



UNIMORE

UNIVERSITÀ DEGLI STUDI DI
MODENA E REGGIO EMILIA

Dipartimento di Scienze della Vita

Corso di Laurea Magistrale in Bioscienze

Classe LM-6

**Validazione del metodo UNI EN ISO 15213-
2:2023 per la ricerca e la conta di *Clostridium
perfringens* secondo le procedure in vigore in
laboratorio**

Relatore

Prof.ssa Carla Sabia

Correlatore

Dott.ssa Silvia Rebecchi

Tesi di laurea di

Altea Gessi

Anno Accademico 2024/2025

Indice

RIASSUNTO	2
INTRODUZIONE	3
Capitolo 1. <i>Clostridium perfringens</i>	3
1.1–Caratteristiche generali	3
1.2–Tassonomia	4
1.3–Caratteristiche morfologiche e fisiologiche	5
1.4–Patogenicità	8
1.4.1–Infezione nell’uomo	10
1.4.2–Formazione delle spore	11
1.4.3–<i>Clostridium perfringens</i> come contaminante alimentare	13
Capitolo 2. Quadro normativo generale	14
2.1–Principi generali delle norme ISO per l’analisi microbiologica	16
2.2–Norme ISO applicate alla ricerca di <i>Clostridium perfringens</i>	18
SCOPO DELLA TESI	19
Capitolo 3. MATERIALI E METODI	20
3.1–Metodo ISO 15213-2:2023	20
3.2–Validazione e verifica del metodo	20
3.3–Parametri di validazione	21
3.3.1–Ceppi di riferimento e materiali biologici	22
3.3.2–Preparazione e contaminazione dei campioni	24
3.3.3–Selettività del metodo	36
Capitolo 4. RISULTATI	37
4.1–Limite di rivelabilità (LOD)	37
4.2–Limite di quantificazione (LOQ)	37
4.3–Ripetibilità del metodo	38
4.4–Bias del metodo	39
4.5–Accuratezza del metodo	40
4.6–Incertezza di misura	40
CONCLUSIONI	41
BIBLIOGRAFIA	42

RIASSUNTO

Il presente lavoro ha come scopo la validazione del metodo UNI EN ISO 15213-2:2023 per la ricerca e l'enumerazione di *Clostridium perfringens* all'interno delle matrici alimentari, valutandone l'applicabilità nelle procedure di routine di laboratorio. *Clostridium perfringens* ha molteplici caratteristiche: è un batterio Gram-positivo, anaerobio sporigeno, diffuso ubiquitariamente nell'ambiente e nel tratto intestinale di uomo e animali. Alcuni ceppi sono responsabili della produzione di tossine, le quali sono la causa di patologie nell'uomo, tra cui tossinfezioni alimentari correlate al consumo di alimenti cotti conservati a temperature non idonee. Per questo motivo il monitoraggio di questo batterio rappresenta un aspetto di rilevante importanza nella sicurezza microbiologica degli alimenti. Il presente lavoro è stato svolto presso il laboratorio di analisi microbiologiche Artest S.r.l. di Modena, applicando il metodo ISO basato sull'enumerazione dei batteri anaerobi solfito-riduttori in terreno selettivo, in condizioni di anaerobiosi. Le colonie presuntive vengono successivamente confermate tramite test biochimico. La validazione del metodo è stata effettuata attraverso prove sperimentali su campioni alimentari contaminati artificialmente con un ceppo di riferimento di *C. perfringens*. Sono stati valutati molteplici parametri prestazionali, tra cui ripetibilità, bias, accuratezza e incertezza di misura. I risultati ottenuti hanno segnalato una buona precisione del metodo, con valori di ripetibilità conformi ai criteri normativi e scostamenti minimi rispetto ai valori teorici nelle prove di contaminazione. Anche l'accuratezza è risultata soddisfacente grazie al confronto con prove interlaboratorio e alla verifica delle competenze degli operatori. Nel complesso, i dati confermano che il metodo UNI EN ISO 15213-2:2023 è affidabile e idoneo per l'analisi microbiologica degli alimenti, rappresentando uno strumento valido per il controllo igienico dei processi produttivi e per la prevenzione delle tossinfezioni alimentari causate da *Clostridium perfringens*.

INTRODUZIONE

Capitolo 1. *Clostridium perfringens*

1.1–Caratteristiche generali

Clostridium perfringens è un batterio Gram-positivo, anaerobio e sporigeno (1-2), ampiamente diffuso nell'ambiente. Si presenta come un bacillo di grandi dimensioni, immobile, con estremità arrotondate. Le cellule metabolicamente attive, dette anche vegetative, sono in grado di formare endospore, che conferiscono al microrganismo una notevole resistenza alle condizioni ambientali sfavorevoli, come calore, disidratazione e presenza di sostanze chimiche. Il microrganismo è ubiquitario: si ritrova comunemente nel suolo, nelle acque, nelle polveri, negli alimenti e nel tratto intestinale dell'uomo e di numerosi animali (1-2-5). La sua presenza nell'intestino umano può avvenire sia in forma transitoria sia come portatore asintomatico, senza necessariamente causare malattia.

Clostridium perfringens è un anaerobio aerotollerante, non utilizza l'ossigeno per il proprio metabolismo, anche se è in grado di sopravvivere temporaneamente in presenza di ossigeno, caratteristica che ne facilita la diffusione e la contaminazione degli alimenti. È un microrganismo mesofilo, con una temperatura ottimale di crescita tra 37 e 45 °C, mentre la crescita è limitata al di sotto dei 20 °C e al di sopra dei 50 °C. Dal punto di vista metabolico, *C. perfringens* è un batterio fermentante, capace di utilizzare un ampio spettro di carboidrati, con produzione di gas e di molteplici metaboliti. La sua crescita è favorita da ambienti ricchi di nutrienti e da condizioni di basso potenziale di ossido-riduzione, tipiche degli alimenti cotti o mantenuti in condizioni anaerobiche. Un aspetto di rilevanza biologica e sanitaria è la capacità di alcuni ceppi di produrre tossine, responsabili di differenti e molteplici casistiche patologiche. Sulla base delle tossine prodotte, *Clostridium perfringens* viene suddiviso in diversi tipi (A, B, C, D, E), tra i quali il tipo A (3-4), è il più frequentemente associato alle tossinfezioni alimentari nell'uomo. La combinazione delle sue caratteristiche, quali: ubiquità ambientale, capacità sporigena, rapida crescita in condizioni favorevoli e produzione di tossine lo rende un microrganismo di grande interesse sia in ambito clinico sia alimentare, giustificando l'attenzione rivolta al suo monitoraggio e alla sua ricerca negli alimenti destinati al consumo umano. Dopo l'ingestione di alimenti contaminati da *C. perfringens*, vengono liberate le enterotossine in concomitanza con la formazione delle spore. Queste enterotossine sono resistenti contro gli enzimi digestivi e provocano coliche addominali con conseguente diarrea e nausea ma senza febbre né vomito (5-7). Il periodo d'incubazione dura da 8 a 24 ore e i sintomi persistono per massimo 1 o 2 giorni. Le infezioni

nell'essere umano sono originate da alimenti contenenti spore sopravvissute alla cottura, anche se alle volte la contaminazione degli alimenti mediante le spore, può avvenire anche dopo la cottura. Gli alimenti prevalentemente coinvolti nell'infezione sono stati sottoposti a cottura e mantenuti a temperatura ambiente o appena riscaldati per alcune ore. Nelle condizioni ideali (temperature tra i 43 e i 47 gradi e assenza di ossigeno), vi è la germinazione delle spore e la rapida moltiplicazione delle forme vegetative. Molto frequenti sono i casi d'intossicazione attribuibili al consumo di carne o pasticci di carne, polpettoni e simili, dove le temperature di cottura non sono state sufficienti e la refrigerazione dopo cottura troppo lenta.

1.2–Tassonomia

Clostridium perfringens è un batterio appartenente al dominio Bacteria, che comprende tutti gli organismi procarioti caratterizzati dall'assenza di un nucleo delimitato da membrana e di organelli citoplasmatici complessi. Come tutti i batteri, presenta un'organizzazione cellulare semplice, con il materiale genetico collocato in un pseudonucleo e una parete cellulare (1-2). Dal punto di vista tassonomico, *C. perfringens* è incluso nel phylum *Firmicutes* (denominato Bacillota nelle classificazioni più recenti), un ampio gruppo di batteri Gram-positivi accomunati da un basso contenuto di guanina e citosina nel DNA genomico (1). Tale phylum comprende microrganismi di rilevanza medica e ambientale, e si distingue nettamente da phyla Gram-negativi come Proteobacteria per la struttura della parete cellulare e per l'assenza della membrana esterna. All'interno dei *Firmicutes*, *Clostridium perfringens* appartiene alla classe *Clostridia*, che riunisce batteri prevalentemente anaerobi, spesso sporigeni, adattati a condizioni ambientali carenti di ossigeno. La classe *Clostridia* si distingue da altre classi dello stesso phylum, come Bacilli, proprio per il metabolismo anaerobio e per l'ecologia tipicamente associata al suolo, ai sedimenti e al tratto gastrointestinale di animali e uomo (1-2). La collocazione nell'ordine *Clostridiales* riflette ulteriormente queste caratteristiche, in quanto tale ordine comprende batteri anaerobi con metabolismo fermentativo e capacità, in molti casi, di formare endospore. Scendendo di livello, *C. perfringens* è incluso nella famiglia *Clostridiaceae*, che comprende bacilli Gram-positivi di dimensioni relativamente grandi, anaerobi e sporigeni. La famiglia *Clostridiaceae* si distingue da altre famiglie affini per caratteristiche morfologiche, fisiologiche e genetiche che riflettono un adattamento a nicchie anaerobiche e a cicli vitali complessi, spesso associati alla produzione di tossine (1). In conclusione, la tassonomia di *Clostridium perfringens* si

colloca all'interno di un gruppo di batteri anaerobi sporigeni di grande importanza biologica e medica.

1.3–Caratteristiche morfologiche e fisiologiche

Dal punto di vista morfologico, *Clostridium perfringens* si presenta come un bacillo Gram-positivo di grandi dimensioni, con lunghezza e diametro superiori rispetto a molti altri batteri anaerobi. Le cellule hanno una forma tozza, con estremità arrotondate, e appaiono generalmente isolate, disposte in brevi catene o in coppie, a seconda delle condizioni di crescita e della fase del ciclo cellulare. La colorazione di Gram risulta solitamente positiva grazie alla parete cellulare spessa e ricca in peptidoglicano (Fig.1); tuttavia, nei preparati ottenuti da colture invecchiate o sottoposte a stress, è possibile osservare una Gram-variabilità, fenomeno ricollocabile a modificazioni della parete cellulare durante la fase stazionaria o degenerativa (1-2).

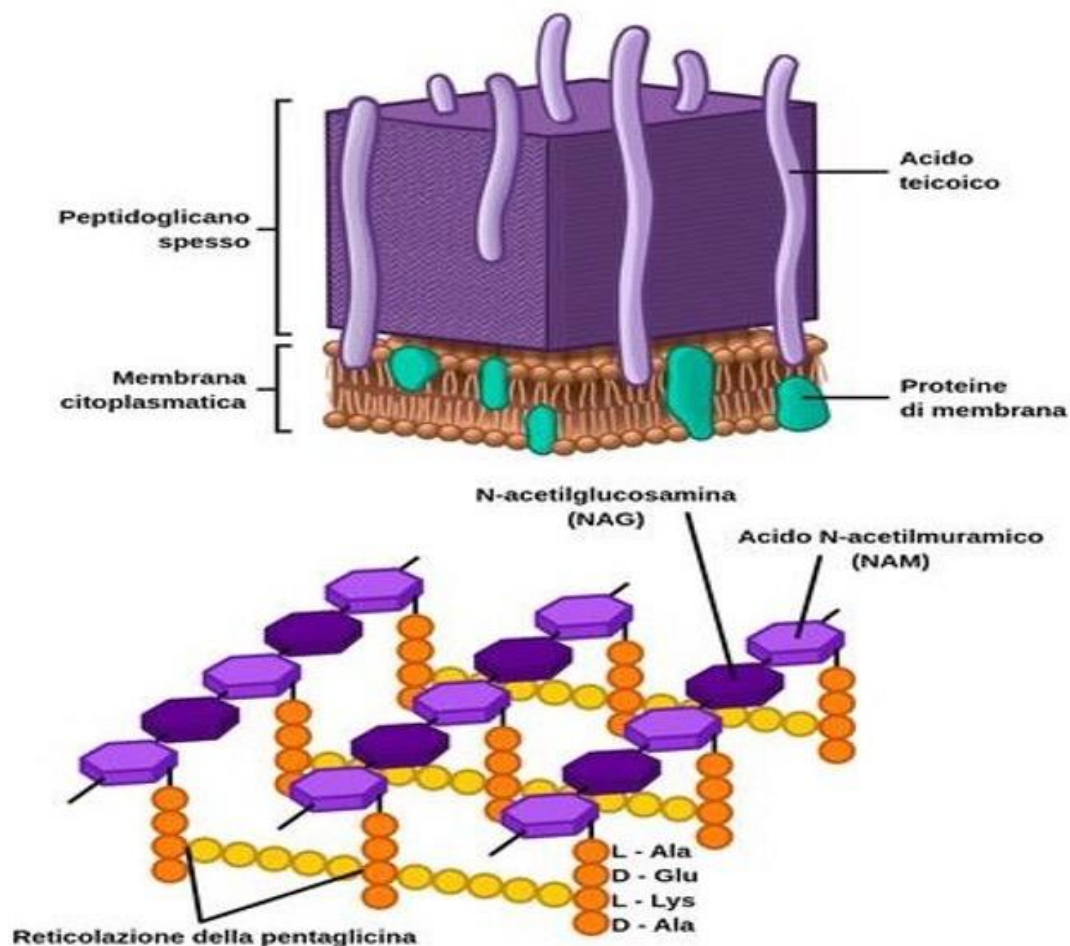


Figura 1: Caratteristica strutturale della parete batterica dei Gram-positivi. (<https://theory.labster.com/it/gram-positive-bacteria/>).

La specie è priva di strutture di motilità, risultando quindi non mobile; l'assenza di flagelli rappresenta una caratteristica morfologica distintiva che permette di caratterizzare *C.*

perfringens da molte altre specie del genere *Clostridium*, generalmente dotate di flagelli peritrichi (1). La capsula, quando presente, è di natura polisaccaridica ed è di considerevole importanza in quanto, contribuisce alla protezione dalla fagocitosi durante l'infezione (2); tuttavia, non è una caratteristica costantemente osservabile in tutti i ceppi. *Clostridium perfringens* è in grado di formare endospore, strutture ovali e generalmente subterminali, che non conferiscono una marcata deformazione della cellula vegetativa. A differenza di altre specie clostridiali, come *Clostridium tetani*, in cui la spora è facilmente osservabile e altera visibilmente la morfologia del bacillo, in *C. perfringens* la sporogenesi è spesso poco evidente in coltura, rendendo le spore difficili da osservare nei terreni utilizzati di routine. Nell'insieme, l'aspetto microscopico di questo batterio è caratterizzato da bacilli voluminosi, non mobili, con disposizione semplice e sporogenesi discreta, un profilo morfologico che contribuisce in modo significativo all'identificazione della specie in ambito microbiologico (Fig.2).

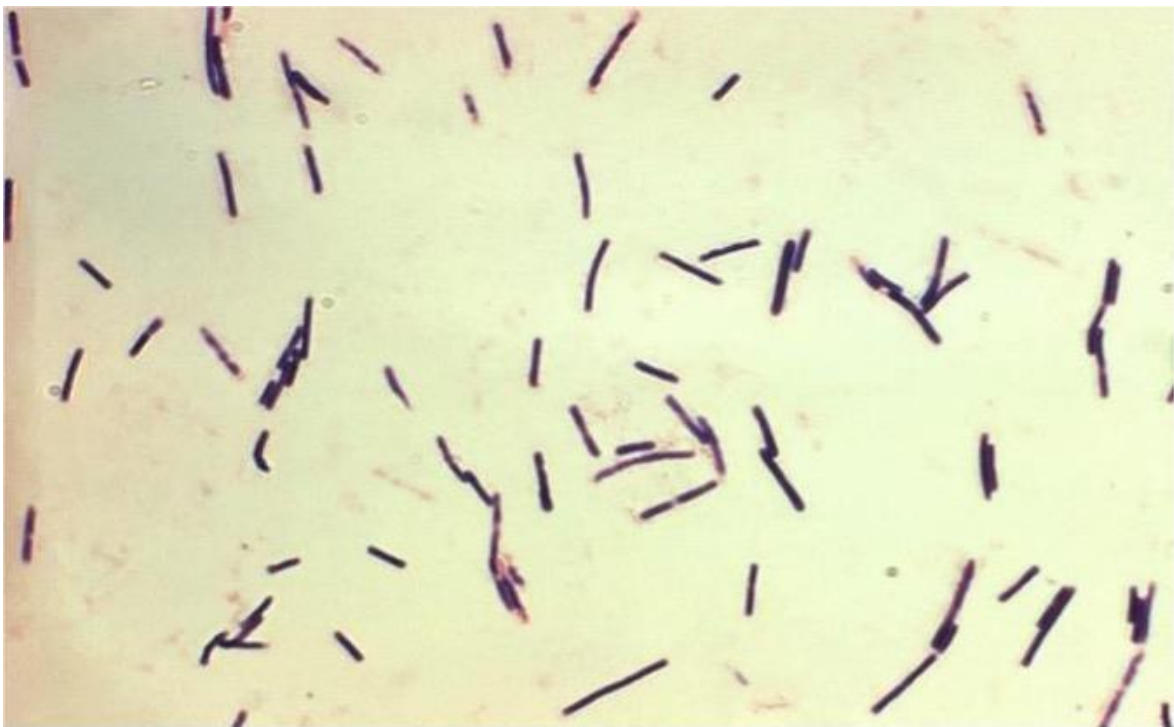


Figura 2: *C. perfringens*; colorazione di Gram.
(https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/5e/Clostridium_perfringens.jpg).

Clostridium perfringens è un bacillo anaerobio obbligato con una marcata componente fermentativa. Pur non utilizzando l'ossigeno come accettore finale di elettroni, presenta una certa aerotolleranza, che ne favorisce la sopravvivenza temporanea in ambienti non completamente assenti di ossigeno (2). Dal punto di vista dei test fenotipici di routine eseguiti in laboratorio, la specie risulta catalasi-negativa e ossidasi-negativa, come atteso per

un anaerobio fermentativo. La crescita è rapida rispetto ad altri anaerobi: in condizioni ottimali sviluppa colonie evidenti in 18–24 ore (2). Il metabolismo fermentativo è intenso e si accompagna alla produzione di acidi organici e, soprattutto, di grandi quantità di gas (H_2 e CO_2). Questo aspetto fisiologico è significativo sia per l'identificazione sia per la patogenesi, poiché la produzione di gas nei tessuti infetti contribuisce alla disgregazione, con conseguente separazione dei piani tissutali e alla progressione del danno locale (2). Un aspetto cruciale della fisiologia di questo microrganismo è la capacità di formare endospore, strutture metabolicamente quiescenti e altamente resistenti, che permettono la sopravvivenza del microrganismo in condizioni sfavorevoli (stress ambientali, carenza di nutrienti, disidratazione, calore e agenti chimici). Le spore sono ordinariamente ovali e subterminali; tuttavia, in colture di routine le spore possono essere poco evidenti o rare, perché la sporogenesi è favorita da condizioni specifiche e non necessariamente riprodotte nei terreni standard. Dal punto di vista ecologico e microbiologico, la sporogenesi spiega la persistenza della specie nel suolo e negli alimenti e costituisce il presupposto delle tossinfezioni alimentari: le spore possono sopravvivere a trattamenti termici non sufficienti, permanere nel prodotto e germinare quando la temperatura e le condizioni nutrizionali tornano favorevoli, con rapida ripresa della crescita vegetativa. *Clostridium perfringens* è caratterizzato dalla produzione di numerose tossine extracellulari, che rappresentano la base della sua variabilità patogenetica e della classificazione in differenti profili tossinici. Tra queste, la tossina alfa ricopre un ruolo di primaria importanza: è una fosfolipasi C, una lecitinasi, che agisce sui fosfolipidi di membrana, determinando destabilizzazione della membrana cellulare, lisi e danno tissutale (3-4). La produzione di tossine non è quindi soltanto un aspetto "clinico", ma un vero tratto fisiologico che si palesa in coltura tramite specifici fenotipi osservabili. A seconda dei ceppi e dei contesti, possono essere prodotte ulteriori tossine con attività citotossica, necrotizzante e/o enterotossica; l'espressione di tali fattori è regolata da condizioni ambientali e da determinanti genetici, contribuendo alla diversità biologica della specie. In coltura su agar sangue, *C. perfringens* mostra un comportamento particolarmente utile dal punto di vista diagnostico: la doppia zona di emolisi, descritta come un alone esterno più ampio di emolisi incompleta e un alone interno più ristretto di emolisi completa. Questo aspetto rispecchia l'azione combinata di fattori emolitici, tra cui l'attività lecitinasi associata alla tossina alfa e l'azione di ulteriori tossine/emolisine. In prospettiva fisiologica, il pattern emolitico è la conseguenza diretta della capacità del batterio di produrre proteine extracellulari in grado di alterare e lisare le membrane eritrocitarie (2-4). Complessivamente, l'associazione tra fermentazione rapida,

gas, sporogenesi, produzione tossinica e doppia emolisi costituisce un quadro fenotipico distintivo (1-2-5), che permette una forte identificazione presuntiva della specie (Fig.3).

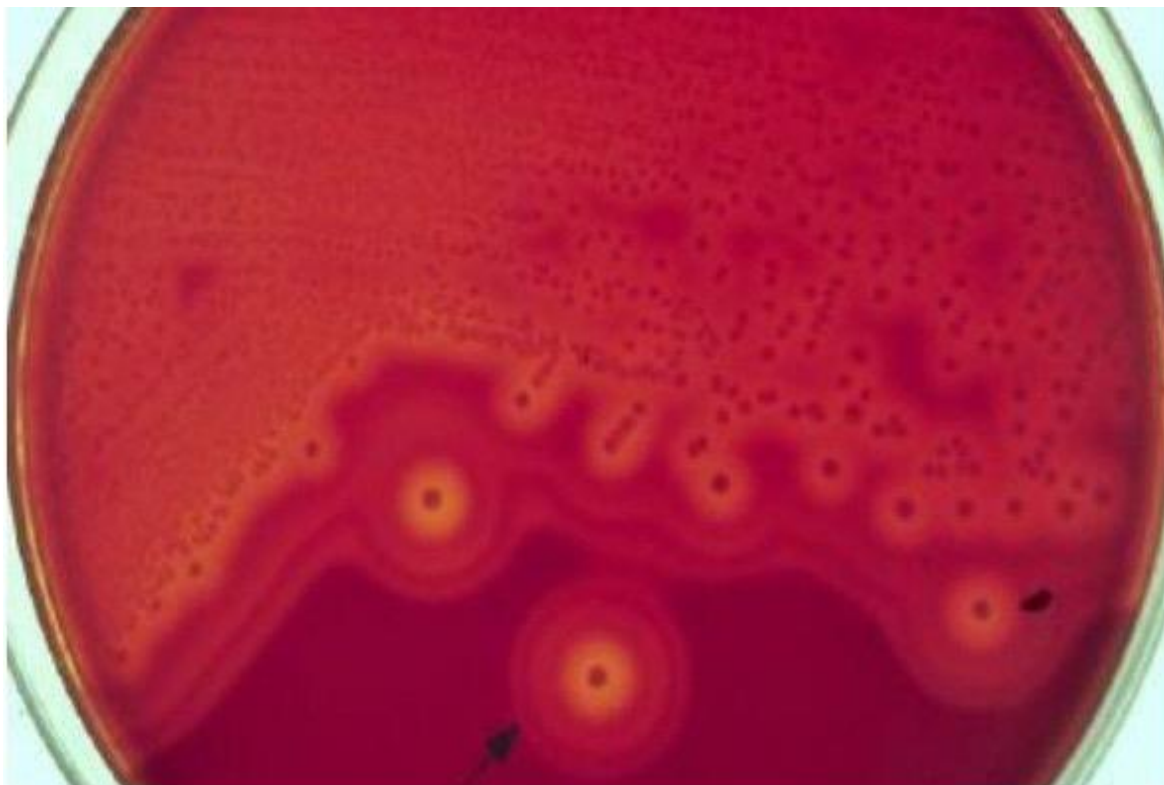


Figura 3: Doppia emolisi su terreno Blood Agar tipica di *C. perfringens*. (https://x.com/SA_Microbiology/status/1026575832280719361/photo/1).

1.4–Patogenicità

In microbiologia, il termine patogenicità denota la capacità intrinseca di un microrganismo di causare malattia in un ospite suscettibile. Essa non è un parametro assoluto, ma il risultato dell'interazione tra fattori microbici (fattori di virulenza) e condizioni dell'ospite. La patogenicità viene distinta dalla virulenza, che rappresenta il grado o l'intensità con cui un microrganismo patogeno provoca danno tissutale e manifestazioni cliniche. Nel caso dei batteri anaerobi, e in particolare dei clostridi, la patogenicità è fortemente legata alla produzione di tossine extracellulari, alla capacità di sopravvivere in ambienti ostili e alla rapidità di moltiplicazione nei tessuti (2). La patogenicità di *Clostridium perfringens* è conferibile principalmente alla produzione di molteplici tossine e di enzimi extracellulari, che causano danno tissutale diretto, alterazione della risposta infiammatoria e compromissione della perfusione locale (2-3). A differenza di altri patogeni, *C. perfringens* non basa la propria patogenicità sull'invasività cellulare o sull'adesione specifica, bensì sull'azione rapida e distruttiva dei suoi prodotti extracellulari. La specie è un commensale del tratto gastrointestinale di uomo e animali e un saprofito ambientale; la malattia insorge

quando il microrganismo accede a tessuti profondi o ambienti anaerobi, come ferite traumatiche, tessuti ischemici o necrotici, o quando viene ingerito in elevata carica attraverso alimenti contaminati. Il principale fattore di patogenicità di *C. perfringens* è costituito dalla tossina alfa, una fosfolipasi C (lecitinasi) che agisce sui fosfolipidi delle membrane cellulari. Dal punto di vista patogenetico, la tossina alfa provoca lisi cellulare, distruzione delle membrane endoteliali, aumento della permeabilità vascolare e inibizione della risposta infiammatoria locale (3- 4) (Fig.4).

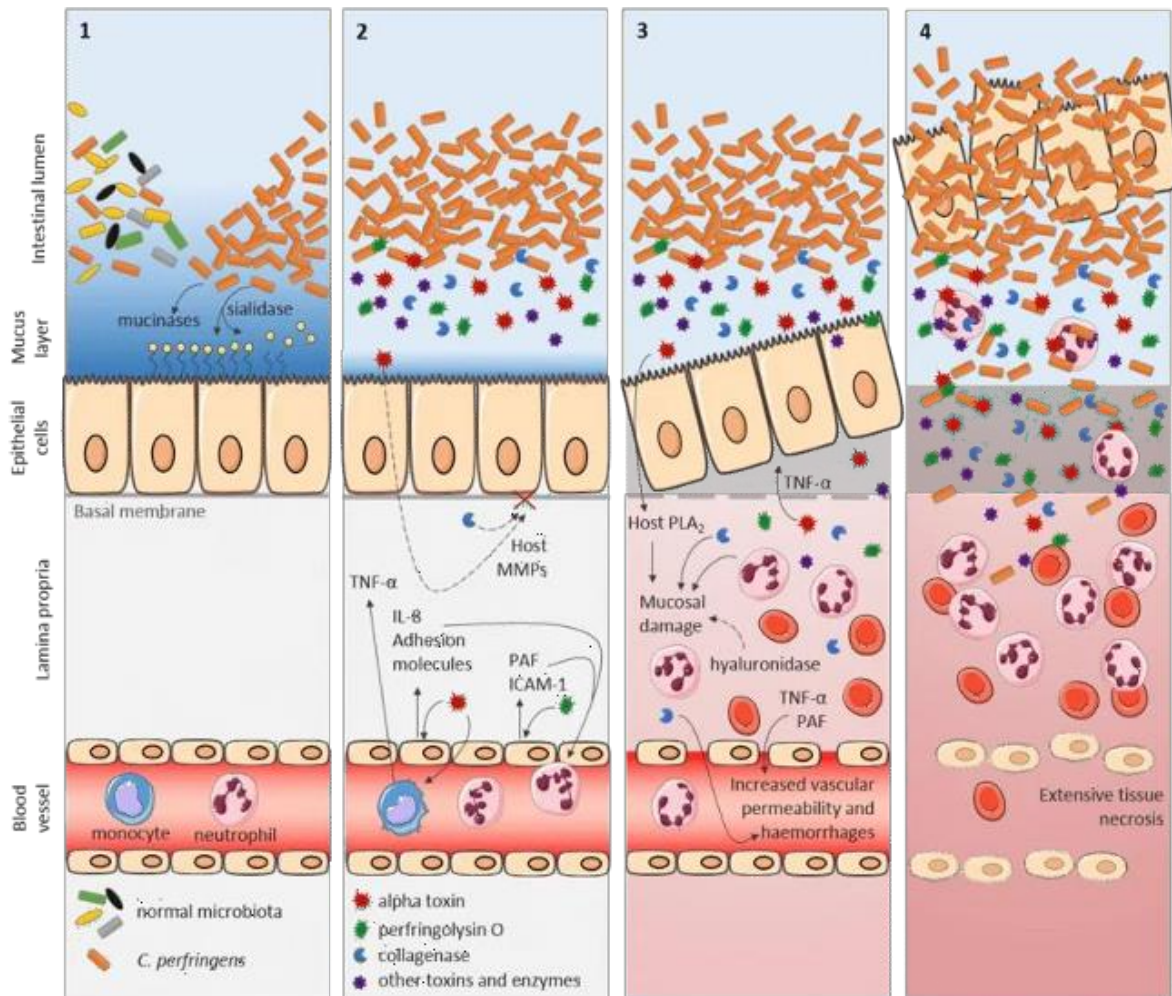


Figura 4: Tossina alfa ed il suo ruolo nell'infezione da *C. perfringens*. (https://www.researchgate.net/figure/Hypothesis-on-key-events-in-C-perfringens-type-A-induced-intestinal-necrosis-Key-risk_fig1_313813637).

Questi effetti generano ischemia, necrosi tissutale e favoriscono la rapida diffusione del batterio. Oltre alla tossina alfa, *C. perfringens* ha la capacità di produrre altre tossine, tra cui enterotossine e citotossine, la cui espressione varia in base al ceppo. La tipizzazione tossinica della specie riflette questa variabilità patogenetica e consente di attribuire specifici profili tossinici a determinate manifestazioni cliniche. Una delle espressioni più gravi della

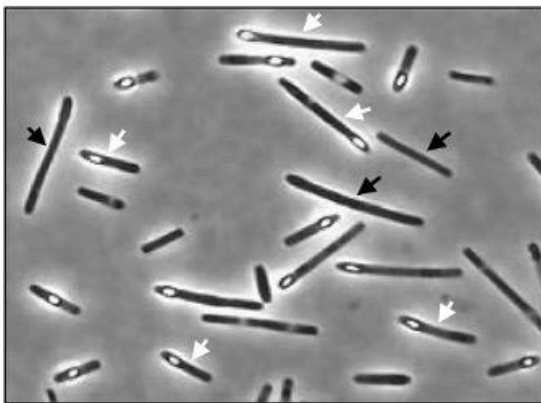
patogenicità di *C. perfringens* è la mionecrosi clostridica (gangrena gassosa). In questo contesto, la combinazione tra produzione tossinica e metabolismo fermentativo determina necrosi muscolare estesa, formazione di gas nei tessuti e rapida progressione del danno (2-5). La patologia non è dovuta a una risposta infiammatoria efficace, poiché le tossine interferiscono con il reclutamento leucocitario e la perfusione sanguigna.

1.4.1– Infezione nell'uomo

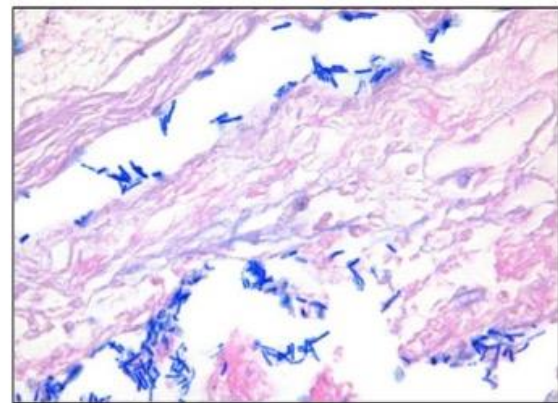
Clostridium perfringens è un microrganismo ubiquitario, presente nel suolo e nel tratto gastrointestinale di uomo e animali (1-2). Nell'uomo, le infezioni insorgono prevalentemente in condizioni che promuovono la crescita anaerobia o la produzione tossinica, e comprendono infezioni dei tessuti molli, infezioni intestinali e, più raramente, infezioni sistemiche (2). La gravità del quadro clinico varia da forme autolimitanti a condizioni rapidamente fatali. La forma più grave di infezione da *C. perfringens* nell'uomo è la mionecrosi clostridica, comunemente nota come gangrena gassosa (2-4). Questa infezione si sviluppa solitamente in seguito a ferite traumatiche contaminate, interventi chirurgici, ischemia tissutale o in presenza di tessuti necrotici. La patogenesi è dominata dalla rapida moltiplicazione del batterio in ambiente anaerobio e dalla produzione di potenti tossine, in particolare la tossina alfa (3-4). Il decorso clinico è rapido e progressivo. I sintomi iniziali includono dolore intenso e sproporzionato rispetto ai segni locali, edema e tensione dei tessuti. Successivamente compaiono necrosi muscolare, formazione di gas nei tessuti (palpabile come crepitio), secrezioni maleodoranti e alterazioni cutanee. La risposta infiammatoria locale è spesso sorprendentemente scarsa, a causa dell'azione delle tossine sulla perfusione vascolare e sul reclutamento leucocitario (2-4). In assenza di trattamento tempestivo, l'infezione evolve rapidamente verso tossiemia, shock e morte (2). Accanto alla mionecrosi, *C. perfringens* può causare celluliti clostridiche, forme meno invasive ma comunque contraddistinte da produzione di gas e necrosi superficiale (2). Queste infezioni hanno un decorso più lento rispetto alla gangrena gassosa, ma possono progredire se non trattate adeguatamente. *Clostridium perfringens* è una delle principali cause di tossinfezione alimentare nell'uomo (5). Questa forma di infezione è generalmente associata all'ingestione di alimenti contaminati da elevate quantità di batteri o spore, in particolare carni cotte e mantenute a temperatura non adeguata (5). Dopo l'ingestione, le spore sopravvivono, germinano nell'intestino e producono enterotossine durante la sporulazione (3-5) (Fig.5) Il decorso clinico è solitamente autolimitante. I sintomi insorgono entro 6–24 ore e comprendono diarrea acquosa, crampi addominali e dolore addominale. Febbre, nausea e

vomito sono generalmente assenti o lievi (5). La malattia si risolve spontaneamente entro 24–48 ore nella maggior parte dei casi, ed è raramente associata a complicanze gravi in soggetti immunocompetenti. Una forma più rara ma severa è l'enterite necrotizzante, storicamente descritta in specifici contesti epidemiologici. In questo caso, la produzione di tossine porta a necrosi della mucosa intestinale, con dolore addominale acuto, sanguinamento e possibile perforazione intestinale (3). Questa condizione è associata a un'elevata mortalità se non trattata. *C. perfringens* può causare batteriemia e sepsi, in particolare in pazienti con condizioni predisponenti quali neoplasie, diabete, immunosoppressione o malattie epatobiliari (2). In questi casi, la batteriemia può essere associata a emolisi massiva intravascolare, attribuita all'azione tossinica, e a un decorso clinico rapidamente progressivo. I sintomi comprendono febbre, ipotensione, anemia acuta e segni di shock settico.

C. perfringens cell morphology



Phase-contrast micrograph of *C. perfringens* vegetative (black arrows) and sporulating cells (white arrows)



Gram stain of *C. perfringens* cells (purple, rod-shaped) in infected tissue

Trends in Microbiology

Figura 5: Morfologia cellulare *C. perfringens* ([https://www.cell.com/trends/microbiology/issue?pii=S0966-842X\(24\)X0002-5](https://www.cell.com/trends/microbiology/issue?pii=S0966-842X(24)X0002-5)).

1.4.2–Formazione delle spore

La formazione delle endospore in *Clostridium perfringens* costituisce un processo di differenziamento cellulare altamente specializzato, comune ai batteri sporigeni Gram-positivi, che permette la sopravvivenza del microrganismo in condizioni ambientali sfavorevoli (1-2). La sporulazione viene descritta come una risposta adattativa a situazioni di stress, quali carenza di nutrienti, accumulo di metaboliti tossici o condizioni ambientali incompatibili con la prosecuzione della crescita vegetativa (1). La spora non costituisce una forma riproduttiva, ma una struttura metabolicamente quiescente, dotata di una resistenza

estremamente elevata al calore, disidratazione, agenti chimici e variazioni di pH (1-5). La sporulazione riveste un significato non solo ecologico, ma anche clinico e patogenetico. Questo processo è infatti strettamente associato alla produzione dell'enterotossina responsabile delle tossinfezioni alimentari (3-5). Ciò distingue la sporulazione di *C. perfringens* da quella di altri clostridi, in cui il legame diretto tra differenziamento sporale e patogenicità è meno marcato (3). L'ingresso nel programma di sporulazione è regolato da un complesso sistema di controllo genetico, il regolatore chiave di questo processo è il fattore di trascrizione Spo0A, considerato il "master regulator" della sporulazione (3-6). In risposta a segnali di stress ambientale, Spo0A viene attivato e induce una considerevole riorganizzazione dell'espressione genica, determinando l'arresto della crescita vegetativa e l'avvio del programma di differenziamento (6). La sporulazione in *C. perfringens* procede attraverso una serie di eventi ordinati. La cellula vegetativa va incontro a una divisione asimmetrica che genera due compartimenti distinti: una forespora di dimensioni ridotte e una cellula madre metabolicamente attiva (1). Successivamente, la cellula madre ingloba la forespora in un processo noto come engulfment, determinando la formazione di una struttura delimitata da una doppia membrana (1). Attorno alla forespora vengono sintetizzate la corteccia sporale, costituita da peptidoglicano modificato, e il rivestimento proteico esterno, responsabile della resistenza meccanica e chimica della spora (1,2). Durante la fase di maturazione, la spora subisce una progressiva disidratazione del citoplasma e accumula dipicolinato di calcio, una molecola fondamentale per la stabilità strutturale e la termoresistenza (1). Al termine del processo, la cellula madre va incontro a lisi programmata, rilasciando nell'ambiente una spora completamente matura e metabolicamente inattiva (1). In *C. perfringens*, la spora possiede solitamente una forma ovale e localizzata in posizione subterminale, senza determinare una deformazione della cellula madre (1). Un aspetto peculiare di *C. perfringens*, è che la sporogenesi risulta spesso poco evidente nelle colture di laboratorio di routine. Questo è attribuito alla spiccata tendenza della specie a mantenere una crescita vegetativa rapida in condizioni favorevoli, mentre la sporulazione avviene prevalentemente in risposta a segnali ambientali specifici. Di conseguenza, le spore possono risultare difficili da osservare nei terreni standard, nonostante rivestano un ruolo centrale nella sopravvivenza e nella trasmissione del batterio. Dal punto di vista clinico, la sporulazione assume un'importanza cruciale nelle tossinfezioni alimentari da *C. perfringens*, l'enterotossina viene prodotta principalmente durante la sporulazione, in particolare nelle fasi finali del processo. Questo spiega perché l'ingestione di spore vitali, seguita dalla loro

germinazione e successiva sporulazione nell'intestino, rappresenti il meccanismo patogenetico alla base della malattia (3-5).

1.4.3–*Clostridium perfringens* come contaminante alimentare

Clostridium perfringens rappresenta uno dei principali patogeni di interesse nella microbiologia alimentare per la sua associazione con tossinfezioni legate al consumo di alimenti cotti, in particolare prodotti a base di carne, sughi, stufati e preparazioni di grandi volumi (5-6). La rilevanza di questo microrganismo come contaminante alimentare è collegata alla sua capacità di formare endospore termoresistenti e alla rapida crescita delle forme vegetative in condizioni di conservazione termica non adeguata (1-5). La contaminazione degli alimenti avviene facilmente, poiché *C. perfringens* è ubiquitario nell'ambiente e comunemente presente nel tratto gastrointestinale di animali e uomo (1-2). Dal punto di vista microbiologico, la cottura degli alimenti è generalmente efficace nell'inattivare le cellule vegetative di *C. perfringens*, ma non garantisce l'eliminazione delle endospore, che possono sopravvivere ai trattamenti termici comunemente impiegati (5-6). Il rischio principale di tossinfezione non dipende dalla presenza iniziale del microrganismo, bensì dalla gestione delle fasi successive alla cottura. Le spore sopravvissute possono infatti germinare e dare origine a una rapida moltiplicazione delle forme vegetative quando l'alimento viene mantenuto per tempi prolungati a temperature favorevoli alla crescita batterica (5-6). Un aspetto centrale nella prevenzione delle tossinfezioni da *C. perfringens* è il controllo della temperatura. La crescita del microrganismo è favorita all'interno di un intervallo termico critico, indicato come "zona di pericolo", compreso approssimativamente tra 15 e 50 °C, con un optimum di crescita delle forme vegetative intorno a 43–47 °C (5). Quando un alimento cotto viene raffreddato lentamente, soprattutto se conservato in grandi masse o in contenitori profondi, attraversa questa fascia di temperatura per un periodo di tempo sufficiente a consentire la germinazione delle spore e la moltiplicazione batterica. La moltiplicazione batterica è favorita dalle condizioni di ridotta disponibilità di ossigeno tipiche degli alimenti compatti o conservati in contenitori chiusi (1). L'adeguata conservazione degli alimenti cotti si basa quindi sull'adozione di strategie in grado di impedire sia la germinazione delle spore sia la crescita delle cellule vegetative. Dopo la cottura, gli alimenti destinati alla refrigerazione devono essere raffreddati rapidamente, riducendo il tempo di permanenza nella fascia di temperatura critica e raggiungendo temperature inferiori a 10 °C nel più breve tempo possibile (6-7). Una volta refrigerati, la conservazione a temperature pari o inferiori a 4 °C è considerata efficace nell'inibire la

crescita di *C. perfringens*. In alternativa, qualora l'alimento venga mantenuto in caldo in attesa del consumo, è fondamentale garantire una temperatura costante pari o superiore a 60–65 °C, valore al di sopra del quale la germinazione delle spore e la moltiplicazione delle forme vegetative risultano inibite (5-7). Un ulteriore punto critico è rappresentato dalla fase di riscaldamento prima del consumo. Un riscaldamento insufficiente o non uniforme può permettere la sopravvivenza di elevate cariche di cellule vegetative. L'ingestione di tali cellule costituisce il presupposto per l'insorgenza della tossinfezione alimentare, poiché *C. perfringens* produce l'enterotossina prevalentemente nell'intestino dell'ospite, durante la fase di sporulazione (3-5). Per ridurre il rischio, è necessario che il riscaldamento consenta il raggiungimento di temperature interne dell'alimento di almeno 70–75 °C, sufficienti a ridurre in modo significativo la carica batterica.

Capitolo 2. Quadro normativo generale

Il commercio internazionale di cibo esiste da migliaia di anni ma fino a non molto tempo fa il cibo è stato prodotto, venduto e consumato per la maggior parte localmente. Durante l'ultimo secolo il quantitativo di cibo commercializzato a livello internazionale è cresciuto in modo esponenziale ed oggi enormi quantità e varietà di alimenti, come mai in passato, viaggiano ogni giorno attraverso il globo. Il Codex Alimentarius è un insieme di linee guida e codici di buone pratiche, standardizzate a livello internazionale, che contribuisce al miglioramento della sicurezza, qualità e correttezza del commercio mondiale di alimenti (7). I consumatori sono tutelati sempre meglio rispetto alla sicurezza e qualità dei prodotti alimentari che acquistano e gli importatori hanno sempre più garanzie nei loro scambi sul fatto che il cibo che hanno ordinato sarà conforme alle loro specifiche richieste. Biotecnologie, pesticidi, additivi e contaminanti alimentari sono tra i principali argomenti in discussione durante le riunioni del Codex. Gli standard del Codex si basano su dati e considerazioni oggettive, confortati dalle migliori acquisizioni scientifiche disponibili, provenienti da organismi di ricerca indipendenti sulla valutazione dei rischi oppure su consultazioni internazionali "ad hoc" organizzate dalla FAO e dall'OMS (Organizzazione Mondiale della Sanità) (7). Pur essendo solo raccomandazioni per applicazioni volontarie degli stati membri, gli standard del Codex sono utilizzati spesso come base per la legislazione sanitaria nei vari paesi. I membri dell'OMC (L'Organizzazione Mondiale del Commercio) che desiderano applicare misure più restrittive, di quelle raccomandate dal Codex, per la sicurezza degli alimenti, devono giustificare queste misure con evidenze scientifiche. La sicurezza microbiologica degli alimenti rappresenta un pilastro

fondamentale per l'intera filiera: coinvolge le autorità governative e sanitarie, le imprese di produzione e distribuzione, fino a responsabilizzare il consumatore finale. Il Codex Alimentarius (FAO/WHO) definisce la sicurezza degli alimenti come la “garanzia che l'alimento non arrechi danni al consumatore quando è preparato e/o consumato secondo l'uso previsto”. L'adozione del sistema HACCP e l'applicazione delle norme di buona pratica igienica, per esempio, hanno posto la prevenzione al centro delle strategie per la riduzione degli episodi di tossinfezione alimentare. La sicurezza di un alimento al momento del consumo si costruisce lungo tutta la filiera alimentare (produzione primaria, trasformazione, distribuzione, trasporto, conservazione, consumo), che viene concepita come un processo continuo durante il quale possono avere luogo sia eventi in grado di ridurre o eliminare i pericoli microbiologici, sia eventi in grado di determinare una contaminazione, in particolare da microrganismi patogeni, o un aumento di concentrazione del contaminante oltre la soglia considerata sicura. L'analisi del rischio (risk analysis) è un processo scientifico, sistematico e trasparente basato sull'interazione di tre elementi: valutazione del rischio (risk assessment), gestione del rischio (risk management) e comunicazione del rischio (risk communication) (6-7). La Commissione Internazionale sulle Specifiche Microbiologiche per gli Alimenti (ICMSF) è un organismo creato nel 1962 dedicato alla definizione di criteri microbiologici per garantire la sicurezza microbiologica degli alimenti, la Commissione è stata creata in risposta alla necessità di un organismo che prendesse decisioni a livello internazionale sui limiti microbiologici per gli alimenti. L'International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) svolge un ruolo centrale, poiché fornisce le basi scientifiche per la definizione dei criteri microbiologici e per la valutazione del rischio microbiologico negli alimenti. Le raccomandazioni dell'ICMSF, elaborate sulla base di evidenze sperimentali e modelli quantitativi (6), vengono utilizzate come riferimento tecnico-scientifico nell'elaborazione dei documenti del Codex Alimentarius, contribuendo a garantire che gli standard internazionali siano fondati su criteri scientificamente validi e condivisi (6-7). Nel contesto della legislazione dell'Unione Europea, il controllo di *Clostridium perfringens* rientra nel quadro generale dell'igiene dei prodotti alimentari definito dal Regolamento (CE) n. 853/2004, che stabilisce norme applicabili a tutte le fasi della produzione, trasformazione e distribuzione degli alimenti, con l'obiettivo di garantire un elevato livello di tutela della salute umana (8). Sebbene il regolamento non menzioni esplicitamente *Clostridium perfringens*, esso è implicitamente incluso tra i pericoli biologici da controllare, in quanto microrganismo patogeno sporigeno la cui crescita e tossigenesi sono strettamente correlate alle condizioni igieniche e, in

particolare, alla gestione delle temperature. Il regolamento attribuisce la responsabilità primaria della sicurezza degli alimenti agli operatori del settore alimentare e impone l'adozione di procedure basate sui principi del sistema HACCP, finalizzate all'identificazione e al controllo dei pericoli microbiologici lungo l'intera filiera alimentare (8). Un aspetto di particolare rilevanza per *C. perfringens* è rappresentato dai requisiti relativi al controllo delle temperature e al raffreddamento degli alimenti, espressamente previsti dal regolamento come misure necessarie per prevenire la proliferazione di microrganismi patogeni e la formazione di tossine. In particolare, il regolamento stabilisce che gli alimenti in grado di consentire la crescita di microrganismi patogeni non devono essere conservati a temperature tali da comportare rischi per la salute e che, al termine del trattamento termico, essi devono essere raffreddati il più rapidamente possibile a una temperatura che non comporti rischi sanitari (8). Tali disposizioni risultano direttamente applicabili alla prevenzione delle tossinfezioni da *Clostridium perfringens*, la cui patogenicità è legata alla germinazione delle spore e alla moltiplicazione delle forme vegetative in condizioni di conservazione termica non adeguata. Il Regolamento (CE) n. 852/2004 prevede inoltre il rispetto dei criteri microbiologici, l'adozione di misure igieniche strutturali e operative e il mantenimento della catena del freddo, elementi che costituiscono strumenti fondamentali per il controllo di patogeni anaerobi sporigeni come *C. perfringens*. In questo quadro normativo, il rischio associato a tale microrganismo non viene gestito attraverso l'eliminazione completa del batterio, bensì mediante un approccio preventivo basato sull'igiene di processo, sul controllo dei parametri critici e sulla corretta applicazione delle procedure di autocontrollo. Ne deriva che il Regolamento (CE) n. 852/2004 rappresenta il principale riferimento normativo europeo per la gestione del rischio da *Clostridium perfringens* negli alimenti, fornendo una base giuridica coerente con le conoscenze microbiologiche relative alla sopravvivenza delle spore e alla crescita del microrganismo in condizioni favorevoli.

2.1–Principi generali delle norme ISO per l'analisi microbiologica

Le norme ISO per l'analisi microbiologica degli alimenti si fondano su un insieme di principi scientifici condivisi, sviluppati per garantire riproducibilità, affidabilità e comparabilità dei risultati analitici tra laboratori diversi (9). Tali principi derivano dall'integrazione tra microbiologia classica, statistica applicata e valutazione del rischio, come descritto nei principali manuali di microbiologia alimentare e nelle pubblicazioni dell'International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF) (6). Un principio

fondamentale alla base delle norme ISO è la standardizzazione dei metodi analitici. In microbiologia, la variabilità intrinseca dei microrganismi e delle matrici alimentari può influenzare in modo significativo il risultato dell'analisi. Le norme ISO definiscono quindi in modo dettagliato le fasi di campionamento, preparazione del campione, semina, incubazione e lettura dei risultati, riducendo al minimo la variabilità legata all'operatore e alle condizioni sperimentali (9-10). Questo approccio consente di ottenere risultati confrontabili a livello nazionale e internazionale, requisito essenziale per il controllo ufficiale degli alimenti e per la verifica della conformità normativa (9). Un secondo principio chiave è la rappresentatività del campione, che riconosce come l'analisi microbiologica non possa prescindere da un corretto piano di campionamento. Le norme ISO assumono che il campione analizzato debba essere rappresentativo del lotto alimentare e definiscono procedure standardizzate di diluizione e omogeneizzazione per garantire una distribuzione uniforme dei microrganismi (9). Questo principio è direttamente collegato alla microbiologia quantitativa e alla statistica dei microrganismi negli alimenti, come ampiamente discusso nei volumi ICMSF (6). Le norme ISO si fondano sul principio di selettività e specificità dei metodi analitici, perseguito attraverso l'impiego di terreni di coltura selettivi e differenziali e mediante l'adozione di condizioni di incubazione mirate (10). Tali accorgimenti consentono di favorire lo sviluppo del microrganismo bersaglio, limitando al contempo la crescita della flora microbica interferente, con conseguente incremento dell'affidabilità sia dell'identificazione sia della quantificazione. Un ulteriore elemento distintivo delle metodiche ISO è la presenza sistematica di fasi di conferma biochimica e/o fisiologica, finalizzata a garantire la corretta attribuzione delle colonie isolate al microrganismo oggetto di indagine, riducendo il rischio di falsi positivi (10). Tra i principi cardine rientra inoltre la quantificazione basata su unità biologiche vitali, generalmente espresse come unità formanti colonia (UFC). Le norme ISO assumono infatti che, ai fini della valutazione igienico-sanitaria, siano rilevanti esclusivamente i microrganismi vitali. Di conseguenza, le metodiche proposte sono progettate per enumerare le cellule capaci di moltiplicarsi nelle condizioni di prova adottate. Tale impostazione risulta coerente con i principi della valutazione del rischio microbiologico, poiché la presenza di cellule vitali è direttamente correlata al potenziale di crescita e, nei casi pertinenti, di patogenicità (9). Un aspetto di particolare rilevanza è il collegamento tra le norme ISO e il concetto di analisi del rischio. Come evidenziato nei documenti ICMSF e nelle review di microbiologia alimentare, i metodi ISO non sono pensati come strumenti isolati, ma come parte integrante dei sistemi di gestione della sicurezza alimentare basati su HACCP (6). L'analisi microbiologica diventa

così uno strumento di verifica dell'efficacia delle misure di controllo, piuttosto che un fine in sé. Infine, le norme ISO incorporano il principio della tracciabilità e documentazione del dato analitico, imponendo la registrazione delle condizioni di prova, dei terreni utilizzati, delle temperature e dei tempi di incubazione. Questo garantisce la possibilità di audit, riesame e confronto dei risultati nel tempo, elemento essenziale nei sistemi di controllo ufficiale e nelle certificazioni di qualità. Nel loro insieme, questi principi rendono le norme ISO uno strumento scientificamente solido e normativamente riconosciuto per l'analisi microbiologica degli alimenti, in grado di collegare la microbiologia sperimentale alla valutazione del rischio e alla tutela della salute pubblica (6-9-12-13).

2.2–Norme ISO applicata alla ricerca di *Clostridium perfringens*

La ricerca e l'enumerazione di *Clostridium perfringens* negli alimenti seguono i protocolli definiti dalle norme ISO, riferimento metodologico internazionale che garantisce l'accuratezza e la standardizzazione dei risultati (9). Tali procedure, fondate su rigorosi principi di microbiologia alimentare, rappresentano il pilastro analitico sia per la vigilanza ufficiale, sia per i piani di autocontrollo HACCP, assicurando la piena conformità ai requisiti di sicurezza alimentare vigenti (6-9). Il riferimento generale per tutte le analisi microbiologiche degli alimenti è rappresentato dalla ISO 15213:2-2023 (Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of sulfite-reducing bacteria growing under anaerobic conditions). Tale norma sostituisce la precedente ISO 7937 – Microbiology of food and animal feeding stuffs: Horizontal method for the enumeration of *Clostridium perfringens* – Colony-count technique (10). La ISO 7937 basava la ricerca del batterio in modalità specie-specifica, progettata per l'enumerazione diretta di *Clostridium perfringens* mediante tecnica di conteggio delle colonie (11). Il metodo utilizzava terreni selettivi e condizioni anaerobiche tali da favorire la crescita del microrganismo bersaglio, consentendo una quantificazione delle cellule vitali considerate direttamente rilevanti dal punto di vista sanitario. Dal punto di vista applicativo, la ISO 7937 era quindi orientata a una valutazione mirata del rischio microbiologico, utile quando l'obiettivo dell'analisi era verificare la presenza e la concentrazione di *C. perfringens* come patogeno responsabile di tossinfezioni alimentari. Tuttavia, questa impostazione presentava alcuni limiti, in particolare la scarsa flessibilità rispetto alle diverse matrici alimentari e la limitata armonizzazione con l'approccio moderno basato su indicatori di processo. La ISO 15213:2-2023, normativa ad oggi in vigore, descrive un metodo orizzontale, applicabile a diverse matrici alimentari, per l'enumerazione delle cellule vitali di *C. perfringens* mediante

conteggio delle unità formanti colonia. Il metodo si basa sull'impiego di terreni selettivi e condizioni di incubazione anaerobiche, progettate per favorire la crescita del microrganismo bersaglio e inibire la flora interferente. Il confronto tra le due norme evidenzia una differenza sostanziale di finalità e livello di specificità. La ISO 15213:2-2023 fornisce un'informazione globale e indicativa sulla presenza di batteri anaerobi sporigeni, risultando particolarmente adatta come strumento di screening e di controllo dell'igiene di processo. La ISO 7937, invece, consente una valutazione mirata e specie-specifica, ed è quindi più appropriata quando l'obiettivo dell'analisi è la verifica della presenza e della concentrazione di *Clostridium perfringens* in relazione a un rischio sanitario concreto. La ISO 15213:2-2023 (Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of sulfite-reducing bacteria growing under anaerobic conditions) rappresenta una norma orizzontale ampiamente utilizzata nell'analisi microbiologica degli alimenti per l'enumerazione dei batteri anaerobi solfito-riduttori. Questa categoria comprende diversi microrganismi anaerobi sporigeni, tra cui *Clostridium perfringens*, che costituisce il principale rappresentante di interesse igienico-sanitario nel contesto alimentare. Dal punto di vista metodologico, la ISO 15213:2-2023 si basa sull'impiego di terreni contenenti solfito e ferro, che consentono l'evidenziazione delle colonie solfito-riduttrici attraverso la formazione di colonie nere, risultato della precipitazione di solfuro ferroso. L'incubazione avviene in condizioni strettamente anaerobiche, a temperature idonee alla crescita di microrganismi mesofili. La norma è concepita come metodo indicatore, in quanto non consente una identificazione specie-specifica, ma fornisce una stima quantitativa complessiva dei batteri anaerobi sporigeni presenti nel campione. Nelle pubblicazioni ICMSF, la ISO 15213:2-2023 viene descritta come particolarmente utile per la valutazione dell'igiene di processo, soprattutto in alimenti cotti o sottoposti a trattamenti termici, nei quali la presenza di batteri solfito-riduttori è indicativa di una possibile sopravvivenza delle spore e di una gestione termica non adeguata delle fasi post-cottura. In questo senso, la norma è coerente con l'approccio normativo europeo, che privilegia l'uso di microrganismi indicatori per il monitoraggio dei processi produttivi.

SCOPO DELLA TESI

Questo progetto è stato condotto presso il laboratorio di analisi microbiologiche “Artest-Laboratorio E Servizi-S.R.L.”, con sede a Modena (Mo). Lo scopo della presente tesi sperimentale è la validazione del metodo analitico per l'enumerazione dei batteri anaerobi

solfito-riduttori, applicato a matrici alimentari selezionate, in conformità alla norma UNI EN ISO 15213:2-2023 (10). Sono stati utilizzati quindici campioni in totale, dei quali: dieci campioni di carne avicola per valutare la ripetibilità del metodo e cinque matrici alimentari differenti per valutare la bias. Lo scopo della validazione è finalizzato a verificarne l' idoneità all'uso, l'affidabilità dei risultati e la riproducibilità delle prestazioni analitiche nell'ambito dell'analisi microbiologica degli alimenti. La seguente normativa è applicabile su

-prodotti destinati al consumo umano

-prodotti per l'alimentazione animale

-campioni ambientali prelevati nelle zone di produzione e manipolazione di alimenti e mangimi

-campioni provenienti dalla fase di produzione primaria

Nonostante le molteplici matrici alimentari sulle quali è possibile applicare la normativa, è stata validata su prove condotte su prodotti destinati al consumo umano.

Capitolo 3. MATERIALI E METODI

3.1–Metodo ISO 15213-2:2023

Il protocollo per la ricerca e l'enumerazione dei batteri anaerobi solfito-riduttori, con particolare riferimento a *Clostridium perfringens*, segue le direttive della norma UNI EN ISO 15213:2-2023 (10). Il metodo si basa sulla tecnica della semina per inclusione: aliquote del (o delle sue diluizioni decimali) vengono inoculate in piastre di terreno selettivo TSC (Tryptone Sulfite Cycloserine agar). La presenza di solfito e sali di ferro nel terreno permette di identificare le colonie tipiche grazie alla formazione di un precipitato scuro, indice della riduzione del solfito in condizioni di anaerobiosi. Dopo un'incubazione a (37 ± 1) °C in atmosfera anaerobica, le colonie sospette vengono isolate su terreno non selettivo e sottoposte al test della fosfatasi acida per la conferma biochimica. Il calcolo della concentrazione microbica finale viene eseguito sulla base del numero di colonie effettivamente confermate.

3.2–Validazione e verifica del metodo

La validazione del metodo analitico è stata condotta con l'obiettivo di verificare l' idoneità applicativa della norma UNI EN ISO 15213:2-2023 nel contesto sperimentale considerato.

In particolare, la verifica delle prestazioni del metodo è stata articolata e divisa in due fasi distinte:

1. Fase di implementazione
2. Verifica della ripetibilità del metodo e della bias

La fase di implementazione ha previsto l'esecuzione di dieci prove indipendenti, eseguite ciascuna da due operatori differenti, su una matrice selezionata tra quelle oggetto di validazione. Per ciascuna prova sono state analizzate due aliquote dello stesso campione, contaminato artificialmente a basso livello di *Clostridium perfringens*, al fine di simulare le condizioni realistiche di routine analitica. La prima parte ha la finalità di calcolare lo scarto tipo di riproducibilità intralaboratorio, detto SIR (riferimento ISO 19036) (12). Il criterio di accettabilità adottato prevede che il valore di SIR sia inferiore a 2SR, dove SR rappresenta il più basso valore medio di deviazione standard di riproducibilità interlaboratorio riportato in norma per le matrici considerate. Il secondo punto della verifica prestazionale ha riguardato la valutazione della bias e della ripetibilità, mediante prove di contaminazione artificiale su più matrici. In accordo con quanto previsto per le matrici alimentari (cinque tipologie, secondo ISO 16140-3) (13), sono state selezionate differenti matrici rappresentative e ciascuna è stata contaminata artificialmente a tre livelli di concentrazione (basso, medio e alto), utilizzando un inoculo ottenuto da un ceppo a titolo noto. Ogni livello di contaminazione è stato eseguito in doppio e, contestualmente alle prove, è stata effettuata la determinazione del titolo dell'inoculo per definire il valore atteso di riferimento.

3.3–Parametri di validazione

La validazione del metodo di prova per l'enumerazione di *Clostridium perfringens* è stata condotta in conformità al protocollo interno e in accordo con quanto previsto per la verifica dei metodi di prova normati, applicando il metodo ufficiale UNI EN ISO 15213:2-2023 a matrici alimentari destinate al consumo umano (10-13). L'attività di validazione ha avuto carattere applicativo ed è stata finalizzata a verificare l'idoneità del metodo all'uso previsto nel contesto operativo considerato, valutandone le principali caratteristiche prestazionali sulla base delle evidenze sperimentali raccolte (13). Il parametro principale oggetto di valutazione è stato la ripetibilità del metodo, determinata mediante l'esecuzione di dieci prove analitiche indipendenti su un campione contaminato artificialmente (12-13). La ripetibilità è stata verificata confrontando lo scarto tipo ottenuto dal laboratorio con lo scarto tipo di riferimento indicato dalla norma per prodotti a base di carne a basso livello di

contaminazione (10-12). È stata inoltre valutata la bias (errore sistematico) mediante prove di contaminazione artificiale condotte su diverse matrici alimentari (carni, ortaggi cotti, formaggi, prodotti ittici e miscele a base d'uovo), utilizzando un ceppo di riferimento di *Clostridium perfringens* (WDCM 00007 – ATCC 13124) (13). L'accuratezza del metodo è stata valutata in attesa della partecipazione a un circuito interlaboratorio, mediante prove interne di contaminazione su matrici alimentari con titolo noto, in accordo con quanto previsto dal protocollo di validazione (13). I parametri di LOD e LOQ non sono stati oggetto di determinazione sperimentale nella presente tesi. Essi sono riportati come valori di riferimento normativi secondo quanto indicato dalla ISO 7218 e non rientrano tra i parametri utilizzati per la valutazione applicativa del metodo (9). Infine, è stata stimata l'incertezza di misura, in conformità alla norma ISO 19036, considerando i contributi di incertezza tecnica e di matrice (12).

3.3.1–Ceppi di riferimento e materiali biologici

I microrganismi utilizzati durante le sessioni analitiche sono tre.

1. Per le prove di contaminazione artificiale è stato utilizzato un ceppo di riferimento di *Clostridium perfringens* WDCM 00007 (ATCC 13124), al fine di garantire la tracciabilità e la standardizzazione delle prove sperimentali (10).
2. Durante ogni sessione analitica sono state preparate due piastre di TSC agar per effettuare il controllo positivo (utilizzare *C. Perfringens*) e come controllo negativo è stato impiegato *Escherichia coli* WDCM 00012 (ATCC 8739), utilizzato per verificare la selettività del terreno di coltura e l'assenza di crescita in condizioni non compatibili con i batteri anaerobi solfito-riduttori (10).
3. Per la prova di conferma mediante fosfatasi acida, prevista dalla procedura come step di conferma delle colonie presuntive, è stato inoltre utilizzato un ceppo di *Clostridium bifermentans* WDCM 00037 (NCTC 506), come riferimento di controllo per l'esecuzione e l'interpretazione del test (10).

Tra i materiali microbiologici impiegati rientrano inoltre i terreni di coltura selettivi e non selettivi previsti dalla procedura interna, in particolare:

- TP (Tryptone Salt Broth) diluente triptone isotonico utilizzato in microbiologia per il campionamento, la diluizione e la sospensione di microrganismi da vari campioni per la preparazione delle sospensioni e delle diluizioni decimali;

- sistemi per la generazione di condizioni di anaerobiosi (giara anaerobica con generatore di atmosfera e indicatore di anaerobiosi) (9);
- reagente per la prova della fosfatasi acida, utilizzato per la conferma delle colonie presuntive (10);
- TSC (Tryptose Sulfite Cycloserine) agar con supplemento selettivo a base di D-cicloserina, utilizzato per l'enumerazione dei batteri anaerobi solfito-riduttori (Fig.6) (10);



Figura 6 : Terreno TSC agar. Foto acquisita da: <https://www.kairosafe.it/en/culture-media-in-plates- bottles-tubes/3016-tsc-agar-iso-90-mm.html>.

- terreni non selettivi (Blood Agar e Tryptone Soya Agar) impiegati per il reisolamento e le prove di conferma (Fig.7) (9).

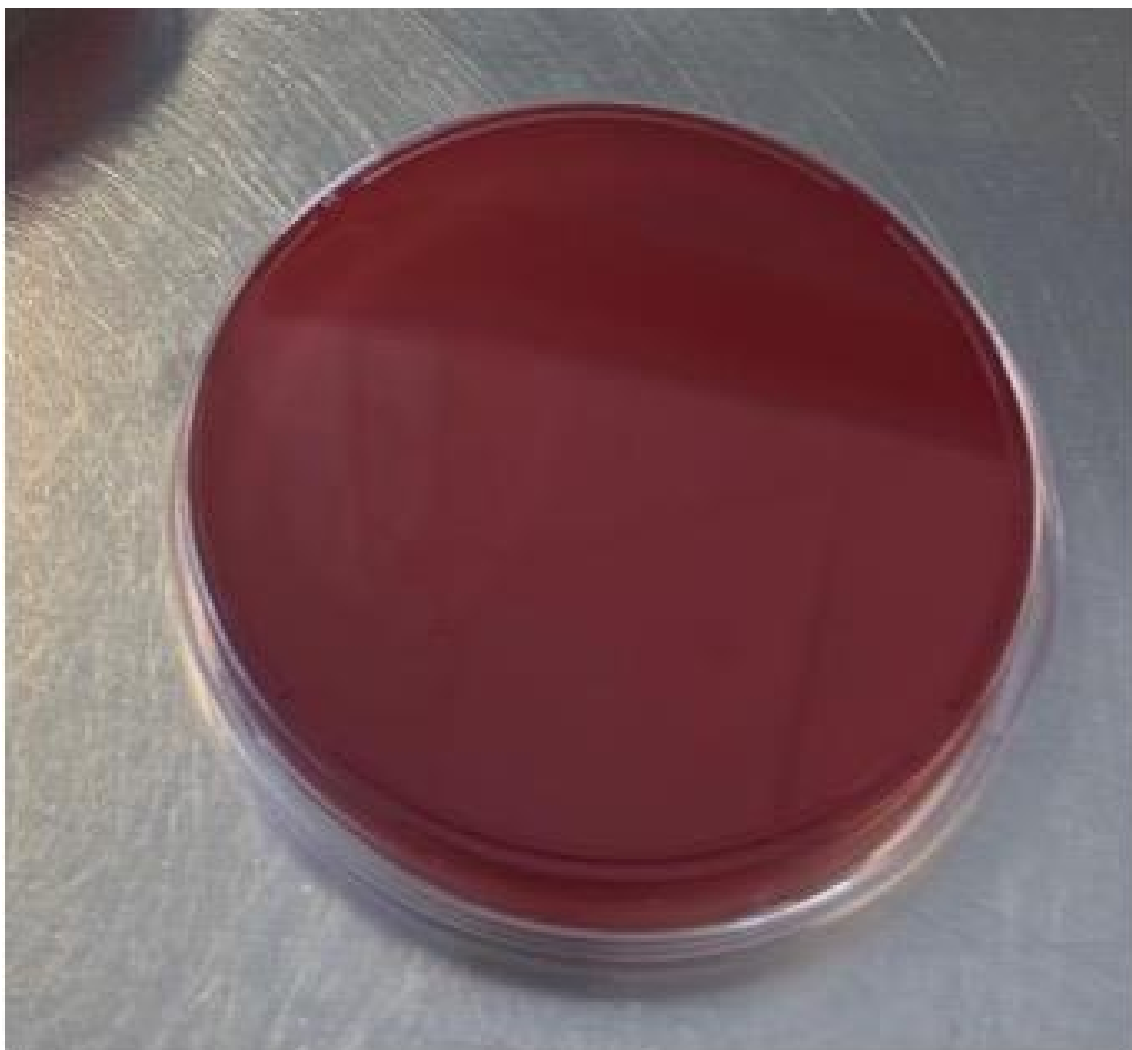


Figura 7: Terreno non selettivo Blood Agar. Foto acquisita presso il laboratorio Artest S.r.l., Modena.

L'insieme dei ceppi di riferimento e dei materiali microbiologici sopra descritti ha consentito lo svolgimento delle prove sperimentali in condizioni controllate, garantendo l'affidabilità e la riproducibilità delle determinazioni effettuate nell'ambito della validazione applicativa del metodo (9-10).

3.3.2–Preparazione e contaminazione dei campioni

La preparazione dei campioni e la verifica del metodo si eseguono in conformità a quanto specificato al punto 9 della norma ISO 15213-2:2023 (10); tutte le operazioni descritte devono essere condotte nel rispetto della più completa asepsi, operando con flambatore acceso e con superfici di lavoro costantemente sanificate. Utilizzare una piastra Petri per ogni diluizione in accordo con la norma ISO 7218 (9); tra la preparazione della prima diluizione e l'inoculo del terreno in piastra non devono trascorrere più di 15 minuti (10). Al fine di valutare la ripetibilità del metodo secondo quanto previsto dalla procedura di verifica

interna, sono state eseguite dieci prove analitiche indipendenti, svolte in condizioni operative comparabili e in doppio. Le prove sono state impostate su matrici alimentari contaminate artificialmente con concentrazione nota del ceppo di riferimento, in modo da consentire la valutazione della variabilità intra-laboratorio del metodo di enumerazione. Il giorno precedente allo svolgimento delle prove, per ogni prova indipendente, viene isolato *Clostridium perfringens* dalla ceppoteca di riferimento interna al laboratorio; il batterio viene prelevato tramite ansa sterile da inoculo, strisciato su terreno Blood Agar ed incubato in anaerobiosi in termostato a $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ per (21 ± 3) h (Fig.8) (10).

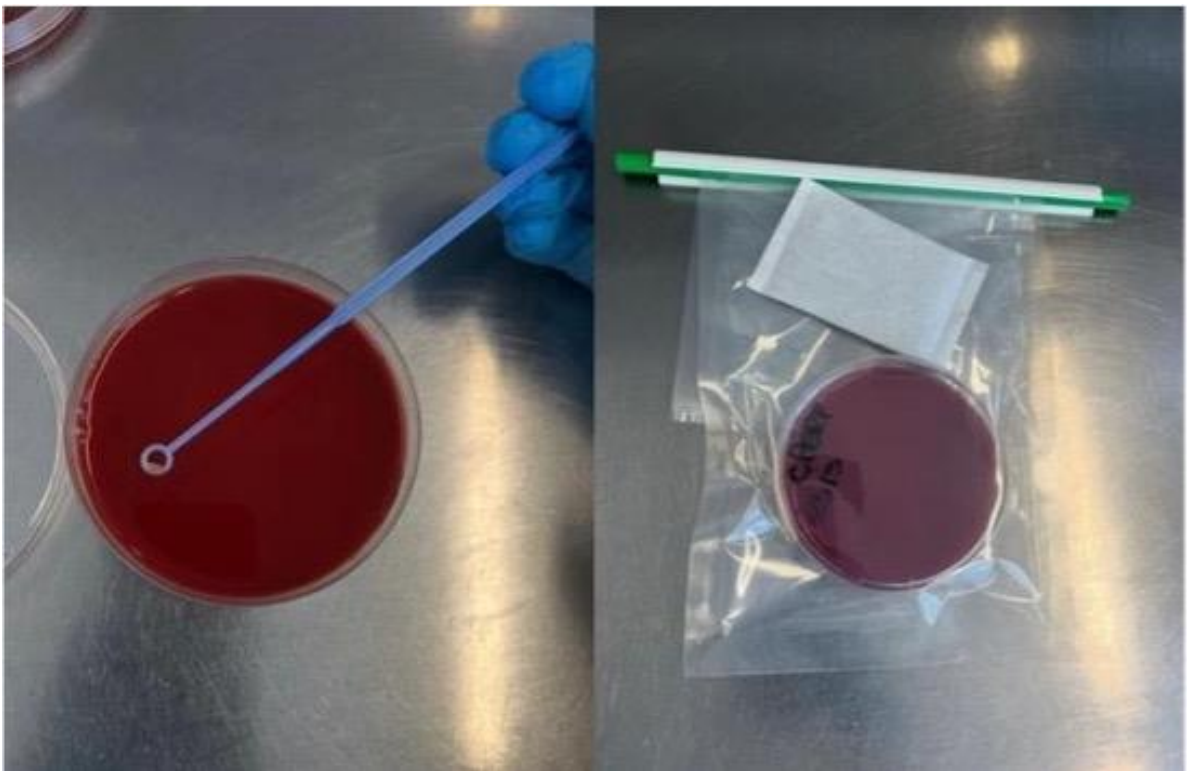


Figura 8: Blood Agar con *C. perfringens* spatolato e riposto in anaerobiosi. Foto acquisita presso il laboratorio Arttest S.r.l., Modena.

Il ceppo di riferimento di *Clostridium perfringens*, precedentemente coltivato su piastra di Blood Agar e incubato a $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ per (21 ± 3) h, è stato utilizzato per la preparazione della sospensione batterica iniziale. A partire dalla coltura fresca, una quantità idonea di biomassa batterica è stata prelevata dalla superficie della piastra e risospesa in una provetta contenente 9 mL di diluente TP (Tryptone Salt Broth) sterile (9). La sospensione così ottenuta è stata omogeneizzata e regolata fino al raggiungimento di una torbidità corrispondente a 2,0 unità McFarland. Gli standard McFarland vengono utilizzati come standard di torbidità nella preparazione delle sospensioni di microrganismi, al fine di standardizzare la concentrazione iniziale del microrganismo. La regolazione della torbidità è stata effettuata per garantire

uniformità e riproducibilità nelle successive fasi di diluizione e contaminazione artificiale delle matrici alimentari. A partire dalla sospensione a 2,0 McFarland, sono state eseguite diluizioni decimali seriali successive in diluente TP sterile fino alla diluizione 10^{-4} , al fine di ottenere una concentrazione batterica adeguata per l'allestimento delle prove di contaminazione artificiale (Fig.9) (9). Alla diluizione 10^{-4} è stato prelevato un volume noto di inoculo, modulato in funzione del livello di contaminazione previsto per ciascuna prova. L'aliquota di sospensione batterica è stata trasferita in due sacchetti sterili per stomacher con banda filtrante, contenenti ciascuno 10 g di matrice alimentare (carne di pollo), precedentemente pesati con bilancia tecnica ($10\text{ g} \pm 0,1\text{ g}$), e 90 mL di terreno peptonato (TP) (Fig.10) (9-10).

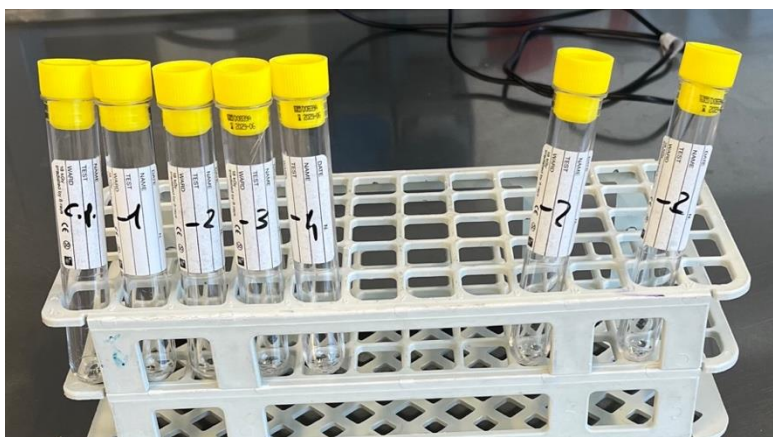


Figura 9: Diluente TP utilizzato e provette per diluizioni decimali. Foto acquisita presso il laboratorio Artest S.r.l; Modena.



Figura 10: Preparazione della matrice alimentare. Foto acquisita presso il laboratorio Artest S.r.l; Modena.

Dopo l'inoculo, i campioni sono stati omogeneizzati in stomacher per 2 minuti, ottenendo la sospensione iniziale corrispondente alla diluizione 10^{-1} (Fig.11).



Figura 11: Stomacher utilizzato per omogeneizzazione. Foto acquisita presso il laboratorio Artest S.r.l.; Modena.

Successivamente, 1 mL della diluizione 10^{-1} è stato seminato in piastre Petri sterili (Fig.12), opportunamente etichettate con la sigla “-1” (10). A partire dalla sospensione iniziale, è stata quindi effettuata una diluizione seriale trasferendo 1 mL in una provetta contenente 9 mL di TP, ottenendo la diluizione 10^{-2} (10). Dopo agitazione, 1 mL della nuova diluizione è stato seminato in piastra Petri sterile, riportando sul coperchio la sigla “-2”, indicativa di una diluizione pari a 10^{-2} (100 volte) (10).

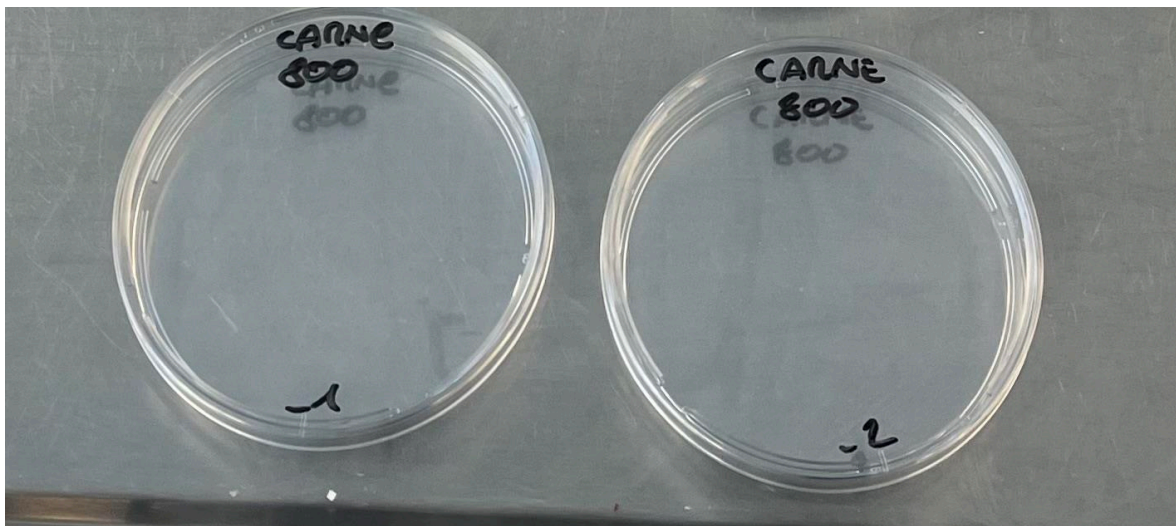


Figura 12: Piastre Petri utilizzate durante la validazione del metodo. Foto acquisita presso il laboratorio Artest S.r.l., Modena.

In ciascuna piastra Petri sono stati dispensati, mediante pipetta sterile, 15 mL di terreno TSC agar precedentemente mantenuto in bagnomaria a 44–47 °C (10). Il terreno è stato omogeneizzato con l'inoculo effettuando tre rotazioni della piastra seguite da tre movimenti trasversali tra loro ortogonali, prestando attenzione a evitare la fuoriuscita del mezzo. Tra la semina della diluizione decimale e la colata del terreno non sono intercorsi più di 45 minuti (10). Per ogni sessione analitica sono state predisposte due piastre di controllo: una per il controllo positivo, inoculata con *Clostridium perfringens*, e una per il controllo negativo, inoculata con *Escherichia coli*. L'assenza di crescita di *E. coli* ha costituito verifica sia della selettività del terreno sia della corretta instaurazione delle condizioni di anaerobiosi (Fig. 13) (10).

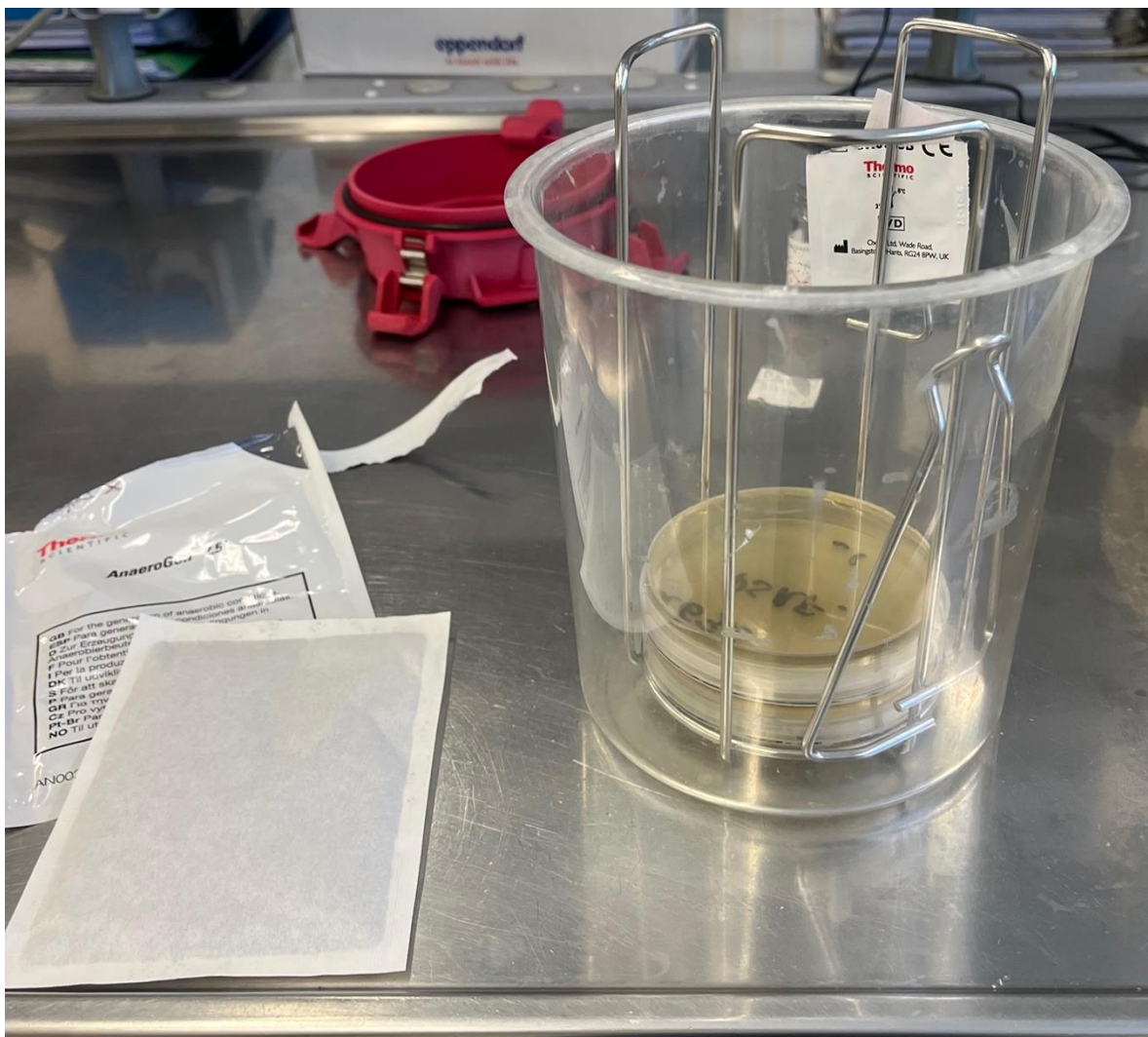


Figura 13: Giara per incubazioni in anaerobiosi. Foto acquisita presso il laboratorio Artest S.r.l; Modena.

Dopo solidificazione su superficie piana, su ciascuna piastra è stato aggiunto un ulteriore strato superficiale di 5 mL di TSC agar, distribuito uniformemente. Una volta solidificato anche il secondo strato, le piastre capovolte sono state collocate in giara per anaerobiosi,

insieme alla busta generatrice di atmosfera anaerobia (Anaerogen) e all'indicatore di anaerobiosi, posizionati negli appositi alloggiamenti del rack (10). La giara è stata chiusa ermeticamente e incubata in termostato a $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ per (20 ± 2) ore (10). Il colore dell'indicatore di anaerobiosi è stato verificato sia all'inizio sia al termine dell'incubazione; qualora fosse stata rilevata la presenza di ossigeno, le prove sono state ripetute (10). Dopo l'incubazione considerare come presunti *C. perfringens* le colonie nere o grigie o marrone-giallino, anche se il colore è lieve; effettuare il conteggio entro 30 minuti (10) dal termine dell'incubazione; il colore delle colonie può rapidamente sbiadire o scomparire con l'esposizione all'ossigeno. Confermare almeno 5 colonie presuntive con il test della fosfatasi acida. Le colonie ben isolate (Fig.14), vengono trasferite su terreni solidi, quali Blood Agar o Tryptone Soya Agar (TSA), e incubate in condizioni di anaerobiosi a una temperatura di $(37 \pm 1) ^\circ\text{C}$ per (21 ± 3) ore.

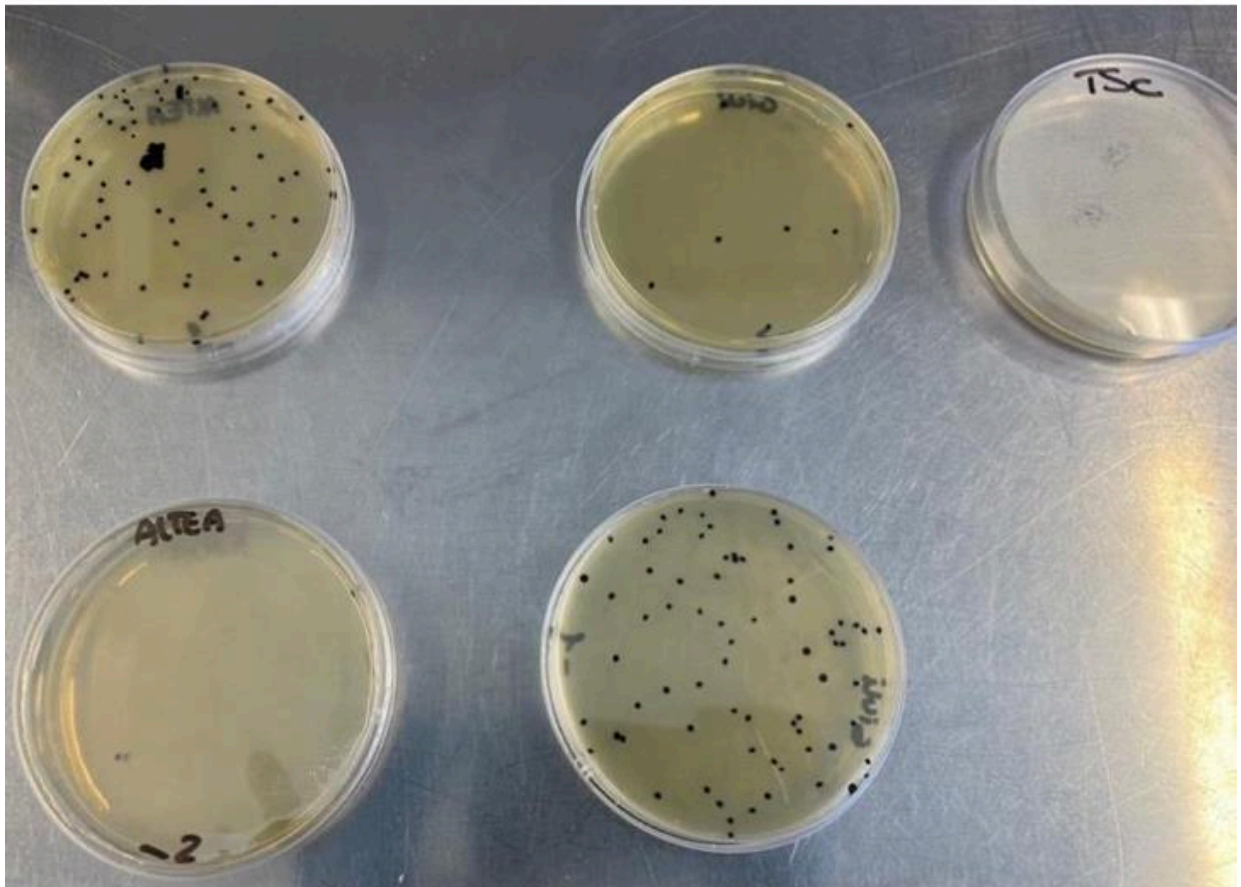


Figura 14: Piastre Petri con colonie presuntive di *C. perfringens*. Foto acquisita presso il laboratorio Arttest S.r.l; Modena.

La conferma biochimica viene effettuata tramite il saggio della fosfatasi acida: una porzione di colonia è strisciata su carta da filtro e addizionata con 2-3 gocce del reagente specifico. La comparsa di una colorazione violacea entro 3-4 minuti indica una reazione positiva. Per

garantire la validità del test, ogni sessione analitica include un controllo positivo (*C. perfringens*) (Fig.15) e un controllo negativo (*C. bifermentans*) (Fig.16).



Figura 15: Controllo positivo *C. perfringens*. Foto acquisita presso il laboratorio Artest S.r.l., Modena.

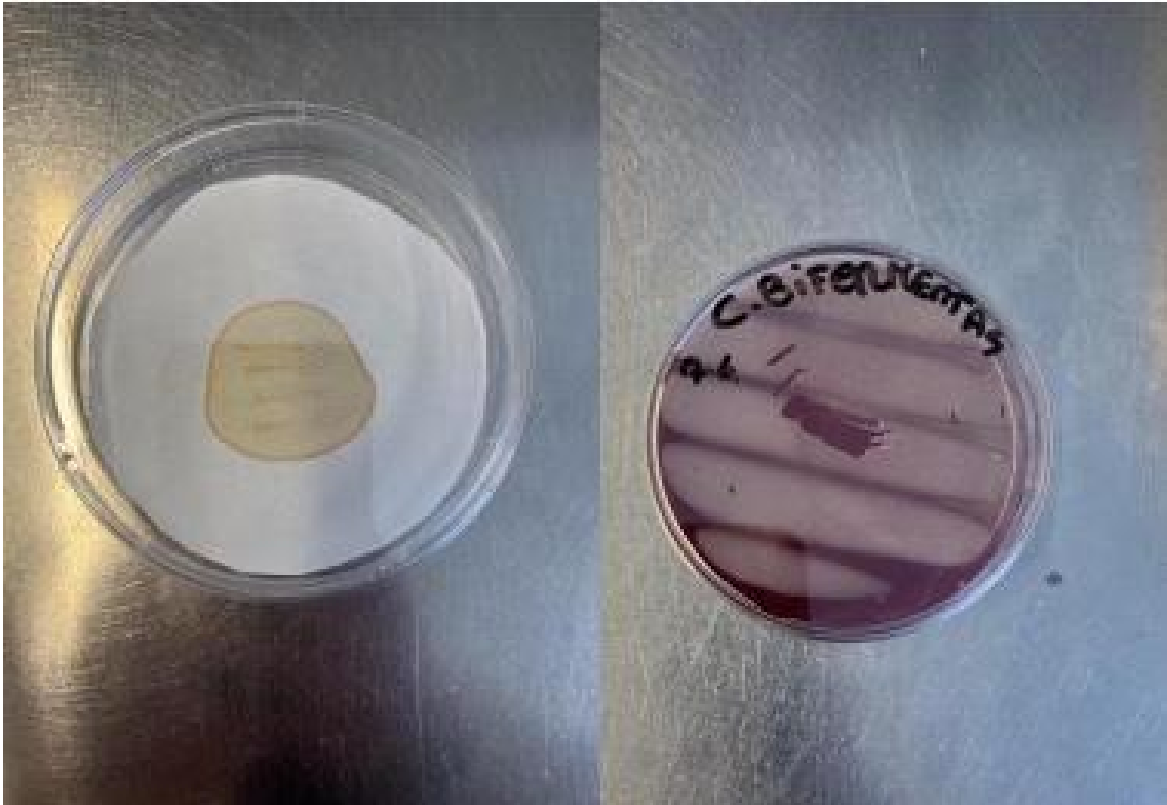


Figura 16: Controllo negativo *C. bifementas*. Foto acquisita presso il laboratorio Arttest S.r.l., Modena.

In ambito microbiologico, il bias è definito come un errore sistematico — conscio o inconscio — introdotto durante le fasi di pianificazione, esecuzione, analisi o interpretazione di uno studio. Tale distorsione allontana i risultati dal valore reale e, a differenza degli errori casuali, agisce in modo costante, rischiando di produrre conclusioni errate come la sovrastima o la sottostima della reale carica microbica. Nel presente lavoro di tesi, la valutazione del bias per la validazione del metodo è stata condotta attraverso prove di contaminazione artificiale (spiking) su cinque differenti matrici alimentari: carne avicola, ortaggi cotti, formaggi, prodotti ittici e miscele a base d'uovo.

Il protocollo sperimentale ha previsto:

- Livelli di fortificazione: Per ciascuna matrice sono stati analizzati tre livelli di concentrazione in doppio.
- Inoculo: È stata utilizzata una concentrazione nota di un ceppo di riferimento di *Clostridium perfringens*.
- Procedura: Per garantire la coerenza del dato, le prove sono state allestite seguendo la medesima metodica impiegata nelle dieci prove indipendenti per la valutazione della ripetibilità.

Operativamente, le matrici sono state pesate e suddivise in sacchetti da stomacher, contenenti 10 g di campione e 90 mL di diluente sterile specifico. Nello specifico, è stato utilizzato il brodo Tryptone Salt (TP) per la carne avicola, gli ortaggi cotti, i prodotti ittici e le miscele d'uovo, mentre per il formaggio si è impiegata una soluzione di cloruro di sodio (SC) (Fig.17).

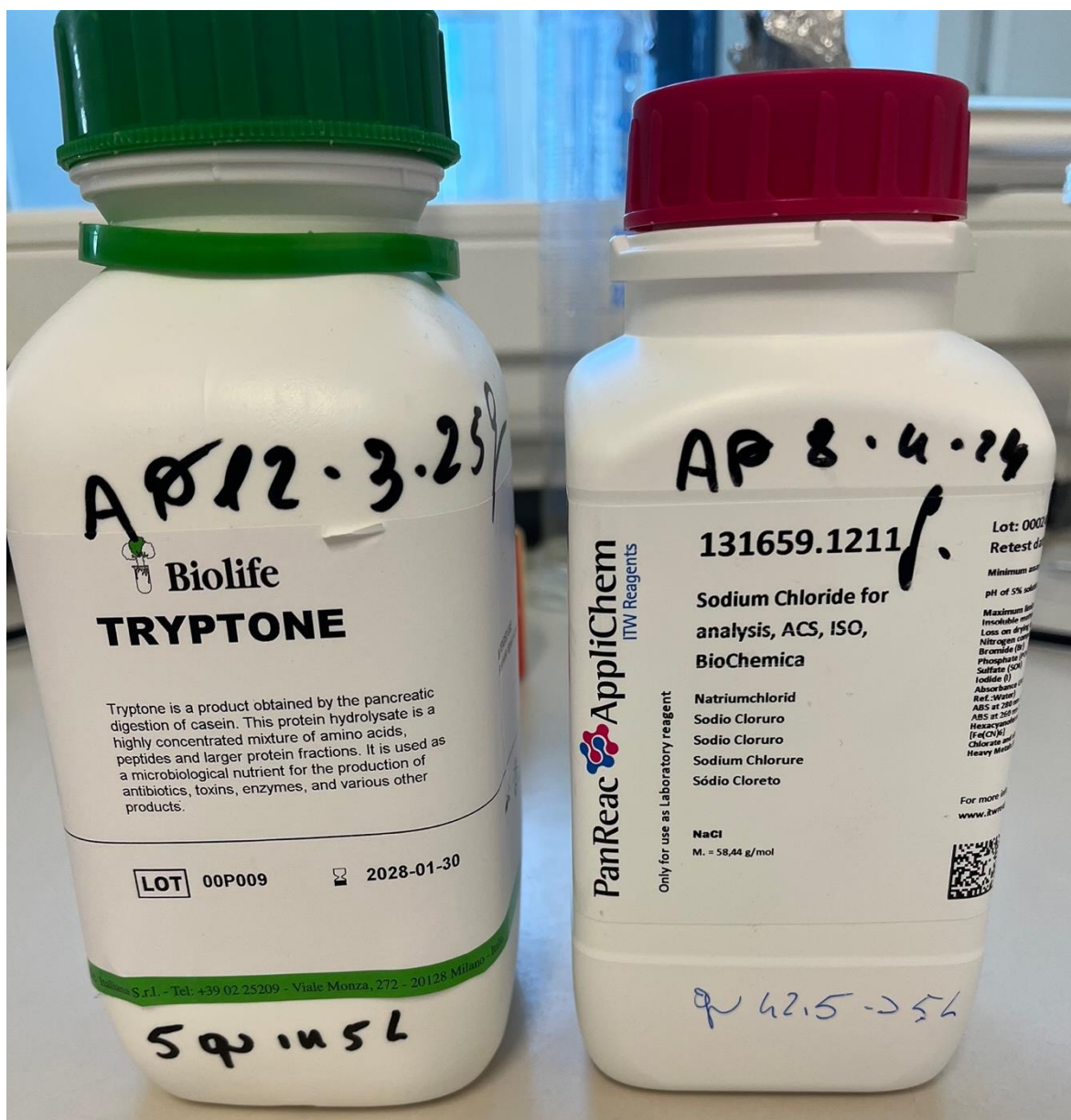


Figura 17: Brodo TP e SC utilizzati durante la validazione del metodo. Foto acquisita presso il laboratorio Artest S.r.l., Modena.

A seguito della pesata delle cinque matrici alimentari, si è proceduto alla preparazione dell'inoculo. A partire da una sospensione di *Clostridium perfringens* standardizzata a 2,0 unità McFarland, sono state allestite diluizioni decimali seriali in diluente Tryptone Salt (TP) sterile fino alla concentrazione, ritenuta idonea per le successive fasi di contaminazione

artificiale. Per la fortificazione delle matrici, dalla diluizione sono state prelevate tre diverse aliquote (600 µL, 800 µL e 1000 µL), ciascuna inocolata singolarmente nei sacchetti da stomacher contenenti le unità campionarie. Tale procedura è stata replicata per tutte le cinque matrici in esame. Al fine di garantire l'omogenea distribuzione del microrganismo, i campioni sono stati sottoposti a omogeneizzazione meccanica mediante stomacher per 2 minuti. Successivamente, da ogni sacchetto sono state allestite piastre Petri (da 90 mm e 140 mm) per ogni combinazione di matrice e livello di inoculo (Fig.18). In conformità con il protocollo di semina previsto dal metodo in validazione, sono state analizzate le diluizioni 10^{-1} e 10^{-2} (10).

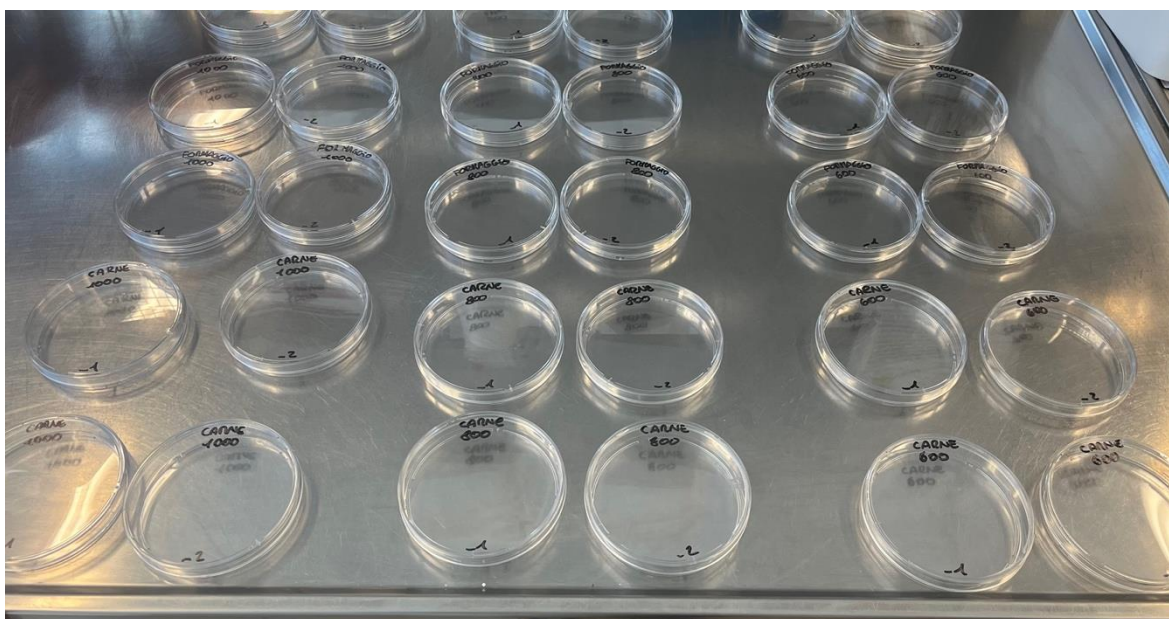


Figura 18: Piastre Petri utilizzate durante la validazione. Foto acquisita presso il laboratorio Artest S.r.l., Modena.

Dopo aver proceduto all'inoculo delle diluizioni previste, è stato versato il terreno selettivo TSC (Tryptose Sulfite Cycloserine), preventivamente addizionato con D-cicloserina. Per garantire le condizioni di selettività e favorire lo sviluppo dei microrganismi target, è stata applicata la tecnica del doppio strato (semina per inclusione seguita da uno strato di copertura).

Una volta completata la solidificazione del terreno, le piastre sono state poste in incubazione in condizioni di anaerobiosi controllata alla temperatura di 37 ± 1 °C, per la tempistica prevista dal protocollo normativo di riferimento (Fig.19) (10).

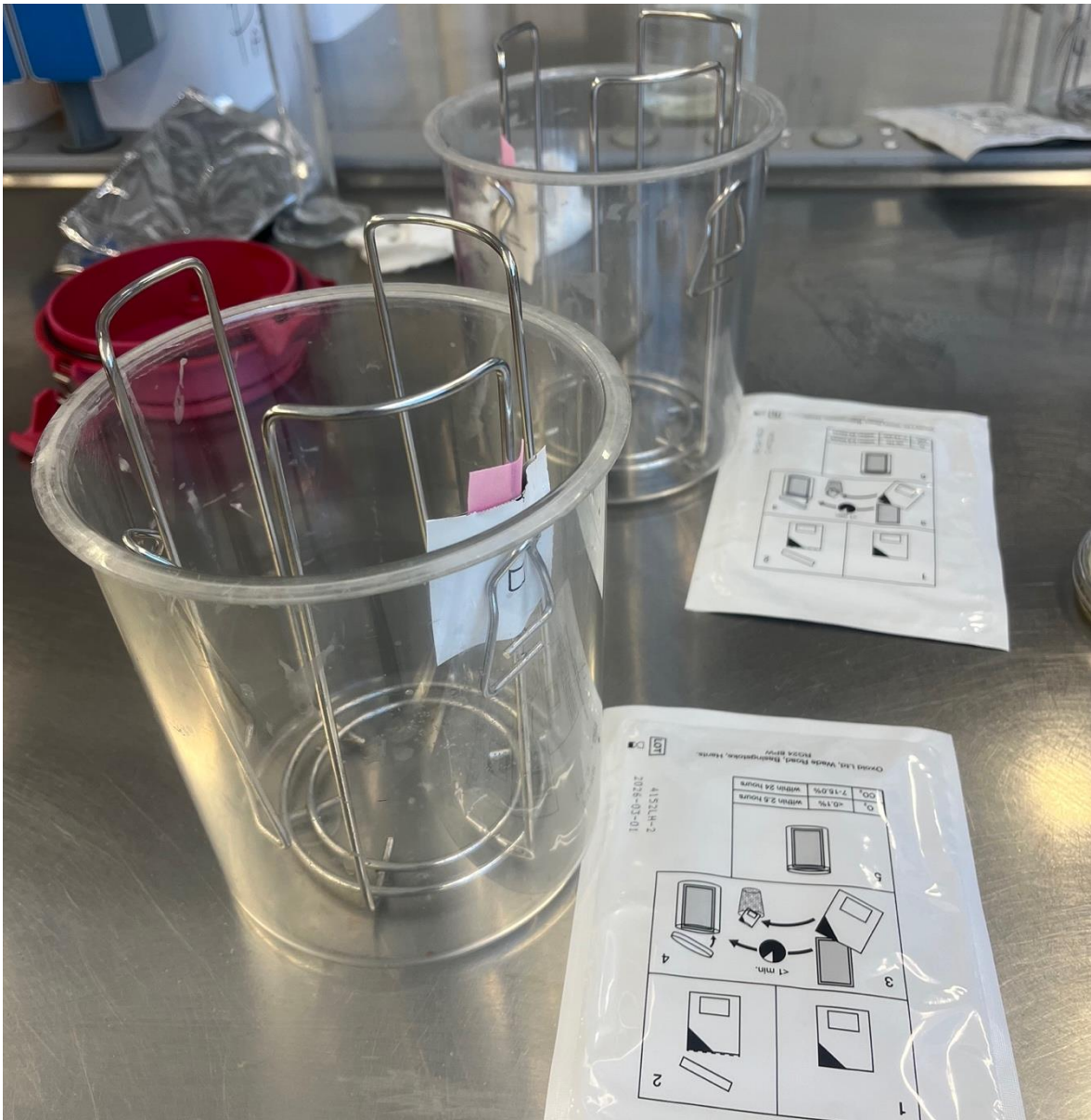


Figura 19: Giare per anaerobiosi. Foto acquisita presso il laboratorio Artest S.r.l., Modena.

Al termine del periodo di incubazione, le colonie presuntive sono state sottoposte a conferma biochimica mediante il test della fosfatasi acida, seguendo il protocollo già descritto per la valutazione della ripetibilità. L'accuratezza del metodo è stata valutata attraverso la partecipazione a un circuito interlaboratorio (Ring Test), in conformità alle procedure interne di validazione e ai criteri applicabili ai metodi normati (10). Tale confronto costituisce uno strumento essenziale per verificare la concordanza tra i risultati ottenuti dal laboratorio e i valori di riferimento assegnati, permettendo una valutazione oggettiva delle prestazioni analitiche. In attesa dello svolgimento del circuito interlaboratorio, è stata effettuata una sessione di abilitazione degli operatori. A tal fine, ogni tecnico ha eseguito una prova in

doppio su una matrice di pesce in scatola, contaminata artificialmente con il ceppo di riferimento di *C. perfringens*.

Il protocollo di abilitazione ha previsto:

- Preparazione del campione: Sono state effettuate dieci pesate indipendenti, mantenendo la medesima grammatura e il rapporto matrice/diluyente (TP) impiegati nelle fasi precedenti per garantire la coerenza metodologica.
- Inoculo e Omogeneizzazione: Ciascuna unità campionaria, trasferita in sacchetti sterili con banda filtrante, è stata contaminata con un'aliquota prelevata dalla diluizione (derivante dalla sospensione standardizzata a 2,0 McFarland). Successivamente, i campioni sono stati omogeneizzati mediante stomacher secondo le modalità già descritte.
- Analisi: Per ogni sacchetto sono state allestite due piastre Petri (90 mm e 140 mm) (Fig.20), per le diluizioni 10^{-1} e 10^{-2} , seguendo rigorosamente la procedura di semina prevista dal metodo.

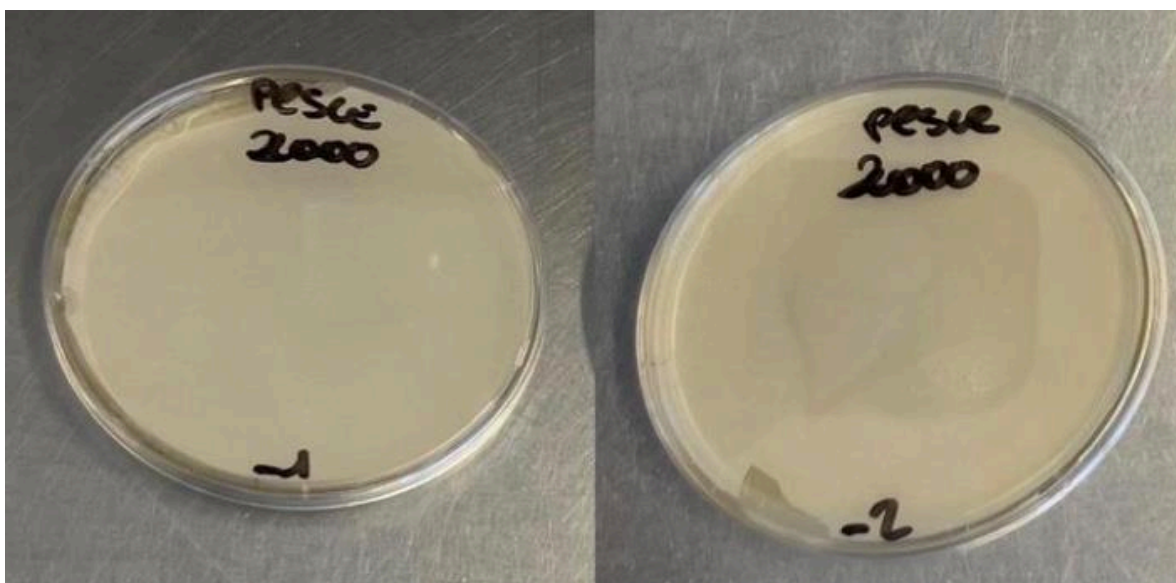


Figura 20: Piastre Petri con inoculo e TSC. Foto acquisita presso il laboratorio Artest S.r.l., Modena.

Le piastre sono state allestite mediante inclusione nel terreno TSC addizionato con D-cicloserina, adottando la tecnica del doppio strato, per assicurare le necessarie condizioni di selettività. Successivamente, i campioni sono stati posti in incubazione in anaerobiosi controllata, attenendosi rigorosamente ai parametri di tempo e temperatura specificati dal metodo UNI EN ISO 15213-2:2023. Al termine del periodo di incubazione, le colonie presuntive sviluppatesi sono state sottoposte a conferma definitiva mediante il test della fosfatasi acida, al fine di accertarne l'appartenenza alla specie *C. perfringens*.

3.3.3–Selettività del metodo

La selettività del metodo, ovvero la capacità di favorire lo sviluppo del microrganismo target inibendo al contempo la flora batterica di accompagnamento (non-target), è stata garantita dall'impiego del terreno TSC (Tryptose Sulfite Cycloserine) (Fig.21) (10). Tale substrato è specificamente formulato per la ricerca e l'enumerazione dei batteri anaerobi solfito-riduttori nelle matrici alimentari e ambientali. L'azione selettiva del terreno è dovuta all'aggiunta della

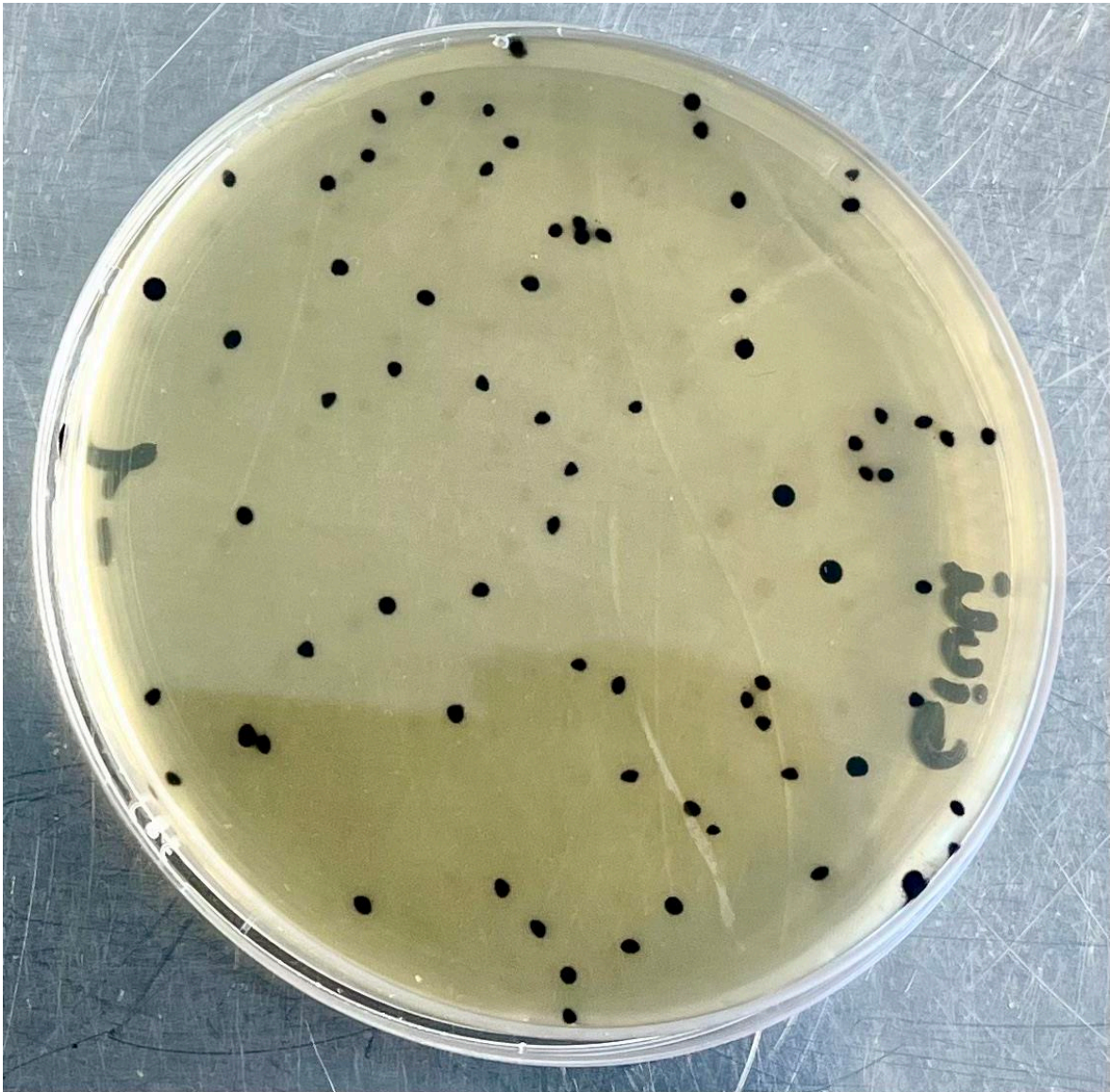


Figura 21: Piastre Petri con colonie presuntive di *C. perfringens* e TSC. Foto acquisita presso il laboratorio Artest S.r.l., Modena.

D-cicloserina, un antibiotico che inibisce la crescita dei microrganismi interferenti e limita il diametro delle colonie, agevolando così il conteggio e l'identificazione di *C. perfringens*. Il principio analitico del terreno TSC si fonda sulla capacità di *C. perfringens* di ridurre i solfiti a solfuri (10). Tale reazione biochimica viene evidenziata nel terreno dalla presenza

di citrato ferrico: i solfuri prodotti reagiscono con il ferro, portando alla formazione di un precipitato di solfuro di ferro di colore nero (10). Le colonie tipiche di anaerobi solfito-riduttori appaiono pertanto di colore nero, generalmente circondate da un alone scuro. Ai fini dell'accuratezza del dato analitico, sono state selezionate per il conteggio esclusivamente le piastre che presentavano colonie ben distanziate tra loro, al fine di evitare fenomeni di confluenza che potrebbero compromettere l'identificazione delle caratteristiche morfologiche e la corretta quantificazione.

Capitolo 4. RISULTATI

4.1–Limite di rivelabilità (LOD)

Il limite di rilevabilità, comunemente indicato con l'acronimo LOD (Limit of Detection) (16), rappresenta la minima concentrazione di analita in un campione che può essere rilevata con un intervallo di confidenza statistica accettabile, pur non essendo necessariamente quantificata come valore esatto (14). Tale parametro esprime la sensibilità analitica del metodo e, in termini statistici, viene spesso definito come un valore pari a tre volte la deviazione standard del bianco. Nel presente studio di validazione, condotto in conformità alla norma UNI EN ISO 15213-2:2023 (10), il valore del LOD non è stato ricavato da prove sperimentali dirette, bensì è stato adottato il parametro teorico normativo. Tale scelta metodologica è supportata dalle linee guida della norma UNI EN ISO 7218 (9), la quale definisce le prestazioni minime attese per i metodi microbiologici normati. Poiché il metodo oggetto di tesi segue un protocollo standardizzato i cui limiti di performance sono già stati ampiamente caratterizzati e validati a livello internazionale, il LOD viene indicato come valore nominale di riferimento previsto dalla norma stessa (10).

4.2–Limite di quantificazione (LOQ)

Il limite di quantificazione o limite di rivelabilità quantitativo (Limit of Quantification) da cui la sigla LOQ, è il limite di concentrazione fino al quale è possibile ottenere strumentalmente una misura di tipo quantitativo con relativa incertezza (5% o 1%). È più alto del LOD, il quale indica invece la minima concentrazione alla quale è possibile condurre un'analisi qualitativa volta alla determinazione o meno della presenza di un determinato analita (15-16). Lo svolgimento della validazione del metodo UNI EN ISO 15213:2-2023 (10) si basa sul metodo quantitativo diretto, espresso in UFC/g, in cui si effettua un'enumerazione direttamente su piastra e non attraverso una metodica strumentale. Per questa motivazione il limite LOQ non è stato calcolato (Tabella 1).

PARAMETRO	VALORE TARGET	VALORE OTTENUTO
SELETTIVITÀ	NA	NA
LOQ	NA	NA
LOD	Valore target da norma UNI EN ISO 7218	Valore e unità di misura
CAMPO DI APPLICAZIONE	Alimenti: <1 ufc/ml – <10 ufc/g (ISO 7218)	Alimenti: <1 ufc/ml – <10 ufc/g
LIMITE DI RIPETIBILITÀ	Esito positivo del test F di Fisher (confronto tra lo scarto tipo del metodo con lo scarto tipo del metodo di riferimento). Il laboratorio ha confrontato lo scarto tipo calcolato con quello riportato dalla norma per prodotti a base di carne livello basso (sr = 0,100).	sr = 0,0884 (log ₁₀) – Alimenti. Risultato del test F conforme.

Tabella 1: Sintesi dei parametri di validazione e verifica del metodo UNI EN ISO 15213-2:2023, con indicazione dei valori target di riferimento e dei risultati sperimentali ottenuti.

4.3–Ripetibilità del metodo

La ripetibilità è stata valutata sulla base di dieci determinazioni indipendenti, effettuate in condizioni operative comparabili ed eseguite ciascuna da due operatori, in conformità alla ISO 19036 (12). Dall’elaborazione statistica dei risultati ottenuti è stato calcolato lo scarto tipo di riproducibilità intralaboratorio (SIR), risultato pari a: 0,0884 log₁₀, valore inferiore al limite di riferimento fissato per la matrice in esame (0,100 log₁₀). L’analisi statistica condotta mediante il test F di Fisher ha confermato la conformità del metodo rispetto ai criteri di accettabilità stabiliti. I risultati ottenuti attestano l’elevata precisione del metodo nelle condizioni operative adottate dal laboratorio (Tabella 2) (Tabella 3).

Numero ripetizioni	Conteggio in piastra 1° diluizione	Conteggio in piastra 2° diluizione	Valore ufc/g-ml	Valore Log10 ufc/g-ml
1	37	2	355	2,55
2	40	2	382	2,58
3	56	7	573	2,76
4	47	9	509	2,71
5	60	4	582	2,76
6	52	3	500	2,70
7	47	4	464	2,67
8	56	8	582	2,76
9	37	6	391	2,59
10	34	5	355	2,55
Fattore di diluizione	10	100	-	-
Media	46,60	5,0	469,1	2,66
Scarto di Ripetibilità Sr	9,26	2,4	93,5	0,0884

Calcolo eseguito utilizzando la seguente formula	$S_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$			
Ripetibilità r	26,94	7,84	299,26	0,2827
Calcolo eseguito utilizzando la seguente formula	$r = \sqrt{2} \times t \times S_r$			

Tabella 2: La tabella riporta i risultati delle dieci prove indipendenti effettuate per la valutazione della ripetibilità del metodo, con i relativi valori in UFC/g e in scala log₁₀. I dati sono stati elaborati a partire dai fogli di calcolo utilizzati in laboratorio per l'elaborazione statistica delle prove. Il valore di scarto tipo ($S_r=0,0884 \log_{10}$) e il limite di ripetibilità ($r=0,2827 \log_{10}$), calcolati secondo ISO 19036.

Parametro	Valore
Scarto tipo di ripetibilità S_r (sessione analitica)	0,0884
Scarto tipo di ripetibilità σ_r (valore di riferimento normativo)	0,1000
Rapporto S_r / σ_r	0,8840
Gradi di libertà ($\nu = n - 1$)	9
Limite inferiore accettabilità ($p = 0,025$)	0,548
Limite superiore accettabilità ($p = 0,975$)	1,454
Intervallo di accettabilità	$0,548 \leq S_r/\sigma_r \leq 1,454$
Esito finale	ACCETTABILE

Tabella 3: Verifica della conformità della ripetibilità mediante confronto tra scarto tipo calcolato e valore di riferimento normativo (test F di Fisher, ISO 19036).

4.4–Bias del metodo

La bias, intesa come espressione dell'errore sistematico, è stata valutata per verificare l'eventuale scostamento tra il valore teorico atteso e il valore determinato sperimentalmente applicando il metodo UNI EN ISO 15213-2:2023 (10). In ambito microbiologico, la bias permette di identificare fenomeni di sovrastima o sottostima, quantificando la differenza tra la concentrazione reale del microrganismo e il dato analitico ottenuto (12). La valutazione è stata condotta attraverso prove di contaminazione artificiale su differenti matrici alimentari, inoculate con concentrazioni note di un ceppo di riferimento di *Clostridium perfringens*. Il protocollo ha previsto l'analisi di tre livelli di contaminazione per matrice (basso, medio, alto), eseguiti in doppio. Per l'elaborazione dei dati, è stata calcolata la media dei conteggi per ciascun livello, successivamente trasformata in scala logaritmica (12). Il valore della bias è stato determinato come differenza tra il logaritmo della concentrazione ottenuta e il logaritmo del valore teorico di inoculo (12): In conformità alla procedura interna di

validazione, il criterio di accettabilità fissato prevede che lo scostamento assoluto sia inferiore a 0,5 (12). Per tutte le matrici e per tutti i livelli analizzati, la differenza tra valore atteso e valore ottenuto in logaritmo è risultata inferiore a 0,5 rispettando il criterio di accettabilità stabilito.

4.5–Accuratezza del metodo

L'accuratezza è stata valutata mediante la partecipazione a un circuito interlaboratorio (Ring Test) (13). Parallelamente, al fine di garantire il mantenimento delle prestazioni analitiche, è stato avviato un iter di abilitazione degli operatori. Ogni tecnico ha eseguito una prova in doppio su una matrice di pesce in scatola, contaminata artificialmente con un titolo noto di *C. perfringens*. Il criterio di accettabilità è stato definito sulla base dell'intervallo di confidenza calcolato sul titolo del ceppo di riferimento (13). Contestualmente, è stata verificata la ripetibilità individuale dei singoli operatori, confrontandola con i valori ottenuti durante la fase di validazione del metodo (10). Tutti gli operatori coinvolti hanno ottenuto risultati rientranti nei limiti di accettabilità previsti, confermando l'adeguatezza delle competenze tecniche e la robustezza del metodo applicato.

4.6–Incertezza di misura

L'incertezza di misura è stata stimata secondo approccio top-down, in conformità alla ISO 19036 (12). L'incertezza combinata è stata calcolata considerando le seguenti componenti:

1. U_{tech} , associata alla variabilità tecnica del metodo (stimata attraverso il SIR);
2. U_{matrix} , associata alla variabilità dalle differenti matrici alimentari;
3. U_{conf} , associata alla fase di conferma biochimica.

L'incertezza estesa è stata ottenuta applicando un fattore di copertura: $k = 2$, corrispondente a un livello di confidenza del 95%. L'incertezza estesa risultante è pari a: $U = 0,0453599$ \log_{10} . Il valore ottenuto è coerente con il campo di applicazione del metodo e con i requisiti di precisione richiesti per analisi microbiologiche quantitative su matrici alimentari.

CONCLUSIONI

Il presente lavoro di tesi ha avuto come obiettivo la validazione applicativa del metodo UNI EN ISO 15213-2:2023 (10) per l'enumerazione dei batteri anaerobi solfito-riduttori, con particolare riferimento a *Clostridium perfringens*, nell'ambito dell'analisi microbiologica di matrici alimentari destinate al consumo umano. L'attività sperimentale è stata condotta secondo un approccio finalizzato a verificare l'idoneità del metodo, nelle condizioni operative del laboratorio, attraverso la valutazione dei principali parametri prestazionali: ripetibilità, bias, accuratezza e incertezza di misura. La ripetibilità del metodo è risultata conforme ai criteri di accettabilità previsti, evidenziando una variabilità contenuta tra le prove indipendenti eseguite (10). Tale risultato conferma la stabilità del metodo nelle condizioni operative adottate e la sua capacità di fornire dati coerenti nel tempo. La valutazione della bias, condotta mediante prove di contaminazione artificiale su differenti matrici alimentari, ha dimostrato uno scostamento sistematico contenuto rispetto ai valori teorici di inoculo, rientrante nei limiti di accettabilità stabiliti. L'accuratezza del metodo, verificata attraverso la partecipazione a circuito interlaboratorio e mediante prove interne di abilitazione degli operatori, ha evidenziato la concordanza dei risultati ottenuti con i valori di riferimento assegnati, attestando l'affidabilità complessiva del sistema analitico e la competenza tecnica del personale coinvolto. La stima dell'incertezza di misura, effettuata secondo approccio top-down ha consentito di quantificare l'intervallo di confidenza associato al risultato analitico, in conformità alle indicazioni della norma ISO 19036 (12). Nel complesso, i risultati ottenuti confermano che il metodo UNI EN ISO 15213-2:2023 (10) risulta idoneo all'uso previsto nel contesto analitico considerato, dimostrandosi uno strumento affidabile per il controllo microbiologico degli alimenti e per la valutazione dell'igiene di processo.

BIBLIOGRAFIA

References

1. Whitman WB, Rainey FA, Kämpfer P, Trujillo ME, Chun J, DeVos P, et al., editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Volume 3: The Firmicutes*. 2nd ed. New York: Springer; 2009.
2. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. *Medical Microbiology*. 9th ed. Philadelphia: Elsevier; 2020.
3. Petit L, Gibert M, Popoff MR. *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype. *Trends Microbiol.* 1999;7(3):104–110.
4. Sakurai J, Nagahama M, Oda M. *Clostridium perfringens* alpha-toxin: characterization and mode of action. *J Biochem.* 2004;136(5):569–574.
5. Jay JM, Loessner MJ, Golden DA. *Modern Food Microbiology*. 7th ed. New York: Springer; 2005.
6. International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). *Microorganisms in Foods 7: Microbiological Testing in Food Safety Management*. New York: Springer; 2002.
7. Codex Alimentarius Commission. *General Principles of Food Hygiene (CXC 1-1969)*. Rome: FAO/WHO; latest revision.
8. Parlamento Europeo e Consiglio dell'Unione Europea. Regolamento (CE) n. 853/2004 del 29 aprile 2004 sull'igiene dei prodotti alimentari. *Gazzetta Ufficiale dell'Unione Europea*; 2004.
9. International Organization for Standardization (ISO). *ISO 7218:2017. Microbiology of the food chain — General requirements and guidance for microbiological examinations*. Geneva: ISO; 2017.
10. International Organization for Standardization (ISO). *ISO 15213-2:2023. Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of Clostridium spp. — Part 2: Enumeration of Clostridium perfringens*. Geneva: ISO; 2023.

11. International Organization for Standardization (ISO). ISO 7937:2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of *Clostridium perfringens* — Colony-count technique. Geneva: ISO; 2004.
12. International Organization for Standardization (ISO). ISO 19036:2019. Microbiology of the food chain — Estimation of measurement uncertainty for quantitative determinations. Geneva: ISO; 2019.
13. International Organization for Standardization (ISO). ISO 16140-3:2021. Microbiology of the food chain — Method validation — Part 3: Protocol for the verification of reference and validated alternative methods implemented in a single laboratory. Geneva: ISO; 2021.
14. EFSA (European Food Safety Authority). Limit of detection (LOD) [Internet]. Parma: EFSA; [cited 2026 Mar 4]. Available from: <https://www.efsa.europa.eu/en/glossary/lod>.
15. Wikipedia contributors. Limite di quantificazione. Wikipedia, The Free Encyclopedia [Internet]. Available from: https://it.wikipedia.org/wiki/Limite_di_quantificazione (accessed 4 Mar 2026).
16. Wikipedia contributors. Limite di rivelabilità. Wikipedia, The Free Encyclopedia [Internet]. Available from: https://it.wikipedia.org/wiki/Limite_di_rivelabilit%C3%A0 (accessed 4 Mar 2026).
17. Petit L., Gibert M., Popoff M.R. (1999) *Clostridium perfringens*: toxinotype and genotype Trends Microbiol. 7:104–10.
18. Marks S.L., Kather E.J., Kass P.H., Melli A.C. (2002) Genotypic and phenotypic characterization of *Clostridium perfringens* and *Clostridium difficile* in diarrheic and healthy dogs. J. Vet. Intern. Med. 16:533–40.
19. Navarro MA, McClane BA, Uzal FA. Mechanisms of Action and Cell Death Associated with *Clostridium perfringens* Toxins. Toxins (Basel). 2018 May 22;10(5).
20. T. Grenda, A. Jarosz, M. Sapała, A. Grenda, E. Patyra, K. Kwiatek *Clostridium perfringens* - opportunistic foodborne pathogen, its diversity and epidemiological significance Pathogens, 12 (2023).

21. H.R. Stämpfli, O.J. Oliver-Espinosa-Enterotoxemias in animals (Clostridium perfringens infections) MSD Veterinary Manual (2022).
22. ShresthaUN, Mehdizadeh GohariIO, LiJ, NavarroM, UzalFUN, McClaneBUN.2024. Biologia e patogenicità del Clostridium perfringens tipo F: un comune enteropatogeno umano con un nome nuovo. Microbiol Mol Biol Rev 88:e00140-23.<https://doi.org/10.1128/membr.00140-23>.
23. Pawaiya, Rajveer & Kumaresan, Gururaj & Gangwar, Neeraj & Singh, D.D. & Kumar, Rahul & Kumar, Ashok Kumar & Gururaj, S & Gangwar, K & Singh, N & Kumar, R & Pawaiya, R. (2020).
24. The Challenges of Diagnosis and Control of Enterotoxaemia Caused by Clostridium perfringens in Small Ruminants Open Access. Advances in Microbiology. 10. 238-273. [10.4236/aim.2020.105019](https://doi.org/10.4236/aim.2020.105019).
25. Raza, A., Sumaira Goshi, Khan, A., Mahmood, S., Goshi, S., Khalid, R., Ijaz, M., Shaheen, M., Noor, A., Bano, S., Asghar, S., Afzal, T. e Akbar, Z. (2024) "Mechanisms of Action of Toxins Released by Clostridium perfringens", BioScientific Review , 6(1), pp. 16-33. doi: 10.32350/BSR.61.i.