

**ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ**

**Criteria chimici e microbiologici  
per la valutazione di conformità  
degli integratori alimentari a base di piante**

A cura di Brunella Carratù e Paolo Aureli

*Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari*

ISSN 1123-3117

**Rapporti ISTISAN**

**07/45**

Istituto Superiore di Sanità

**Criteria chimici e microbiologici per la valutazione di conformità degli integratori alimentari a base di piante.**

A cura di Brunella Carratù e Paolo Aureli

2007, iv, 87 p. Rapporti ISTISAN 07/45

Il volume raccoglie i metodi analitici, i metodi di campionamento e i valori orientativi di riferimento per il giudizio di conformità di contaminanti chimici e microbiologici negli integratori a base di piante che con la Direttiva 46/2002/CE, recepita in Italia con il DL.vo 169/2004, sono stati collocati nel settore alimentare. Tra i contaminanti chimici vengono presi in considerazione il benzo[a]pirene (BaP), gli elementi in traccia (As, Cd, Hg, Pb), i fitofarmaci, le aflatoxine totali e l'ocratossina A; tra quelli microbiologici la *Listeria monocytogenes* e la Salmonella. In attesa che vengano fissati dei criteri ufficiali dalle autorità competenti nella gestione del rischio, la presente iniziativa nasce con l'intento di fornire una linea guida a tutte le strutture coinvolte nel controllo ufficiale e nell'autocontrollo con cui stabilire l'accettabilità di questa particolare categoria di prodotti.

*Parole chiave:* Integratori a base di piante, Contaminanti, Metodi analitici

Istituto Superiore di Sanità

**Chemical and microbiological criteria for conformity evaluation of plant based food supplements.**

Edited by Brunella Carratù and Paolo Aureli

2007, iv, 87 p. Rapporti ISTISAN 07/45

The volume gathers analytical methods, sampling methods, indicative reference values for conformity evaluation of chemical and microbiological contaminants in plant based food supplements now defined in food area in accordance to national legislation (Italian decree 169/2004) implementing the European Directive 46/2002. Chemical contaminants considered are benzo[a]pyrene, trace elements (As, Cd, Hg, Pb), pesticides, aflatoxins and ochratoxin A; microbiological ones are *Listeria monocytogenes* and Salmonella. Until the official criteria are defined by risk management stakeholders, the purpose of this initiative is to provide a guideline – addressed to all food control system operators – to evaluate the botanical dietary supplement acceptability.

*Key words:* Plant based food supplements, Contaminants, Analytical methods

Si ringrazia Alberto Fraleoni (*Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari, Istituto Superiore di Sanità*) per il prezioso lavoro editoriale e grafico.

Per informazioni su questo documento rivolgersi a: [brunella.carratu@iss.it](mailto:brunella.carratu@iss.it).

Il rapporto è disponibile online sul sito di questo Istituto: [www.iss.it](http://www.iss.it).

Citare questo documento come segue:

Carratù B, Aureli P. (Ed.). *Criteria chimici e microbiologici per la valutazione di conformità degli integratori alimentari a base di piante*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2007. (Rapporti ISTISAN 07/45).

---

Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità e Direttore responsabile: *Enrico Garaci*  
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988

Redazione: *Paola De Castro, Sara Modigliani e Sandra Salinetti*  
La responsabilità dei dati scientifici e tecnici è dei singoli autori.

© Istituto Superiore di Sanità 2007

# INDICE

<b>Premessa</b> .....	iii
<b>METODI CHIMICI</b> .....	1
<b>Determinazione del Benzo[a]Pirene (BaP)</b> .....	3
Determinazione analitica .....	3
Metodo di campionamento .....	5
Preparazione dei campioni .....	8
Metodo d'analisi utilizzato dal laboratorio e requisiti del laboratorio in materia di controllo .....	9
Limiti massimi consigliati .....	11
<b>Determinazione degli elementi in traccia (AS<sub>inorganico</sub>, Cd, Hg, Pb)</b> .....	13
Determinazione analitica .....	13
Metodo di campionamento .....	13
Preparazione del campione .....	16
Criteri di rendimento dei metodi analitici .....	16
Espressione dei risultati analitici .....	18
Limiti massimi consigliati .....	18
Conformità della partita o sottopartita .....	18
<b>Determinazione dei fitofarmaci</b> .....	20
Premessa .....	20
Determinazione analitica .....	21
Metodo di analisi utilizzato e requisiti del laboratorio in materia di controllo .....	21
Parametri di qualità per l'espressione del risultato analitico nelle analisi di residui di fitofarmaci in alimenti di origine vegetale .....	22
<b>Determinazione delle micotossine</b> .....	26
Metodo di analisi per le aflatossine totali .....	26
Metodo di analisi per l'ocratossina A (OTA) .....	30
Metodo di campionamento .....	31
Parametri di efficienza del metodo .....	33
Limiti massimi consigliati .....	34
<b>METODI MICROBIOLOGICI</b> .....	35
<b>Metodo orizzontale per la ricerca di <i>Listeria monocytogenes</i>     (ISO 11290-1/1996; Amendement 1: 2004)</b> .....	37
1. Scopo .....	37
2. Riferimenti normativi .....	37
3. Definizioni .....	37
4. Principio .....	37
5. Terreni di coltura e reagenti .....	38
6. Apparecchiature e vetreria .....	39
7. Metodo di campionamento .....	40
8. Preparazione del campione test .....	40
9. Procedura .....	40
10. Espressione dei risultati .....	44
11. Rapporto di prova .....	44

<b>Metodo orizzontale per la numerazione di <i>Listeria monocytogenes</i></b>	
<b>(ISO 11290-2:1998; Amendment 1 2004)</b> .....	57
1. Scopo.....	57
2. Riferimenti normativi.....	57
3. Definizioni.....	57
4. Principio.....	58
5. Terreni di coltura e reagenti.....	58
6. Apparecchiature e vetreria.....	58
7. Campionamento.....	59
8. Preparazione del campione test.....	59
9. Procedura.....	59
10. Espressione dei risultati (ISO 7218).....	62
11. Rapporto di prova.....	63
<b>Metodo orizzontale per la ricerca della <i>Salmonella</i> spp.</b>	
<b>(ISO 6579:2002/ Corr.1:2004)</b> .....	72
1. Scopo.....	72
2. Normative di riferimento.....	72
3. Termini e definizioni.....	72
4. Principio.....	72
5. Terreni di coltura, reagenti e sieri.....	73
6. Apparecchi e vetreria.....	74
7. Campionamento.....	75
8. Preparazione del campione di prova.....	75
9. Procedimento.....	75
10. Espressione dei risultati.....	79
11. Rapporto di prova.....	79

## PREMESSA

Il quadro normativo comunitario dei prodotti a base di ingredienti vegetali negli ultimi anni si è progressivamente rinnovato per migliorare, semplificare e modernizzare la legislazione in modo da garantire che gli alimenti a rischio non siano immessi sul mercato e che i rischi siano gestiti in maniera appropriata, assecondando anche l'esigenza di un mercato in continua crescita.

L'Unione Europea, infatti, al fine di rendere omogeneo tale mercato, con la Direttiva 46/2002/CE, recepita in Italia con il DL.vo 169/2004, ha voluto avviare un processo di armonizzazione nel settore in quanto i derivati di piante utilizzati da soli o in associazione alla componente nutrizionale negli integratori sono stati collocati nel settore alimentare.

La strada percorsa dal Ministero della Salute per promuovere un utilizzo appropriato degli ingredienti vegetali da parte dei produttori è stata: la definizione di una lista negativa di piante, la definizione di linee guida sui contenuti del dossier tecnico e sulla documentazione che l'impresa deve possedere per la richiesta di notifica al Ministero.

Inoltre con il provvedimento del 26 gennaio 2006 la Conferenza Permanente per i Rapporti tra lo Stato e le Regioni ha sancito l'intesa tra il Ministero della Salute le regioni e le province autonome per l'adozione di un piano di vigilanza annuale di tutti i prodotti ricadenti nel campo di applicazione del DL.vo n. 169/2004.

Tale provvedimento ha comportato l'attivazione di specifiche verifiche ispettive presso le strutture di vendita e di distribuzione di integratori alimentari che hanno messo in luce per il 2005/2006 un commercio diffuso di prodotti non regolamentari in quanto contenenti piante tal quali o come estratti non presenti nella lista di piante ammesse negli integratori alimentari e quindi non collocabili nel settore alimentare.

È da tenere presente però che il requisito di sicurezza non deve basarsi esclusivamente sulla valutazione delle caratteristiche tossicologiche intrinseche degli ingredienti vegetali e sulla loro concentrazione ma anche sulla presenza di contaminanti accidentali o intenzionali, sulle adulterazioni o sofisticazioni o su altre pratiche scorrette che possono influenzare la qualità finale del prodotto. Da qui l'esigenza di imporre una attività di controllo a tutti gli operatori della filiera considerati come un processo produttivo unico in quanto ogni suo componente può impattare sulla sicurezza alimentare.

Ciò premesso, appare evidente che è necessario assicurare la presenza sul mercato di alimenti sicuri. A questo proposito è necessario ribadire che la libera circolazione sul mercato è subordinata all'adozione di criteri armonizzati di sicurezza con cui stabilire l'accettabilità dei prodotti ed evitare interpretazioni divergenti nella valutazione di conformità.

Per criterio di accettabilità/conformità si deve intendere l'insieme di elementi tecnici prefissati che si intendono utilizzare per valutare un determinato tipo di alimento o una categoria alimentare appartenente ad uno stesso lotto. Essi sono: il metodo di campionamento, il numero di campioni, la quantità ponderale di prodotto da prelevare e quella da analizzare, il metodo di analisi, il limite di tolleranza, l'incertezza di misura e le azioni da intraprendere nel caso di non conformità. Per lo specifico settore dei prodotti erboristici non sono disponibili criteri comunitari e conseguentemente non si dispone di limiti tollerabili condivisi per i contaminanti d'interesse sanitario. Come è noto sono disponibili i limiti di tolleranza di una serie di contaminanti alimentari e i relativi metodi per rilevarli.

Considerato quanto sopra e tenuto conto di quanto prescrive la attuale normativa (la legislazione alimentare si deve basare sull'analisi del rischio, tranne quando ciò non sia confacente alle circostanze o alla natura del provvedimento), la presente iniziativa nasce con

l'intendimento di fornire ai laboratori deputati al controllo ufficiale, una raccolta delle procedure analitiche, dei metodi di campionamento e dei valori orientativi di riferimento per il giudizio di conformità; in pratica una linea guida attraverso la quale rendere omogenea l'attività di controllo di tutte le strutture coinvolte nel controllo ufficiale e nell'autocontrollo in attesa che vengano fissati dei criteri ufficiali dalle autorità competenti alla gestione del rischio.

Verranno presi in considerazione tra i contaminanti microbiologici la *Listeria monocytogenes* e la Salmonella tra quelli chimici il benzo[a]pirene (BaP), gli elementi in traccia (As, Cd, Hg, Pb), i fitofarmaci, l'ocratossina A e le aflatossine totali.

È necessario però sottolineare che in materia di controllo ufficiale di alimenti, l'impostazione comunitaria attuale si orienta verso la definizione di criteri generali di rendimento dei metodi analitici svincolando i laboratori dall'utilizzo di un unico metodo ufficiale di riferimento purché il metodo sia conforme ai requisiti esposti nella norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025, pertanto è sembrato doveroso fornire i criteri di rendimento dei metodi anche quando ne viene descritta la specifica procedura analitica.

L'impostazione descrittiva rispetta nella maggior parte dei casi i protocolli ISO, le basi sulle quali sono stati elaborati i metodi sono le stesse metodiche ISO-UNI e quelle ufficiali nazionali e CEE oltre alle esperienze dirette dei ricercatori, esperti del settore, del Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari e del Dipartimento Ambiente e Prevenzione Primaria dell'Istituto Superiore di Sanità ai quali si rivolgono i ringraziamenti per il considerevole contributo fornito.

*Brunella Carratù e Paolo Aureli*

Centro Nazionale per la Qualità  
degli Alimenti e per i Rischi Alimentari  
Istituto Superiore di Sanità

## **METODI CHIMICI**





# DETERMINAZIONE DEL BENZO[a]PIRENE (BaP)

Ettore Coni, Mauro Di Pasquale

Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari

## Determinazione analitica

### 1. Campo di applicazione

Il metodo è applicabile agli integratori a base vegetale per la ricerca dei residui di benzo[a]pirene (BaP) e/o di altri Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA).

### 2. Principio del metodo

Il metodo prevede una fase di estrazione con solvente organico e una successiva fase di purificazione su cartucce per estrazione in fase solida (SPE C18). Gli analiti sono poi determinati mediante Cromatografia Liquida ad Alta Prestazione (HPLC) con rivelatore spettrofluorimetrico.

### 3. Reattivi e materiali

Se non diversamente indicato le soluzioni e le diluizioni si intendono in acqua (3.3).

Tutti i solventi, acqua inclusa, hanno un grado di purezza almeno per HPLC.

- 3.1. Acetone.
- 3.2. Acetonitrile.
- 3.3. Acqua.
- 3.4. Dietiletere.
- 3.5. Metanolo.
- 3.6. N-esano.
- 3.7. N,N-Dimetilformammide (DMF).
- 3.8. Tetraidrofurano (THF).
- 3.9. Soluzione di estrazione – N,N-Dimetilformammide (DMF) (3.7)/ acqua (3.3), 9:1 (v/v)
- 3.10. Soluzione di condizionamento cartucce SPE – N,N-Dimetilformammide (DMF) (3.7)/ acqua (3.3), 1:1 (v/v).
- 3.11. Soluzione standard madre di Benzo[a]Pirene (BaP) e/o di altri Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA) – Pesare esattamente 10 mg di BaP e portarli a volume in un matraccio da 10 mL con acetonitrile (3.2) (1 mg/mL). Questa soluzione è stabile per circa 3 mesi al buio e a 4 °C.
- 3.12. Soluzione standard di lavoro di Benzo[a]Pirene (BaP) e/o di altri Idrocarburi Policiclici Aromatici (IPA) – Preparare una soluzione standard contenente 10-250 µg/L di BaP a partire dalla soluzione madre (3.11), diluendo opportunamente con acetonitrile (3.2).

## 4. Apparecchiature

- 4.1 Agitatore vortex.
- 4.2 Bagno termostato.
- 4.3 Bilancia analitica.
- 4.4 Cartucce SPE C18 da 500 mg, 6 mL.
- 4.5 Centrifuga refrigerata.
- 4.6 Evaporatore rotante.
- 4.7 Filtri di nylon a membrana da 0.45 micron.
- 4.8 HPLC con rivelatore spettrofluorimetrico.
- 4.9 Normale vetreria da laboratorio.
- 4.10 PHmetro.
- 4.11 Sistema SPE Vac Elut.

## 5. Procedimento

### 5.1. Estrazione

In una provetta da centrifuga in vetro introdurre 0,5 g di campione, 5 mL di n-esano (3.6) e 5 mL di soluzione di estrazione (3.9). Agitare su vortex per 2 min e sonicare per 5 minuti. Centrifugare per 5 min a 5 °C a 8000 giri al minuto (rpm). A questo punto sono presenti due fasi: la fase inferiore di DMF/acqua (primo estratto) va lasciata in questa provetta; la fase superiore di n-esano va trasferita in una seconda provetta. Aggiungere in questa seconda provetta altri 5 mL di soluzione di estrazione (3.9), agitare al vortex per 2 min, sonicare per 5 minuti e centrifugare per 5 min a 5 °C a 8000 rpm. Eliminare il surnatante (n-esano). Riunire la fase inferiore di DMF/acqua (secondo estratto) alla prima provetta (primo estratto), lavando con circa 9-10 mL di acqua (3.3), fino a raggiungere un rapporto DMF (3.7)/acqua (3.3), 1:1 (v/v) (1).

### 5.2. Purificazione

Dopo aver condizionato le cartucce SPE C18 con 5 mL di metanolo (3.5) e poi con 5 mL di di soluzione di condizionamento cartucce SPE (3.10), far passare il campione. Lavare le pareti delle provette utilizzate per l'estrazione con 10 mL della soluzione di condizionamento cartucce SPE (3.10). Caricare anche questi 10 mL sulle cartucce. Lavare le cartucce con 10 mL di acqua (3.3) e lasciare asciugare le cartucce per 10 minuti sotto vuoto. Quindi eluire il campione con 5 mL di n-esano (3.6). Portare a secco l'eluato sotto azoto e riprenderlo con 0,2 mL di acetonitrile (3.2). Filtrare su filtri di nylon a membrana (4.7) ed iniettare in HPLC (2).

### 5.3. Condizioni strumentali HPLC

Colonna: C18 a fase inversa, 5 µm, 250 x 4,6 mm  
Temperatura colonna: 35 °C  
Volume di iniezione: 30-200 µL  
Fase mobile A: acqua (3.3)  
Fase mobile B: acetonitrile (3.2)  
Tipo di eluizione: gradiente  
Tempo di corsa: 30 min  
Gradiente secondo quanto indicato nello schema seguente:

Gradiente min	Fase A (Acqua)	Fase B (Acetonitrile)
0	50	50
10	50	50
15	0	100
25	0	100
30	50	50

Tempo di ritenzione: circa 15 min

Flusso della fase mobile: 1,0 mL/min

Lunghezza d'onda di eccitazione: 370 nm

Lunghezza d'onda di emissione: 470 nm

Effettuare l'identificazione dei picchi incogniti per confronto con il tempo di ritenzione della soluzione standard di lavoro (3.12).

## 6. Calcolo ed espressione dei risultati

Il contenuto dell'analita nel campione, espresso in microgrammi per chilogrammo, è calcolato in base alla seguente formula:

$$\text{Analita } (\mu\text{g/kg}) = \frac{A_C \times C_S}{A_S \times F_c}$$

dove:

$A_C$  = area del picco dell'analita nella soluzione campione

$A_S$  = area del picco dell'analita nella soluzione standard

$C_S$  = concentrazione ( $\mu\text{g/kg}$ ) dello standard iniettato.

$F_c$  = fattore totale di concentrazione lungo l'intera analisi = 2,5

## 7. Limiti di sensibilità

Il limite di sensibilità del metodo è di 1  $\mu\text{g/kg}$  (partendo da un campione di 0,5 g).

# Metodo di campionamento

## 1. Finalità e campo di applicazione

I campioni destinati ai controlli del tenore di benzo[a]pirene negli integratori a base vegetale vengono prelevati conformemente alla metodologia descritta qui di seguito. I campioni globali così ottenuti sono considerati rappresentativi dei lotti. La conformità al limite massimo consigliato (Tabella 4) viene stabilita sulla base dei livelli determinati nei campioni di laboratorio.

## 2. Definizioni

– *Partita*

quantità identificabile di una derrata alimentare, oggetto di una consegna e per la quale l'addetto al controllo ufficiale ha stabilito che presenta caratteristiche comuni, quali l'origine, la varietà, il tipo d'imballaggio, il confezionatore dell'imballaggio, lo speditore o i contrassegni.

- *Sottopartita*  
parte designata di una partita al fine di applicare il metodo di campionamento sulla parte in questione; ciascuna sottopartita deve essere separata fisicamente e identificabile.
- *Campione elementare*  
quantitativo di materiale prelevato da un solo punto della partita o della sottopartita.
- *Campione globale*  
totale di tutti i campioni elementari prelevati dalla partita o dalla sottopartita.
- *Campione di laboratorio*  
campione corrispondente ad 1/5 del campione globale omogeneizzato.

### **3. Disposizioni generali**

#### **3.1. Personale**

Il prelievo è effettuato da persona qualificata e abilitata, secondo quanto specificato dall'Autorità competente.

#### **3.2. Prodotto da campionare**

Ciascuna partita da analizzare è oggetto di campionatura separata.

#### **3.3. Precauzioni da prendere**

Durante il campionamento e la preparazione dei campioni occorre adottare precauzioni per evitare qualsiasi alterazione che possa modificare il tenore di benzo[a]pirene, compromettere l'analisi o la rappresentatività del campione globale.

#### **3.4. Campioni elementari**

I campioni elementari sono prelevati per quanto possibile in vari punti distribuiti nell'insieme della partita o sottopartita. Qualsiasi deroga a tale norma deve essere segnalata nel verbale.

#### **3.5. Preparazione del campione globale**

Il campione globale è costituito da tutti i campioni elementari. Il campione globale viene omogeneizzato in laboratorio, salvo il caso in cui questo sia in contrasto con l'attuazione del punto 3.6.

#### **3.6. Repliche dei campioni di laboratorio**

Le repliche dei campioni di laboratorio destinati all'esecuzione dei controlli, ai ricorsi e all'arbitraggio sono prelevati dal campione globale omogeneizzato, salvo il caso in cui tale procedura sia in contrasto con le norme in vigore.

#### **3.7. Confezionamento e inoltro dei campioni**

Ciascun campione globale va collocato in un recipiente pulito, di materiale inerte, che lo protegga adeguatamente da qualsiasi fattore di contaminazione e dai danni che potrebbero essere causati dal trasporto. Si prendono inoltre tutte le necessarie precauzioni per evitare alterazioni della composizione del campione che potrebbero verificarsi durante il trasporto o il deposito.

### 3.8. Sigillatura ed etichettatura dei campioni

Ciascun campione prelevato per uso ufficiale viene sigillato sul luogo del prelievo e identificato secondo le disposizioni vigenti.

Per ciascun prelievo si redige un verbale di campionamento, che consente di identificare con certezza la partita dal quale è stato prelevato, la data e il luogo di campionamento, nonché qualsiasi altra informazione supplementare che possa essere utile all'analista.

## 4. Modalità di campionamento

Il metodo di campionamento applicato deve garantire che il campione globale sia rappresentativo della partita che deve essere controllata.

### 4.1. Numero di campioni elementari

Nel caso di oli essenziali, per i quali è lecito presumere una distribuzione omogenea del benzo[a]pirene nella partita, è sufficiente prelevare un campione elementare per partita per costituire il campione globale. Occorre indicare il riferimento al numero della partita. Per altri prodotti il numero minimo di campioni elementari da prelevare per partita è indicato nella Tabella 1. I campioni elementari avranno peso analogo, non inferiore a 100 g ciascuno, formando un campione globale di peso non inferiore ai 300 g (cfr. punto 3.5).

**Tabella 1. Numero minimo di campioni elementari da prelevare dalla partita**

Peso della partita (in kg)	Numero minimo di campioni elementari da prelevare
< 50	3
da 50 a 500	5
> 500	10

Se la partita è composta da confezioni singole, il numero di confezioni che va prelevato per formare un campione globale è indicato nella Tabella 2.

**Tabella 2. Numero di confezioni (campioni elementari) da prelevare per formare un campione globale se la partita è composta da confezioni singole**

Numero di confezioni o unità nella partita o sottopartita	Numero di confezioni o unità da prelevare
da 1 a 25	1 confezione o unità
da 26 a 100	circa il 5 % o almeno 2 confezioni o unità
> 100	circa il 5 %, al massimo 10 confezioni o unità

#### **4.2. Campionamento a livello di vendita al dettaglio**

Il campionamento dei prodotti alimentari a livello di vendita al dettaglio deve essere effettuato ove possibile conformemente alle disposizioni indicate prima. Nel caso in cui questo non sia possibile, si possono adottare altre procedure di campionamento efficaci, a condizione che garantiscano una sufficiente rappresentatività della partita oggetto del campionamento.

### **5. Conformità della partita o sottopartita alle specifiche**

Il laboratorio di controllo deve sottoporre il campione di laboratorio destinato a provvedimenti di esecuzione a doppia analisi, nei casi in cui i risultati ottenuti dalla prima analisi siano meno del 20 % inferiori o superiori al limite massimo consigliato, e in tali casi calcolare la media dei risultati.

La partita risulta conforme, qualora il risultato della prima analisi o, laddove si sia rivelata necessaria una doppia analisi, qualora la media non superi il rispettivo limite massimo consigliato, tenendo conto degli opportuni margini di errore.

La partita non risulta conforme, qualora il risultato della prima analisi o, laddove si sia rivelata necessaria una doppia analisi, qualora la media superi il rispettivo limite massimo consigliato oltre ogni ragionevole dubbio, tenuto conto degli opportuni margini di errore.

## **Preparazione dei campioni**

### **1. Precauzioni e considerazioni di natura generale relativamente alla presenza di benzo[a]pirene nei campioni**

Il requisito fondamentale consiste nell'ottenere un campione di laboratorio rappresentativo e omogeneo senza introdurre contaminazioni secondarie.

L'analista dovrebbe garantire che i campioni non siano contaminati durante la preparazione del campione stesso. I contenitori devono essere risciacquati con acetone purissimo o esano (p.a., qualità HLPC o equivalente) prima dell'uso, onde minimizzare il rischio di contaminazione. Nella misura del possibile gli apparecchi che entrano in contatto con il campione devono essere formati da materiali inerti, ad esempio alluminio, vetro o acciaio inossidabile lucidato. È opportuno evitare le materie plastiche quali polipropilene, PTFE, ecc., poiché l'analita può essere assorbito da questi materiali.

Tutto il materiale di campionamento ricevuto dal laboratorio deve essere utilizzato per la preparazione di materiale da analizzare. Soltanto i campioni ben omogeneizzati permettono di ottenere risultati riproducibili.

Per la preparazione dei campioni possono essere utilizzate numerose procedure specifiche soddisfacenti.

### **2. Trattamento del campione ricevuto nel laboratorio**

Il campione globale completo viene macinato finemente (se del caso) e attentamente miscelato con un metodo che garantisce una completa omogeneizzazione.

### 3. Suddivisione dei campioni destinati all'esecuzione dei provvedimenti e a scopi di difesa

Le repliche di campioni destinati all'esecuzione dei controlli, ai ricorsi e all'arbitraggio sono prelevati dal campione globale omogeneizzato, salvo il caso in cui tale procedura sia contraria alle norme sul campionamento in vigore.

## Metodo d'analisi utilizzato dal laboratorio e requisiti del laboratorio in materia di controllo

### 1. Definizioni

Qui di seguito indichiamo alcune delle definizioni utilizzate più comunemente che il laboratorio dovrà usare:

- $r$  = Ripetibilità: valore al di sotto del quale la differenza assoluta fra i risultati di due test individuali, ottenuti in condizioni di ripetibilità (vale a dire, lo stesso campione, lo stesso operatore, lo stesso apparecchio, lo stesso laboratorio e un breve intervallo di tempo), dovrebbe collocarsi entro una percentuale specifica di probabilità (di solito 95 %), pertanto  $r = 2,8 \times sr$ .
- $sr$  = Deviazione standard, calcolata a partire dai risultati ottenuti in condizioni di ripetibilità.
- $RSDr$  = Deviazione standard relativa, calcolata a partire dai risultati ottenuti in condizioni di ripetibilità  $[(sr/x) \times 100]$ .
- $R$  = Riproducibilità: valore al di sotto del quale è possibile che la differenza assoluta fra i risultati di test individuali, ottenuti in condizioni di riproducibilità (vale a dire, per un prodotto identico, ottenuto da operatori in laboratori diversi utilizzando il metodo standard di test), si collochi entro una certa percentuale di probabilità (solitamente il 95 %);  $R = 2,8 sr$ .
- $sR$  = Deviazione standard, calcolata a partire da risultati ottenuti in condizioni di riproducibilità.
- $RSDR$  = Deviazione standard relativa, calcolata a partire da risultati ottenuti in condizioni di riproducibilità  $[(sR/x) \times 100]$ , in cui  $x$  rappresenta la media dei risultati per tutti i laboratori e campioni.
- $HORRATr$  =  $RSDr$  osservata, divisa per il valore di  $RSDr$  stimato a partire dall'equazione di Horwitz (3), supponendo  $r = 0,66R$ .
- $HORRATR$  = Valore osservato di  $RSDR$  diviso per il valore calcolato di  $RSDR$  a partire dall'equazione di Horwitz.
- $U$  = Incertezza ampliata, utilizzando un coefficiente di copertura di 2 che determina un livello di affidabilità del 95 % circa.

## 2. Requisiti generali

I metodi di analisi utilizzati per il controllo degli integratori a base vegetale devono essere conformi alle disposizioni dei punti 1 e 2 dell'Allegato della direttiva 85/591/CEE del Consiglio.

## 3. Requisiti specifici

Nel caso in cui a livello comunitario non siano indicati metodi specifici per la determinazione del tenore di benzo[a]pirene negli integratori a base vegetale, i laboratori possono scegliere qualsiasi metodo convalidato, purché sia conforme ai criteri che figurano nella Tabella 3. Sarebbe opportuno che la convalida comprendesse un materiale di riferimento certificato.

**Tabella 3. Criteri relativi alle prestazioni per i metodi di analisi del benzo[a]pirene**

Parametro	Valore/osservazione
Limite d'individuazione	Non oltre 0,3 µg/kg
Limite di quantificazione	Non oltre 0,9 µg/kg
Precisione valori	HORRATr o HORRATR inferiori a 1,5 nella provadi convalida collettiva
Recupero	50-120%
Specificità	Nessuna interferenza proveniente dalla matrice o spettrale, verifica dell'individuazione positiva

### 3.1. Criteri relativi alle prestazioni. Approccio della funzione d'incertezza

Per valutare l'adeguatezza del metodo di analisi che il laboratorio deve utilizzare è tuttavia possibile un'impostazione basata sull'incertezza. Il laboratorio può usare un metodo che produca risultati che comportano un'incertezza massima normalizzata. L'incertezza massima normalizzata può essere calcolata utilizzando la seguente formula:

$$U_f = \sqrt{[(LOD/2)^2 + (0,2 C)^2]}$$

dove:

$U_f$  rappresenta l'incertezza massima normalizzata,

LOD è il limite d'individuazione del metodo,

$C$  è la concentrazione d'interesse.

Se un metodo d'analisi fornisce risultati che presentano livelli d'incertezza inferiori all'incertezza massima normalizzata, questo metodo sarà altrettanto valido di quello che è conforme alle caratteristiche indicate nella Tabella.

## 4. Calcolo del tasso di recupero e registrazione dei risultati

Il risultato delle analisi va riportato, corretto o meno, ai fini di un recupero. Le modalità di registrazione e il tasso di recupero devono essere indicati. I risultati d'analisi corretti a titolo di recupero sono utilizzati per verificare la conformità (cfr. Allegato I, punto 5).



L'analista deve tener conto della relazione della Commissione europea sul rapporto fra i risultati d'analisi, la misura dell'incertezza, i fattori di recupero e le disposizioni della legislazione comunitaria relativa alle derrate alimentari (4).

Il risultato d'analisi deve essere riportato come  $x \pm U$ , dove  $x$  rappresenta il risultato d'analisi e  $U$  l'incertezza della misurazione.

## 5. Norme di qualità applicabili ai laboratori

I laboratori devono conformarsi alle disposizioni della direttiva 93/99/CEE.

## 6. Altre considerazioni relative alle analisi

### 6.1. Controllo della competenza

Partecipazione a programmi di controllo della competenza conformi all'*International Harmonised Protocol for the Proficiency Testing of (Chemical) Analytical Laboratories* (5) elaborati a cura dell'IUPAC/ISO/AOAC.

### 6.2. Controllo interno della qualità

I laboratori devono poter dimostrare l'applicazione di procedure di controllo interno della qualità. Esempi delle procedure sono riportati in *ISO/AOAC/IUPAC Guidelines on Internal Quality Control in Analytical Chemistry Laboratories* (6).

## Limiti massimi consigliati

Nella Tabella 4 vengono mostrati i limiti massimi consigliati di benzo[a]pirene (BaP) negli integratori contenenti ingredienti vegetali.

**Tabella 4. Limiti massimi consigliati di benzo[a]pirene (BaP) negli integratori a base vegetale**

Tipologia di ingrediente vegetale	BaP µg/kg
Pianta essiccata*	10
Estratti fluidi**	10
Estratti secchi**	10
Estratti molli**	10
Tinture***	10
Pianta essiccata polverizzata****	10
Pianta fresca polverizzata****	2
Tinture madri***	2
Pianta fresca	2
Macerati glicerinati*****	2

\* Parti di piante essiccate e frantumate destinate a tisane, decotti ed infusi.

\*\* Preparazioni semiliquide (e.fluidi) o solide (e.secchi) o di consistenza intermedia (e. molli) ottenute a partire da piante generalmente essiccate estratte con solventi appropriati.

\*\*\* Preparazioni liquide risultanti dall'azione di un veicolo alcolico su piante essiccate (tinture) o allo stato fresco (t.madri).

\*\*\*\* Preparazioni solide, ottenute sottoponendo la pianta essiccata o fresca ad una particolare polverizzazione e utilizzate tal quali nella produzione di capsule o compresse.

\*\*\*\*\* Preparazioni liquide risultanti dall'azione solvente di una miscela acqua-glicerolo-alcool su piante allo stato fresco.

## Bibliografia

1. Barranco A, Alonso-Salces RM, Bakkali A, Berrueta LA, Gallo B, Vicente F, Sarobe M, Solid-phase clean-up in the liquid chromatographic determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in edible oils. *J Chrom A* 2003;988(13):33-40.
2. Bogusz MJ, Abu El Hajj S, Ehaideb Z, Hassan H, Al-Tufail M. Rapid determination of benzo(a)pyrene in olive oil samples with solid-phase extraction and low-pressure, wide-bore gas chromatography–mass spectrometry and fast liquid chromatography with fluorescence detection. *J Chrom* 2004;1026(1-2):1-7.
3. Horwitz W. Evaluation of Analytical Methods for Regulation of Foods and Drugs. *Anal Chem* 1982;54 67A-76A.
4. European Commission. Food and Feed Safety. *Report on the relationship between analytical results, the measurement of uncertainty, recovery factors and the provisions in EU food legislation, 2004*. Disponibile all'indirizzo: [http://europa.eu.int/comm/food/food/chemicalsafety/contaminants/index\\_en.htm](http://europa.eu.int/comm/food/food/chemicalsafety/contaminants/index_en.htm); ultima consultazione 13/12/2007.
5. ISO/AOAC/IUPAC. International Harmonised Protocol for Proficiency Testing of (Chemical) Analytical Laboratories. Ed. Thompson M and Wood R, *Pure Appl Chem* 1993;65:2123-44 (Anche pubblicato in *J AOAC International* 1993;76:926).
6. ISO/AOAC/IUPAC. International Harmonised Guidelines for Internal Quality Control in Analytical Chemistry Laboratories. Ed Thompson M. and Wood R, *Appl Chem* 1995;67:649-66.

# DETERMINAZIONE DEGLI ELEMENTI IN TRACCIA (AS<sub>INORGANICO</sub>, CD, HG, PB)

Francesco Cubadda, Federica Aureli  
Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari

## Determinazione analitica

Non è prescritto alcun metodo specifico per la determinazione del tenore di arsenico (As), cadmio (Cd), mercurio (Hg) e piombo (Pb) negli integratori a base di ingredienti vegetali.

In generale, il campione da analizzare dovrà essere sottoposto a un processo di digestione ossidativa, ad esempio in ambiente acido mediante irraggiamento con le microonde a temperatura e pressione elevate (1-7).

Per la determinazione strumentale degli analiti, vi sono diverse tecniche analitiche idonee allo scopo quali la spettrofotometria di assorbimento atomico con fornello di grafite (Cd, Pb) (2-3), la spettrofotometria di assorbimento atomico con generazione di idruri (As) (3-4), la spettrofotometria di assorbimento atomico a vapori freddi (Hg) (3, 5), la spettrometria di massa con sorgente al plasma accoppiato induttivamente (As, Cd, Hg, Pb) (5-7).

Per quanto concerne l'arsenico *inorganico* (As<sub>in</sub>) – definizione che include le specie inorganiche sia dell'arsenico trivalente che dell'arsenico pentavalente – se l'arsenico totale (As) determinato con un'opportuna metodica risulta inferiore ai limiti massimi consigliati, non sono necessari ulteriori accertamenti analitici. In caso contrario, occorre procedere alla determinazione selettiva delle forme inorganiche dell'arsenico. Trattandosi di composti dell'arsenico solubili in acqua è possibile condurre l'estrazione con acqua o con miscele di acqua e metanolo 1:1. È buona norma eseguire entrambi i procedimenti di estrazione e selezionare quello con il più alto recupero per la specifica matrice indagata. Tecniche quali la sonicazione o l'agitazione meccanica prolungata sono frequentemente utilizzate per aumentare le rese di estrazione (4); il procedimento di estrazione deve comunque essere ripetuto per almeno 3 volte. La generazione degli idruri dei composti estratti consente una stima di massima dell'arsenico *inorganico*; stima in eccesso in quanto sono soggetti alla reazione oltre alle specie inorganiche anche altri arsenocomposti come l'acido monometilarsinico e l'acido dimetilarsinico (4). Un metodo più selettivo è quello basato sulla combinazione di una separazione cromatografica delle diverse specie e di un idoneo detector atomico per la successiva determinazione del loro tenore in arsenico, ovvero sull'uso di tecniche quali la cromatografia liquida ad alta pressione accoppiata *on-line* con la spettrometria di massa con sorgente al plasma accoppiato induttivamente (HPLC-ICP-MS) (4, 7).

## Metodo di campionamento

### 1. Finalità e campo di applicazione

Il metodo di campionamento deve garantire che il campione prelevato sia rappresentativo della partita di prodotti da sottoporre a verifica (8). Questo comporta il prelievo di più campioni elementari di peso analogo che devono essere riuniti in laboratorio in un unico campione

aggregato. La conformità ai limiti massimi consigliati viene stabilita sulla base dei livelli determinati nei campioni di laboratorio. La metodologia di seguito descritta è applicabile a tutti gli integratori a base di ingredienti vegetali.

## 2. Definizioni

- *Partita*  
quantitativo identificabile di prodotto, oggetto di un'unica consegna per la quale si riscontra la presenza di caratteristiche comuni quali l'origine, la varietà, il tipo di imballaggio, l'imballatore, lo speditore o la marcatura.
- *Sottopartita*  
porzione di una partita di grandi dimensioni designata per essere sottoposta a campionamento secondo le modalità stabilite. Ogni sottopartita deve essere fisicamente separata e identificabile.
- *Campione elementare*  
quantitativo di materiale prelevato in un unico punto della partita o della sottopartita.
- *Campione globale*  
campione ottenuto riunendo tutti i campioni elementari prelevati dalla partita o dalla sottopartita. I campioni globali si considerano rappresentativi delle partite o sottopartite da cui sono prelevati.
- *Campione di laboratorio*  
campione destinato al laboratorio. Nel caso di prelievo di più campioni elementari, si ottiene dal campione globale dopo sua completa omogeneizzazione.

## 3. Disposizioni generali

Ciascuna partita o sottopartita da analizzare deve essere oggetto di campionamento separato. In fase di campionamento occorre adottare ogni precauzione necessaria ad evitare qualsiasi alterazione che possa incidere sul tenore degli analiti, compromettere la determinazione analitica o la rappresentatività dei campioni globali. I campioni elementari devono essere prelevati per quanto possibile in vari punti distribuiti nell'insieme della partita o della sottopartita. Il campione globale deve essere ottenuto riunendo i campioni elementari. Ciascun campione va collocato in un recipiente pulito, di materiale inerte, che lo protegga adeguatamente da qualsiasi contaminazione, dalla perdita di analiti per adsorbimento sulla parete interna del recipiente stesso e dai danni che potrebbero essere causati dal trasporto.

Ogni campione deve essere sigillato sul luogo del prelievo e opportunamente identificato. Per ciascun prelievo deve essere redatto un verbale che consenta di identificare con certezza la partita campionata e che indichi la data e il luogo del campionamento, nonché eventuali altre informazioni che possano essere utili all'analista.

## 4. Modalità di campionamento

Le partite di grandi dimensioni dovrebbero essere suddivise in sottopartite purché materialmente possibile. Il regolamento CE 333/2007 che stabilisce i metodi di campionamento per il controllo ufficiale dei tenori di piombo, cadmio, mercurio e altri contaminanti nei prodotti alimentari può essere preso come riferimento per quanto concerne i criteri che consentono di

suddividere le partite in sottopartite (sia nel caso dei prodotti commercializzati sfusi che nel caso di prodotti confezionati) e ad esso si rimanda (9).

È opportuno che il campione globale sia di almeno 1 kg o 1 litro, salvo i casi in cui ciò non risulti possibile (ad esempio nel caso in cui il campione sia composto da una confezione o da un'unità). Il numero minimo di campioni elementari da prelevare da una partita o sottopartita è indicato nella Tabella 1.

Nel caso di prodotti liquidi sfusi, la partita o la sottopartita deve essere accuratamente mescolata per quanto possibile e nella misura in cui ciò non alteri la qualità del prodotto, manualmente o con mezzi meccanici, immediatamente prima del campionamento. In tal caso si presume che gli analiti siano distribuiti omogeneamente all'interno della partita o della sottopartita. È quindi sufficiente prelevare tre campioni elementari dalla partita o dalla sottopartita per formare il campione globale.

I campioni elementari devono avere peso analogo. Ciascun campione elementare dovrebbe pesare almeno 100 grammi o avere un volume di 100 millilitri al fine di formare un campione globale di almeno 1 kg o 1 litro.

**Tabella 1. Numero minimo di campioni elementari da prelevare da una partita o sottopartita**

<b>Peso della partita (in kg)</b>	<b>Numero minimo di campioni elementari da prelevare</b>
< 50	3
da 50 a 500	5
> 500	10

Se la partita è costituita da confezioni o unità singole, il numero di confezioni o di unità che va prelevato per formare un campione globale è indicato nella Tabella 2.

**Tabella 2. Numero di confezioni (campioni elementari) da prelevare per formare un campione globale se la partita consiste in confezioni o unità singole**

<b>Numero di confezioni o unità nella partita o sottopartita</b>	<b>Numero di confezioni o unità da prelevare</b>
da 1 a 25	1 confezione o unità
da 26 a 100	circa il 5 % o almeno 2 confezioni o unità
> 100	circa il 5 %, al massimo 10 confezioni o unità

Il prelievo di campioni di prodotti nella fase della distribuzione al dettaglio dovrebbe essere conforme alle norme di campionamento sopra descritte. Ove ciò non sia possibile, nella fase della distribuzione al dettaglio si può adottare una metodologia di campionamento alternativa, purché tale da garantire una rappresentatività sufficiente della partita o della sottopartita oggetto di campionamento.

In ogni circostanza durante il prelievo, il trasporto o la conservazione del campione devono essere adottate tutte le precauzioni necessarie ad evitare alterazioni della sua composizione (8).

## Preparazione del campione

### 1. Assicurazione di qualità

I laboratori di prova devono essere conformi alle linee guida per l'attuazione di un sistema per l'assicurazione della qualità emanate da organizzazioni nazionali e internazionali, fra le quali si ricordano IUPAC, ISO, AOAC, CITAC, Eurachem.

I laboratori dovrebbero partecipare a programmi di verifica della competenza conformi all'*International Harmonised Protocol for the Proficiency Testing of Analytical Chemistry Laboratories* (10) elaborato sotto l'egida dell'IUPAC/ISO/AOAC.

I laboratori dovrebbero altresì poter dimostrare l'applicazione di procedure di controllo interno della qualità. Esempi di tali procedure sono citati nel documento ISO/AOAC/IUPAC *Harmonized Guidelines on Internal Quality Control in Analytical Chemistry Laboratories* (11). In particolare riveste grande importanza l'utilizzo di materiali di riferimento certificati in matrice (MRC) per la valutazione dell'accuratezza e precisione dell'analisi. Detti materiali devono essere sottoposti all'intero iter analitico dei campioni di laboratorio e segnatamente alle medesime procedure di digestione/estrazione e a tutto il successivo trattamento, fino alla determinazione strumentale finale. È importante che la matrice dei MRC utilizzati sia quanto più possibile simile a quella dei prodotti da analizzare.

### 2. Precauzioni e considerazioni di natura generale

Nel corso della preparazione dei campioni per l'analisi occorre evitare qualunque alterazione del tenore degli analiti nel campione e nelle aliquote da sottoporre ad analisi. In particolare occorre prevedere l'utilizzo di laboratori e materiali che prevengano contaminazioni dei campioni per deposizione atmosferica o per cessione diretta. Occorre altresì evitare l'utilizzo di contenitori che possano rilasciare l'analita nel campione o viceversa determinarne una perdita per adsorbimento sulle superfici. A tal fine si consiglia l'uso di idonei contenitori monouso fabbricati con polimeri non contaminanti (8).

### 3. Trattamento del campione ricevuto in laboratorio

Nel caso in cui siano stati prelevati più campioni elementari, questi vanno riuniti in laboratorio in un unico campione globale da rendere poi omogeneo attraverso opportune procedure. Per lo sminuzzamento e la completa omogeneizzazione di materiali grossolani si può ricorrere a dispositivi operanti in modo continuo (molini, blender) o discontinuo (mortai), secondo la natura del campione. In generale, per gli analiti considerati, è lecito l'utilizzo di dispositivi recanti lame di acciaio inossidabile di elevata qualità, sebbene con opportune cautele in relazione alle caratteristiche fisiche del campione (8, 12). Dal campione globale omogeneizzato si preleva il campione di laboratorio, per il quale è opportuno prevedere l'utilizzo di almeno due aliquote da sottoporre ad analisi.

## Criteri di rendimento dei metodi analitici

Qualunque sia il metodo analitico impiegato per la determinazione degli elementi in traccia è opportuno che questo sia validato (13) e che, in ogni caso, soddisfi i criteri di prestazione della Tabella 3.

Tabella 3. Criteri di rendimento dei metodi analitici

Parametro	Criterio
Applicabilità	Integratori a base di ingredienti vegetali
LOD	Non superiore a un decimo del valore LMC
LOQ	Non superiore a un quinto del valore LMC
Precisione	Valori HORRAT <sub>r</sub> o HORRAT <sub>R</sub> inferiori a 2
Recupero	80%-120%
Specificità	Senza interferenze significative (di matrice o spettrali)

## Definizioni

- LOD = limite di rilevabilità: la minima concentrazione misurata da cui è possibile dedurre con ragionevole certezza statistica la presenza dell'analita. Il limite di rilevabilità è numericamente pari al triplo della deviazione standard della media delle determinazioni in bianco ( $n > 20$ ).
- LOQ = limite di quantificazione: il minimo tenore di analita misurabile con ragionevole certezza statistica. Se l'accuratezza e la precisione sono costanti in un intervallo di concentrazione prossimo al limite di rivelazione, il limite di quantificazione è numericamente pari al sestuplo della deviazione standard della media delle determinazioni in bianco ( $n > 20$ ).
- LMC = limiti massimi consigliati (Tabella 4).
- HORRAT<sub>r</sub> = il valore RSD<sub>r</sub> determinato, diviso per il valore RSD<sub>r</sub> calcolato dall'equazione di Horwitz e sue successive implementazioni (14-15) assumendo  $r = 0,66R$ .
- HORRAT<sub>R</sub> = il valore RSD<sub>R</sub> determinato, diviso per il valore RSD<sub>R</sub> calcolato dall'equazione di Horwitz e sue successive implementazioni (14-15).
- dove:
- $r$  = ripetibilità: valore al di sotto del quale è lecito presumere che la differenza assoluta fra i risultati delle singole prove ottenuti in condizioni di ripetibilità (ovvero stesso campione, stesso operatore, stesso apparecchio, stesso laboratorio, breve intervallo di tempo) rientri in una specifica probabilità (generalmente il 95%) da cui  $r = 2,8 \times sr$ .
- $sr$  = deviazione standard calcolata dai risultati ottenuti in condizioni di ripetibilità.
- RSD<sub>r</sub> = deviazione standard relativa, calcolata da risultati ottenuti in condizioni di ripetibilità  $[(sr/x) \times 100]$ , in cui  $x$  è la media dei risultati ottenuti.
- $R$  = riproducibilità: valore al di sotto del quale è lecito presumere che la differenza assoluta fra i risultati delle singole prove ottenuti in condizioni di riproducibilità (cioè su materiali identici ma da operatori in diversi laboratori, mediante metodo di prova standardizzato) rientri in una specifica probabilità (generalmente il 95%) da cui  $R = 2,8 \times SR$ .
- SR = deviazione standard, calcolata da risultati ottenuti in condizioni di riproducibilità.
- RSD<sub>R</sub> = deviazione standard relativa, calcolata da risultati ottenuti in condizioni di riproducibilità  $[(SR/x) \times 100]$ , in cui  $x$  è la media dei risultati ottenuti.

Per valutare l'idoneità del metodo di analisi si può applicare, in alternativa, un criterio basato sull'incertezza di misura (9). L'incertezza di misura standard del metodo ( $u$ ) viene confrontata con quella calcolata attraverso una opportuna formula, definita "massima incertezza di misura standard". Se il metodo presenta un'incertezza di misura standard inferiore a quella massima calcolata, esso può essere considerato idoneo allo scopo.

## Espressione dei risultati analitici

Il risultato delle determinazioni è rappresentato dalla media dei risultati ottenuti su ogni singola aliquota sottoposta ad analisi e deve tenere conto dell'incertezza delle misure e delle eventuali correzioni apportate in base alla determinazione del recupero. È quindi opportuno esprimere il risultato nella forma:

$$x \pm U$$

dove  $x$  è la media dei risultati e  $U$  l'incertezza di misura estesa, calcolata con un fattore di copertura 2 corrispondente a un livello di confidenza intorno al 95% ( $U = 2u$ ). Inoltre è opportuno specificare se è stata effettuata una correzione per il recupero (e la sua entità) e se nell'analisi sono stati inclusi idonei MRC. Questi ultimi possono essere impiegati per dimostrare la soddisfacente accuratezza del metodo ed, eventualmente, per stabilire il recupero (ovvero applicare opportuni fattori di recupero al risultato finale).

Per la determinazione dell'arsenico *inorganico* mediante metodi di speciazione (identificazione delle singole forme a seguito di un processo di estrazione) è necessario precisare il recupero dell'estrazione e, nel caso di ricorso ad una separazione cromatografica, il recupero post-colonna (4, 7).

## Limiti massimi consigliati

I limiti massimi consigliati (LMC) per arsenico *inorganico* ( $As_{in}$ ), cadmio (Cd), mercurio (Hg) e piombo (Pb) negli integratori a base di ingredienti vegetali sono riportati nella Tabella 4.

**Tabella 4. LMC negli integratori a base vegetale**

Tipologia di integratore	$As_{in}$	Cd	Hg	Pb
Pianta essiccata (mg/kg) *	0,20	0,10	0,07	0,35
Pianta polverizzata (mg/kg)**	0,50	0,25	0,15	0,85
Estratti secchi (mg/kg)***	0,50	0,25	0,15	0,85
Tinture (mg/L) ****	0,50	0,25	0,15	0,85

\* Parti di piante essiccate e frantumate destinate a tisane, decotti ed infusi.

\*\* Preparazioni solide ottenute sottoponendo la pianta essiccata o fresca a polverizzazione, utilizzate tal quali nella produzione di capsule o compresse.

\*\*\* Preparazioni concentrate ottenute a partire da piante essiccate mediante estrazione con solventi appropriati, normalmente assunte sotto formule di capsule o compresse.

\*\*\*\* Preparazioni liquide risultanti dall'azione di un veicolo alcolico su piante essiccate (tinture) o fresche (tinture madri).

## Conformità della partita o sottopartita

La partita o la sottopartita è ritenuta non conforme se il risultato dell'analisi sul campione di laboratorio supera il relativo LMC, tenuto conto dell'incertezza di misura estesa e della correzione del risultato per il recupero nel caso in cui il metodo analitico utilizzato abbia comportato una fase di estrazione.



## Bibliografia

1. Wu S, Feng X, Wittmeier A. Microwave digestion of plant and grain reference materials in nitric acid or a mixture of nitric acid and hydrogen peroxide for the determination of multi-elements by inductively coupled plasma mass spectrometry. *J Ana. Atom Spectrom* 1997;12:797-806.
2. Jorhem L, Engman J. Determination of lead, cadmium, zinc, copper, and iron in foods by atomic absorption spectrometry after microwave digestion: NMKL collaborative study. *J AOAC Int* 2000;83:1189-203.
3. Akman S, Demirata-Ozturk B, Tokman N. Atomic absorption spectrometry. In: Picò Y. (Ed.). *Food Toxicant Analysis – Techniques, Strategies and Developments*. Amsterdam: Elsevier; 2007. p. 637-665.
4. Francesconi KA, Kuehnelt D. Determination of arsenic species: a critical review of methods and applications, 2000-2003. *Analyst* 2004;129:373-95.
5. Perring L, Andrey D. Optimization and validation of total mercury determination in food products by cold vapor AAS: comparison of digestion methods and with ICP-MS analysis. *Atom Spectrosc* 2001;22:371-78.
6. Cubadda F, Raggi A, Testoni A, Zanasi F. Multielemental analysis of food and agricultural matrices by inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Journal of AOAC International* 2002;85(1):113-21.
7. Cubadda F. Inductively coupled plasma mass spectrometry. In: Picò Y(Ed.). *Food Toxicant Analysis – Techniques, Strategies and Developments..* Amsterdam: Elsevier; 2007. p.697-751.
8. Cubadda F, Stacchini P. Elementi inorganici in matrici alimentari: campionamento, conservazione e trattamento del campione. In: *Determinazione di elementi inorganici di interesse tossicologico in matrici ambientali, biologiche e alimentari*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2003. (Rapporti ISTISAN 03/45). p 1-15.
9. Italia. Regolamento CE 28 marzo 2007, n. 333/2007 relativo ai metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di piombo, cadmio, mercurio, stagno inorganico, 3-MCPD e benzo(a)pirene nei prodotti alimentari.
10. Thompson M, Ellison SLR, Wood R. The international harmonized protocol for the proficiency testing of analytical chemistry laboratories (IUPAC Technical Report). *Pure Appl Chem* 2006;78:145-96.
11. Thompson M, Wood R. Harmonized guidelines on internal quality control in analytical chemistry laboratories (IUPAC Technical Report). *Pure Appl Chem* 1995;67:649-66.
12. Cubadda F, Baldini M, Carcea M, Pasqui LA, Raggi A, Stacchini P. Influence of laboratory homogenization procedures on trace element content of food samples: an ICP-MS study on soft and durum wheat. *Food Addit Contam* 2001;18:778-87.
13. Thompson M, Ellison SLR, Wood R. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis (IUPAC Technical Report). *Pure Appl Chem* 2002;74:835-55.
14. Horwitz W, Albert R. The Horwitz Ratio (HorRat): a useful index of method performance with respect to precision. *J AOAC Int* 2006;89:1095-109.
15. Thompson M. Recent trends in inter-laboratory precision at ppb and sub-ppb concentrations in relation to fitness for purpose criteria in proficiency testing. *Analyst* 2000;125:385-86.

## DETERMINAZIONE DEI FITOFARMACI

Danilo Attard Barbini, Roberto Dommarco  
*Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria*

### Premessa

Con il termine fitofarmaci si intendono i principi attivi e i prodotti commerciali contenenti detti principi attivi impiegati dall'uomo per la lotta ai parassiti e alle malattie che colpiscono le piante, con particolare riguardo i prodotti vegetali coltivati destinati all'alimentazione umana.

A seconda della classe chimica cui appartengono si possono, a titolo di esempio, menzionare: organoclorurati, organofosforici, carbammati, ditiocarbammati, piretroidi, N-metilcarbammati, triazolici, neonicotinoidi, benzimidazolici, ecc.

Attualmente sono presenti sul mercato internazionale circa 1500 fitofarmaci commercializzati in un numero non precisato di prodotti fitosanitari.

A seguito dei trattamenti effettuati (prima della semina, in campo, in serra, dopo la raccolta) si possono ritrovare nelle colture trattate quantità relativamente piccole (residui) dei principi attivi impiegati, dei loro prodotti di metabolismo e/o di degradazione, i quali entrano a contatto con l'uomo attraverso l'assunzione di cibi e bevande (ivi compresi prodotti trasformati di origine vegetale e animale).

Le autorità comunitarie e nazionali preposte al controllo e alla tutela della salute pubblica hanno provveduto a varare una serie di norme per:

- regolamentare l'immissione in commercio e l'impiego dei prodotti fitosanitari (1, 2);
- fissare, attraverso studi tossicologici e prove sperimentali in campo, i valori massimi di residuo tollerabili sulle varie colture per ciascun principio attivo (3);
- attuare piani nazionali con cadenza annuale, coordinati a livello europeo, per il controllo ufficiale degli alimenti ivi compreso il controllo della conformità degli alimenti al DM 27.08.2004;
- stabilire le modalità di prelevamento dei prodotti alimentari da sottoporre a controllo ufficiale (4);
- fissare a livello comunitario i requisiti che i laboratori di analisi devono possedere per poter effettuare i controlli analitici (5);
- fissare i requisiti minimi di prestazione che i metodi di analisi per la determinazione dei residui di fitofarmaci devono soddisfare (6).

Data la numerosità e la dinamicità del mercato (con l'immissione in commercio di molecole nuove e ritiro di quelle divenute obsolete o non incluse in All. I alla Dir. 91/414/CEE dopo revisione comunitaria) e l'enorme varietà (da un punto di vista chimico) dei fitofarmaci presenti in commercio, non sono disponibili metodi ufficiali di analisi per i residui di tali molecole ad eccezione di un metodo ufficiale per l'analisi dei residui dei ditiocarbammati (espressi come CS<sub>2</sub>) (7).

I metodi sviluppati per la tipologia di analisi in questione sono distinguibili in metodi di screening e metodi di conferma.

Nelle sue linee generali un metodo analitico di screening dovrebbe essere in grado di permettere la determinazione simultanea del più elevato numero possibile di analiti (metodo multiresiduo) mentre un metodo di conferma può e deve essere specifico per la conferma

analitica qualitativa e quantitativa delle singole molecole individuate con un metodo di screening.

## Determinazione analitica

Un metodo per la determinazione dei residui di fitofarmaci è generalmente composto dalle seguenti fasi analitiche:

- **omogeneizzazione** del campione con mezzi meccanici avente lo scopo di ottenere una matrice omogenea dalla quale prelevare aliquote da saggio il più possibile rappresentative della massa iniziale a disposizione dell'analista;
- **estrazione** mediante solventi (con agitatori meccanici; mediante sistemi automatizzati: ASE, in fase supercritica) in grado di portare in soluzione il maggior numero di principi attivi in un ampio spettro di caratteristiche chimico-fisiche quali polarità, volatilità, solubilità;
- **eventuale ripartizione** fra solventi immiscibili tra di loro (es: acqua-esano, esano-acetonitrile) allo scopo di separare le molecole da analizzare da potenziali interferenti in base a differenti caratteristiche di solubilità (ripartizione liquido-liquido in imbuto separatore, ripartizione in fase solida su cartucce monouso);
- **eventuale purificazione** dell'estratto (mediante colonne o cartucce di silice, allumina, florisil, carbone, GPC);
- **determinazione analitica strumentale** (cromatografia liquida con rivelatori UV e spettrometria di massa, gas cromatografia con vari rivelatori, gascromatografia accoppiata alla spettrometria di massa, spettrofotometria UV-visibile).

## Metodo di analisi utilizzato e requisiti del laboratorio in materia di controllo

Molteplici sono le soluzioni adottabili individualmente nei vari laboratori di analisi, purché vengano rispettate le norme comunitarie e nazionali relative all'assicurazione della qualità del dato analitico.

In primo luogo è richiesto che un laboratorio che esegue analisi ufficiali per residui di fitofarmaci in matrici alimentari sia accreditato ai sensi della norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2005 (5).

In particolare la norma prevede l'utilizzo, dove esistenti, di metodi pubblicati nelle norme internazionali, regionali o nazionali (garantendo l'impiego dell'ultima revisione disponibile), specificando che, se non disponibili metodi ufficiali, metodi "sviluppati dal laboratorio o adottati dal laboratorio possono essere utilizzati se sono appropriati per l'uso previsto e se sono validati."

Nello specifico, non esistendo metodi ufficiali nazionali per l'analisi dei residui di antiparassitari, i singoli laboratori potranno (e dovranno) adottare metodi di analisi sviluppati internamente o disponibili nella letteratura scientifica di settore, validando tali metodi secondo la normativa comunitaria e nazionale vigente.

Si danno, di seguito, alcune indicazioni operative sui criteri generali a cui un metodo di analisi per i residui, a prescindere da come è strutturato, deve sottostare (parametri di qualità).

## Parametri di qualità per l'espressione del risultato analitico nelle analisi di residui di fitofarmaci in alimenti di origine vegetale

Il risultato numerico di un'analisi chimica può essere indicato come la quantità di un analita in una data quantità di campione iniziale. Il risultato di un'analisi può essere caratterizzato mediante alcuni parametri di qualità quali l'accuratezza, la precisione e l'incertezza di misura.

Le definizioni di accuratezza e precisione sono riportate nel documento SANCO/10232/2006: *Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis* (6).

### 1. Accuratezza ed esattezza

L'accuratezza indica il grado di corrispondenza (*closeness of agreement*) fra i risultati analitici (ciascun valore) rispetto al valore di riferimento accettato.

L'esattezza (o accuratezza della media) indica il grado di accordo fra la media dei valori ottenuti da n prove indipendenti (almeno n=6) e il valore di riferimento accettato ed è in genere espressa come percentuale del recupero medio del misurando dalla matrice. Tale parametro si può quantificare eseguendo una serie di analisi (usualmente è accettato n=6) utilizzando un materiale di riferimento (MR) in cui l'analita è presente in quantità nota, oppure eseguendo un'aggiunta nota (*spiking*) dell'analita ad una matrice "bianca".

Il rapporto percentuale fra il valore medio dell'analita riscontrato effettivamente nel campione e la quantità dichiarata (MR) o aggiunta (*spiking*), usualmente noto come recupero (R%), rappresenta l'errore sistematico del metodo, indicato col termine di accuratezza.

### 2. Precisione

Indica il grado di accordo fra i risultati ottenuti eseguendo una serie di ripetizioni della stessa analisi (usualmente è accettato n=6). La precisione è indicata dalla deviazione standard (ds) delle misure. Un parametro utile per meglio definire la precisione è la DSR% (Deviazione Standard Relativa) definita come il rapporto percentuale fra la deviazione standard e la media delle misure effettuate:

$$\left(\frac{ds}{x} \times 100\right)$$

### 3. Criteri di rendimento dei metodi analitici

Nella Tabella 1 sono riportati i valori di precisione e di accuratezza previsti a seconda dei livelli di concentrazione dei residui di fitofarmaci in alimenti di origine vegetale.

**Tabella 1. Valori di precisione e di accuratezza accettati per l'analisi di residui di fitofarmaci in alimenti di origine vegetale**

Concentrazione (mg/kg)	R% (Accuratezza)	DSR% (Precisione)
0,001 - 0,01	70 - 110	30
>0,01 - 0,1	70 - 110	20
>0,1 - 1	70 - 110	15
>1	70 - 110	10

#### 4. Incertezza

Un approccio possibile per la stima dell'incertezza è quello proposto da Horwitz, che stabilisce che l'incertezza può essere espressa come funzione della sola concentrazione dell'analita:

$$U=2*0,02*c^{0,8495}$$

dove c è la concentrazione dell'analita e U è l'incertezza, espressi come frazione di massa.

Per concentrazioni inferiori a 0,12 mg/kg l'equazione di Horwitz fornirebbe valori eccessivamente elevati, per cui l'incertezza può essere meglio calcolata secondo la formula di Thompson:

$$U=2*0,22*c$$

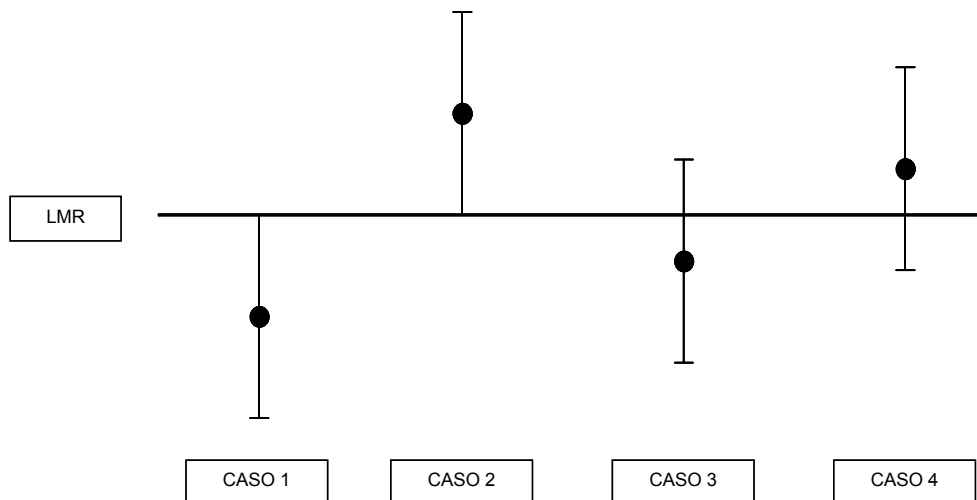
dove c e U sono espressi, in questo caso, in mg/kg.

Questo approccio risulta essere stato adottato da un elevato numero di laboratori italiani preposti ai controlli ufficiali.

La stima dell'incertezza permette di esprimere il risultato (calcolato in mg/kg  $\pm$  U) come l'*intervallo* all'interno del quale può trovarsi il valore vero dell'analita con una probabilità del 95%.

Nel corso dei controlli ufficiali, dovendosi confrontare il risultato ottenuto con un valore limite di legge, possono presentarsi diversi casi che andrebbero considerati in maniera armonizzata da tutti i laboratori preposti al controllo ufficiale degli alimenti.

Generalmente accettato è l'approccio di seguito esemplificato in Figura 1.



**Figura 1. Diverse possibilità in cui si colloca il risultato analitico rispetto al limite di legge**

Nella figura, la linea orizzontale rappresenta graficamente il valore del limite massimo di residuo (LMR) ammesso per un determinato principio attivo su una certa coltura; il pallino pieno rappresenta il risultato analitico  $r$  ottenuto mediante analisi singola o come media di più determinazioni (in mg/kg, arrotondato secondo quanto stabilito nel documento SANCO/10232/2006); la linea verticale, delimitata agli estremi dai trattini orizzontali più

piccoli, rappresenta l'intervallo  $r \pm U$  di concentrazione entro il quale ricade, con una probabilità del 95%, il valore vero.

I quattro casi descritti rappresentano le varie possibilità che possono presentarsi in pratica e che si possono interpretare come segue.

– *Caso 1*

Tutto l'intervallo di concentrazione è inferiore al LMR.

Il campione è conforme (al 95% di probabilità) a quanto stabilito dal D.M. 27 Agosto 2004 e successive modifiche e integrazioni (campione REGOLARE) (3).

– *Caso 2*

Tutto l'intervallo di concentrazione è superiore al LMR o, al più, con il limite inferiore coincidente con il LMR.

Il campione non è conforme (al 95% di probabilità) a quanto stabilito dal D.M. 27 Agosto 2004 e successive modifiche e integrazioni (campione IRREGOLARE) (3).

– *Casi 3 e 4*

L'intervallo di concentrazione comprende il valore di LMR.

Il LMR è compreso nell'intervallo in cui ricade il valore vero attribuibile (al 95% di probabilità) all'analita. Quest'ultimo valore, quindi, non può essere considerato distinguibile, da un punto di vista statistico, dal LMR stesso. Pertanto il campione non può essere giudicato non conforme (campione REGOLARE).

Come conseguenza di questo approccio, la concentrazione minima denunciabile di un analita consentito in/su una determinata matrice con un LMR di 1 mg/kg sarà pari a 1,44 mg/kg, poiché a tale concentrazione l'incertezza risulta  $U = \pm 0,44$  mg/kg. In tale situazione, quindi, l'intervallo di concentrazione ( $1,44 \pm 0,44$  mg/kg) risulterà tutto superiore al LMR.

## 5. Arrotondamento dei risultati

Il citato documento SANCO/10232/2006 detta alcune raccomandazioni, di seguito riassunte, su come arrotondare i risultati analitici. Si ritiene che tali raccomandazioni possano essere adottate dai Laboratori italiani preposti al controllo ufficiale dei residui di fitofarmaci nelle matrici alimentari allo scopo di uniformare le modalità di espressione del risultato.

In generale i risultati  $\geq 0,01$  e  $< 10$  mg/kg dovrebbero essere arrotondati a due cifre significative; i risultati  $\geq 10$  mg/kg possono essere arrotondati a tre cifre significative oppure ad un numero intero.

A titolo di esemplificazione è riportata la Tabella 2.

**Tabella 2. Arrotondamenti in funzione del livello di concentrazione**

Livello di concentrazione (mg/kg)	Esempio di arrotondamento	Note
$\geq 10$	11,3 oppure 11 (no: 11,31)	tre cifre significative o arrotondamento a numero intero
$9,9 \div 0,010$	9,4; 0,54; 0,15; 0,024 (no: 9,44; 0,5; 0,154; 0,02)	due cifre significative

I risultati analitici per i residui di fitofarmaci devono essere espressi in mg/kg avendo cura di riportare l'esatta dizione utilizzata nell'Allegato 2 del DM 27 Agosto 2004 e successive modificazioni e integrazioni (3).

## Bibliografia

1. Italia. Decreto legislativo 17 marzo 1995, n. 194. Attuazione della direttiva 91/414/CEE in materia di immissione in commercio di prodotti fitosanitari. *Supplemento Ordinario alla Gazzetta Ufficiale- Serie Generale* n. 122, 27 maggio 1995.
2. Italia. Decreto del Presidente della Repubblica 23 aprile 2001, n. 290. Regolamento di semplificazione dei procedimenti di autorizzazione alla produzione, alla immissione in commercio e alla vendita di prodotti fitosanitari e relativi coadiuvanti (n. 46, Allegato 1, L. n. 59/1997). *Gazzetta Ufficiale* n. 165, 18 luglio 2001.
3. Italia. Decreto Ministero della Salute 27 agosto 2004. Prodotti fitosanitari: limiti massimi di residui delle sostanze attive nei prodotti destinati all'alimentazione. *Supplemento Ordinario alla Gazzetta Ufficiale- Serie Generale* n. 292, 14 dicembre 2004, successive modificazioni e integrazioni.
4. Italia. Decreto Ministero della Salute 23 luglio 2003. Attuazione della direttiva 2002/63/CE 11 luglio 2002 relativa ai metodi di campionamento ai fini del controllo ufficiale dei residui di antiparassitari nei prodotti alimentari di origine vegetale e animale. *Gazzetta Ufficiale - Serie Generale* n. 221, 23 settembre 2003.
5. UNI CEI EN ISO/IEC 17025. Settembre 2005. *Requisiti generali per la competenza dei laboratori di prova e di taratura.*
6. Documento SANCO/10232/2006. 24 marzo 2006. *Quality Control Procedures for Pesticide Residues Analysis.*
7. Italia. Decreto Ministero della Sanità 18 aprile 1981. Metodo ufficiale di analisi per la determinazione dei residui di ditiocarbammati e thiuramdisolfuri negli e sugli ortofrutticoli. *Gazzetta Ufficiale* n. 155, 8 giugno 1981.

## DETERMINAZIONE DELLE MICOTOSSINE

Carlo Brera

*Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e per i Rischi Alimentari*

Micotossine da ricercare: Aflatossine totali (G2+G1+B2+B1) e Ocratossina A.

Si fa presente che la categoria dei prodotti di interesse è di ampia classificazione pertanto non è possibile individuare un metodo unico valido per tutte le classi di prodotto, tuttavia si suggeriscono le seguenti indicazioni valide per le spezie.

### Metodo di analisi per le aflatossine totali

Il metodo proposto si basa sulla norma EN 14123 dello European Committee for Standardization (CEN) (Campo di applicazione: spezie) (1).

#### 1. Reattivi

- 1.1. Informazioni generali: usare solo reagenti di grado analitico e acqua conforme al grado 3 della norma ISO 3696 (2).
- 1.2. Tampone fosfato salino (PBS) pH = 7,4.  
Sciogliere 0,20 g di cloruro di potassio, 0,20 g di fosfato biacido di potassio, 1,16 g di ortofosfato acido disodico e 8,00 g di cloruro di sodio in 0,9 l di acqua.  
Se del caso, aggiustare il pH a 7,4 con HCl (0,1 mol/L) o NaOH (0,1 mol/L). Diluire ad 1 l con acqua.  
In alternativa, è possibile utilizzare tavolette di PBS pronte all'uso disponibili sul mercato.
- 1.3. Cloruro di sodio (NaCl).
- 1.4. Perbromuro idrobromuro di piridinio (PBPB), [CAS: 39416-48-3].
- 1.5. Acetonitrile, grado HPLC.
- 1.6. Alcol metilico, grado HPLC.
- 1.7. Alcol metilico, per analisi.
- 1.8. Toluene.
- 1.9. Miscela di solventi di estrazione: alcol metilico (1.7) e acqua.  
Miscelare 8 parti per volume di alcol metilico (1.7) con 2 parti per volume di acqua.
- 1.10. n-Esano, per analisi.
- 1.11. Acido nitrico (HNO<sub>3</sub>) = 4 mol/L.  
Diluire 28 mL di acido nitrico (frazione di volume 65 %), o 26 mL di acido nitrico (frazione di volume 70 %) con acqua fino ad un volume finale di 100 mL.
- 1.12. Colonna di Immunoaffinità.  
La colonna di immunoaffinità contiene anticorpi specifici per le aflatossine B1, B2, G1 e G2. La concentrazione massima di solvente delle soluzioni che possono essere applicate alla colonna non dovrà eccedere il 12 % di alcol metilico (1.7).
- 1.13. Fase mobile per HPLC (A): da utilizzare con il PBPB.



Miscelare 6 parti per volume di acqua con 2 parti per volume di acetonitrile (1.5) e 3 parti per volume di alcol metilico (1.7). Degassare la soluzione prima dell'uso.

Fase mobile per HPLC (B): da utilizzare con la cella elettrochimica.

Miscelare 6 parti per volume di acqua con 2 parti per volume di acetonitrile (1.5) e 3 parti per volume di alcol metilico (1.6). Aggiungere 120 mg di bromuro di potassio e 350 µL di acido nitrico (1.11) per litro di fase mobile. Degassare la soluzione prima dell'uso.

1.14. Reagente post-colonna.

Sciogliere 50 mg di PBPB (1.4) in 1 l di acqua. La soluzione può essere usata per quattro giorni se mantenuta in luogo lontano dalla luce diretta e a temperatura ambiente.

1.15. Miscela di toluene (1.8) e acetonitrile (1.5).

Miscelare 98 parti per volume di toluene (1.8) con 2 parti per volume di acetonitrile (1.5).

1.16. Soluzioni di riferimento di aflatossine.

Proteggere le soluzioni di riferimento di aflatossine dalla luce (usare un foglio di alluminio o vetreria ambrata) e stoccare a -18 °C.

Preparazione: Sciogliere singolarmente le aflatossine B1, B2, G1 and G2 in matraccio di opportuno volume nella miscela di toluene e acetonitrile (1.15) in modo tale da ottenere una concentrazione di 10 µg/mL per ciascuna aflatossina. Avvolgere i matracci con un foglio di alluminio e stoccare a meno di 4 °C.

Per determinare l'esatta concentrazione delle aflatossine in ciascuna soluzione, registrare in uno spettrofotometro la curva di assorbimento nell'intervallo di lunghezze d'onda di 330 nm e 370 nm in cuvetta di quarzo da 1 cm (2.8), contro la miscela (1.16) nella cuvetta di riferimento.

Calcolare la concentrazione di ciascuna aflatossina,  $\rho_i$ , in microgrammi per millilitro, usando l'equazione:

$$\rho_i = A_{\max} \times M_i \times 100 / \epsilon_i \times d$$

dove:

$A_{\max}$  = assorbanza determinate al massimo della curva di assorbimento;

$M_i$  = massa di ciascuna aflatossina, espresso in grammi per moli;

$\epsilon_i$  = coefficiente di estinzione molare di ciascuna aflatossina nella miscela (1.16), espressa in m<sup>2</sup> per moli;

$d$  = lunghezza del cammino ottico della cella espresso in centimetri;

$M_i$  ed  $\epsilon_i$  delle aflatossine B1, B2, G1 e G2 sono date in Tabella 1.

**Tabella 1. Massa molare ( $M_i$ ) e coefficiente di estinzione molare ( $\epsilon_i$ ) delle aflatossine B1, B2, G1 e G2**

Aflatossina	$M_i$ (g/mol)	$\epsilon_i$ (m <sup>2</sup> /mol)
B1	312	1930
B2	314	2040
G1	328	1660
G2	330	1790

Soluzioni di riferimento di miscele di aflatossine.

Preparare una soluzione di riferimento di miscele di aflatossine contenente 1000 ng/mL di aflatossina B1 e G1, e 200 ng/mL di aflatossine B2 e G2 nella miscela

toluene-acetonitrile (1.15) tramite appropriata diluizione delle soluzioni di riferimento delle singole aflatossine (B1, B2, G1 e G2) (1.16)

Soluzioni diluite di riferimento di miscele di aflatossine.

Preparare una soluzione diluita di riferimento di miscele di aflatossine contenente 100 ng/mL di aflatossina B1 e G1, 20 ng/mL di aflatossina B2 e G2 nella miscela toluene-acetonitrile (1.15) prelevando esattamente 1.0 mL delle soluzioni di riferimento di aflatossine (1.17) in un matraccio calibrato da 10 mL (5.10) fino a menisco, con la soluzione di toluene e acetonitrile (1.15) e miscelare accuratamente.

Avvolgere il matraccio con foglio di alluminio e mantenere al buio a  $T < 4\text{ }^{\circ}\text{C}$  o in congelatore. Prima dell'uso, portare il matraccio a temperatura ambiente

Soluzioni calibranti.

Utilizzare la soluzione diluita di riferimento delle miscele di aflatossine (1.18) prelevando i volumi indicati nella Tabella 2 in matracci da 10 mL (5.10). Evaporare la soluzione toluene/acetonitrile (1.15) fino a secchezza tramite azoto. Ad ogni matraccio, aggiungere 4 mL of metanolo (1.6), e diluire a 10 mL con acqua, agitando bene.

**Tabella 2. Preparazione delle soluzioni calibranti**

Soluzione calibrante	Volume della soluzione di riferimento delle miscele diluite di aflatossine (1.18) ( $\mu\text{L}$ )	Concentrazione della soluzione calibrante, in ng/mL			
		B1	B2	G1	G2
1	40	0,400	0,080	0,400	0,080
2	120	1,200	0,240	1,200	0,240
3	200	2,000	0,400	2,000	0,400
4	280	2,800	0,560	2,800	0,560
5	360	3,600	0,720	3,600	0,720

Soluzioni *spike*

Preparare una soluzione *spike* pipettando 2 mL delle soluzioni di riferimento di miscele di aflatossine (contenenti 1000 ng/mL di aflatossine B1 e G1, 200 ng/mL di aflatossine B2 e G2, (1.17) in un matraccio tarato da 10 mL.

Evaporare la soluzione toluene/acetonitrile (1.15) fino a secchezza tramite azoto.

Diluire fino a menisco con metanolo (1.6) e agitare bene. La concentrazione della soluzione *spike* è di 200 ng/mL di aflatossina B1 e G1, e 40 ng/mL di aflatossina B2 e G2.

Avvolgere i matracci con un foglio di alluminio e stoccare a meno di  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Prima dell'uso portare il matraccio a temperatura ambiente.

## 2. Apparecchiature

### 2.1. Procedure generali.

Tutta la vetreria che deve essere utilizzata durante l'analisi che entra in contatto con le soluzioni di aflatossine dovrà essere accuratamente neutralizzata tramite lavaggi con acido solforico (2 mol/L) lasciando in immersione per 15 h o tutta la notte. Sciacquare con acqua almeno tre volte. Controllare l'assenza di acido residuo con opportuno indicatore di pH.

### 2.2. Agitatore ad asta o equivalente.

### 2.3. Carta da filtro, p.e. di diametro di 24 cm.

- 2.4. Matraccio conico, munito di tappo a smeriglio.
- 2.5. Filtri di microfibra di vetro, con pori da 1,6  $\mu\text{m}$  o inferiori.
- 2.6. Contenitore di capacit  di 50 mL con attacco "luer".
- 2.7. Matracci tarati da 3 mL, 5 mL, 10 mL e 20 mL, con accuratezza di almeno lo 0,5 %.
- 2.8. Cuvette di quarzo da 1cm.
- 2.9. Pompa HPLC, dispensatrice di flussi di velocit  pari a 1,0 mL/min.
- 2.10. Sistema di iniezione, con sistema di iniezione "total loop". Un loop da 100  $\mu\text{L}$    raccomandato.
- 2.11. Colonna RP-HPLC, p.e. C18 o ODS-2 (25 cm/4,6 mm/5  $\mu\text{m}$ ).
- 2.12. Sistema di derivatizzazione post-colonna con PBPB (1.4) (da usarsi con la fase mobile A 1.13) consistente in una pompa HPLC, una valvola a T a volume morto pari a zero, tubo di reazione minimo 45 cm x 0,5 mm di diametro interno in PTFE.
- 2.13. Sistema di derivatizzazione con cella elettrochimica per la generazione di bromo, p.e. KOBRA cell<sup>®</sup> da usarsi con la fase mobile B (4.16).
- 2.14. Rivelatore a fluorescenza settato a  $\lambda = 360 \text{ nm}$  in eccitazione e a  $\lambda = 435 \text{ nm}$  in emissione.
- 2.15. Pipette di capacit  di 2 mL, 5 mL e 10 mL, con accuratezza di almeno lo 0,5 %.
- 2.16. Bilancia analitica con accuratezza di 0,1 mg.
- 2.17. Bilancia tecnica con accuratezza di 10 mg.
- 2.18. Micropipette di capacit  da 10  $\mu\text{L}$  a 1000  $\mu\text{L}$ .

### 3. Procedimento

#### 3.1. Estrazione

Pesare, approssimativamente 50  $\text{g} \pm 0,1 \text{ g}$  dell'aliquota omogeneizzata in un matraccio conico da 500 mL (2.4). Aggiungere 5 g di cloruro di sodio (1.3) e 300 mL di miscela di estrazione (1.9). Agitare vigorosamente per 15-30 s a mano e poi per 30 min con agitatore (2.2). Filtrare l'estratto usando carta da filtro (2.3). Pipettare 10,0 mL del filtrato in un beker da 100 mL e diluire con 60 mL di PBS (1.2).

#### 3.2. Purificazione

Condizionamento delle colonne di immunoaffinit .

Portare le colonne di immunoaffinit  (1.12) a temperatura ambiente. Connettere la colonna (1.12) ad un contenitore (2.6).

Far passare per gravit  in colonna (1.12) 10 mL di PBS (1.2) ad una velocit  di 2-3 mL/min. Mantenere un piccolo volume (0,5 mL) di PBS sulla colonna finch  il campione viene fatto passare nella colonna.

Trasferire l'estratto diluito al contenitore connesso alla colonnina di immunoaffinit  (1.12).

Eluire le aflatoxine facendo passare 0,50 mL di alcol metilico (1.7) nella colonna. Raccogliere l'eluato in un matraccio calibrato da 5 mL (2.7). Attendere 1 min e applicare una seconda porzione di 0,75 mL di alcol metilico (1.7). Portare a volume con acqua e agitare bene.

#### 3.3. Analisi quantitativa per HPLC

Condizioni operative:

Volume di iniezione: 200  $\mu\text{L}$

Colonna cromatografica: fase inversa di dimensioni 250 mm x 4,6 mm, e diametro delle particelle 5 $\mu$   
Fase mobile: vedi 1.13  
Velocità di flusso: 1 mL/min  
Lunghezze d'onda: eccitazione 365 nm - emissione 435 nm

### 3.4. Derivatizzazione post-colonna

Se si usa la derivatizzazione con PBPB, connettere al sistema cromatografico, dopo la colonna cromatografia, la valvola di miscelazione a T ed il tubo di reazione (vedi 2.12), impostando le velocità dei flussi ai seguenti valori: 1,00 mL/min per la fase mobile (1.13); 0,40 mL/min per il PBPB (1.4)

*NB: Se si usa il sistema di generazione di bromo per via elettrochimica seguire le istruzioni del produttore.*

## Metodo di analisi per l'ocratossina A (OTA)

### 1. Reattivi

- 1.1. Bicarbonato di sodio.
- 1.2. Alcol metilico, per analisi.
- 1.3. Tampone fosfato salino (PBS), pH = 7,4.  
Sciogliere 0,20 g di cloruro di potassio, 0,20 g di fosfato biacido di potassio, 1,16 g di ortofosfato acido disodico e 8,00 g di cloruro di sodio in 0,9 l di acqua.  
Se del caso, aggiustare il pH a 7,4 con HCl (0,1 mol/L) o NaOH (0,1 mol/L).  
Diluire ad 1 l con acqua.  
In alternativa, è possibile utilizzare tavolette di PBS pronte all'uso disponibili sul mercato.
- 1.4. Alcol metilico.
- 1.5. Acido acetico.
- 1.6. Acetonitrile per HPLC.

### 2. Apparecchiature

- 2.1. Omogeneizzatore Waring Blender a due velocità.
- 2.2. Carta da filtro Whatman n. 113 o equivalente (carta per filtrazione ultrarapida).
- 2.3. Matraccio tarato, classe A, da 250 mL.
- 2.4. Colonnina di immunoaffinità.  
La colonna di Immunoaffinità contiene anticorpi specifici per la ocratossina A.

### 3. Procedimento

#### 3.1. Estrazione

- 3.1.1. Pesare 10 g $\pm$ 0,1 g di campione.
- 3.1.2. Aggiungere 200 mL di una soluzione acquosa di bicarbonato di sodio (1.1) all'1% e miscelare ad alta velocità per 2 minuti in un omogeneizzatore Waring Blender (2.1).

- 3.1.3. Filtrare il campione con carta da filtro Whatman No. 113 (2.2) o equivalente e raccogliere il filtrato in un matraccio tarato da 250 mL (2.3).

### **3.2. Purificazione**

- 3.2.1. Trasferire 20 mL del filtrato (equivalenti ad 1 g di campione) in colonnina di immunoaffinità (2.4) ad una velocità di flusso pari a 2-3 mL al minuto.
- 3.2.2. Lavare la colonnina con 20 mL di PBS (1.3), ad una velocità di flusso di non più di 5 mL al minuto.
- 3.2.3. Eluire la OTA dalla colonnina passando per gravità 1,5 mL di alcol metilico (1.4) acidificato con acido acetico (1.5) al 2% e raccogliere in provetta da 5 mL. Insufflare aria tramite siringa per recuperare la massima quantità di eluente dalla colonnina.
- 3.2.3. Passare 1,5 mL di acqua distillata e raccogliere in apposita fiala tarata a 3 mL.

### **3.3. Analisi quantitativa per HPLC**

Condizioni operative:

Volume di iniezione: 150-200 µL nell'HPLC.

Colonna cromatografica: fase inversa di dimensioni 250 mm x 4,6 mm, e diametro delle particelle 5 µ

Fase mobile: acqua acidulata al 2% con acido acetico (1.5)/acetonitrile (1.6) 50/50 v/v

Velocità di flusso: 1 mL/min

Lunghezze d'onda: eccitazione 333 nm – emissione 470 nm.

## **Metodo di campionamento**

### **1. Finalità e campo di applicazione**

Le metodologie di campionamento sono state recentemente emanate dalla Commissione Europea con il Regolamento 401/2006 del 23 febbraio 2006 (3).

Per quanto riguarda le spezie, il regolamento 401 sancisce modalità di campionamento per le sole aflatossine ma non per l'ocratossina per la quale, peraltro, data la analoga eterogenea presenza in una derrata alimentare rispetto alle aflatossine, può essere preso in considerazione il medesimo provvedimento legislativo.

### **2. Modalità di campionamento**

#### **2.1. Peso del campione elementare**

Il peso del campione elementare è di circa 100 g. Nel caso di partite che si presentano in confezioni al dettaglio, il peso del campione elementare dipende dal peso della confezione stessa.

Per le confezioni al dettaglio con un peso superiore a 100 g i campioni globali pesano più di 10 kg. Se il peso di una singola confezione al dettaglio supera di molto i 100 g, da ciascuna di tali confezioni si ritirano 100 g per costituire un campione elementare. Questa operazione può essere effettuata al momento del prelievo del campione o in laboratorio. Nei casi in cui non è possibile applicare le modalità di prelievo sopra descritte senza causare effetti commerciali inaccettabili dovuti al danneggiamento

della partita (ad esempio a causa delle forme d'imballaggio o dei mezzi di trasporto) si può tuttavia ricorrere a un metodo di campionamento alternativo. Ad esempio, se un prodotto di valore viene commercializzato in confezioni al dettaglio da 500 g o da 1 kg, il campione globale può essere ottenuto unendo un numero di campioni elementari inferiore al numero indicato nelle Tabelle 1 e 2, purché il suo peso corrisponda al peso richiesto per il campione globale citato in dette Tabelle.

Se il peso della confezione al dettaglio è inferiore a 100 g e la differenza non è considerevole, una confezione al dettaglio viene considerata equivalente a un campione elementare e il campione globale che ne risulta è inferiore a 10 kg. Se la confezione al dettaglio pesa molto meno di 100 g, un campione elementare è costituito da due o più confezioni al dettaglio in modo che il suo peso si avvicini il più possibile ai 100 g.

## 2.2. Riepilogo del metodo di campionamento per le spezie

### 2.2.1. Metodo di campionamento per partite > 15 tonnellate

Sempreché le sottopartite possano essere separate fisicamente, ciascuna partita deve essere suddivisa in sottopartite conformemente alla Tabella 3. Dato che il peso delle partite non è sempre un multiplo esatto di quello delle sottopartite, quest'ultimo può superare il peso indicato al massimo del 20 %.

Ciascuna sottopartita deve essere oggetto di campionamento separato.

Numero di campioni elementari: 100.

Peso del campione globale: 10 kg.

Nei casi in cui non è possibile applicare le modalità di prelievo sopra descritte senza causare effetti commerciali inaccettabili dovuti al danneggiamento della partita (ad esempio a causa delle forme d'imballaggio o dei mezzi di trasporto), si può ricorrere a un metodo alternativo, a condizione che il campionamento sia il più rappresentativo possibile e che il metodo applicato sia chiaramente descritto e debitamente documentato.

### 2.2.2. Metodo di campionamento per partite < 15 tonnellate.

Per le partite di spezie inferiori a 15 tonnellate si applica un piano di campionamento proporzionato al peso della partita e comprendente da 5 a 100 campioni elementari, riuniti in un campione globale di 0,5-10 kg.

Per determinare il numero di campioni elementari da prelevare, è possibile basarsi sulle cifre della Tabella 3.

**Tabella 3. Suddivisione delle partite in sottopartite in funzione del prodotto e del peso della partita**

Prodotto	Peso della partita (t)	Peso o numero delle sottopartite	Numero dei campioni elementari	Peso del campione globale (kg)
Spezie	≥ 15	25 tonnellate	100	10
	≤ 1		5-100 (*)	0,5-10

(\*) In funzione del peso della partita. Cfr. Tabella 2 di questa parte dell'Allegato

### 2.3. Campionamento nella fase della distribuzione al dettaglio

Il prelievo di campioni nella fase della distribuzione al dettaglio deve essere conforme, nella misura del possibile, alle disposizioni di campionamento di cui alla presente parte. Qualora ciò non sia possibile, si può ricorrere a un metodo alternativo di campionamento nella fase della distribuzione al dettaglio purché il campione globale sia sufficientemente rappresentativo della partita campionata e il metodo sia chiaramente descritto e debitamente documentato. Il campione globale deve comunque pesare almeno 0,5 kg.

### 2.4. Metodo specifico di campionamento per le spezie commercializzate in confezioni sotto vuoto

Per le partite il cui peso è pari o superiore a 15 tonnellate si prelevano almeno 25 campioni elementari in modo da costituire un campione globale di 10 kg. Per le partite inferiori alle 15 tonnellate si preleva il 25% del numero di campioni elementari indicato nella Tabella 4, il che costituisce un campione globale il cui peso corrisponde al peso della partita campionata.

**Tabella 4. Numero di campioni elementari da prelevare in funzione del peso della partita di spezie**

Peso della partita (t)	Numero di campioni elementari	Peso del campione globale (kg)
≤ 0,01	5	0,5
> 0,01- ≤ 0,1	10	1
> 0,1- ≤ 0,2	15	1,5
> 0,2 - ≤ 0,5	20	2
> 0,5 - ≤ 1,0	30	3
> 1,0 - ≤ 2,0	40	4
> 2,0 - ≤ 5,0	60	6
> 5,0 ≤ - 10,0	80	8
> 10,0 - ≤ 15,0	100	10

## 3. Conformità della partita o sottopartita alle specifiche

- 3.1. Accettazione se il campione di laboratorio non supera il limite massimo, tenendo conto dell'incertezza della misura e della correzione per recupero.
- 3.2. Rifiuto se il campione di laboratorio supera il limite massimo oltre ogni ragionevole dubbio, tenendo conto dell'incertezza della misura e della correzione per recupero.

## Parametri di efficienza del metodo

In assenza di metodi di analisi specifici validati si può comunque ricorrere all'utilizzo di metodi di analisi alternativi a quelli proposti fatte salve le condizioni di efficienza (*Performance characteristics*) del metodo utilizzato. Tali parametri sono stati emanati dal Comitato Europeo per la Normalizzazione (CEN) con la norma 13505. Di seguito si riportano i valori di precisione e accuratezza previsti a seconda dei livelli di concentrazione e delle varie micotossine (Tabella 5).

**Tabella 5. Caratteristiche di efficienza dei metodi di analisi per la determinazione delle aflatossine B1 e totali (B1+B2+G1+G2) e della Ocratossina A**

Livello (ug/kg)	RSDr%	RSDR%	Recupero %
<b>Aflatossina B1</b>			
< 1	≤ 40	≤ 60	Da 50 a 120
1 – 10	≤ 20	≤ 30	Da 70 a 110
> 10	≤ 15	≤ 20	Da 80 a 110
<b>Aflatossine totali</b>			
< 1	-	-	Da 50 a 120
1 – 10	≤ 40	≤ 60	Da 70 a 110
> 10	≤ 30	≤ 50	Da 80 a 110
<b>Ocratossina A</b>			
< 1	≤ 40	≤ 60	Da 50 a 120
1 – 10	≤ 20	≤ 30	Da 70 a 110

## Limiti massimi consigliati

Attualmente per le aflatossine nei prodotti in oggetto non esistono limiti massimi tollerabili o valori guida, anche se in Italia è in vigore dal 1999 la circolare n. 10 del 9 giugno (4) in cui per le piante infusionali o loro prodotti derivati è previsto un limite pari a 5 ug/kg e 10 ug/kg per le aflatossine totali. Inoltre, a livello comunitario è in vigore il regolamento 1881/2006 (5) che fissa un limite massimo tollerabile per l'aflatossina B1 nelle spezie pari a 5 ug/kg e 10 ug/kg per le aflatossine totali. Tali limiti sono peraltro considerati anche dalla Farmacopea Ufficiale.

Per quanto riguarda l'ocratossina A, attualmente non sono previsti limiti massimi tollerabili per i prodotti di interesse, ma è attualmente in discussione presso la Commissione Europea un limite massimo tollerabile pari a 10 ug/kg. Pertanto, allo stato attuale delle conoscenze, si propone di adottare un valore guida di 10 ug/kg nei prodotti di interesse.

## Bibliografia

1. Comunità Europea. European Committee for Standardization (CEN). Norma EN 14123 giugno 2003. *Determinazione della aflatossina B1 e della somma di aflatossine B1, B2, G1 e G2 in arachidi, pistacchi, fichi e paprica in polvere. Metodo HPLC con derivatizzazione post-colonna e purificazione con colonna di immunoaffinità.*
2. BS EN ISO 3696. *Water for Analytical laboratory use - Specification and test methods.* Geneva: International Organization for Standardization; 1995.
3. Comunità Europea. Regolamento 23 febbraio 2006, n. 401. Metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari. *GUCE L 70 del 9 marzo 2006.*
4. Italia. Circolare Ministero della Sanità n. 10 del 9 giugno 1999. - Direttive in materia di controllo ufficiale sui prodotti alimentari: valori massimi ammissibili di micotossine nelle derrate alimentari di origine nazionale, comunitaria e Paesi terzi. *Gazzetta ufficiale* n. 135 dell'11 giugno 1999.
5. Comunità Europea. Regolamento 19 dicembre 2006, n. 1881. Tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari. *GUCE L 70 del 20 dicembre 2006.*



# **METODI MICROBIOLOGICI**



# **METODO ORIZZONTALE PER LA RICERCA DI *LISTERIA MONOCYTOGENES* (ISO 11290-1/1996; AMENDEMENT 1: 2004)**

Alfonsina Fiore  
*Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e dei Rischi Alimentari*

## **1. Scopo**

Metodo orizzontale per la determinazione di *L. monocytogenes*.

## **2. Riferimenti normativi**

ISO 6887:1983, Microbiologia - Guide Generali per la preparazione delle diluizioni per l'esame microbiologico.

ISO 7218:1996, Microbiologia degli alimenti e mangimi di origine animale- Regole generali per l'esame microbiologico.

## **3. Definizioni**

### **3.1. *L. monocytogenes***

Microrganismo che forma colonie tipiche su terreni selettivi solidi, e che mostra le caratteristiche morfologiche, fisiologiche e biochimiche descritte, quando le prove sono effettuate, in accordo con questa parte dell'ISO 11290.

### **3.2. Rivelazione di *L. monocytogenes***

Determinazione della presenza o assenza di questo microrganismo, in una data massa o volume di prodotto, in accordo con questa parte dell'ISO 11290.

## **4. Principio**

Il metodo per la ricerca di *L. monocytogenes* necessita di quattro stadi successivi (Allegato A per il diagramma di flusso).

*NOTA 1: Listeria spp. possono essere presenti in piccolo numero insieme ad altri generi presenti in quantità maggiore, pertanto è necessario un arricchimento selettivo. È anche necessario individuare Listeria ssp. stressate e il terreno di arricchimento selettivo primario, con ridotta concentrazione di inibitore, adempie almeno in parte a questa funzione.*

#### **4.1. Arricchimento primario in un terreno di arricchimento liquido selettivo a ridotta concentrazione di agenti selettivi (Brodo half Fraser)**

Inoculo di un terreno di arricchimento selettivo primario contenente un volume di litio cloruro e mezzo volume sia di acriflavina che di acido nalidixico (brodo half Fraser); esso è anche utilizzato come diluente per l'aliquota test (9.1).  
Incubazione dell'aliquota test a 30 °C per 24 h.

#### **4.2. Arricchimento secondario con un terreno di arricchimento liquido selettivo a concentrazione intera di agenti selettivi (Brodo Fraser)**

Inoculo del terreno di arricchimento liquido secondario a concentrazione intera (Fraser broth) con la coltura ottenuta da 4.1.  
Incubazione del Brodo Fraser a 35 °C o 37 °C per 48 h.

#### **4.3. Allestimento delle piastre ed identificazione**

Dalle colture ottenute in 4.1 e 4.2, effettuare una semina su due terreni selettivi solidi:

- Agar *Listeria* in accordo con Ottaviani e Agosti (ALOA). [(1), B.3];
- Agar PALCAM.

Incubazione dell'Agar *Listeria* in accordo con Ottaviani e Agosti, a 37 °C  $\pm$  1 °C e osservazione dopo 24 h  $\pm$  3 h e, se necessario per ulteriori 24  $\pm$  3 h, per verificare la presenza di colonie caratteristiche presuntive di *L. monocytogenes*.

Incubazione del secondo terreno selettivo (PALCAM Agar) alla temperatura di 35-37 °C per 24 h e, se necessario per ulteriori 24  $\pm$  3 h, per verificare la presenza di colonie caratteristiche presuntive di *L. monocytogenes*.

#### **4.4. Conferma**

Subcoltivazione delle colonie presuntive di *L. monocytogenes*, piastrate come descritto in 4.3, e conferma per mezzo di adatti test morfologici, fisiologici e biochimici.

## **5. Terreni di coltura e reagenti**

### **5.1. Generale**

Per le abituali pratiche di laboratorio, vedi ISO 7218.

*NOTA 2: a causa del grande numero di terreni di coltura e reagenti, è preferibile, per la chiarezza del testo, dare la loro composizione e preparazione nell'Allegato B.*

### **5.2. Terreno di arricchimento selettivo primario**

Brodo Fraser a ridotta concentrazione di agenti selettivi (brodo half Fraser) Vedi B.1.

### **5.3. Terreno di arricchimento selettivo secondario a concentrazione intera di agenti selettivi (Brodo Fraser)**

Vedi B.2.

### **5.4. Terreno selettivo solido**

- 5.4.1. Primo terreno: Agar Listeria in accordo con Ottaviani e Agosti (ALOA) (1).  
Vedi B.3.
- 5.4.2. Secondo terreno: PALCAM Agar.  
Vedi B.4.
- 5.4.3. Terreno di coltura solido: Tryptone soya yeast extract agar (TSYEA).  
Vedi B.6.
- 5.4.4. Terreno di coltura liquido: Tryptone soya yeast extract broth (TSYEB).  
Vedi B.7.
- 5.4.5. Agar sangue di montone.  
Vedi B.5.
- 5.4.6. Terreno CAMP (Christie, Atkins, Munch-Petersen) e ceppi test.  
Vedi B.10.
- 5.4.7. Soluzione di perossido di idrogeno.  
Vedi B.11.
- 5.4.8. Soluzione salina tamponata con fosfato (PBS Phosphate –buffered saline).  
Vedi B.12.

## **6. Apparecchiature e vetreria**

Attrezzature microbiologiche usuali ( vedi ISO 7218) e, in particolare ciò che segue:

- 6.1. Apparecchiature per la sterilizzazione a secco (Stufa) o per la sterilizzazione a vapore (autoclave). Vedi ISO 7218.
- 6.2. Incubatore capace di mantenere una temperatura tra 25 °C + 1 e 50 °C +1.
- 6.3. Incubatori per mantenere i terreni inoculati, piastre e tubi entro i seguenti intervalli di temperatura:  
25 °C ± 1 °C  
30 °C ± 1 °C  
37 °C ± 1 °C
- 6.4. Bagno termostato regolabile a 47 °C ± 2 °C.
- 6.5. Anse di platino/iridio o nichel/cromo, di circa 3 mm di diametro e fili dello stesso materiale o bacchette di vetro a gomito o anse monouso.
- 6.6. pHmetro, leggibile il più vicino possibile a 0,01 unità di pH a 25 °C, e che consenta misure accurate fino a + 0,1 unità di pH.
- 6.7. Provette o bottiglie di appropriata capacità, per la sterilizzazione e la conservazione di terreni di coltura e l'incubazione di terreni liquidi.
- 6.8. Cilindri graduati, di capacità da 50 mL a 1000 mL, per la preparazione di diluizioni e terreni completi.
- 6.9. Pipette graduate a svuotamento totale, di capacità nominale 10 mL e 1 mL, rispettivamente graduate in 0,5 e 0,1 unità.

- 6.10. Piastre Petri, da 90 mm a 100 mm di diametro.
- 6.11. Apparecchiatura per il test di illuminazione Henry (opzionale) (Allegato C).
- 6.12. Microscopio, preferibilmente a contrasto di fase, vetrini e vetrini copri-oggetto.

## 7. Metodo di campionamento

È importante che il laboratorio riceva un campione che sia realmente rappresentativo e che non sia stato danneggiato o modificato durante il trasporto o la conservazione.

## 8. Preparazione del campione test

Preparare il campione test in accordo con lo specifico Standard Internazionale, qualora esista.

## 9. Procedura

### 9.1. Aliquota test e sospensione iniziale

Vedere ISO 6887

Per la preparazione della sospensione iniziale, usare come liquido di diluizione il terreno di arricchimento selettivo primario specificato in 5.2.

In generale per preparare la sospensione iniziale, aggiungere una porzione test di x g o x mL a 9x mL o 9x g di terreno di arricchimento selettivo primario (5.2.), per ottenere un rapporto di porzione test rispetto al terreno di arricchimento selettivo primario di 1/10 (massa/volume o volume/ volume).

### 9.2. Arricchimento primario

Incubare (6.3 B) la sospensione iniziale preparata in accordo con 9.1, a 30 °C per 24 h ± 2 h.

*NOTA 3: durante l'incubazione potrebbe svilupparsi una colorazione nera.*

### 9.3. Arricchimento secondario

9.3.1. Dopo l'incubazione della sospensione iniziale (arricchimento primario) per 24 h + 2 h (9.2), trasferire 0.1 mL di coltura ottenuta in 9.2 (indipendentemente dalla sua colorazione) in una provetta (6.7) che contenga 10 mL di terreno di arricchimento secondario (Brodo Fraser) (5.3).

9.3.2. Incubare il terreno inoculato (9.3.1.) per 48 h ± 2 h a 35 °C o a 37 °C.

### 9.4. Allestimento delle piastre e identificazione

9.4.1. Dalla coltura di arricchimento primario incubata per 24 h ± 3 h a 30 °C (9.2), prendere, con un'ansa o una bacchetta di vetro (6.5), una porzione della coltura e

inoculare la superficie del primo terreno selettivo, Agar Listeria in accordo con Ottaviani e Agosti (5.4.1), così da ottenere colonie ben separate. Procedere nello stesso modo con il secondo terreno selettivo (PALCAM Agar) (5.4.2).

*NOTA 4: questa semina è condotta senza tener conto del colore del terreno.*

9.4.2. Dal terreno di arricchimento secondario incubato per 48 h  $\pm$  2 h a 35 °C o 37 °C (9.3.2), ripetere la procedura descritta in 9.4.1 con i due terreni selettivi.

9.4.3 Capovolgere le piastre ottenute in 9.4.1 e 9.4.2 e riporle in un incubatore (6.3) settato a 37 °C.

Dopo l'incubazione per un periodo di tempo appropriato, esaminare la piastre (9.4.3) per la presenza di colonie presuntive di *Listeria* spp.

Agar Listeria in accordo con Ottaviani e Agosti (ALOA): considerare come *L. monocytogenes* le colonie verdi-blu circondate da un alone opaco (colonie tipiche). Se la crescita è scarsa, o se non si osserva nessuna colonia, o se nessuna colonia tipica è presente dopo 24 h  $\pm$  3 h di incubazione, reincubare le piastre per ulteriori 24 h  $\pm$  3 h.

PALCAM agar: dopo 24 h la *Listeria* ssp si presenta sotto forma di piccole colonie grigio-verdi o verdi oliva con un diametro pari a 1,5-2 mm, talvolta con il centro nero ma sempre con un alone nero. Dopo 48 h la *Listeria* ssp si presenta nella forma di colonie verdi di diametro circa 1,5-2 mm con una depressione centrale e circondate da un alone nero.

*NOTA 5: alcuni ceppi di L. monocytogenes mostrano un alone molto debole (o nessuna alone) in caso di stress, in particolare stress acido.*

*NOTA 6: alcune L. monocytogenes sono caratterizzate da una debole attività PIPLC (phosphatidyl inositol phospholipase C). Tali batteri sono individuati quando la durata totale dell'incubazione supera, per esempio, i 4 giorni. Alcuni di questi ceppi potrebbero essere patogeni (2).*

## 9.5 Conferma di *Listeria* spp.

### 9.5.1. Selezione delle colonie per la conferma

9.5.1.1. Per la conferma, isolare da ogni piastra di ogni terreno selettivo (vedi 9.4.1 e 9.4.2), 5 colonie presuntive di *Listeria* spp.

Se su una piastra ci sono meno di 5 colonie presuntive, isolarle tutte per la conferma.

9.5.1.2 Strisciare le colonie selezionate su piastre pre-asciugate di tryptone soya yeast extract agar (TSYEA) (5.5), per consentire lo sviluppo di colonie ben separate.

Riporre le piastre nell'incubatore (6.3 c) settato a 35 °C o 37 °C per 18 h - 24 h, fino a che la crescita non sia soddisfacente.

Le colonie tipiche hanno un diametro che va da 1 mm a 2 mm, sono convesse, incolori e opache con contorno definito. Se le colonie non sono ben separate, prelevare una colonia tipica di *Listeria* spp. e seminarla in un'altra piastra di TSYEA. Effettuare i seguenti test partendo da colonie di una coltura pura su TSYEA.

*NOTA 7: se necessario è possibile eseguire il Test dell'illuminazione di Henry (Allegato C). Per questo test è importante che lo strato di terreno agarizzato sia sottile (15 mL/ piastra).*

### 9.5.2. Reazione della catalasi

Prelevare una colonia isolata ottenuta in 9.5.1.2 e sospendere in una goccia di

soluzione di perossido di idrogeno (5.11) su un vetrino. La formazione immediata di bolle di gas indica una reazione positiva.

### 9.5.3. Colorazione di Gram

Effettuare la colorazione di Gram su una colonia separata ottenuta in 9.5.1.2. *Listeria* spp. vengono rivelate come corti bastoncini Gram positivi sottili.

## 9.6. Conferma di *L. monocytogenes*

### 9.6.1. Test di emolisi

9.6.1.1. Se le caratteristiche fisiologiche e morfologiche e il test della catalasi sono indicativi di *Listeria* spp., inoculare le piastre di sangue di montone (5.7) così da determinare la reazione di emolisi.

Asciugare bene la superficie dell'agar prima dell'uso. Isolare una colonia separata in 9.5.1.2 ed inoculare per infissione uno spazio della piastra per ogni colonia, usando un ago metallico (6.5).

Inoculare contemporaneamente colture di controllo positive (*L. monocytogenes*) e negative *L. innocua*).

Dopo l'incubazione a 35 °C o a 37 °C per 24 h ± 2 h, esaminare i ceppi test ed i controlli.

*L. monocytogenes* presenta aloni circoscritti, trasparenti e luminosi (b-emolisi) (Figura 1); *L. innocua* non presenta zone trasparenti intorno all'inoculo; *L. seeligeri* mostra una debole zona di emolisi; *L. ivanovii* presenta zone di b-emolisi ampie e ben delineate. Esaminare le piastre sotto una buona luce per meglio comparare le colture test con i controlli.

9.6.1.2. La reazione emolitica può anche esser compiuta come segue usando globuli rossi di sangue di montone.

Disperdere la colonia in 150 mL di TSYEB (B.6); incubare a 37 °C per 2 h. Aggiungere 150 mL di una sospensione di globuli rossi di sangue di montone (B.4 di questa modifica). Incubare a 37 °C dai 15 ai 60 min, poi refrigerare a 3 °C ± 2 °C per circa 2 h. Esaminare l'attività emolitica. Se la reazione non è ben definita lasciare a 3 °C ± 2 °C fino a 24 h ± 3 h.

### 9.6.2. Utilizzazione dei carboidrati

Adoperare un qualsiasi sistema biochimico miniaturizzato adatto per l'identificazione di *Listeria* spp., disponibile commercialmente.

### 9.6.3. CAMP test

Strisciare ognuna delle colture di *Staphylococcus aureus* e *Rhodococcus equi* (B.10.4) in linee singole lungo la piastra di agar sangue di montone (5.7 o B.10.3) in modo che le due colture siano parallele e diametralmente opposte. È necessario un inoculo sottile e uniforme. Questo può esser ottenuto utilizzando un'ansa da inoculo o un filo metallico (6.5) mantenuto ad angolo retto sull'agar.

Strisciare in modo simile il ceppo test separato in 9.5.1.2 ad angolo retto rispetto a queste colture in modo che la coltura test e le colture di *S. aureus* e *R. equi* non si tocchino ma stiano ad una distanza di almeno 1 mm, 2 mm.

Contemporaneamente, strisciare colture di controllo di *L. monocytogenes*, *L. innocua* e *L. ivanovii*. Se si utilizza l'agar sangue (5.7) incubare le piastre a 35 °C o a 37 °C da



18 h a 24 h. Se si utilizzano piastre a doppio strato(B.10.3), incubare a 35 °C o a 37 °C da 12 h a 18 h.

Viene considerata reazione positiva una pronunciata zona di  $\beta$ -emolisi all'intersezione del ceppo test con ognuna delle colture di *S. aureus* e *R. equi*.

La reazione positiva con *R. equi* si osserva come un'ampia (dai 5 mm ai 10 mm) punta di freccia di emolisi. La reazione viene considerata negativa se una piccola zona di debole emolisi si estende solo fino a circa 1 mm all'intersezione con del ceppo test con la zona di diffusione della coltura di *R. equi*.

Una reazione positiva con *S. aureus* appare come una piccola zona di aumento di emolisi che si estende solo fino a 2 mm dal ceppo test ed entro la debole zona emolitica dovuta alla crescita della coltura di *S. aureus*. Nell'area di *S. aureus* e *L. monocytogenes* non si verificano ampie zone di emolisi.

## 9.7. Interpretazione delle proprietà morfologiche e fisiologiche e delle reazioni biochimiche

Tutte le *Listeria* spp. sono piccoli bastoncini Gram positivi, che presentano motilità. Sono catalasi positivi. *L. monocytogenes* si distingue dalle altre specie, per le caratteristiche elencate in Tabella 1.

## 9.8. Conferma definitiva

I ceppi che vengono considerati *L. monocytogenes* (9.7.) possono essere inviati ad un laboratorio di riferimento per *Listeria*, il quale effettuerà la tipizzazione sierologica o, se possibile, lisogenica. La richiesta deve essere accompagnata da tutte le informazioni possibili sul ceppo (ceppi).

Tabella 1. Reazioni per l'identificazione di *Listeria* spp.

Specie	Emolisi	Produzione di acido		CAMP test	
		Ramnosio	Xilosio	<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	-	+	-
<i>L. innocua</i>	-	V	-	-	-
<i>L. ivanovii</i>	+	-	+	-	+
<i>L. seeligeri</i>	(+)	-	+	(+)	-
<i>L. welshimeri</i>	-	V	+	-	-
<i>L. grayi</i> subsp. <i>grayi</i>	-	-	-	-	-
<i>L. grayi</i> subsp. <i>murrayi</i>	-	V	-	-	-

V: reazione variabile; (+): reazione debole; +: reazioni positive>90%; -: assenza di reazione

NOTA - Esistono rari ceppi di *L. monocytogenes* che non mostrano  $\beta$ -emolisi o reazione positiva al CAMP test nelle condizioni descritte in questa parte dell'ISO 11290

## 9.9. Colture di controllo

Per verificare la capacità dei terreni di arricchimento e identificazione di supportare la crescita selettiva di *L. monocytogenes*, deve essere introdotta in una beuta di controllo contenente il terreno di arricchimento selettivo primario, una diluizione della coltura di

riferimento di ceppi recentemente isolati di *L. monocytogenes* e ceppi di controllo negativi (es. bastoncelli, *Streptococcus*) (vedi 9.2). Aggiungere dalle 10 alle 100 cellule di *L. monocytogenes* o dei ceppi di controllo negativi per beuta.

Procedere con le beute di controllo come per le colture test, per dimostrare che la coltura positiva di controllo viene recuperata.

## 10. Espressione dei risultati

In accordo con l'interpretazione dei risultati, riportare la presenza o assenza di *L. monocytogenes* nella porzione test, specificando la massa in grammi, o il volume in millilitri, del campione testato.

*NOTA 8: se vengono isolate altre specie di Listeria, queste devono essere annotate nel rapporto di prova, se previsto.*

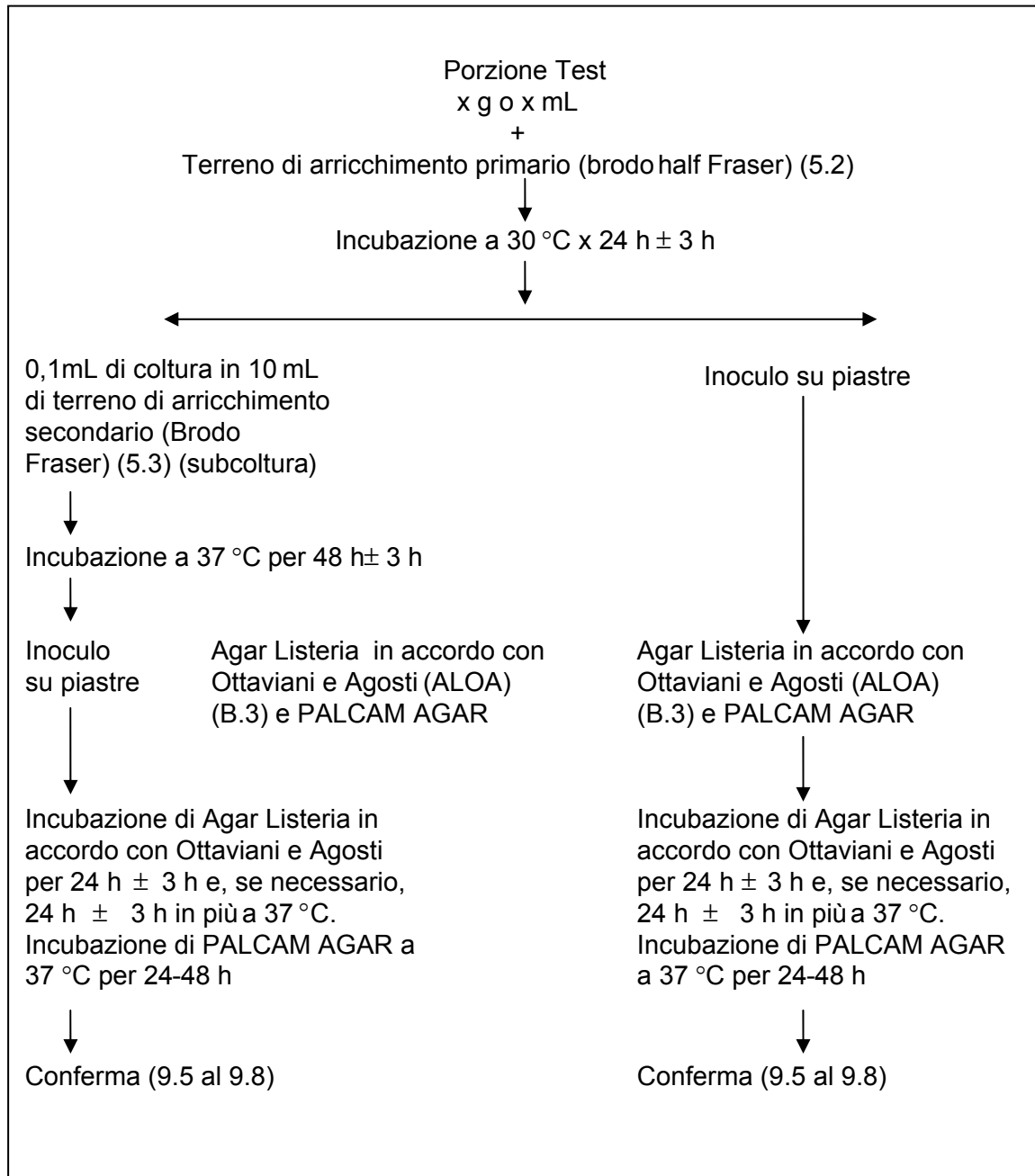
## 11. Rapporto di prova

Il rapporto di prova deve specificare il metodo utilizzato, le temperature di incubazione, ed i risultati ottenuti. Deve inoltre menzionare ogni dettaglio operativo non specificato in questa parte della ISO 11290, o considerato opzionale, insieme ai dettagli di ogni inconveniente che potrebbe aver influenzato i risultati.

Il rapporto di prova deve includere tutte le informazioni necessarie per la completa identificazione del campione.

## Bibliografia

1. Ottaviani F, Ottaviani M, Agosti M. Differential Agar Medium for *Listeria monocytogenes*. In: *Quimper Froid Symposium Proceedings*, P6 ADRIA Quimper (France), 16-18 June, 1997.
2. Leclercq A, Colonial atypical morphology and low recoveries of *Listeria monocytogenes* strains on Oxford, PALCAM, Rapid'L.mono and ALOA solid media. *J Microbiol Methods* 2004;57:251-58.
3. ISO/TS 11133-2. *Microbiology of food and animal feeding stuffs – guidelines on preparation and production of culture media – part 2: practical guidelines on performance testing of culture media*. International Organization for Standardization. 2002.

**ALLEGATO A****Diagramma di procedura**

## ALLEGATO B

---

### Composizione e preparazione dei terreni di coltura e dei reagenti

#### B.1. Terreno di arricchimento primario selettivo: Brodo Half Fraser

##### B.1.1. Base

È possibile utilizzare il terreno completo pronto all'uso seguendo le istruzioni del produttore.

##### B.1.1.1. Composizione

##### B.1.1.2. Preparazione

Sciogliere in acqua i componenti della base o la base completa disidratata, riscaldando se necessario.

Aggiustare il pH, se necessario, in modo che dopo la sterilizzazione abbia un valore di  $7,2 \pm 0,2$  a 25 °C.

Dispensare la base in bottiglie (6.7) di adatta capacità, in modo da ottenere quantità appropriate per l'analisi (vedere 9.1).

Sterilizzare per 15 minuti in autoclave (6.1) regolata a 121 °C.

*NOTA 1: la soluzione di cloruro di litio (B.1.2) e la soluzione di acido nalidixico (B.1.3) possono essere aggiunte alla base (B.1.1) prima della sterilizzazione.*

##### B.1.2. Soluzione di cloruro di litio

##### B.1.2.1. Composizione

Cloruro di litio 3 g

Acqua 10 mL

##### B.1.2.2 Preparazione

Aggiungere il cloruro di litio all'acqua.

Sterilizzare per filtrazione.

*ATTENZIONE – Prendere le necessarie precauzioni quando si scioglie il cloruro di litio nell'acqua, poiché la reazione è fortemente esotermica. Inoltre questa soluzione irrita le membrane mucosali.*

##### B.1.3. Soluzione del sale sodico dell'acido nalidixico

##### B.1.3.1. Composizione

Sale sodico di acido nalidixico 0,1 g

Idrossido di sodio, 0,05 mol/l/L soluzione 10,0 mL

##### B.1.3.2. Preparazione

Sciogliere il sale di acido nalidixico nell'idrossido di sodio.

Sterilizzare per filtrazione.

**B.1.4. Soluzione idrocloruro di acriflavina****B.1.4.1. Composizione**

Idrocloruro di acriflavina 0,25 g  
Acqua 100,00 mL

**B.1.4.2. Preparazione**

Sciogliere l'idrocloruro di acriflavina nell'acqua.  
Sterilizzare per filtrazione.

**B.1.5. Soluzione di ferro (III) ammonio citrato****B.1.5.1. Composizione**

Ferro (III) ammonio citrato 5,0 g  
Acqua 100,0 mL

**B.1.5.2. Preparazione**

Sciogliere il ferro (III) ammonio citrato nell'acqua.  
Sterilizzare per filtrazione.

**B.1.6. Terreno completo****B.1.6.1. Composizione**

Base (B.1.1)	100,0 mL
Soluzione di cloruro di litio (B.1.2)	1,0 mL
Sale sodico dell'acido nalidixico (B.1.3)	0,1 mL
Idrocloruro di acriflavina (B.1.4)	0,5 mL
Ferro (III) ammonio citrato (B.1.5)	1,0 mL

**B.1.6.2. Preparazione**

Immediatamente prima dell'uso, aggiungere le quattro soluzioni (da B.1.2 a B.1.5) a ciascuna porzione di 100 mL della base (B.1.1).

**B.2. Terreno di arricchimento secondario: Brodo Fraser****B.2.1. Base**

È possibile utilizzare il terreno completo pronto all'uso seguendo le istruzioni del produttore.

**B.2.1.1. Composizione**

Peptone di carne (digerito peptico di tessuto animale)	5,00 g
Triptone (digerito peptico di caseina)	5,00 g
Estratto di carne	5,00 g
Estratto di lievito	5,00 g
Cloruro di sodio	20,00 g
Fosfato disodico idrogeno biidrato	12,00 g
Diidrogeno fosfato di potassio	1,35 g
Esculina	1,00 g
Cloruro di litio	3,00 g
Sale sodico di acido nalidixico	0,02 g
Acqua	1000,00 mL

#### **B.2.1.2. Preparazione**

Sciogliere in acqua i componenti o il terreno completo disidratato, riscaldando se necessario.

Aggiustare il pH, se necessario, in modo che dopo la sterilizzazione abbia un valore di  $7,2 \pm 0,2$  a 25 °C.

Dispensare il terreno in provette di adatta capacità, in modo da ottenere quantità appropriate per l'analisi.

Sterilizzare per 15 minuti in autoclave regolata a 121 °C.

#### **B.2.2. Soluzione di idrocloruro di acriflavina**

Vedere B.1.4.

#### **B.2.3. Soluzione di ferro (III) ammonio citrato**

Vedere B.1.5.

#### **B.2.4. Terreno completo**

Immediatamente prima dell'uso, aggiungere 0,1 mL delle soluzioni B.2.2 e B.2.3 ad ogni provetta (10 mL di volume) del terreno base (B.2.1). Agitare gentilmente.

### **B.3. Agar Listeria in accordo a Ottaviani e Agosti (ALOA)**

#### **B.3.1. Terreno base**

È possibile utilizzare il terreno completo pronto all'uso seguendo le istruzioni del produttore.

##### **B.3.1.1. Composizione**

Tessuti animali digeriti enzimaticamente	18,00 g
Caseina digerita enzimaticamente	6,00 g
Estratto di Lievito	10,00 g
Piruvato di Sodio	2,00 g
Glucosio	2,00 g
Glicerofosfato di Magnesio	1,00 g
Solfato di Magnesio (anidro)	0,50 g
Sodio Cloruro	5,00 g
Litio Cloruro	10,00 g
Fosfato Idrogeno Bisodico (anidro)	2,50 g
5-Bromo 4-Cloro-3-indoil-β-Dglucopiranoside	0.05 g
Agar	da 12 a 18 g <sup>a</sup>
Acqua	930 mL <sup>b</sup>

<sup>a</sup> dipende dal potere gelificante dell'agar

<sup>b</sup> 925 mL se si utilizza la soluzione di Amphotericina B (vedi B.3.5.2).

**B.3.1.2. Preparazione**

Sciogliere in acqua i componenti o il terreno completo disidratato e portare ad ebollizione.

Sterilizzare per 15 minuti in autoclave regolata a 121 °C.

Aggiustare il pH, se necessario, in modo che dopo la sterilizzazione abbia un valore di  $7,2 \pm 0,2$  a 25 °C.

**B.3.2. Soluzione di Acido Nalidixico**

Sale sodico dell'acido Nalidixico 0,02 g

Idrossido di sodio (0,05 mol/L) 5,00 mL

Dissolvere il sale sodico dell'Acido Nalidixico in 5 mL di Idrossido di Sodio e sterilizzare mediante filtrazione.

**B 3.3. Soluzione di Ceftazidime**

Ceftazidime 0,02 g

Acqua 5,00 mL

Dissolvere la Ceftazidime in 5 mL di acqua e sterilizzare mediante filtrazione.

**B.3.4. Soluzione di Polimixina B**

Polimixina B solfato 76 700 UI

Acqua 5 mL

Dissolvere la Polimixina B in 5 mL di acqua e sterilizzare mediante filtrazione.

**B.3.5. Supplemento antibiotico****B.3.5.1. Soluzione di Cycloeximide**

Cycloeximide 0,05 g

etanolo 2,50 mL

acqua 2,50 mL

Dissolvere la Cycloeximide in 2,5 mL di etanolo e poi aggiungere 2,5 mL di acqua e sterilizzare mediante filtrazione.

**B.3.5.2. Soluzione di Amphotericina B (come soluzione alternativa alla Cycloeximide)**

Amphotericina B 0,01 g

HCl (1 mol/l/L) 2,50 mL

Dimetilformammide (DMF) 7,50 mL

Dissolvere la Amphotericina B in una soluzione di HCl/ DMF e sterilizzare mediante filtrazione.

Attenzione: a soluzione di HCl/ DMF è tossica, maneggiare con cura.

**B.3.6. Supplemento**

Dissolvere 2 g di L-a-phosphatidilinositolo in 50 mL di acqua fredda.

Mescolare per circa 30 minuti fino ad ottenere una sospensione omogenea.

Autoclavare a 121 °C per 15 minuti e raffreddare a temperatura da 48 °C a 50 °C.

### B.3.7. Terreno completo

#### B.3.7.1. Composizione

Terreno base (B.3.1)	930 mL <sup>a</sup>
Soluzione di Acido Nalidixico (B.3.2)	5 mL
Soluzione di Caftazidime (B.3.3)	5 mL
Soluzione di Polymixina B (B.3.4)	5 mL
Soluzione di Cicloeximide (B.3.5) o	5 mL
Soluzione di Amphotericina B (B.3.5)	10 mL
Supplemento (B.3.6)	50 mL

<sup>a</sup> 925 mL se si utilizza la soluzione di Amphotericina B

#### B.3.7.2. Preparazione

Aggiungere le soluzioni al terreno base sciolto, alla temperatura approssimativa di 50 °C, miscelando completamente dopo ogni aggiunta.

Il pH del terreno completo deve essere  $7,2 \pm 0,2$  a 25 °C.

Il terreno deve avere un'opacità omogenea.

#### B.3.7.3. Preparazione delle piastre di Agar

Porre in ciascuna Piastra Petri dai 15 ai 20 mL di terreno completo preparato fresco, quindi lasciare solidificare.

## B.4. PALCAM AGAR

### B.4.1. Base

È possibile utilizzare il terreno completo pronto all'uso seguendo le istruzioni del produttore.

#### B.4.1.1. Composizione

Peptone	23,00 g
Amido	1,00 g
Cloruro di sodio	5,00 g
Estratto di lievito	3,00 g
Agar	9-18 g <sup>a</sup>
D-glucosio	0,50 g
D-Mannitolo	10,00 g
Esculina	0,80 g
Ammonio ferricc(III) citrato	0,50 g
Rosso fenolo	0,08 g
Cloruro di litio	15,00 g
Acqua	960 mL

<sup>a</sup> dipende dal potere gelificante dell'agar

#### B.4.1.2. Preparazione

Dissolvere i componenti o la base completamente disidratata in acqua e portare ad ebollizione.

Se necessario, aggiustare il pH così che dopo la sterilizzazione sia di  $7,2 \pm 0,2$  a 25 °C.

Sterilizzare per 15 minuti in autoclave a 121 °C.



#### **B.4.2. Soluzione di polimixina B solfato**

##### **B.4.2.1. Composizione**

Polimixina B solfato (100 000 UI) 0,1 g  
Acqua 100 mL

##### **B.4.2.2 Preparazione**

Dissolvere la polimixina B solfato in acqua.  
Sterilizzare per filtrazione.

#### **B.4.3. Soluzione di Idrocloruro di Acriflavina**

##### **B.4.3.1. Composizione**

Acriflavina hydrochloride 0,05 g  
Acqua 100 mL

##### **B.4.3.2. Preparazione**

Dissolvere l'Idrocloruro di Acriflavina in acqua.  
Sterilizzare per filtrazione.

#### **B.4.4. Soluzione di Sodio ceftazidime pentaidrato**

##### **B.4.4.1. Composizione**

Sodio Ceftazidime pentaidrato 0,116 g  
Acqua 100 mL

##### **B.4.4.2. Preparazione**

Dissolvere il Sodio Ceftazidime in acqua.  
Sterilizzare per filtrazione.

#### **B.4.5. Terreno Completo**

##### **B.4.5.1. Composizione**

Base (B.4.1)	960 mL
Soluzione di solfato di Polimixina B (B.4.2)	10 mL
Soluzione di idrocloruro di Acriflavina (B.4.3)	10 mL
Soluzione di Sodio ceftazidime pentaidrato (B.4.4)	20 mL

##### **B.4.5.2. Preparazione**

Aggiungere alla base dissolta (B.4.1) le soluzioni da B.4.2 a B.4.4, alla temperatura di 47 °C mescolando delicatamente ad ogni aggiunta.

#### **B.4.6. Preparazione delle piastre di agar**

Piastrare un appropriato numero di piastre petri (6.10) con circa 15 mL di terreno completo preparato fresco (B.4.5). Lasciare solidificare.  
Conservare il terreno al riparo dalla luce.

## B.5. Sospensioni di emazie di sangue di montone

Conservare le emazie di sangue di montone a  $3\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  prima dell'uso.

Prima dell'uso, esaminare se ci sono segni di emolisi (arrossamenti) sullo strato superficiale del siero.

Se non c'è stata emolisi, introdurre 2 mL dello strato inferiore delle emazie in 98 mL di tampone PBS.

Se c'è stata emolisi, sospendere circa 4 mL dello strato di emazie in 10 mL di tampone PBS e mescolare delicatamente, quindi centrifugare. Se il liquido supernatante diventa decisamente rosso, a causa di una significativa emolisi, non utilizzare la sospensione stock ed eliminarla. Altrimenti, decantare il liquido supernatante e aggiungere 2 mL di questa soluzione di emazie a 98 mL di tampone PBS.

Conservare la sospensione per 5 giorni a  $3\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Eliminare se è avvenuta emolisi.

## B.6. Terreno di coltura solido: tryptone-soya-yeast extract agar (TSYEA)

### B.6.1. Composizione

Brodo triptone soia <sup>a</sup>	30,0 g
Estratto di lievito	6,0 g
Agar	da 9 g a 18 g <sup>b</sup>
Acqua	1000 mL

<sup>a</sup> triptone 17,0 g

Peptone di soia	3,0 g
Cloruro di sodio	5,0 g
Fosfato bipotassio	2,5 g
Glucosio	2,5 g

<sup>b</sup> a seconda del potere gelificante dell'agar

È possibile utilizzare il terreno completo pronto all'uso seguendo le istruzioni del produttore.

### B.6.2. Preparazione

Sciogliere in acqua i componenti o il terreno completo disidratato, portando ad ebollizione.

Aggiustare il pH, se necessario, in modo che dopo la sterilizzazione abbia un valore di  $7,3 \pm 0,2$  a  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Dispensare il terreno in provette di adatta capacità, in modo da ottenere quantità appropriate per l'analisi.

Sterilizzare per 15 minuti in autoclave regolata a  $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Adagiare in posizione inclinata.

Per la preparazione di piastre agarizzate, distribuire il terreno in piastre Petri sterili, in quantità appropriate per l'analisi. Lasciare solidificare.

## B.7. Terreno di coltura liquido: tryptone-soya-yeast extract broth (TSYEB)

### B.7.1. Composizione

Brodo triptone soia <sup>a</sup>	30 g
Estratto di lievito	6 g
Acqua	1000 mL

<sup>a</sup> vedere B.6.1

### B.7.2. Preparazione

Sciogliere in acqua i componenti o il terreno completo disidratato, riscaldando se necessario.

Aggiustare il pH, se necessario, in modo che dopo la sterilizzazione abbia un valore di  $7,3 \pm 0,2$  a 25 °C.

Dispensare il terreno in bottiglie o provette di adatta capacità, in modo da ottenere quantità appropriate per l'analisi.

Sterilizzare per 15 minuti in autoclave regolata a 121 °C.

## B.8. Agar sangue di montone

### B.8.1. Base

#### B.8.1.1. Composizione

Peptone di carne	15 g
Digerito di fegato	2,5 g
Estratto di lievito	5 g
Cloruro di sodio	5 g
Agar	da 9 g a 18 g <sup>a</sup>
Acqua	1000 mL

<sup>a</sup> a seconda del potere gelificante dell'agar.

#### B.8.1.2. Preparazione

Sciogliere in acqua i componenti portando ad ebollizione.

Aggiustare il pH, se necessario, in modo che dopo la sterilizzazione abbia un valore di  $7,2 \pm 0,2$  a 25 °C.

Dispensare il terreno in bottiglie di adatta capacità, in modo da ottenere quantità appropriate per l'analisi.

Sterilizzare per 15 minuti in autoclave regolata a 121 °C.

## **B.8.2. Sangue di montone defibrinato**

### **B.8.3. Base completa**

#### **B.8.3.1. Composizione**

Base (B.7.1) 100 mL

Sangue di montone defibrinato (B.7.2) da 5 mL a 7 mL

#### **B.8.3.2. Preparazione**

Aggiungere il sangue alla base precedentemente raffreddata a circa 47 °C. Agitare bene.

Dispensare il terreno in piastre Petri sterili, in quantità appropriate per l'analisi. Lasciare solidificare.

## **B.9. Materiali per l'utilizzazione degli zuccheri**

### **B.9.1. Sistemi Biochimici miniaturizzati commerciali per l'identificazione biochimica di *Listeria* spp.**

Seguire le istruzioni del produttore.

## **B.10. Terreno CAMP (Christie, Atkins, Munch-Petersen) e ceppi test**

Per questo test possono essere utilizzate le piastre di agar sangue di montone (B.7), ma è preferibile usare piastre agar a doppio strato, con uno strato molto sottile di sangue (B.10.3).

### **B.10.1. Base**

Vedere B.7.1.

### **B.10.2. Terreno contenente sangue di montone**

Vedere B.7.3.1.

### **B.10.3. Terreno completo**

Distribuire circa 10 mL del terreno base (B.10.1) in piastre Petri sterili e lasciare solidificare. Versare uno strato molto sottile di terreno contenente sangue di montone (B.10.2) in quantità non superiori a 3 mL per piastra.

Lasciare solidificare. Se il terreno contenente il sangue viene aggiunto a piastre di terreno base preparate in precedenza, può essere necessario riscaldare le piastre per 20 minuti, ponendole in un incubatore settato a 37 °C, prima di versare lo strato di terreno al sangue.

#### B.10.4. Ceppi per la reazione CAMP

Per eseguire il CAMP test, sono necessari un ceppo  $\beta$ -emolitico di *S. aureus* (es. NCTC 1803 o ATCC 25923) e un ceppo di *R. equi* (es. NCTC 1621 o ATCC 6939).

Non tutti i ceppi di *S. aureus* sono adatti per il CAMP test.

Mantenere le colture stock di *S. aureus*, *R. equi*, *L. monocytogenes*, *L. innocua*, ed *L. ivanovii*, inoculando provette di agar-becco TSYEA (B.6.2), incubandole a 35 °C o a 37 °C per 24-48 ore, o fino a che si verifica la crescita, e conservare in frigorifero a 3 °C  $\pm$  2 °C. Subcoltivare almeno una volta al mese.

#### B.11. Soluzione di perossido di idrogeno

Usare una soluzione al 3% (peso/peso), per esempio una soluzione a 10 volumi.

*NOTA 2: preparare la soluzione al momento dell'uso, evitando di utilizzare eventuali rimanenze.*

#### B.12. Soluzione salina tamponata con fosfato (PBS)

##### B.12.1. Composizione

Fosfato disodico idrogeno biidrato	8,98 g
Diidrogeno fosfato di sodio	2,71 g
Cloruro di sodio	8,50 g
Acqua	1000 mL

##### B.12.2. Preparazione

Sciogliere in acqua i componenti.

Aggiustare il pH, se necessario, in modo che dopo la sterilizzazione abbia un valore di 7,2  $\pm$  0,2 a 25 °C.

Sterilizzare in autoclave per 15 minuti a 121 °C.

## **ALLEGATO C**

---

### **Test dell'illuminazione di Henry**

Esaminare le piastre utilizzando una sorgente di luce bianca, sufficientemente potente per illuminarle bene e che colpisca il fondo delle stesse con un'angolazione di 45°. Osservando dall'alto la piastra, illuminata da questa luce trasmessa obliquamente (illuminazione di Henry), le colonie di *Listeria* spp. presentano un colore blastro e una superficie granulare.

# **METODO ORIZZONTALE PER LA NUMERAZIONE DI *LISTERIA MONOCYTOGENES* (ISO 11290-2:1998; AMENDMENT 1 2004)**

Alfonsina Fiore  
Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e dei Rischi Alimentari

## **1. Scopo**

Metodo orizzontale per la numerazione di *Listeria monocytogenes*.

In generale (vedi nota in 9.2.1) il limite più basso di numerazione di questo metodo è 10 *L. monocytogenes* per millilitro di campione per i prodotti liquidi, o 100 per grammo di campione per gli altri prodotti.

## **2. Riferimenti normativi**

ISO 6887-1:2004, Microbiologia degli alimenti e dei mangimi- Preparazione dei campioni test, della sospensione iniziale e delle diluizioni decimali per l'esame microbiologico- Parte 1: Guide Generali per la preparazione della sospensione iniziale e delle diluizioni decimali per l'esame microbiologico.

ISO 7218:1996, Microbiologia degli alimenti e mangimi - Regole generali per l'esame microbiologico.

ISO 11290-2:1998, Microbiologia di alimenti e mangimi – Metodo orizzontale per la numerazione di *Listeria monocytogenes*

## **3. Definizioni**

### **3.1. *L. monocytogenes***

Microrganismo che forma colonie tipiche su terreni selettivi solidi, e che mostra le caratteristiche morfologiche, fisiologiche e biochimiche descritte in questa parte dell'ISO 11290.

### **3.2. Numerazione di *L. monocytogenes***

Determinazione del numero di unità formanti colonie (UFC) (vedi 3.1) in una data quantità di prodotto, in accordo con questa parte dell'ISO 11290.

## 4. Principio

Il metodo di numerazione di *L. monocytogenes* necessita di sei stadi successivi (Allegato A).

- 4.1. Preparazione della sospensione iniziale nel diluente (B.1)
- 4.2. Rivitalizzazione per 1 h a 20 °C
- 4.3. Semina in superficie su terreno di coltura selettivo solido, contenuto in due piastre Petri, di una specifica quantità del campione test per i prodotti liquidi o della sospensione iniziale per gli altri prodotti.  
Preparazione di altre piastre, nelle medesime condizioni, usando diluizioni decimali del campione test o della sospensione iniziale.
- 4.4. Incubazione delle piastre a 37 °C ed esame dopo 24 h e 48 h.
- 4.5. Conferma delle colonie presuntive di *Listeria monocytogenes* con i test descritti.
- 4.6. Calcolo del numero di *Listeria monocytogenes* per grammo o per millilitro del campione test, partendo dal numero delle colonie confermate.

## 5. Terreni di coltura e reagenti

Vedi ISO 7218.

*NOTA 1: a causa del grande numero di terreni di coltura e reagenti, è preferibile, per la chiarezza del testo, dare la loro composizione e preparazione nell'Allegato B.*

## 6. Apparecchiature e vetreria

Attrezzature microbiologiche usuali ( vedi ISO 7218) e, in particolare ciò che segue.

- 6.1. Apparecchiature per la sterilizzazione a secco (Stufa) o per la sterilizzazione a vapore (Autoclave)  
Vedi ISO 7218
- 6.2. Incubatore capace di mantenere una temperatura tra 25 °C + 1 e 50 °C +1.
- 6.3. Incubatori per mantenere i terreni inoculati, piastre e tubi entro i seguenti intervalli di temperatura: 20 °C ± 1 °C (opzionale); 25 °C ± 1 °C (opzionale); 37 °C ± 1 °C.
- 6.4. Bagno termostato regolabile a 44 °C-47 °C.
- 6.5. Anse e aghi di platino/iridio o nichel/cromo o pipette pasteur o anse monouso.
- 6.6. Spatole di vetro o plastica sterili
- 6.7. pHmetro, leggibile il più vicino possibile a 0,01 unità di pH a 25 °C, e che consenta misure accurate fino a + 0,1 unità di pH.
- 6.8. Provette o bottiglie di appropriata capacità, per la sterilizzazione e la conservazione di terreni di coltura e l'incubazione di terreni liquidi.
- 6.9. Pipette graduate a svuotamento totale, di capacità nominale 1 mL e 10 mL, rispettivamente graduate in 0,1 e 0,5 unità.
- 6.10. Piastre Petri, da 90 mm a 100 mm di diametro.
- 6.11. Attrezzatura per il test di illuminazione Henry (opzionale) (Allegato C).
- 6.12. Microscopio, preferibilmente a contrasto di fase, vetrini e vetrini copri-oggetto.



## 7. Campionamento

È importante che il laboratorio riceva un campione che sia realmente rappresentativo e che non sia stato danneggiato o modificato durante il trasporto o la conservazione.

## 8. Preparazione del Campione Test

Preparare il campione test in accordo con lo specifico Standard Internazionale, qualora esista.

## 9. Procedura

### 9.1. Aliquota test e sospensione iniziale

Vedere ISO 6887-1.

Per preparare la sospensione iniziale usare come diluente l'acqua peptonata tamponata (B1).

Lasciare la sospensione iniziale per 1 h  $\pm$  5 min a 20 °C  $\pm$  2 °C (usando se necessario l'incubatore 6.3 a), al fine di rivitalizzare i microrganismi stressati.

### 9.2. Inoculazione e incubazione

9.2.1. Trasferire con una pipetta sterile (6.9) 0,1 mL della sospensione iniziale su ciascuna delle due piastre di ALOA agar (B.3) asciugando le piastre se necessario nell'incubatore (6.2).

Ripetere la procedura usando le diluizioni decimali se necessario.

*NOTA 2: se è necessario stimare bassi numeri di Listeria monocytogenes, distribuire 1,0 mL della sospensione iniziale su tre piastre (90 mm), in duplicato.*

9.2.2. Distribuire l'inoculo il più rapidamente possibile sulla superficie dell'agar evitando di toccare i lati della piastra con la spatola. Usare una spatola sterile per ciascuna piastra. Lasciare le piastre chiuse per circa 15 min a temperatura ambiente per far assorbire l'inoculo dall'agar.

9.2.3. Invertire le piastre preparate in 9.2.2 e porle in un incubatore (6.3) settato a 37 °C.

### 9.3. Numerazione di colonie caratteristiche

9.3.1. Dopo incubazione per 24 h, e per ulteriori 18-24 h se la crescita è debole o se non si osservano colonie, esaminare le piastre (9.2.3) per la presenza di colonie di *Listeria* spp. presuntive (vedi 9.3.3).

9.3.2. Considerare come *Listeria monocytogenes* le colonie verdi-blu circondate da un alone opaco (colonie tipiche). Se la crescita è debole o assente o se non si osservano colonie tipiche dopo 24 h  $\pm$  3 h di incubazione, reincubare le piastre per ulteriori 24 h  $\pm$  3 h.

*NOTA 3: alcuni ceppi di Listeria monocytogenes mostrano un alone molto debole (anche una mancanza di alone) in caso di stress, in particolare stress acido.*

*NOTA 4: alcuni ceppi di Listeria monocytogenes sono caratterizzati da una debole PIPLC attività. Tali batteri sono rilevati dopo 4 giorni di incubazione. Alcuni di questi ceppi potrebbero essere patogeni. (1).*

- 9.3.3. Contare tutte le colonie di *Listeria* spp. presuntive su ciascuna piastra contenente meno di 150 colonie caratteristiche o non caratteristiche.

## 9.4. Conferma di *Listeria* spp.

### 9.4.1. Selezione di colonie per la conferma

- 9.4.1.1. Dopo il periodo di incubazione (9.3.1) scegliere le piastre contenenti meno di 150 colonie di *Listeria* spp. presuntive a tutte le diluizioni e, se possibile, alle due diluizioni successive.

Selezionare 5 delle colonie presuntive su ciascuna piastra. Se ci sono meno di 5 colonie presuntive su ciascuna piastra, selezionare tutte le colonie presuntive.

- 9.4.1.2. Strisciare le colonie selezione sulla superficie di piastre di TSA con estratto di lievito (B.3) in modo da ottenere colonie ben separate.

Incubare a 37 °C per 18-24 h o fino a che la crescita è soddisfacente

Le colonie tipiche hanno un diametro che va da 1 mm a 2 mm, sono convesse, incolore e opache con contorno definito. Se le colonie non sono ben separate, prelevare una colonia tipica di *Listeria* spp. in un'altra piastra di TSYEA.

Effettuare i seguenti test partendo da colonie di una coltura pura su TSYEA.

*NOTA 5: il test di illuminazione di Henry può essere eseguito se si rende necessario. Le colonie appaiono bluastre con una superficie granulata.*

### 9.4.2. Reazione della Catalasi

Prelevare una colonia isolata ottenuta in 9.4.1.2 e sospendere in una goccia di soluzione di perossido di idrogeno (B.10) su un vetrino. La formazione immediata di bolle di gas indica una reazione positiva (vedi ISO 7218).

### 9.4.3. Colorazione di Gram

Effettuare la colorazione di Gram su una colonia separata in 9.4.1.2. (vedi ISO 7218). *Listeria* spp. vengono rivelate come corti bastoncelli Gram positivi sottili, (di circa 0.4-0.5 µm di diametro, e 1-2 µm di lunghezza).

## 9.5. Conferma di *L. monocytogenes*

### 9.5.1. Test di emolisi

Se le caratteristiche fisiologiche e morfologiche e il test della catalasi sono indicativi di *Listeria* spp., determinare la reazione emolitica su piastre di agar sangue di montone (B.6).

Asciugare bene la superficie dell'agar prima dell'uso. Per ciascuna piastra prelevare una colonia separata in 9.4.1.2 e inoculare per infissione uno spazio della piastra per ogni coltura, usando un ago metallo o di plastica (6.5).

Inoculare contemporaneamente colture di controllo positive (*L. monocytogenes*) e negative *L. innocua*.

Dopo l'incubazione a 37 °C per 24 h ± 2 h, esaminare i ceppi test ed i controlli.

*L. monocytogenes* presenta aloni circoscritti, trasparenti e luminosi (b-emolisi), (Figura 1);

*L. innocua* non presenta zone trasparenti intorno all'inoculo. *L. seeligeri* mostra una debole zona di emolisi. *L. ivanovii* presenta zone di b-emolisi ampie e ben delineate.

Esaminare le piastre sotto una buona luce per meglio comparare le colture test con i controlli.

### 9.5.2. Utilizzazione dei carboidrati

Adoperare un qualsiasi sistema biochimico miniaturizzato adatto per l'identificazione di *Listeria* spp., disponibile in commercio.

### 9.5.3. CAMP test

Strisciare ognuna delle colture di *Staphylococcus aureus* e *Rhodococcus equi* (B.10.4) in linee singole lungo la piastra di agar sangue di montone (5.7 o B.10.3) in modo che le due colture siano parallele e diametralmente opposte. È necessario un inoculo sottile e uniforme. Questo può esser ottenuto utilizzando un'ansa da inoculo o un ago metallico (6.5) mantenuto ad angolo retto sull'agar.

Strisciare in modo simile il ceppo test separato in 9.5.1.2 ad angolo retto rispetto a queste colture in modo che la coltura test e le colture di *S. aureus* e *R. equi* non si tocchino ma stiano ad una distanza di almeno 1 mm, 2 mm.

Contemporaneamente, strisciare colture di controllo di *L. monocytogenes*, *L. innocua* e *L. ivanovii*. Se si utilizza l'agar sangue(5.7) incubare le piastre a 35 °C o a 37 °C da 18 h a 24 h. Se si utilizzano piastre a doppio strato (B.10.3), incubare a 35 °C o a 37 °C da 12 h a 18 h.

Viene considerata reazione positiva una pronunciata zona di  $\beta$ -emolisi all'intersezione del ceppo test con ognuna delle colture di *S. aureus* e *R. equi*.

La reazione positiva con *R. equi* si osserva come un'ampia (dai 5 mm ai 10 mm) punta di freccia di emolisi. La reazione viene considerata negativa se una piccola zona di debole emolisi si estende solo fino a circa 1 mm all'intersezione con del ceppo test con la zona di diffusione della coltura di *R. equi*.

Una reazione positiva con *S. aureus* appare come una piccola zona di aumento di emolisi che si estende solo fino a 2 mm dal ceppo test ed entro la debole zona emolitica dovuta alla crescita della coltura di *S. aureus*. Nell'area di *S. aureus* e *L. monocytogenes* non si verificano ampie zone di emolisi.

## 9.6. Interpretazione delle proprietà morfologiche e fisiologiche e delle reazioni biochimiche

Tutte le *Listeria* spp. sono piccoli bastoncini Gram positivi, che presentano motilità. Sono catalasi positivi. *L. monocytogenes* si distingue dalle altre specie, per le caratteristiche elencate in Tabella 1.

Tabella 1. Reazioni per l'identificazione di *Listeria* spp.

Specie	Emolisi	Produzione di acido		CAMP test	
		Ramnosio	Xilosio	<i>S. aureus</i>	<i>R. equi</i>
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	-	+	-
<i>L. innocua</i>	-	V	-	-	-
<i>L. ivanovii</i>	+	-	+	-	+
<i>L. seeligeri</i>	(+)	-	+	(+)	-
<i>L. welshimeri</i>	-	V	+	-	-
<i>L. grayi subsp. grayi</i>	-	-	-	-	-
<i>L. gray subsp. murrayi</i>	-	V	-	-	-

V: reazione variabile; (+): reazione debole; +: reazioni positive >90%; -: assenza di reazione

NOTA - Esistono rari ceppi di *L. monocytogenes* che non mostrano  $\beta$ -emolisi o reazione positiva al CAMP test nelle condizioni descritte in questa parte dell'ISO 11290

## 9.7. Conferma definitiva

I ceppi che vengono considerati *L. monocytogenes* (9.7) possono essere inviati ad un laboratorio di riferimento per *Listeria*, il quale effettuerà la tipizzazione sierologica o, se possibile, lisogenica. La richiesta deve essere accompagnata da tutte le informazioni possibili sul ceppo (ceppi).

## 10. Espressione dei risultati (ISO 7218)

### 10.1. Conteggio delle colonie di *Listeria monocytogenes*

Calcolare per ciascuna delle piastre il numero  $a$  di colonie di *Listeria monocytogenes* presenti, usando la seguente formula:

$$a = \frac{b}{A} \times C$$

dove:

$b$  è il numero delle colonie conformi ai criteri di identificazione (9.6)

$A$  è il numero delle colonie prelevate per la conferma (9.4.1.1.)

$C$  è il numero totale di colonie caratteristiche numerate sulla piastra (9.3.4)

Arrotondare  $a$  ad un numero intero.

### 10.2. Metodo di calcolo

10.2.1. Piastre contenenti meno di 150 colonie di *Listeria monocytogenes*, in una delle quali ci sono almeno 15 *Listeria monocytogenes*

Calcolare il numero  $N$  di *Listeria monocytogenes* presenti in 1 mL o 1 g di prodotto, usando la seguente formula:

$$N = \frac{\Sigma a}{V(n_1 + 0,1n_2) d}$$

Dove:

$\Sigma a$  è la somma delle colonie di *Listeria monocytogenes* calcolate dopo la conferma, su tutte le piastre prese in considerazione in due consecutive diluizioni, una delle quali contiene almeno 15 colonie identificate.

$V$  è il volume dell'inoculo applicato a ciascuna piastra in millilitri

$n_1$  è il numero delle piastre considerate alla prima diluizione

$n_2$  è il numero delle piastre considerate alla seconda diluizione

$d$  è il fattore di diluizione corrispondente alla prima diluizione considerata

Arrotondare i risultati ottenuti a due cifre decimali (vedi ISO 7218).

Considerare come risultato valido il numero di *Listeria monocytogenes* per millilitro (prodotti liquidi) o per grammo (altri prodotti), espresso come un numero fra 1.0 e 9.9 moltiplicato per 10 all'appropriata potenza.

NOTA 6: per un esempio vedi ISO 7218

#### 10.2.2. Stima di numeri piccoli

10.2.2.1. Se le due piastre, al livello della sospensione iniziale, contengono meno di 15 colonie di *Listeria monocytogenes* calcolare il numero di colonie

confermate su ciascuna piastra, usando la formula data in 10.1. Calcolare la media aritmetica  $y$  delle colonie contate su due piastre.

Esprimere il risultato come segue:

numero stimato di *Listeria monocytogenes* per grammo o per millilitro

$$N_E = \frac{y}{d \times V}$$

dove:

$d$  è il fattore di diluizione della sospensione iniziale

$V$  è il volume di inoculo su ciascuna piastra

10.2.2.2. Se le due piastre a livello della sospensione iniziale non contengono colonie, esprimere il risultato come segue:

meno di *Listeria monocytogenes* per grammo o per millilitro

$$d \times V$$

dove:

$d$  è il fattore di diluizione della sospensione iniziale

$V$  è il volume dell'inoculo su ciascuna piastra

## 11. Rapporto di prova

Il rapporto di prova deve specificare il metodo utilizzato, le temperature di incubazione, ed i risultati ottenuti. Deve inoltre menzionare ogni dettaglio operativo non specificato in questa parte della ISO 11290, o considerato opzionale, insieme ai dettagli di ogni inconveniente che potrebbe aver influenzato i risultati.

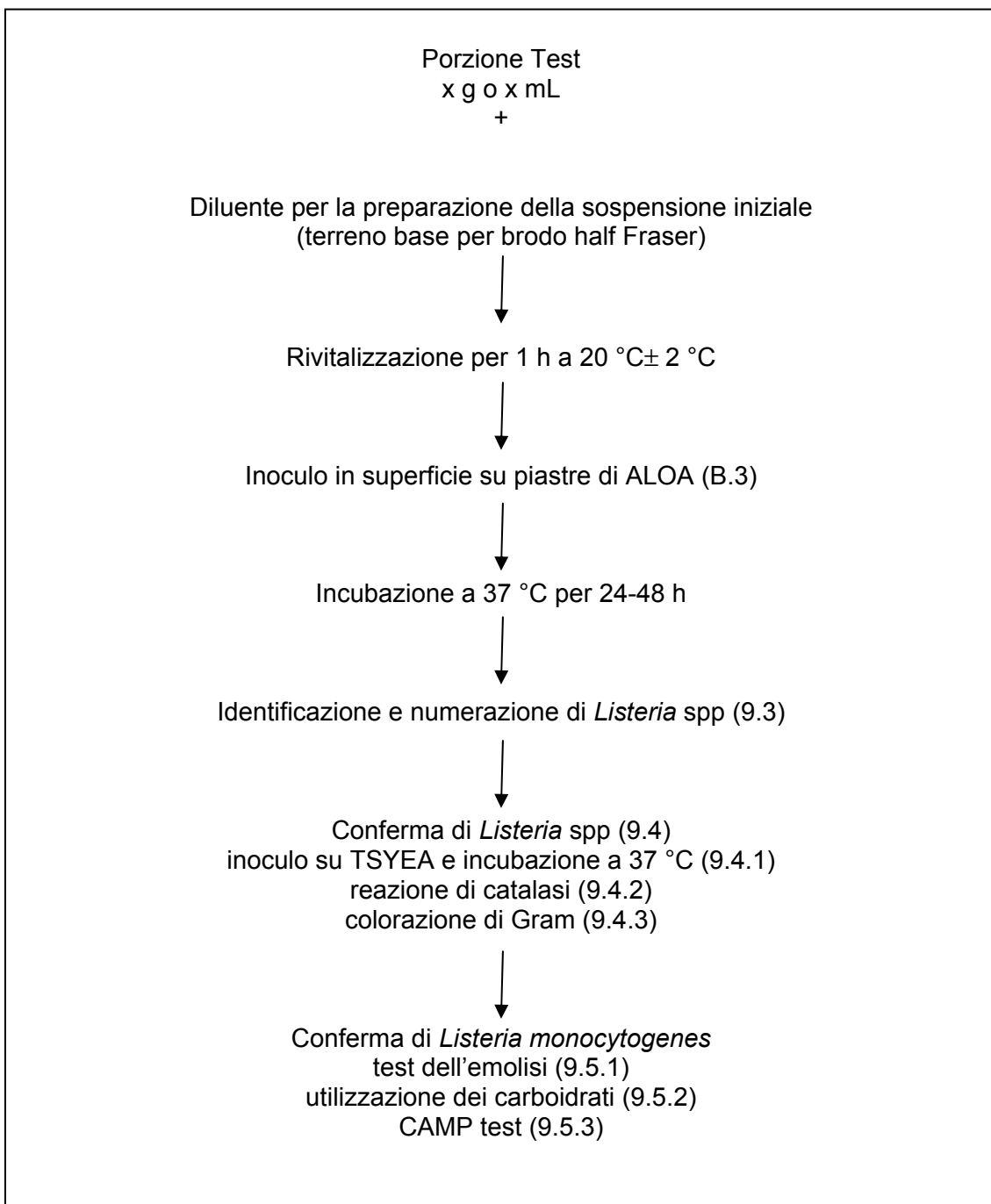
Il rapporto di prova deve includere tutte le informazioni necessarie per la completa identificazione del campione.

### Bibliografia

1. Leclercq A. Colonial atypical morphology and low recoveries of *Listeria monocytogenes* strains on Oxford, PALCAM, Rapid'L.mono and ALOA solid media. *J Microbiol Methods* 2004;57:251-8.

## ALLEGATO A

### Diagramma di procedura



## ALLEGATO B

---

### Composizione e preparazione dei terreni di coltura e dei reagenti

#### B.1. Terreno base per Brodo Half Fraser con ferro (III)ammonio citrato

##### B.1.1. Terreno base per brodo half Fraser

È possibile utilizzare il terreno completo pronto all'uso seguendo le istruzioni del produttore.

##### B.1.1.1. Composizione

Peptone di carne (digerito peptico di tessuto animale)	5,00 g
Tryptone (digerito peptico di caseina)	5,00 g
Estratto di manzo	5,00 g
Estratto di lievito	5,00 g
Cloruro di sodio	20,00 g
Fosfato disodico idrogeno biidrato	12,00 g
Diidrogeno fosfato di potassio	1,35 g
Esculina	1,00 g
Acqua	1000 mL

##### B.1.1.2. Preparazione

Sciogliere in acqua i componenti della base o la base completa disidratata, riscaldando se necessario.

Aggiustare il pH, se necessario, in modo che dopo la sterilizzazione abbia un valore di  $7,2 \pm 0,2$  a 25 °C.

Dispensare la base in bottiglie (6.8) di adatta capacità, in modo da ottenere quantità appropriate per l'analisi (vedere 9.1).

Sterilizzare in autoclave (6.1) settata a 121 °C per 15 min

##### B.1.2. Soluzione di ferro(III) ammonio citrato

##### B.1.2.1. Composizione

Ferro (III) ammonio citrato	5,0 g
Acqua	100 mL

##### B.1.2.2. Preparazione

Sciogliere il ferro (III) ammonio citrato in acqua.

Sterilizzare per filtrazione

#### B.2. Agar Listeria in accordo con Ottaviani e Agosti (ALOA)

##### B.2.1. Terreno base

È possibile utilizzare il terreno completo pronto all'uso seguendo le istruzioni del produttore.

### B.2.1.1. Composizione

Tessuti animali digeriti enzimaticamente	18 g
Caseina digerita enzimaticamente	6 g
Estratto di Lievito	10 g
Piruvato di Sodio	2 g
Glucosio	2 g
Glicerofosfato di Magnesio	1,0 g
Solfato di Magnesio (anidro)	0,5 g
Sodio Cloruro	5,0 g
Litio Cloruro	10,0 g
Fosfato Idrogeno Bisodico (anidro)	2,5 g
5-Bromo 4-Cloro-3-endoil- $\beta$ -Dglucopiranoside	0,05 g
Agar	da 12 a 18 g <sup>a</sup>
Acqua	930,0 mL <sup>b</sup>

<sup>a</sup> dipende dal potere gelificante dell'agar

<sup>b</sup> 925 mL se si utilizza la soluzione di Amphotericina B (vedi B.3.5.2)

### B.2.1.2. Preparazione

Sciogliere in acqua i componenti o il terreno completo disidratato e portare ad ebollizione.

Sterilizzare per 15 minuti in autoclave regolata a 121 °C.

Aggiustare il pH, se necessario, in modo che dopo la sterilizzazione abbia un valore di  $7,2 \pm 0,2$  a 25 °C.

### B.2.2. Soluzione di Acido Nalidixico

Sale sodico dell'Acido Nalidixico 0,02 g

Idrossido di Sodio (0,05mol/l/L) 5 mL

Dissolvere il sale sodico dell'Acido Nalidixico in 5 mL di Idrossido di Sodio e sterilizzare mediante filtrazione.

### B.2.3. Soluzione di Ceftazidime

Ceftazidime 0.02 g

Acqua 5 mL

Dissolvere la Ceftazidime in 5 mL di acqua e sterilizzare mediante filtrazione.

### B.2.4. Soluzione di Polimixina B

Polimixina B solfato 76.700 UI

Acqua 5 mL

Dissolvere la Polimixina B in 5 mL di acqua e sterilizzare mediante filtrazione.

### B.2.5. Supplemento antibiotico

#### B.2.5.1. Soluzione di Cycloeximide

Cycloexemide 0,05 g

etanolo 2,50 mL



Acqua 2,05 mL

Dissolvere la Cycloeximide in 2,5 mL di etanolo e poi aggiungere 2,5 mL di acqua e sterilizzare mediante filtrazione.

**B.2.5.2. Soluzione di Amphotericina B  
(come soluzione alternativa alla Cycloexemide)**

Amphotericina B 0,01 g

HCl (1 mol/l/L) 2,5 mL

Dimetilformammide (DMF) 7,5 mL

Dissolvere la Amphotericina B in una soluzione di HCl/ DMF e sterilizzare mediante filtrazione.

Attenzione: la soluzione di HCl/ DMF è tossica, maneggiare con cura.

**B.2.6. Supplemento**

Dissolvere 2 g di L-a-phosphatidilinositolo in 50 mL di acqua fredda.

Mescolare per circa 30 minuti fino ad ottenere una sospensione omogenea.

Autoclavare a 121 °C per 15 minuti e raffreddare a temperatura da 48 °C a 50 °C.

**B.2.7. Terreno completo**

**B 2.7.1. Composizione**

Terreno base (B 3.1)	930 mL <sup>a</sup>
Soluzione di Acido Nalidixico (B.3.2)	5 mL
Soluzione di Caftazidime (B.3.3)	5 mL
Soluzione di Polymixina B (B.3.4)	5 mL
Soluzione di Cicloeximide (B.3.5)	5 mL
Soluzione di Amphotericina B (B.3.5)	10 mL
Supplemento (B.3.6)	50 mL

<sup>a</sup>925 mL se si utilizza la soluzione di Amphotericina B

**B.2.7.2. Preparazione**

Aggiungere le soluzioni al terreno base sciolto, alla temperatura approssimativa di 50 °C, miscelando completamente dopo ogni aggiunta.

Il pH del terreno completo deve essere  $7,2 \pm 0,2$  a 25 °C.

Il terreno deve avere un'opacità omogenea.

**B.2.7.3. Preparazione delle piastre di Agar**

Porre in ciascuna Piastra Petri dai 15 ai 20 mL di terreno completo preparato fresco, quindi lasciar solidificare.

**B.3. Tryptone-soya-yeast extract agar (TSYEA)**

È possibile utilizzare il terreno completo pronto all'uso seguendo le istruzioni del produttore.

**B.3.1. Composizione**

Brodo triptone soia	30,0 g <sup>a</sup>
Estratto di lievito	6,0 g
Agar	da 9 g a 18 g <sup>b</sup>

Acqua	1000 mL
Peptone di soia	3,0 g
Cloruro di sodio	5,0 g
Fosfato bipotassio	2,5 g
Glucosio	2,5 g

<sup>a</sup> triptone 17,0 g

<sup>b</sup> a seconda del potere gelificante dell'agar

### B.3.2. Preparazione

Sciogliere in acqua i componenti o il terreno completo disidratato, portando ad ebollizione.

Aggiustare il pH, se necessario, in modo che dopo la sterilizzazione abbia un valore di  $7,3 \pm 0,2$  a 25 °C.

Dispensare il terreno in piastre Petri sterili, in quantità appropriate per l'analisi. Lasciare solidificare.

## B.4. Agar sangue di montone

### B.4.1. Base

#### B.4.1.1. Composizione

Peptone di carne	15 g
Digerito di fegato	2,5 g
Estratto di lievito	5 g
Cloruro di sodio	5 g
Agar	da 9 g a 18 g <sup>a</sup>
Acqua	1000 mL

<sup>a</sup> a seconda del potere gelificante dell'agar.

#### B.4.1.2. Preparazione

Sciogliere in acqua i componenti portando ad ebollizione.

Aggiustare il pH, se necessario, in modo che dopo la sterilizzazione abbia un valore di  $7,2 \pm 0,2$  a 25 °C.

Dispensare il terreno in bottiglie di adatta capacità, in modo da ottenere quantità appropriate per l'analisi.

Sterilizzare per 15 minuti in autoclave regolata a 121 °C.

### B.4.2. Sangue di montone defibrinato

### B.4.3. Base completa

#### B.4.3.1. Composizione

Base (B.7.1) 100 mL

Sangue di montone defibrinato (B.7.2) da 5 mL a 7 mL

#### **B.4.3.2. Preparazione**

Aggiungere il sangue alla base precedentemente raffreddata a circa 47 °C. Agitare bene.  
Dispensare il terreno in piastre Petri sterili, in quantità appropriate per l'analisi. Lasciare solidificare.

### **B.5. Materiali per l'utilizzazione degli zuccheri**

#### **B.5.1. Sistemi Biochimici miniaturizzati commerciali per l'identificazione biochimica di *Listeria* spp.**

Seguire le istruzioni del produttore.

### **B.6. Terreno CAMP (Christie, Atkins, Munch-Petersen) e ceppi test**

Le piastre di agar sangue di montone (B.7) possono essere utilizzate per questo test, ma è preferibile usare piastre agar a doppio strato, con uno strato molto sottile di sangue (B.10.3).

#### **B.6.1. Base**

Vedere B.4.1.

#### **B.6.2. Terreno contenente sangue di montone**

Vedere B.7.3.1.

#### **B.6.3. Terreno completo**

Distribuire circa 10 mL del terreno base (B.10.1) in piastre Petri sterili e lasciare solidificare. Versare uno strato molto sottile di terreno contenente sangue di montone (B.10.2) in quantità non superiori a 3 mL per piastra.

Lasciare solidificare. Se il terreno contenente il sangue viene aggiunto a piastre di terreno base preparate in precedenza, può essere necessario riscaldare le piastre per 20 minuti, ponendole in un incubatore settato a 37 °C, prima di versare lo strato di terreno al sangue.

#### **B.6.4. Ceppi per la reazione CAMP**

Per eseguire il CAMP test, sono necessari un ceppo  $\beta$ -emolitico di *S. aureus* (es. NCTC 1803 o ATCC 25923) e un ceppo di *R. equi* (es. NCTC 1621 o ATCC 6939).

Non tutti i ceppi di *S. aureus* sono adatti per il CAMP test.

Mantenere le colture stock di *S. aureus*, *R. equi*, *L. monocytogenes*, *L. innocua*, ed *L. ivanovii*, inoculando provette di agar-becco TSYEA (B.6.2), incubandoli a 35 °C o a

37 °C per 24-48 ore, o fino a che si verifica la crescita, e conservare in frigorifero a 3 °C ± 2 °C. Subcoltivare almeno una volta al mese.

## **B.7. Soluzione perossido d'idrogeno**

Usare una soluzione al 3% (peso/peso), per esempio una soluzione a 10 volumi.

*Nota: preparare la soluzione al momento dell'uso, evitando di utilizzare eventuali rimanenze.*

## **ALLEGATO C**

---

### **Test dell'illuminazione di Henry**

Esaminare le piastre utilizzando una sorgente di luce bianca, sufficientemente potente per illuminarle bene e che colpisca il fondo delle stesse con un'angolazione di 45°. Osservando dall'alto la piastra, illuminata da questa luce trasmessa obliquamente (illuminazione di Henry), le colonie di *Listeria* spp. presentano un colore blastro e una superficie granulata.

# **METODO ORIZZONTALE PER LA RICERCA DELLA SALMONELLA SPP. (ISO 6579:2002/ CORR.1:2004)**

Alfonsina Fiore

Centro Nazionale per la Qualità degli Alimenti e dei Rischi Alimentari

## **1. Scopo**

Metodo orizzontale per la determinazione di *Salmonella* spp, comprese *Salmonella typhi* e *Salmonella paratyphi*.

## **2. Normative di riferimento**

ISO 6887-1, Microbiologia degli alimenti e alimentazione animale- Preparazione del campione di prova, sospensione iniziale e diluizioni decimali per l'esame microbiologico- parte 1: regole generali per la preparazione della sospensione iniziale e delle diluizioni decimali.

ISO 7218:1996, Microbiologia degli alimenti e alimentazione animale- regole generali per l'esame microbiologico.

## **3. Termini e definizioni**

### **3.1. Salmonelle**

Microrganismi che formano colonie tipiche o non tipiche su terreni solidi selettivi e che mostrano caratteristiche biochimiche e sierologiche descritte, quando le prove sono condotte in accordo con questo metodo.

### **3.2. Determinazione di Salmonella**

Determinazione della presenza o assenza di Salmonella (3.1) in una particolare massa o volume di prodotto quando le prove sono condotte in accordo con questo metodo.

## **4. Principio**

### **4.1. Generale**

La determinazione di Salmonella necessita di quattro successivi passaggi (Allegato A).

*NOTA 1: la Salmonella può essere presente in piccole quantità e può essere spesso accompagnata da un considerevole alto numero di Enterobacteriaceae di altre famiglie. Inoltre, il prearricchimento è necessario per permettere la determinazione di un basso numero di Salmonelle o di Salmonelle danneggiate.*

#### **4.2. Pre-arricchimento in un terreno liquido non selettivo**

L'acqua peptonata tamponata a temperatura ambiente è inoculata con il campione di prova e incubata a 37 °C +/- 1 °C per 18 h +/- 2 h.

Se usata in grande quantità, l'acqua peptonata tamponata deve essere riscaldata a 37 °C +/- 1 °C prima dell'inoculo con il campione di prova.

#### **4.3. Arricchimento in terreno liquido selettivo**

Inoculare con la coltura ottenuta in 4.2 il terreno Rappaport-Vassiliadis con soia (RVS broth) e il Muller-Kauffmann tetrationato/novobiocina broth (MKTTn broth).

Il brodo RVS è incubato a 41,5 °C +/- 1 °C per 24 h +/- 3 h, e l'MKTTn broth a 37 °C +/- 1 °C per 24 h +/- 3 h.

#### **4.4. Piastramento e identificazione**

Dalle colture ottenute in 4.3 vengono inoculati 2 terreni selettivi solidi:

- primo terreno selettivo: xylose lesine deoxycholate agar (XLD agar); incubato a 37 °C +/- 1 °C ed esaminato dopo 24 h +/- 3 h;
- secondo terreno selettivo: a scelta dal laboratorio e complementare all'XLD (appropriato per l'isolamento di colonie di Salmonelle lattosio-positivo, di *Salmonella typhi* e di *Salmonella paratyphi*). Incubare alla temperatura e per il tempo specificati dal produttore.

#### **4.5. Conferma ed identificazione**

Le colonie presuntive di Salmonella sono subcolturate, dopo essere state piastrate come descritto in 4.4 e la loro identificazione è confermata per mezzo di appropriati test biochimici e sierologici.

### **5. Terreni di coltura, reagenti e sieri**

#### **5.1. Generale**

Per le pratiche di laboratorio vedere ISO 7218.

#### **5.2. Terreni di coltura e reagenti**

5.2.1. Terreno di prearricchimento non selettivo: Acqua Peptonata Tamponata (BPW) vedi B.1.

5.2.2. Primo terreno di arricchimento selettivo: Rappaport-Vassiliadis Medium con soia (RVS broth) vedi B.2.

- 5.2.3. Secondo terreno di arricchimento selettivo: Muller-Kauffman tetratio-nobiocina broth (MKTTn broth) vedi B.3.
- 5.2.4. Terreni selettivi solidi .
  - 5.2.4.1 Primo terreno XLD agar vedi B.4.
  - 5.2.4.2 Secondo terreno a scelta del laboratorio.
- 5.2.5. Nutrient agar vedi B.5.
- 5.2.6. Triple Sugar Iron agar (TSI agar) vedi B.6.
- 5.2.7. Nutrient agar semisolido vedi B.7.
- 5.2.8. Soluzione fisiologica vedi B.8.

*NOTA 2: la composizione dei terreni di coltura e dei reagenti è riportata nell'Allegato B.*

### 5.3. Sieri

In commercio sono disponibili diversi tipi di sieri agglutinanti contenenti anticorpi per uno o più antigeni-O; per esempio: antisieri contenenti uno o più gruppi "O" (chiamati sieri anti- O monovalenti o polivalenti, sieri anti-Vi, e antisieri contenenti anticorpi per uno o più fattori H (chiamati sieri anti-H monovalenti o polivalenti).

Ogni scelta deve essere fatta per assicurare che gli antisieri usati siano adatti per la ricerca di tutti i sierotipi di Salmonella. Questo obiettivo può essere ottenuto mediante il solo uso di antisiero preparato da un fornitore competente riconosciuto.

## 6. Apparecchi e vetreria

In alternativa alla vetreria può essere utilizzato materiale monouso.

In generale viene utilizzata l'usuale attrezzatura di un laboratorio di microbiologia (vedi ISO 7218) ed in particolare:

- 6.1. Apparecchi per la sterilizzazione a secco (stufa) e per la sterilizzazione umida (autoclave).
- 6.2. Stufa a secco o forno ventilato mediante convezione, capace di operare tra 37 °C e 55 °C.
- 6.3. Incubatore, capace di operare a 37 °C +/- 1 °C.
- 6.4. Bagno termostato o incubatore capaci di operare a 41,5 °C +/- 1 °C.
- 6.5. Bagno termostato, capace di operare da 44 °C a 47 °C.
- 6.6. Bagno termostato, capace di operare a 37 °C +/- 1 °C.  
Si raccomanda di utilizzare un bagno termostato (6.4, 6.5 e 6.6) contenente un agente antibatterico a causa della bassa dose infettiva di Salmonella.
- 6.7. Anse sterili, di diametro approssimativamente di 3 mm o 10 µL.
- 6.8. Phmetro, avente un'accuratezza di calibrazione di +/- 0,1 unità di pH a 20 °C /25 °C.
- 6.9. Provette o flasche, di appropriata capacità.  
Possono essere usate bottiglie o flasche con tappi metallici non tossici o di plastica.
- 6.10. Pipette graduate o pipette automatiche, di capacità nominale di 10 mL e 1 mL, graduate rispettivamente in divisioni di 0,5 mL e 0,1 mL.
- 6.11. Piastre Petri, di misura piccola (diametro da 90 mm a 100 mm) e/o di misura grande (diametro di 140 mm).



## 7. Campionamento

È importante che il laboratorio riceva un campione che sia veramente rappresentativo e che non sia stato danneggiato o trasformato durante il trasporto o la conservazione.

## 8. Preparazione del campione di prova

Preparare il campione di prova in accordo con lo specifico Standard Internazionale relativo al prodotto considerato, qualora esiste.

## 9. Procedimento (vedere diagramma dell'Allegato A)

### 9.1. Aliquota di prova e sospensione iniziale

#### 9.1.1. Generale

Per la preparazione della sospensione iniziale, utilizzare come diluente il terreno di pre-arricchimento specificato in 5.2.1 e 4.2 (acqua peptonata tamponata). Se l'aliquota di prova pesa più di 25 g, usare la quantità necessaria di terreno di pre-arricchimento per ottenere una diluizione 1/10.

Per ridurre il carico di lavoro dell'analisi quando il campione pesa più di 25 g è possibile scomporre quest'ultimo. Per esempio, se devono essere esaminati 10 campioni di prova da 25 g, bisogna combinare le 10 unità per formare un campione di prova composto da 250 g ai quali vanno aggiunti 2,25 l di brodo di pre-arricchimento. Allo stesso modo, 0,1 mL (in 10 mL di RVS broth) e 1 mL (in 10 mL di MKTTn broth) del brodo di pre-arricchimento provenienti dai 10 campioni di prova separati (vedere 9.3.1) possono essere composti per l'arricchimento in 100 mL di terreno di arricchimento selettivo.

### 9.2. Pre-arricchimento non selettivo

Incubare la sospensione iniziale (9. 1) a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  per 18 h  $\pm$  2 h.

### 9.3. Arricchimento selettivo

9.3.1. Trasferire 0,1 mL della coltura ottenuta in 9.2 in una provetta contenente 10 mL di RVS broth (5.2.2); trasferire 1 mL della coltura ottenuta in 9.2 in una provetta contenente 10 mL di MKTTn broth (5.2.3).

9.3.2. Incubare l'RVS broth inoculato (9.3.1) a  $41,5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  per 24  $\pm$  3 h e l'MKTTn broth inoculato (9.3.1) a  $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$  per 24  $\pm$  3 h.

## 9.4. Piastramento e identificazione

9.4.1. Dopo incubazione per 24 h +/- 3 h usando la coltura ottenuta dall'RVS broth (9.3.2), per mezzo di un'ansa (6.7) inoculare la superficie di una piastra Petri di misura grande (6.11) contenente il primo terreno selettivo in piastra (XLD agar, vedere 5.2.4.1) in modo da ottenere colonie ben isolate.

In assenza di piastre di misura grande, inoculare due piccole piastre una dopo l'altra usando la stessa ansa.

Procedere nello stesso modo quando viene usato il secondo terreno selettivo in piastra (5.2.4.2) usando un'ansa sterile e piastre Petri come sopra.

9.4.2. Dopo incubazione per 24 h +/- 3 h, usando la coltura ottenuta in MKTTn broth (9.3.2) ripetere la procedura descritta in 9.4.1 con i due terreni selettivi in piastra.

9.4.3. Capovolgere le piastre (9.4.1 e 9.4.2) in modo che il fondo sia in alto, e porle in un incubatore (6.3) settato a 37 °C +/- 1 °C per entrambi i terreni in piastra (5.2.4.1 e 5.2.4.2).

9.4.4. Dopo incubazione per 24 h +/- 3 h, esaminare le piastre (9.4.3) per la presenza di colonie tipiche e atipiche di Salmonella (vedi NOTA). Segnare la loro posizione sul fondo della piastra. Su XLD agar le colonie tipiche di Salmonella presentano un centro nero e una zona trasparente traslucida di color rosso dovuta al cambio del colore dell'indicatore.

Sul secondo terreno selettivo scelto dal laboratorio le colonie dovranno presentare una morfologia compatibile con quella dichiarata dal fornitore.

*NOTA 3: le varianti di Salmonella H<sub>2</sub>S-negative (per esempio S. paratyphi A) che crescono su XLD agar sono rosa con un centro di color rosa più scuro. Le Salmonelle lattosio -positive che crescono su XLD agar sono gialle con o senza annerimento.*

## 9.5. Conferma

### 9.5.1. Generale

Per l'esame biochimico possono essere usati i sistemi miniaturizzati per l'identificazione biochimica disponibili in commercio, specifici per *Salmonella* spp, e dei quali ne sia dimostrata l'attendibilità.

*NOTA 4: il riconoscimento delle colonie di Salmonella richiede esperienza e la loro apparenza può variare non solo da sierovariante a sierovariante, ma anche in base al terreno di coltura selettivo utilizzato.*

### 9.5.2. Selezione delle colonie per la conferma

Per la conferma, prendere da ciascuna piastra di ogni terreno selettivo (vedi 9.4) almeno una colonia considerata tipica o sospetta e ulteriori quattro colonie se la prima è negativa.

Nel caso di studi epidemiologici, si raccomanda che siano identificate almeno cinque colonie. Se su una piastra ci sono meno di cinque colonie tipiche o sospette, prendere per la conferma tutte le colonie tipiche o sospette.

Seminare per striscio le colonie selezionate sulla superficie di una piastra di nutrient agar (5.2.5), in modo tale da permettere lo sviluppo di colonie ben isolate. Incubare le piastre inoculate (9.4.3) a 37 °C +/- 1 °C per 24 h +/- 3 h.

Usare le colture pure per la conferma biochimica e sierologica.

### 9.5.3 Conferma biochimica

#### 9.5.3.1. Generale

Mediante un ago, inoculare il terreno specificato in 9.5.3.2 con ciascuna delle colture ottenute dalle colonie selezionate in 9.5.2.

#### 9.5.3.2. TSI agar (5.2.6)

Seminare per infissione il fondo della provetta e per striscio la superficie dell'agar a becco. Incubare a 37 °C +/- 1 °C per 24 h +/- 3 h.

Interpretare i cambiamenti nel colore del terreno come segue:

##### a) fondo

- giallo glucosio-positivo (fermentazione del glucosio)
- rosso o non variato glucosio-negativo (nessuna fermentazione del glucosio)
- nero formazione di idrogeno solforato
- formazione di bolle o fenditura dell'agar formazione di gas dal glucosio

##### b) superficie dell'agar (becco)

- giallo lattosio e/o saccarosio-positivo
- rosso o non variato lattosio e/o saccarosio-negativo

Le colture tipiche di *Salmonella* mostrano superfici a becco alcaline (rosse) e estremità acide (gialle) con formazione di gas (bollicine) e (nel 90% dei casi circa) formazione di idrogeno solforato (annerimento dell'agar).

Quando viene isolata una *Salmonella* lattosio positiva (vedi 4.4), il TSI a becco è giallo. Perciò, la conferma preliminare delle colture di *Salmonella* non può essere basata solo sui risultati del test del TSI agar (vedi 9.5.3).

Procedere all'identificazione biochimica utilizzando i sistemi miniaturizzati specifici per *Salmonella* spp. (9.5.1).

### 9.5.4. Conferma sierologica e sierotipizzazione

#### 9.5.4.1. Generale

La ricerca della presenza degli antigeni O, Vi ed H di *Salmonella* è testata per mezzo dell'agglutinazione su vetrino con gli appropriati sieri, da colonie pure (9.5.2) e dopo avere eliminato le colonie autoagglutinanti. Usare gli antisieri in accordo con le istruzioni del produttore se diverse da quelle descritte sopra.

#### 9.5.4.2. Eliminazione delle colonie autoagglutinanti

Porre una goccia di soluzione salina (5.2.8) su un vetrino ben pulito. Per mezzo di un'ansa (6.7) sciogliere nella goccia una parte della colonia che deve essere testata in modo da ottenere una sospensione torbida e omogenea.

*NOTA 5: è anche possibile sciogliere una parte della colonia che deve essere testata in una goccia di acqua, e dopo mescolare questa soluzione con una goccia di soluzione salina (5.2.8). Roteare il vetrino delicatamente per 30-60 secondi. Osservare il risultato in contrasto con uno sfondo scuro preferibilmente con l'aiuto di una lente di ingrandimento. Se i batteri hanno agglutinato in unita più o meno distinte, la colonia è considerata autoagglutinante, e non deve essere sottoposta ai successivi test di ricerca degli antigeni.*

#### 9.5.4.3. Esame per gli antigeni O

Usando una colonia pura non autoagglutinante, procedere in accordo al 9.5.4.2, usando una goccia di siero anti-O (5.3) invece della soluzione salina

(5.2.8). Se avviene l'agglutinazione, la reazione è considerata positiva. Usare i sieri poli- e monovalenti uno dopo l'altro.

**9.5.4.4. Esame per gli antigeni Vi**

Procedere in accordo con 9.5.4.2, ma usando una goccia di siero anti-Vi (5.3) invece della soluzione salina.

Se avviene l'agglutinazione, la reazione è considerata positiva.

**9.5.4.5 Esame per gli antigeni H**

Inoculare nutrient agar semisolido (5.2.7) con una colonia pura non-autoagglutinante. Incubare il terreno a 37 °C +/- 1 °C per 24 h +/- 3 h.

Usare questa coltura per l'esame degli antigeni H, procedendo in accordo con 9.5.4.2, ma usando una goccia del siero anti-H (5.3) invece della soluzione salina. Se avviene l'agglutinazione, la reazione è considerata positiva.

**9.5.5 Interpretazione della reazioni biochimiche e sierologiche**

La Tabella 2 riporta l'interpretazione dei test di conferma (9.5.3 e 9.5.4) eseguiti sulle colonie testate (9.5.2).

**Tabella 1. Interpretazione dei test di conferma**

Reazione biochimica	Auto-agglutinazione	Reazioni sierologiche	Interpretazione
Tipica	no	0-, Vi-, o H-antigene positivo	Ceppi considerati Salmonella
Tipica	no	Tutte reazioni negative	Può essere Salmonella
Tipica	si	Non testate (vedi 9.5.4.2)	"
Non tipica	no/si	0-, Vi-, o H-antigene positivo	"
Non tipica	no/si	Tutte reazioni negative	Ceppi non considerati Salmonella

**9.5.6 Conferma definitiva**

I ceppi considerati essere Salmonella, o che possono essere Salmonella (Tabella 2), possono essere inviati ad un centro di riferimento per la tipizzazione definitiva.

L'invio deve essere accompagnato da tutte le informazioni possibili riguardanti il ceppo (i ceppi).

**10. Espressione dei risultati**

In accordo con i risultati dell'interpretazione, indicare la presenza o assenza di Salmonella in un campione di x g o x mL di prodotto.

## 11. Rapporto di prova

Il rapporto deve specificare:

- tutte le informazioni necessarie per la completa identificazione del campione;
- il metodo di campionamento usato, se conosciuto;
- le differenze nel terreno di arricchimento o le condizioni di incubazione usate;
- tutte le condizioni operative non specificate in questo Standard Internazionale, o ritenute;
- un optional, insieme ai dettagli di qualsiasi incidente che può aver influenzato i risultati;
- i risultati ottenuti.

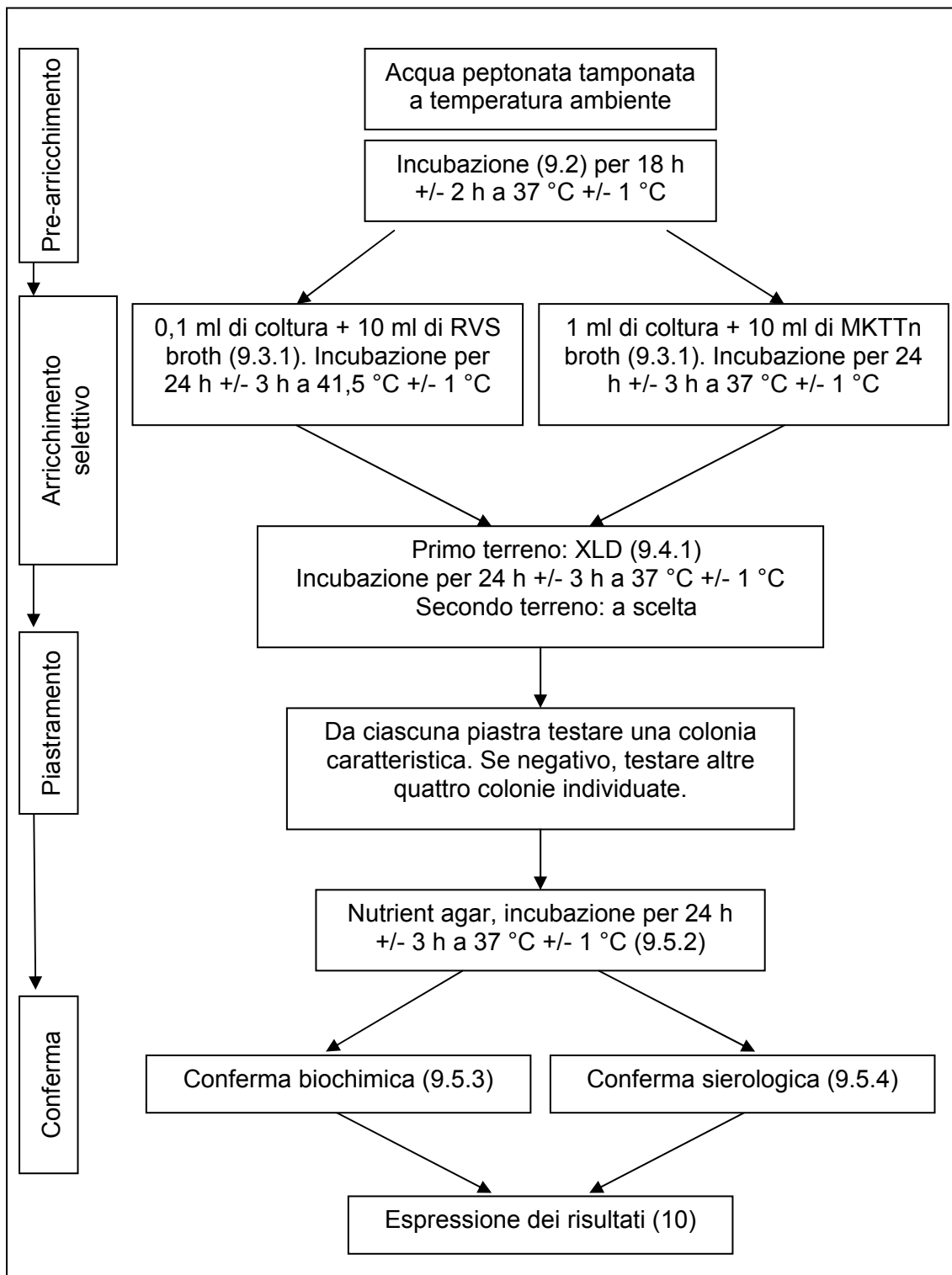
La relazione deve anche riportare se un risultato positivo è stato ottenuto utilizzando un terreno in piastra (5.2.4) non specificato in questo Standard Internazionale.

### Bibliografia

1. ISO/TR 11133-1. *Microbiology of food and animal feeding stuffs – Guidelines on the preparation and production of culture media – Part 1: General guidelines on quality assurance for the preparation of culture media in the laboratory.* 2002.
2. Italia. Legge n. 283 del 30 aprile 1962. Disciplina igienica della produzione e vendita delle sostanze alimentari e delle bevande. *Gazzetta Ufficiale* n. 139 del 4 giugno 1962.

## ALLEGATO A

### Diagramma di procedura



## ALLEGATO B

---

### Composizione e preparazione dei terreni di coltura e dei reagenti

#### B.1. Acqua peptonata tamponata

È possibile utilizzare il terreno completo pronto all'uso seguendo le istruzioni del produttore.

##### B.1.1. Composizione

Digerito enzimatico di caseina	10,0 g
Cloruro di sodio	5,0 g
Idrogeno fosfato di sodio dodecaidrato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ )	9,0 g
Diidrogeno fosfato di potassio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	1,5 g
Acqua	1000 mL

##### B.1.2. Preparazione

Sciogliere i vari componenti, o la polvere nel caso di terreno completo, in acqua riscaldando se necessario.

Se necessario aggiustare il pH, in modo tale che dopo la sterilizzazione esso sia pari a 7,0 +/- 0,2 a 25 °C.

Versare il terreno in contenitori di idonea capacità (6.9).

Sterilizzare per 15min in autoclave (6.1) a 121 °C.

#### B.2. Terreno Rappaport-Vassiliadis con soia (RVS broth)

È possibile utilizzare il terreno completo pronto all'uso seguendo le istruzioni del produttore.

##### B.2.1. Soluzione A

###### B.2.1.1. Composizione

Digerito enzimatico di soia	5,0 g
Cloruro di sodio	8,0 g
Diidrogeno fosfato di potassio ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )	1,4 g
Idrogeno fosfato di potassio ( $\text{K}_2\text{HPO}_4$ )	0,5 g
Acqua	1000 mL

###### B.2.1.2. Preparazione

Sciogliere i componenti in acqua mediante riscaldamento a circa 70 °C.

Preparare la soluzione il giorno stesso della preparazione del terreno RVS completo.

## B.2.2 Soluzione B

### B.2.2.1.

Cloruro di magnesio esaidrato ( $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ ) 400 g

Acqua 1000 mL

### B.2.2.2. Preparazione

Sciogliere il cloruro di magnesio in acqua.

Poiché questo sale è molto igroscopico, è opportuno sciogliere l'intera quantità di  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$  da un contenitore appena aperto, in accordo con la formula. Quindi, 250 g di cloruro di magnesio esaidrato vengono aggiunti a 625 mL di acqua, in modo tale da ottenere una soluzione con un volume totale è pari a 795 mL e con una concentrazione di circa 31,5 g per 100 mL di cloruro di magnesio esaidrato.

La soluzione può essere mantenuta in una bottiglia scura di vetro con tappo, a temperatura ambiente per almeno 2 anni.

## B.2.3. Soluzione C

### B.2.3.1. Composizione

Ossalato di verde malachite 0,4 g

Acqua 100 mL

### B.2.3.2. Preparazione

Sciogliere l'ossalato di verde malachite in acqua.

La soluzione può essere conservata in una bottiglia scura di vetro a temperatura ambiente per almeno 8 mesi.

## B.2.4. Terreno completo

### B.2.4.1. Composizione

Soluzione A (B.2.1) 1000 mL

Soluzione B (B.2.2) 100 mL

Soluzione C (B.2.3) 10 mL

### B.2.4.2. Preparazione

Aggiungere a 1000 mL di soluzione A, 100 mL di soluzione B e 10 mL di soluzione C.

Se necessario aggiustare il pH in modo tale che dopo la sterilizzazione sia pari a 5,2 +/- 0,2.

Distribuire il terreno in provette (6.9) in quantità di 10 mL/provetta.

Sterilizzare per 15min in autoclave (6.1) a 115 °C.

Conservare il terreno a 3 °C +/- 2 °C utilizzare il terreno il giorno stesso della sua preparazione.

*NOTA 1: la composizione finale del terreno è: digerito enzimatico di soia 4,5 g/L, cloruro di sodio 7,2 g/L, diidrogeno fosfato di potassio 1,44 g/L, idrogeno fosfato di potassio 1,44 g/L, cloruro di magnesio anidro 13,4 g/L, o cloruro di magnesio esaidrato 28,6 g/L, ossalato di verde malachite 0,036 g/L.*



## B.3. Muller-Kauffmann tetrionato-novobiocina broth (MKTTn)

### B.3.1. Terreno base

È possibile utilizzare il terreno completo pronto all'uso seguendo le istruzioni del produttore.

#### B.3.1.1. Composizione

Digerito enzimatico di estratto di carne	4,30 g
Digerito enzimatico di caseina	8,60 g
Cloruro di sodio (NaCl)	2,60 g
Carbonato di calcio (CaCO <sub>3</sub> )	38,70 g
Sodio tiosolfato pentaidrato (Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub> ·5H <sub>2</sub> O)	47,80 g
Ox bile per uso batteriologico	4,75 g
Verde brillante	9,5 mg
Acqua	1000 mL

#### B.3.1.2. Preparazione

Sciogliere i componenti deidratati o il terreno completo deidratato, in acqua mediante bollitura per 5min. Se necessario, aggiustare in pH in modo tale che sia pari a 8,0 +/- 0,2 a 25 °C.

Miscelare accuratamente il terreno e versare asetticamente in provette sterili (6.9) in quantità pari a 10 mL/provetta.

Il terreno base può essere conservato per 4 settimane a 3 °C +/- 2 °C.

### B.3.2. Soluzione iodio-ioduro

#### B.3.2.1. Composizione

Iodio	20,0 g
Ioduro di potassio (KI)	25,0 g
Acqua	100 mL

#### B.3.2.2. Preparazione

Sciogliere completamente lo ioduro di potassio in 10 mL di acqua, quindi aggiungere lo iodio e portare a 100 mL con acqua sterile. Non riscaldare.

Conservare la soluzione preparata al buio, a temperatura ambiente in un contenitore a tenuta.

### B.3.3. Soluzione di novobiocina

È possibile utilizzare la soluzione di novobiocina pronta all'uso seguendo le istruzioni riportate dal produttore.

#### B.3.3.1. Composizione

Sale sodico di novobiocina	0,04 g
Acqua	5 mL

#### B.3.3.2. Preparazione

Sciogliere il sale sodico di novobiocina in acqua e sterilizzare mediante filtrazione.

Conservare per più di 4 settimane a 3 °C +/- 2 °C.

### B.3.4. Terreno completo

#### B.3.4.1 Composizione

Terreno base (B.3.1)	1000 mL
Soluzione iodio-ioduro (B.3.2)	20 mL
Soluzione di novobiocina (B.3.3)	5 mL

#### B.3.4.2 Preparazione

Aggiungere asetticamente 5 mL di soluzione di novobiocina (B.3.3) a 1000 mL di terreno base (B.3.1).

Miscelare e aggiungere 20 mL di soluzione iodio-ioduro (B.3.2). Miscelare bene.

Versare il terreno asetticamente in provette sterili (6.9) di adatte capacità. Il terreno deve essere usato il giorno stesso della sua preparazione.

*NOTA 2: la composizione finale del terreno è digerito enzimatico di estratto di carne 4,3 g, digerito enzimatico di caseina 8,45 g, cloruro di sodio 2,54 g, carbonato di calcio 38,04 g, sodio tiosolfato pentaidrato 30,27 g, ox-bile per uso batteriologico 4,75 g, iodio 4 g, ioduro di potassio 5 g, verde brillante 9,25 g, novobiocina 0,05 g, acqua 1000 mL.*

## B.4. Xilosio Lisina Desossicolato agar (XLD)

### B.4.1. Terreno base

È possibile utilizzare il terreno completo pronto all'uso seguendo le istruzioni del produttore.

#### B.4.1.1. Composizione

Estratto di lievito	3,00 g
Cloruro di sodio	5,00 g
Xilosio	3,75 g
Lattosio	7,05 g
Saccarosio	7,50 g
L-lisina idrocloruro	5,00 g
Sodio tiosolfato	6,80 g
Ferro (III) ammonio citrato	0,80 g
Rosso fenolo	0,08 g
Sodio desossicolato	1,00 g
Agar	da 9 g a 18 g <sup>a</sup>
Acqua	1000 mL

<sup>a</sup> dipende dalla consistenza dell'agar

#### B.4.1.2. Preparazione

Sciogliere i componenti deidratati, o il terreno completo, in acqua mediante riscaldamento, agitando di frequente fino a che il terreno non inizia a bollire. Evitare il surriscaldamento.

Se necessario, aggiustare il pH in modo tale che dopo la sterilizzazione esso sia pari a 7,4 +/- 0,2 a 25 °C.

Versare il terreno in contenitori (6.9) di appropriata capacità. Riscaldare agitando di frequente fino all'ebollizione. Non surriscaldare.

#### B.4.2. Preparazione delle piastre di XLD

Trasferire immediatamente il terreno in bagno termostato (6.5) a 44-46 °C, agitare e versare in piastre. Lasciare solidificare. Immediatamente prima dell'uso, asciugare accuratamente le piastre d'agar (preferibilmente con i coperchi chiusi e capovolte) nel forno (6.2) settato tra 37-55 °C, fino a che la superficie dell'agar non risulti asciutta. Conservare le piastre non oltre 5 giorni a 3 °C +/- 2 °C.

### B.5. Nutrient agar

È possibile utilizzare il terreno completo pronto all'uso seguendo le istruzioni del produttore.

#### B.5.1. Composizione

Estratto di carne	3,0 g
Peptone	5,0 g
Agar	da 9,0 g a 18,0 g <sup>a</sup>
Acqua	1000 mL

<sup>a</sup> dipende dalla consistenza dell'agar

#### B.5.2. Preparazione

Sciogliere i componenti o il terreno completo in acqua, mediante riscaldamento se necessario.

Se necessario, aggiustare il pH in modo tale che dopo la sterilizzazione sia pari a 7,0 +/- 0,2 a 25 °C.

Trasferire il terreno all'interno di contenitori (6.9) di appropriata capacità. Sterilizzare per 14 minuti in autoclave (6.1) a 121 °C.

#### B.5.3. Preparazione delle piastre di Nutrient agar

Trasferire circa 15 mL del terreno in piastre di Petri piccole (6.11) e procedere come descritto in B.4.2.

### B.6. Triple sugar iron agar (TSI)

È possibile utilizzare il terreno completo pronto all'uso seguendo le istruzioni del produttore.

#### B.6.1. Composizione

Estratto di carne	3,0 g
Estratto di lievito	3,0 g
Peptone	20,0 g

Cloruro di sodio	5,0 g
Lattosio	10,0 g
Saccarosio	10,0 g
Glucosio	1,0 g
Ferro (III) citrato	0,3 g
Sodio tiosolfato	0,3 g
Rosso fenolo	0,024 g
Agar	da 9 g a 18 g <sup>a</sup>
Acqua	1000 mL

<sup>a</sup> dipende dalla consistenza dell'agar

### B.6.2. Preparazione

Sciogliere i componenti o il terreno completo in acqua riscaldando. Se necessario, aggiustare il pH in modo tale che dopo la sterilizzazione esso sia pari a 7,4 +/- 0,2 a 25 °C.

Versare il terreno in provette in quantità pari a 10 mL. Sterilizzare per 15 minuti in autoclave (6.1) a 121 °C. Lasciare raffreddare le provette in posizione inclinata in modo tale da ottenere un fondo di profondità variabile da 2,5-5 cm.

## B.7. Nutrient agar semisolido

È possibile utilizzare il terreno completo pronto all'uso seguendo le istruzioni del produttore.

Nello specifico utilizzare il Nutrient broth aggiungendo l'opportuna quantità di agar.

### B.7.1. Composizione

Estratto di carne	3,0 g
Peptone	5,0 g
Agar	da 4 g a 9 g <sup>a</sup>
Acqua	1000 mL

<sup>a</sup> dipende dalla consistenza dell'agar

### B.7.2. Preparazione

Sciogliere i vari componenti, o il terreno completo con l'opportuna quantità di agar, in acqua, riscaldando se necessario.

Se necessario aggiustare il pH in modo tale che dopo la sterilizzazione sia 7,0 +/- 0,2 a 25 °C.

Trasferire il terreno in contenitori (6.9) di appropriata capacità.

Sterilizzare in autoclave (6.1) per 15 min a 121 °C.

### **B.7.3. Preparazione delle piastre di agar**

Versare asepticamente circa 15 mL terreno in piastre di Petri di misura piccola (6.11).  
Non lasciare seccare le piastre.

## **B.8. Soluzione fisiologica (soluzione salina)**

### **B.8.1. Composizione**

Cloruro di sodio 8,5 g  
Acqua 1000 mL

### **B.8.2. Preparazione**

Sciogliere il cloruro di sodio in acqua.  
Se necessario, aggiustare il pH in modo tale che dopo la sterilizzazione sia 7,0 +/- 0,2 a 25 °C.  
Distribuire la soluzione in contenitori o provette (6.9) in modo tale che dopo la sterilizzazione essi ne contengano 90/100 mL.  
Sterilizzare in autoclave (6.1) per 15min a 121 °C.

## **Campionamento**

Il livello di campionamento degli integratori a base vegetale, come per le spezie, prodotto ad essi assimilabile, dovrebbe essere lasciato alla discrezione delle autorità competenti (2).

## **Limiti microbiologici**

Al momento attuale non esistono limiti microbiologici specifici per gli integratori a base di piante pertanto, in attesa di indicazioni ufficiali, si consigliano i seguenti limiti:

- A) *Salmonella* spp.  
Presenza/Assenza in 25 grammi di prodotto analizzato.
- B) *Listeria monocytogenes*  
Presenza/Assenza in 25 grammi di prodotto analizzato (quando non viene esplicitamente dichiarato in etichetta se il prodotto in questione è destinato a categorie di persone a rischio).
- C) *Listeria monocytogenes*  
≤ 100 ufc/grammo di prodotto analizzato (quando non viene esplicitamente dichiarato in etichetta se il prodotto in questione è destinato a categorie di persone a rischio: immunocompressi, donne in gravidanza, bambini, anziani).

*La riproduzione parziale o totale dei Rapporti e Congressi ISTISAN  
deve essere preventivamente autorizzata.  
Le richieste possono essere inviate a: [pubblicazioni@iss.it](mailto:pubblicazioni@iss.it).*

*Stampato da Litografia Chicca di Fausto Chicca  
Via di Villa Braschi 143, 00019 Tivoli (Roma)*

*Roma, dicembre 2007 (n. 4) 7° Suppl.*