). Tra le zoonosi più rilevanti ci sono brucellosi, listeriosi, salmonellosi, e tubercolosi.

Può essere contaminato anche da numerose sostanze sia lipo che idrosolubili.

Tali contaminazioni possono avere origine ambientale, oppure derivare da contaminazioni durante il processo di trasformazione e conservazione oppure essere il risultato di sofisticazioni, o semplicemente sale, atto a mascherare l'aggiunta di acqua.

Latticini

In senso generico sono latticini tutti gli alimenti derivanti dal latte, ottenuti secondo i procedimenti più vari che vanno dall'aggiunta di fermenti all'aggiunta di caglio e successiva stagionatura.

-Formaggio

Il formaggio, è il prodotto ottenuto dalla coagulazione acida o presamica del latte intero, parzialmente o totalmente scremato oppure della crema di latte.

Il latte può subire un trattamento termico iniziale o meno: si parla quindi di formaggi a "latte pastorizzato" o formaggi a "latte crudo". La scelta tra le due opzioni varia in funzione di molti fattori. A seconda del tipo di latte utilizzato e dal tipo di scrematura cui viene sottoposto varia la

percentuale di grassi all'interno del formaggio. I formaggi vengono quindi differenziati in formaggi grassi, formaggi semigrassi e formaggi magri. Sia se si utilizza latte crudo che latte pastorizzato è possibile inoculare batteri lattici naturali o selezionati. Allo stesso modo è possibile introdurre muffe per ottenere formaggi erborinati.

-Panna

La panna o crema di latte è la parte grassa del latte, ottenuta dal latte fresco per affioramento spontaneo a riposo oppure per centrifugazione.

-Burro

Si tratta di un fluido con punto di rammollimento prossimo alla temperatura ambiente, di aspetto solido e consistenza morbida, ricavato dalla parte lipidica del latte di diversi animali per inversione della panna ed eventuale fermentazione o salatura. Viene usato come condimento e in cucina, analogamente agli oli vegetali e allo strutto.

Il burro italiano è generalmente di bassa qualità, poiché le tecniche di lavorazione del latte sono principalmente orientate a produrre formaggi di qualità, così il burro in Italia viene prevalentemente prodotto per affioramento e ad alte temperature invece che per centrifuga e a basse temperature.

-Yogurt

Lo yogurt è un alimento di consistenza cremosa e di sapore acidulo derivato dal latte, il quale, grazie all'inoculazione di fermenti lattici specifici ed alla loro proliferazione, subisce un processo di fermentazione durante il quale il lattosio è trasformato in acido lattico.

Per la produzione dello yogurt può essere utilizzato ogni tipo di latte. Le fasi della lavorazione comprendono la selezione degli ingredienti, la miscelazione, l'omogeneizzazione, il trattamento termico, l'inoculazione della coltura, la fermentazione, il confezionamento e la distribuzione.

-Mozzarella

La mozzarella è un latticino a pasta filata, prodotto da secoli in Italia centrale e meridionale.

Viene preparato con latte bufalino oppure con latte vaccino.

La mozzarella tradizionale è ottenuta solo con latte fresco, sale, caglio e fermenti lattici ed è di più alta qualità; quella industriale è ottenuta usando acido citrico o acido lattico al posto dei fermenti; per distinguere le due tipologie è necessario leggere gli ingredienti.

La mozzarella deve il suo nome all'operazione di mozzatura compiuta per separare i singoli pezzi durante la lavorazione artigianale, come testimonia anche la sua antica denominazione: mozza

Uova

L'uovo è un alimento naturale di cui ci si può cibare direttamente o come ingrediente presente in numerosi piatti delle cucine di tutto il mondo.

Le uova di gallina sono le più comunemente consumate, ma si consumano anche le uova di altri volatili e sono altamente nutrienti. Forniscono una grande quantità di proteine complete di alta qualità, che contengono tutti gli amminoacidi essenziali per gli esseri umani, e forniscono quantità significative di parecchie vitamine e minerali. Sono inoltre uno degli alimenti singoli meno costosi contenenti proteine complete.

Dal 2004 sul guscio di tutte le uova di gallina prodotte nell'Unione europea è necessario che venga marchiato un apposito codice che ne consente la rintracciabilità, indicando il tipo e il luogo di allevamento da dove proviene l'uovo stesso.

Le uova prodotte da animali sani sono internamente sterili. La frequenza della contaminazione in utero delle uova da parte delle salmonelle (contaminazione endogena) di cui possono essere affetti gli animali è nell'ordine di 2 per milione. In compenso, la contaminazione del guscio (contaminazione esogena) con questi stessi batteri è frequente e rappresenta circa il 50% delle tossinfezioni umane da salmonella in Italia. Il guscio delle uova può anche essere contaminato da

muffe, nel caso vengano conservate in ambienti umidi, le quali danno origine a macchie superficiali di vario colore (gialle, blu o verdi) che possono portare alla putrefazione dell'uovo.

Miele

Il miele è un alimento prodotto dalle api e, in misura minore, da altri imenotteri sulla base di sostanze zuccherine che essi raccolgono in natura.

Le principali fonti di approvvigionamento sono il nettare, che è prodotto dalle piante da fiori (angiosperme), e la melata, che è un derivato della linfa degli alberi, prodotta da alcuni insetti succhiatori.

La produzione del miele comincia nell'ingluvie dell'ape bottinatrice, dove il nettare raccolto viene accumulato. Giunta nell'alveare, l'ape rigurgita il nettare liquido. Il compito passa alle api operaie, che digeriscono il nettare scindendo gli zuccheri complessi in zuccheri semplici. L'elaborazione del nettare viene ultimata con la sua disidratazione, per prevenire la fermentazione.

Le fasi di lavorazione del miele sono un insieme di procedimenti che l'apicoltore compie per ottenere il miele in forma commercializzabile.

Le api accumulano il miele prodotto nei favi contenuti nei melari. Al momento opportuno l'apicoltore decide di toglierli dall'arnia per portarli in laboratorio ed iniziare l'estrazione del miele.

Lo stoccaggio è una fase importante per il miele in quanto una elevata temperatura, un'esposizione al sole o altre operazioni errate possono compromettere la qualità, il sapore ed anche la commestibilità del prodotto.

Grazie alle qualità di antibatterico naturale, il miele è un alimento che naturalmente ha una lunga conservazione. Tuttavia, sono possibili alcune alterazioni dovute principalmente a umidità, luce e calore. L'umidità favorisce la fermentazione, che pur alterando il miele, può essere utilizzata per produrre l'idromele. La temperatura invece influenza direttamente l'aroma e i principi nutritivi. Analogo discorso vale per la luce diretta, quindi è opportuno conservare il miele in recipienti scuri o al chiuso.

PRODUZIONI VEGETALI

Conserve

Le conserve alimentari sono ogni varietà di ortaggio conservato in vari modi per poter essere mangiato anche fuori stagione. Sin dai tempi antichi venivano preparati in casa dalle massaie e conservati per essere consumati quando non esistevano freschi.

Fra le prime in assoluto si possono considerare le conserve di pomodoro nella versione di: passata, pelati e concentrati di pomodoro. Successivamente vennero prodotte le confetture di frutta e quindi ogni tipo di prodotto conservato, a seconda del tipo, sottolio o in salamoia. Fra le conserve alimentari possono essere considerate anche altri tipi di alimenti come ad esempio il pesce sottolio o al naturale e la carne in gelatina.

Oggi questo genere di alimenti è molto diffuso e si prevede lo sarà sempre di più, via via che l'industria alimentare andrà affinando la sua tecnologia per la produzione di alimenti conservati sempre più numerosi e pronti all'uso.

MANGIMI

Il mangime è una qualsiasi sostanza utilizzata per l'alimentazione del bestiame e, più in generale, degli animali.

Di solito, il mangime per il bestiame è ricco di proteine, carboidrati, grassi, sali minerali e vitamine. La razione giornaliera viene adeguata, oltre che al tipo di animale, all'età dello stesso e alle esigenze produttive delle singole specie e razze.

Il mangime cosiddetto "concentrato" è costituito da miscele di cereali, legumi e altri mangimi semplici, che fornisce all'animale in allevamento un elevato livello nutritivo per energia, proteine e altri elementi nutritivi. Questi prodotti concentrati vengono di solito realizzati da industrie apposite denominate industrie mangimistiche. Particolarmente diffuso negli allevamenti bovini da carne è la tecnica dell'unifeed (piatto unico) che si avvale di carri miscelatori in cui i vari mangimi semplici (farine di cereali e legumi, foraggi, sottoprodotti e integratori) sono introdotti contemporaneamente, mescolati e somministrati direttamente nella mangiatoia, con i vantaggi di semplificare la somministrazione e l'impatto sugli animali.

QUALITÀ ALIMENTO

SICUREZZA ALIMENTARE

I più frequenti problemi causati alla salute dal consumo alimentare sono di origine microbiologica. I batteri della salmonella, per esempio, sono un delle cause più diffuse di malattie, specialmente a causa della scarsa cottura del pollo e delle uova. La cosiddetta "intossicazione alimentare", è generalmente causata da batteri, da tossine, da virus, e da parassiti. Ogni anno, circa 7 milioni di persone soffrono di intossicazione alimentare. I due fattori più comuni che conducono alla malattia alimentare batterica sono la contaminazione trasversale di alimenti pronti, ed il controllo improprio della temperatura degli alimenti crudi.

Più raramente, può anche accadere che l'alimento sia contaminato chimicamente. L'alimento può anche essere alterato da una vasta gamma di corpi estranei provenienti dalla fabbricazione, questi corpi estranei possono includere parassiti, capelli, estremità di sigaretta, trucioli e tutti gli altri agenti inquinanti.

L'intossicazione alimentare è stata riconosciuta come malattia dell'uomo fin da Ippocrate. L'alimento contaminato o alterato posto in vendita, era un fatto comunemente accettato, fino a quando venne introdotta l'igiene e la refrigerazione. La scoperta delle tecniche per la sterilizzazione batterica usando il calore ed altri studi microbiologici hanno contribuito ad ottenere la qualità, oggi presente nelle nazioni sviluppate. Ciò è stato ulteriormente sostenuto tramite lo sviluppo di tecniche per l'immagazzinaggio dell'alimento e di metodi moderni di conservazione. Durante gli anni più recenti, una miglior comprensione delle malattie causate dagli alimenti ha condotto allo sviluppo sistematico di moderne metodologie quali l'analisi dei rischi ed i punti di controllo critici (HACCP), in grado di ridurre il pericolo contaminazioni.

Intossicazione alimentare

Un'intossicazione alimentare può verificarsi dopo aver mangiato cibi contaminati con virus, batteri o agenti chimici. I casi moderati durano solo poche ore, alla peggio un giorno o due, ma alcuni tipi come il botulismo o certe forme di intossicazione chimica sono gravi e possono anche mettere a rischio la vita se non si ricorre prontamente a un trattamento medico.

Un tipico esempio è costituito dalle tossinfezioni alimentari, che consistono in una sindrome tossica conseguente all'ingestione di alimenti, di per sé innocui, ma contaminati da germi o tossine microbiche: botulismo, salmonellosi, tossinfezione da germi vari (proteus, colibacillo, stafilococco, etc.). Gli alimenti più spesso in causa sono la carne, le uova, il latte e derivati, i pesci e altri alimenti non cotti o mal cotti.

La tossinfezione ha in genere l'aspetto di una gastroenterite emorragica, accompagnata da ipotensione, prostrazione generale, febbre, vomito, diarrea e soprattutto disturbi nervosi. La cura elettiva consiste nel riposo, nella somministrazione di antibiotici, eventualmente fleboclisi per reidratare il paziente e analettici cardiocircolatori; la dieta deve essere leggera e prevalentemente liquida.

Cause dell'intossicazione alimentare

Molti batteri possono causare intossicazione alimentare. Le persone che sono ammalate o infette possono trasmettere lo stafilococco ai cibi che stanno preparando. I batteri possono contaminare il pollame, le uova e la carne causando un'infezione da Salmonella; anche se potenzialmente fatale, nella maggior parte dei casi, però, questa è causa solo di una modesta sintomatologia.

Batteri pericolosi possono crescere nella carne e nel pesce, nei latticini e nei cibi preparati, cucinati e non, lasciati troppo a lungo a temperatura ambiente. I cibi conservati, specialmente quelli di produzione domestica, possono essere terreno di crescita per il botulino, un batterio che non ha

bisogno di ossigeno per moltiplicarsi e che non è distrutto dalla cottura. Questo batterio causa un'intossicazione alimentare rara, ma potenzialmente fatale. Il pesce crudo e soprattutto i molluschi contaminati possono determinare un'intossicazione alimentare di tipo virale.

Tossinfezioni alimentari

Infezione digestiva contratta attraverso l'ingestione di alimenti contaminati da diversi microrganismi, in particolare batteri o loro tossine.

L'alimento in causa è principalmente l'uovo, o una preparazione contenente uova, ma anche i latticini, crudi o poco cotti, i salumi, i molluschi e le conserve possono essere responsabili dell'infezione.

I germi responsabili sono quelli del genere Salmonella di tipo minore (Salmonella enteritidis), più raramente Shigella, Campylobacter, Clostridium perfringens e Yersinia. Talvolta l'infezione è dovuta ad alimenti contaminati dall'enterotossina (tossina che agisce sull'intestino) di uno stafilococco.

I sintomi di un'infezione da germi del genere Salmonella o Shigella, che insorgono circa 18 ore dopo l'ingestione, consistono in febbre, vomito, dolori addominali, diarrea e affaticamento. L'evoluzione è quasi sempre rapida e benigna e il malessere scompare spontaneamente. In caso di intossicazione stafilococcica, i disturbi digestivi compaiono 1-2 ore dopo l'ingestione e non sono accompagnati da febbre.

La perdita parziale della parola o della vista, la paralisi muscolare dalla testa in giù lungo tutto il corpo e il vomito possono indicare un botulismo, una gravissima e molto rara intossicazione alimentare di tipo batterico.

Una tossinfezione alimentare viene trattata soltanto con la reidratazione e, in alcuni casi, con farmaci antispastici e che rallentano il transito intestinale. In caso di febbre si possono prescrivere antibiotici a soggetti immunodepressi, bambini e anziani.

Tossina botulinica

La tossina botulinica è una proteina neurotossica prodotta dal batterio Clostridium botulinum. È la sostanza più tossica finora conosciuta. È una delle fonti più comuni di avvelenamento alimentare, in particolare nel caso in cui si consumino preparati a base di carne o conserve contaminate.

La tossina fu isolata in forma pura per la prima volta da P. Tamm e Hermann Sommer nel 1928, mentre nel 1949 il gruppo di ricerca guidato da Arnold Burgen identificò il meccanismo tramite il quale viene esplicata l'azione tossica.

Esistono sette tipi di tossina botulinica sierologicamente distinti, descritti dalle lettere dell'alfabeto dalla A alla G. La tossina botulinica è un polipeptide a catena doppia, con una catena di 100 kDa legata tramite ponti disolfuro a un'altra catena di 50 kDa. La catena leggera è un enzima proteasi che attacca una delle proteine della giunzione neuromuscolare, impedendo il rilascio di acetilcolina dalle vescicole. Inibendo il rilascio di questo neurotrasmettitore, la tossina interferisce con l'impulso nervoso e causa paralisi dei muscoli.

I sintomi causati dalla tossina botulinica sono paralisi flaccida, debolezza muscolare, diplopia, difficoltà del movimento, scoordinazione dei muscoli della faringe e dei muscoli volontari, e nei casi mortali, paralisi dei muscoli respiratori. Pochi ettogrammi (o chilogrammi per via aerea) di questa tossina potrebbero teoricamente uccidere tutti gli esseri umani presenti sulla Terra.

L'avvelenamento alimentare solitamente è causato dall'ingestione di cibo contaminato da spore del Clostridium Botulinum in condizioni anaerobiche, nel quale le spore germinano, crescono e producono tossina che si accumula nell'alimento. La forma vegetativa del batterio produce la tossina. È l'ingestione della tossina a causare il botulismo, non l'ingestione delle spore o del batterio vitale.

La tossina è rapidamente distrutta dal calore, ad esempio tramite la cottura dei cibi. Comunque, le spore sono resistenti al riscaldamento a 100°C per un lungo periodo di tempo.

La catena pesante della tossina è particolarmente importante per la penetrazione della stessa all'interno delle estremità assoniche, condizione alla quale è legata l'instaurarsi della paralisi. In seguito al legame della catena pesante con le proteine degli assoni terminali, la tossina può penetrare nei neuroni tramite endocitosi. La catena leggera della tossina possiede attività proteasica. I comuni rimedi utilizzati contro gli agenti nervini, nel caso di avvelenamento provocato dalla tossina botulinica agiscono invece potenziando gli effetti tossici. La morte sopravviene generalmente in seguito all'insufficienza respiratoria dovuta alla paralisi dei muscoli respiratori, pertanto il trattamento consiste nel somministrare antitossine e nell'effettuare la ventilazione artificiale. Se la terapia viene iniziata rapidamente, il suo effetto è veloce e massimo. Occasionalmente il recupero può richiedere diverse settimane o mesi.

HACCP e CONTROLLI QUALITATIVI

ANALISI DEI RISCHI E CONTROLLO DEI PUNTI CRITICI

L'HACCP o Hazard Analysis and Critical Control Points, letteralmente Analisi dei Pericoli e dei Punti Critici di Controllo, è un protocollo, ovvero un insieme di procedure, volto a prevenire i pericoli di contaminazione alimentare.

Esso si basa sul monitoraggio dei "punti della lavorazione" degli alimenti in cui si prospetta un pericolo di contaminazione, sia di natura biologica che chimica o fisica. È sistematico ed ha basi scientifiche; la sua finalità è quella di individuare ed analizzare pericoli, e mettere a punto sistemi adatti per il loro controllo.

Prima dell'adozione del sistema HACCP le verifiche venivano effettuate solo a valle del processo produttivo, con analisi della salubrità del prodotto finito, pronto per la vendita al consumatore, e spesso il prodotto era consumato prima dell'individuazione dell'irregolarità.

Dal 1997 è stato introdotto in Italia il sistema HACCP che, promuovendo il concetto di prevenzione, analizza i possibili pericoli verificabili in ogni fase del processo produttivo e nelle fasi successive come lo stoccaggio, il trasporto, la conservazione e la vendita o somministrazione al consumatore.

Il sistema pone un importante accento sulla qualità alimentare, in particolare riguardo a salubrità e sicurezza; concetto che va oltre la semplice soddisfazione del cliente, ma punta piuttosto alla tutela della salute pubblica.

Il sistema HACCP venne ideato negli anni sessanta negli Stati Uniti, con l'intento di assicurare che gli alimenti forniti agli astronauti della NASA non avessero alcun effetto negativo sulla salute o potessero mettere a rischio le missioni nello spazio.

L'HACCP è stato introdotto in Europa negli anni Novanta, con la Direttiva 43/93/CEE (recepita in Italia con il D.Lgs 155/1997), che prevede l'obbligo di applicazione del protocollo HACCP per tutti gli operatori del settore alimentare. Questa normativa è stata sostituita dal Reg. CE 852/2004 entrato in vigore dal 01/01/2006 e recepito in Italia con il D.Lgs 193/2007, con quale viene inoltre definitivamente abrogato il precedente decreto legislativo e vengono decretate le sanzioni per inadempienza.

Data l'ampia gamma di imprese alimentari prese in considerazione e la grande varietà di prodotti alimentari e di procedure di produzione applicate agli alimenti, sono state redatte dalla Commissione Europea delle Linee guida generali sull'applicazione delle procedure riferite ai principi del sistema HACCP, venendo così in aiuto a tutti coloro che intervengono nella catena della produzione alimentare. Tali linee-guida danno indicazioni per un'applicazione semplificata delle prescrizioni in materia di HACCP, in particolare nelle piccole imprese alimentari.

Sono tenuti a dotarsi di un piano di autocontrollo tutti coloro che sono interessati alla produzione primaria di un alimento, alla sua preparazione, trasformazione, fabbricazione, confezionamento, deposito, trasporto, distribuzione, manipolazione, vendita o fornitura, compresa la somministrazione al consumatore.

Nel 2006 il sistema HACCP è stato reso obbligatorio anche per le aziende che hanno a che fare con i mangimi per gli animali destinati alla produzione di alimenti.

I punti fondamentali del sistema dell'HACCP, la cui applicazione nelle aziende alimentari è diretta a far sì che un qualsivoglia alimento non sia causa di danno alla salute del consumatore, sono identificabili in sette principi:

Principio 1 – Individuazione e analisi dei pericoli:

Identificare i pericoli potenziali associati alla produzione di un alimento in tutte le sue fasi, dalla coltura o allevamento fino al consumo, che dovranno essere controllati. Valutare le probabilità che il pericolo si concretizzi e la gravità dell'eventuale danno sulla salute del consumatore.

Principio 2 – Individuazione dei CCP (punti critici di controllo):

Un CCP (critical control point) è un punto, una fase, o una procedura in cui è possibile ed indispensabile attuare un controllo al fine di eliminare, prevenire o ridurre a limiti accettabili un pericolo. Per identificare le fasi che possono essere controllate viene utilizzato l'"albero delle decisioni", al fine di comprendere se un passaggio all'interno della produzione di un alimento è da ritenersi un punto critico di controllo o solamente un punto critico. Ogni fase rappresenta uno stadio di produzione e/o manipolazione degli alimenti.

Principio 3 – Definizione dei limiti critici:

Stabilire i limiti critici che devono essere osservati per assicurare che ogni CCP sia sotto controllo. In pratica, limite critico è quel valore di riferimento che separa l'accettabilità dall'inaccettabilità; in altre parole, sono ciò che consente di garantire la sicurezza di un prodotto finito. I limiti critici sono desunti da quelli di legge, ove presenti, oppure possono derivare dall'adozione di una pratica igienica di lavorazione propria di un'azienda.

Importante ricordare che non sempre i limiti critici sono rappresentati da valori numerici: possono infatti corrispondere a quantità rilevabili sensorialmente, come la presenza o assenza di sporco visibili.

Principio 4 – Definizione delle procedure di monitoraggio:

Attuare una serie di osservazioni e misure per tenere sotto controllo e entro i limiti critici i CCP.

Il monitoraggio consiste in interventi e modalità che dipendono dalla realtà dell'azienda in oggetto; un piano minimo di controllo comunque solitamente prevede:

- controllo e qualifica fornitori
- controllo conservazione dei prodotti
- registrazione temperature di conservazione
- controllo e predisposizioni di procedure di lavorazione definite in tempi e modi
- controllo e pianificazione condizioni igieniche.

Un piano minimo di controllo deve inoltre riportare:

- chi si occupa di monitorare e verificare i dati rilevati
- quando vengono effettuate le misurazioni o le osservazioni
- come vengono effettuati il monitoraggio e la valutazione dei risultati.

Principio 5 – Definizione e pianificazione delle azioni correttive:

Stabilire in anticipo le azioni da attuare quando il monitoraggio indica che un particolare CCP è fuori dai limiti critici.

La sua efficacia è data dalla sua tempestività che deve consentire il ritorno alle normali condizioni di sicurezza nel più breve tempo possibile.

Le azioni correttive devono comprendere:

- la correzione della causa dello scostamento dal limite critico
- la verifica che il CCP sia di nuovo sotto controllo
- le procedure da attivare verso gli alimenti non sicuri perché prodotti quando il CCP non era sotto controllo.
- la registrazione dell'accaduto e delle misure adottate

- l'eventuale individuazione di misure preventive più efficienti.

Principio 6 _ Definizione delle procedure di verifica:

Stabilire procedure per la verifica che includano prove supplementari e procedure per confermare che il sistema HACCP stia funzionando efficacemente.

Permette di riconoscere l'effettiva adeguatezza delle misure adottate in riferimento allo stato dall'erta della situazione. La frequenza delle procedure di verifica deve essere indicata nel piano di autocontrollo, ed è influenzata dalle dimensioni dell'azienda, dal numero di dipendenti, dal tipo di prodotti trattati e dal numero di non conformità rilevate.

Va ricordato che il sistema HACCP è un sistema dinamico che può venir cambiato e integrato.

Principio 7 _ Definizione delle procedure di registrazione:

Predisporre documenti e registrazioni adeguati alla natura e alle dimensioni dell'impresa alimentare, al fine di dimostrare l'effettiva applicazione delle misure precedentemente esposte.

Stabilire una documentazione riguardante tutte le procedure di registrazione appropriate a questi principi e loro applicazioni. La documentazione deve essere firmata dal responsabile del piano di autocontrollo. Sulla documentazione si basa infatti gran parte del controllo ufficiale da parte dei servizi di prevenzione dell'USL (Servizi Veterinari e SIAN).

Relazione tra HACCP e Standard ISO 22000

Lo Standard ISO 22000 è una norma dell'Ente di Normazione Internazionale ISO creata al fine di armonizzare gli standard nazionali e internazionali in materia di sicurezza alimentare e HACCP e la cui applicazione avviene a discrezione dell'impresa agroalimentare.

Questo standard si basa sui principi dell'HACCP e del Codex Alimentarius, pur restando in linea con i precedenti ISO 9000 e ISO 14000.

Lo standard garantisce la sicurezza agroalimentare "dal campo alla tavola", sulla base di elementi quali:

- la comunicazione interattiva
- la gestione del sistema
- l'adozione degli schemi di buona pratiche di preparazione
- i principi HACCP

La certificazione secondo la norma ISO 22000 è un elemento particolarmente importante per dimostrare l'impegno di un'azienda nei confronti della sicurezza alimentare, nel pieno rispetto dei requisiti di Corporate governance, Responsabilità sociale d'impresa e Bilancio di sostenibilità.

Il processo descritto nella norma ISO 22000 prevede i seguenti passaggi:

- identificazione, valutazione e controllo dei rischi agroalimentari che potrebbero verificarsi
- comunicazione lungo la filiera agroalimentare delle informazioni sui problemi di sicurezza connessi al prodotto
- comunicazione a tutta l'organizzazione coinvolta delle informazioni sullo sviluppo, implementazione e aggiornamento di tutto ciò che riguarda la sicurezza agroalimentare
- valutazione periodica e aggiornamento del sistema di gestione della sicurezza agroalimentare

ANALISI POST PROCESSO PRODUTTIVO

Essenziale è il controllo di verifica post produzione, che garantisce l'effettivo funzionamento delle norme HACCP. Viene attuato mediante analisi di laboratorio accurate eseguite in appositi laboratori interni o esterni all'azienda di produzione, nella seconda ipotesi si evitano i comuni casi di frode e di scarsa qualità a favore di un maggior guadagno dell'azienda. In questo settore operano tre importanti enti nazionali: l'ASL che si fa carico della prevenzione e della formazione nel settore; il corpo carabinieri del settore NAS addetti al controllo delle frodi e contraffazioni; gli istituti zooprofilattici sperimentali che si fanno carico delle analisi di laboratorio ufficiali sia per conto delle ditte che degli altri enti.

ASL: azienda sanitaria locale

I servizi sanitari erano originariamente gestiti dalle casse mutualistiche che avevano evidenti disparità di trattamento tra lavoratori e disoccupati o sottoccupati. In seguito però gli ospedali, le case di riposo e le opere pie vennero trasformati da enti privati in Istituti pubblici di assistenza e beneficenza. Nel 1978 i servizi sanitari divenivano totalmente a carico statale e si erogavano in tutto il territorio nazionale. Dall'inizio del 1993 l'ASL ha comunque preso la caratteristica di organo di competenza delle regioni, acquisendo una propria soggettività giuridica con un'autonomia che ha in seguito assunto anche carattere imprenditoriale.

Le ASL fanno parte del Servizio sanitario nazionale; sono aziende con personalità giuridica pubblica e sono centri di imputazione di autonomia imprenditoriale. Esse assolvono i compiti del sistema sanitario nazionale italiano in un determinato ambito territoriale.

Ciascuna ASL è organizzata nelle seguenti 3 strutture tecnico-funzionali complesse:

- presidio ospedaliero
- distretto socio-sanitario
- dipartimento di prevenzione

Il Dipartimento di prevenzione è una struttura tecnico funzionale dell'Azienda sanitaria preposta alla promozione della tutela della salute collettiva con l'obiettivo della promozione della salute, della prevenzione delle malattie, del miglioramento della qualità della vita e del benessere animale e della sicurezza alimentare.

NAS: Comando carabinieri per la tutela della salute

Il Comando carabinieri per la tutela della salute è un'unità specializzata posta sotto il Comando divisione unità specializzate dell'Arma dei Carabinieri. Da essa dipendono i vari nuclei antisofisticazioni e sanità del corpo, più spesso indicati semplicemente come NAS. Ha sede nella città di Roma, ed è retta da un generale di brigata o di divisione. Esso esercita funzioni di alta direzione, coordinamento e controllo dei comandi dipendenti.

Il 15 ottobre 1962, a seguito di intese intercorse tra il Ministero della Sanità, il Ministero della Difesa ed il Comando generale dell'Arma dei carabinieri, furono istituiti i NAS (nuclei antisofisticazioni e sanità), posti alle dipendenze funzionali del Ministero della Sanità con il compito di «vigilare sulla disciplina igienica della produzione, commercializzazione e vendita delle sostanze alimentari e delle bevande, a tutela della salute pubblica».

Il Comando carabinieri per la tutela della salute si articola in un comando centrale, alle dipendenze funzionali del Ministro della Salute e un vice comandante responsabile dell'organizzazione diretta. Dal vice comandante dipende anche un reparto analisi strutturato nelle sezioni di criminalità alimentare e farmaceutica, pianificazioni e valutazione rischi, controlli antidoping.

I NAS hanno il potere di intervento in tutti i luoghi dove si producono, si somministrano, si depositano o si vendono prodotti destinati all'alimentazione. Essi possono entrare in tutti i luoghi in cui vengono prodotti, o si suppone che lo siano, tali sostanze in tutte le ore del giorno o della notte.

Le indagini nel settore delle sofisticazioni alimentari, data la peculiarità degli illeciti che si perseguono, sono condotte con criteri operativi che differiscono sostanzialmente dalle normali tecniche di polizia giudiziaria.

Fra le modalità di lavoro che caratterizza il NAS vi sono le ispezioni fatte in uno o più settori di intervento su tutto il territorio nazionale quali ospedali, case di cura private e strutture ricettive per anziani, verifiche in materia di legittimo esercizio delle professioni sanitarie e relative arti ausiliarie, ispezioni presso industrie farmaceutiche. Fra gli altri compiti vi è anche il contrasto al traffico ed alla distribuzione illegale di medicinali e loro contraffazione ed il controllo sull'uso illegale di anabolizzanti e altre sostanze farmacologicamente attive negli allevamenti di animali, nonché il contrasto al commercio illegale di prodotti di provenienza extra-comunitaria, pericolosi per la salute dei consumatori, in quanto realizzati e posti in vendita senza il rispetto dei requisiti di legge.

Istituti zooprofilattici sperimentali

Gli istituti zooprofilattici sperimentali, IZS, sono enti sanitari di diritto pubblico con autonomia gestionale ed amministrativa, facenti parte del Servizio Sanitario Nazionale, quale strumento tecnico ed operativo per la sanità animale, il controllo della salute e qualità degli alimenti di origine animale, l'igiene degli allevamenti ed attività correlate. Gli IZS sono sottoposti alla vigilanza del Ministero della Salute.

Gli IZS rappresentano un importante strumento operativo di cui dispone il Servizio Sanitario Nazionale per assicurare la sorveglianza epidemiologica, la ricerca sperimentale, la formazione del personale, il supporto di laboratorio e la diagnostica nell'ambito del controllo ufficiale degli alimenti. Costituiscono una struttura sanitaria integrata, tra le uniche in Europa, in grado di assicurare una rete di servizi per verificare la salute degli alimenti e dell'ambiente, per la salvaguardia della salute dell'uomo.

Hanno compiti in materia di ricerca scientifica, di accertamento dello stato sanitario degli animali, garantendo ai servizi veterinari delle Regioni e delle ASL le prestazioni e la collaborazione tecnico-scientifica necessarie all'espletamento delle funzioni di sanità pubblica veterinaria. Producono, con l'autorizzazione del Ministero della Salute vaccini ed ogni altro prodotto necessario per la profilassi delle malattie trasmissibili degli animali, quali: peste suina africana, brucellosi animali, dell'echinococcosi-iatidiosi, dei residui anabolizzanti, del cosiddetto "morbo della mucca pazza", della lingua blu, ecc.

Gli istituti zooprofilattici sperimentali sono in numero di 10 con 87 sezioni diagnostiche periferiche. La funzione di raccordo e coordinamento delle attività degli IZS è svolta dalla Direzione generale della sanità pubblica veterinaria, alimenti e nutrizione del Ministero della Salute che ne definisce, mediante il lavoro della commissione scientifica nazionale, le linee guida e le tematiche principali.

ISTITUTO ZOOPROFILATTICO SPERIMENTALE DELLA LOMBARDIA E DELL'EMILIA "BRUNO UBERTINI"

Storia

Nel 1907 Pietro Stazzi creava a Milano una "Stazione Sperimentale delle malattie infettive del bestiame", prima in Italia. Tale evento innescò la nascita a catena di iniziative analoghe in tutto il Paese; fu intorno agli anni Venti che gli allevatori bresciani progettaron una loro Stazione Sperimentale che prese forma nel 1921, soprattutto grazie a uomini dotati di grande capacità che nel nascente Istituto gettarono ogni loro energia. Tra questi il Prof. Bruno Ubertini, cui oggi è intitolato l'Istituto. Nel 1999 l'Istituto assume l'attuale denominazione, con la corretta indicazione della regione "Emilia Romagna" e l'aggiunta del nome del prof. "Bruno Ubertini" insigne direttore dell'Istituto ed illustre studioso e ricercatore.

Missione e Visione

La missione dell'IZSLER è:

"Operare a favore della salute pubblica e delle attività produttive del settore agro-alimentare nel rispetto dei valori etici, al fine dello sviluppo socio-economico del paese".

La visione che l'IZSLER propone è disegnata dall'insieme della ricerca, del supporto tecnico-scientifico e della formazione, che sono strumenti indispensabili per l'espletamento della missione.

In quest'ambito si riconoscono come prevalenti:

- l'attivazione e il rafforzamento dei rapporti con le specifiche strutture della Commissione Europea e le istituzioni internazionali quali OIE, FAO, WHO;
- l'attivazione e il rafforzamento del collegamento e della comunicazione fra le strutture ministeriali competenti, i Servizi regionali, la rete degli Istituti Zooprofilattici e i consumatori;
- l'ampliamento dell'assistenza e del supporto alle attività produttive, primarie e di trasformazione;
- l'elezione a ruolo di riferimento dei sistemi di accreditamento della qualità, intesa sia nell'ambito delle specifiche competenze sanitarie che di quelle amministrative.

Compiti primari dell'Istituto:

- servizio diagnostico delle malattie degli animali e delle zoonosi;
- attività di controllo degli alimenti destinati all'uomo e agli animali;
- supporto analitico e consultivo dell'attuazione dei piani di profilassi, risanamento ed eradicazione;
- ricerca applicata in materia di igiene degli allevamenti e di miglioramento delle produzioni zootecniche e, quindi, del benessere animale;
- sorveglianza epidemiologica nell'ambito della sanità animale, igiene delle produzioni zootecniche e degli alimenti;
- ricerca sperimentale applicata e di base nell'ambito veterinario e degli alimenti.

Attività diagnostica

L'Istituto ha da sempre investito notevoli risorse in questo servizio, creando sul territorio di competenza una rete di sezioni diagnostiche provinciali strettamente collegate. Questo tipo di assetto permette un attivo interscambio di conoscenze tra i laboratori specializzati della sede e quelli a contatto con il territorio.

La zootecnia lombarda ed emiliana ha avuto negli ultimi vent'anni un notevole sviluppo e, di conseguenza, sono cambiate le esigenze diagnostiche, non solo nei confronti delle malattie infettive

trasmissibili, ma anche delle patologie metaboliche e delle tecnopatie che interferiscono negativamente sulle produzioni zootecniche.

L'attività diagnostica si esplica ad ampio raggio nell'ambito dei settori di maggior interesse zootecnico e si realizza con ampie prestazioni che non si limitano alle sole analisi di laboratorio ma che comprendono anche interventi in allevamento, in alcuni casi organizzati in veri e propri programmi di assistenza alle aziende.

L'attività diagnostica dell'Istituto si articola in molteplici tipologie che formano un reticolo strettamente connesso:

- La diagnostica anatomo-patologica, attività più tradizionale, esprime la notevole professionalità ed esperienza dei veterinari dell'Istituto: sui reperti necroscopici si esplicano, successivamente, tutti gli approfondimenti analitici necessari.
- La diagnostica batteriologica, indirizzata all'identificazione delle patologie sostenute da batteri mediante l'isolamento dei microrganismi e la loro successiva identificazione.
- La diagnostica virologica, finalizzata all'isolamento di virus da campioni patologici ed alla loro identificazione.
- La diagnostica parassitologica, mirata non solo alla diagnosi delle malattie degli animali ma anche alla evidenziazione della presenza di parassiti negli alimenti di origine animale.
- La diagnostica sierologica, che ha portato allo sviluppo di svariate tipologie di metodiche fino alle più innovative.
- La diagnostica entomologica, sviluppata negli ultimi anni, finalizzata all'identificazione di vettori di malattie infettive degli animali e dell'uomo.

Il continuo evolversi delle esigenze diagnostiche ha spinto l'Istituto a mettere a punto strumenti d'indagine sempre più sofisticati al fine di fornire all'utenza risposte veloci ed estremamente qualificate; un esempio è la diagnostica basata sulla biologia molecolare (PCR), che individua agenti batterici, virali, micotici e parassiti di difficile isolamento con i metodi tradizionali, mediante identificazione del DNA e del RNA.

Sicurezza alimentare

Il controllo delle filiere alimentari è l'area di competenza che ha avuto il rilievo principale, sia sui controlli a supporto dell'attività pianificata degli organi del Servizio Sanitario Nazionale, che nell'ambito dell'attività di autocontrollo degli operatori economici delle produzioni primarie e della trasformazione.

I settori analitici coprono il campo della microbiologia, chimica, fisica, merceologia e della biologia molecolare, e si occupano degli alimenti di origine animale e di quelli per uso zootecnico.

Nel settore della batteriologia degli alimenti l'Istituto ha una lunga tradizione che si esprime nella presenza, in ogni sezione diagnostica, di un laboratorio di "Microbiologia degli Alimenti", impegnato anche nelle diagnosi dei parassiti che li possono infestare.

Alla suddetta attività nel campo alimentare si è affiancata, mediante la biologia molecolare, anche la ricerca di agenti virali e la ricerca degli OGM.

In questo ambito l'attività analitica dell'Istituto ha avuto notevole sviluppo e avrà sempre maggior importanza vista l'aumentata sensibilità dei consumatori e degli organi di controllo nei riguardi della sicurezza alimentare.

L'analisi dei prodotti destinati all'alimentazione animale riveste un ruolo primario ai fini della salubrità e sicurezza degli alimenti di origine animale e riguarda: la composizione percentuale, il controllo quantitativo dei farmaci e degli additivi e la presenza di sostanze indesiderate come micotossine, contaminanti ambientali e pesticidi, o di materie prime non ammesse come ad esempio le farine di carne.

Sugli alimenti di origine animale si effettua il controllo della corrispondenza al dichiarato in etichetta, mediante la ricerca degli additivi e conservanti, lo stato di conservazione ed eventuali adulterazioni.

Relativamente alla presenza di residui si controllano: residui di pesticidi, di contaminanti ambientali, sostanze farmacologicamente attive e/o ad azione anabolizzante non consentite.

L'elevato numero delle sostanze chimiche, la complessità del meccanismo di azione, la formazione di metaboliti che possono avere effetti più pericolosi delle molecole originali, la lunga persistenza di gran parte di questi nell'ambiente, hanno comportato un ulteriore affinamento specialistico del settore chimico dell'Istituto per coadiuvare al meglio chiunque sia coinvolto nella salvaguardia della sicurezza degli alimenti.

La politica dell'Istituto a supporto della sicurezza alimentare tuttavia, nell'ottica di una tutela efficace del settore, non si è rivolta solo alle autorità ma ha tenuto conto delle realtà produttive sia primarie che connesse alla trasformazione; e pertanto di recente è stato costituito un Reparto di sorveglianza epidemiologica degli allevamenti, destinato a diventare filtro determinante nello sviluppo dei "Sistemi di Analisi del rischio delle filiere alimentari" che, oltre ad una precipua attività, implementerà il sistema informativo degli osservatori epidemiologici dell'Istituto in merito a tale problematica.

L'Istituto fornisce in tale ambito una gamma di servizi che comprende una vasta attività analitica, oltre un milione di analisi/anno, a supporto del servizio veterinario pubblico, dei produttori, dei trasformatori e degli altri operatori privati delle filiere produttive lattiero-casearia e carnea.

Simile attività analitica viene svolta, a supporto dei servizi veterinari delle Aziende Sanitarie Locali delle due regioni di competenza, nell'ambito dei controlli previsti dalla normativa vigente sul latte ed i prodotti a base di latte.

A completare l'offerta di determinazioni analitiche dei laboratori sono poi le numerose prove eseguite su richiesta degli operatori privati del settore (ad esempio per la diagnosi della mastite, per il controllo dei processi produttivi in caseificio ecc.).

Controllo delle zoonosi

Il termine zoonosi indica le infezioni naturalmente trasmissibili dall'animale all'uomo. Il controllo delle zoonosi è, con la sicurezza alimentare, un momento centrale dell'attività di sanità pubblica in cui l'Istituto è attivamente coinvolto.

Brucellosi, Tubercolosi, Rabbia, Echinococcosi, Carbonchio, Salmonellosi, Legionellosi, Listerosi, Tularemia, Leptosirosi sono alcune tra le principali zoonosi nel cui controllo l'Istituto è particolarmente impegnato.

L'istituto fornisce inoltre un supporto importante all'attuazione dei piani di eradicazione nazionali della Brucellosi e Tubercolosi mediante l'esecuzione di numerosi test e nel monitoraggio diagnostico dei "selvatici" per il controllo della Rabbia e della Tularemia.

Nell'ambito del controllo delle zoonosi ed al contempo della sicurezza alimentare, un ruolo particolare va attribuito all'attività svolta dall'Istituto nei confronti dell'Encefalopatia Spongiforme dei Bovini (BSE).

L'Istituto ha compiuto un ingente sforzo strutturale ed organizzativo allestendo un servizio che, nel giro di poche settimane, è stato in grado di passare da poche decine a circa 2000 analisi al giorno.

Presso i laboratori dell'Ente si esegue il 65-70% del totale dei test BSE effettuati in Italia, essendo qui presenti sia larga parte del patrimonio bovino lattifero nazionale che le maggiori industrie di macellazione.

L'impegno dell'Istituto nell'ambito del piano di sorveglianza della BSE è significativo anche nel controllo dei mangimi per ruminanti, in particolare per la ricerca al loro interno di farine di origine animale, il cui utilizzo è stato vietato dal luglio del 1994 in quanto riconosciute come principale, se non unico, veicolo di trasmissione della BSE, e si concretizza nell'analisi di centinaia di campioni di mangimi/anno.

Benessere animale

Il settore del Benessere Animale è stato oggetto di significativi interventi del Legislatore Comunitario e Nazionale, al fine di introdurre misure minime di protezione delle specie animali a garanzia di livelli accettabili di benessere, nelle diverse fasi dei cicli zootecnici.

L'accertamento puntuale e tempestivo dei livelli di benessere animale, inoltre, è funzionale all'attività di certificazione delle filiere alimentari, in linea con le attuali direttive della Unione Europea sulla qualità delle produzioni zootecniche, intesa come qualità totale del processo produttivo, e sulla valorizzazione delle produzioni locali tipiche.

I parametri che caratterizzano lo stato di benessere sono la sintesi di un approccio combinato, multidisciplinare, basato su competenze di clinica, etologia, immunologia, immuno-biochimica.

L'accertamento di buone condizioni di benessere nel corso dei cicli zootecnici rappresenta, inoltre, un'ulteriore garanzia per il consumatore, anche rispetto ad eventuali trattamenti illeciti sugli animali, individuabili attraverso l'alterazione di parametri di omeostasi metabolica e comportamentale.

Sulla base di tali parametri si proporranno, nella realtà dell'allevamento intensivo, anche idonei interventi di igiene zootecnica e/o di immunomodulazione mirata, soprattutto al fine di prevenire risposte di stress cronico che possono sfociare in patologie condizionate.

La definizione di parametri precisi e obiettivamente di benessere animale consentirà, infine, di portare evidenze nei consessi internazionali dove si discutono e si stabiliscono i requisiti minimi connessi alle condizioni degli allevamenti a carattere intensivo ed estensivo.

Biotechnologie

Le biotecnologie possono essere definite come "ogni tecnologia che utilizza organismi viventi quali batteri, lieviti o loro componenti al fine di ottenere prodotti o servizi".

L'Istituto, che da sempre svolge attività nel settore delle biotecnologie, ha attivato nel 1987 il Dipartimento di Ricerca che opera, tra l'altro, anche nell'ambito della ricerca e dell'applicazione delle biotecnologie innovative:

- l'ingegneria genetica (tecniche del DNA ricombinante) applicata alla produzione, da parte di microrganismi modificati, di vaccini e reagenti diagnostici;
- la tecnica degli ibridomi per produrre anticorpi monoclonali con finalità diagnostiche e tecnologiche.

L'attività nel settore biotecnologico si esplica anche nella messa a punto e nell'esecuzione di test diagnostici, basati sia sull'identificazione degli acidi nucleici (PCR, Microarrays), che sull'identificazione degli antigeni e/o degli anticorpi (metodi ELISA allestiti con anticorpi monoclonali) specifici dei vari microrganismi.

Centro allevamento sperimentazione animale

I tre principali settori di attività del Centro allevamento e sperimentazione animale, tra loro interconnessi, in particolare rispondono alle finalità sotto esposte.

- Produzione di animali da laboratorio e di reagenti biologici, è settore strategico per la ricerca e per molteplici attività routinarie di laboratorio dell'Ente.
- Attività di sperimentazione e ricerca, segue il duplice obiettivo di coordinare le sperimentazioni animali interne all'Istituto, fornendo anche un servizio di supporto con personale del Centro, e di sviluppare tematiche di ricerca proprie del Centro stesso.
- Attività di laboratorio e controllo qualità, ha la finalità di garantire, oltre che la conformità di soggetti indenni da alcuni patogeni, lo stato delle altre tipologie di animali utilizzati ed anche la qualità dei prodotti biologici da questi ottenuti, successivamente distribuiti alle altre strutture come "reagenti". Si avvale di uno specifico "Laboratorio di controllo di qualità degli animali da laboratorio", collocato all'interno del Centro stesso.

Attività di produzione

L'attività di produzione di sieri e vaccini è stata fondamentale nel controllo delle malattie diffuse. Attualmente tale attività concerne i vaccini stabulogeni, i kit diagnostici innovativi, gli antigeni virali e batterici per l'attività analitica, i terreni colturali pronto uso, per i laboratori dell'Istituto che erogano servizi.

Nell'ambito della trasformazione delle attività produttive dell'Ente si colloca anche un recente settore: quello dei prodotti di immunomodulazione, sviluppato in funzione di alcuni caratteri strategici connessi al loro impiego, quali la riduzione del fabbisogno di antibiotici e chemioterapici, l'assenza di problemi di residui e di tempi di sospensione, la compatibilità con i capitolati tecnici di allevamento "biologico" che si stanno sempre più diffondendo.

In questo settore è stata consolidata la produzione di alfa-interferone, nell'ambito delle strategie finalizzate alla diminuzione in campo zootecnico dell'utilizzo di antibiotici a vantaggio di prodotti in grado di aumentare l'immunità degli animali da reddito, specie nel comparto suinicolo.

ORGANIZZAZIONE

La Sede Centrale dell'IZSLER si trova a Brescia ed è articolata in 3 Aree a loro volta suddivise in Reparti (strutture complesse) e Laboratori (strutture semplici):

- Area Diagnostica (R. Batteriologia - R. Virologia - R. agenti ad alta diffusione e biotecnologie diagnostiche - R. Genomica - R. Proteomica)
- Area Controllo degli Alimenti e delle Trasformazioni(R. chimica degli alimenti di origine animale - R. chimica degli alimenti di origine vegetale e mangimi - R. Microbiologia - R. chimica applicata alle tecnologie alimentari - R. tecnologia acidi nucleici applicata agli alimenti - R. produzioni primarie)
- Area delle Attività di Servizio (R. animali da laboratorio - R. produzione terreni - R. produzione vaccini e reagenti - R. substrati cellulari e immunologia cellulare)

REPARTO VIROLOGIA

L'attività svolta nel Reparto di Virologia prevede principalmente l'esecuzione di analisi su sangue e su materiali patologici degli animali di interesse zootecnico provenienti dal territorio di competenza, atte a ricercare i virus o loro componenti nei materiali patologici in modo diretto e con la messa in evidenza delle lesioni negli organi in sezioni istologiche e immunolocalizzando gli antigeni con colorazioni immunoistochimiche.

Altre attività :

- Produzione di reagenti diagnostici per alcune malattie di Piano utilizzati nelle diverse strutture IZSLER.
- Ricerca applicata intesa come messa a punto di nuove metodologie diagnostiche nei confronti di patologie emergenti.
- Supporto agli operatori del comparto zootecnico per la risoluzione dei problemi sanitari intercorrenti e la pianificazione di strategie per la prevenzione degli stessi.

L'attività di ricerca si è concretizzata in numerose ricerche finanziate a livello regionale, ministeriale e comunitario, volte alla produzione di reagenti e allo sviluppo, alla messa a punto e alla validazione di metodi diagnostici. Ampi e vari sono i settori zootecnici interessati da tale attività di ricerca, che è frequentemente 'indotta' da eventi morbosi contingenti quali: influenza aviaria, influenza suina, coronavirus animali, rotavirus mammiferi ed aviari, virus dell'epatite E del suino, virus enterici del coniglio e delle specie avicole, virus trasmessi da vettori.

REPARTO AGENTI AD ALTA DIFFUSIONE E BIOTECNOLOGIE DIAGNOSTICHE

Presso il Reparto opera il Centro Nazionale di Referenza per le Malattie Vescicolari (CERVES), il Centro esegue attività di diagnostica a livello nazionale ed ha una intensa attività di ricerca e sviluppo a livello internazionale e rapporti di consulenza e collaborazione con organismi quali FAO, OIE, EU, IAEA.

Il Reparto ha sviluppato competenze tecniche e scientifiche nell'ambito delle biotecnologie, in particolare sin dagli anni '80 nella produzione e caratterizzazione di anticorpi monoclonali, e, a partire dagli anni '90 di proteine espresse attraverso tecnologie del DNA ricombinante. I kit diagnostici sviluppati e prodotti presso il Reparto vengono distribuiti ai laboratori dell'IZSLER, in ambito nazionale ed internazionale.

REPARTO GENOMICA

Il Reparto di Genomica opera principalmente nell'ambito della Sanità Animale utilizzando moderne tecniche di biologia molecolare nelle proprie attività di diagnostica e di ricerca e sviluppo. L'attività più consistente è associata alla diagnosi molecolare di malattie virali del suino e all'applicazione di metodi molecolari per la ricerca, identificazione e caratterizzazione di micobatteri effettuata dal Centro di Referenza per la tubercolosi da *M. bovis*. Il reparto è inoltre impegnato nel settore della Sicurezza Alimentare per la ricerca e quantificazione di OGM in matrici vegetali utilizzate per l'alimentazione umana o animale. Grazie al sequenziamento degli acidi nucleici il laboratorio di analisi genomiche è in grado di identificare e caratterizzare specie batteriche, virali etc.

REPARTO PROTEOMICA

Il reparto di Proteomica opera nell'area della Sanità Animale nei settori della diagnostica, della ricerca e sviluppo e della produzione di reagenti diagnostici.

In termini quantitativi, la diagnosi delle TSE animali è l'attività più rilevante.

L'attività qualitativamente più significativa ed avanzata è connessa alla diagnostica delle malattie virali dei lagomorfi.

In relazione ai mandati dei Centri, il reparto produce reagenti diagnostici a fini vari, anche nel formato simil-kits.

In aggiunta il Reparto prepara e fornisce, regolarmente e da anni, reagenti immuno-marcati di varia specificità, utilizzati da più laboratori interni all'IZSLER, sia per diagnosi che ricerca.

REPARTO CHIMICA DEGLI ALIMENTI DI ORIGINE ANIMALE

L'attività del Reparto si esplica nell'esecuzione di prove chimiche su campioni provenienti dalle filiere delle produzioni animali. Le prove spaziano dai controlli della presenza di contaminanti ambientali, alla determinazione della conformità al dichiarato, fino alla rilevazione della presenza di residui di sostanze vietate (o soggette a limiti di utilizzo) nei fluidi biologici, nei tessuti animali e nei prodotti finiti.

Il Reparto opera nell'ambito di programmi di campionamento o di specifiche indagini a supporto delle autorità competenti in materia di sanità e repressione frodi e contribuisce, anche tramite analisi a pagamento su richiesta dei clienti, a indirizzare gli operatori del settore verso modalità di produzione più corrette e verso un impiego più razionale dei farmaci veterinari e delle sostanze consentite.

REPARTO CHIMICA DEGLI ALIMENTI DI ORIGINE VEGETALE E DEI MANGIMI

L'attività del Reparto si esplica nell'esecuzione dei controlli chimici su alimenti e mangimi provenienti dalle filiere delle produzioni animali. Le tipologie di prove e controlli sono assai diversificate, spaziano dai controlli della conformità a quanto dichiarato in etichetta, alla presenza di additivi consentiti o non, alla presenza di contaminazioni ambientali, ed anche alla rilevazione della

presenza di sostanze vietate (o soggette a limiti di utilizzo) nei mangimi e nei prodotti alimentari finiti. Il Reparto supporta con le attività di laboratorio le autorità competenti in materia di sanità pubblica e di repressione delle frodi, opera sia nell'ambito di programmi di campionamento o di specifiche indagini sia nel sistema dell' "autocontrollo".

REPARTO DI MICROBIOLOGIA

L'attività del Reparto di Microbiologia si esplica nell'esecuzione di controlli su alimenti provenienti dalle filiere delle produzioni animali e vegetali. Le tipologie di prove e controlli spaziano dalla rilevazione e/o quantificazione di parametri microbiologici tecnologici, parametri indicatori di igiene e di microrganismi potenzialmente patogeni per l'uomo e di loro tossine. Il Reparto supporta con le attività di laboratorio le autorità competenti in materia di sanità pubblica per i campionamenti previsti nell'ambito dei diversi piani di controllo regionali o nazionali, nell'ambito di piani di sorveglianza per specifiche filiere produttive o sui prodotti destinati all'esportazione verso paesi terzi. Il Reparto esegue anche analisi su campioni alimentari per privati nell'ambito dei controlli previsti nel sistema dell'"autocontrollo".

Il Reparto inoltre effettua attività di caratterizzazione microbiologica di prodotti tradizionali, challenge test, secondo le indicazioni dei protocolli internazionali, con contaminazione sperimentale di alimenti sia in corso di trasformazione sia per una valutazione della shelf life di prodotti pronti al consumo nonché prove di validazione di trattamenti termici.

I risultati di tali test vengono utilizzati per un confronto/validazione dei modelli di microbiologia predittiva riguardo al comportamento dei microrganismi potenzialmente patogeni per l'uomo e le informazioni ottenute vengono rese disponibili all'autorità Sanitaria o ai produttori per l'effettuazione di una corretta analisi del rischio con la finalità di migliorare la sicurezza degli alimenti a tutela della salute del consumatore.

Laboratorio di Microbiologia

Nel Laboratorio vengono effettuate le analisi microbiologiche sulle diverse matrici alimentari su campioni conferiti dall'autorità sanitaria o da privati. Il laboratorio è autorizzato all'esecuzione delle analisi microbiologiche secondo le metodiche FSIS per alimenti ready to eat destinati all'export verso paesi terzi. Il laboratorio funge anche da riferimento per la diagnosi di casi umani di botulismo da materiale biologico o da matrici alimentari.

Laboratorio di Trasformazioni sperimentali

Nel laboratorio vengono effettuati prove di caratterizzazione microbiologica di prodotti tradizionali e challenge test con contaminazione sperimentale di alimenti con i principali agenti di tossinfezioni alimentari per valutare la capacità di crescita o di produzione di tossine nel corso del processo di trasformazione o durante la fase di shelf life del prodotto simulando condizioni di conservazione anche variabili. Vengono effettuate anche prove per valutare l'efficacia di trattamenti termici. I risultati ottenuti vengono confrontati con le applicazioni dei modelli matematici di microbiologia predittiva.

REPARTO CHIMICA APPLICATA ALLE TECNOLOGIE ALIMENTARI

L'attività del Reparto si esplica nell'esecuzione dei controlli chimici su alimenti provenienti dalle filiere delle produzioni animali e vegetali. Le tipologie di prove e controlli sono assai diversificate e spaziano dai controlli della conformità a quanto dichiarato in etichetta, alla presenza di additivi consentiti o non, alla caratterizzazione nutrizionale degli alimenti tradizionali fino alla rilevazione della presenza di additivi o sostanze vietate (o soggette a limiti di utilizzo).

Il Reparto supporta con le attività di laboratorio le autorità competenti in materia di sanità pubblica e di repressione delle frodi ed opera sia nell'ambito di programmi di campionamento o di specifiche indagini sia nel sistema dell'"autocontrollo".

REPARTO TECNOLOGIA ACIDI NUCLEICI APPLICATA AGLI ALIMENTI

Il Reparto è caratterizzato prevalentemente da attività connesse all'impiego di metodi molecolari in ambito di Microbiologia degli alimenti. In particolare sono messe a punto e applicate tecniche biomolecolari finalizzate alla ricerca di patogeni batterici ed alla loro caratterizzazione e tipizzazione.

Ulteriore campo di applicazione è lo sviluppo di metodiche in grado di verificare la specie di provenienza delle matrici alimentari mediante utilizzo di tecniche applicabili anche a matrici complesse ed altamente processate. Il Reparto dispone inoltre di sistemi di caratterizzazione genotipica a supporto delle indagini epidemiologiche e collabora alla messa a punto ed applicazione di metodi alternativi in vitro per l'identificazione di contaminanti ambientali e verifica di tossicità di prodotti cosmetici. Ulteriore settore del Reparto è dedicato all'analisi degli alimenti per la presenza di allergeni in prodotti alimentari in accordo alla direttiva europea di riferimento. Il Reparto opera nell'ambito di programmi di campionamento o di specifiche indagini a supporto delle autorità competenti in materia di sanità e svolge analisi anche in regime di autocontrollo. E' di recente stato attivato il laboratorio di Microbiologia Predittiva.

REPARTO ANIMALI DA LABORATORIO

L'attività del Reparto si esplica nelle attività di servizio relative alla produzione di animali da esperimento e reagenti biologici per la esecuzione di esami di laboratorio ed è dotato di un laboratorio di biochimica clinica e controllo di qualità degli animali e prodotti biologici.

All'interno del Laboratorio di produzione vengono effettuati i controlli sugli animali allevati al fine di garantire la loro salute e il loro benessere.

Nella struttura si possono effettuare sperimentazioni sulle le seguenti specie animali: Topo; Ratto; Criceto; Cavia; Pollo; Suino; Bovino; Ovini e Caprini; Equini.

Le attività di sperimentazione animale sono quasi esclusivamente orientate alla diagnostica delle malattie infettive e alla tossicologia diagnostica negli animali da reddito e da compagnia e sono connesse alle attività delle Sezioni provinciali e dei reparti della sede.

L'impianto collabora con Enti pubblici e privati nello svolgimento di progetti di ricerca con utilizzo di animali.

REPARTO PRODUZIONE VACCINI E REAGENTI

Il reparto produzione vaccini e reagenti esprime l'attività storica di profilassi dell'IZSLER svolta attraverso la produzione di immunizzanti sia verso batteri che virus e la produzione di antigeni per la diagnostica di laboratorio delle malattie infettive.

Il Laboratorio biomasse cellulari, distribuzione kit diagnostici e liofilizzazione riunisce le produzioni storiche di vaccini antivirali e la liofilizzazione e la distribuzione di materiali per kit diagnostici.

I vaccini stabulogeni possono essere prodotti solo dagli IZS. I prodotti vengono richiesti dai veterinari aziendali con ricetta veterinaria e a seguito della diagnosi effettuata dalle Sezioni Diagnostiche o da altri laboratori con isolamento del ceppo batterico. Vengono anche prodotti autovaccini, vaccini cioè prodotti a partire da materiali biologici dell'animale malato.

Sono disponibili vaccini per tutte le specie di allevamento e per animali da compagnia.

REPARTO SUBSTRATI CELLULARI E IMMUNOLOGIA CELLULARE

Nell'ambito dell'IZSLER il Reparto Substrati Cellulari ha ottenuto il certificato del sistema di gestione della Qualità. Dispone di un Manuale di Qualità e di Procedure Operative Standard per la gestione dei processi produttivi relativamente allo "Sviluppo e produzione di substrati cellulari; conservazione e cessione di risorse biologiche (Biobanca)" avendo recentemente esteso il campo di applicazione della certificazione alla struttura dei depositi di risorse centralizzate "Biobanca

IZSLER".

Nel laboratorio si riconosce il "Centro di Referenza Nazionale per i Metodi Alternativi Cura e Benessere degli Animali da Laboratorio che include anche il Centro di Referenza Nazionale per i Substrati Cellulari" istituito nel 2012.

L'attività di ricerca viene perseguita nell'ambito di Programmi Nazionali sia Regionali che Ministeriali. I progetti hanno come tematica di base le colture cellulari e le metodologie volte a perfezionarne le modalità applicative e le caratteristiche qualitative, le cellule staminali ed il loro impiego terapeutico in medicina veterinaria, inoltre, nell'ambito del Centro di Referenza recentemente assegnato, le ricerche vertono anche sullo sviluppo e standardizzazione di metodi alternativi alla sperimentazione animale.

Nel settore colture cellulari viene svolta attività di preparazione, reperimento, amplificazione, controllo, conservazione ed impiego/distribuzione di colture cellulari di differente tipologia, di differente natura allestite da organi e tessuti di diverse specie.

Inoltre, in tale settore viene perseguita l'attività relativa alla decontaminazione, con appropriati farmaci e sieri immuni specifici, di cellule note essere portatrici di determinate tipologie di contaminazioni.

Per lo svolgimento delle attività routinarie, il settore colture cellulari è da sempre completato da un laboratorio di preparazione dei terreni colturali e reagenti il quale non copre soltanto le esigenze interne, ma anche quelle di altri laboratori periferici dell'IZSLER. Anche in questo ambito le esigenze qualitative sono particolarmente elevate ed è basilare la completa sterilità di tutti i reagenti impiegati. È stata pertanto standardizzata una procedura operativa che permette di assicurare l'idoneità del materiale impiegato. Numerose sono le tipologie dei terreni utilizzati in ragione delle differenti esigenze delle colture cellulari allestite. Pertanto, nel laboratorio la quantità dei terreni colturali e reagenti allestiti non è particolarmente rilevante, ma è altamente diversificata. A corollario di questa attività significative sono le attività di servizio che comprendono la preparazione, e sterilizzazione del materiale comunemente impiegato in tutte le differenti aree. Il settore controlli di qualità è costituito da una serie di laboratorio in cui vengono eseguiti controlli qualitativi sulle colture cellulari di differente natura. È tuttavia da sottolineare che le medesime tipologie di analisi vengono anche adottate per il controllo di prodotti biologici. In sintesi quindi l'attività perseguita dal Laboratorio Colture Cellulari non consiste soltanto nella preparazione, amplificazione e controllo di cellule, ma anche in attività di servizio mirata alla determinazione delle caratteristiche qualitative di prodotti biologici.

Un ulteriore aspetto è quello relativo alla preparazione di cellule staminali utilizzate in medicina veterinaria ed utilizzabili in ambito terapeutico negli animali.

Il Laboratorio di Immunologia Cellulare rientra in un programma complessivo di ristrutturazione aziendale che mira ad aggiornare i contenuti delle attività di diagnostica e ricerca alle esigenze più recentemente maturate nel settore della Sanità e del Benessere Animale.

Nel campo della Sanità Animale, notevoli esperienze hanno dimostrato che la valutazione dei parametri di immunità cellulare è di fondamentale importanza per comprendere lo status sanitario e il profilo di immunità da vaccinazione in numerosi modelli di malattie infettive e diffuse di animali di interesse zootecnico e da affezione, specie per quanto riguarda i modelli di infezioni virali e da batteri a replicazione intracellulare. In particolare, vi sono numerose evidenze sperimentali riguardo all'impiego di metodi di immunità cellulare per meglio discriminare lo stato di infezione degli animali o riconoscerlo più tempestivamente.

Per quanto concerne la problematica del Benessere Animale, è stato ampiamente dimostrato che il sistema immunitario può fungere da efficace "Reporter System" della reazione di adattamento degli animali agli ambienti di allevamento e fornire importanti indicazioni prognostiche sulla possibile insorgenza di malattie condizionate di diversa natura.

L'identificazione dei punti di rischio in allevamento può consentire di impostare la profilassi aziendale su basi più solide, che tengano conto effettivamente delle condizioni "problema". Al

tempo stesso, i parametri di immunità innata consentono di valutare nel tempo l'effetto delle soluzioni di allevamento adottate per conseguire migliori condizioni di sanità e benessere animale. In tale contesto, anche gli interventi di immunomodulazione mirata possono giocare un ruolo sicuramente importante, visto che la selezione genetica per elevate produzioni ha in genere determinato l'emergere di fenotipi animali meno in grado di adattarsi a condizioni ambientali non ottimali. Immunomodulatori facilmente somministrabili si sono rivelati di importanza decisiva anche nel settore degli animali da affezione.

ANALISI DI LABORATORIO SUGLI ALIMENTI

ANALISI CHIMICHE

Le analisi chimiche sono importanti per un primo inquadramento del campione in esame. pH, umidità e acqua libera sono i primi parametri analizzati nella ricerca dei microrganismi poiché, unitamente alla temperatura di conservazione sono quelli che ne determinano la possibilità di sviluppo tant'è che per la conservazione degli alimenti si interviene sull'alimento eliminando la disponibilità di acqua (essiccazione) o alterando il pH in modo da impedire lo sviluppo dei batteri patogeni. La presenza di microrganismi può inoltre portare alla formazione di metaboliti che con la loro presenza alterano il pH dell'alimento e quindi un valore discostante da quelli previsti può indicare contaminazione.

pH

Per pH si intende una scala grazie alla quale è possibile misurare l'acidità; il termine risale agli inizi del 1900 e significa Potenz Hydrogen, ovvero potenza dell'idrogeno.

Il pH ha dei valori che vanno da 0 (molto acido) fino a un massimo di 14 (molto alcalino). Ad esempio l'acqua pura ha un pH di 7,07, mentre la frutta ha un pH generalmente acido, così come è molto acido l'ambiente gastrico che oscilla da 1 a 1,6.

Tutti gli alimenti hanno una particolare e specifica composizione chimica e un determinato grado di acidità. Quest'ultimo aspetto è molto importante per lo sviluppo dei microrganismi; infatti, negli alimenti con un pH inferiore a 4,5 i microrganismi sporigeni non si sviluppano, mentre se il valore va oltre il 4,5 lo sviluppo e la moltiplicazione di tali germi è favorita. Un alimento acido, scatena una reazione chimica in base alla quale ne consegue una sottrazione di sali minerali all'organismo, al contrario un alimento alcalino tende a non sottrarre sali minerali fungendo da bilancia.

Se si vogliono effettuare misure accurate di pH si usano speciali strumenti di alta precisione, chiamati piaccametri. Tali strumenti consentono la misura diretta del pH con la semplice immersione di uno speciale elettrodo nella soluzione in esame. Il valore del pH, con una approssimazione di 0.1 unità, viene letto sul monitor del PC collegato alla sonda mediante un'interfaccia. Per tarare il piaccametro si utilizzano delle soluzioni tampone le quali hanno la proprietà di mantenere il pH a valori pressoché costanti anche nel caso in cui si aggiungono piccole quantità di ioni H_3O^+ o di ioni OH^- .

AW (activity water o acqua libera)

La quantità di acqua contenuta negli alimenti e nei prodotti principali è importante per la qualità, l'elaborazione e la durata. I requisiti di legge inerenti agli alimenti devono ovviamente essere considerati. Assicurare la corretta umidità del prodotto in tutte le fasi di lavorazione richiede una misurazione continua durante tutto il processo, misurando il prodotto o dei campioni.

L'attività dell'acqua (aw) è un concetto delle tecnologie di trasformazione e conservazione degli alimenti che indica il rapporto tra la pressione di vapore dell'acqua in un certo materiale e la pressione di vapore dell'acqua pura.

Dal punto di vista puramente descrittivo, è un indice relativo alla quantità d'acqua che, in un determinato prodotto, è libera da particolari legami con altri componenti, dunque, della quantità d'acqua (espressa in un valore adimensionale compreso tra 0 e 1) disponibile per reazioni chimiche e biologiche. La presenza di acqua, non tanto in termini di quantità, quanto in termini di disponibilità dell'acqua stessa, può quindi determinare la deteriorabilità di un prodotto alimentare.

L'aw viene misurata tramite appositi strumenti come per il pH dopo aver sminuzzato una quantità rappresentativa sufficiente di campione all'interno dell'apposito contenitore in cui verrà poi introdotta la sonda analizzatrice.

Presenza di corpi estranei

Per corpo estraneo si intende un materiale solido, che non appartiene per composizione o per ragionevole aspettativa al prodotto nel quale viene rilevato. L'assunzione e l'attuazione di un piano di autocontrollo, non può prescindere dalla rilevazione di corpi estranei, grazie all'adozione di procedure ispettive efficienti.

L'analisi avviene seguendo differenti metodiche, tutte si basano su un attacco chimico per solubilizzare l'alimento, a cui segue una separazione dei frammenti, utilizzando sostanze organiche caratterizzate da un peso specifico inferiore all'acqua, come benzina o paraffina; dopo opportuna decantazione si provvede a filtrare il liquido a più basso peso specifico, nel quale sono state trascinate le impurezze (insetti, acari, peli di roditore e loro frammenti). Il filtrato sarà poi osservato al microscopio.

Riconoscendo che non è possibile trasformare alimenti esenti, in termini assoluti, da impurità come frammenti di insetti e altre particelle solide, l'FDA ha stabilito per ogni categoria di alimenti dei limiti di accettazione chiamati brevemente DAL ossia Detection Action Level.

ANALISI MICROBIOLOGICHE

Il controllo di qualità mediante l'analisi microbiologica richiede la definizione di criteri microbiologici, attraverso specifici parametri definiti dalle normative in materia. La definizione del limite di legge tiene chiaramente anche conto dei possibili effetti sulla salute che il microrganismo può causare nel consumatore del prodotto alimentare.

È impossibile analizzare tutti i microrganismi patogeni, vengono quindi identificati alcuni microrganismi, maggiormente rappresentativi e che con maggiori probabilità possono trovarsi nelle specifiche matrici alimentari. In particolare la scelta del microrganismo da analizzare deve essere fatta considerando il tipo di alimento e la sua storia di produzione, quindi quali passaggi sono stati eseguiti per arrivare alla produzione del prodotto finito (materie prime, processi di produzione, stoccaggio) oltre alle condizioni e tempi di conservazione e alla provenienza geografica.

Oltre a specifici agenti patogeni, per una caratterizzazione completa dello stato igienico dell'alimento è in genere opportuno determinare anche altri batteri, considerati indicatori, poiché sono simili per localizzazione e vie di trasmissione anche ad altri patogeni, e quindi la loro presenza al di sopra di certi limiti è indicativa di una possibile compresenza anche di altri microrganismi.

Criteri microbiologici e limiti normativi

Il controllo microbiologico prevede di regola l'applicazione di Criteri Microbiologici prestabiliti. Un'analisi microbiologica comporta infatti sia il prelievo di prodotti finiti che il prelievo di campioni lungo tutta la catena produttiva/distributiva secondo piani prefissati, la ricerca di germi patogeni ed eventuali loro tossine e di germi responsabili del deterioramento o indicativi dell'applicazione di norme di buona fabbricazione secondo metodologie standardizzate, e infine la valutazione dei risultati per accettare la rispondenza dei lotti ai limiti stabiliti.

Un criterio microbiologico di un alimento è un limite specifico legato ad una caratteristica microbiologica. Definisce l'accettabilità di un processo, di un prodotto o di un lotto di prodotto, sulla base della presenza o assenza di un definito numero di determinati microrganismi e/o sulla quantità delle loro tossine o dei loro metaboliti espressa per unità di peso o volume.

Lo scopo di un criterio microbiologico è prevalentemente quello di proteggere la salute del consumatore, assicurandogli l'assunzione di prodotti sani e salubri, nonché di consentire l'individuazione di attività commerciali non corrette.

I criteri microbiologici si distinguono in criteri obbligatori o norme e in criteri facoltativi o direttive. I primi hanno carattere vincolante ed includono sia limiti per microrganismi patogeni che per germi particolarmente rilevanti per le condizioni igieniche dell'alimento, il non rispetto di tali limiti comporta l'eliminazione del prodotto e sanzioni legali per l'azienda produttrice o distributrice. I secondi includono disposizioni non vincolanti proposte per migliorare il livello igienico della produzione alimentare principalmente relative a microrganismi non direttamente pericolosi per la salute pubblica, non costituiscono una prescrizione a carattere legale dagli organi di controllo e possono essere d'aiuto per la formulazione delle norme.

Dato che è impossibile tenere sotto controllo tutti i microrganismi potenzialmente cause di malattie alimentari, è importante mirare il controllo solo a quei microrganismi che effettivamente svolgono un ruolo determinante nella qualità microbiologica del prodotto in base al tipo di alimento, alle materie prime utilizzate, alla sua produzione e conservazione, alla previsione per il deterioramento e alla provenienza geografica.

Tali microrganismi vengono riconosciuti come rilevanti: patogeni, indici o indicatori e responsabili di deterioramento. La priorità viene assegnata ai microrganismi patogeni quando i primi possono essere evidenziati direttamente altrimenti si procede con la ricerca dei microrganismi indicatori delle insoddisfacenti pratiche igieniche o di potenziali rischi per la salute.

La sola presenza di germi patogeni non è sufficiente a determinarne una situazione di rischio immediato per il consumatore, è noto ad esempio di alcuni germi (*S.aureus*, *C.perfringens*, *Vibrio parahaemolyticus*) presenti in deboli quantità in alcuni carni crude e non si sviluppano se il prodotto è correttamente conservato, pertanto il loro numero limitato può essere tollerato. Mentre per altri patogeni quali le salmonelle vale il requisito dell'assenza totale in tutti i tipi di prodotti.

I microrganismi indici e indicatori servono a caratterizzare in maniera più completa lo stato igienico del prodotto. I primi sono abitualmente non patogeni ma generalmente simili a questi per localizzazione e vie di trasmissione pertanto la loro presenza elevata è indizio di una possibile compresenza dei patogeni correlati; i secondi sono invece tipici delle materie prime e vengono ridotti in misura più o meno marcata durante la lavorazione, sono maggiormente tollerati e forniscono indicazioni su eventuali carenze igieniche del prodotto legate alla sua produzione e sottintendono la possibile presenza di patogeni.

Si analizza inoltre il livello di carica batterica totale, comunemente considerato un indicatore della qualità della pratica produttiva e conservativa. Non si può tuttavia precisare un livello unico indicatore di deterioramento o di tossicità aspecifica se non specificando il tipo di alimento, le modalità di preparazione e conservazione ed altre variabili quali il tempo trascorso dal momento della produzione.

Tenendo presenti le caratteristiche microbiologiche dell'alimento e il tipo di criterio microbiologico adottato, la fissazione di limiti numerici per un alimento deve tener conto del rischio che questo può causare al consumatore, dell'influenza che i microrganismi possono avere sull'accettabilità dell'alimento, delle trasformazioni o trattamenti che esso può subire, ed infine delle caratteristiche del metodo di analisi disponibile.

In base a ciò si possono formulare limiti che possono essere diversi a seconda che si consideri una norma o una linea guida, i secondi potranno essere più severi proprio per incoraggiare una miglior produzione.

I limiti usati nei criteri devono essere basati su dati microbiologici appropriati per l'alimento e devono tener conto di qualsiasi altra modifica della microflora possibile durante la conservazione e la distribuzione. Devono prendere in considerazione il pericolo associato al microrganismo ed il rischio associato alle condizioni in cui si pensa di manipolare e consumare l'alimento. Devono anche tener conto della probabilità di una dispersione non uniforme del microrganismo nell'alimento e la implicita variabilità della procedura analitica. Bisogna considerare la virulenza e la patogenicità dell'organismo e le fasce a rischio.

Metodi di analisi

Date le implicazioni che i risultati conseguiti possono avere, per una norma o standard si deve far ricorso a metodi ufficiali o riconosciuti. In mancanza di questi si può ricorrere ad altri metodi di routine disponibili purché siano valutati, in caso di necessità di una risposta rapida è permesso l'utilizzo di metodiche rapide non riconosciute. Rimane fondamentale, qualunque sia il metodo, il criterio di controllo a due livelli: valutazione e validazione. La prima consiste nell'accertamento che la sequenza di operazioni di un metodo analitico porti ad un risultato affidabile, preciso e accurato. La seconda consiste nella verifica della precisione e dell'accuratezza di un metodo applicato a più laboratori.

Vi sono dei parametri fondamentali per la valutazione di un metodo:

- Accuratezza. È definita come il grado di concordanza fra il valore medio di un gran numero di misure ed il valore vero ed è espressa in percentuale.
- Precisione. È il grado di concordanza tra i risultati ottenuti da numerose prove indipendenti, sotto condizioni definite, applicando uno stesso metodo analitico, su uno stesso materiale di saggio

- Specificità. È l'attitudine a rilevare correttamente il parametro ricercato, in presenza di fattori interferenti ed è inversamente proporzionale al numero di falsi positivi. Data l'importanza della conferma delle colture "sospette" si utilizzano usualmente più prove di identificazione
- Praticabilità. I metodi devono essere fattibili quindi devono utilizzare reagenti e attrezzature commercialmente disponibili.

La metodologia prescelta, dopo essere stata verificata con controlli positivi e negativi tramite impiego di ceppi di riferimento e materiali standard, deve essere approvata dalla direzione del laboratorio e i metodi da seguire vanno raccolti e documentati per iscritto secondo lo schema ISO/TC 34 n. 7667. È il caso di prevedere anche indicazioni esaurienti per il controllo di qualità, così tutte le informazioni aggiuntive eventualmente necessarie all'operatore. Ogni eventuale modifica deve essere registrata insieme alla descrizione di qualunque azione correttiva effettuata.

Campionamento e conservazione

Il corretto campionamento del substrato in esame è importante ai fini della valutazione qualitativa del prodotto. Lo scopo della preparazione di un campione per un'analisi microbiologica è quello di omogeneizzare il prodotto mediante l'utilizzo di un diluente senza danneggiare le forme microbiche presenti e che si vogliono determinare. Si deve operare in sterilità al fine di evitare contaminazioni esterne che potrebbero invalidare l'analisi. Le modalità di preparazione sono diverse a seconda della natura del prodotto.

Il materiale in esame va quindi prima preparato in modo da renderlo un composto omogeneo dal quale poi verrà estratta la quantità richiesta per l'analisi. Nel caso di campioni liquidi o fluidi per preparare il campione è sufficiente mescolarlo in maniera asettica e, in caso di campioni ad alto contenuto microbico come il latte, procedere ad una preventiva diluizione in acqua fisiologica sterile di cui si terrà conto poi durante le conte per riportare il numero di microrganismi al campione tale quale.

Nel caso di alimenti solidi quali formaggi o insaccati viene pesata sterilmente una quantità sufficientemente rappresentativa del campione, prestando attenzione a prelevare quantità da ogni zona e profondità, in un sacchetto sterile, aggiungere in ragione 1:10 diluente sterile, quindi omogeneizzare; l'omogeneizzazione viene effettuata con Stomacher, un apparecchio che grazie alla presenza di pedali che si muovono in senso rototraslatorio schiaccia il campione e ne determina lo sfibramento. Si può poi procedere ad eventuali diluizioni o alla semina diretta. I campioni dopo il prelievo vanno conservati in cella frigorifera in modo da poter effettuare una seconda analisi di conferma o in caso di risultati troppo dissonanti.

ANALISI TRADIZIONALI: conte microbiche

Terreni e tecniche di semina e trapianto

La semina per le analisi microbiologiche viene effettuata in terreni liquidi solo allo scopo di arricchire la carica microbica presente o selezionare eventuali specie microbiche per verificarne la presenza/assenza, inoculando un unità di campione all'interno della provetta contenente il terreno. Per le tecniche di conta batterica sono necessari terreni solidi generali o specifici per la specie in esame. I tipi di terreni utilizzati si suddividono in tre categorie:

- arricchiti: terreni addizionati di sostanze nutritive per agevolare la crescita anche dei microrganismi esigenti
- di arricchimento: terreni contenenti sostanze che facilitano la crescita della specie in esame
- selettivi: terreni contenenti sostanze che bloccano la crescita di tutte le specie ad eccezione di quella in esame
- differenziali: terreni contenenti sostanze che mettono in evidenza particolari attività metaboliche del microrganismo in esame permettendone, insieme all'analisi microscopica, l'identificazione.

Vi possono poi essere dei terreni specifici per determinati tipi di batteri.

Tutti i terreni colturali, a meno che non siano particolarmente selettivi, devono venire sterilizzati in autoclave prima dell'uso e quando non specificato, le condizioni di sterilizzazione sono 121°C per 15 minuti. Gli ingredienti sono sempre sciolti in acqua distillata, solamente in casi particolari si utilizza acqua di fonte, ma è esplicitamente dichiarato. Tutti i terreni possono essere preparati sia in solido che in liquido: la solidificazione si ottiene, aggiungendo agar in ragione di 15-18g/l.

La semina viene effettuata in differenti metodi a seconda se i microrganismi che si vogliono analizzare siano aerobi, anaerobi facoltativi o anaerobi obbligati:

• semina per incorporamento

Si procede, ponendo 1 ml di un'opportuna diluizione del campione in piastre petri sterili quindi il terreno, preparato in precedenza e sciolto mediante ebollizione, una volta raggiunta la temperatura di 45-50°C, è versato in ciascuna delle piastre seminate in ragione di 10-12 ml. Quindi, al fine di distribuire la sospensione microbica nel modo più omogeneo possibile in tutto il terreno addizionato, si effettuano delicati movimenti rotatori, orizzontali e verticali della piastra. Questo sistema può essere utilizzato per tutti i microrganismi

• semina per spatolamento superficiale

Preparare il terreno specifico e dopo sterilizzazione versarlo nelle piastre e lasciare solidificare. seminare quindi 0.1 ml della diluizione del campione al centro di una piastra di petri contenente il terreno ben asciutto. la sospensione microbica è quindi distribuita su tutta la superficie mediante l'aiuto di una spatola sterile a L. Questo tecnica di semina è suggerita per i microrganismi aerobi stretti oppure quando si vuole evidenziare la morfologia delle colonie.

• semina in doppio strato

Seminare 1 ml di un'opportuna diluizione in piastre di petri sterili. Il terreno, preparato in precedenza, è sciolto mediante ebollizione e, raggiunta la temperatura di 45-50°C, è distribuito in ciascuna delle piastre seminate in ragione di 10-12 ml; una volta dispersa la sospensione microbica e, dopo solidificazione del terreno, si procede all'aggiunta di un secondo strato di terreno, circa 8 ml, e si lascia solidificare. questo sistema è abitualmente utilizzato per i microrganismi anaerobi facoltativi.

• semina in alto strato

Sciogliere per ebollizione il terreno agarizzato distribuito in provette, lasciar raffreddare sino a 50°C quindi, prima che il terreno si solidifichi nuovamente, seminare immergendo totalmente la pipetta

nel terreno per tutta la sua altezza e lasciare cadere il contenuto, mentre la pipetta stessa viene estratta. Si evita in questo modo di introdurre aria. Lasciare quindi solidificare e coprire con un tappo di paraffina sterile solida o di agar doppio al fine di creare le condizioni di anaerobiosi. Questa tecnica si utilizza per i microrganismi anaerobi.

• *tecnica dello striscio*

La sospensione o la patina microbica, prelevata sterilmente con un'ansa calibrata, è distribuita sopra un terreno agarizzato, facendo passare delicatamente per tutta la superficie l'ansa. La semina può essere effettuata in provetta (becco di clarino o slant) quando lo scopo è di conservare il ceppo microbico oppure in piastre di petri quando si vogliono differenziare le singole colonie.

• *semina per infissione*

Prelevare con ago di platino sterilizzato una minima quantità di patina microbica da una coltura fresca e perforare il terreno debolmente agarizzato e solidificato che si intende seminare. questa tecnica è utilizzata per seminare microrganismi anaerobi facoltativi o quando intende conoscere il metabolismo del microrganismo.

Determinazione quantitativa dei microrganismi

Esistono differenti metodiche per la determinazione quantitativa dei microrganismi compresi tra tecniche colturali, conta diretta ed indiretta, e non colturali.

I metodi di prova microbiologici "vitali", siano essi qualitativi (presenza/assenza), che quantitativi (enumerazione) rappresentano una componente fondamentale del processo analitico e alla base utilizzano la "capacità naturale" dei microrganismi ricercati di riprodursi, in determinate condizioni ambientali e su idonei supporti allo scopo di renderli "visibili" ai nostri occhi e quindi poterli quantificare come UFC (unità formanti colonie) o come MPN (most probable number).

• *Conta in piastra*

Sono considerate solamente le piastre che contengono un numero di colonie non superiore a 150 e comunque non inferiore a 10.

Il numero dei microrganismi in 1 ml di prodotto, o in 1 g, nel caso dei prodotti solidi, è dato dalla formula:

$$\frac{\Sigma C}{(n1 + 0.1 n2)d}$$

dove:

ΣC : è la somma del numero di colonie contate

n1 : rappresenta in numero di piastre utilizzate per la prima diluizione

n2 : rappresenta in numero di piastre utilizzate per la seconda diluizione

d: è il fattore di diluizione relativo ai primi conteggi effettuati

Arrotondare il risultato a due cifre significative; il valore finale sarà quindi espresso come numero compreso tra 1.0 e 9.9 moltiplicato per l'opportuna potenza di dieci (diluizione considerata).

Nel caso in cui tutte le conte della colonie risultassero inferiori a dieci, esprimere il numero di microrganismi per grammo o ml come "meno di $10 \times 1/d$ ", dove d è il valore corrispondente alla prima diluizione piastrata.

Se tutte le conte fossero superiori a 150, esprimere il risultato come numero presuntivo di colonie, stimandolo in base al numero di colonie identificabili nella piastra più diluita.

• *Tecnica del most probable number*

Ciascuna diluizione viene seminata in triplo, quindi per la lettura, si considerano le ultime tre diluizioni in cui si è verificata crescita e, per ciascuna diluizione si riporta il numero di provette positive, si ottiene così un numero caratteristico. Si ricerca sulle tavole di mc rady questo numero che corrisponderà ad un certo quantitativo di microrganismi, tale numero deve essere moltiplicato

per il reciproco della prima diluizione considerata nella lettura. Il valore ottenuto sarà il numero di microrganismi per g o ml di prodotto.

Conte microbiche comunemente effettuate

Differiscono tra loro per il tipo di terreno usato, i tempi e temperature di incubazione e per la modalità di crescita delle varie colonie ricercate, di seguito sono riportate le principali conte che si effettuano genericamente nei laboratori d'analisi.

DETERMINAZIONE DELLA CARICA BATTERICA TOTALE

E' una determinazione che permette di effettuare un valutazione della qualità globale del prodotto e fornisce indicazioni generali sul tempo di conservazione di un dato alimento.

Si usa l'agar plate count (apc). Semina per incorporamento ed incubazione a 30°C per 48 ore. Si contano tutte le colonie cresciute.

RICERCA DI BATTERI ACETICI

- Terreno al CaCO₃

Dopo la sterilizzazione, al momento dell'uso aggiungere a 130 ml di terreno fuso e portato a 45°C, 20 ml di etanolo al 15 %, filtrato sterilmente.

Semina per spatolamento superficiale ed incubazione a 28-30°C per 5 giorni.

Le colonie di batteri acetici crescono circondate da un alone limpido che rimane tale se si tratta di Gluconobacter, mentre nel caso di Acetobacter, a seguito della ri-precipitazione del carbonato di calcio intorno alla colonia scompare.

- Terreno al verde bromocresolo

Dopo sterilizzazione, al momento dell'uso aggiungere a 65 ml di terreno fuso e portato a 45°C, 10 ml di etanolo al 15 %, filtrato sterilmente.

Semina per spatolamento superficiale ed incubazione a 28-30°C per 5 giorni. Le colonie di Gluconobacter fanno virare in modo permanente il colore del terreno da blu a verde o giallo, quelle di Acetobacter fanno successivamente ritornare il terreno al colore originario.

- Terreno al lattato di calcio

Semina per spatolamento superficiale ed incubazione a 25-30°C per 4-5 giorni. Le colonie di Acetobacter vengono circondate da un alone di carbonato di calcio insolubile, quelle di Gluconobacter invece rimangono sempre senza alone.

RICERCA DI ENTEROBACTERIACEAE

Si utilizza il terreno Violet Red Bile Destrosio Agar contenente il glucosio come fonte di carbonio, che viene utilizzato da tutte le Enterobacteriaceae.

Semina per incorporamento in doppio strato, incubazione a 37°C per 24 ore.

RICERCA DEI COLIFORMI

La ricerca dei coliformi (indici di qualità e di igiene) negli alimenti può essere effettuata sia in terreno solido che in terreno liquido. Come terreno solido si utilizza il Violet Red Bile Agar, mentre come terreno liquido si utilizza il Brodo Verde Brillante Lattosio Bile 2%.

-Terreno violet red bile agar (VRB agar)

La semina avviene per incorporamento con doppio strato in Agar VRB e l'incubazione viene effettuata a 37°C per i coliformi totali (indici di pulizia) o a 44°C (indici di contaminazione fecale)

per 24 ore. La presenza dei sali di bile (agente selettivo) crea l'ambiente ideale per la crescita di questi microrganismi di origine intestinale, mentre il cristal violetto inibisce la crescita degli altri Gram -. Sono considerati appartenenti ai coliformi solo le colonie che crescono tra i due strati di agar di colore rosso-viola (fermentazione del lattosio e viraggio del rosso-neutro) circondate da un alone violaceo e con un diametro non inferiore a 2 mm.

-Brodo verde brillante bile lattosio 2%

Il terreno è distribuito in ragione di 10 ml in provette contenenti campanella di Durhams, la semina viene effettuata in triplo e l'incubazione avviene con le medesime modalità del VRB. Sono considerate positive le provette dove si osserva intorbidamento e produzione di gas, evidenziata dall'innalzamento della campanella a seguito della fuoriuscita del liquido e l'entrata del gas (CO₂). La lettura si esegue secondo la tecnica del Most Probable Number (MPN).

TEST DI MC. KENZIE

E' un test rapido e semplice per stabilire la presenza di E. coli, tipico indice di contaminazione fecale, in un alimento. Dopo che si è osservata crescita in Verde brillante o in VRB trasferire una ansata o una colonia rispettivamente in una provetta di brodo verde brillante bile lattosio 2% contenente la campanella di Durham sul fondo ed in una provetta di acqua peptonata, quindi incubare entrambe a 44°C per 24 - 48 ore. E. coli crescerà con produzione di gas nella provetta di verde brillante e di indolo (decarbossilazione del triptofano) in acqua peptonata. Qualsiasi altra combinazione di risposta è da ritenere negativa.

La produzione di indolo è evidenziata dalla formazione di un anello rosso-rosa in seguito all'aggiunta di poche gocce del reattivo di Kovacs

RICERCA DI PSEUDOMONAS SPP.

-Terreno di King B

Dopo la sterilizzazione, al momento dell'uso, come agente selettivo, aggiungere penicillina, in ragione di 20 γ/ ml. Semina per spatolamento superficiale ed incubazione a 30°C per 48 ore.

-Terreno di King A

Simile al precedente, si preferisce per la ricerca di Ps. aeruginosa, perché permette l'evidenziazione del pigmento blu piocianina, tipico di questa specie.

Dopo la sterilizzazione, al momento dell'uso, aggiungere penicillina in ragione di 20 γ / ml. Semina per spatolamento superficiale ed incubazione a 30°C per 48 ore.

-Ricerca Ps. aeruginosa nelle acque

Filtrazione di 250 ml di acqua attraverso membrana sterile con pori diametro 0,2 μm, deporre quindi il filtro su piastra contenente il terreno agar cetrimide che potenzia la produzione della piocianina. Si considerano solo le colonie blu.

agar cetrimide. Incubazione a 30°C per 48 ore.

Si procede poi con prove di conferma riportate nella seguente tabella:

Crescita a 42°C	+
Ossidasi (Soluzione di dimetil-para-fenilendiammina all'1% in acqua distillata)	+
Ossidazione glucosio	+

Svolgimento prova dell'ossidasi: porre un po' di patina batterica su carta da filtro e coprire con una goccia del reattivo. Il test è considerato positivo se la patina assume entro pochi secondi una

colorazione rosso-violacea. La soluzione utilizzata è particolarmente sensibile alla luce ed instabile, va pertanto protetta da ogni fonte luminosa e deve essere preparata al momento dell'uso, e conservata in frigorifero per non più di 24 ore. Questo test permette evidenziare la presenza dell'enzima citocromo-ossidasi, ultimo enzima coinvolto nella catena di trasporto degli elettroni: i microrganismi che danno risposta positiva sono sicuramente aerobi. Questo test è particolarmente utile per distinguere a livello di famiglie i Gram negativi.

RICERCA DI BATTERI LATTICI

Si tratta di un gruppo microbico vasto ed eterogeneo. A seconda del tipo di batterio lattico considerato e dell'ambiente di provenienza si possono utilizzare vari tipi di terreni.

GENERE	MORFOLOGIA	HABITAT	TERRENO
Lactobacillus	bacilli	vari	-Man Rogosa Sharpe (M.R.S.) -M.R.S. variamente modificato - S.D.B.A.
Carnobacterium	bacilli	prodotti poco acidi	M.R.S. pH = 9
Lactococcus	cocchi	latte	M 17
Streptococcus	cocchi	vari	
Pediococcus	cocchi	vegetali	
Leuconostoc	cocchi	vegetali	- Terreno di Mayeux
Enterococcus	cocchi	intestino/vegetali	- K.E.A. - M-enterococcus

-Man rogosa sharpe (M.R.S.)

Terreno generico che consente il recupero indiscriminato di tutti i batteri lattici, eccetto qualche forma estremamente esigente nutrizionalmente. Non ne permette la differenziazione.

Semina per incorporamento ed incubazione, se non esplicitamente richiesto, in anaerobiosi, a 30°C per 48-72 ore.

Opportunamente modificato questo terreno può diventare selettivo per alcune specie e generi:

- *Lactobacillus bulgaricus* (nello yogurt) : acidificare il terreno MRS, prima di aggiungere l'agar, sino a pH 5.4. Semina per diffusione ed incubazione a 37°C per 72 ore in anaerobiosi (gas pack). Si contano tutte le colonie cresciute.

- *Lactobacillus acidophilus*: si prepara un MRS privo di zucchero (MRS identification) e si aggiungono 0,1 g/l di glucosio e 2 g/l di esculina. Al momento dell'uso aggiungere a 100 ml di terreno fuso e raffreddato a 50°C, 1 ml di una soluzione di citrato ferrico ammonico al 10% sterilizzata per filtrazione. Semina per incorporamento ed incubazione a 37°C in aerobiosi od anaerobiosi per 48 ore. *L. acidophilus*, essendo in grado di idrolizzare l'esculina, crescerà con caratteristiche colonie lenticolari di color nero.

- *Lactobacillus casei*: il terreno MRS identification viene addizionato di gluconato, in ragione di 2g/l, quindi si procede come per *L. acidophilus*.

- *Carnobacterium spp.*: portare, prima dell'aggiunta dell'agar, a pH 9 il terreno MRS. Incubazione in anaerobiosi o anaerobiosi a 30°C per 48 ore.
- *Bifidobacterium spp.* : il terreno MRS agar viene addizionato, al momento dell'uso, una miscela di sostanze inibenti sterilizzata per filtrazione e definita NNL, in ragione del 5%, Incubazione a 37°C in anaerobiosi per 48 ore.

-M17

E' utilizzato per i cocchi omofermentanti (Streptococchi, Lattococchi e Pediococchi)

Al momento dell'uso aggiungere sterilmente, per ogni 100 ml di terreno fuso e tenuto a 50°C, 5 ml di soluzione di lattosio al 10% in acqua sterilizzata.

Semina per incorporamento ed incubazione a 30°C per 48 ore.

Per il recupero di *Streptococcus thermophilus* l'incubazione è effettuata a 37°C per 48 ore.

-Sour dough bacteria agar (S.D.B.A)

E' un terreno molto ricco utilizzato per i bacilli lattici da impasti acidi, essendo questi molto esigenti nutrizionalmente e particolarmente adattati a questo ambiente.

Semina per spatolamento superficiale ed incubazione in anaerobiosi a 37°C per 48-72 ore.

-Terreno di Mayeux

Utilizzato per il genere *Leuconostoc spp.*

Piastre per spatolamento superficiale ed incubazione a 20°C per 48 -72 ore.

-Kanamicina esculina azide agar (KEA)

E' un terreno utilizzato per gli enterococchi.

Seminare le piastre per spatolamento superficiale ed incubare a 37°C per 48 ore. Considerare solo le colonie nere, circondate da un alone bruno-nero; talvolta giova l'incubazione a 42°C anziché a 37°C.

La ricerca degli Enterococchi, nelle acque, può essere anche di tipo qualitativo, mediante arricchimento di 100 ml, in tal caso si utilizzano:

-terreno di Litsky

Il brodo è preparato a doppia concentrazione e seminato con 100 ml di acqua da analizzare, quindi incubato a 37°C per 48 ore. Se il brodo risulta torbido si prosegue con la prova di conferma che prevede l'utilizzo del seguente terreno solido:

-terreno di Slanetz e Bartley

Semina per spatolamento superficiale ed incubazione a 37°C per 48 ore.

Su questo terreno gli enterococchi crescono, formando colonie dal rosa al rosso violaceo in funzione della capacità di ridurre l'agente differenziale (1,2,3 tri-cloruro-trifenil-tetrazolio) in esso contenuto.

RICERCA DI BATTERI MALOLATTICI

-Terreno a base mosto

-Terreno a base succo di pomodoro

-Terreno con acido malico

Questi terreni così acidi vengono di solito usati liquidi. Nel caso si volessero usare allo stato solido devono venire preparati in concentrazione doppia e solidificati al momento dell'uso con un ugual volume di agar acqua al 4% sterilizzato a parte. L'incubazione di tutti i terreni per malolattici avviene a 25°C per almeno 5 giorni.

RICERCA DEI CONTAMINANTI NON LATTICI

Agar gelisato. Utilizzato per i prodotti caseari (yogurt, formaggi freschi) dove i batteri lattici costituiscono parte della microflora tipica.

Semina per spatolamento superficiale ed incubazione a 30°C per 48-72 ore

RICERCA DELLE MICROCOCCACEAE

Terreno di chapman. Semina per spatolamento superficiale. Incubazione a 37°C per 48 ore. Su questo terreno le Micrococcaceae formano colonie di colore giallo, a seguito della fermentazione del mannitolo (viraggio del rosso fenolo). Tutti gli altri microrganismi sono inibiti dalla presenza del sale, che invece le Micrococcaceae, essendo osmotolleranti, sopportano bene.

RICERCA DI STAFILOCOCCI POTENZIALMENTE PATOGENI

La ricerca può essere effettuata sia mediante arricchimento che per conta diretta.

- Terreno di giolitti e cantoni

Preparare in doppia concentrazione e distribuire in ragione di 10 ml per provetta. Al momento dell'uso aggiungere 0,3 ml per provetta di terreno di una soluzione acquosa al 3,5% di tellurito di potassio precedentemente sterilizzata per filtrazione; coprire con tappo vaselina dopo la semina ed incubare a 37°C per 48 ore. La semina è effettuata in ragione di 1g (10 ml della diluizione 10-1).

La glicina e il cloruro di litio agiscono da sostanze selettive, perché inibiscono la crescita dei bastoncini gram+, inoltre gli stafilococchi riducono il tellurito di potassio a tellurio, formando un precipitato nero. La conferma è effettuata strisciando un'ansata del brodo annerito su piastre di Petri.

- Terreno di baird-parker

Al momento dell'uso aggiungere a 100 ml di terreno 5 ml di una emulsione di rosso d'uovo e di tellurito di potassio opportunamente preparata. Semina per spatolamento superficiale ed incubazione a 37°C per 24-48 ore. Gli stafilococchi cresceranno, per gli stessi motivi del precedente terreno, formando colonie nere, inoltre quelli potenzialmente patogeni, in grado di idrolizzare la lecitina formeranno un alone di illimpidimento intorno alla colonia.

Si eseguono delle diluizioni decimali del campione sul medesimo terreno utilizzato per la prova di conferma dopo arricchimento in Brodo Giolitti e Cantoni.

RICERCA DELLE BACILLACEAE

La famiglia delle Bacillaceae comprende il genere aerobio/anaerobio facoltativo Bacillus ed il genere anaerobio stretto Clostridium: per entrambi è necessario specificare se la ricerca riguarda le forme vegetative oppure le forme sporigene. In questo caso infatti è necessario pastorizzare il prodotto in bagno maria a 80°C per 10 minuti prima di procedere all'analisi.

Conta delle forme aerobie/anaerobie facoltative (Bacillus spp.)

-Tryptic soy agar (t.s.a.)

Semina per incorporamento ed incubazione a 30-37°C per 48 ore.

-Terreno per bacillus cereus

Aggiungere al terreno fuso e pronto per l'uso, come agente differenziale, 25 ml/l di una emulsione sterile di rosso d'uovo e 2 ml di polimixina b, come agente selettivo. Semina per spatolamento superficiale ed incubazione a 37°C per 48 ore. B. cereus, capace di utilizzare il mannitolo grazie al viraggio del blu bromotimolo, crescerà con colonie blu-turchese con margini sfrangiati ed irregolari.

Conta delle forme anaerobie

-Reinforced clostridial medium (r.c.m.) clostridium spp.

Semina per incorporamento ed incubazione a 30-37°C per 48 ore in anaerobiosi.

In caso di crescita la sicurezza che si tratti proprio di Clostridium spp. si può avere verificando la presenza dell'enzima catalasi, assente nei Clostridi anaerobi stretti. A tale scopo le colonie sono bagnate con una goccia di acqua ossigenata al 3%, l'assenza di produzione di bollicine (ossigeno) è indice di risultato negativo.

Per evidenziare i clostridi che utilizzano il lattato (Clostridi butirrici) è sufficiente aggiungere al terreno anche 5 g di lattato di sodio, in alternativa si può utilizzare il seguente terreno:

-Latte sterile ricostituito 10% + 1 ml di Soluzione A sterile

Questo brodo è distribuito in ragione di 10 ml in provette precedentemente sterilizzate e contenenti sul fondo un fondello (1-2 ml) di paraffina (6 parti + 1 parte). Le provette sono quindi seminate con le diluizioni scelte e poste a pastorizzare a 80°C per 10 minuti.

Questo trattamento termico permette al fondello di paraffina di sciogliersi e di venire in superficie, l'immediato raffreddamento consente la formazione di un tappo superficiale che creerà anaerobiosi.

-Terreno di angelotti (S.P.S.)

Utilizzato per la ricerca e numerazione dei clostridi solfito riduttori.

Distribuire in provette in ragione di 10 ml ciascuna e seminare in alto strato; l'anaerobiosi è assicurata da un tappo di paraffina o di agar acqua.

Incubazione a 37°C per 48 ore. Su questo terreno, grazie alla presenza degli agenti selettivi (polimixina e sulfametazina) che inibiscono gli altri gram+, i Clostridi solfito riduttori crescono con colonie nere immerse nell'agar e con produzione di gas, evidenziata da spaccature del terreno e dall'innalzamento del tappo di paraffina. Se l'incubazione avviene a 44°C, le colonie nere con gas appartengono presumibilmente alla specie *Cl. perfringens*, in tal caso si procede con prove di conferma di tipo biochimico.

-RCM modificato

Utilizzato in alternativa al precedente per il recupero dei Clostridi solfito riduttori (senza agar può essere usato come terreno liquido)

Al momento dell'uso aggiungere per ogni 100 ml di terreno sterile fuso e mantenuto a 45°C: 10 ml di una soluzione di Na solfito al 6,25% in acqua e 40 gocce di una soluzione di allume ferrico al 5% in acqua.

Semina per incorporamento ed incubazione in anaerobiosi a 37°C per 48 ore.

Nelle acque, la ricerca dei clostridi solfito riduttori (indici di contaminazione fecale) è di tipo qualitativo, presenza o assenza in 100 ml:

Filtrare sterilmente (diametro pori=0,22 µm) 100 ml acqua pastorizzata a 80°C x 10', quindi deporre la membrana su terreno per anaerobi, contenente Na₂SO₄ ed allume ferrico.

Incubazione a 37°C x 18 ore in anaerobiosi. Sono da considerare solo le colonie nere che devono essere isolate e strisciate su terreno di Willis.

RICERCA DI SALMONELLA SPP.

La Ricerca delle Salmonelle negli alimenti non è mai una conta, ma una valutazione di *presenza/assenza* in una stabilita quantità di alimento.

Il metodo classico (Gazzetta Ufficiale 346 del 13/12/1978) consta di quattro fasi:

1) *prearricchimento* (37°C per 24 ore).

-Acqua peptonata tamponata a pH 7.

-Latte scremato sterile + verde brillante 0,02% per il cacao e derivati

2) *arricchimento selettivo*

Trasferimento di 1 o 0,1 ml di prearricchimento in uno o più brodi contenenti sostanze selettive che favoriscono la crescita di microrganismi di tipo intestinale.

-Brodo Selenito Cistina 37°C per 24 - 48 ore

-Brodo Rappaport Vassidialis 42°C per 24 - 48 ore

-Brodo Tetrionato Novobiocina 42°C per 24 - 48 ore

3) *conferma* (37°C per 24 ore)

Consiste in uno striscio su terreno selettivo differenziale.

-Desossicolato Citrato Lattosio Agar,

-Bismuto Sulfite Agar,

-Verde Brillante Agar,

-Rambach,

-Salmonella Shigella Agar

4) *riconoscimento colonie sospette*

-Test sierologico _ agglutinazione con siero polivalente

-Prove biochimiche _ API Test

-Tipizzazione fagica

RICERCA DI YERSINIA ENTEROCOLITICA

1) *prearricchimento*

25 g di campione sono posti sterilmente in 225 ml di terreno Tryptic Soy Broth (TSB) ed incubati a 4°C per 7-14-21 giorni; oppure posti in terreno Yeast Extract Rose Bengala Broth (YER) ed incubati a 10°C per 5 giorni.

2) *arricchimento selettivo*

0,1 ml di prearricchimento sono trasferiti sterilmente in 10 ml di Rappaport e Brodo Selenito ed incubati a 22°C per 4 giorni. (Per la composizione degli arricchimenti si rimanda ai terreni per la ricerca di Salmonella spp.).

3) *conferma*

Striscio su terreno selettivo differenziale Celfusodin-Irgasan- novobiocina agar (CIN) (25°C per 24-48 ore).

4) *identificazione*

Le colonie che su questo terreno selettivo e differenziale si presentano di colore rosso scuro con bordo bianco (occhio di bue) sono sottoposte alle seguenti prove:

-Crescita in Triple Sugar Iron (TSI)

-Idrolisi dell'urea

-Mobilità: tipico di Yersinia enterocolitica è di risultare mobile a seconda della temperatura di incubazione, è mobile a temperature inferiori a 30°C ed immobile a 37°C.

-Prove biochimiche : API test

VALUTAZIONE DELLA POTENZIALE PATOGENICITÀ' DI YERSINIA ENTEROCOLITICA

La virulenza dei ceppi di *Yersinia enterocolitica* viene valutata attraverso le seguenti prove:

a) Analisi della Ca⁺⁺ dipendenza

Il terreno utilizzato è Magnesio-Ossalato-Medium.

Dopo sterilizzazione, si aggiungono 80 ml di soluzione di cloruro di magnesio, 80ml di soluzione di ossalato di sodio e 10ml di soluzione di glucosio, sterilizzate per filtrazione

Per ogni ceppo si inocula con 0,1 ml di sospensione batterica 2 piastre, una viene successivamente incubata a 26°C e l'altra a 37°C. Si osservano le colonie dopo 2-3 giorni. I ceppi che crescono a 26°C in maniera confluyente e a 37°C presentano solo 10-100 colonie per piastra, sono Ca⁺⁺ dipendenti, perciò sospetti di virulenza.

b) Prova di autoagglutinazione

Il terreno utilizzato è detto RPMI-1640, con aggiunta del 10% di siero fetale di vitello e di HERPES sino ad una concentrazione finale di 25 mM (acido N-2-idrossietil-piperazina-N-2-etansulfonico) distribuito in una doppia serie di provette in ragione di 2 ml ciascuna. Una serie è incubata a 26°C e l'altra a 37°C, entrambe per 18 ore.

Si osserva la crescita: i ceppi virulenti crescono dando torbidità uniforme a 26°C e una pellicola di agglutinazione sul fondo, con surnatante limpido a 37°C.

I ceppi avirulenti crescono dando torpidità uniforme sia a 26°C che a 37°C, a volte però ceppi che crescono con colonie rugose danno agglutinazione spontanea sia a 26°C che a 37°C.

c) Attività pirazinamidasi

I ceppi da testare sono fatti crescere su TSA per una notte, seminati sugli slant e incubati per 48 ore a 25-30 °C, dopodiché la coltura cresciuta è trattata con una soluzione acquosa all'11% di solfato di ammonio ferroso preparata di fresco. Dopo 15 minuti si effettua la lettura del test: questo si considera positivo se compare una colorazione rosa dovuta alla presenza di acido pirazinico, e negativo se il colore non cambia.

d) Fermentazione di salicina, esculina, ramnosio, saccarosio

Si utilizza il terreno Andrade Peptone water che viene posto in provette (4,5 ml per provetta), sterilizzato a 121°C per 20 minuti ed addizionato di 0,5 ml della soluzione di zucchero al 10%. Si considera positivo il risultato quando si ha la comparsa di una colorazione rosa, nelle provette incubate a 25°C per 2-3 giorni.

RICERCA DI LISTERIA SPP.

Anche per *Listeria* si esegue una ricerca qualitativa in 25 g di prodotto. I passaggi sono:

1)pre-arricchimento selettivo

25 g di campione sono posti sterilmente in 225 ml di terreno di Fraser ½ concentrazione, incubazione a 30°C per 24 ore.

2)arricchimento selettivo

Trasferimento di 1 ml di prearricchimento in 10 ml di Fraser a concentrazione normale, incubazione a 37°C per 48 ore.

3)conferma

In caso di annerimento della brodocoltura striscio sui terreni selettivi differenziali Palcam ed ALOA (30°C per 48-72 ore).

4) identificazione

Prove di identificazione delle colonie caratteristiche per accertare l'appartenenza alla specie L.

	L.monocytogenes	L. innocua	L .seeligeri	L. welshimeri
Fermentazione xilosio	-	-	+	+
Fermentazione ramnosio	+	-/+	-	-/+
β-Emolisi	+	-	+	-
St. aureus	+	-	+	-
R. equi	-/+	-	-	-

Tutte queste prove ed altre, sempre di tipo biochimico sono racchiuse nel kit Api Listeria Biomeriaux, che consentono facilmente la diagnosi di specie. In alternativa le colonie sospette possono venire identificate con sistemi di analisi immunoenzimatico o con sonde genetiche.

Conta diretta in terreno selettivo

Eseguire le piastre con le diluizioni ritenute necessarie direttamente sul terreno selettivo differenziale Palcam o ALOA con il metodo delle piastre per spatolamento superficiale, incubare a 30°C per 2-4 giorni. . Procedere, in presenza delle caratteristiche colonie , alla identificazione della specie L. monocytogenes

Se si preferisce la conta diretta in terreno liquido, effettuare diluizioni decimali seminando in triplice serie il terreno di Fraser. Lettura col MPN delle provette annerite e striscio di conferma su piastre di terreno selettivo differenziale Palcam od ALOA. Il numero di ufc/g di Listeria spp verrà conteggiato mantenendo il sistema dell'MPN.

RICERCA DI BATTERI PROPIONICI

-terreno di politi-hettinga

Semina per spatolamento superficiale vengono incubate in anaerobiosi a 30°C per 6-7 giorni. Su questo terreno i batteri proponici crescono con caratteristiche colonie di colore bruno.

-terreno yela

Incubazione 30°C per 5-7 giorni in anaerobiosi.

RICERCA DEI VIBRIONI

Per vibrioni alofili ed alotolleranti dalle salamoie

-agar saccarosio sale

Semina per diffusione ed incubazione a 20°C per 48-72 ore. I vibrioni alofili si sviluppano, a seguito della fermentazione del saccarosio, sotto forma di colonie gialle.

Ricerca di vibrio parahaemolyticus

Questo microrganismo può essere ricercato mediante conta diretta o previo arricchimento.

a) Ricerca diretta (agar BTB, agar TCBS)

Semina indifferentemente per spatolamento superficiale o per diffusione. Dopo 18-24 ore di incubazione a 37°C i ceppi di V. parahaemolyticus patogeni si presentano sotto forma di colonie rotonde di diametro 2-3 mm verdi o blu. I vibrioni non patogeni danno colonie più grandi, gialle o verdi con centro blu a seconda della capacità di fermentare saccarosio.

b) *Arricchimento* (Brodo salato alla colistina, Brodo glucosato salato al Teepol)

La prova di conferma viene effettuata nei terreni solidi prima descritti

TERRENI PER EUMICETI TOTALI

Per la ricerca di queste forme microbiche sono disponibili vari terreni, quelli più comuni sono:

-agar all'infuso di malto contenente 1,8% di agar pH 5,5

-agar patata

-yeast glucose cloramfenicolo

Il pH viene portato a 5,5 dopo la sterilizzazione mediante aggiunta di una soluzione al 10% di acido tartarico al 10% sterilizzata a parte (5 ml per 100 ml di terreno). Le piastre vengono allestite per spatolamento superficiale ed incubate generalmente a 25°C per 5-7 giorni. Per i lieviti, che sono anaerobi facoltativi le piastre possono essere allestite anche per incorporamento

Per limitare lo sviluppo di colonie di muffe si può aggiungere al terreno di coltura una sol. di rosa bengala, 35 ppm al massimo.

Eumiceti osmofili (MY40)

In questo caso è bene anche aggiungere un 20% di saccarosio al diluente in cui si preparano le diluizioni decimali da piastrare per evitare shock osmotici.

RICERCA DI GRUPPI SPECIFICI

-*Aspergillus flavus* agar medium (ADM)

Utilizzato per la ricerca presuntiva di aspergilli del gruppo *flavus*

Semina per spatolamento superficiale ed incubazione a 25-30°C per 3-5 giorni..*Aspergillus flavus* crescerà con caratteristiche colonie con fondo arancio.

-Dichloran cloramfenicolo malto agar

Utilizzato per il recupero di *Alternaria* spp.

-Czapek dox iprodione dichloran aga

per la ricerca delle muffe del genere *Fusarium*

Al terreno pronto per l'uso aggiungere 10 ml di una soluzione allo 0,5% di clorotetraciclina ed 1 ml di iprodione in sospensione (0,3 di iprodione in 50 ml di acqua sterile). Semina per striscio superficiale ed incubazione a 25-30°C. Seguire giornalmente la crescita, osservando al microscopio a piccolo ingrandimento la formazione delle varie strutture miceliari.

DETERMINAZIONE IMMUNOLOGICA

I test immunoenzimatici sono test che servono a rilevare l'eventuale presenza di anticorpi o di antigeni in un campione.

Per individuare un particolare anticorpo si utilizza l'antigene, contro cui è diretto tale anticorpo, il quale andrà a legarsi con quest'ultimo, se presente. Oppure, in modo speculare, è possibile utilizzare un particolare anticorpo per rivelare l'antigene incognito. Questa intercambiabilità di antigeni e anticorpi come legandi e come rivelatori spiega l'enorme versatilità delle tecniche immunoenzimatiche.

Gli anticorpi costituiscono un formidabile strumento per la valutazione su base strutturale. La loro capacità di discriminare tra strutture molto simili ne fa un insostituibile tool diagnostico. Possono essere usati per valutare strutture in soluzione/sospensione o in preparati solidi (istologici), possono dar luogo a misurazioni quantitative, semi-quantitative o a valutazioni qualitative, dipendentemente dalla metodica utilizzata.

La presenza del complesso antigene-anticorpo così formatosi, reso visibile con particolari procedure, è indice della presenza dell'anticorpo, o dell'antigene, cercato.

Caratteristica peculiare dei test immunoenzimatici è quella di sfruttare in modo accoppiato una reazione immunologica per legare selettivamente la molecola ricercata, e una reazione enzimatica per produrre un segnale colorato facilmente misurabile a occhio o in modo quantitativo con appositi fotometri. La componente immunologica del test ne assicura la specificità mentre la componente enzimatica ne assicura la sensibilità analitica.

Successivamente altre tecnologie analitiche hanno sostituito la rivelazione enzimatica, ottenendone vantaggi di sensibilità, linearità o praticabilità. Tali tecnologie possono usare ad esempio segnali radioattivi o fluorescenti.

I test sono stati implementati in numerose varianti tecniche, caratterizzati da varie sigle, tutte volte a risolvere in modo più o meno brillante il principale problema analitico posto da questa tecnologia, che è quello di distinguere l'anticorpo rimasto libero dall'anticorpo che invece si è legato alla molecola cercata, segnalandone la presenza.

Esempi di test immunoenzimatici sono:

- il test ELISA
- il test ELFA
- il test MEIA

Test ELISA

ELISA è un acronimo derivato dall'espressione inglese enzyme-linked immunosorbent assay (saggio immuno-assorbente legato ad un enzima). Si tratta di un versatile metodo d'analisi immunologica usato più comunemente in biochimica per rilevare la presenza di una sostanza usando uno o più anticorpi ad uno dei quali è legato un enzima.

La sostanza da rilevare può essere un antigene appartenente ad un patogeno od una molecola più piccola, chiamata aptene, come per esempio per riconoscere la presenza di steroidi. Se invece di un enzima, viene usato un radionucleide (spesso l'iodio-125) per rilevare la positività del test, si parla di RIA dall'inglese (radio-immuno assay).

Ci sono diversi varianti del test ELISA, che si differenziano secondo il componente che si vuole rilevare.

Il metodo più comunemente utilizzato è il metodo diretto o "sandwich": il metodo prevede la copertura del fondo del pozzetto con un anticorpo specifico per l'antigene che vogliamo misurare. Si esegue un lavaggio. In seguito si introduce l'antigene, che si legherà all'anticorpo. Si lava ulteriormente per togliere antigeni in eccesso. Si introduce un anticorpo specifico che legherà il complesso anticorpo + antigene, formando un triplo strato (o "sandwich"), da cui prende il nome il

test. All'ultimo anticorpo che abbiamo aggiunto, era legato un enzima specifico, e aggiungendo il suo substrato si formerà un prodotto colorato, che evidenzierà il pozzetto.

le fasi in sintesi prevedono:

1. Immissione di una soluzione dell'anticorpo primario, specifico per l'antigene da ricercare, nei pozzetti di una apposita piastra da saggio in polistirene. Il fondo del pozzetto viene saturato con l'anticorpo che aderisce al fondo dei pozzetti e l'eccesso viene lavato via.
2. Aggiunta dei campioni dei quali bisogna saggiare la presenza, o meno, dell'antigene caratteristico dell'organismo patogeno e lavaggio con soluzione tampone; L'antigene, se presente, si lega specificamente con l'anticorpo e l'eccesso viene lavato via.
3. Aggiunta dell'anticorpo secondario. Questo anticorpo viene coniugato con un enzima, tipicamente perossidasi o fosfatasi alcalina, e lavaggio con soluzione tampone; L'anticorpo secondario si lega selettivamente all'antigene, se presente, e l'eccesso viene lavato via. L'assenza dell'antigene specifico per l'anticorpo comporta che l'anticorpo secondario (e il relativo enzima ad esso coniugato), con il lavaggio, venga dilavato.
4. Se l'enzima usato è la fosfatasi alcalina si aggiunge come substrato p-nitrofenilfosfato; Questa sostanza provoca una reazione con la fosfatasi alcalina coniugata all'anticorpo secondario producendo p-nitrofenolo di colore giallo. Se l'antigene caratteristico dell'organismo patogeno è assente nel pozzetto non vi sarà neanche l'enzima coniugato all'anticorpo secondario e quindi la reazione non può avvenire.
5. Lettura del risultato, espressione della reazione tra enzima fosfatasi e p-nitrofenilfosfato che produce sul substrato una reazione cromogenica o fluorogenica - ovvero sviluppo di colore o luce di fluorescenza - successivamente misurabile attraverso uno spettrofotometro.

Lo sviluppo del colore è indicativo della presenza dell'antigene che si voleva saggiare e l'intensità della colorazione, misurabile grazie al spettrofotometro, è semi-quantitativa secondo una scala arbitraria di intensità.

Al fine di validare il test, le operazioni sopra riportate vengono effettuate in due pozzetti distinti che differiscono per il tipo di anticorpo primario che viene introdotto inizialmente: un pozzetto viene riempito con l'anticorpo specifico per l'antigene che si vuole individuare, mentre l'altro viene saturato con un anticorpo non specifico. Affinché il test possa ritenersi valido, in primo luogo deve risultare negativo in quest'ultimo pozzetto e nel caso in cui il campione biologico saggiato contenga realmente l'antigene d'interesse, il test deve essere positivo nell'altro pozzetto, quello saturato con l'anticorpo primario specifico.

Nei laboratori di analisi il test ELISA è utilizzato per avere una più veloce determinazione microbica poiché i tempi di incubazione e rilevazione sono, anche se presenti, notevolmente inferiori a quelli delle conte microbiche, per aumentare la validità del test si ricorre ad una versione più completa del test, la Multiple & Portable ELISA, che usa una conformazione innovativa della fase solida: un'astina di polistirene dotata di 8 o 12 pozzetti preriempiti con le soluzioni e i reagenti differenti, in modo che in ciascun campione sia possibile la ricerca simultanea di differenti anticorpi e/o di differenti antigeni, per analisi multiple o per multi-screening più un pozzetto non è sensibilizzato che funge da controllo negativo, per valutare la specificità per tutti i test di ricerca di anticorpi e/o antigeni eseguiti nel campione in esame; le astine vengono poi poste in un apposito fotometro che legge i cambiamenti di colore dei vari pozzetti e, attraverso il collegamento con un processore, elabora e stampa i dati delle concentrazioni microbiche.

ANALISI BIOMOLECOLARI

La presenza di batteri può essere individuata più velocemente tramite la ricerca non tanto degli stessi ma molecole da loro prodotte, particolari proteine che ne caratterizzano la struttura o sequenza di acidi nucleici. Queste tecniche innovative stanno venendo messe a punto nel corso di questi ultimi anni come metodi più veloci dato non richiedono il tempo di incubazione che è di un minimo di 24/48h, anche per l'individuazione di quei microrganismi difficili da coltivare o troppo pericolosi da manipolare, prestando particolarmente occhio al rapporto costi/benefici.

La ricerca molecolare permette di valutare la presenza del genoma dei microrganismi con una sensibilità e affidabilità molto superiore alle metodiche di microbiologia classica. Ad oggi, per la rilevazione dei microrganismi patogeni, accanto alle metodiche tradizionali come l'esame colturale generale, sono disponibili tecniche di amplificazione molecolare che hanno assunto un ruolo determinante nella diagnostica microbiologica.

Praticamente tutte le tecniche si basano sulla reazione a catena della polimerasi, comunemente nota con la sigla PCR. La PCR è una tecnica di biologia molecolare che consente la moltiplicazione (amplificazione) di frammenti di acidi nucleici dei quali si conoscano le sequenze nucleotidiche iniziali e terminali. L'amplificazione mediante PCR consente di ottenere in vitro molto rapidamente la quantità di materiale genetico necessaria per le successive applicazioni.

La PCR ricostruisce in vitro uno specifico passaggio della duplicazione cellulare: la ricostituzione (sintesi) di un segmento di DNA "completo" (a doppia elica) a partire da un filamento a singola elica. Il filamento mancante viene ricostruito a partire da una serie di nucleotidi che vengono disposti nella corretta sequenza, complementare a quella del DNA interessato.

Questo processo viene svolto in natura da enzimi chiamati DNA-polimerasi, che sono in grado di sintetizzare progressivamente un nuovo filamento di DNA nelle seguenti condizioni:

- disponibilità dei nucleotidi da polimerizzare;
- DNA denaturato (le due eliche che compongono i filamenti devono essere già separate);
- non è possibile sintetizzare un nuovo filamento a partire da zero;
- devono inoltre essere rispettate opportune condizioni di temperatura, pH, ecc.

È possibile quindi ricostruire le condizioni che portano alla formazione dei nuovi segmenti di DNA, ponendo in soluzione:

- una quantità, anche minima, del segmento di DNA che si desidera riprodurre;
- una quantità opportuna di nucleotidi liberi per costituire i nuovi filamenti;
- opportuni "inneschi", detti primer, costituiti da brevi sequenze di DNA complementari alle estremità 5' e 3' dei due filamenti del segmento da riprodurre;
- una DNA polimerasi termo-resistente;
- un tampone pH;
- altri elementi di supporto (ad es. ioni magnesio) indispensabili per la DNA polimerasi;
- acqua per portare a volume la soluzione.

Per avviare la reazione della polimerasi (fase di prolungamento del filamento) è prima necessario provvedere alla separazione dei filamenti del DNA (fase di denaturazione), quindi alla creazione del legame tra i primer e le regioni loro complementari dei filamenti di DNA denaturati (fase di annealing). Questo processo risulta però incompatibile con la DNA polimerasi umana, che viene distrutta alle temperature necessarie alla denaturazione (96-99°C).

Per ovviare a questo inconveniente si fa ricorso alle polimerasi appartenenti a organismi termofili che non sono inattivate dalle alte temperature, ad esempio la Taq polimerasi proveniente dal batterio termofilo *Thermus aquaticus*. Ciò consente di realizzare più cicli di PCR in sequenza, in ciascuno dei quali viene duplicato anche il DNA sintetizzato nelle fasi precedenti, ottenendo una reazione a catena che consente una moltiplicazione estremamente rapida del materiale genetico di interesse.

Schema di un ciclo di PCR

1. Fase di denaturazione: la soluzione di DNA da replicare, desossiribonucleotidi trifosfati, ioni magnesio, primer e TAQ polimerasi viene portata a una temperatura compresa tra 94 e 99°C. Ci si trova, di conseguenza, in una situazione in cui la doppia elica del DNA viene completamente scissa ed i due filamenti di cui essa è composta sono liberi.
2. Fase di annealing: successivamente la temperatura viene abbassata fino a 40-55°C circa al fine di permettere il legame dei primer alle regioni loro complementari dei filamenti di DNA denaturati.
3. Fase di prolungamento: infine la temperatura viene alzata fino a 65-72°C al fine di massimizzare l'azione della TAQ polimerasi che determina un allungamento dei primer legati, utilizzando come stampo il filamento singolo di DNA.

Il ciclo descritto viene ripetuto generalmente per circa 30-40 volte. In genere non si superano i 50 cicli in quanto ad un certo punto la quota di DNA ottenuto raggiunge un plateau. Ciò avviene, ad esempio, per carenza degli oligonucleotidi usati come inneschi. Bisogna inoltre considerare che si potrebbe amplificare in maniera eccessiva anche eventuale materiale genomico contaminante.

In linea teorica ogni ciclo dovrebbe raddoppiare la quantità di DNA; ciò, tuttavia, non si realizza. Per avere una stima sufficientemente attendibile del numero di filamenti di DNA ottenuti dopo η cicli si può ricorrere alla formula:

$$Y_{\eta} = A \cdot (1+E)^{\eta}$$

dove:

Y_{η} = DNA prodotto dopo η cicli

A = quantità iniziale di DNA presente

η = numero di cicli di PCR effettuati

E = efficienza dell'amplificazione (in genere compresa tra 0,7 e 0,8)

Allestimento di una PCR

La scelta del bersaglio genetico da amplificare tramite PCR dipende da ciò che si è interessati ad ottenere e per tale motivo si ricorre a differenti strategie, in caso di ricerca di contaminazioni alimentari si possono amplificare geni del microorganismo in questione che codifichino per funzioni vitali essenziali o per fattori di patogenicità.

Il bersaglio da amplificare può anche essere una molecola di RNA (come, ad esempio, nel caso di alcuni virus) la quale deve essere sottoposta ad una reazione di retrotrascrizione.

Per effettuare una PCR si può benissimo utilizzare una piccola quantità di bersaglio in quanto la sensibilità della reazione è molto alta. Si è visto che una quantità di DNA genomico di 100 ng è sufficiente per identificare un gene bersaglio che è presente in una singola copia. La presenza d'un basso quantitativo di bersaglio, comunque, aumenta la probabilità che vengano amplificate sequenze non specifiche. Una quantità troppo elevata di DNA, al contrario, può diminuire l'efficienza dell'amplificazione a causa della presenza di troppi elementi contaminanti e può rendere complessa la valutazione della resa della reazione durante i processi di ottimizzazione dei singoli parametri per cercare di allestire tutta la PCR.

Durante le fasi d'allestimento d'una PCR sarebbe bene, per evitare le problematiche appena riportate, cercare d'ottimizzare la quantità di DNA.

L'efficienza d'amplificazione è leggermente inferiore in molecole di DNA circolari o che abbiano un peso molecolare troppo elevato per cui è consigliabile utilizzare appositi enzimi di restrizione che permettano di linearizzare il materiale genomico o di ridurlo in frammenti più piccoli.

La scelta dei primer da utilizzare costituisce un aspetto essenziale per la buona riuscita della PCR. Essi, infatti, devono potersi ibridare in maniera specifica ed efficiente alla sequenza d'interesse, tralasciando quelle aspecifiche. La tipologia di primer da usare varia a seconda dello scopo della PCR. Nel caso della ricerca di un determinato microorganismo risulta conveniente ricorrere a primer

che siano specie-specifici o che possano efficacemente distinguere tra ceppi patogeni e non. Grazie alle banche dati ed alle pubblicazioni scientifiche stanno diventando sempre più disponibili le sequenze di DNA o di RNA necessarie per poter disegnare i primer da utilizzare nelle PCR. Una volta ottenuta la sequenza d'interesse bisogna controllare che nel resto del genoma non vi siano sequenze omologhe che possano portare alla produzione di falsi positivi.

La concentrazione di magnesio è senza dubbio il fattore più critico di tutta la PCR. La presenza di magnesio condiziona l'attività della polimerasi, l'ibridizzazione dei primer ed aumenta la temperatura cui il DNA stampo si denatura. Vista la grande importanza del magnesio, bisogna prestare attenzione che nella soluzione di reazione non sussista un'eccessiva quantità di agenti chelanti o di gruppi negativamente carichi in quanto possono catturare il magnesio presente rendendolo non disponibile.

Generalmente i nucleotidi vengono utilizzati alla concentrazione di 200 μM ciascuno. Un aumento di questa concentrazione non porta ad un aumento dell'efficienza della reazione, i nucleotidi, in concentrazione superiore ai 200 μM , possono aumentare la percentuale d'errore della polimerasi od addirittura inibirla qualora presenti in concentrazione millimolare in quanto i gruppi fosfato carichi negativamente possono legarsi al magnesio della miscela rendendolo meno disponibile.

L'allestimento di opportuni controlli di qualità permette di valutare la sensibilità e specificità della metodica, nonché di evidenziare la presenza di falsi positivi o falsi negativi. I controlli da utilizzare sono:

- il controllo positivo,
- il controllo negativo.

Il controllo positivo consiste in un campione in cui la sequenza bersaglio è contenuta. Tale controllo non dovrebbe contenere un numero di copie di sequenza bersaglio troppo alto (in genere tra 10^5 e 10^6). Ciò al fine di evitare di creare pericolosi aerosol che possano contaminare altri campioni o di sottostimare eventuali cali di sensibilità della reazione con produzione di falsi negativi. Il controllo negativo consiste in un campione in cui la sequenza bersaglio manca. Esso serve per evidenziare eventuali contaminazioni che potrebbero riferirsi sia all'estrazione del materiale genomico, sia al momento di preparazione della PCR.

Importante è fare attenzione alla temperatura e al tempo di esposizione delle varie fasi.

Nella fase di denaturazione deve avvenire la completa separazione dei due filamenti di DNA. Si tratta d'un momento importante in quanto una denaturazione incompleta può pregiudicare l'efficienza dell'amplificazione. La denaturazione avviene piuttosto rapidamente ma bisogna assicurarsi che la temperatura raggiunta sia omogenea in tutta la provetta di reazione. È da tenere presente che aumenti eccessivi di temperatura o protratti troppo a lungo possono diminuire l'attività della DNA polimerasi. Per evitare simili problematiche, si può ricorrere ad agenti che destabilizzano i ponti idrogeno per cui la temperatura di denaturazione può essere diminuita.

Nella fase di annealing, in cui i primer si appaiano alle sequenze complementari del bersaglio, la temperatura da utilizzare, e la sua durata, devono essere scelti considerando due aspetti opposti. Una temperatura più elevata, aumenta la specificità della reazione ma ne può pregiudicare l'efficienza poiché favorisce la separazione dei primer dal bersaglio. Se la temperatura viene abbassata, le condizioni diventano meno stringenti ma viene favorita la formazione di ibridi, e quindi di amplificati, aspecifici.

Nella fase di prolungamento la temperatura da adottare è quella cui corrisponde la massima attività enzimatica. Il periodo di tempo in cui tale temperatura viene utilizzata varia a seconda della lunghezza del frammento da amplificare. In genere, l'ultimo ciclo della reazione di amplificazione dura più a lungo al fine di poter ottenere prodotti che siano completi il più possibile. Tale passo risulta estremamente importante in situazioni in cui i prodotti di reazione debbano avere estremità ben definite, per poterli utilizzare, ad esempio, nel sequenziamento o nel clonaggio.

Paradossalmente, il più grande problema della PCR deriva proprio dalla sua elevata sensibilità ed efficienza. In effetti la reazione risulta molto sensibile alla presenza di materiale genetico contaminante che si può trovare in differenti posti: strumentazione, operatore, ambiente esterno. Il problema delle contaminazioni è tanto maggiore quanto la sensibilità della PCR è elevata. Una PCR meno sensibile risulterà, ovviamente, meno soggetta a contaminazioni ma necessiterà d'una maggior presenza del proprio bersaglio per poterlo amplificare.

Un altro aspetto che deve essere considerato è la presenza di materiale contaminante di origine ambientale o cellulare. Avendo a che fare con microrganismi vi può essere la possibilità che essi crescano in vicinanza ai luoghi in cui la PCR viene preparata. È anche possibile la contaminazione crociata a partire dal materiale utilizzato come controllo positivo il quale potrebbe andarsi a depositare nelle provette dei campioni da testare.

Esiste, infine un'altra possibilità di contaminazione che si può avere durante le procedure di rilevazione del prodotto della PCR. In questo caso è possibile che materiale di un campione possa aggiungersi in piccola quantità ad un altro con la possibilità d'un risultato falsato. Di fronte ad un problema così importante come quello delle contaminazioni è opportuno che vengano intrapresi degli accorgimenti idonei a minimizzare tale rischio.

È assolutamente indispensabile che l'area di preparazione della miscela della reazione sia ben distinta da quella in cui i campioni vengono inoculati e da quella in cui vengono analizzati. Ciò vale anche per tutta la strumentazione da utilizzarsi. Il fine di ciò consiste nell'evitare che eventuale materiale genomico possa contaminare la soluzione mentre viene preparata.

Tutti i reagenti della PCR dovrebbero venir suddivisi in aliquote piuttosto piccole in maniera tale da evitare che una provetta venga aperta e chiusa un numero troppo elevato di volte. In caso di presenza di materiale contaminante, poi, non sarà necessario buttare tutto quanto il reagente considerato inquinato ma solo l'aliquota di esso che è stata utilizzata.

Le pipette utilizzate nei laboratori costituiscono una delle maggiori fonti di contaminazione, un accorgimento utile da usare consiste nell'utilizzo di pipette differenti per la preparazione della miscela di reazione e per l'inoculo del DNA.

Tutte queste misure vanno, ovviamente, inserite in un contesto generale di buona pratica laboratoristica che dovrebbe prevedere, tra l'altro: il cambio frequente dei guanti, la pulizia accurata di tutte le superfici e strumentazioni e la chiusura di tutte le provette subito dopo il loro utilizzo.

La PCR viene utilizzata in tutte quelle situazioni in cui bisogna amplificare un quantitativo di DNA fino a livelli utili per analisi successive. I campi di applicazione sono enormi. La tecnica viene sfruttata, per esempio, nelle analisi per la qualità degli elementi per evidenziare la presenza o assenza di determinati patogeni per cui serve una diagnostica rapida ed efficace, come nel caso del *Clostridium botulinico*. Il suo utilizzo consente inoltre di rivelare contaminazioni da OGM ed eventuali malattie genetiche. Le diverse gradazioni di specificità dei primer integrate alla diversa efficienza con cui essi si legano all'amplificato a seconda della temperatura garantiscono a questa tecnica una straordinaria flessibilità per studi a tutti i diversi livelli tassonomici.

Attualmente esistono delle varianti della PCR classica tra cui:

- Real time PCR
- RT-PCR
- Reazione a catena della ligasi (LCR)
- Mismatching PCR
- PCR-RFLP
- PCR in situ
- Touchdown PCR
- Race-PCR
- PCR asimmetrica
- Multiplex PCR

Real time PCR

La PCR real-time, denominata anche PCR quantitativa o PCR quantitativa in tempo reale, è un metodo che simultaneamente amplifica e quantifica il DNA.

Il DNA è amplificato da reazioni a catena della DNA-polimerasi. Dopo ogni turno di amplificazione, il DNA è quantificato. I metodi comuni di quantificazione includono l'uso delle colorazioni fluorescenti che intercalano con il DNA doppio-filamento e gli oligonucleotidi modificati del DNA che sono fluorescenti una volta ibridati con un DNA. Spesso la PCR real-time è combinata con la PCR Retro Trascrizionale per quantificare i livelli di espressione di specifici RNA, la combinazione di queste due tecniche è spesso denominata RT-PCR quantitativa.

Similmente alle reazioni di PCR, sono richiesti diversi passaggi per sviluppare un'analisi quantitativa di PCR. Questi includono:

- la produzione di filamenti stampo puliti;
- la progettazione di inneschi;
- l'ottimizzazione degli stati di reazione.

Per alcuni geni bersaglio, le impostazioni degli inneschi e le condizioni ottimizzate sono state raccolte in alcuni database per facilitare lo sviluppo delle analisi. In una reazione tipica, il prodotto di PCR si raddoppia ad ogni ciclo dell'amplificazione. Siccome sono necessari parecchi cicli affinché abbastanza prodotto sia rilevabile, il diagramma della fluorescenza sul numero dei cicli esibisce un andamento sigmoide. Nei cicli finali, i substrati di reazione iniziano a scarseggiare, i prodotti di PCR non raddoppiano e la curva comincia ad appiattirsi. Il punto sulla curva in cui la quantità di fluorescenza comincia ad aumentare velocemente, solitamente alcuni scarti quadratici medi sopra la linea di base, è chiamato il ciclo soglia (valore di Ct). Il diagramma di Ct su DNA stampo è lineare, così un confronto dei valori di Ct fra reazioni multiple permette di calcolare la concentrazione dell'acido nucleico che si vuole quantificare. La pendenza di questa linea fornisce inoltre una misura dell'efficienza della PCR. Alcuni strumenti permettono agli utenti di generare delle curve di melting che seguono il completamento della PCR. Le curve di melting forniscono un'indicazione della purezza del prodotto di reazione e rivelano la presenza di dimeri degli inneschi.

Per valutare in tempo reale la quantità di DNA a doppio filamento presente dopo ogni ciclo di sintesi, nella miscela di reazione è presente il SYBR Green, un composto fluorescente intercalante del DNA. La fluorescenza del SYBR Green aumenta considerevolmente nel momento in cui la molecola si intercala nel solco minore del DNA a doppio filamento, pertanto, la misura quantitativa della fluorescenza emessa è direttamente proporzionale alla quantità di DNA a doppio filamento presente in ogni campione, che è, a sua volta, proporzionale alla quantità di DNA presente nel campione iniziale, a patto che la molecola intercalante sia presente in eccesso. La lettura della fluorescenza avviene al termine di ogni ciclo di amplificazione. L'uso di molecole fluorescenti intercalanti è un metodo efficace e relativamente economico, tuttavia questo sistema non è in grado di discriminare tra i prodotti specifici di amplificazione e altri prodotti aspecifici, come dimeri di primer.

Si può effettuare una quantificazione assoluta delle concentrazioni di specifici RNA producendo una curva standard di calibrazione; in alternativa si può effettuare una quantificazione relativa rapportando la loro quantità rispetto a quella di un gene di controllo. La quantificazione assoluta può utilizzare dei campioni standard (DNA plasmidico o altre forme di DNA) la cui concentrazione assoluta sia nota. Si deve essere certi, tuttavia, che l'efficienza della PCR sia la stessa per i campioni noti e per quelli incogniti. Il metodo della quantificazione relativa è più semplice poiché richiede la quantificazione di geni di controllo o housekeeping per normalizzare l'espressione del gene studiato. Tuttavia, la selezione dei geni di controllo adatti può causare problemi poiché possono non essere espressi ugualmente attraverso tutti i campioni incogniti. Ciò può essere risolto normalizzando le misure con un insieme di geni housekeeping per evitare tale problema di variabilità.

Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR)

La tecnica della RT-PCR è una variante della tecnica della reazione a catena della polimerasi. Questa tecnica consiste nella sintesi di una molecola di DNA a doppio filamento a partire da uno stampo di RNA. La molecola di DNA sintetizzata mediante il processo di retrotrascrizione è definita cDNA, dove la c sta per complementare (complementaryDNA).

Mediante l'impiego della RT-PCR è possibile convertire in DNA un intero trascrittoma (insieme di tutto il trascritto di una cellula) di uno specifico tessuto di un individuo in una specifica fase del suo sviluppo. Per tale motivo, la RT-PCR è una tecnica che viene sfruttata in laboratorio per studiare l'espressione genica, perché consente di sottoporre ad ulteriori analisi il cDNA sintetizzato.

SPERIMENTAZIONE ANIMALE

Le locuzioni sperimentazione animale, ricerca animale e ricerca in vivo hanno lo stesso significato e sono usate in ambito scientifico per indicare l'ampio insieme degli esperimenti condotti con l'ausilio di modelli animali. I primi riferimenti alla sperimentazione animale possono essere rintracciati in alcuni scritti del Corpus Hippocraticum (fine V - inizio IV secolo a.C.); tuttavia, in questi testi l'analogia morfologica tra umani ed animali non viene teoricamente spiegata o giustificata.

Aristotele è il primo ad argomentare teoricamente l'omogeneità delle parti e delle funzioni degli animali, uomo incluso.

Gli animali hanno avuto un ruolo importante in numerosi e ben noti esperimenti. Negli anni 1880, Louis Pasteur dimostrò la teoria dei germi in medicina somministrando antrace ad alcune pecore, e circa dieci anni dopo Ivan Pavlov utilizzò i cani per descrivere la sua teoria del riflesso condizionato. L'insulina fu isolata per la prima volta nei cani nel 1922, rivoluzionando il trattamento del diabete. Negli anni settanta, trattamenti antibiotici multi-farmaco per la cura della lebbra furono sviluppati grazie a test sugli armadilli.

Dal 1900, la quasi totalità dei premi Nobel per la medicina hanno condotto le loro ricerche con l'utilizzo di modelli animali, spesso essenziali alla scoperta. Tra questi gli italiani Camillo Golgi e Rita Levi Montalcini per le scoperte della struttura e dello sviluppo del sistema nervoso. Altri hanno rivoluzionato la conoscenza del sistema immunitario e delle infezioni, hanno permesso la messa a punto delle tecniche dei trapianti di organi e tessuti, la scoperta e lo studio della penicillina e la cura della febbre gialla, del tifo, della poliomielite.

Negli Stati Uniti la materia è regolata dall'Animal Welfare Act del 1966 e dalla Guide for the Care and Use of Laboratory Animals pubblicata dalla National Academy of Sciences; sulla base di questa regolamentazione è consentita la sperimentazione se si può considerare giustificata dal punto di vista scientifico.

Nel 2010 l'Unione Europea ha emanato la direttiva 2010/63/UE sulla Protezione degli animali utilizzati a fini scientifici. In essa, tra le altre cose si prevede:

- divieto di uso dei primati salva la possibilità di deroga
- il progetto che prevede la sperimentazione dovrà essere autorizzato dalle autorità competenti che ne dovranno attestare la necessità, concedendo l'autorizzazione solo se non vi sono metodi alternativi utilizzabili
- il progetto dovrà essere reso pubblico
- le strutture che utilizzano animali saranno sottoposte a ispezioni annuali
- non potranno essere utilizzati randagi e animali catturati in natura

In Italia la sperimentazione animale ha una regolamentazione più restrittiva; è disciplinata principalmente dal Decreto legislativo 27 gennaio 1992, n. 116, in materia di "Attuazione della direttiva n. 86/609/CEE in materia di protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici.". In seguito è stata introdotta anche la Legge 6 agosto 2013, n. 96, articolo 13, in materia di "Delega al Governo per il recepimento delle direttive europee e l'attuazione di altri atti dell'Unione europea - Legge di delegazione europea 2013.". La legge ha introdotto un articolato regime di autocontrollo dando dei precisi limiti entro cui può essere svolta la sperimentazione, al di fuori di tali limiti si commette un illecito di natura amministrativa e nei casi più gravi, di natura penale.

L'obiezione di coscienza alla sperimentazione animale è regolamentata dalla Legge 12 ottobre 1993, n. 413, in materia di "Norme sull'obiezione di coscienza alla sperimentazione animale."

In tutta Europa, dal 2009, sono inoltre vietati i test sugli animali per prodotti cosmetici e dal 2013 è stato introdotto il divieto di vendita in Europa di prodotti di cosmesi che contengano ingredienti che siano stati testati su animali, in qualunque parte del mondo.

Posizione della comunità scientifica

La stragrande maggioranza della comunità scientifica e enti accademici come la Royal Society e la statunitense National Academy of Sciences ritengono ad oggi necessario il ricorso alla sperimentazione animale.

Secondo questa posizione gli animali sono dei modelli causali analoghi (CAM - causal analog models) e la funzione primaria dei test sugli animali è quella di scoprire i meccanismi causali che producono e dirigono il corso della patologia negli animali; questi risultati vengono poi estesi per analogia agli esseri umani. La comprensione dei meccanismi causali rilevanti negli umani serve poi agli scienziati per prevenire o trattare le malattie (AMA 1988). La generalizzabilità da modello a soggetto modellato viene basata sulla vicinanza filogenetica tra i soggetti, poiché questa vicinanza evolutiva implica una vicinanza anche nei meccanismi (fisiologici, patologici, molecolari, ecc.) studiati. Altre ipotesi sulla validità della sperimentazione animale sono quella strumentalista ("sappiamo che gli animali sono causalmente simili agli uomini grazie alla nostra esperienza") e quella basata sulla storia della medicina, plausibile e scientificamente corretta, che testimonia in molti casi l'utilità della sperimentazione animale.

Per quanto riguarda i risultati della sperimentazione animale, secondo gli studiosi ad essa favorevoli la ricerca basata su test animali ha avuto un ruolo fondamentale in larga parte delle scoperte mediche dell'ultimo secolo, come ad esempio i vaccini e agli antibiotici per la prevenzione e il trattamento delle infezioni e gli anestetici usati in tutte le forme di chirurgia.

Nel maggio del 1881, Louis Pasteur eseguì un esperimento pubblico per mostrare l'efficacia della vaccinazione. Selezioneò due gruppi di 25 pecore, uno dei quali venne vaccinato con due somministrazioni distanziate di 15 giorni di un vaccino da lui preparato. Trenta giorni dopo la prima iniezione ad entrambi i gruppi venne iniettata una coltura di batteri di antrace vivi. Il risultato fu sorprendente: tutte le pecore vaccinate riuscirono a sopravvivere, le altre 25 morirono in pochi giorni.

La scoperta dell'insulina viene spesso citata come un altro chiaro esempio del contributo della sperimentazione animale al progresso della medicina: Frederick Grant Banting e Charles Herbert Best, negli anni venti, scoprirono che l'iniezione di un estratto di cellule pancreatiche che contenevano l'ormone dell'insulina alleviava nei cani i sintomi del diabete.

Gli interventi cardiocirurgici a cuore aperto, la dialisi e i trapianti renali, i trattamenti per l'asma, per la leucemia e per la pressione alta, sono per i fautori di questa tecnica sperimentale solo alcuni altri fra i progressi clinici resi possibili grazie alla ricerca medica e ai test condotti sugli animali. Inoltre, sempre secondo i suoi fautori, negli ultimi decenni grazie alla ricerca basata su sperimentazioni animali si è iniziato ad affrontare patologie difficili e complesse come i tumori, i problemi cardiaci più gravi, nonché infezioni di nuova natura come l'HIV, e farmaci più efficaci nella prevenzione del rigetto nei trapianti di organi sono stati sviluppati negli anni ottanta e novanta grazie ai test sugli animali.

Le organizzazioni mediche e scientifiche citano il caso della talidomide per sostenere l'importanza dei test animali nella prevenzione del rischio di difetti congeniti nel nascituro. Rifacendosi alla vicenda, esse sostengono che la tragedia della talidomide fu dovuta al fatto che i modelli animali non furono usati nel giusto modo, in particolare che non furono usati modelli animali gravidi, e concludono affermando che i cambiamenti e i miglioramenti introdotti in seguito assicurano oggi che errori simili non possono più verificarsi.

La tecnica del gene targeting, che Mario Capecchi, Martin Evans e Oliver Smithies con i loro studi hanno contribuito a mettere a punto, è utilizzata oggi dai ricercatori di tutto il mondo per «costruire» topi con mutazioni inserite nei geni. La potenza di questa tecnologia è tale che il ricercatore può selezionare sia quale gene mutare sia come farlo. In pratica il ricercatore può scegliere come e quali sequenze di DNA del genoma di topo vuole cambiare, e ciò permette di valutare nel dettaglio la funzione di ogni gene durante lo sviluppo embrionale o nelle fasi successive. Il gene targeting sta avendo una ricaduta importante anche sugli studi sul cancro, sull'embriogenesi, sull'immunologia,

sulla neurobiologia e su moltissime altre malattie, e ha notevoli applicazioni nell'ambito della medicina clinica.

Secondo ciò che sostengono gli assertori della validità della sperimentazione animale, va poi ricordato che, oltre ai benefici medici e clinici, anche gran parte dei progressi in medicina veterinaria sono ascrivibili alla ricerca compiuta sugli animali.

I sostenitori della sperimentazione animale riconoscono che la scienza medica ha sviluppato nel tempo un'ampia gamma di tecniche sperimentali in grado di fornire risposte a problemi scientifici che non possono essere affrontati dagli studi compiuti sugli animali. Tuttavia, nonostante questi nuovi sviluppi, essi affermano che l'analisi e i risultati di numerose ricerche mediche e cliniche recenti dimostrano che molte domande chiave nella scienza medica possono e potranno avere una risposta solo se verranno condotti anche studi ed esperimenti sugli animali. Opinione largamente condivisa dagli stessi ricercatori che operano in questi nuovi promettenti campi, i quali riconoscono che nel lungo termine sarà possibile ridurre ed indirizzare in modo più specifico l'uso degli animali, ma non eliminare del tutto questa fase.

Posizione dei movimenti animalisti

Le critiche degli animalisti alla validità dei modelli animali come CAM si possono dividere in due filoni: quello della critica a priori (il modello non può funzionare), e quello della critica alle modalità (il modello funziona poco, non è affidabile).

- Nel primo filone troviamo prevalentemente autori non appartenenti alla comunità scientifica che parlano dell'intrinseca non validità dei modelli animali.
- Tra i critici meno aprioristici troviamo chi afferma che le informazioni ottenute da modelli pre-clinici (Barnard; Kaufmann; Rowan; Valenstein) sono ingannevoli, chi nega l'utilità dei modelli perché tentano di ripetere in un brevissimo arco di tempo condizioni patologiche che si sono evolute in tempi molto lunghi (come la depressione) (Bateson; Miller), ed infine chi, come Giere denuncia l'esagerazione del ruolo dei modelli animali nelle scoperte biomediche.

L'argomento più comune riguarda comunque il problema della generalizzabilità dei risultati ottenuti tramite la sperimentazione su animali diversi dall'uomo. I critici denunciano che non si possono estendere i risultati sperimentali sui (ad esempio) ratti agli esseri umani a meno che non si abbiano basi sperimentali solide per sostenere che certe differenze tra l'anatomia/fisiologia dei ratti ed degli esseri umani non siano differenze che generano errore.

Il passaggio dal risultato nel modello alla previsione del risultato nel soggetto modellato è una inferenza analogica, che è per definizione sempre "rischiosa" e meramente euristica: ogni inferenza di validità esterna implica un passaggio induttivo, implicitamente fallibile. Perché essa abbia senso c'è bisogno di "buone analogie", cioè analogie per le quali sia veramente molto improbabile osservare certi dati a meno che l'ipotesi di validità esterna sia vera, ma questo non è sempre il caso nelle sperimentazioni animali.

In risposta alla giustificazione portata dai sostenitori della sperimentazione animale, come la vicinanza filogenetica necessaria a permettere il passaggio induttivo, controbattono enunciando quelle che ritengono due fallacie argomentative:

1. Fallacia funzionale, ovvero credere che la somiglianza funzionale implichi la somiglianza causale.
2. Fallacia filogenetica, ovvero credere che la continuità filogenetica garantisca la somiglianza causale tra soggetti.

Dal punto di vista della teoria dell'evoluzione possiamo inoltre dire che la maggior parte delle proprietà significative di un organismo sono di tipo relazionale (emergenti, olistiche), quindi anche due specie che condividano un comune bagaglio di parti biochimiche possono reagire in maniera completamente differente a stimoli uguali o paragonabili.

Quanto all'argomento della utilità storica della sperimentazione animale, i critici sostengono che enumerare i casi nei quali essa ha portato a dei risultati rilevanti per lo sviluppo di farmaci o terapie per gli esseri umani è argomento spurio. In primo luogo, si argomenta, questa lista non distingue tra modelli euristici e modelli causali. Pochi negano che i modelli animali possano funzionare come "macchine euristiche", fonti cioè di ipotesi di lavoro e di inferenze "deboli" (se nei maiali il fegato ha funzioni di metabolizzazione degli xenobiotici, è probabile che svolga una funzione molto simile anche nell'uomo), mentre si mette in forte dubbio che funzionino come analoghi causali (dato che i maiali metabolizzano il composto X attraverso il percorso metabolico Y, allora lo stesso avviene nell'uomo). Poiché la stragrande maggioranza degli studi moderni (a differenza di quelli storici) verte su una modellistica causale, è necessario giustificare l'utilizzo.

In secondo luogo, portare una lista di risultati positivi è cattiva scienza. Il dato importante è il rapporto tra risultati positivi, numero di esperimenti effettuati, e risultati negativi. È evidente, continuano i critici, che soltanto se si potesse dimostrare che una percentuale significativa degli esperimenti su modelli causali animali avesse portato a conseguenze di rilevanza clinica sull'uomo, potremmo inferire che la modellazione è efficace, sensibile e specifica, tre parametri fondamentali per la scelta di un modello. Dire infatti che "di circa 30 agenti che sono causa riconosciuta di cancro nell'uomo, tutti sono causa di cancro anche nei ratti da laboratorio - a dosaggi elevati" è fuorviante poiché suggerisce che la misura dell'utilità di un test sia data solo dalla sensibilità dello stesso (proporzione di carcinogeni umani che sono carcinogeni anche nei ratti) e non anche dalla sua specificità (proporzione di non carcinogeni umani che sono non carcinogeni nei ratti).

ALTERNATIVE

Nel 1959 W.M.S. Russell e R.L. Burch hanno proposto la cosiddetta regola delle 3R per ridurre l'impatto della sperimentazione sugli animali. I concetti fondanti sono tre:

1. Rimpiazzamento (Replacement), sostituzione con metodi alternativi.
2. Riduzione (Reduction), riduzione del numero di animali.
3. Raffinamento (Refinement), miglioramento delle condizioni degli animali.

Questa regola è stata inserita dall'Unione europea nella Direttiva 2010/63/UE sulla Protezione degli animali utilizzati a fini scientifici.

Il concetto di alternativa alla sperimentazione animale risale alla definizione elaborata da Russell e Burch.

Con Raffinamento si intende il miglioramento delle tecniche sperimentali, compiute pur sempre su animali, in modo da ridurre la loro sofferenza; in alcuni casi, si cerca di usare animali filogeneticamente meno evoluti; con Riduzione si intende la riduzione del numero di animali usati, o l'aumento di informazioni ottenute con lo stesso numero di animali; con Rimpiazzamento si intende la sostituzione dell'animale con l'utilizzo di metodi alternativi.

La direttiva europea 86/609/CEE in materia di "protezione degli animali utilizzati a fini sperimentali o ad altri fini scientifici", impone di sostituire o ridurre il più possibile il numero degli animali utilizzati.

L'articolo 7.2 afferma che "Un esperimento su un animale non dovrà essere eseguito se è disponibile un altro metodo scientificamente soddisfacente per ottenere il risultato cercato che non implichi l'uso di animali."

Inoltre, l'articolo 23.1 afferma che il governo dovrebbe promuovere le alternative: "La Commissione e gli Stati Membri dovrebbero incoraggiare la ricerca nello sviluppo e nella validazione di tecniche alternative, che possano fornire lo stesso livello di informazione ottenuto dagli esperimenti su animali, ma che utilizzino meno animali o che comportino procedure meno dolorose."

La stragrande maggioranza degli esperimenti compiuti sugli animali sono quelli per i test "di tossicità" obbligatori per legge, cioè quei test che dovrebbero accertare la pericolosità di una data sostanza chimica per l'uomo.

Altri esperimenti sono quelli compiuti invece nella ricerca biomedica di base, per lo studio delle malattie: in questo caso NON è obbligatorio per legge usare gli animali, però è quello che si continua a fare.

I metodi alternativi sono in fase di sviluppo già da molti anni, ma ci sono ancora varie questioni che ne rendono poco applicabile l'uso.

Oltre a risolvere il problema dell'etica morale relativo alla sperimentazione animale queste hanno anche tempi di diagnostica di gran lunga più ristretti. Purtroppo però queste tecniche non sono ancora fortemente sviluppate e sono ancora in fase di sperimentazione oltre ad avere oneri finanziari molto elevati, ciò ne determina una poca praticità rispetto ai bassi costi e alla reperibilità degli esperimenti animali.

Nei più grossi centri di analisi quali gli istituti zooprofilattici si è giunti ad un compromesso affiancando le due metodologie al fine di una miglior valutazione della qualità, ad un maggior sviluppo di tecniche alternative verso il quasi completo abbandono della sperimentazione animale.

CONCLUSIONI RELATIVE AL TIROCINIO

Presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna non sono riuscita a seguire un unico processo analitico nella sua interezza per presentarne una tesi descrittiva poiché avendo già delle conoscenze nell'ambito dei laboratori acquisite in cinque anni di percorso superiore per tecnico di laboratorio chimico biologico, ho impiegato queste mie capacità in ogni attività svolta dal laboratorio, ma il lavoro svolto nei due mesi all'IZSLER mi ha permesso di conoscere e comprendere le modalità e le tecniche di controllo che avvengono su un alimento e sulle sue materie prime per poterne accettare la conformità agli standard di produzione.

Ho potuto inoltre far parte di un eccelso staff di tecnici di laboratorio che mi ha dato l'opportunità di mettere in pratica le tecniche e le nozioni acquisite nel mio percorso di studi e di apprendere molto sul funzionamento pratico di un laboratorio di analisi così importante.

Ho avuto anche la possibilità di farmi una mia idea su alcune tematiche molto sentite attualmente quali l'effettiva o meno utilità delle sperimentazioni animali o le problematiche sull'alimentazione dovute alle sostanze additive e alla salubrità degli alimenti che arrivano nei comuni negozi alimentari avendo la possibilità di constatare di persona ogni aspetto di queste tematiche.

Il tirocinio ha inoltre ampliato le mie conoscenze e capacità riguardanti l'attività di laboratorio e aumentato il mio già presente interesse verso questo settore lavorativo.

RINGRAZIAMENTI

Un primo riconoscimento va allo staff del laboratorio di microbiologia dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna, che mi ha permesso di farne parte anche per poco.

Un altro particolare ringraziamento lo devo ai miei docenti dell'istituto IPSSCT Ghislandi di Breno che mi hanno aiutato a coltivare la passione per il laboratorio e le operazioni di controllo in esso svolte e al professor Ivano De Noni dell'università di Milano, che con le sue lezioni ha incrementato ancora di più questa passione e a fatto da tramite con l'IZSLER per il tirocinio che ha portato a questa tesi.

Un grazie va d'obbligo alla mia famiglia che mi ha sempre spronato e sostenuto nelle mie scelte. Ringrazio lo staff del reparto di ortopedia della Poliambulanza di Brescia le cui cure mi hanno permesso, dopo due anni di interruzione, di riprendere e portare a termine questo percorso di studi.

BIBLIOGRAFIA

- Hutchinson John, Melville Roland, The story of plants and their uses to man, P.R. Gawthorn, London 1948
- Jasny Naum, The Wheats of Classical Antiquity, J. Hopkins Press, Baltimore 1944
- Kraemer Hans (a cura di), L'uomo e le piante. Origine, conquista e impiego del regno vegetale in rapporto colla civiltà, 2 voll. Vallardi, Milano s.d.
- Meyer J., Histoire du sucre, Paris 1989
- Messedaglia Luigi, Il mais e la vita rurale italiana, Federazione Italiana del Consorzi Agrari, Piacenza 1927
- Oliemans Willem H., Het brood van de armen. De geschiedenis van de aardappel temidden van kettens kloosterling en kerhvorsten, SDU uitgeveijs, Gravenhage 1988
- Saltini Antonio, I semi della civiltà. Frumento, riso e mais nella storia delle società umane, Prefazione di Luigi Bernabò Brea, Bologna 1996. ISBN 978-88-96459-01-0
- Aguilera, Jose Miguel and David W. Stanley. Microstructural Principles of Food Processing and Engineering. Springer, 1999. ISBN 0-8342-1256-0.
- Campbell, Bernard Grant. Human Evolution: An Introduction to Man's Adaptations. Aldine Transaction: 1998. ISBN 0-202-02042-8.
- Carpenter, Ruth Ann; Finley, Carrie E. Healthy Eating Every Day. Human Kinetics, 2005. ISBN 0-7360-5186-4.
- Giampaolo Colavita (a cura di), Igiene e tecnologia degli alimenti di origine animale, Milano, Point Veterinaire Italie, 2008, p. 322. ISBN 978-88-95995-47-2
- Davidson, Alan. The Oxford Companion to Food. 2nd ed. UK: Oxford University Press, 2006.
- Howe, P. and S. Devereux. Famine Intensity and Magnitude Scales: A Proposal for an Instrumental Definition of Famine. 2004.
- Humphery, Kim. Shelf Life: Supermarkets and the Changing Cultures of Consumption. Cambridge University Press, 1998. ISBN 0-521-62630-7.
- Jango-Cohen, Judith. The History Of Food. Twenty-First Century Books, 2005. ISBN 0-8225-2484-8.
- Jurgens, Marshall H. Animal Feeding and Nutrition. Kendall Hunt, 2001. ISBN 0-7872-7839-4.
- Lawrie, Stephen; R A Lawrie. Lawrie's Meat Science. Woodhead Publishing: 1998. ISBN 1-85573-395-1.
- Magdoff, Fred; Foster, John Bellamy; and Buttel, Frederick H. Hungry for Profit: The Agribusiness Threat to Farmers, Food, and the Environment. September 2000. ISBN 1-58367-016-5.
- Mason, John. Sustainable Agriculture. Landlinks Press: 2003. ISBN 0-643-06876-7.
- Merson, Michael H.; Black, Robert E.; Mills, Anne J. International Public Health: Disease, Programs, Systems, and Policies. Jones and Bartlett Publishers, 2005.
- McGee, Harold. On Food and Cooking: The Science and Lore of the Kitchen. New York: Simon and Schuster, 2004. ISBN 0-684-80001-2.
- Mead, Margaret. The Changing Significance of Food. In Carole Counihan and Penny Van Esterik (Ed.), Food and Culture: A Reader. UK: Routledge, 1997. ISBN 0-415-91710-7.
- Messer, Ellen; Derosé, Laurie Fields and Sara Millman. Who's Hungry? and How Do We Know?: Food Shortage, Poverty, and Deprivation. United Nations University Press, 1998. ISBN 92-808-0985-7.

- Cesare Corradini, Chimica e tecnologia del latte, Milano, Hoepli, 1995, ISBN 88-481-0005-8.
- Giuseppe Siccheri, Chimica delle fermentazioni, Milano, Hoepli, 1995, ISBN 88-203-2338-9.
- Ottavio Salvadori del Prato, Tecnologia del latte, Milano, Edagricole, 2005, ISBN 88-506-4986-X.
- National Institute of Health. Food poisoning. MedlinePlus Medical Encyclopedia F. May 11, 2006. Retrieved from <http://www.niaid.nih.gov/publications/pdf/foodallergy.pdf> on 2006-09-29.
- Nicklas, Barbara J. Endurance Exercise and Adipose Tissue. CRC Press, 2002. ISBN 0-8493-0460-1.
- Parekh, Sarad R. The Gmo Handbook: Genetically Modified Animals, Microbes, and Plants in Biotechnology. Humana Press, 2004. ISBN 1-58829-307-6.
- Regmi, Anita (editor). Changing Structure of Global Food Consumption and Trade. Market and Trade Economics Division, Economic Research Service, USDA, May 30, 2001. stock #ERSWRS01-1.
- Schor, Juliet; Taylor, Betsy (editors). Sustainable Planet: Roadmaps for the Twenty-First Century. Beacon Press, 2003. ISBN 0-8070-0455-3.
- Simoons, Frederick J. Eat Not This Flesh: Food Avoidances from Prehistory to the Present. ISBN 0-299-14250-7.
- Smith, Andrew (Editor). "Food Marketing," in Oxford Encyclopedia of American Food and Drink, New York: Oxford University Press, 2007.
- Van den Bossche, Peter. The Law and Policy of the bosanac Trade Organization: Text, Cases and Materials. UK: Cambridge University Press, 2005. ISBN 0-521-82290-4.
- Rudolf Steiner, Le api, Editrice Antroposofica Milano, 1982
- Ente Parco Regionale Migliarino San Rossore, Massaciuccoli, Il marchio del miele biologico della spiaggia ed. Bandecchi & Vivaldi, 1996
- Mozzarella di Bufala Campana - Storia, tradizioni e immagini di un formaggio nato all'ombra del mito della Magna Grecia (a cura di Nico Pirozzi), Consorzio di Tutela della Mozzarella di Bufala Campana, 2004.
- Elenco e descrizione dei prodotti derivati dal latte riconosciuti come tradizionali dalla Regione siciliana e allegato alla Gazzetta Ufficiale della Regione Siciliana, Palermo, Sabato 6 febbraio 1999, N. 6
- Giampaolo Colavita (a cura di), Igiene e tecnologia degli alimenti di origine animale, Milano, Point Veterinaire Italie, 2008, p. 322. ISBN 978-88-95995-47-2
- <http://sintomicura.com> ntossicazione alimentare: sintomi, cura, cause, terapia, diagnosi e prevenzione
- <http://www.salute.gov.it/>
- <http://www.carabinieri.it/cittadino/tutela/salute/>
- A. Redaelli, Tossina Botulica A in Medicina Estetica, Principi e pratica clinica. OEO Firenze, 2010, ISBN 978-88-905033-0-6
- <http://www.izsler.it> chi siamo
- Angela Tedesco, Igiene degli alimenti, Milano, Hoepli, 2007, ISBN 978-88-203-3729-2.
- Paolo Borghi, Luigi Costato, Sebastiano Rizzoli, Compendio di diritto alimentare, CEDAM, 2011. ISBN 88-13-30853-1
- <https://it.wikipedia.org/wiki/Portale:Microbiologia>
- APHA - Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater - American Public Health
- Association, American Water Works Association, 20th Ed., Washington, D.C., 2000.

- DIN 38404-5 German standard methods for the examination of water, waste water and sludge:
- Determination of pH value, 1992.
- UNI 10501 - UNICHIM METODO 929, 1994.
- Metodi analitici ufficiali per le acque destinate al consumo umano ai sensi del D.Lgs. 31/2001
- Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria
- Reparto di Igiene delle Acque Interne
- Versione on-line su sito www.iss.it
- unibo Lezioni di Patologia generale Capitolo 42. Appendice 1: immunologia in laboratorio
- Thomas McMeekin, Detecting pathogens in food, Woodhead Publishing, 2003. [1]
- Pierre-Jean Raugel, Rapid food analysis and hygiene monitoring: kits, instruments, and systems, Springer, 1999.
- Metodi per l'analisi microbiologica degli alimenti, Antonietta Galli e Laura Franzetti - © DISTAM – Università degli Studi di Milano, 2003
- Metodi raccomandati per analisi microbiologiche non normate di alimenti, Unità Organizzativa Prevenzione Direzione Generale Sanità – Regione Lombardia marzo 2002
- metodi di analisi per il controllo microbiologico degli alimenti, raccolta a cura di Dario De Medici, Lucia Fenicia, Leucio Orefice e Angelo Stacchini
- ary B. Mullis, Polymerase Chain Reaction – Making DNA accessible, su www.karymullis.com – sito web personale. URL consultato il 15 maggio 2013.
- Nobel Prize of Chemistry, 1993
- Ramakers, C., Ruijter, J., Deprez, R., and Moorman, A. (2003). Assumption-free analysis of quantitative real-time polymerase chain reaction (PCR) data. *Neuroscience Letters*, 339(1), 62–66.
- <http://www.minerva.unito.it/Chimica&Industria/Tesi1/ReazioneCatenaPolimerasi.htm>
- Aristotele, *De Partibus Animalium*, trad. it. di D. Lanza e M. Vegetti in Aristotele, *Opere*, vol. 5, Laterza, Bari 1973.
- Doll R, Hill AB (1950) "Smoking and carcinoma of the lung; preliminary report." *Br Med J*. 30;2(4682):739-48
- Doll R, Hill AB (1953) "A study of the aetiology of carcinoma of the lung." *Pak J Health*. ;3(2):65-94
- Doll R. (1953a) "Smoking and lung cancer." *Br Med J*. 28;1(4808):505-6
- Doll R. (1953b) "Smoking and carcinoma of the lung" *Acta Unio Int Contra Cancrum*. 9; (3):495-506
- Doll R, Hill B (1954) "The mortality of doctors in relation to their smoking habits: a preliminary report" *Br Med J* 1954: ii;1451-5
- Autori Vari (2012) "Dossier sulla sperimentazione animale", in *Asinus Novus: rivista di antispecismo e filosofia*, IV: maggio 2012.
- Galeno, *De anatomicis administrationibus*, trad. it. di I. Garofalo in Galeno, *Opere scelte*, a cura di I. Garofalo e M. Vegetti UTET, Torino 1978.
- Manson, J.M. and Wise, L.D. (1993) "Teratogens" in Amdur, M.O., Doull, J., Klaassen, C. (eds), *Casarett and Doull's Toxicology*, 4th edition, New York: McGraw Hill pp. 226–281
- Northrup, E. (1957) "Men, Mice, and Smoking.", in *Science Looks at Smoking*, New York: Coward McCann
- Patton, W. (1993) *Mouse and Man* Oxford: The University Press

- Roberts, I, Kwan, I, Evans, P, Haig, S (2002) "Does animal experimentation inform human healthcare? Observations from a systematic review of international animal experiments on fluid resuscitation" *BMJ*; 324:474–6
- Pound P, Ebrahim S, Sandercock P, Bracken MB, Roberts I. (2004) "Where is the evidence that animal research benefits humans?" *BMJ*;328:514-7.
- Schardein, J. (1976) *Drugs as Teratogens* Cleveland, OH: CRS Press
- Hansen JM. (2012) In vivo models of developmental toxicology. *Methods Mol Biol.* 889:7-13. doi: 10.1007/978-1-61779-867-2_2.
- Myers DD Jr. (2012) Nonhuman primate models of thrombosis. *Thromb Res.* 2012 May;129 Suppl 2:S65-9. doi: 10.1016/j.thromres.2012.02.037. Epub 2012 Mar 10.