



RAPPORTI ISTISAN 26|25

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

Botulismo: nuove sfide per contrastare un rischio antico in un sistema alimentare moderno

A cura di
F. Anniballi, C. Scalfaro, S. Taglieri, T. Vicenza



EPIDEMIOLOGIA
E SANITÀ PUBBLICA

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**Botulismo: nuove sfide per contrastare
un rischio antico in un sistema alimentare moderno**

A cura di
Fabrizio Anniballi, Concetta Scalfaro, Silvia Taglieri, Teresa Vicenza
Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria

ISSN: 1123-3117 (cartaceo) • 2384-8936 (online)

Rapporti ISTISAN
26/25

Istituto Superiore di Sanità

Botulismo: nuove sfide per contrastare un rischio antico in un sistema alimentare moderno.

A cura di Fabrizio Anniballi, Concetta Scalfaro, Silvia Taglieri, Teresa Vicenza
2026, 58 p. Rapporti ISTISAN 26/25

Il botulismo è una delle patologie a più alto impatto sia sull'opinione pubblica sia sulle autorità sanitarie. Nonostante ciò, a livello europeo gli agenti microbici responsabili della malattia non sono contemplati dal Regolamento (CE) 2073/2005. Le linee guida nazionali per il controllo ufficiale degli alimenti attualmente in vigore riportano, tuttavia, le metodiche analitiche e le tipologie di alimenti da sottoporre ad analisi. Con l'introduzione del Piano Nazionale per il controllo ufficiale degli alimenti, non sarà più necessario effettuare analisi per la determinazione dei clostridi produttori di tossine botuliniche e delle tossine botuliniche: le autorità competenti potranno formulare il giudizio di conformità delle conserve alimentari sulla base dei loro parametri chimico-fisici. Per le semiconserve e i REPFED (*Refrigerated Processed Foods of Extended Durability*), i produttori dovranno dimostrare che il processo produttivo, in combinazione con le condizioni di conservazione, non favorisca lo sviluppo e la tossinogenesi dei clostridi produttori di tossine botuliniche.

Parole chiave: Botulismo alimentare; Prevenzione; Controllo; *Microbial challenge test*; Controllo ufficiale degli alimenti

Istituto Superiore di Sanità

Botulism: new challenges in countering an ancient risk in a modern food system.

Edited by Fabrizio Anniballi, Concetta Scalfaro, Silvia Taglieri, Teresa Vicenza
2026, 58 p. Rapporti ISTISAN 25/25 (in Italian)

Botulism is one of the foodborne diseases with the greatest impact on public opinion and on health authorities. Nevertheless, at the European level, the microbial agents responsible for the disease are not covered by Regulation (EC) No 2073/2005. However, the national guidelines currently in force for official food control do include the analytical methods and the categories of food to be tested. With the introduction of the National Plan for Official Food Control, it will no longer be necessary to perform analyses to detect botulinum toxin-producing clostridia or botulinum toxins: competent authorities will be able to assess the compliance of canned foods on the basis of their physicochemical parameters. For semi-preserved foods and REPFEDs (*Refrigerated Processed Foods of Extended Durability*), producers will be required to demonstrate that the production process, in combination with the storage conditions, does not support the growth or toxinogenesis of botulinum toxin-producing clostridia.

Key words: Foodborne botulism; Prevention; Control; *Microbial challenge test*; Official control of food

Per informazioni su questo documento scrivere a: fabrizio.anniballi@iss.it

Il rapporto è accessibile online dal sito di questo Istituto: www.iss.it

Citare questo documento come segue:

Anniballi F, Scalfaro C, Taglieri S, Vicenza T (Ed.). *Botulismo: nuove sfide per contrastare un rischio antico in un sistema alimentare moderno*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2026. (Rapporti ISTISAN 26/25).

Legale rappresentante dell'Istituto Superiore di Sanità: *Rocco Bellantone*

Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 114 (cartaceo) e n. 115 (online) del 16 maggio 2014

Direttore responsabile della serie: *Antonio Mistretta*

Coordinamento redazionale: *Sandra Salinetti*. Redazione: *Sandra Salinetti, Annalisa D'Angelo*

La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori, che dichiarano di non avere conflitti di interesse.



INDICE

Clostridi produttori di tossine botuliniche e botulismo alimentare

Silvia Taglieri, Teresa Vicenza, Fabrizio Anniballi, Concetta Scalfaro 1

Strategia nazionale di controllo microbiologico degli alimenti

Eleonora Chelli, Rita Marcianò 11

Strategie nazionali di controllo dei clostridi produttori di tossine botuliniche e delle tossine botuliniche negli alimenti

Concetta Scalfaro, Silvia Taglieri, Teresa Vicenza, Fabrizio Anniballi 15

Metodi analitici per la determinazione di pH, a_w e stabilità delle conserve

Yolande Thérèse Rose Proroga, Francesca Garofalo 29

Challenge test per *Listeria monocytogenes* negli alimenti ready-to-eat

Angelo Cerrella, Maria Luisa Danzetta, Ercole Del Nigro, Francesco Pomilio, Marina Torresi 40

Progettazione e conduzione di challenge test per *Clostridium botulinum*

Teresa Vicenza, Concetta Scalfaro, Silvia Taglieri, Fabrizio Anniballi 50

CLOSTRIDI PRODUTTORI DI TOSSINE BOTULINICHE E BOTULISMO ALIMENTARE

Silvia Taglieri, Teresa Vicenza, Fabrizio Anniballi, Concetta Scalfaro

Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Clostridi produttori di tossine botuliniche

I clostridi produttori di tossine botuliniche (*Botulinum NeuroToxins*, BoNT) sono un gruppo eterogeneo di batteri anaerobi, sporigeni e Gram-positivi, capaci di produrre le BoNT. Sono annoverati tra i clostridi produttori di BoNT le seguenti specie microbiche:

- *Clostridium botulinum*;
- *Clostridium baratii*;
- *Clostridium butyricum*;
- *Clostridium argentinense*;
- *Clostridium sporogenes*.

Sulla base delle loro caratteristiche fenotipiche, genotipiche e metaboliche, questi microrganismi possono essere suddivisi in 6 gruppi. Per ciascuno dei gruppi sopra indicati è stato individuato anche un microrganismo non tossigeno.

I microrganismi appartenenti al gruppo I sono i ceppi di *C. botulinum* proteolitici, mesofili, con una temperatura di crescita ottimale di 37°C e una temperatura minima di crescita di 10°C. Tali ceppi non sono capaci di svilupparsi in ambienti acidi con pH minore di 4,6 e a concentrazioni di NaCl pari o superiori al 10% (*water activity* 0,93). Le spore di questi microrganismi sono altamente resistenti al calore e sono considerate il microrganismo target per la sterilizzazione commerciale delle conserve alimentari poco acide. Per garantire la sicurezza delle conserve poco acide, è necessario infatti raggiungere una temperatura di 121°C per almeno 3 minuti ($F_0 = 3$ min), riducendo il numero di spore di un fattore 10^{12} o 12D. I microrganismi appartenenti a questo gruppo metabolico possono produrre le BoNT di tipo A, B, F, X e H. Appartengono al gruppo I anche i ceppi di *C. sporogenes* capaci di produrre le tossine botuliniche di tipo B. Questi ultimi hanno caratteristiche fenotipiche molto simili a quelle dei ceppi di *C. botulinum* con metabolismo proteolitico, ma presentano una resistenza termica notevolmente maggiore. I ceppi saprofitici di *C. sporogenes* rappresentano la specie non tossica di microrganismi associati al gruppo I (1).

I microrganismi appartenenti al gruppo II sono i ceppi di *C. botulinum* non proteolitici, psicrotrofi e capaci di fermentare diversi zuccheri semplici. La loro temperatura ottimale di crescita è di 25°C; quella minima è di 3°C. I ceppi non proteolitici possono svilupparsi e produrre tossine anche in ambienti acidi con pH maggiore di 5,0 e in presenza di concentrazioni di NaCl maggiori del 5% (*water activity* 0,96). La resistenza termica delle spore di questi microrganismi è inferiore rispetto a quella dei ceppi del gruppo I e sono considerati i microrganismi target dei processi di pastorizzazione (trattamenti termici a 90°C per 10 minuti o trattamenti equivalenti, processi 6D). I microrganismi appartenenti a questo gruppo metabolico possono produrre le BoNT di tipo B, E e F (1).

I microrganismi del gruppo III sono principalmente coinvolti nel botulismo animale. Producono le BoNT di tipo C e D e le loro varianti mosaico C/D e D/C. Tali microrganismi presentano caratteristiche fenotipiche e metaboliche intermedie rispetto ai gruppi precedenti. La

loro temperatura ottimale di crescita è compresa tra 37°C e 40°C. I ceppi produttori di tossine di tipo D sono capaci di svilupparsi su substrati di carcasse animali fino a 9°C, mentre quelli produttori di tossine di tipo C non si sviluppano a temperature inferiori a 16°C. Il pH ottimale per lo sviluppo è 7,4. I microrganismi non tossigeni di riferimento per questo gruppo metabolico sono *Clostridium novyi* e *Clostridium subterminale* (1).

Il gruppo IV è costituito dai ceppi di *C. botulinum* di tipo G, tassonomicamente noti anche come *C. argentinense*. I ceppi appartenenti a questo gruppo metabolico sono proteolitici e asaccarolitici. Questi microrganismi, solo in un caso, sono stati associati al botulismo. Generalmente sono stati isolati dal suolo e da cadaveri (1).

Il gruppo V è costituito dai ceppi di *C. baratii* produttori di BoNT tipo F. I ceppi saprofitici di *C. baratii* sono mesofili, con un optimum di crescita nel range 30-45°C e una temperatura minima di 10-15°C. I ceppi possono svilupparsi in ambienti acidi con pH superiore a 3,7 e concentrazioni di NaCl dell'ordine del 6,5% (1).

Il gruppo VI è costituito dai ceppi di *C. butyricum* produttori di BoNT tipo E. I ceppi neurotossigeni di *C. butyricum* sono mesofili con temperatura ottimale di crescita a 30°C e temperatura minima di 12°C. Questi ceppi non sono in grado di svilupparsi in ambienti acidi con pH inferiore a 4,8 e con concentrazioni di NaCl superiori al 5,0% (1).

I clostridi produttori di BoNT sono microrganismi ambientali e sono frequentemente isolati dalla polvere, dal suolo, dai sedimenti marini e lacustri, dall'acqua, dai vegetali e dagli animali. La loro prevalenza nell'ambiente e negli alimenti è stata valutata nel corso del tempo in diversi studi. Nel suolo, che rappresenta la matrice ambientale più studiata, e, di conseguenza, nelle materie prime utilizzate per la produzione degli alimenti, si riscontrano solitamente poche decine di spore per chilogrammo. Tuttavia, la maggior parte dei dati di letteratura sulla prevalenza dei clostridi produttori di BoNT (soprattutto *C. botulinum*) nell'ambiente risale agli anni Settanta del secolo scorso e proviene da metodiche analitiche non standardizzate, che spesso li rende non paragonabili (2).

I clostridi produttori di BoNT, in particolare *C. botulinum*, giocano un ruolo di vitale importanza nel ciclo del carbonio, sviluppandosi sul materiale organico in decomposizione e ivi producendo elevati quantitativi di BoNT. Il loro sviluppo ottimale richiede ingenti quantità di fonti proteiche (come le carcasse animali), poiché *C. botulinum* non è in grado di sintetizzare autonomamente tutti gli amminoacidi essenziali. In natura, si trovano principalmente sotto forma di spore, che ne consentono la sopravvivenza per lunghissimi periodi anche in condizioni sfavorevoli (come l'esposizione all'ossigeno, bassi livelli di umidità, temperature elevate e carenza di nutrienti). A causa della loro ubiquità, le spore possono contaminare gli alimenti e le ferite, raggiungendo il tratto intestinale dell'uomo e degli animali. Ciò nonostante, affinché si verifichi un caso di botulismo, le spore devono trovarsi in condizioni tali da poter germinare, svilupparsi e produrre le BoNT. Anche se la corretta applicazione delle buone prassi igieniche nella fabbricazione degli alimenti consente una considerevole riduzione del livello di contaminazione delle materie prime, la presenza dei clostridi produttori di tossine non può essere eliminata del tutto. Ne consegue che il rischio botulismo può essere contenuto soltanto mediante distruzione delle spore eventualmente presenti sulle materie prime oppure mediante l'applicazione di tutte quelle misure capaci di impedire la germinazione delle spore e la conseguente tossinogenesi (2).

Nell'ambiente i clostridi produttori di BoNT sono presenti principalmente sotto forma di spore. Negli alimenti sottoposti a blandi trattamenti termici o a pastorizzazione, le uniche forme microbiche riscontrabili sono le spore, poiché in questo stadio il microrganismo è molto più resistente agli stress ambientali, al calore, alla pressione, all'essiccamento e alla luce UV rispetto alle cellule vegetative. Il passaggio da spora a cellula vegetativa, denominato germinazione, è un processo che comporta, per il microrganismo, la perdita delle caratteristiche di resistenza proprie

dello stato sporale. Questo processo coinvolge una cascata di cambiamenti della membrana e l'attività di enzimi prodotti durante la sporulazione. La germinazione non richiede la sintesi di nuove macromolecole e si attiva in risposta a una serie di stimoli nutritivi, non nutritivi, enzimatici e fisici. I nutrienti germinativi penetrano nella parte esterna della spora e attivano i recettori di germinazione situati sulla membrana interna, innescando un processo irreversibile nel microrganismo. Questo porta alla perdita di ioni potassio, sodio e protoni, seguita dalla perdita di ioni calcio e acido dipicolinico dal nucleo della spora, con conseguente perdita di resistenza. Infine, avviene l'idrolisi del peptidoglicano della corteccia della spora con conseguente idratazione e rigonfiamento del nucleo della spora. Questo processo crea le condizioni tipiche delle cellule vegetative, consentendo la ripresa dell'attività enzimatica, del metabolismo e della sintesi di macromolecole. La sostanza con attività germinante più efficace è la L-alanina o l'associazione L-alanina/L-lattato per i ceppi di *C. botulinum* proteolitico, e il L-lattato in combinazione con L-alanina, L-serina o L-cisteina per i ceppi di *C. botulinum* non proteolitico; tuttavia, la risposta a questi stimoli è ceppo-dipendente. L'attivazione della germinazione mediante shock termico subletale aumenta la velocità e l'estensione della germinazione, probabilmente a causa di cambiamenti conformazionali del recettore, che diventa più reattivo ai germinanti. Il processo di germinazione della spora può essere disgiunto dall'*outgrowth*. Per esempio, l'intervallo di temperatura e di pH in cui avviene la germinazione di *C. botulinum* è più ampio di quello in cui può avvenire la sua moltiplicazione vegetativa. La germinazione è anche meno suscettibile all'azione dell'ossigeno rispetto all'*outgrowth*. Le spore di *C. botulinum* possono germinare sia in condizioni aerobiche sia in quelle anaerobiche, indipendentemente dal potenziale redox. Dai dati della letteratura emerge che, in una popolazione sporale, esiste una notevole variabilità nei tempi di germinazione e di sviluppo vegetativo. Infatti, non è detto che la spora che germina per prima sia quella che produce per prima due cellule figlie. Questo accade perché la germinazione è essenzialmente un processo di degradazione che non genera nuove macromolecole; invece, lo sviluppo vegetativo richiede la sintesi di nuove macromolecole, conseguente all'attivazione di molteplici cascate enzimatiche (1).

Lo sviluppo microbico dei clostridi produttori di BoNT, così come la germinazione delle spore, è negativamente influenzato dall'acidità del mezzo. L'effetto inibente dell'acidità dipende non solo dal pH finale, ma anche dalla concentrazione, dalle proprietà fisiche (es. grado di dissociazione) dell'acido, nonché dal peso molecolare e dal numero di gruppi carbonilici dell'acido. Il tipo di acido può influenzare l'effetto inibitorio. Generalmente, gli acidi organici hanno un potere acido maggiore rispetto a quelli inorganici. Anche la *water activity* influenza lo sviluppo microbico e può incidere addirittura sulla resistenza agli stress termici e sulla tossinogenesi. Una delle strategie più utilizzate negli ultimi anni per il controllo dello sviluppo dei clostridi produttori di BoNT negli alimenti si basa sull'effetto combinato di pH, *water activity* e temperatura di conservazione (*hurdle technology*) (1, 3).

Diverse sostanze come, per esempio, i nitriti, i nitrati e i sorbati sono correntemente addizionati agli alimenti per prevenire il rischio botulismo. I nitriti, comunemente utilizzati nelle carni anche per stabilizzarne il colore, inibiscono la crescita delle spore, soprattutto a pH acidi. Il meccanismo con cui i nitriti esercitano la loro attività antibotulinica non è del tutto chiaro; tuttavia, alcuni studi suggeriscono che si tratti di un meccanismo ossidativo che coinvolge il sistema nitrito-perossinitrito. Il perossinitrito, infatti, è noto per essere un agente che causa l'ossidazione (diretta o mediata da radicali) delle proteine, del DNA e dei lipidi delle cellule microbiche. Le vie chimiche coinvolte in questo processo sono complesse e modulate da altre proprietà intrinseche ed estrinseche degli alimenti in cui sono utilizzati, come il pH, il potenziale redox, la concentrazione di NaCl, la temperatura di conservazione, eventuali trattamenti termici, l'aggiunta di acido ascorbico e di altri agenti riducenti. I nitrati, invece, non hanno attività antibotulinica vera e propria ma rappresentano, previa bioconversione microbica, una riserva di nitriti. L'acido

sorbico e i suoi sali sono ampiamente utilizzati come conservanti degli alimenti per inibire la crescita di lieviti, muffe e batteri. Il loro effetto inibente è pH-dipendente e dovuto principalmente all'acido indissociato. Il sorbato di potassio inibisce sia la germinazione sia l'*outgrowth* delle spore di *C. botulinum* e ha un effetto positivo anche sulle cellule vegetative. Poiché la concentrazione di sorbato necessaria per inibire la germinazione delle spore di clostridi produttori di BoNT è superiore a quella consentita per legge, questo agente può essere utilizzato solo per la sua capacità di impedire lo sviluppo delle cellule vegetative (4).

Oltre ai conservanti di sintesi, negli ultimi anni la ricerca in ambito alimentare si sta concentrando sullo studio dell'attività antimicrobica esercitata da estratti naturali, soprattutto vegetali. Oli essenziali ed idrolati di chiodi di garofano, timo, pepe nero, aglio, cipolla, origano e cannella hanno dimostrato, almeno *in vitro*, attività antibotulinica. In particolare, gli oli essenziali con maggiore attività nei confronti dei clostridi produttori di BoNT sono il timo e l'origano in quanto contengono elevati quantitativi di carvacolo. Tuttavia, al momento non sono stati pubblicati studi che dimostrino la capacità di queste sostanze naturali di inibire lo sviluppo microbico e la tossinogenesi dei clostridi produttori di BoNT in modelli alimentari o in formulazioni alimentari. Per alcuni prodotti a base di latte, come il Grana, la normativa vigente consente l'uso di peptidi antimicrobici, tra cui la nisina. Questa batteriocina naturalmente sintetizzata da *Lactobacillus lactis* spp. *lactis*, è stata ampiamente studiata anche per le sue proprietà antibotuliniche.

La germinazione, la crescita e la tossinogenesi dei clostridi produttori di BoNT sono influenzate anche dalle condizioni anaerobiche. Poiché questi microrganismi hanno un corredo genetico capace di attivarsi in risposta allo stress indotto dalla presenza di ossigeno, possono svilupparsi in alimenti confezionati in atmosfera ordinaria, purché vi sia una barriera che impedisca il continuo afflusso di ossigeno dall'esterno. Poiché il contenuto di ossigeno nello spazio di testa non è un indicatore affidabile del potenziale di crescita dei clostridi produttori di BoNT, storicamente, per predire il loro comportamento è stato utilizzato lo stato ossidativo di un alimento, misurato dal potenziale redox. Tuttavia, sia l'ambiente gassoso sia il potenziale redox possono variare durante la *shelf-life* di un alimento a causa dello scambio gassoso attraverso l'imballaggio, dello sviluppo di microrganismi che influenzano il gas nello spazio di testa e dell'attivazione di reazioni redox che possono instaurarsi nell'alimento in funzione della sua composizione. Di conseguenza, sebbene sia ragionevole ritenere che gli alimenti confezionati sottovuoto o in atmosfera modificata a ridotto contenuto di ossigeno favoriscano lo sviluppo dei clostridi produttori di BoNT, non è possibile utilizzare l'atmosfera gassosa o il potenziale redox come unici fattori di controllo, poiché non è possibile definire o controllare con precisione le condizioni necessarie per prevenire la crescita o la tossinogenesi dei clostridi produttori di BoNT. Inoltre, in un alimento, soprattutto se confezionato, i microambienti a basso potenziale redox sono poco accessibili per la misurazione (1).

Storicamente il processo di sviluppo microbico e quello di tossinogenesi sono stati considerati strettamente legati. In molti studi, l'aumento della popolazione misurabile veniva utilizzato come indicatore indiretto della presenza di tossine nella matrice. Tuttavia, una serie di evidenze scientifiche recenti ha dimostrato che, in alimenti in cui non è misurabile un incremento della popolazione, è comunque possibile rilevare la presenza di BoNT. Tutto ciò è dovuto al fatto che le cellule possono morire rapidamente dopo la tossinogenesi, anche a causa di peptidi litici da esse prodotti (autolisi). Nel 2020, un gruppo di lavoro dell'*Advisory Committee on the Microbiological Safety of Food*, nel suo documento di valutazione del rischio botulismo associato al consumo di alimenti confezionati sottovuoto e in atmosfera modificata, ha dichiarato che la determinazione delle tossine durante la conduzione dei *challenge test* è un requisito minimo e che la determinazione della carica vitale è utile per garantire la sicurezza del prodotto (3).

Tossine botuliniche

Le tossine botuliniche sono i veleni più potenti conosciuti per l'uomo. Il consumo di piccolissime quantità di tossine presenti in alimenti contaminati può causare il botulismo. È stato stimato che la dose letale per inalazione e per via orale della tossina di tipo A è rispettivamente di 10 ng/kg e 1 µg/kg di peso corporeo. Questo elevato potenziale dipende dalla loro attività enzimatica e dalla selettività con cui si legano ai neuroni. A causa della loro letalità, le BoNT sono state incluse nell'elenco degli agenti biologici potenzialmente utilizzabili come armi di distruzione di massa (2).

Al momento sono state identificate 8 varianti antigeniche di tossine denominate con le lettere dell'alfabeto dalla A alla G e recentemente X. Un'ulteriore variante, la tossina tipo H è stata dapprima proposta come nuova variante, poi definita come un riarrangiamento molecolare tra le tossine A e F e viene indicata anche come tossina FA. Per ognuna delle tossine di interesse della patologia umana (A, B, E, F) esistono diversi sub-tipi identificati sulla base della loro sequenza nucleotidica ed amminoacidica. Per la tossina tipo C esistono due sub-tipi (uno identificato recentemente) più la variante mosaico CD, mentre per la tossina tipo D esiste un solo sub-tipo più la variante mosaico DC. Ogni sub-tipo può avere un'antigenicità ed un potenziale diversi da quelli espressi dagli altri componenti il sub-gruppo. I complessi genetici codificanti per le tossine di tipo H e X sono stati riscontrati in ceppi precedentemente classificati come produttori di tossina botulinica di tipo B. Non sono rari, infatti, i ceppi capaci di sintetizzare contemporaneamente due tipologie di tossine diverse (es. Ab, Ae, Af, Bf) (5).

Le BoNT sono prodotte come singole catene polipeptidiche inattive, con un peso molecolare di 150 kDa, e vengono rilasciate dai clostridi produttori di BoNT, insieme a un numero variabile di componenti proteiche non tossiche, principalmente durante la fase tardiva della crescita logarithmica e nella fase stazionaria. Le proteine ausiliarie non tossiche proteggono la tossina dal metabolismo gastrico, ma vengono rapidamente dissociate a livello intestinale. L'attivazione delle neurotossine è dovuta al taglio enzimatico, operato da proteasi batteriche e tissutali, che determina un riarrangiamento strutturale in due catene polipeptidiche unite da un ponte disolfuro. La catena leggera pesa circa 50 kDa ed è responsabile dell'attività enzimatica intraneuronale; la catena pesante, del peso di circa 100 kDa, è responsabile dell'ancoraggio e dell'internalizzazione nel neurone. L'intero processo di intossicazione neuronale è caratterizzato da un meccanismo con 4 fasi:

1. legame al neurone;
2. endocitosi;
3. traslocazione;
4. idrolisi delle proteine SNARE (*Soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor Attachment Protein Receptor*).

La tossina si lega dapprima al suo ganglioside specifico presente nella membrana delle terminazioni colinergiche; successivamente, il legame con un secondo recettore, costituito da una proteina della membrana della vescicola presinaptica, innesca l'endocitosi. Il processo di traslocazione del dominio catalitico (catena leggera) nel citosol del neurone dipende dalla temperatura e dall'energia. Questo processo è dovuto a una diminuzione del pH che induce un cambiamento conformazionale della tossina, consentendone la penetrazione nella membrana attraverso la formazione di un canale. Nel citosol neuronale, la catena leggera delle BoNT taglia una proteina SNARE in un sito specifico. Le tossine di tipo A, C ed E tagliano, in punti diversi, la proteina SNAP-25 (*Synaptosomal-Associated Protein*), mentre le tossine di tipo B, D, F e G tagliano le proteine VAMP/syntaxina. Solo la tossina di tipo C taglia sia la SNAP-25 sia la syntaxina (5).

Tossine dello stesso tipo, prodotte da ceppi diversi, non sono necessariamente identiche. Oltre ai sub-tipi, sono stati identificati quattro complessi di tossine di differente peso molecolare e indicati con le lettere S, M, L, e LL. Le differenze di peso molecolare sono dovute alla combinazione di proteine non tossiche presenti nel complesso. Negli alimenti si possono generalmente riscontrare i complessi M e L. Tra i quattro complessi, il complesso LL è il più tossico per via orale. Il complesso L risulta approssimativamente 1000 volte più potente di quello M, che a sua volta è 20 volte più potente di quello S.

Le varianti antigeniche di tossine botuliniche finora conosciute mostrano una diversa suscettibilità nell'ospite; infatti, i casi di botulismo umano sono quasi esclusivamente correlati alle tossine di tipo A, B ed E, mentre quelli animali sono principalmente associati alle tossine di tipo C e D e alle loro varianti mosaico CD e DC (2).

Botulismo alimentare

Il botulismo si presenta in 6 forme distinte (botulismo alimentare, da ferita, infantile, intestinale dell'adulto, iatrogeno, da inalazione), con un'unica manifestazione clinica dovuta all'azione delle tossine botuliniche. La prima forma di botulismo riconosciuta è quella alimentare. Il botulismo alimentare è causato dall'esposizione alle tossine botuliniche, preformate negli alimenti a seguito della germinazione, dell'*outgrowth* e della tossinogenesi dei clostridi produttori di BoNT (6). Poiché questi microrganismi sono ampiamente presenti nell'ambiente, possono contaminare anche le materie prime utilizzate nella produzione alimentare e, di conseguenza, gli alimenti. Tuttavia, affinché un prodotto alimentare sia a rischio botulismo devono verificarsi i seguenti eventi:

- le materie prime devono essere contaminate con le spore dei clostridi produttori di BoNT;
- il processo di trasformazione delle materie prime in prodotto finito non deve prevedere l'applicazione di operazioni unitarie della tecnologia alimentare capaci di inattivare le spore dei clostridi produttori di tossine botuliniche;
- le caratteristiche intrinseche del prodotto (pH, *water activity*, potenziale di ossidoriduzione) devono permettere/favorire la germinazione, l'*outgrowth* e la tossinogenesi delle spore di clostridi produttori di BoNT eventualmente presenti;
- l'alimento deve essere consumato senza un trattamento termico preventivo (es. cottura, frittura) in grado di denaturare le eventuali BoNT presenti.

Il botulismo alimentare è la forma più diffusa al mondo e il 90% dei casi è associato al consumo di conserve preparate in ambito domestico. In Italia, in Spagna e negli Stati Uniti, gli alimenti più spesso incriminati nei casi di botulismo alimentare sono le conserve di origine vegetale. Nei Paesi del Nord Europa, come la Germania e la Polonia, i prodotti più coinvolti nei casi e nei focolai di botulismo sono quelli a base di carne. In altri paesi come il Canada, l'Alaska, la Scandinavia e il Giappone, la maggior parte dei casi è associata al consumo di conserve di pesce tipiche. Molti di questi prodotti sono fermentati, ma il loro contenuto di carboidrati fermentescibili è basso per garantire un adeguato abbassamento del pH durante la fermentazione. Più raramente i focolai di botulismo sono associati al consumo di prodotti di produzione industriale (4).

Diagnosi clinica e gestione del malato

La sindrome clinica del botulismo è altamente caratteristica. Consiste nella paralisi simmetrica dei nervi cranici, seguita da una paralisi flaccida, simmetrica e discendente, che può progredire fino all'arresto respiratorio. Importante è l'anidrosi con severa secchezza della bocca e della gola. In alcuni casi, il collasso della faringe è secondario alla paralisi dei nervi cranici e può compromettere la respirazione, richiedendo l'intubazione anche in assenza di compromissione dei muscoli respiratori. Nel botulismo alimentare, prima della comparsa dei sintomi neurologici, possono essere presenti anche sintomi gastroenterici, come nausea, vomito, dolori addominali e diarrea. La costipazione è un sintomo universale di natura neurologica. I segni vitali sono generalmente normali. Il sistema sensorio non è affetto e le funzioni intellettuali sono preservate. La morte risulta dall'ostruzione delle vie aeree provocata dalla paralisi dei muscoli faringei, diaframmatici e dei muscoli accessori della respirazione. La malattia rientra nella diagnosi differenziale con la sindrome di Guillain-Barré, la *miastenia gravis*, la sindrome di Eaton-Lambert, l'intossicazione da alcol, l'overdose di droghe, le encefaliti o le meningiti. Il legame delle neurotossine è non competitivo e irreversibile; ciò nonostante, le terminazioni nervose si rigenerano lentamente, consentendo il completo recupero nel 95% dei casi. La paralisi si risolve generalmente in settimane o mesi e spesso richiede una terapia riabilitativa (6).

I segni oculari e i sintomi, come la diplopia, la difficoltà di deglutizione e di articolazione del linguaggio, che erano importanti durante la fase acuta della malattia, risultano completamente risolti.

La rapidità di insorgenza e la gravità della malattia dipendono dalla quantità di tossina assorbita. Un piccolissimo quantitativo di tossina (30 ng) è sufficiente a provocare la malattia e perfino la morte. Il consumo di quantità piccolissime di alimenti, come 0,1 g di alimento contaminato, può provocare la malattia. Nel botulismo alimentare, i sintomi possono manifestarsi da 2 ore a 8 giorni dopo l'ingestione dell'alimento contaminato, ma generalmente compaiono entro 12-72 ore (2).

A supporto della diagnosi clinica, nella maggior parte dei casi si ricorre anche alla conferma di laboratorio. La conferma di laboratorio dei casi di botulismo alimentare viene effettuata per la dimostrazione della tossina botulinica nel siero, e/o nel tratto gastrointestinale, nell'alimento sospetto e l'isolamento del ceppo neurotossigeno dai campioni fecali e dall'alimento. La presenza di spore nei campioni fecali di pazienti che presentano una sintomatologia caratteristica del botulismo, costituisce altrettanto validamente la conferma del caso in laboratorio. La dimostrazione della presenza di tossina botulinica nel contenuto intestinale e/o nel siero di un neonato di età inferiore a un anno costituisce la conferma di laboratorio di un caso di botulismo infantile; allo stesso modo, la dimostrazione della tossicità dell'essudato di una ferita infetta e l'eventuale isolamento del ceppo tossigeno dalla ferita stessa costituiscono la conferma di un caso di botulismo da ferita (6).

Una diagnosi rapida, la terapia di supporto e l'immunizzazione passiva con immunoglobuline di origine equina costituiscono il trattamento migliore per il botulismo. L'uso ottimale dell'antitossina dipende dalla tempestività della formulazione del sospetto clinico. Una terapia tempestiva minimizza il danno ai nervi non ancora compromessi, pur non potendo agire sulle terminazioni nervose già danneggiate. Lo shock anafilattico legato all'origine dell'antitossina si verifica nei primi 10 minuti dall'inizio della somministrazione del siero, in circa nel 2% dei pazienti trattati. Per testare l'ipersensibilità al siero antibotulinico, i pazienti vengono trattati con dosi molto basse prima di ricevere l'intera terapia (6).

I malati affetti da botulismo necessitano di cure di supporto che spesso includono l'alimentazione tramite sondino nasogastrico, la terapia intensiva, la ventilazione assistita e il trattamento delle infezioni secondarie. La terapia antibiotica ha un ruolo limitato. Generalmente

si ricorre all'uso di antibiotici nel trattamento dei casi di botulismo da ferita (in cui talvolta si ricorre anche a trattamenti in camera iperbarica) e delle infezioni secondarie nelle altre forme di botulismo. Gli aminoglicosidi e la clindamicina sono controindicati per il rischio di aggravare il blocco neuromuscolare. Altrettanto controindicati sono tutti gli antibiotici ad azione anticlostridiocida, in quanto, rompendo la cellula batterica, favoriscono un ulteriore rilascio di tossine botuliniche, con conseguente peggioramento della sintomatologia neurologica (6).

Elementi di epidemiologia del botulismo alimentare in Italia

Il botulismo è una malattia rara in tutto il mondo e anche in Italia, ciò nonostante, nel nostro Paese si registra costantemente uno dei tassi di prevalenza più alti rispetto agli altri Paesi dell'Unione Europea. La ragione di tale prevalenza risiede molto verosimilmente nella tradizione conserviera ampiamente diffusa su tutto il territorio nazionale, soprattutto nelle aree rurali, nonché nell'attenzione che le Autorità sanitarie hanno da sempre dimostrato nei confronti di questa malattia. Basti pensare che in Italia il botulismo è una malattia a notifica obbligatoria dal 1975. Successivamente, con la revisione del Sistema di sorveglianza delle malattie trasmissibili e diffusibili, nel 1990, il botulismo è stato incluso tra le malattie di classe I, per le quali era richiesta la segnalazione da parte del medico all'azienda sanitaria locale, entro 12 ore dalla formulazione del sospetto clinico. Nel 1996, e successivamente nel 2012, al fine di armonizzare il sistema di notifica e di reporting dei casi, il Ministero della Salute, con il supporto del Centro Nazionale di Riferimento per il Botulismo, istituito nel 1988 presso l'Istituto Superiore di Sanità, ha redatto e pubblicato due lettere circolari (7). La circolare più recente ha recepito le definizioni di caso e i criteri diagnostici stabiliti a livello comunitario dalla Decisione 2002/253/EC (modificata e integrata nel 2003, 2008 e 2009). Nel 2018, tali definizioni sono state nuovamente modificate e integrate con la Decisione di esecuzione (UE) 2018/945. A livello nazionale, inoltre, con la pubblicazione del DPCM del 3 marzo 2017 è stato istituito ufficialmente il sistema di sorveglianza nazionale del botulismo. L'ultimo atto normativo nazionale applicabile al sistema di sorveglianza del botulismo è il Decreto del Ministero della Salute del 7 marzo 2022, "Revisione del sistema di segnalazione delle malattie infettive (PREMAL)", che richiede la segnalazione del caso sospetto all'azienda sanitaria entro 12 ore e l'inserimento dei dati nel sistema informativo entro 48 ore (8).

In Italia vengono generalmente confermati in laboratorio circa 20-30 casi di botulismo all'anno; fanno eccezione il 1996, il 2004, il 2013, il 2016, il 2020 e il 2025, anni in cui è stato registrato un numero di casi superiore alla media. La quasi totalità dei casi (oltre il 90%) è rappresentata da botulismo alimentare, che si verifica prevalentemente in ambito domestico ed è collegato al consumo di conserve preparate in casa. I prodotti maggiormente implicati nei casi e nei focolai, in cui è stato possibile identificare la fonte dell'intossicazione, sono i vegetali e i funghi conservati sott'olio, nonché vegetali conservati in acqua di cottura o in salamoia (72%). Il restante 28% dei casi e dei focolai è associato al consumo di conserve di carne (15%), di pesce (8%), di formaggio (3%) e di alimenti macrobiotici (2%). I ceppi circolanti in Italia appartengono principalmente al Gruppo I e, nella stragrande maggioranza dei casi, producono tossina di tipo B, che generalmente non provoca quadri clinici molto gravi. Il tasso di letalità si mantiene intorno al 2% ed è paragonabile a quello registrato in tutto il mondo occidentale, dove il trattamento della malattia prevede la sieroterapia e, se necessario, il supporto ventilatorio in terapia intensiva (8).

Negli anni in cui è stato osservato un numero di casi superiore a quello atteso, i picchi sono stati associati a specifici episodi di esposizione alimentare. Nel 1996 si registrarono focolai associati al consumo di mascarpone, di tonno in scatola di produzione industriale e di olive di produzione industriale. Il picco del 2004 fu causato da un focolaio legato al consumo di olive verdi preparate artigianalmente in un agriturismo del Centro Italia. Nel 2013 si registrò un incremento delle segnalazioni, senza un corrispondente aumento dei casi confermati in

laboratorio, correlato al richiamo del pesto effettuato da un produttore ligure a seguito di un esito positivo in un autocontrollo aziendale. Il picco del 2016 fu associato a due focolai di botulismo correlati al consumo di alimenti contaminati in due esercizi di ristorazione collettiva, nel Lazio e nel Veneto. Il picco del 2020 fu causato dal consumo di tonno contaminato da tossine Ab, presente in un'insalatona. Infine, nel 2025 l'aumento dei casi fu causato dal consumo di un panino farcito acquistato da un venditore ambulante in Calabria (8).

Prevenzione e controllo del botulismo alimentare

I sistemi di prevenzione e controllo del botulismo alimentare consistono nella distruzione delle spore eventualmente presenti nelle materie prime o nel controllo della crescita e della tossinogenesi dei clostridi produttori di tossine botuliniche.

La temperatura è un parametro di controllo molto importante. I clostridi produttori di tossine botuliniche sono capaci di svilupparsi in un intervallo di temperatura molto ampio (3-38°C), per cui la conservazione degli alimenti al di fuori di tale intervallo costituisce un idoneo sistema di prevenzione e controllo.

La sicurezza delle conserve poco acide ($\text{pH} > 4,6$), in cui il pH favorisce lo sviluppo dei clostridi produttori di tossine botuliniche, è garantita dal trattamento di sterilizzazione industriale. Per questo genere di prodotti deve essere garantito un livello di sicurezza 12D, ovvero la possibilità di ridurre la popolazione sporale vitale di un fattore 10^{12} (in altri termini, si può tollerare che una confezione su mille miliardi di confezioni rimanga contaminata). Tale livello di sicurezza è garantito mediante un processo termico a 121°C per almeno 3 minuti ($F_0 = 3 \text{ min}$). Nella pratica industriale, generalmente si ricorre a un trattamento più severo per ridurre le popolazioni sporali responsabili del deterioramento degli alimenti, che presentano resistenze termiche maggiori rispetto a quelle di *C. botulinum* tipo A (9).

Per le conserve acide o acidificate ($\text{pH} < 4,6$), i trattamenti termici applicati sono generalmente più blandi (pastorizzazione – 6D), poiché tali valori di pH non consentono la germinazione e la tossinogenesi delle spore di clostridi produttori di tossine botuliniche. Inoltre, quanto più basso è il pH del mezzo, tanto minore sarà la resistenza al calore delle spore. Tale trattamento termico viene effettuato al fine di eliminare le popolazioni microbiche che, sviluppatesi a tali valori di pH, potrebbero determinare variazioni del pH fino a livelli compatibili con la germinazione dei clostridi produttori di tossine botuliniche.

Marmellate e confetture di frutta sono generalmente acide, ma il controllo del rischio di botulismo in questo genere di prodotti è garantito dalla quantità di zucchero, che mantiene il valore di *water activity* al di sotto di 0,93.

I prodotti in salamoia sono considerati sicuri, purché la concentrazione di sale sia almeno del 10%, che consente di controllare la *water activity*, mantenendola al di sotto di 0,93. Nella pratica industriale, talvolta questa concentrazione di sale viene ridotta per ragioni sensoriali, ma, per mantenerne inalterate le capacità conservanti, la salamoia viene acidificata.

Le semiconserve presentano valori di pH e *water activity* (a_w) che non riescono a inibire lo sviluppo e la tossinogenesi dei clostridi produttori di tossine botuliniche. La loro sicurezza è garantita dalla conservazione a temperature di refrigerazione, con *shelf-life* limitata. Poiché esistono ceppi di *C. botulinum* capaci di svilupparsi e produrre tossine botuliniche a temperature di refrigerazione, la sicurezza d'uso di questi prodotti deve essere valutata sperimentalmente mediante *microbial challenge test* (vedi capitolo dedicato in questo rapporto "Progettazione e conduzione di *challenge test* per *Clostridium botulinum*").

Il congelamento o la surgelazione sono metodi molto efficaci per il controllo del rischio botulismo, soprattutto per i prodotti poco acidi e per quelli sottoposti a blandi trattamenti termici di stabilizzazione. Alle temperature di congelamento o di surgelazione, l'attività metabolica dei

clostridi produttori di tossine botuliniche è bloccata; pertanto, se questi microrganismi sono presenti nell'alimento, non possono moltiplicarsi né produrre le tossine. Tuttavia, tali trattamenti non eliminano l'eventuale contaminazione presente nel prodotto. Pertanto, se viene congelato o surgelato un prodotto già contaminato, la contaminazione persiste e, il suo consumo può costituire un pericolo per la salute, una volta scongelato (2, 9).

Altri metodi di controllo del rischio botulismo prevedono l'uso di additivi e conservanti, come i nitriti, la cui aggiunta ai prodotti a base di carne avviene, oltre che per ragioni tecnologiche, per impedire lo sviluppo e la tossinogenesi dei clostridi produttori di tossine botuliniche.

Bibliografia

1. Peck MW. Biology and genomic analysis of *Clostridium botulinum*. *Adv Microb Physiol*. 2009;55:183-256, 320.
2. Anniballi F, Lonati D, Fiore A, Auricchio B, De Medici D, Locatelli CA. New targets in the search for preventive and therapeutic agents for botulism. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2014;12(9):1075-1086.
3. Peck MW. *Clostridium botulinum* and the safety of minimally heated, chilled foods: an emerging issue? *J Appl Microbiol*. 2006;101(3):556-570.
4. Scalfaro C, Auricchio B, De Medici D, Anniballi F. Foodborne botulism: an evolving public health challenge. *Infect Dis*. 2019;51(2):97-101.
5. Pirazzini M, Montecucco C, Rossetto O. Toxicology and pharmacology of botulinum and tetanus neurotoxins: an update. *Arch Toxicol*. 2022;96(6):1521-1539.
6. Sobel J. Botulism. *Clin Infect Dis*. 2005;41(8):1167-1173.
7. Anniballi F, Auricchio B, Fiore A, Lonati D, Locatelli CA, Lista F, Fillo S, Mandarino G, De Medici D. Botulism in Italy, 1986 to 2015. *Euro Surveill*. 2017;22(24):pii=30550.
8. Anniballi F, Bella A, Scalfaro C, Renna Bertoli M, D'Amato S, Scavia G, Pezzotti P, Maraglino F, Morabito F. Il sistema di sorveglianza nazionale del botulismo: i dati in Italia dal 2001 al 2020. *Boll Epidemiol Naz*. 2002;3(3):39-46.
9. Rasetti-Escargueil C, Lemichez E, Popoff MR. Public health risks associated with botulism as foodborne zoonoses. *Toxins*. 2020;12(1):17.

STRATEGIA NAZIONALE DI CONTROLLO MICROBIOLOGICO DEGLI ALIMENTI

Eleonora Chelli, Rita Marcianò

Direzione Generale dell'Igiene e della Sicurezza Alimentare, Ministero della Salute, Roma

La sicurezza microbiologica degli alimenti è uno degli ambiti prioritari della tutela della salute pubblica. I pericoli di natura biologica restano infatti la principale causa delle Malattie Trasmesse da Alimenti (MTA) nei Paesi industrializzati. In tale contesto, il sistema dei controlli ufficiali deve assicurare un'azione omogenea, efficace e proporzionata al rischio lungo l'intera filiera, dalla produzione primaria fino alla distribuzione e alla somministrazione al consumatore finale (1, 2).

Gli episodi più recenti hanno, inoltre, confermato l'esigenza di una programmazione dei controlli ufficiali più omogenea, fondata su basi scientifiche e coordinata su tutto il territorio nazionale. In questa prospettiva, il Ministero della Salute ha introdotto il Piano Nazionale per i Controlli Microbiologici sugli alimenti. Il Piano è lo strumento con cui il Ministero intende ricondurre a unità l'attività di campionamento e analisi svolta dalle Autorità competenti su tutto il territorio nazionale (3, 4).

Il percorso che ha condotto alla definizione di una strategia nazionale dedicata ha avuto come primo riferimento l'Intesa Stato-Regioni n. 212/CSR del 10 novembre 2016, recante le "Linee guida per il controllo ufficiale ai sensi dei Regolamenti (CE) 882/2004 e 854/2004" (5, 6). L'entrata in vigore del Regolamento (UE) 2017/625 e l'adozione del Decreto Legislativo 2 febbraio 2021, n. 27, hanno poi ridefinito il quadro di riferimento (3, 6). Gli articoli 2 e 3 del decreto attribuiscono al Ministero della Salute il compito di garantire il coordinamento, l'uniformità, l'efficacia e l'efficienza dei controlli ufficiali tra tutte le Autorità competenti sul territorio nazionale. Tale funzione si esercita attraverso l'adozione di piani nazionali di controllo e di modalità e strumenti condivisi. Da qui è emersa l'esigenza di ricondurre la programmazione dei controlli microbiologici a un piano organico dedicato, integrato da un protocollo tecnico che disciplini in modo uniforme le modalità di campionamento, l'interpretazione degli esiti analitici e la loro gestione (7).

Il Piano Nazionale per i Controlli Microbiologici sugli alimenti è parte integrante del Piano di Controllo Nazionale Pluriennale (PCNP) e si fonda sulle disposizioni comunitarie e nazionali vigenti. La sua struttura è stata definita in modo da consentire di stimare la prevalenza dei principali microrganismi patogeni di origine alimentare e di valutare i parametri microbiologici relativi ai processi produttivi. Consente, inoltre, di verificare la conformità ai criteri stabiliti dal Regolamento (CE) 2073/2005 e di applicare, per le combinazioni matrice/pericolo non disciplinate dalla normativa europea, i valori guida definiti a livello nazionale (8). Le sue finalità sono molteplici. In primo luogo, il Piano mira a individuare le matrici e le categorie alimentari più rilevanti per la salute del consumatore, così da orientare con maggiore precisione le attività di controllo ufficiale e definire strategie di intervento mirate. Mira, inoltre, a uniformare le procedure di campionamento, di analisi e di interpretazione dei risultati. Esso concorre infine a definire e aggiornare le misure preventive, a sviluppare iniziative di comunicazione e sensibilizzazione e a favorire il miglioramento continuo del sistema dei controlli (9).

La prima versione del Piano Nazionale per i Controlli Microbiologici sugli alimenti, trasmesso alle Regioni e Province Autonome il 24 dicembre 2025, ha costituito per l'annualità 2026 un documento di indirizzo a carattere sperimentale. Il piano microbiologico si basa su un modello di

pianificazione maggiormente armonizzato con gli orientamenti europei, fondato su criteri di priorità coerenti con le metodologie di analisi del rischio adottate a livello dell'Unione.

La rilevanza di ciascuna combinazione matrice/pericolo riportata nell'Allegato 7 dell'Intesa n. 212/2016 è stata valutata mediante un'analisi decisionale multicriterio di tipo semi-quantitativo. L'analisi si basa su quattro elementi, a ciascuno dei quali è stato attribuito un punteggio da 0 a 5 (10, 11):

- l'incidenza delle non conformità, quale indicatore della probabilità di presenza del pericolo, desunta dai dati RaDISAN (Raccolta Dati analitici del flusso unico in Igiene e Sicurezza degli Alimenti);
- il volume dei consumi alimentari, quale misura del livello di esposizione, secondo i dati CREA (Consiglio per la ricerca in agricoltura e l'analisi dell'economia agraria);
- il numero di casi umani associati a focolai, quale indicatore dell'impatto sanitario, rilevato attraverso il flusso informativo previsto dalla Direttiva 2003/99/CE sulle zoonosi (12);
- il potenziale patogeno in relazione all'alimento, definito sulla base del parere di esperti.

Per assicurare una copertura rappresentativa ed equilibrata dell'intero territorio nazionale, i campioni sono stati ripartiti tra le Regioni in base alla popolazione residente (dati ISTAT) per i campionamenti eseguiti in distribuzione e al numero di stabilimenti produttivi per quelli eseguiti alla produzione.

Alle attività stabilite dal Piano si affiancano ulteriori tipologie di campionamento. Ciascuna Regione/Provincia Autonoma può programmare campionamenti aggiuntivi, configurati come extra-piano, sulla base di specifiche realtà territoriali. Il campionamento su sospetto, invece, non è programmato e viene disposto, tra l'altro, a seguito di precedenti positività, di indagini epidemiologiche su casi di sospetta MTA, di ispezioni che abbiano rilevato condizioni non idonee o di indagini di tracciabilità. Ciò avviene in coerenza con la Direttiva 2003/99/CE, che impone di condurre indagini lungo tutta la filiera in caso di focolaio sospetto o confermato, e con il Regolamento (CE) 2073/2005, che prevede l'adozione immediata di azioni correttive in presenza di non conformità o di un potenziale rischio per la salute pubblica (8, 12).

Il Piano dedica, inoltre, specifica attenzione alla garanzia del diritto alla difesa, secondo le modalità di cui agli articoli 7 e 8 del DL.vo 27/2021 e alla nota del Ministero della Salute n. 21355 del 22 maggio 2023. Per le analisi microbiologiche la riproducibilità dell'esito non è assicurata, data la prevalenza e la distribuzione del pericolo nelle merci (7, 13). Pertanto, il campionamento è effettuato in aliquota unica: con convocazione delle parti ai sensi dell'articolo 223 del DL.vo 271/1989, quando si verifica il rispetto dei criteri di sicurezza alimentare; senza convocazione, quando si verifica il rispetto dei criteri di igiene di processo (14, 15). All'operatore resta la facoltà di richiedere la controperizia e la controversia documentale, quest'ultima con riesame da parte dell'Istituto Superiore di Sanità.

La qualificazione dell'esito analitico, inclusa quella relativa ai valori guida, è effettuata ai sensi dell'articolo 5 del DL.vo 27/2021. Essa tiene conto della gravità del rischio, del principio di proporzionalità e della sede del campionamento. Ne derivano, a seconda dei casi, il ritiro o il richiamo del prodotto, il divieto di immissione in commercio oppure l'adozione di azioni correttive sul processo produttivo (7).

La rendicontazione costituisce elemento essenziale della strategia, consentendo il monitoraggio dell'andamento delle attività e l'adozione tempestiva di eventuali interventi correttivi per la futura programmazione, in linea con il ciclo *plan-do-check-act*.

Per l'anno 2027 le principali novità riguardano la revisione dell'Allegato 1 alla luce delle osservazioni pervenute e delle modifiche normative intervenute, con particolare riferimento ai nuovi requisiti per *Listeria monocytogenes* introdotti dal Regolamento (UE) 2024/2895, alla nuova strategia di indagini relativa al pericolo *Clostridium botulinum* e alle novità in materia di

controllo dei *Vibrio* spp. potenzialmente patogeni (16-20). Sono previsti, inoltre, la riprogrammazione sulla base degli stabilimenti registrati, una più puntuale disciplina dei valori guida e del diritto alla difesa e un richiamo alla verifica dell'etichettatura. Completano l'aggiornamento, l'integrazione nel verbale di prelievo degli elementi necessari alla rendicontazione e l'introduzione di schede di programmazione e di rendicontazione, utili a evidenziare criticità ed eventuali scostamenti dal piano nazionale.

Bibliografia

1. Europa. Regolamento (CE) n. 178/2002 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 28 gennaio 2002, che stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare. *Gazzetta ufficiale delle Comunità europee* L 31/1, del 1.2.2002.
2. Europa. Regolamento (CE) n. 765/2008 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 9 luglio 2008 che pone norme in materia di accreditamento e di vigilanza del mercato per quanto riguarda la commercializzazione dei prodotti e che abroga il regolamento (CEE) n. 339/93. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 218/30, del 13.8.2008.
3. Europa. Regolamento (UE) 2017/625 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 15 marzo 2017 relativo ai controlli ufficiali e alle altre attività ufficiali effettuati per garantire l'applicazione della legislazione sugli alimenti e sui mangimi, delle norme sulla salute e sul benessere degli animali, sulla sanità delle piante e sui prodotti fitosanitari. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 95/1, del 7.4.2017.
4. Europa. Regolamento di esecuzione (UE) 2019/627 della Commissione, del 15 marzo 2019 che stabilisce modalità pratiche uniformi per l'esecuzione dei controlli ufficiali sui prodotti di origine animale destinati al consumo umano in conformità al regolamento (UE) 2017/625 del Parlamento europeo e del Consiglio e che modifica il regolamento (CE) n. 2074/2005 della Commissione per quanto riguarda i controlli ufficiali. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 131/51, del 17.5.2019.
5. Europa. Rettifica del regolamento (CE) n. 852/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 29 aprile 2004, sull'igiene dei prodotti alimentari. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 139, del 30.4.2004.
6. Europa. Rettifica del regolamento (CE) n. 853/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 29 aprile 2004 che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 226/22, del 25.6.2004.
7. Italia. Decreto legislativo 2 febbraio 2021, n. 27 Disposizioni per l'adeguamento della normativa nazionale alle disposizioni del regolamento (UE) 2017/625, ai sensi dell'articolo 12, lettere a), b), c), d) ed e), della legge 4 ottobre 2019, n. 117. *Gazzetta ufficiale Serie Generale* n.60, del 11.3.2021.
8. Europa. Regolamento (CE) n. 2073/2005 della Commissione, del 15 novembre 2005 relativo ai criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 338, del 22.12.2005.
9. Ministero della Salute. *Indicazioni operative in materia di controlli microbiologici e gestione dei dati analitici*. Circolare Prot. N. 0005471 del 10 febbraio 2025.
10. Ferla G, Mura B, Falasco S, Caputo P, Matarazzo A. Multi-Criteria Decision Analysis (MCDA) for sustainability assessment in food sector. A systematic literature review on methods, indicators and tools. *Sci Total Environ.* 2024;946:174235. doi: 10.1016/j.scitotenv.2024.174235.
11. Gésan-Guiziou G, Alaphilippe A, Aubin J, Bockstaller C, Boutrou R, Buche P, Collet C, Girard A, Martinet V, Membré JM, Sabbadin R, Thiollot-Schoults M, van der Werf HMG. Multi-criteria decision analysis methods in agri-food research. *Agron Sustain Dev.* 2020;40:44. doi.org/10.1007/s13593-020-00650-3.

12. Europa. Direttiva 2003/99/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, del 17 novembre 2003, sulle misure di sorveglianza delle zoonosi e degli agenti zoonotici, recante modifica della decisione 90/424/CEE del Consiglio e che abroga la direttiva 92/117/CEE del Consiglio. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 325, del 12.12.2003.
13. Ministero della Salute, Direzione Generale per l'Igiene e la Sicurezza degli Alimenti e la Nutrizione (DGISAN). *Indicazioni operative relative ai controlli ufficiali ai sensi del regolamento (UE) 2017/625*. Nota Prot. n. 0021355 del 22 maggio 2023.
14. Italia. Legge 7 agosto 1990, n. 241. Nuove norme in materia di procedimento amministrativo e di diritto di accesso ai documenti amministrativi. *Gazzetta Ufficiale* n. 192 del 18.8.1990.
15. Italia. Decreto legislativo 30 dicembre 1989, n. 271 Norme di attuazione, di coordinamento e transitorie del codice di procedura penale, con riferimento all'articolo 223, comma 1. *Gazzetta Ufficiale Serie Generale* n. 182, del 5.8.1989.
16. Europa. Regolamento (UE) 2024/2895 della Commissione del 20 novembre 2024 che modifica il regolamento (CE) n. 2073/2005 per quanto riguarda *Listeria monocytogenes*. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 2024/2895, del 21.11.2024.
17. Ministero della Salute, Direzione Generale per l'Igiene e la Sicurezza degli Alimenti e la Nutrizione (DGISAN). *Strategie per il controllo dei clostridi produttori di tossine botuliniche negli alimenti - Trasmissione parere ISS*. Nota Prot. N. 0021602-04/05/2026-DGISAN-MDS-P.
18. Ministero della Salute, Direzione Generale per l'Igiene e la Sicurezza degli Alimenti e la Nutrizione (DGISAN). *Nota tecnica per la ricerca, l'analisi e la gestione delle partite di prodotti della pesca in relazione a Vibrio spp.* Nota Prot. N. 0026189 29/05/2026-DGISAN-MDS-P.
19. Ministero della Salute, Direzione Generale per l'Igiene e la Sicurezza degli Alimenti e la Nutrizione (DGISAN). *Strategie per il controllo dei clostridi produttori di tossine botuliniche negli alimenti – Ulteriori chiarimenti*. Nota Prot. N 0029097 del 16/06/2026-DGISAN-MDS-P
20. Ministero della Salute, Direzione Generale per l'Igiene e la Sicurezza degli Alimenti e la Nutrizione (DGISAN). *Vibrio spp. in prodotti della pesca. Chiarimenti in merito all'applicazione della nota prot. 0026189 29/05/2026-DGISAN-MDS-P*. Nota Prot. N. 0038160 04/08/2026-DGISAN-MDS-P.

STRATEGIE NAZIONALI DI CONTROLLO DEI CLOSTRIDI PRODUTTORI DI TOSSINE BOTULINICHE E DELLE TOSSINE BOTULINICHE NEGLI ALIMENTI

Concetta Scalfaro, Silvia Taglieri, Teresa Vicenza, Fabrizio Anniballi

Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

In attuazione delle disposizioni europee e nazionali in materia di controlli ufficiali degli alimenti e con l'obiettivo di garantire una pianificazione e un'esecuzione coordinate delle attività di campionamento sul territorio nazionale, il Ministero della Salute ha adottato un apposito Piano nazionale per i Controlli Microbiologici. Il Piano copre l'intero spettro delle categorie alimentari, incluse quelle di interesse per il controllo e la prevenzione del botulismo, ovvero i prodotti pronti (*Ready-To-Eat*, RTE) (alimenti destinati dal produttore o dal fabbricante al consumo umano diretto, senza che sia necessaria la cottura o altro trattamento per eliminare o ridurre a un livello accettabile i microrganismi presenti), le conserve, le semi-conserve e i REPFED (*Refrigerated Processed Food with Extended Durability*). Per quanto concerne queste categorie alimentari, il nuovo Piano nazionale registra un significativo mutamento del paradigma di conformità rispetto alle precedenti "Linee guida relative all'applicazione del Regolamento (CE) 2073/2005 e successive modifiche ed integrazioni sui criteri microbiologici applicabili agli alimenti" (1).

In questo capitolo verrà esaminata la nuova strategia nazionale per il controllo dei clostridi produttori di tossine botuliniche e delle tossine botuliniche negli alimenti, sia per quanto riguarda i controlli pianificati, sia per quanto riguarda i controlli effettuati a seguito di sospetti casi e focolai di botulismo.

Applicazione del Regolamento (CE) 2073/2005: la cascata analitica prevista nelle linee guida

Le linee guida relative all'applicazione del Regolamento (CE) 2073/2005, oltre a disciplinare la pianificazione e la programmazione dei controlli previsti da ciascuna autorità competente per i parametri definiti dal medesimo regolamento, prevedevano, nel rispetto del principio secondo cui i controlli devono essere basati sul rischio, per tutte le categorie alimentari, l'analisi di ulteriori parametri microbiologici (1).

Considerando l'alto tasso di incidenza del botulismo alimentare in Italia e la severità dei quadri clinici ad esso associati, anche gli alimenti a rischio, quali conserve, semiconserve e prodotti refrigerati pronti al consumo (REPFED), erano oggetto di specifica trattazione nelle sopra richiamate linee guida, come indicato nello stralcio riportato nella Tabella 1.

Nella pratica analitica, il laboratorio che riceveva i campioni doveva innanzitutto misurare il pH e la *water activity* (a_w) e, sulla base dei valori ottenuti, eventualmente procedere alla determinazione dei clostridi produttori di tossine botuliniche e delle tossine botuliniche.

Le analisi chimico-fisiche di pH e a_w venivano considerate conclusive nel caso in cui uno solo dei due parametri fosse stato in grado di inibire la crescita e la tossinogenesi dei clostridi

produttori di tossine botuliniche. Alcuni laboratori, su indicazione delle autorità competenti, eseguivano, dopo la determinazione dei parametri chimico-fisici, anche la determinazione dei clostridi solfito-riduttori.

Tabella 1. Parametri chimico-fisici e microbiologici da saggiare rispetto al rischio botulismo per la categoria merceologica di conserve, semiconserve e REPFED

Parametro	Metodi	Valori guida	Note
pH	Metodo accreditato	$\leq 4,6$	La determinazione è relativa alla valutazione del rischio di crescita e tossinogenesi dei clostridi produttori di tossine botuliniche. Prelievo alla produzione da eseguire in una sola aliquota composta da una singola unità campionaria.
a_w		$\leq 0,93$	La determinazione è relativa alla valutazione del rischio di crescita e tossinogenesi dei clostridi produttori di tossine botuliniche. Prelievo alla produzione da eseguire in una sola aliquota composta da una singola unità campionaria.
Stabilità	Istituto Superiore di Sanità, Rapporto ISTISAN 96/35	Conforme	Solo per le conserve. Prelievo alla produzione/importazione da eseguire con 3-4 aliquote composte da 8 unità campionarie. Prelievo alla distribuzione da eseguire con una sola aliquota composta da 3 unità campionarie.
Anaerobi solfito riduttori	ISO 15213	≤ 10 UFC/g	Solo per le semiconserve (compresi i REPFED). Prelievo alla produzione da eseguire in una sola aliquota composta da una singola unità campionaria.
Clostridi produttori di tossine botuliniche	CNRB30.000 (mouse test) CNRB31.000 (PCR test) ISO/TS17919 (PCR test)	Assenti*	La ricerca verrà eseguita nelle conserve e semiconserve (compresi i REPFED) solo nel caso in cui i valori chimico-fisici risultano compatibili con la crescita e tossinogenesi dei clostridi produttori di tossine botuliniche ($pH > 4,6$ e $a_w > 0,93$) nei prodotti non sottoposti a trattamenti di stabilizzazione microbiologica (es. sterilizzazione nel caso di conserve poco acide $pH > 4,6$) o pastorizzazione nel caso di conserve acide, oppure pastorizzazione unita alla conservazione in condizioni di refrigerazione per le semiconserve. Prelievo alla distribuzione da eseguire in 4-5 aliquote composte da una singola unità campionaria.
Tossine botuliniche	CNRB30.000 (mouse test)	Assenti*	La ricerca verrà eseguita solo in presenza di valori di pH e a_w compatibili con la crescita e la tossinogenesi di clostridi produttori di tossine botuliniche ($pH > 4,6$ e $a_w > 0,935$). Prelievo alla distribuzione da eseguire in 4-5 aliquote composte da una singola unità campionaria.

* Tali valori guida verranno gestiti come criteri di sicurezza.

UFC: Unità Formanti Colonia.

CNRB: Centro Nazionale di Riferimento per il Botulismo.

PCR: Polymerase Chain Reaction.

Tuttavia, tale determinazione non era del tutto appropriata ai fini della valutazione del rischio botulismo, poiché non tutti i ceppi di *Clostridium botulinum* e degli altri clostridi produttori di tossine botuliniche sono in grado di ridurre il solfito a solfuro (di ferro). Indipendentemente da tale determinazione analitica, qualora uno dei parametri chimico-fisici fosse risultato permissivo alla crescita e alla tossinogenesi, le analisi dovevano proseguire con la determinazione dei clostridi produttori di tossine botuliniche mediante PCR o *real-time* PCR e con la determinazione delle tossine botuliniche mediante saggio *in vivo* su topo. Queste ultime due determinazioni analitiche venivano solitamente eseguite in modo sequenziale per limitare al massimo l'impiego di animali da laboratorio, in ottemperanza alla normativa comunitaria e nazionale vigente. In caso esito negativo di PCR o *real-time* PCR, non era necessario effettuare la ricerca delle tossine botuliniche, poiché la loro rilevazione non sarebbe stata biologicamente plausibile, salvo nei casi di sospetta contaminazione deliberata dell'alimento (condizione che non rientrava nell'ambito del controllo ufficiale degli alimenti).

Piano microbiologico per il controllo delle conserve, delle semiconserve e dei REPFED

Con la pubblicazione, seppur in fase sperimentale, del Piano Nazionale per i controlli microbiologici sugli alimenti, le attività di campionamento e le conseguenti analisi di laboratorio da effettuare sulle categorie alimentari a rischio botulismo sono state radicalmente modificate, eliminando la necessità di determinare i clostridi produttori di tossine botuliniche e le tossine botuliniche (2). Sebbene questa scelta possa apparire in contrasto con i principi della legislazione alimentare che vietano l'immissione sul mercato di alimenti dannosi per la salute o inadatti al consumo umano, nonché con la necessità di mantenere un alto livello di guardia rispetto al rischio botulismo, essa trova giustificazione in solide evidenze scientifiche. In particolare:

- il naturale livello di contaminazione in spore di clostridi produttori di tossine botuliniche nelle materie prime e nei prodotti a rischio è molto basso (dell'ordine delle decine di spore per kg di prodotto);
- la distribuzione di questi microrganismi nel prodotto non è uniforme.

Questi due elementi sono stati recepiti anche dal DL.vo n. 27 del 2 febbraio 2021 che all'articolo 7 comma 2 recita:

“qualora l'esito delle analisi, prova o diagnosi da condurre non assicuri la riproducibilità dell'esito analitico, in considerazione della prevalenza e della distribuzione del pericolo negli animali o nelle merci, della deperibilità dei campioni o delle merci, come nel caso delle analisi microbiologiche finalizzate alla verifica dei criteri di sicurezza alimentare di cui alla normativa comunitaria e nazionale e per la ricerca di agenti patogeni negli altri settori di cui all'articolo 2, comma 1 del presente decreto, l'Autorità competente procede al prelievo del campione in un'unica aliquota specificando nel verbale di campionamento i relativi motivi che escludono la opportunità, la pertinenza o la fattibilità tecnica della ripetizione delle analisi o della prova”(3).

Non essendo possibile garantire al consumatore la salubrità di un alimento sulla base delle evidenze scaturite dall'analisi di un'unica aliquota di prodotto, la valutazione delle caratteristiche chimico-fisiche (pH e a_w), nonché di quelle tecnologiche (stabilità delle conserve poco acide) dei prodotti a rischio di botulismo rappresenta un sistema più solido di prevenzione e controllo della malattia.

Nel corso del 2026, anche grazie alle attività svolte sul campo nella fase sperimentale, la struttura inizialmente pensata per il campionamento e l'analisi di laboratorio dei prodotti a rischio botulismo ha subito alcune piccole variazioni.

Un'importante novità introdotta dal Piano Nazionale per i controlli microbiologici sugli alimenti, rispetto alle precedenti linee guida, è rappresentata dall'attività di campionamento che dovrà essere effettuata esclusivamente presso lo stabilimento di produzione, su prodotti finiti pronti per la commercializzazione, ma non ancora distribuiti (2). Questa scelta consente all'autorità competente di acquisire tutte le informazioni relative al processo di stabilizzazione della conserva, al fine di orientare l'attività analitica. In altri termini, per una conserva alimentare di origine vegetale acidificata con un agente acidificante consentito dalla normativa vigente e stabilizzata microbiologicamente mediante un trattamento termico di pastorizzazione o un trattamento equivalente, la conformità sarebbe legata esclusivamente al pH, che dovrebbe essere inferiore o uguale a 4,6. Diversamente, qualora il produttore optasse per la sterilizzazione al fine di preservare le caratteristiche organolettiche e sensoriali del prodotto evitando l'acidificazione, l'idoneità della conserva non sarebbe associata al pH, ma all'esito dei saggi di stabilità.

Per quanto riguarda la gestione dell'incertezza di misura, il Piano Nazionale per i controlli microbiologici sugli alimenti introduce un ulteriore elemento di novità. Generalmente, nell'analisi chimica degli alimenti è prassi consolidata fornire il giudizio di conformità del prodotto rispetto al limite prefissato, sottraendo al valore analitico determinato la sua incertezza di misura. Questa prassi si fonda sul fatto che, sottraendo l'incertezza di misura al valore misurato, si ottiene la certezza (oltre ogni ragionevole dubbio) che tale valore sia compreso nell'insieme di tutti i possibili valori che il misurando può assumere. A titolo di esempio, ripetendo più volte la misurazione del pH di una conserva si otterrebbero valori leggermente diversi tra loro. Da tali misure sarebbe possibile calcolare un valore medio e la relativa incertezza, ad esempio $\text{pH } 4,5 \pm 0,2$. Considerando il limite massimo di pH pari a 4,6, se si sommasse al valore misurato l'incertezza di misura, il limite verrebbe superato, invece, sottraendola, il limite non verrebbe superato e il prodotto verrebbe ritenuto conforme. Nel caso del botulismo, tuttavia, un approccio di questo tipo è stato ritenuto insufficientemente cautelativo, data la pericolosità della malattia e, pertanto, è stato prudenzialmente deciso di definire conforme un prodotto in base al valore misurato addizionato all'incertezza di misura.

Per esprimere i valori limite di pH e a_w che impediscono lo sviluppo e la tossinogenesi dei clostridi produttori di tossine botuliniche, sarebbe più corretto utilizzare una notazione con due cifre decimali per il pH e con tre cifre decimali per l' a_w . Per questa motivazione, nella Nota della Direzione Generale per l'Igiene e la Sicurezza Alimentare del Ministero della Salute n. 0029097-16/06/2026-DGISAN-MDS-P i valori limite sono espressi in questo modo (4). Tuttavia, le metodiche standard per la determinazione del pH e dell' a_w negli alimenti, accreditate dai laboratori ufficiali, prevedono l'espressione dei risultati con una cifra decimale per il pH e con due cifre decimali per l' a_w . Per tale ragione, nell'estratto delle analisi da condurre sulle conserve alimentari, in ottemperanza alle indicazioni del Piano Nazionale per i controlli microbiologici sugli alimenti, di cui alla Tabella 2, sono riportati i valori limite con una cifra decimale significativa per il pH e due per l' a_w .

Per comprendere meglio la Tabella 2 e i valori in essa contenuti, di seguito sono riportati esempi di conserve alimentari e i parametri da saggiare, con l'indicazione della conformità o della non conformità. A tal proposito, si ricorda che il giudizio di conformità non è emesso dal laboratorio ufficiale, bensì dall'autorità competente che ha effettuato il campionamento, che valuta i risultati analitici forniti dal laboratorio nel rapporto di prova (*vedi* Nota della Direzione Generale per l'Igiene e la Sicurezza Alimentare del Ministero della Salute n. 0019604-11/05/2021-DGISAN-MDS-P dell'11 maggio 2021) (5).

Tabella 2. Estratto delle analisi da condurre sui prodotti alimentari a rischio botulismo in ottemperanza alle indicazioni del Piano Nazionale per i controlli microbiologici sugli alimenti

Parametro	Metodi	Valori guida	Fase di prelievo	Note
pH	ISO 11289	$\leq 4,6^*$	Produzione	La determinazione del pH si applica solo alle conserve acide o acidificate stabilizzate mediante trattamento termico di pastorizzazione o trattamento equivalente. Tale determinazione è relativa alla valutazione del rischio di crescita e tossinogenesi dei clostridi produttori di tossine botuliniche. Prelievo di una singola unità campionaria. Determinazione da effettuare sulla stessa aliquota su cui verrà determinata l' a_w .
a_w	ISO 18787	$\leq 0,93^*$	Produzione	La determinazione dell' a_w si applica solo alle conserve in salamoia e alle conserve a bassa a_w (es. pesto sott'olio) stabilizzate mediante trattamento termico di pastorizzazione o trattamento equivalente. Tale determinazione è relativa alla valutazione del rischio di crescita e tossinogenesi dei clostridi produttori di tossine botuliniche. Prelievo di una singola unità campionaria. Determinazione da effettuare sulla stessa aliquota su cui verrà misurato il pH.
Stabilità	AFNOR NF V08-408	Conforme	Produzione	La stabilità si determina soltanto in conserve non acide o acidificate, ad alta a_w e in conserve a base di pomodoro sottoposte a trattamenti termici di stabilizzazione mediante appertizzazione (sterilizzazione commerciale) o a trattamenti equivalenti (es. HHP, riscaldamento omico). Prelievo da eseguire su 9 unità campionarie appartenenti allo stesso lotto senza alterazioni evidenti.

* La misura del parametro, sommata alla sua incertezza di misura, deve essere inferiore al valore guida.

ISO: *International Organization for Standardization*.

AFNOR: *Association française de normalisation*.

HHP: *High Hydrostatic Pressure*

Nel caso in cui l'autorità competente effettui il campionamento di una conserva alimentare poco acida ($\text{pH} > 4,6$) o ad alta *water activity* ($a_w > 0,93$), come, per esempio, il tonno in scatola, la carne in scatola o i piselli in vaso di vetro, deve richiedere la valutazione della sua stabilità. In questi prodotti, infatti, l'idoneità non dipende dai valori di pH o *water activity*, la cui determinazione non risulta necessaria, ma dall'esito dei saggi eseguiti con il metodo AFNOR NF V08-408 (6).

Nel caso di campionamento di una conserva acida o acidificata ($\text{pH} \leq 4,6$), come ad esempio una giardiniera, il parametro analitico da determinare sarà il pH. L'autorità competente dovrà pertanto chiedere al laboratorio di determinare tale parametro. Il laboratorio effettuerà i saggi analitici applicando il metodo ISO 11289:1993 ed esprimerà nel rapporto di prova il valore del

misurando, associato alla sua incertezza di misura, con una sola cifra decimale (33). Il prodotto sarà giudicato conforme dall'autorità competente se il valore del misurando, sommato alla sua incertezza di misura, risulterà inferiore o uguale a 4,6 (es. $4,2 + 0,1 = 4,3 \rightarrow$ prodotto conforme). Nel caso in cui il valore del misurando sommato alla sua incertezza di misura dovesse risultare maggiore a 4,6 il prodotto verrà giudicato non conforme (es. $4,6 + 0,1 = 4,7 \rightarrow$ prodotto non conforme).

Analogamente al pH, se l'autorità competente campionerà una conserva a bassa *water activity* ($a_w > 0,93$), come, per esempio, le acciughe sotto sale, il parametro da determinare in sede analitica sarà la *water activity*. Tale prodotto sarà conforme se il valore della *water activity*, sommato alla sua incertezza di misura, risulterà inferiore o uguale a 0,930 (es. $0,89 + 0,01 = 0,90 \rightarrow$ prodotto conforme) e non conforme se il valore di *water activity*, sommato all'incertezza di misura, risultasse maggiore o uguale a 0,930 (es. $0,94 + 0,01 = 0,95 \rightarrow$ prodotto non conforme).

Nella pratica industriale, il produttore adotta generalmente un valore di sicurezza inferiore al limite massimo consentito, per compensare le inevitabili variazioni che possono verificarsi nella lavorazione di grandi quantità di prodotto. Generalmente, per il pH si adotta un target tecnologico vicino a pH 4,2. Le informazioni dettagliate sulle prassi aziendali possono essere reperite dall'autorità competente, in occasione di ispezioni e audit, presso lo stabilimento di produzione, consultando il manuale di autocontrollo e la scheda tecnica del prodotto.

Le semiconserve e i REPFED sono caratterizzati da valori di pH e di *water activity* elevati, che teoricamente consentono lo sviluppo e la tossinogenesi dei clostridi produttori di tossine botuliniche. La loro sicurezza d'uso, a differenza delle conserve poco acide, non è garantita dall'applicazione di trattamenti termici di sterilizzazione, bensì dalla combinazione di più barriere (*hurdles*) e dalla conservazione a temperature di refrigerazione per tempi limitati. Per queste categorie di alimenti le determinazioni analitiche di pH, *water activity* e stabilità non forniscono informazioni utili ai fini della valutazione della sicurezza del prodotto. Analogamente, anche l'eventuale determinazione dei clostridi produttori di tossine botuliniche e delle tossine botuliniche perderebbe di significato, non potendo essere estesa all'intero lotto di produzione e ancor meno all'intera produzione effettuata con lo stesso processo produttivo. Per queste tipologie di prodotti è necessaria, infatti, la validazione del processo produttivo o del prodotto mediante un *microbial challenge test*, in grado di verificare l'efficacia delle misure adottate nel prevenire la crescita e la tossinogenesi dei clostridi produttori di tossine botuliniche.

Definizione di conserve, semiconserve e REPFED

Durante le discussioni del gruppo tecnico istituito dal Ministero della Salute per la redazione del Piano Nazionale per i controlli microbiologici sugli alimenti, è emersa la necessità di fornire le definizioni di conserve, semiconserve e REPFED. Tali definizioni sono riportate nella nota della Direzione Generale per l'Igiene e la Sicurezza Alimentare del Ministero della Salute n. 0029097-16/06/2026-DGISAN-MDS-P, come sotto riportato (4).

Conserve

Le conserve sono definite:

“prodotti alimentari confezionati in un recipiente ermetico ai gas, ai liquidi e ai microrganismi nelle normali condizioni d'uso, che hanno subito un trattamento termico o un altro trattamento equivalente, in grado di inattivare in modo irreversibile gli enzimi e di distruggere i microrganismi che possono alterare l'alimento o renderlo comunque non adatto al consumo umano” (4).

Le conserve sono stabili a temperatura ambiente e in etichetta si possono trovare le seguenti diciture: “conservare in luogo fresco ed asciutto, lontano da fonti di calore”; “conservare a temperatura ambiente”.

Generalmente per questi prodotti sono fornite anche le indicazioni di conservazione dopo l’apertura: “dopo l’apertura conservare in frigorifero”; “dopo l’apertura conservare in frigorifero a 2-4°C coperto con olio e consumare entro 2-3 giorni”; “dopo l’apertura conservare in frigorifero (< 4°C) e consumare entro 4 giorni”.

Esempi di conserve alimentari: carne o pesce in scatola, vegetali sottaceto, vegetali sottolio, concentrato di pomodoro, pomodori pelati, passata di pomodoro, ketchup, maionese, mostarda, senape, marmellate e confetture, frutta sciroppata, paté di olive, capperi sotto sale, olive in salamoia, pesto a lunga conservazione.

Semiconserve

Le semiconserve sono definite:

“prodotti alimentari trasformati, sottoposti a processi termici di pastorizzazione o a processi non termici, finalizzati ad aumentarne la conservabilità, in sinergia con le modalità di conservazione” (4).

Nelle etichette delle semi-conserve si possono trovare le seguenti diciture: “conservare in frigorifero a +4/6°C”, “conservare in frigorifero tra +4°C e +8°C”; “conservare in luogo refrigerato a temperatura inferiore a 5°C”; “conservare in luogo fresco preferibilmente max 18°C”; “conservare in luogo fresco ed asciutto, preferibilmente in frigorifero”; conservare in luogo fresco e asciutto”; “conservare a riparo dalla luce in luogo fresco, asciutto, pulito e senza odore”; “conservare in luogo fresco ed asciutto lontano da fonti di calore”.

Esempi di semi-conserve: acciughe marinate, acciughe sotto sale, olive verdi dolci, pesto refrigerato, bottarga refrigerata, hummus di ceci, sughi freschi refrigerati.

REPFED

I REPFED sono definiti:

“prodotti alimentari trasformati e processati, conservati in condizioni di refrigerazione per una durata prolungata (> 5 giorni)” (4).

Questi prodotti si presentano generalmente come piatti composti multi-ingrediente, confezionati.

I REPFED sono generalmente classificati in tre gruppi:

- *tipo 1*: prodotti sottoposti a pastorizzazione a 90°C per almeno 10 minuti (o trattamento termico equivalente), dopo il confezionamento, come purè di patate, vellutate, ratatouille;
- *tipo 2*: prodotti sottoposti a pastorizzazione a 70°C per almeno 2 minuti (o trattamento termico equivalente), dopo il confezionamento, come pesce tritato, pasta fredda, insalata di riso, varie tipologie di risotto, riso con pollo e curry;
- *tipo 3*: prodotti sottoposti a pastorizzazione in confezione aperta oppure pastorizzati in confezione chiusa poi riconfezionati dopo la pastorizzazione, come spezzatino di vitello con purè di patate, involtini di prosciutto con indivia belga, maccheroni con prosciutto e formaggio.

In funzione della tipologia di trattamento che viene richiesto al REPFED prima del consumo, questi prodotti possono ulteriormente essere classificati in:

- pronti al consumo (*ready to eat*), se non richiedono trattamenti termici aggiuntivi prima del consumo. Esempi di REPFED *ready to eat* sono gli snack confezionati (es. merendine ad elevato contenuto di umidità);
- da rigenerare (*ready to heat*), se necessita di un trattamento termico la cui entità, solitamente indicata in etichetta, consente l'abbattimento di 6 logaritmi (6D) di *Listeria monocytogenes*.
- da riscaldare (*ready to re-heat*) necessita di trattamenti termici aggiuntivi prima del consumo.

Per facilitare la corretta classificazione dei prodotti alimentari, è possibile utilizzare l'albero decisionale mostrato nella Figura 1.

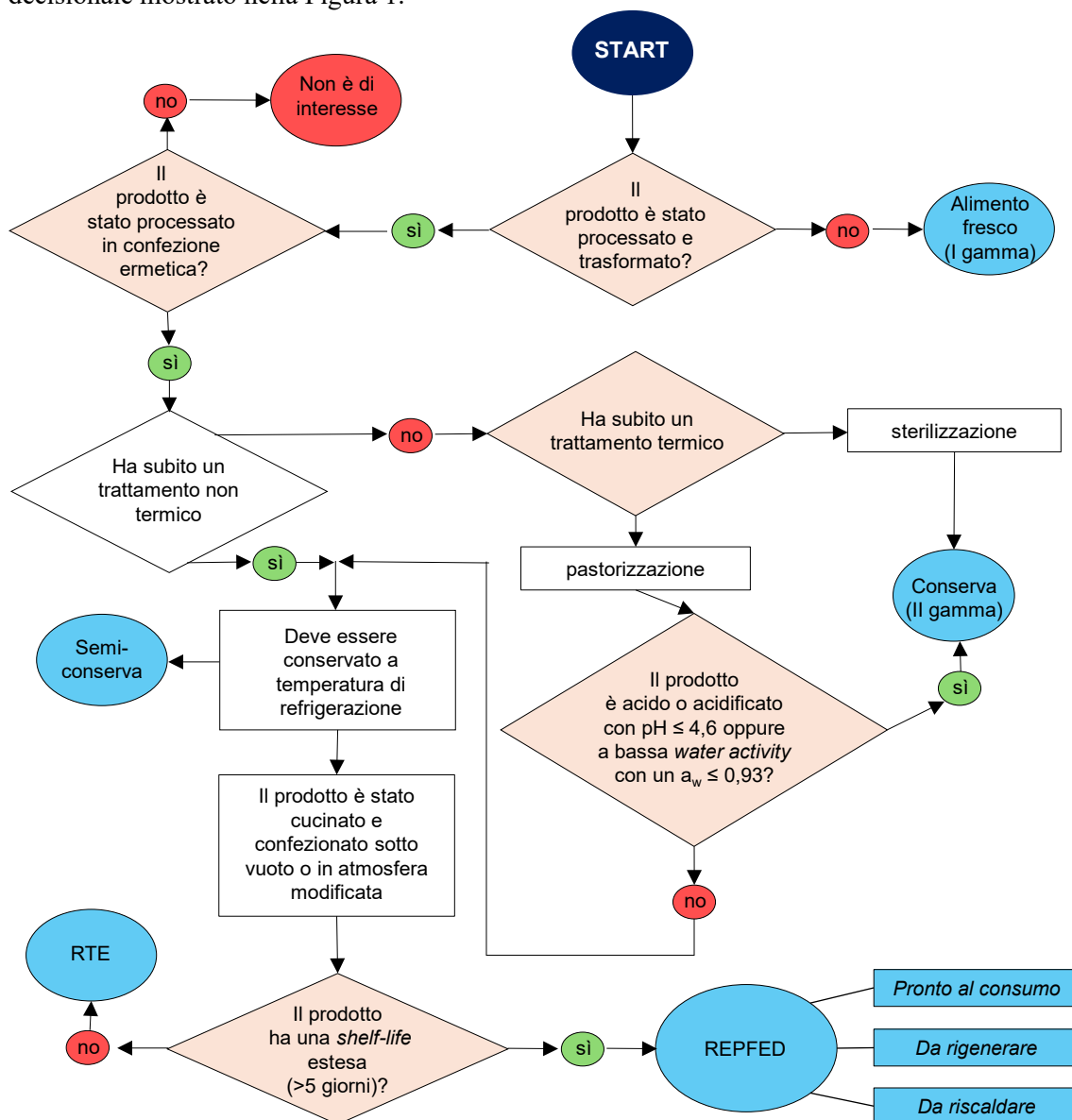


Figura 1. Albero delle decisioni per la corretta classificazione dei prodotti alimentari a rischio botulismo

Strategie di controllo degli alimenti in occasione di casi e focolai di botulismo

In termini di salute pubblica, ogni sospetto caso o focolaio di botulismo deve essere considerato un'emergenza. Dal momento che il botulismo è una malattia che genera allerta, il medico che pone il sospetto clinico, in ottemperanza alle prescrizioni di cui al Decreto del 7 marzo 2022 "Revisione del sistema di segnalazione delle malattie infettive (PREMAL)", ha l'obbligo di segnalarlo all'Azienda sanitaria entro dodici ore. Il personale dell'Azienda sanitaria preposto alla gestione del sistema informativo PREMAL deve registrare il caso entro 24 ore dalla segnalazione. Contemporaneamente alla segnalazione all'Azienda sanitaria, il sospetto clinico deve essere notificato alle altre strutture del Dipartimento di Prevenzione, per dare immediato avvio all'indagine epidemiologica finalizzata a identificare la causa, i fattori di rischio e la fonte dell'intossicazione, nonché a organizzare gli interventi di salute pubblica volti a prevenire ulteriori casi (7).

L'indagine epidemiologica deve essere condotta tempestivamente. Come indicato nel documento del 2017 "Botulismo e sicurezza alimentare: indirizzi operativi" di cui alla nota della Direzione Generale per l'Igiene, la Sicurezza degli Alimenti e la Nutrizione del Ministero della Salute n. 0028167-P-06/07/2017 (8).

Conduzione dell'indagine epidemiologica

L'indagine epidemiologica, soprattutto nei focolai di botulismo alimentare in cui si sospetta il coinvolgimento di prodotti industriali, richiede competenze multidisciplinari. Poiché le competenze necessarie per condurre un'indagine epidemiologica spesso coinvolgono diverse unità operative dell'Azienda sanitaria e personale esterno alla stessa, è fondamentale istituire un gruppo di lavoro in cui siano chiari i ruoli e la catena di comando e di responsabilità. Generalmente, i Dipartimenti di prevenzione delle aziende sanitarie sono organizzati con un idoneo sistema procedurale che definisce i componenti minimi e la struttura gerarchica di un gruppo multidisciplinare di pronto intervento. Nella maggior parte dei casi e dei focolai non è necessaria l'attivazione formale del gruppo multidisciplinare di pronto intervento, tuttavia, è fondamentale un coordinamento unico delle strutture che prendono parte all'indagine (8).

Il primo passo dell'indagine epidemiologica ha lo scopo di identificare tutti i casi e reperire quante più informazioni possibili. Questa fase, in alcuni casi, viene condotta a livello ospedaliero dal medico che, durante l'anamnesi, formula il sospetto diagnostico. In questa fase è fondamentale ricostruire la storia alimentare di tutti i soggetti coinvolti nel focolaio, prestando attenzione a tutti gli alimenti consumati fino a 8 giorni prima della comparsa dei primi segni o sintomi clinici. Nel caso in cui si accerti che la sintomatologia neurologica è stata preceduta da quella gastroenterica, gli 8 giorni devono essere conteggiati a partire dalla comparsa di quest'ultima. La tempestiva ricostruzione della storia alimentare dei malati è fondamentale, perché subito dopo la comparsa dei sintomi è maggiore la probabilità che il malato ricordi gli alimenti consumati. In questa fase, l'intervistatore non dovrebbe, almeno inizialmente, in alcun modo influenzare il ricordo del malato ponendo domande specifiche sul consumo degli alimenti a rischio botulismo. In questa fase i malati dovrebbero essere intervistati singolarmente per evitare che i ricordi di uno influenzino quelli di un altro (8).

Nella seconda fase dell'indagine epidemiologica si procede all'analisi dei segni e dei sintomi clinici raccolti, valutandone la tipologia e la frequenza di comparsa dopo l'assunzione dei pasti sospetti. Questi dati sono utili per la costruzione della curva epidemica, che viene utilizzata per stimare il periodo di esposizione all'alimento responsabile dell'intossicazione e il luogo in cui

l'alimento è stato consumato, qualora tali informazioni non siano emerse dall'anamnesi. Se questa fase viene condotta correttamente, i dati ottenuti possono essere analizzati statisticamente per stimare la probabilità di rischio associata a ciascun alimento consumato dalla coorte dei commensali. Combinando i dati di probabilità ottenuti per ciascun alimento con le caratteristiche chimico-fisiche e tecnologiche dei prodotti stessi, sarà possibile circoscrivere il numero di analisi di laboratorio necessarie per l'identificazione dell'alimento veicolo dell'intossicazione (8).

Per stimare la plausibilità biologica degli alimenti emersi dall'indagine epidemiologica è necessario considerare che affinché il consumo di un alimento rappresenti un rischio per il botulismo devono verificarsi le seguenti situazioni:

- le materie prime devono essere contaminate con le spore dei clostridi produttori di tossine botuliniche;
- le caratteristiche chimico-fisiche dell'alimento devono essere favorevoli alla germinazione delle spore, allo sviluppo cellulare e alla conseguente tossinogenesi;
- il prodotto deve essere stato consumato senza subire processi di sanificazione o deve aver subito processi di sanificazione insufficienti a disattivare le tossine botuliniche presenti.

Sono pertanto da considerarsi prodotti a rischio botulismo:

- le conserve poco acide o che hanno subito processi di acidificazione inefficaci ($\text{pH} > 4,6$), sia sott'olio che in acqua;
- le conserve in salamoia non acidificata che presentano un valore di $a_w > 0,93$;
- le creme e salse non opportunamente acidificate;
- le creme e salse non opportunamente sterilizzate;
- le conserve di produzione domestica o di produzione artigianale a vocazione "etnica";
- alcuni prodotti macrobiotici come seitan e tofu;
- i prodotti conservati mediante sottovuoto effettuato anche con apparecchiature di uso domestico;
- le spezie in olio e gli oli aromatizzati non opportunamente acidificati/disidratati;
- i prodotti freschi pronti al consumo per i quali la catena del freddo è stata interrotta per un periodo sufficiente a consentire lo sviluppo e la tossinogenesi dei clostridi produttori di tossine botuliniche.

Sono invece non a rischio botulismo i seguenti prodotti alimentari:

- alimenti freschi;
- alimenti opportunamente cotti prima del consumo;
- prodotti congelati, surgelati, gelati;
- conserve naturalmente acide o acidificate opportunamente;
- conserve in salamoia con $a_w \leq 0,93$;
- conserve di carne o di pesce sterilizzate;
- prodotti a base di carne additivati con nitriti e nitrati.

Contrariamente a quanto spesso riportato in letteratura, i prodotti contaminati da clostridi produttori di tossine botuliniche presentano caratteristiche sensoriali alterate (4). Purtroppo, le alterazioni possono essere percepite dal consumatore in modo soggettivo e risultare difficili da riconoscere come segnali di potenziale pericolo. Inoltre, la palatabilità di un prodotto può essere influenzata anche dalla presenza di spezie o di altri ingredienti che possono mascherare totalmente o parzialmente eventuali anomalie sensoriali. In certi casi il consumatore non conosce esattamente

le caratteristiche sensoriali del prodotto che sta consumando e non associa odori e sapori sgradevoli ad alterazioni potenzialmente pericolose per la salute. In altri casi, pur percependo odori o sapori insoliti, li considera caratteristiche specifiche del prodotto. Può accadere infine che le alterazioni vengano riconosciute, ma che la loro potenziale pericolosità viene considerata soltanto dopo diverse ore dal consumo.

Sulla base dei sintomi e dei segni clinici registrati, del luogo e del tempo di esposizione, nonché degli alimenti consumati, sarà possibile elaborare la definizione di caso, che dovrà prevedere la differenziazione tra caso confermato e caso probabile. La definizione di caso deve essere semplice, esplicita ed oggettiva. Nella sua formulazione è fondamentale trovare un adeguato equilibrio tra sensibilità e specificità. Una definizione sensibile consente di individuare la maggior parte dei casi di malattia, mentre una definizione specifica riduce il rischio di includere tra i casi persone che non hanno effettivamente sviluppato la patologia. Una definizione eccessivamente sensibile può determinare un aumento dei falsi positivi; al contrario, una definizione troppo specifica può portare a una sottostima del rischio associato a una determinata esposizione, riducendo la capacità di evidenziare eventuali associazioni epidemiologicamente significative (8).

Le attività svolte nelle prime due fasi dell'indagine epidemiologica consentono di formulare un'ipotesi descrittiva del focolaio. A tal fine, le informazioni e i dati epidemiologici devono essere combinati con le analisi sugli alimenti e con quelle ambientali, se pertinenti. Questa fase assume particolare rilevanza in caso di negatività di tutti gli alimenti saggiati, poiché permette di valutare la plausibilità dell'ipotesi epidemiologica formulata. In questo contesto è particolarmente importante verificare le modalità di produzione, preparazione e, se del caso, conservazione prima del consumo degli alimenti sospettati.

Qualora un alimento ritenuto epidemiologicamente plausibile risulti positivo per i clostridi produttori di tossine botuliniche ma negativo per la ricerca delle tossine, può essere utile ricorrere a uno studio analitico, come uno studio di coorte o uno studio caso-controllo, per rafforzare o confutare l'ipotesi investigativa. Gli studi di coorte si applicano a focolai in cui è coinvolta una piccola e ben definita popolazione e in cui è possibile identificare chiaramente i soggetti esposti e quelli non esposti. Se non è stato possibile ricostruire l'intera coorte, ma è stato possibile identificare tutti i casi, il confronto può essere effettuato con un gruppo di controllo, costituito da soggetti non affetti da botulismo e rappresentativi della popolazione da cui provengono i casi (8).

Analisi dei reperti alimentari

Nel caso in cui il malato si rechi in ospedale portando con sé il residuo dell'alimento consumato e ritenuto responsabile dell'intossicazione, oppure, presso l'abitazione, fossero rinvenuti dall'autorità sanitaria residui alimentari consumati dal malato o dai malati prima dell'esordio sintomatologico, tali campioni devono essere inviati al laboratorio e analizzati senza indugio.

A tal proposito, è utile ricordare che l'individuazione dei metodi e delle modalità di campionamento e di analisi, prova e diagnosi di laboratorio da utilizzare nel contesto dei controlli ufficiali e delle altre attività ufficiali deve avvenire in conformità a quanto previsto dall'articolo 34 del Regolamento (UE) 2017/625 e dal Capo IV, punto 2.2.1, della Comunicazione della Commissione relativa all'attuazione del Regolamento stesso. A tal proposito, i campioni devono essere prelevati, manipolati ed etichettati in modo da garantirne il valore legale e la validità scientifica e tecnica. Il reperto, per sua natura, non garantisce il valore legale dell'analisi, pur garantendone la validità scientifica e tecnica (9).

Nei reperti devono essere determinati i parametri chimico-fisici (pH e a_w), nonché i clostridi produttori di tossine botuliniche e le tossine botuliniche. Per la determinazione dei clostridi

produttori di tossine botuliniche è disponibile un metodo sviluppato dalla ISO: ISO/TS 17919:2013 “Microbiology of the food chain – Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens – Detection of botulinum type A, B, E, and F neurotoxin-producing clostridia” (10). In Italia, tuttavia, il Centro Nazionale di Riferimento per il Botulismo (CNRB) ha sviluppato, validato ed accreditato in accordo con la ISO 17025 (11), un metodo per la ricerca dei clostridi produttori di tossine botuliniche mediante *multiplex real-time* PCR. Il metodo sviluppato dal CNRB, rispetto alla norma ISO consente prestazioni superiori, consentendo l’identificazione alcune varianti non rilevabili con il metodo ISO. Inoltre, l’utilizzo di un controllo di processo dedicato consente di monitorare tutto il processo analitico dall’estrazione degli acidi nucleici fino all’esecuzione della *real-time* PCR, garantendo una maggiore affidabilità dei risultati (12).

Per quanto riguarda la determinazione delle tossine botuliniche, la metodica analitica attualmente in uso a livello nazionale si basa su un saggio *in vivo* (13). A livello ISO, da anni è attivo un gruppo di lavoro che sta sviluppando uno standard per la determinazione delle tossine botuliniche mediante saggi immunoenzimatici. Il metodo è previsto per il 2027/28. Successivamente alla pubblicazione di tale metodo sarà possibile adottare, anche a livello nazionale, un metodo *in vitro* per la determinazione delle tossine botuliniche.

Il documento “Botulismo e sicurezza alimentare: indirizzi operativi” stabilisce che i campioni alimentari in confezione aperta (reperiti) siano analizzati il prima possibile dal laboratorio del CNRB o da un laboratorio della rete degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IZS), purché questi ultimi siano in grado di garantire la ricezione del campione anche in giorni festivi, l’immediato inizio delle attività analitiche, nonché di fornire i primi risultati entro 30 ore dall’avvio delle analisi.

Fatta salva la tempestività con cui devono essere svolte le analisi, qualora sia possibile comunicare preventivamente all’OSA interessato la data, l’ora e il luogo di apertura del campione e di esecuzione delle analisi, si applicano le indicazioni riportate di seguito:

- campionamento presso l’abitazione domestica di alimento acquistato sfuso
→ avviso al rivenditore;
- campionamento presso l’abitazione domestica di alimento acquistato confezionato
→ avviso al rivenditore e al produttore indicato in etichetta;
- campionamento presso l’esercizio di somministrazione
→ avviso al rivenditore e al produttore indicato sull’etichetta.

Tale avviso dovrà essere dato a mezzo PEC e per comunicazione orale, ai sensi della normativa vigente.

Analisi dei campioni alimentari di produzione industriale in confezione integrale

Nel caso in cui, dalle indagini epidemiologiche e di laboratorio condotte su campioni clinici e residui alimentari, emerga il coinvolgimento di alimenti di produzione industriale, l’autorità competente ha la facoltà di effettuare, oltre alle attività di ispezione e audit, anche attività di campionamento per l’analisi di laboratorio. A tal proposito, generalmente vengono campionati prodotti appartenenti allo stesso lotto del reperto analizzato con esito positivo. Tali alimenti devono essere saggiati determinando gli stessi parametri chimico-fisici indicati nella Tabella 2. L’autorità competente può altresì richiedere, ai sensi dell’articolo 14 del Regolamento (CE) 178/2002, che gli alimenti oggetto di campionamento e analisi, oltre ad essere saggiati per i parametri di cui alla Tabella 2, siano analizzati anche per la determinazione dei clostridi produttori di tossine botuliniche e delle tossine botuliniche. In caso di esito analitico sfavorevole dei

parametri oggetto di controllo, la non conformità sarebbe considerata grave ai sensi dell'articolo 5 del DL.vo 27/2021 e s.m.i. (3, 14).

Considerato che la presenza di clostridi produttori di tossine botuliniche e tossine botuliniche rappresenta un rischio immediato per la salute umana, l'autorità competente deve procedere come indicato all'articolo 14 del Regolamento (CE) 178/2002.

Bibliografia

1. Italia. Intesa, ai sensi dell'articolo 8, comma 6, della legge 5 giugno 2003, n. 131, tra il Governo, le Regioni e le Province autonome di Trento e di Bolzano sul documento concernente "Linee guida relative all'applicazione del Regolamento (CE) n. 2073/2005 e successive modifiche ed integrazioni sui criteri microbiologici applicabili agli alimenti". *Rep. Atti n. 41/ CSR*, del 3 marzo 2016.
2. Ministero della Salute, Direzione Generale per l'Igiene e la Sicurezza degli Alimenti e la Nutrizione (DGISAN). *Indicazioni operative relative ai controlli ufficiali ai sensi del regolamento (UE) 2017/625*. Nota Prot. N. 0021355 del 22 maggio 2023
3. Italia. Decreto legislativo 2 febbraio 2021, n. 27 Disposizioni per l'adeguamento della normativa nazionale alle disposizioni del regolamento (UE) 2017/625, ai sensi dell'articolo 12, lettere a), b), c), d) ed e), della legge 4 ottobre 2019, n. 117. *Gazzetta ufficiale Serie Generale* n.60, del 11.03.2021.
4. Ministero della Salute, Direzione Generale per l'Igiene e la Sicurezza degli Alimenti e la Nutrizione (DGISAN). *Strategie per il controllo dei clostridi produttori di tossine botuliniche negli alimenti – Ulteriori chiarimenti*. Nota Prot. N 0029097 del 16/06/2026-DGISAN-MDS-P
5. Ministero della Salute, Direzione Generale per l'Igiene e la Sicurezza degli Alimenti e la Nutrizione (DGISAN). *Indicazioni per l'esecuzione delle attività di campionamento e analisi di matrici afferenti agli ambiti di cui all'articolo 2, comma 1 del decreto legislativo n. 27 del 2 febbraio 2021 nell'ambito dei controlli ufficiali di cui al regolamento (UE) 2017/625, in relazione alle disposizioni previste dal Decreto legge 22 marzo 2021 n. 42 "Misure urgenti sulla disciplina sanzionatoria in materia di sicurezza alimentare"* pubblicato sulla *Serie Generale* n. 72 della *GU* del 24 marzo 2021. Nota Prot. N. 0019604-11/05/2021-DGISAN-MDS-P.
6. AFNOR NF V08-408. *Microbiology of food and animal feeding stuffs. Control of stability of preserved and assimilated products. Routine method*. Paris: Association Française de Normalisation; 1997.
7. Ministero della Salute. Decreto del 7 marzo 2022. Revisione del sistema di segnalazione delle malattie infettive. *Gazzetta Ufficiale – Serie Generale* n. 82, del 7.4.2022.
8. Ministero della Salute, Direzione Generale per l'Igiene e la Sicurezza degli Alimenti e la Nutrizione (DGISAN). *Botulismo e sicurezza alimentare: indirizzi operativi*. Nota Prot. N.0028167-P-06/07/2017
9. Europa. Regolamento (UE) 2017/625 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 15 marzo 2017 relativo ai controlli ufficiali e alle altre attività ufficiali effettuati per garantire l'applicazione della legislazione sugli alimenti e sui mangimi, delle norme sulla salute e sul benessere degli animali, sulla sanità delle piante e sui prodotti fitosanitari. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 95/1, del 7.4.2017.
10. ISO/TS 17919. *Microbiology of the food chain – Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens – Detection of botulinum type A, B, E, and F neurotoxin-producing clostridia*; 2013. Geneva: International Organization for Standardization; 2013.
11. UNI CEI EN ISO/IEC 17025. *Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e taratura*; Milano: Ente Italiano di Normazione; 2018.

12. Centro Nazionale di Riferimento per il Botulismo. *CNRB31.013 - Metodo per la ricerca di clostridi produttori di tossine botuliniche mediante multiplex real-time PCR*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2023.
13. Centro Nazionale di Riferimento per il Botulismo. *CNRB30.013 - Metodo per la ricerca di clostridi produttori di tossine botuliniche e per la ricerca di tossine botuliniche (metodo colturale e mouse test)*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2023.
14. Europa. Regolamento (CE) n. 178/2002 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 28 gennaio 2002, che stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare. *Gazzetta ufficiale delle Comunità europee* L 31/1, del 1.2.2002

METODI ANALITICI PER LA DETERMINAZIONE DI pH, A_w E STABILITÀ DELLE CONSERVE

Yolande Thérèse Rose Proroga, Francesca Garofalo

Dipartimento di Coordinamento di Sicurezza Alimentare, Istituto Zooprofilattico Sperimentale del Mezzogiorno, Portici (NA)

Determinazione del pH nelle conserve alimentari

Nel presente capitolo vengono descritte le modalità operative per la determinazione del pH delle conserve alimentari, come descritto nella norma ISO 11289:1993 (1).

Il pH misura la differenza di potenziale (concentrazione idrogenionica) tra due elettrodi immersi in una matrice, alla temperatura di misurazione indicata. Si esprime in unità di pH.

Scopo e campo di applicazione

Definire le modalità operative per la misurazione potenziometrica del pH della fase acquosa di tutte le tipologie di conserve alimentari contenute in contenitori ermetici. Il monitoraggio del pH costituisce un Punto Critico di Controllo (*Critical Control Point*, CCP) fondamentale per verificare la stabilità biologica del prodotto e prevenire la proliferazione e la tossinogenesi dei clostridi produttori di tossine botuliniche (il cui limite critico di sicurezza è fissato a $\text{pH} \leq 4,6$).

Strumentazione e reagenti richiesti

Gli strumenti significativi per la conduzione del metodo sono:

- pH-metro digitale: dotato di sistema di compensazione automatica della temperatura, con risoluzione e accuratezza pari ad almeno 0,01 unità di pH;
- elettrodo combinato: idoneo alla matrice alimentare (ad es. elettrodo a penetrazione con giunzione aperta per carni/paste, o a contatto);
- omogeneizzatore da laboratorio: a lame, a rotore o peristaltico;
- imbuto separatore: per separare le fasi oleose;
- soluzioni tampone di calibrazione: certificate e tracciabili (tipicamente a pH 4,01 e pH 7,01);
- acqua di risciacquo: acqua distillata o deionizzata;
- soluzione di conservazione: specifica per l'elettrodo utilizzato.

Modalità di esecuzione

Taratura dello strumento (all'inizio di ogni seduta lavorativa)

Le modalità di taratura del pH-metro prevedono la seguente sequenza analitica:

- Accendere il pH-metro e sciacquare l'elettrodo con acqua distillata. Tamponarlo delicatamente con carta assorbente senza strofinare la membrana di vetro;
- Immergere l'elettrodo nella prima soluzione tampone (pH 7,01) e avviare la calibrazione automatica attendendo la stabilità della lettura;

- Risciacquare l'elettrodo e immergerlo nella seconda soluzione tampone (pH 4,01);
- Verificare i valori di pendenza (*slope*) e di potenziale di asimmetria (*offset*). L'errore deve rientrare rigorosamente nei limiti di tolleranza indicati dal costruttore.

Preparazione del campione (suddivisione in Classi ISO 11289)

I campioni da sottoporre ad analisi possono essere suddivisi nelle seguenti classi omogenee:

– *Classe 1*

Matrici liquide o pastose omogenee (es. liquidi di governo, succhi, vellutate, creme)

- Mescolare accuratamente per ottenere un prodotto omogeneo. Effettuare la misurazione immergendo direttamente l'elettrodo nel campione tal quale;

– *Classe 2*

Matrici pastose omogenee o eterogenee da omogeneizzare (es. maionese, pesti, paté)

- Omogeneizzare meccanicamente il prodotto.
- Se la consistenza ostacola il contatto dell'elettrodo, è consentito aggiungere acqua distillata in quantità minima e controllata (al massimo 10-20 mL per 100 g di prodotto, per evitare che l'aggiunta alteri il pH originario);

– *Classe 3*

Matrici solide o semisolidi con componenti in pezzi in mezzo acquoso (es. sottaceti, crauti, sughi con verdure/carne, zuppe)

- Prelevare una porzione che rappresenti proporzionalmente tutte le frazioni del prodotto. Sminuzzare e frullare fino a ottenere una pasta fluida e omogenea.
- Se sussiste il rischio di una penetrazione lenta dell'acidificante nei pezzi grandi, omogeneizzare e misurare separatamente i componenti solidi e la fase liquida. In ogni caso, l'omogeneizzazione deve avvenire senza surriscaldare la matrice (mantenere la temperatura < 25°C);

– *Classe 4*

Matrici con fase liquida prevalentemente oleosa o in emulsione acqua/olio (es. tonno sott'olio, sardine, conserve ittiche o vegetali sott'olio)

- Trasferire la fase liquida del barattolo nell'imbuto separatore. Far decantare, scartare la fase oleosa superiore e raccogliere l'eventuale fase acquosa sottostante. Raccogliere la parte solida, asciugare accuratamente l'olio residuo con carta assorbente ed omogeneizzare meccanicamente il solido (aggiungendo, se necessario, 10-20 mL di acqua distillata per 100 g per fluidificare).
- Effettuare le misurazioni sia sulla fase acquosa separata sia sull'omogenato della parte solida.

Misurazione potenziometrica

Per l'esecuzione della misura potenziometrica si segue la sequenza analitica riportata di seguito:

- Portare il campione o le sue fasi separate a una temperatura stabile (l'analisi va eseguita rigorosamente a $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$, come previsto dalle norme ISO);
- Inserire l'elettrodo nel campione garantendo il perfetto contatto con la membrana;
- Attendere la completa stabilizzazione del segnale sul display e registrare il valore;
- Pulire e risciacquare accuratamente l'elettrodo tra un campione e l'altro.

Criteri di accettabilità e ripetibilità

Affinchè le misure siano ritenute affidabili, devono essere soddisfatti i seguenti criteri di accettabilità:

- *Numero di repliche*
 - Eseguire le letture in doppio sulle matrici liquide/acquose omogenee e in triplo sugli omogenati solidi o complessi;
- *Limite di ripetibilità (r)*
 - Secondo la norma ISO 11289, la differenza assoluta tra le repliche eseguite in parallelo sullo stesso campione non deve superare 0,15 unità di pH. Se tale limite viene superato, la sessione di misura va annullata, lo strumento ricalibrato e l'analisi ripetuta migliorando la fase di omogeneizzazione.

Espressione dei risultati

Nell'espressione dei risultati è fondamentale attenersi alle indicazioni sotto riportate:

- *Approssimazione delle letture parziali*
 - Registrare i singoli valori letti dallo strumento, arrotondandoli alla più vicina unità di pH pari a 0,05;
- *Calcolo e output*
 - Calcolare la media aritmetica delle repliche conformi. Il risultato finale del rapporto di prova ufficiale deve essere espresso arrotondando a una sola cifra decimale (es. pH 4,3), in conformità con quanto prescritto dal metodo ufficiale ISO 11289.

Determinazione della *water activity* nelle conserve alimentari

Nel presente capitolo vengono descritte le modalità operative per la determinazione della *water activity* nelle conserve alimentari, come descritto nella norma AFNOR NF V08-408 (2).

Principio e campo di applicazione

La *water activity* (a_w) è un parametro fondamentale nella chimica e nella microbiologia degli alimenti. Essa misura la quantità di acqua libera e non vincolata, ossia la frazione di acqua non legata biochimicamente alla struttura del prodotto, disponibile per reazioni chimiche ed enzimatiche o per la proliferazione dei microrganismi.

A differenza dell'umidità, che indica la percentuale totale di acqua presente nel prodotto (sia libera che legata), l' a_w indica esclusivamente la frazione biologicamente attiva.

Dal punto di vista matematico, in conformità alla norma ISO 18787 (3), si esprime come il rapporto tra la pressione di vapore dell'acqua nell'alimento (P) e quella dell'acqua pura alla medesima temperatura (P0): è un numero adimensionale compreso tra 0 (alimento completamente disidratato) e 1 (acqua pura).

Fattori che influenzano l'acqua libera

Il livello di acqua libera presente in una matrice alimentare è determinato da una combinazione di fattori interni ed esterni:

- *Umidità iniziale e ambiente*
l'umidità iniziale del prodotto e il grado igrometrico dell'ambiente di confezionamento.
- *Stato fisico*
nei prodotti congelati l'acqua si trasforma in ghiaccio, perdendo la sua fluidità e non essendo più disponibile per gli scambi.
- *Sostanze leganti (soluti)*
la presenza di sale, zucchero e/o di idonei additivi specifici (es. acido tartarico, sorbitolo e glicerina) che trattengono strettamente le molecole d'acqua.
- *Parametri chimico-fisici*
l'acidità (pH) del prodotto e la temperatura di conservazione, che influenzano direttamente la tensione di vapore.

Il controllo dell' a_w è di fondamentale importanza per garantire la sicurezza alimentare, in quanto influisce direttamente sulla crescita microbica: la maggior parte dei batteri patogeni e alteranti si inibisce a valori di a_w inferiori a 0,90-0,91, mentre muffe e lieviti sono più tolleranti e possono proliferare fino a valori di 0,60-0,70.

Limiti di applicabilità ed esclusioni ufficiali

In accordo con i criteri metrologici della norma ISO 18787:2017, il metodo analitico standardizzato *non si applica* alle seguenti tipologie di matrici:

- prodotti conservati al di sotto del loro punto di congelamento (con formazione di ghiaccio strutturato);
- emulsioni complesse di tipo acqua in grasso (come il burro o le margarine stabili);
- prodotti cristallini puri o minerali isolati (es. zuccheri puri, sale da cucina o minerali allo stato puro).

Nota per sostanze volatili: Per i prodotti che contengono composti volatili diversi dall'acqua (es. alcoli o acido acetico ad alte concentrazioni), sono necessari adattamenti specifici o sensori dedicati (es. filtri al carbone attivo o sensori a diodo laser sintonizzabile) per evitare interferenze fisiche e letture errate sullo specchio ottico dello strumento.

Apparecchiature e reagenti

La dotazione strumentale del laboratorio deve soddisfare i seguenti requisiti minimi:

- *Misuratore di a_w*
Strumento basato sul principio del punto di rugiada (*chilled-mirror dew-point*), sulla variazione della conduttività elettrica di un elettrolita o sulla permittività elettrica di un polimero. Lo strumento deve avere una risoluzione interna di almeno 4 decimali (0,0001 unità di a_w) e un display con una risoluzione visiva di almeno 3 decimali (0,001 unità di a_w).
- *Camera di analisi termostata*
Integrata nell'apparecchiatura, capace di stabilizzare l'ambiente di prova a una temperatura controllata di $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$.

- *Omogeneizzatore da laboratorio*
Sistema meccanico (es. a lame o a rotore) per l'eventuale riduzione volumetrica del campione, a impulsi controllati.
- *Consumabili*
Vaschette cilindriche monouso, pulite e perfettamente asciutte, dotate di coperchi a tenuta per evitare scambi igrometrici con l'esterno.
- *Soluzioni standard certificate*
Soluzioni saline sature con valore di a_w noto, tracciabili ai campioni primari (es. NaCl, LiCl, ecc.).

Modalità operative e gestione del campione

Preparazione e condizionamento termico

La manipolazione del campione deve garantire l'assoluta rappresentatività della porzione analizzata rispetto al lotto originario, impedendo modifiche involontarie allo stato igrometrico prima del test.

Per la preparazione del campione è necessario attenersi alle indicazioni sotto riportate:

- *Uso dei contenitori*
Utilizzare tassativamente vaschette monouso, pulite e asciutte, per evitare contaminazioni crociate. Il campione deve essere inserito in modo da coprire interamente il fondo, senza superare la metà (50%) della capacità volumetrica della vaschetta, per evitare il contatto con i sensori superiori.
- *Stabilizzazione termica*
Se la conserva proviene da un campionamento in magazzino (es. a 15°C) o da un frigorifero, il campione all'interno della vaschetta chiusa deve essere lasciato stabilizzarsi termicamente fino a raggiungere la temperatura ambiente della camera dello strumento (25°C) prima di avviare il test. Le fluttuazioni termiche sono la principale causa di errore strumentale nell'analisi dell'acqua libera.
- *Velocità di esecuzione*
Il trasferimento del campione dal contenitore originale della conserva alla vaschetta dello strumento deve avvenire nel minor tempo possibile. Se il campione rimane esposto all'aria del laboratorio, scambierà umidità con l'ambiente (assorbendola o perdendola per evaporazione), falsando il risultato.
- *Controllo dell'omogeneizzazione*
Attenzione al surriscaldamento del prodotto durante l'eventuale fase di triturazione meccanica. Il calore provoca l'evaporazione immediata dell'acqua libera, riducendo artificialmente il valore finale di a_w . È consigliabile utilizzare un mixer da laboratorio impostato su impulsi brevi e ripetuti.
- *Tempi di stoccaggio*
I campioni preparati per la lettura possono essere conservati fino a un massimo di 4 ore, purché inseriti in contenitori sigillati con coperchio ermetico ed evitando sbalzi termici o l'esposizione alla luce solare.

Procedure specifiche per tipologia di conserva

Nel caso specifico delle conserve alimentari (che spesso uniscono parti solide a liquidi di governo, oli, salse o sciroppi), la preparazione richiede protocolli standardizzati per evitare letture errate:

- *Conserve omogenee o semifluide (es. passate, salse, sughi omogenei, maionese, pesto)*
Il prodotto va semplicemente mescolato con cura e delicatezza prima del prelievo per ridistribuire l'umidità in modo uniforme. Nel caso di emulsioni stabili (es. maionese o pesto), il tempo di lettura potrebbe risultare decisamente più lungo del consueto, poiché la matrice grassa rallenta l'azione del sensore e la liberazione del vapore nello spazio di testa.
- *Conserve sott'olio (es. tonno, funghi, carciofini)*
L'olio libero può depositarsi sul sensore ottico o sul polimero dello strumento, formando un film impermeabile che impedisce il passaggio del vapore acqueo. Va rimosso seguendo questi tre step:
 1. *Sgrondo dell'olio*: separare la frazione solida da quella liquida utilizzando un setaccio da laboratorio o un imbuto idoneo.
 2. *Rimozione dei residui superficiali*: tamponare delicatamente la superficie della porzione solida isolata con carta assorbente pulita, senza esercitare una pressione eccessiva che potrebbe provocare la fuoriuscita di liquidi interni.
 3. *Omogeneizzazione*: sminuzzare la frazione solida ripulita a impulsi brevi prima di trasferirla nella vaschetta.
- *Conserve sottaceto e in salamoia (es. cetriolini, olive, giardiniera)*
La fase liquida partecipa all'equilibrio osmotico con la fase solida, ma generalmente non viene consumata insieme all'alimento. Si può procedere secondo due standard:
 1. *Approccio a Prodotto Completo*: per determinare la stabilità e la sicurezza complessiva della conserva, prelevare una quota proporzionale di solidi e liquidi e omogeneizzarli fino a ottenere un campione omogeneo.
 2. *Approccio a Frazione Separata*: scolare rapidamente il liquido di governo, prelevare esclusivamente la matrice solida risultante dalla filtrazione, triturlarla e sottoporla a misurazione immediata.
- *Conserve in liquido di governo (es. tonno al naturale, pomodori pelati)*
Agitare energicamente il contenitore commerciale sigillato prima di aprirlo. Questo consente un'adeguata e corretta miscelazione del liquido di governo con la parte solida. Successivamente, prelevare l'aliquota di campione per la misurazione.
- *Caso particolare: conserve alcoliche (es. frutta sotto spirito, babà al rum)*
L'alcol è un composto altamente volatile che evapora rapidamente e interferisce in modo significativo con i sensori tradizionali a specchio freddo (*chilled mirror*) o capacitivi. Pertanto, questi campioni vanno gestiti in manipolazione ermetica: macinare o mescolare il prodotto esclusivamente in contenitori ermetici chiusi per evitare la volatilizzazione precoce dei vapori alcolici. Utilizzare obbligatoriamente strumenti dotati di sensori a diodo laser sintonizzabile), oppure impiegare filtri selettivi al carbone attivo approvati dal produttore per bloccare l'alcol prima che raggiunga la camera di lettura.

Taratura, verifica e criteri di accettabilità

Prima di effettuare qualsiasi sessione di misurazione sul campione, è obbligatorio verificare la stabilità dello strumento:

- *Controllo a due punti*
Eseguire un controllo di routine utilizzando almeno 2 soluzioni standard sature certificate, con valori analitici analoghi e limitrofi a quello atteso per la tipologia di matrice in esame. Leggere sempre per primo lo standard con il valore di a_w più basso, per minimizzare gli effetti di isteresi del sensore.
- *Soglia di accettabilità*
Lo scostamento massimo ammesso tra il valore letto e il valore nominale dello standard certificato è pari a $\pm 0,005$ unità di a_w .
- *Azioni correttive*
Se le letture degli standard non risultassero conformi ai limiti di accettabilità:
 - sospendere le sessioni analitiche;
 - effettuare la pulizia profonda della camera e dello specchio ottico secondo le istruzioni del manuale d'uso;
 - ripetere il test degli standard. Se i valori risultassero ancora fuori range, procedere con le operazioni formali di calibrazione e di aggiustamento del software dello strumento.

Espressione dei risultati e criteri statistici

La lettura di ogni campione va eseguita rigorosamente in *doppio (duplicato analitico)*, effettuando due preparazioni indipendenti dello stesso lotto e verificando il rispetto dei *limiti di precisione indicati dalla ISO 18787, in particolare la ripetibilità (r)*: la differenza assoluta tra i due risultati analitici individuali, ottenuti in condizioni di ripetibilità dallo stesso operatore, non deve superare il limite critico di $\pm 0,01$ unità di a_w . Se lo scostamento è maggiore, la sessione va annullata e l'analisi va ripetuta.

Espressione formale del dato

Il risultato finale dell'analisi è espresso come la media aritmetica dei due valori di lettura rilevati. Il dato finale ufficiale deve essere arrotondato e riportato a *2 cifre decimali*.

Determinazione della stabilità delle conserve alimentari

Introduzione e definizioni

Conserve sterili e sterilità commerciale

Si definiscono conserve sterili i prodotti alimentari confezionati in un recipiente ermetico ai gas, ai liquidi e ai microrganismi nelle normali condizioni d'uso. Tali prodotti hanno subito un trattamento termico o un processo equivalente, in grado di inattivare irreversibilmente gli enzimi e di distruggere i microrganismi in grado di alterare l'alimento o di renderlo non idoneo al consumo umano.

Poiché un trattamento termico eccessivamente spinto altererebbe sapore, colore, consistenza e valore nutrizionale del cibo, nell'industria alimentare si parla comunemente di sterilizzazione commerciale, che consente di ottenere un prodotto sicuro e a lunga conservazione senza comprometterne la qualità organolettica e nutrizionale.

Si definiscono conserve commercialmente sterili quei prodotti nei quali:

- l'applicazione del calore rende gli alimenti privi di microrganismi in grado di replicarsi nelle normali condizioni di conservazione e distribuzione non refrigerata, nonché privi di microrganismi vitali rilevanti per la salute pubblica;
- oppure, la combinazione tra calore e controllo dell'attività dell'acqua (a_w) rende gli alimenti privi di microrganismi capaci di riprodursi nelle condizioni normali di conservazione e di distribuzione non refrigerate.
- nelle conserve commercialmente sterili è possibile la presenza di microrganismi vitali, a patto che non possano replicarsi (senza quindi causare alterazioni fisiche o chimiche nel prodotto) e che sia totalmente esclusa la presenza o la proliferazione di patogeni.

Presenza tollerata di microrganismi vitali

I microrganismi vitali possono essere presenti senza compromettere la sterilizzazione commerciale in tre casi specifici:

- batteri sporigeni termofili obbligati conservati al di sotto dell'intervallo di temperatura termofila.
- alimenti ad alta acidità ($\text{pH} < 3,7$) o acidi (pH da 3,7 a 4,6) in cui microrganismi intolleranti all'acido non riescono a crescere.
- batteri sporigeni mesofili o termofili negli alimenti in cui si combinano il calore e il controllo dell'attività dell'acqua per prevenirne lo sviluppo.

Attrezzature, materiali e tecniche asettiche

Per le indagini colturali e diagnostiche sono necessari i seguenti materiali:

- cappa a flusso laminare;
- apriscatole speciale per uso batteriologico (*Bacti-Disc Cutter*): indispensabile per aprire asetticamente le scatole metalliche senza deformare le doppie aggraffature. È espressamente vietato l'uso di apriscatole comuni da cucina per evitare contaminazioni accidentali;
- incubatore regolato a $37^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$;
- incubatore regolato a $55^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$;
- pH-metro con precisione di lettura di $\pm 0,01$ unità di pH e risoluzione di $\pm 0,1$ unità di pH a 25°C ;
- microscopio ottico con obiettivi a $40\times$ e $100\times$ a immersion;
- terreni di coltura e reagenti;
- dispositivi di Protezione Individuale da indossare prima di aprire contenitori gonfi o sospetti.

Per verificare la stabilità delle conserve, è necessario distinguere due categorie in base al pH:

- *Categoria 1*
Conserve alimentari e prodotti assimilati con $\text{pH} \geq 4,5$ (es. legumi, prodotti a base di carne o pesce, prodotti a base di pomodoro, salse o zuppe addizionate di amido).
- *Categoria 2*
Conserve alimentari e prodotti assimilati con $\text{pH} < 4,5$ (es. frutta, marmellate, maionese).

Campionamento ed esame preliminare

Dallo stesso lotto si selezionano campioni privi di alterazioni evidenti:

- almeno 3 campioni per i prodotti di Categoria 1;
- almeno 2 campioni per i prodotti di Categoria 2.

Per ogni campione occorre annotare le caratteristiche del confezionamento, la presenza di deformazioni o ammaccature preesistenti e le informazioni riportate sull'etichetta.

Contestualmente alla verifica dell'integrità del contenitore, prima della sua apertura, è necessario procedere alla pulizia esterna.

Condizioni di Incubazione

I campioni vengono disposti su carta assorbente nella posizione più idonea per rivelare eventuali fuoriuscite di liquido (es. incubando le conserve capovolte) e sottoposti a incubazione per 7 giorni:

- almeno 1 campione a temperatura ambiente per 7 giorni;
- almeno 1 campione a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ per 7 giorni;
- almeno 1 campione a $55^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ per 7 giorni (esclusivamente i campioni di Categoria 1; anche i campioni di Categoria 2, se richiesto in particolari casi, come per controlli di import/export).

Quotidianamente, i campioni devono essere osservati, prestando particolare attenzione a ritirare immediatamente quelli che presentano alterazioni esterne evidenti. Al termine dei 7 giorni, i campioni vengono posti a temperatura ambiente fino al raggiungimento dell'equilibrio termico e ne viene valutato l'aspetto esterno (assenza di bombaggio, afflosciamenti, perdite o percolamenti).

Analisi interna del campione

Per i prodotti liquidi o semiliquidi: miscelare accuratamente il contenuto prima del campionamento. Questo può essere ottenuto capovolgendo il contenitore per almeno 20-30 volte subito prima di aprirlo.

Contenitori senza alterazioni esterne

Sui campioni che non presentano alterazioni esterne si procede all'apertura per verificare la presenza di variazioni di odore, colore, aspetto o consistenza.

Tecniche di apertura asettica

Per aprire asetticamente il campione è necessario attenersi alle indicazioni riportate di seguito:

– Lattine metalliche

Fiammeggiare l'estremità pulita della scatola sopra la fiamma di un becco bunsen fino all'evaporazione dell'umidità, fiammeggiare il *Bacti-Disc Cutter* o utensile simile, praticare un foro sul coperchio a una distanza compresa di circa 6 mm dalla doppia aggraffatura, al fine di consentire un campionamento adeguato del contenuto e facilitare la successiva prova del vuoto per micro-perdite ed asportare il disco metallico (in caso di apertura facilitata *easy-open*, aprire dall'estremità opposta). Per disinfettare un apriscatole dopo l'uso per un riutilizzo immediato: rimuovere eventuali residui di prodotto, immergere l'intera punta in una soluzione acquosa di etanolo al 70% e fiammeggiare l'intera estremità. Prima di riutilizzarlo, lasciarlo raffreddare sotto una cappa a flusso laminare. La

disinfezione può anche essere effettuata mediante immersione nella soluzione disinfettante per almeno 20 minuti. Dopo l'estrazione, lasciare asciugare all'aria in un flusso laminare o alla fiamma.

- *Vasi di vetro*
Fare pressione tra il tappo e il vetro per verificare la tenuta; immergere il collo del vaso nella soluzione disinfettante (es. cloro a 100 ppm) per 10 min.
- *Buste (pouch) flessibili*
igienizzare la superficie, asciugare, spingere il prodotto lontano dall'estremità e tagliare sotto la sigillatura con forbici sterilizzate alla fiamma.
- *Contenitori gonfi*
Inserire il contenitore in un sacchetto di plastica sterile e, tenendo saldamente l'estremità aperta del sacchetto attorno all'asta dell'apricatole, forare il contenitore. Non rimuovere il contenitore finché non si è completamente sgonfiato.

Esame organolettico

Esaminare il prodotto per verificare la presenza di odori anomali o altre evidenze di alterazione (es. formazione di schiuma, cagliatura, alterazione del colore naturale del prodotto, ecc.), senza assaggiarlo. Tutte le osservazioni vanno annotate nell'apposito registro.

Misurazione del pH

Si effettua secondo la metodica ISO 11289:1993, confrontando i valori del campione mantenuto a temperatura ambiente con quelli dei campioni incubati a 37°C e 55°C.

Esame microscopico

Da eseguire *esclusivamente* sui campioni con alterazioni organolettiche, con variazioni di pH comprese tra 0,3 e 0,5 unità, oppure su confezioni di grande formato (peso netto 1,5 kg). Si allestisce uno striscio di una goccia di liquido (o, per i solidi, per apposizione), si colora e si esamina al microscopio, contando la flora microbica in *almeno 20 campi microscopici* per calcolarne la media.

Si raccomandano i coloranti violetto di genziana (cristal violetto) o la carbofucsina di Ziehl-Neelsen. I prodotti con un alto contenuto di solidi nella porzione liquida spesso resistono all'adesione al vetrino e possono essere diluiti in modo vantaggioso con volumi approssimativamente uguali di acqua distillata sterile direttamente sul vetrino. Per effettuare gli strisci si può utilizzare un'ansa batteriologica. È necessario esaminare sia il prodotto sottoposto a test sia un prodotto di controllo normale (tenuto a temperatura ambiente) per consentire una valutazione della presenza di livelli anomali di microrganismi nel primo.

Interpretazione dei risultati ed espressione del giudizio finale

Criteri di conformità per la stabilità microbiologica

I campioni in esame sono considerati in *stabilità microbiologica* se soddisfano contemporaneamente i seguenti requisiti:

- *Assenza di alterazioni e deformazioni* della confezione (assenza di bombaggi, perdite, ecc.);

- *Assenza di alterazioni organolettiche* di odore, aspetto e consistenza (variazioni di colore nei campioni incubati a 55°C sono tollerate se dipendenti esclusivamente dal trattamento termico d'incubazione);
- *Differenza di pH* tra il campione a temperatura ambiente e quelli incubati 0,5 di pH;
- *Flora microbica assente o minima* all'esame microscopico. Un incremento della popolazione microbica superiore a 100 volte indica una perdita di stabilità.

Ulteriori prove microbiologiche

In caso di stabilità microbiologica non confermata, il laboratorio può approfondire la diagnosi eseguendo prove supplementari, quali ad esempio:

- Numerazione degli anaerobi solfito-riduttori;
- Numerazione di *Clostridium perfringens*;
- Numerazione di muffe e lieviti.

Espressione del risultato finale

Al termine di tutte le verifiche analitiche e delle prove d'incubazione, il giudizio finale sul rapporto di prova viene espresso formalmente come: “stabile”, “non stabile”.

Alterazioni non microbiche: enzimi termoresistenti

La liquefazione di prodotti a base di amido (come budini e salse trattati con processi HTST, *High Temperature Short Time*) può essere causata da enzimi microbici termostabili (es. α -amilasi) residui nelle materie prime. Questi conferiscono al prodotto un aspetto liquescente, con la comparsa di materiale gelatinoso trasparente che può avere odori sgradevoli. Talvolta il contenitore appare bombato. All'esame analitico, il saggio di sterilità risulterà idoneo, poiché non saranno evidenziati microrganismi vitali né verranno osservate cellule microbiche al microscopio. Tuttavia, il prodotto risulterà conforme dal punto di vista microbiologico, pur essendo inaccettabile per il consumatore dal punto di vista organolettico e sensoriale.

Bibliografia

1. ISO 11289. *Heat-processed foods in hermetically sealed containers – Determination of pH*. Geneva: International Organization for Standardization 1993
2. AFNOR NF V08-408. *Microbiology of food and animal feeding stuffs. Control of stability of preserved and assimilated products. Routine method*. Paris: Association Française de Normalisation; 1997.
3. ISO 18787. *Foodstuffs – Determination of water activity*. Geneva: International Organization for Standardization 2017.

CHALLENGE TEST PER *LISTERIA MONOCYTOGENES* NEGLI ALIMENTI *READY-TO-EAT*

Angelo Cerrella, Maria Luisa Danzetta, Ercole Del Nigro, Francesco Pomilio, Marina Torresi
Laboratorio Nazionale per Listeria monocytogenes, Istituto Zooprofilattico Sperimentale dell'Abruzzo e del Molise, Teramo

Introduzione

Listeria monocytogenes è un patogeno di particolare rilevanza per la sicurezza degli alimenti pronti al consumo (*Ready-To-Eat*, RTE), destinati al consumo diretto senza subire cottura o trattamenti in grado di eliminare o ridurre ad un livello accettabile il numero dei microrganismi. In conformità al Regolamento (CE) 2073/2005 (art. 3, par. 2, e Allegato II) gli Operatori del Settore Alimentare (OSA) sono tenuti a condurre, ove necessario, specifici studi per monitorare la sopravvivenza o la crescita del batterio lungo l'intera vita commerciale (*shelf-life*) del prodotto. Tali valutazioni possono integrare differenti approcci metodologici – tra cui la caratterizzazione chimico-fisica, i dati storici, la letteratura scientifica, la microbiologia predittiva, i challenge test e gli studi di durabilità – opportunamente modulati in base alle caratteristiche specifiche dell'alimento (1, 2).

Il quadro tecnico di riferimento è costituito da tre documenti complementari: il documento guida della Commissione europea SANCO/11510/2013 (revisione del 18 dicembre 2025), rivolto a OSA e Autorità Competenti (2); il *Technical Guidance Document* dello *European Union Reference Laboratory Listeria monocytogenes* (EURL *Lm*) (versione 4 del 1° luglio 2021, Amendment 1 del 26 febbraio 2026; di seguito TGD), dedicato alla progettazione e alla conduzione di *challenge test* e studi di durabilità (3); il TGD dell'EURL *Lm* (versione 3 del 10 febbraio 2023; di seguito GD) per la valutazione della competenza dei laboratori (4). I documenti vanno letti insieme alla norma EN ISO 20976-1 (5). Il presente contributo ne sintetizza i concetti fondamentali e rimanda ai documenti originali, i cui collegamenti sono riportati in Bibliografia, per i dettagli operativi.

Dal 1° luglio 2026 si applica il Regolamento (UE) 2024/2895, che revisiona il criterio per gli alimenti RTE in grado di supportare la crescita di *L. monocytogenes*: il criterio 1.2a (100 UFC/g) si applica se l'OSA dimostra, in modo soddisfacente per l'Autorità Competente, che tale limite non sarà superato durante la *shelf-life*; in caso contrario si applica il criterio 1.2b (*Lm* non rilevata in 25 g) (6, 2). Ciò rafforza la necessità che i challenge test siano progettati, condotti e interpretati con rigore metodologico.

Caratterizzazione dell'alimento e studi preliminari

La caratterizzazione dell'alimento è il presupposto per stabilire se un challenge test sia necessario, quale tipologia di studio scegliere e come progettarlo. L'OSA deve fornire al laboratorio le informazioni necessarie per identificare i fattori che condizionano la crescita di *L. monocytogenes*, le fonti di variabilità e lo scenario più cautelativo (*worst-case*) (2, 4).

Prodotto RTE, *shelf-life* e informazioni preliminari

La classificazione RTE si basa sull'uso previsto e sulle istruzioni al consumatore. La *shelf-life* microbiologica è il periodo entro il quale il prodotto resta sicuro nelle condizioni ragionevolmente prevedibili di conservazione, distribuzione e uso, inclusa, ove pertinente, la fase successiva all'apertura; per prodotti venduti sfusi o al banco il protocollo deve simulare il confezionamento e la presentazione effettivamente previsti (2, 3).

Prima dello studio l'OSA dovrebbe fornire un dossier tecnico comprendente: identificazione del prodotto ed eventuale famiglia di appartenenza; stato (nuovo prodotto o già commercializzato); formulazione e additivi con effetto sulla crescita microbica; fasi di processo rilevanti per inattivazione o ricontaminazione; confezionamento (aria, vuoto, atmosfera modificata e composizione dei gas); *shelf-life* e condizioni di conservazione dichiarate; profilo tempo/temperatura lungo la catena del freddo; caratteristiche chimico-fisiche (almeno pH e *water activity*, a_w) e microbiologiche con la relativa variabilità; Paesi di commercializzazione (3, 4).

Fattori di crescita e variabilità del prodotto

La crescita di *L. monocytogenes* è determinata dall'interazione tra fattori intrinseci (pH, a_w , NaCl o sale in fase acquosa, acidi organici, conservanti, struttura, microflora di fondo) ed estrinseci (temperatura, durata della conservazione, atmosfera, confezionamento). Ai sensi del Regolamento (CE) 2073/2005, un alimento è considerato non in grado di supportare la crescita di *L. monocytogenes* se rispetta almeno uno dei seguenti criteri chimico-fisici o temporali: prodotti con $\text{pH} \leq 4,4$ oppure $a_w \leq 0,92$, con $\text{pH} \leq 5,0$ e $a_w \leq 0,94$, oppure con *shelf-life* inferiore a cinque giorni. Negli altri casi occorre valutare l'effetto combinato dei diversi fattori che ostacolano la crescita ed eventualmente ricorrere a ulteriori studi (2).

Poiché il challenge test deve rispecchiare le condizioni realisticamente più favorevoli alla crescita del patogeno (*worst-case scenario*), è essenziale caratterizzare la variabilità della matrice prima dell'avvio della prova. A tale fine il TGD raccomanda l'analisi di almeno cinque campioni per ciascuno dei tre lotti distinti (prodotti in tre occasioni differenti), riportando per ciascun parametro il numero di osservazioni, la media, la deviazione standard e l'intervallo di confidenza. Infine, per i prodotti fermentati, stagionati o multicomponente, occorre considerare che parametri chiave come pH e a_w possono oscillare nel tempo o presentare disomogeneità spaziali tra superficie e interno del prodotto (2, 3).

Scenario *worst-case* e prodotti multicomponente

Per matrici alimentari assimilate o rientranti nella stessa categoria, è consentito effettuare il challenge test su un singolo prodotto rappresentativo. Tale scelta deve essere opportunamente giustificata sulla base dei parametri rilevanti per la sopravvivenza e crescita di *L. monocytogenes* (pH, a_w , conservanti, confezionamento, microflora, processo, *shelf-life* e modalità di conservazione). Il prodotto selezionato deve garantire la combinazione di fattori ragionevolmente più favorevoli allo sviluppo del patogeno (*worst-case scenario*), a prescindere dai volumi di vendita o dalla quota di mercato (2). Nei prodotti multicomponente si esamina la componente più permissiva se gli ingredienti non interagiscono; se invece interagiscono, l'interfaccia diventa il punto critico per inoculo, come per la misurazione dei parametri chimico-fisici e l'interpretazione dei risultati (3).

Dati storici, letteratura e microbiologia predittiva

I dati storici dell'OSA servono a descrivere la variabilità e a verificare che le condizioni validate siano mantenute, ma vanno usati con cautela come strumento di validazione (2). La letteratura è utilizzabile solo previa verifica critica della trasferibilità al prodotto in esame. I modelli predittivi, preferibilmente basati su dati estrapolati dalla matrice alimentare, devono essere usati da personale competente entro il loro dominio di validità, documentando software e versione, input, ipotesi e incertezza, e senza fare affidamento su lunghe fasi di latenza non giustificate (2).

Scelta dello strumento di *shelf-life*

Il TGD non impone un unico strumento analitico o predittivo: bensì richiede che la scelta metodologica muova dal quesito di sicurezza specifico e dal quadro di evidenze già disponibili. Spetta all'OSA dimostrare e giustificare l'adeguatezza dello strumento adottato (2). In questo contesto, il challenge test trova elettiva applicazione qualora le altre fonti di informazione (dati storici, letteratura o microbiologia predittiva) non consentano di delineare il comportamento di *L. monocytogenes* con un adeguato livello di confidenza (Tabella 1).

Tabella 1. Strumento sperimentale più pertinente in funzione della domanda di sicurezza

Domanda	Strumento sperimentale più pertinente	Output
Il prodotto supporta la crescita di <i>L. monocytogenes</i> ?	<i>Challenge test</i> del potenziale di crescita (Δ)	Classificazione: $\Delta > 0,5 \log_{10}$ = supporta $\Delta \leq 0,5 \log_{10}$ = non supporta
Quanto può crescere <i>L. monocytogenes</i> durante la <i>shelf-life</i> nelle condizioni definite?	<i>Challenge test</i> per lo studio del potenziale di crescita (Δ)	Quantificazione dell'incremento massimo osservato nelle condizioni testate
Qual è la cinetica di crescita a temperatura costante?	<i>Challenge test</i> per lo studio del μ_{max}	Parametro cinetico utilizzabile per stime e microbiologia predittiva
Qual è il livello di <i>L. monocytogenes</i> naturalmente presente alla fine della <i>shelf-life</i> ?	Studio di durabilità	Distribuzione/concentrazione della contaminazione naturale nelle condizioni studiate

Conduzione del *challenge test*

Il *challenge test* è uno studio di laboratorio su un alimento artificialmente contaminato con *L. monocytogenes*. Il TGD distingue gli studi finalizzati alla determinazione del potenziale di crescita (Δ) e gli studi per il calcolo del tasso massimo di crescita (μ_{max}), i quali hanno obiettivi diversi, rispondono a domande diverse e differiscono per disegno, uso dei ceppi e condizioni di conservazione (3). Per i requisiti di dettaglio si rimanda al TGD e alla norma EN ISO 20976-1 (3, 5).

Potenziale di crescita: principio

Il test misura la crescita di *Lm* nell'alimento conservato in condizioni ragionevolmente prevedibili, dall'inoculo fino, di norma, alla fine della *shelf-life*. Il potenziale di crescita è la differenza tra la concentrazione più alta osservata e quella iniziale, in $\log_{10}$ UFC/g [2]:

$$\Delta = \log_{\max} - \log_i$$

I risultati valgono solo per il prodotto e le condizioni testate: modifiche a ricetta, processo, confezionamento o profilo tempo/temperatura richiedono una nuova valutazione (3).

Lotti e ceppi

Devono essere testati almeno tre lotti rappresentativi della variabilità produttiva del prodotto di interesse, preferibilmente da giornate di produzione diverse; lotti dello stesso giorno sono accettabili solo se l'OSA dimostra che essi siano adeguatamente rappresentativi della variabilità. L'inoculo dovrebbe avvenire quanto prima, di norma entro due giorni dalla produzione; ritardi maggiori devono essere giustificati (2).

Per il Δ si usa una miscela di almeno due ceppi, gli stessi per tutti i lotti, di origine documentata e con caratteristiche di crescita note, adatti al prodotto e alle condizioni di conservazione (3, 4). L'EURL *Lm* mette a disposizione un set di ceppi caratterizzati (<https://zenodo.org/records/15525715>).

Preparazione dell'inoculo e inoculazione

L'inoculo è allestito mediante due subcolture successive, la seconda delle quali condotta a una temperatura uguale o vicina a quella iniziale di conservazione dell'alimento. Nel caso delle prove per la determinazione del Δ i ceppi sono miscelati a concentrazioni equivalenti. Il TGD ammette adattamenti o stress per simulare lo stato fisiologico dei contaminanti reali (3, 4). Il livello target è circa 100 UFC/g (50-200 UFC/g), con volume inoculato $\leq 1\%$ della massa dell'unità; la concentrazione va verificata sul terreno selettivo usato per la prova e, se è stato applicato uno stress, anche su terreno non selettivo (41, 42).

La modalità di inoculo (in profondità, in superficie, sull'interfaccia dei prodotti multicomponente, attraverso un setto nella confezione originale oppure con riconfezionamento in condizioni equivalenti) deve riprodurre la via di contaminazione più probabile senza alterare struttura, umidità, atmosfera o microflora (3, 4). L'omogeneità è verificata su tre repliche al tempo zero: la deviazione standard deve essere $\leq 0,3 \log_{10}$ UFC/g, altrimenti il test sul lotto non è accettabile e va ripetuto su un altro lotto (3, 4).

Unità, campionamento e condizioni di conservazione

Sono richiesti almeno 5 punti di campionamento per il Δ e 8 per la $\mu_{\max}$, con 3 unità al tempo zero e punti distribuiti in modo da intercettare il valore massimo e non solo quello finale (3, 4). Oltre alla unità di prova (*test unit*, inoculate con *L. monocytogenes*) si utilizzano i *food controls* (alimento tal quale non inoculato) e le unità di controllo (*control unit*, inoculate con soluzione

fisiologica), per caratterizzare il lotto e verificare che preparazione e inoculo non abbiano modificato il prodotto (3, 4).

Le condizioni di conservazione devono riflettere la catena del freddo ragionevolmente prevedibile (produttore, vendita al dettaglio, consumatore): il TGD preferisce il 95° percentile dei dati dell'OSA per la produzione e dei dati nazionali per retail e consumatore e, in assenza di dati, fornisce valori di default (Tabella 2). Le temperature effettive vanno registrate con *data logger* in una unità di controllo posta accanto alle unità di prova; gli scostamenti devono essere valutati per il loro impatto sulla validità (3).

Tabella 2. Condizioni di conservazione lungo la catena del freddo: temperature e durate di default secondo il TGD dell'EURL Lm

Fase della catena	Temperatura preferita	Default in assenza di dati	Durata di default
Produttore	95° percentile dei dati dell'OSA	7°C	SL ≤21 gg: 1/3 SL; SL >21 gg: 7 giorni
Rivendita/Commercio al dettaglio	95° percentile dei dati nazionali pertinenti	7°C	SL ≤21 gg: 1/3 SL; SL >21 gg: 1/2 (SL-7)
Consumatore	95° percentile dei dati nazionali pertinenti	10°C	SL ≤21 gg: 1/3 SL; SL >21 gg: 1/2 (SL-7)

SL: Shelf-Life

Analisi chimico-fisiche e microbiologiche

Il valore di pH e di a_w si misurano con metodi standardizzati su food controls e control units almeno all'inizio e alla fine della prova; per prodotti in MAP si verifica la composizione dei gas, anche su unità con setto, per escludere perdite (7, 8). Per *L. monocytogenes* i metodi di riferimento sono EN ISO 11290-1 (9) ed EN ISO 11290-2 (10), o metodi alternativi validati secondo EN ISO 16140-2 (11); il limite di numerazione va abbassato a 10 UFC/g (1). Al tempo zero si verifica la contaminazione naturale nei prodotti non contaminati intenzionalmente: nel test del Δ si prosegue solo se è inferiore o uguale a quella artificiale, nel test della μ_{max} le prove sul lotto devono essere interrotte. La flora batterica indigena (mesofila e, se pertinente, batteri lattici o altra flora specifica) aiuta a interpretare rallentamenti o arresti della crescita (3,4).

Calcolo del potenziale di crescita

Per ciascun lotto il valore $\log_i$ (vedi equazione) è la media delle tre enumerazioni al tempo zero e $\log_{max}$ il valore più alto osservato successivo al t_0 (con più unità per punto, la media più alta). Il Δ dello studio è il valore più alto tra i lotti validi, non la media: con Δ pari a 0,32, 0,48 e 0,61 $\log_{10}$ il risultato è 0,61. Un $\Delta > 0,5 \log_{10}$ indica che il prodotto supporta la crescita di *L. monocytogenes* nelle condizioni testate (3). Esempi di calcolo e di gestione dei lotti non validi sono riportati nel TGD (3).

Tasso massimo di crescita (μ_{max})

Il test del μ_{max} prevede l'utilizzo di un ceppo alla volta a temperatura costante (generalmente 6-10°C) e stima la pendenza della fase esponenziale della curva di crescita adattando un modello

primario. Attraverso l'applicazione di un modello primario, il test stima la pendenza della fase esponenziale della curva di crescita. Il parametro di riferimento selezionato corrisponde alla media dei valori di $\mu_{\max}$ ottenuti dai diversi lotti, corredata dalla relativa deviazione standard. Tale valore, integrato con i valori cardinali e l'impiego di modelli secondari, consente di prevedere lo sviluppo microbico in differenti profili di tempo e temperatura, a condizione di documentare accuratamente il modello adottato e le relative ipotesi di lavoro (2, 4).

Studi di durabilità

Lo studio di durabilità valuta la contaminazione naturale del prodotto, senza inoculo, nelle condizioni di conservazione ragionevolmente prevedibili. Pur essendo un metodo fortemente ancorato alla realtà, la bassa e disomogenea prevalenza di *L. monocytogenes* implica che l'assenza del batterio in un numero limitato di campioni non sia sufficiente a dimostrare la mancata crescita. Di conseguenza, i dati vanno letti in modo integrato con le altre evidenze disponibili, trovando utile applicazione, ad esempio, nella verifica di una *shelf-life* precedentemente validata (2, 4).

Rapporto di *challenge test*

Il rapporto di *challenge* deve essere redatto con un livello di dettaglio tale da consentire a un terzo esperto di ricostruire integralmente il razionale scientifico, il protocollo analitico, le modalità esecutive, i risultati ottenuti, le elaborazioni matematiche e le relative conclusioni. Queste ultime devono essere strettamente circoscritte al prodotto e alle condizioni sperimentali saggiate, specificando chiaramente l'eventuale estensione dei risultati a un gruppo omogeneo di prodotti. Per l'elenco completo delle informazioni richieste si rimanda alle norme EN ISO 20976-1 e al documento TGD; il GD prevede che sia allegata al rapporto una sintesi panoramica dei dati preliminari forniti dall'OSA (3-5).

Valutazione del *challenge test* e del rapporto

La valutazione considera sia la competenza del laboratorio sia la qualità del singolo studio: un rapporto formalmente completo non compensa un disegno sperimentale non rappresentativo (4).

Competenza e sistema qualità del laboratorio

Il laboratorio deve disporre di competenze in microbiologia e tecnologia alimentare, processi produttivi, statistica e, per la $\mu_{\max}$, modellistica predittiva, con personale di esperienza documentata. È raccomandato l'accreditamento EN ISO/IEC 17025 almeno per ricerca e numerazione di *L. monocytogenes*; in alternativa sono attesi buone pratiche documentate, controlli metrologici e proficiency test con esito positivo (2, 4, 12). Tale indicazione non risulta applicabile al contesto normativo nazionale italiano, nel quale i laboratori sono obbligati a soddisfare i requisiti di accreditamento EN ISO/IEC 17025 e a essere iscritti negli appositi elenchi regionali dei laboratori autorizzati. Il laboratorio deve inoltre valutare criticamente le informazioni ricevute dall'OSA e consigliarlo sulla pertinenza dello studio (4).

Disegno sperimentale e criteri di validità

La revisione verifica: numero e rappresentatività dei lotti; coerenza dei ceppi con matrice e obiettivo (miscela per il Δ , ceppi singoli per la $\mu_{\max}$); inoculo, livello target e tecnica di inoculazione; numero di unità e punti di campionamento; profilo tempo/temperatura e sua registrazione; misure su *food control* e *control unit*; metodi, limite di numerazione e gestione della contaminazione naturale; calcoli e deviazioni. Sono criteri critici la Deviazione Standard (DS) a $t_0 \leq 0,3 \log_{10}$ UFC/g per ogni lotto incluso e l'uso del valore massimo osservato, non del solo valore finale, poiché la popolazione può crescere e poi diminuire. Il rapporto deve distinguere un risultato valido da uno inconcludente (3, 4). La check-list ufficiale per la valutazione dei rapporti è riportata nell'allegato e del TGD (4).

Ruoli di laboratorio, OSA e Autorità Competente

Il laboratorio riporta risultati e conclusione tecnica sul comportamento di *L. monocytogenes* nel prodotto testato. L'OSA interpreta tali risultati nel proprio rapporto (dossier) di *shelf-life*, integrandoli con contaminazione iniziale, caratteristiche del prodotto, processo, condizioni tempo/temperatura e dati storici, e lo rende disponibile all'Autorità Competente (3). L'Autorità Competente verifica classificazione RTE, attribuzione alla categoria di crescita, rappresentatività del prodotto testato, competenza del laboratorio, conformità del protocollo, tracciabilità dei dati e corretta integrazione nel dossier, mediante audit del laboratorio o revisione dei rapporti (2, 4). Una carenza va valutata per il suo impatto su validità e rappresentatività, restringendo se necessario il campo della conclusione (2, 4).

Uso dei risultati per i prodotti che supportano la crescita di *L. monocytogenes*

Classificazione e stima della concentrazione massima

Con $\Delta > 0,5 \log_{10}$ il prodotto supporta la crescita di *L. monocytogenes* (categoria 1.2); con $\Delta \leq 0,5 \log_{10}$ non la supporta (categoria 1.3) (41, 42). La soglia di $0,5 \log_{10}$ non equivale al limite di 100 UFC/g: la concentrazione massima attesa si stima come concentrazione iniziale + Δ (in $\log_{10}$). Con $\Delta = 0,7$ e livello iniziale $1 \log_{10}$ UFC/g si ottengono $1,7 \log_{10}$ UFC/g, sotto la soglia di $2 \log_{10}$; con $\Delta = 3,30$ il livello iniziale dovrebbe invece essere inferiore a circa $0,05$ UFC/g, difficilmente dimostrabile (3).

Criteri 1.2a e 1.2b dal 1° luglio 2026

Per gli alimenti RTE che supportano la crescita, il criterio 1.2a (100 UFC/g) si applica solo se l'OSA dimostra, in modo soddisfacente per l'Autorità Competente, che il limite non sarà superato durante l'intera *shelf-life*; in assenza di tale dimostrazione o di studi si applica per default il criterio 1.2b (*L. monocytogenes* non rilevata in 25 g) (2, 5). La dimostrazione si costruisce nel dossier dell'OSA, in cui il challenge test ha un ruolo centrale ma non esclusivo (2, 3).

Limiti intermedi

Noto il Δ , l'OSA può definire un limite in una fase precedente della *shelf-life* sottraendo il Δ al limite finale espresso in $\log_{10}$ (Figura 1).

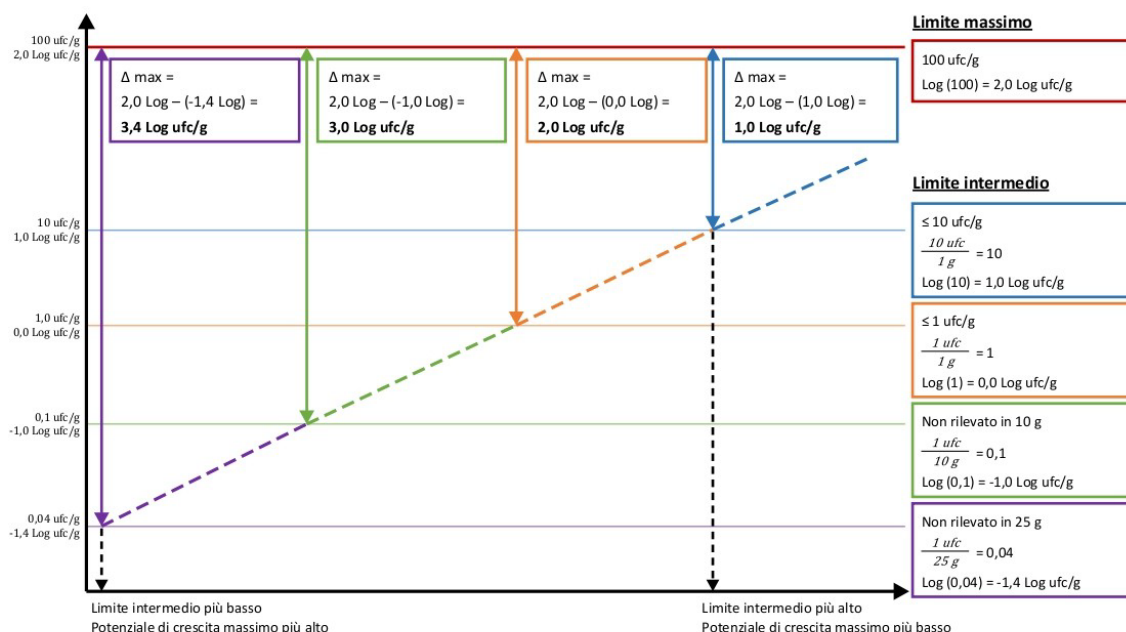


Figura 1. Relazione tra il potenziale di crescita e il possibile limite intermedio (2)

Ad esempio, con $\Delta = 1,0 \log_{10}$ il livello alla produzione non dovrebbe superare $1,0 \log_{10}$ UFC/g (10 UFC/g); con $\Delta = 1,5 \log_{10}$, circa 3 UFC/g. L'approccio richiede un Δ rappresentativo e condizioni entro il campo di validità dello studio e non sostituisce le misure preventive di igiene, controllo ambientale e catena del freddo (2, 3).

Percorso decisionale per gli alimenti RTE

Il *challenge test* si colloca in un percorso decisionale più ampio, descritto dall'albero decisionale del TGD (sezione 5, Figura 2, pag. 19) (2), cui si rimanda per la rappresentazione completa. In sintesi:

- se l'alimento non è RTE, il Regolamento (CE) 2073/2005 non fissa criteri per *L. monocytogenes* e la sicurezza è gestita con buone pratiche igieniche e procedure basate sull'HACCP (*Hazard Analysis and Critical Control Point*);
- per gli alimenti RTE elencati nella nota 4 del Regolamento non sono richieste prove regolari, mentre per quelli destinati ai lattanti o a fini medici speciali si applica il criterio 1.1;
- una *shelf-life* inferiore a cinque giorni, i limiti di pH/ a_w della nota 8 o altre evidenze di assenza di crescita collocano il prodotto nel criterio 1.3; se mancano i dati di pH e a_w , vanno determinati e nel frattempo si applica il criterio 1.2b;
- negli altri casi servono studi supplementari (modelli predittivi, *challenge test*), in attesa dei quali si applica il criterio 1.2b; se indicano una crescita inferiore a $0,5 \log_{10}$ si applica il criterio 1.3;

- se gli studi dimostrano, con soddisfazione dell’Autorità Competente, che 100 Ufc/g non saranno superate entro la *shelf-life* si applica il criterio 1.2a; altrimenti il criterio 1.2b, valutando riformulazione, modifica del processo o riduzione della *shelf-life*.

Mantenimento della validità

Modifiche di formulazione, materie prime, processo, confezionamento, stabilimento, distribuzione o *shelf-life* richiedono una valutazione documentata dell’applicabilità dello studio: la ripetizione è generalmente necessaria se la modifica rende il prodotto più favorevole alla crescita, mentre lo studio può essere riutilizzato se si dimostra che la modifica è più restrittiva (2, 3). Il dossier va collegato al sistema di gestione della sicurezza alimentare e verificato periodicamente, anche con studi di durabilità e dati di routine (2).

Conclusioni

Il challenge test acquista significato solo all’interno di un processo strutturato di caratterizzazione del prodotto e gestione della *shelf-life*. Per il potenziale di crescita gli elementi chiave sono almeno tre lotti rappresentativi, una miscela di almeno due ceppi, un inoculo di circa 100 UFC/g con tecnica coerente con il prodotto, un profilo tempo/temperatura realistico e registrato, misure chimico-fisiche e microbiologiche adeguate, omogeneità a t_0 con Deviazione Standard (DS) $\leq 0,3 \log_{10}$ e il Δ massimo tra i lotti come risultato.

Il laboratorio produce un rapporto ricostruibile e limitato alle condizioni testate; l’OSA lo interpreta nel dossier di *shelf-life* e l’Autorità Competente ne valuta l’adeguatezza. Dal 1° luglio 2026 il challenge test è una componente documentata della dimostrazione richiesta per il criterio 1.2a, non una certificazione permanente del prodotto.

Bibliografia

1. Europa. Regolamento (CE) n. 2073/2005 della Commissione, del 15 novembre 2005, sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari. *Gazzetta ufficiale dell’Unione europea* L 338, del 22.12.2005
2. European Commission. *Guidance document on Listeria monocytogenes monitoring and shelf-life studies for ready-to-eat foods under Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. SANCO/11510/2013, revision of 18 December 2025.* Disponibile all’indirizzo: https://food.ec.europa.eu/document/download/44257174-bf8c-4214-a60d-6790a7ca4109_en?filename=biosafety_fh_mc_guidance_document_lysteria.pdf; ultima consultazione 27/10/2026
3. European Union Reference Laboratory for *Listeria monocytogenes*. *Technical Guidance Document on challenge tests and durability studies for assessing shelf-life of ready-to-eat foods related to Listeria monocytogenes. Version 4, 1 July 2021; Amendment 1, 26 February 2026.* Maisons-Alfort: ANSES; 2026.
4. European Union Reference Laboratory for *Listeria monocytogenes*. *Guidance Document to evaluate the competence of laboratories implementing challenge tests and durability studies related to Listeria monocytogenes in ready-to-eat foods. Version 3, 10 February 2023.* Maisons-Alfort: ANSES; 2023.
5. ISO 20976-1:2019. *Requirements and guidelines for conducting challenge tests of food and feed products - Part 1: Challenge tests to study growth potential, lag time and maximum growth rate.* Geneva: International Organization for Standardization; 2019.

6. Europa. Regolamento (UE) 2024/2895 che modifica il regolamento (CE) n. 2073/2005 per quanto riguarda *Listeria monocytogenes*. *Gazzetta ufficiale dell'Unione europea* L 2024/2895, del 21.11.2024
7. Anniballi F, Lonati D, Fiore A, Auricchio B, De Medici D, Locatelli CA. New targets in the search for preventive and therapeutic agents for botulism. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2014;12(9):1075-1086.
8. Peck MW. Clostridium botulinum and the safety of minimally heated, chilled foods: an emerging issue? *J Appl Microbiol*. 2006;101(3):556-570.
9. ISO 11290-1:2017. *Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes and of Listeria spp. - Part 1: Detection method*. Geneva: International Organization for Standardization; 2017.
10. ISO 11290-2:2017. *Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection and enumeration of Listeria monocytogenes and of Listeria spp. - Part 2: Enumeration method*. Geneva: International Organization for Standardization; 2017.
11. ISO 16140-2:2013. *Microbiology of the food chain - Method validation - Part 2: Protocol for the validation of alternative (proprietary) methods against a reference method*. Geneva: International Organization for Standardization; 2013.
12. UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2018. *Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e taratura*; 2018. Milano: Ente Italiano di Normazione; 2018.

PROGETTAZIONE E CONDUZIONE DI CHALLENGE TEST PER *CLOSTRIDIUM BOTULINUM*

Teresa Vicenza, Concetta Scalfaro, Silvia Taglieri, Fabrizio Anniballi
Dipartimento di Sicurezza Alimentare, Nutrizione e Sanità Pubblica Veterinaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Il documento “Code of hygienic practice for refrigerated packaged foods with extended shelf life” (CAC/RCP46-1999), pubblicato dal *Codex Alimentarius*, stabilisce che per gli alimenti refrigerati con *shelf-life* estesa, in assenza di evidenze scientifiche pregresse, devono essere condotti challenge test per confermare l’efficacia degli ostacoli (*hurdles*) scelti per contrastare il patogeno di interesse. Il documento aggiunge che tali studi devono essere utilizzati per determinare la durata di conservazione appropriata del prodotto, precisando che la loro esecuzione richiede l’inoculo di microrganismi selezionati e l’impiego delle condizioni di stoccaggio e distribuzione più sfavorevoli previste (1).

Diversamente da *Listeria monocytogenes*, per la quale si applica il Regolamento (CE) 2073/2005 (art. 3, par. 2, e Allegato II), per *Clostridium botulinum* e per gli altri clostridi produttori di tossine botuliniche, tale riferimento normativo non è automaticamente applicabile, poiché questa classe di patogeni non è inclusa nella norma. Tuttavia, resta valido e applicabile il principio secondo cui, ove necessario, il produttore dell’alimento, identificato dalla legislazione comunitaria e nazionale in materia di sicurezza alimentare come colui che deve garantire la sicurezza dei prodotti che immette sul mercato, deve condurre studi per monitorare, per tutta la *shelf-life* dell’alimento, la sopravvivenza o la crescita dei pericoli microbiologici pertinenti (2).

Per la conduzione dei *challenge test* per *C. botulinum* e gli altri clostridi produttori di tossine botuliniche sono stati pubblicati diversi articoli scientifici, linee guida e due standard ISO appartenenti alla serie 20976 (3, 4).

Nei paragrafi successivi sono riportati gli elementi significativi delle norme ISO della serie 20976 e del documento “Guidelines for setting shelf life of chilled foods in relation to non-proteolytic *Clostridium botulinum*” che incidono sui risultati del *challenge test*, indicando anche tutti i casi in cui è necessario adottare procedure aggiuntive rispetto a quelle indicate nei documenti di riferimento oggetto della disamina (3, 4, 5).

UNI EN ISO 20976-1:2019

La norma UNI EN ISO 20976-1:2019 specifica i protocolli per condurre *challenge test* microbiologici per studi sul potenziale di crescita o sulla cinetica di crescita di batteri in fase vegetativa e di batteri sporigeni in materie prime, prodotti intermedi o prodotti finiti.

Nel testo della norma si legge che gli studi sul potenziale di crescita sono appropriati per:

- validare la durata di conservazione di un alimento nell’ambito delle condizioni d’uso e di conservazione ragionevolmente prevedibili tra la produzione e il consumo, garantendo che i criteri microbiologici pertinenti siano soddisfatti per tutta la *shelf-life* del prodotto;
- valutare se un prodotto, sottoposto a prova in condizioni specifiche, favorisce la crescita del microrganismo inoculato.

Gli studi sulla cinetica di crescita sono più appropriati dei precedenti se è necessario:

- valutare gli effetti intrinseci e le caratteristiche estrinseche che hanno un impatto significativo sul comportamento del microrganismo inoculato;
- fornire dati per i modelli sviluppati per simulare l'effetto di taluni fattori sul comportamento microbico negli alimenti studiati nell'ambito di condizioni di conservazione ragionevolmente prevedibili;
- confrontare i risultati della simulazione per garantire che i criteri microbiologici pertinenti siano soddisfatti per l'intera *shelf-life* dell'alimento.

Gli studi sulla cinetica di crescita vengono utilizzati per stimare e validare la *shelf-life* microbiologica di un alimento. Questo tipo di studi è particolarmente utile nell'ultima fase dello sviluppo di un alimento, inclusa la riformulazione, i nuovi sistemi di confezionamento e la modifica delle condizioni di processo. Gli studi di cinetica di crescita possono essere più informativi rispetto a quelli sul potenziale di crescita, ma sono più complessi nella progettazione, nell'esecuzione e nell'interpretazione dei risultati.

Gli studi sul potenziale di crescita consentono di validare soltanto le caratteristiche e le condizioni specifiche adottate nello studio e i loro risultati non possono essere utilizzati per estrapolare dati applicabili ad altre condizioni.

Disegno sperimentale del challenge

I criteri decisionali del *challenge test* devono essere definiti prima dell'inizio dello studio. Per gli studi sul potenziale di crescita, solitamente si adotta un approccio a due fasi: la prima mira a determinare se si verifica la crescita, mentre la seconda valuta se tale crescita è accettabile ai fini della sicurezza d'uso del prodotto. Per *L. monocytogenes*, per esempio, quando il potenziale di crescita supera il *cut-off* fissato a $0,5 \log_{10}$, l'alimento favorisce la crescita. Per altri microrganismi, questo *cut-off* è stato fissato a $1 \log_{10}$.

Quando il microrganismo target è *C. botulinum*, la valutazione del potenziale di crescita non risulta pienamente appropriata. La letteratura di settore, infatti, evidenzia che la presenza di tossine botuliniche può essere rilevata anche quando la carica microbica è in diminuzione, fenomeno dovuto al fatto che questa classe di microrganismi può essere autolitica. Di conseguenza, la valutazione del potenziale di crescita può essere utilizzata in fase preliminare, per verificare se l'alimento favorisce o meno lo sviluppo dei clostridi produttori di tossine botuliniche. Qualora l'alimento favorisca tale crescita, non sarebbe necessario procedere oltre, con la ricerca delle tossine, poiché il challenge test sarebbe già considerato fallito, rendendo necessarie azioni correttive sul processo produttivo o sulle condizioni di conservazione dell'alimento oggetto di studio.

Lo studio, almeno da un punto di vista teorico, può essere articolato in due fasi: una prima fase dedicata alla valutazione del potenziale di crescita e una seconda fase, da eseguire solo qualora la prima abbia dato esito favorevole, finalizzata alla ricerca delle tossine botuliniche.

Numero di lotti da saggiare e ceppi da includere nel cocktail

Per quanto riguarda il numero di lotti da saggiare, è sufficiente attenersi alle prescrizioni della norma. Infatti, il numero di lotti da includere nello studio dipende dalla variabilità del processo produttivo dell'alimento. Nel caso in cui la variabilità inter-lotto sia sufficiente a determinare differenze nello sviluppo microbico, sarà necessario studiare almeno tre lotti. L'utilizzo di un solo lotto richiede, invece, una giustificazione chiara e adeguatamente documentata. Anche il numero

minimo di unità di prova da inoculare per ciascun punto di campionamento dipende dalla viabilità inter-lotto.

Ogni ceppo utilizzato deve essere caratterizzato con un livello di dettaglio sufficiente a garantirne un'identificazione inequivocabile. Sono preferibili i ceppi isolati dalla stessa matrice alimentare, oppure i ceppi clinici ottenuti in occasione di casi o focolai correlati a quella matrice, rispetto ai ceppi di collezione provenienti da matrici diverse. La capacità di crescita dei ceppi dovrebbe essere stata determinata prima del *challenge test*, sulla base di dati storici pubblicati o determinati sperimentalmente. I ceppi selezionati devono essere idonei allo scopo in base alla loro capacità di crescita nelle condizioni di prova, tra cui temperatura, pH, a_w , e altri parametri rilevanti.

Per stimare il potenziale di crescita, si raccomanda l'impiego di una miscela di ceppi appartenenti alla stessa specie microbica, così da tenere conto delle differenze intra-specie. Sebbene le misure di contenimento per *C. botulinum* siano generalmente efficaci anche contro gli altri clostridi produttori di tossine botuliniche, nel cocktail da utilizzare nel challenge test è necessario includere anche altre specie. Per stimare la cinetica di crescita, invece, è necessario utilizzare un unico ceppo.

Nello studio del potenziale di crescita non è possibile utilizzare un solo ceppo: è opportuno, invece, utilizzare un cocktail di ceppi composto da 5-10 stipiti microbici, includendo sia ceppi *type* e sia ceppi selvaggi opportunamente caratterizzati. La variabilità dei ceppi deve riflettere la variabilità epidemiologica dei clostridi produttori di tossine botuliniche, che generalmente si riscontra nella matrice oggetto di studio.

La costituzione del cocktail richiede studi preliminari di laboratorio per verificare che i ceppi inizialmente scelti non esercitino una pressione selettiva sugli altri. In altre parole, è necessario accertare l'assenza di ceppi produttori di batteriocine o di altre sostanze in grado di inibire la crescita degli altri componenti del cocktail.

I ceppi del cocktail devono essere utilizzati sotto forma di spore, prodotte in conformità alle prescrizioni dell'Annex D della norma ISO/TS 17919:2013 (6). Successivamente alla produzione, devono essere numerate e incluse nel cocktail, possibilmente in quantità uguali (almeno nell'ordine di grandezza logaritmico).

Nella conduzione degli studi sul potenziale di crescita e sulla cinetica di crescita non è possibile utilizzare surrogati non tossigeni.

Inoculo delle unità di prova

Il livello di inoculazione selezionato deve essere giustificato in relazione all'alimento e ai microrganismi oggetto di studio. Per garantire l'accuratezza dei risultati, l'inoculo deve rientrare nel limite di quantificazione del metodo di numerazione utilizzato. È raccomandato un livello di inoculo pari ad almeno cinque volte il limite di quantificazione del metodo e non superiore a 10^4 UFC/g. La procedura di inoculazione deve riprodurre il più fedelmente possibile l'evento di contaminazione da simulare. Pertanto, se l'obiettivo è analizzare il comportamento microbico nell'intero alimento, l'inoculo deve essere distribuito in modo omogeneo nelle unità di prova. Se invece l'obiettivo dello studio è caratterizzare il comportamento microbico di una porzione specifica dell'alimento (ad esempio al centro o in superficie), l'inoculo dovrebbe essere effettuato esclusivamente su tale porzione. Nel caso di alimenti particolarmente eterogenei, come, ad esempio, alimenti composti, occorre descrivere e giustificare il componente o i componenti scelti per l'inoculo e la procedura di inoculazione. Per gli alimenti confezionati in atmosfera modificata (escluso il sottovuoto) è possibile inoculare e imballare nuovamente l'alimento, oppure contaminarlo per iniezione diretta attraverso uno o più setti adesivi, purché l'atmosfera di imballaggio non venga modificata.

Oltre ai campioni inoculati, devono essere preparati campioni di controllo opportuni, costituiti da campioni non inoculati e da campioni inoculati con soluzione fisiologica sterile in volume pari a quello dell'inoculo.

Conservazione delle unità di prova

Tutte le unità di prova devono essere conservate alle temperature selezionate per l'intera durata dello studio. La temperatura scelta deve riflettere, quanto più fedelmente possibile, le condizioni di conservazione ragionevolmente prevedibili a cui l'alimento è maggiormente esposto lungo tutta la filiera, dalla produzione fino al suo consumo finale. Tali condizioni possono essere definite sulla base delle osservazioni effettuate nei Paesi in cui si trovano la catena di approvvigionamento e i consumatori.

Analisi delle unità di prova

Le analisi chimico-fisiche e microbiologiche devono essere effettuate con metodi riconosciuti e ampiamente accettati a livello internazionale, oppure con metodi alternativi validati secondo protocolli anch'essi riconosciuti a livello internazionale. Il laboratorio incaricato delle analisi dovrebbe essere accreditato in conformità alla UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2018, per i metodi impiegati nello studio (7).

Le attività di numerazione dell'inoculo, trattandosi di spore, potrebbero essere svolte mediante conta in piastra oppure mediante MPN a 5 tubi. È possibile utilizzare anche saggi biomolecolari, come ad esempio la MPN-PCR.

È tuttavia fondamentale determinare qualitativamente la presenza di tossine botuliniche in tutte le unità di prova inoculate e nei relativi controlli. Per l'esecuzione di questi saggi sono disponibili kit commerciali. Il Centro Nazionale di Riferimento per il Botulismo utilizza saggi *in vitro* sviluppati internamente, che saranno resi disponibili non appena il gruppo di lavoro ISO sulla validazione dei metodi per le tossine rilascerà la versione *finale* della norma attualmente in fase di sviluppo. Qualora il laboratorio che conduce il challenge test non sia in grado di eseguire direttamente i saggi per le tossine botuliniche, potrà affidarne l'esecuzione a un laboratorio esterno.

Report del challenge test

Il rapporto di prova del *challenge test* deve includere tutti i dati necessari per la sua interpretazione. Deve essere chiaramente descritto lo scopo dello studio, fornendo tutte le informazioni relative alle caratteristiche dell'alimento sottoposto a prova. Sulla base di queste informazioni, devono essere giustificati la tipologia di *challenge test* progettato e i microrganismi target. Il protocollo sperimentale deve includere informazioni sui ceppi utilizzati (specificandone la fonte, la concentrazione dell'inoculo e le procedure di adattamento), sul numero di lotti studiati, con la relativa giustificazione, sulla preparazione dei campioni e sul piano di campionamento. Per quanto concerne le analisi, devono essere descritte le condizioni di conservazione delle unità di prova, il numero di porzioni di prova da analizzare in ciascun punto di campionamento, il peso del campione analizzato, il metodo di prova utilizzato, nonché i riferimenti alle metodiche e alle strumentazioni impiegate per le analisi chimico-fisiche. Per quanto riguarda le determinazioni quantitative dell'inoculo (ed eventualmente delle cariche riscontrate ai vari tempi di prelievo), sarebbe utile specificare il limite di quantificazione o di rilevazione. L'inclusione nel report dei

dati grezzi e delle elaborazioni grafiche può favorire la comprensione dei risultati, che in ogni caso devono essere confrontati con i criteri decisionali definiti prima dell'inizio dello studio.

UNI EN ISO 20976-2:2022

La norma UNI EN ISO 20976-2:2022 stabilisce il protocollo per la conduzione di un challenge test finalizzato alla valutazione dell'inattivazione di cellule vegetative e spore in materie prime, ingredienti, intermedi di lavorazione e prodotti finiti. Gli studi di inattivazione possono indagare il potenziale o la cinetica di tale processo. L'inoculo deve essere preparato in modo da riprodurre le condizioni che simulano il danno subito dalle cellule vegetative o dalle spore in seguito alla contaminazione naturale degli alimenti oppure, al contrario, le eventuali risposte adattative indotte dalle condizioni di inattivazione, così da riprodurre il comportamento microbico naturale nell'alimento.

Gli studi sul potenziale di inattivazione sono più indicati per la validazione del processo e/o per la formulazione del prodotto. I risultati ottenuti sono specifici per le condizioni e la matrice oggetto di studio; pertanto, la loro estrapolazione a condizioni differenti richiede l'impiego dei parametri cinetici di inattivazione. Gli studi sulla cinetica di inattivazione vengono impiegati per determinare i valori di D e z. Tali studi sono più complessi in termini di progettazione sperimentale, esecuzione, interpretazione ed utilizzo dei risultati, in particolare nei casi di non linearità.

Disegno sperimentale del challenge

I fattori che influenzano l'inattivazione devono essere chiaramente identificati e, per ciascuno di essi, devono essere definiti i relativi intervalli.

La progettazione dello studio deve considerare diverse fonti di variabilità legate a:

- caratteristiche del processo (es. portata, tempo di residenza, temperatura, umidità, progettazione delle attrezzature);
- caratteristiche del prodotto (es. contenuto di grassi, zuccheri, sale, proteine, acidità, pH a_w , dimensione delle particelle, composizione chimica);
- condizioni di trasporto e di conservazione, inclusa la *shelf-life*.

Negli studi di cinetica di inattivazione, le unità di prova dovrebbero essere prelevate in ciascun punto di campionamento lungo l'intera durata del trattamento. Qualora il campionamento non sia realizzabile a causa dell'attrezzatura e/o della tecnologia valutata, potrebbe essere necessario ricorrere a trattamenti indipendenti di natura diversa.

Numero di lotti

Per gli studi sul potenziale di inattivazione e sulla cinetica di inattivazione dovrebbero essere utilizzati almeno tre lotti. In linea generale, il numero di lotti dovrebbe essere incrementato in situazioni caratterizzate da maggiore variabilità o incertezza. L'impiego di un singolo lotto, invece, deve essere chiaramente giustificato.

Durante la fase di preparazione delle unità di prova, è opportuno considerare la possibilità che, durante l'esecuzione dello studio, si verifichino imprevisti e predisporre pertanto materiale aggiuntivo. Le unità di prova rappresentative della matrice prima del trattamento di inattivazione possono consistere in:

- porzioni campionate in modo asettico dal prodotto sfuso proveniente dalla linea di produzione;
- porzioni campionate in modo asettico o contenuto completo delle unità di confezionamento.

Prima dell'inoculazione, le unità di prova devono essere mantenute in condizioni appropriate e, salvo diversa indicazione derivante dallo scopo dello studio, inoculate il più vicino possibile al momento della produzione. Una volta inoculate, tutte le unità di prova devono essere mantenute nelle medesime condizioni appropriate, incluse, ove necessario, le condizioni di trasporto e conservazione.

Inoculo

Il numero minimo di unità di prova da inoculare e analizzare dipende dal tipo di studio di inattivazione, dalla natura dell'alimento e dalle condizioni di processo.

Negli studi sul potenziale di inattivazione, il numero di punti di campionamento dipende dalla possibilità di accedere ai campioni. In alcuni casi, può essere possibile ottenere campioni solo all'inizio e alla fine del processo; in altri, possono essere disponibili anche campioni intermedi.

Negli studi di cinetica di inattivazione è importante disporre di un numero sufficiente di punti sperimentali per ottenere una stima accurata del tipo di curva. Nel caso di curve non lineari è necessario un numero maggiore di campioni (di norma, almeno 6 punti di campionamento).

Ogni ceppo utilizzato deve essere caratterizzato in modo sufficientemente dettagliato da consentirne l'identificazione. Devono essere utilizzati ceppi per i quali siano determinati i parametri di resistenza (es. al calore, alla pressione o agli acidi), così da garantire che i ceppi selezionati siano idonei allo scopo.

Ai fini della valutazione dello scenario peggiore (*worst case*), deve essere utilizzato esclusivamente il ceppo più resistente.

Per valutare la variabilità della resistenza tra i ceppi, gli studi sul potenziale di inattivazione dovrebbero essere condotti utilizzando da 3 a 5 ceppi batterici, singolarmente o in combinazione (cocktail). Negli studi di cinetica di inattivazione, invece, tali ceppi devono essere testati esclusivamente singolarmente.

L'inoculo dovrebbe contenere almeno 9 log CFU/g o mL. In alcuni casi è necessario concentrarlo mediante centrifugazione.

Le spore devono essere prodotte in conformità alle prescrizioni dell'Annex D della norma ISO/TS 17919:2013 (6). Successivamente alla produzione, devono essere numerate e incluse nel cocktail, possibilmente in quantità uguali o quantomeno nello stesso ordine di grandezza logaritmico.

Negli studi di inattivazione è possibile utilizzare surrogati non tossigeni, come *C. sporogenes*, a patto che il ceppo sia adeguatamente caratterizzato e che siano noti i valori D e z ad esso associati.

Analisi

I metodi analitici utilizzati per la numerazione dell'inoculo e quelli impiegati per la numerazione dopo il trattamento devono essere gli stessi. Qualora la numerazione venga effettuata in piastra, è necessario determinare la fertilità del terreno e, nel caso in cui siano disponibili più terreni solidi, utilizzare quello che garantisce maggiore fertilità.

Può essere utilizzata anche la tecnica di numerazione mediante MPN (*Most Probable Number*) a 5 tubi associata alla *Polymerase Chain Reaction* (PCR) o alla *real-time* PCR.

Linee guida per la determinazione della *shelf-life* di alimenti refrigerati in relazione a *C. botulinum* non proteolitico

Alcuni operatori del settore alimentare, organi di commercio, associazioni e laboratori del Regno Unito e dell'Australia, per fornire una guida sulle modalità di conduzione degli studi di *shelf-life* in relazione a *Clostridium botulinum* non proteolitico, hanno pubblicato un documento intitolato "Guidelines for setting shelf life of chilled foods in relation to non-proteolytic *Clostridium botulinum*", di cui si riportano gli elementi significativi (5).

I software di microbiologia predittiva possono fornire dati sulla probabilità di crescita microbica, ma non forniscono indicazioni sulla produzione di tossine botuliniche. La crescita del microrganismo può essere indicativa della produzione di tossine, ma l'assenza di un aumento della conta vitale non implica l'assenza di tossine. Pertanto, i modelli predittivi devono essere utilizzati con cautela e i risultati ottenuti dovrebbero essere interpretati col supporto di esperti. In letteratura sono riportate diverse pubblicazioni scientifiche secondo cui la formazione di tossine botuliniche possa verificarsi anche in assenza di un aumento del numero di cellule vitali di *C. botulinum*. Le possibili spiegazioni includono:

- la conta vitale misurabile non consente di rilevare un'eventuale crescita cellulare precedente seguita da una successiva fase di morte;
- le cellule possono essere state metabolicamente attive e aver prodotto tossine, nonostante la conta vitale non sia aumentata.

La mancata osservazione di un aumento della conta vitale non dimostra, quindi, che nell'alimento non siano state prodotte o non si produrranno le tossine botuliniche.

Un *challenge test* per *C. botulinum* prevede l'inoculazione artificiale dell'alimento con spore allo scopo di valutare la possibile produzione di tossine botuliniche nelle condizioni di conservazione previste per la specifica formulazione del prodotto. Le linee guida sviluppate negli USA e in Canada sottolineano l'importanza di dimostrare che il processo produttivo e le modalità di conservazione siano in grado di impedire la tossinogenesi di *C. botulinum* e degli altri clostridi produttori di tossine botuliniche. Questa raccomandazione si basa sul fatto che il botulismo è causato dalla tossina, che può essere prodotta anche in assenza di un aumento del conteggio vitale. Un aumento significativo della conta vitale rappresenta, in ogni caso, uno scenario di pericolo, anche in assenza di rilevazione della tossina.

Ancorché nell'Unione Europea non esista una prescrizione normativa specifica che obblighi l'OSA a condurre *challenge test* per *C. botulinum*, l'OSA è responsabile della sicurezza del prodotto che immette sul mercato. La conduzione di un *challenge test* è raccomandata nei seguenti casi:

- quando la valutazione del rischio identifica aree per le quali sono necessari ulteriori dati;
- quando vengono apportate modifiche alla formulazione, al processo termico, al sistema di confezionamento utilizzato, al regime di distribuzione o di conservazione o alla durata di conservazione dell'alimento;
- quando un fattore di controllo primario (es. il contenuto di sale) viene ridotto fino a perdere efficacia.

Nella conduzione di *challenge test* per *C. botulinum* dovrebbe essere utilizzata una selezione di ceppi (es. 5-10) che includa anche ceppi di riferimento. I ceppi dovrebbero essere saggiati per confermare la loro capacità di produrre quantità idonee di tossina (es. > 1000 MLD₅₀/mL) anche nelle condizioni di utilizzo (pH, temperatura, concentrazione salina, ecc.). Gli inoculi dovrebbero

essere condotti a 10-100 spore/g di prodotto o a 100-1000 spore/confezione, in base alle cariche sporali naturalmente presenti negli alimenti.

Verso una procedura nazionale per la conduzione di *challenge test* per *C. botulinum*

I clostridi produttori di tossine botuliniche sono microrganismi *dual-use*; pertanto, rientrano tra i microrganismi sensibili ai fini della biosicurezza (*biosecurity* e *biosafety*).

In termini di *biosecurity* (atti dolosi o volontari), è necessario considerare che la diffusione di tali microrganismi potrebbe rappresentare un rischio per la sicurezza nazionale e comunitaria.

Per tenere sotto controllo questo problema sono possibili due soluzioni:

- limitare la possibilità di effettuare *challenge test* ai laboratori pubblici come quelli degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali;
- censire e auditare i laboratori “privati” che si dimostrino capaci di lavorare con i clostridi produttori di tossine botuliniche e di limitare al minimo la presenza di tali microrganismi nelle loro strutture.

I laboratori che potranno svolgere i *challenge test* per *C. botulinum* dovranno:

- sostenere l’accreditamento in conformità alla norma ISO 17025 delle prove per la determinazione dei clostridi produttori di tossine botuliniche e delle tossine botuliniche;
- partecipare al circuito interlaboratorio organizzato dal Centro Nazionale di Riferimento per il Botulismo;
- gestire in maniera controllata gli accessi al laboratorio e a tutti i locali in cui sono conservati/stoccati i campioni durante l’esecuzione del *challenge test*;
- detenere in maniera controllata il cocktail prima dell’inoculo;
- eliminare prontamente tutti i campioni analizzati contenenti i clostridi produttori di tossine botuliniche, previa sterilizzazione in autoclave;
- inviare il rapporto del *challenge* al Centro Nazionale di Riferimento per il Botulismo.
- partecipare alle attività di formazione organizzate dal Centro Nazionale di Riferimento per il Botulismo.

La procedura nazionale per la conduzione dei *challenge test* con *C. botulinum*, prima di essere pubblicata e adottata, dovrà essere approvata dal Ministero della Salute, dal Dipartimento per la Sicurezza della Presidenza del Consiglio dei Ministri, nonché dalla Conferenza Stato-Regioni.

Bibliografia

1. Codex Alimentarius Commission. *Code of hygienic practice for refrigerated packaged foods with extended shelf life*. Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO); 1999. (CAC/RCP 46-1999)
2. European Commission. *Guidance document on Listeria monocytogenes monitoring and shelf-life studies for ready-to-eat foods under Commission Regulation (EC) No 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs*. SANCO/11510/2013, revision of 18 December 2025. Disponibile all’indirizzo: https://food.ec.europa.eu/document/download/44257174-bf8c-4214-a60d-6790a7ca4109_en?filename=biosafety_fh_mc_guidance_document_listeria.pdf; ultima consultazione 27/10/2026

3. UNI EN ISO 20976-1:2019. *Microbiologia della catena alimentare - Requisiti e linee guida per condurre "Challenge tests" in alimenti e mangimi - Parte 1: "challenge tests" per lo studio del potenziale di crescita, lag time ed il tasso di massima crescita*. Milano: Ente Italiano di Normazione; 2020
4. UNI EN ISO 20976-2:2022. *Microbiologia della catena alimentare - Requisiti e linee guida per condurre "Challenge tests" in alimenti e mangimi - Parte 2: "challenge tests" per lo studio del potenziale di inattivazione e dei parametri cinetici*. Milano: Ente Italiano di Normazione; 2022.
5. CFA/BRC/LFR/MLQQIB. *Guidelines for setting shelf life of chilled foods in relation to non-proteolytic Clostridium botulinum*. Kettering: Chilled Food Association 2018.
6. ISO/TS 17919:2013. *Microbiology of the food chain – Polymerase chain reaction (PCR) for the detection of food-borne pathogens – Detection of botulinum type A, B, E, and F neurotoxin-producing clostridia*. Geneva: International Organization for Standardization; 2013.
7. UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2018. *Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e taratura*; 2018. Milano: Ente Italiano di Normazione; 2018.

*Serie Rapporti ISTISAN
numero di ottobre 2026, 5° Suppl.*

*Stampato in proprio
Servizio Comunicazione Scientifica – Istituto Superiore di Sanità*

Roma, ottobre 2026