



Rapporti ISTISAN

13/15



**Analisi microbiologiche
dei prodotti cosmetici:
procedure e metodi di riferimento**



ISSN 1123-3117

A cura di L. Bonadonna
e M. Marletta

www.iss.it

ISTITUTO SUPERIORE DI SANITÀ

**Analisi microbiologiche dei prodotti cosmetici:
procedure e metodi di riferimento**

A cura di Lucia Bonadonna (a) e Marcella Marletta (b)

*(a) Dipartimento di Ambiente e Connessa Prevenzione Primaria,
Istituto Superiore di Sanità, Roma*

*(b) Direzione Generale dei Dispositivi Medici del Servizio Farmaceutico
e della Sicurezza delle Cure, Ministero della Salute, Roma*

ISSN 1123-3117

Rapporti ISTISAN

13/15

Istituto Superiore di Sanità

Linee guida e metodi per l'analisi microbiologica dei prodotti cosmetici.

A cura di Lucia Bonadonna e Marcella Marletta

2013, viii, 94 p. Rapporti ISTISAN 13/15

In Italia il settore cosmetico è regolamentato dalla Legge 713/1986 e successive modifiche e integrazioni, che a sua volta costituisce recepimento della Direttiva 76/768/CEE e s.m.i. Se si considerano gli aspetti microbiologici, la Legge 713/1986, riprendendo i principi della Direttiva, non attribuisce come carattere essenziale ai prodotti cosmetici la sterilità, ma stabilisce che in essi debba essere limitata la presenza di microrganismi. Tuttavia, la normativa non individua le procedure analitiche da seguire per lo svolgimento dell'analisi microbiologica. È in questo contesto che è stato elaborato il presente volume che raccoglie i metodi analitici di riferimento per la determinazione di parametri microbiologici utili a valutare le caratteristiche di sicurezza dei prodotti cosmetici.

Parole chiave: Cosmetici; Metodi; Patogeni; Sicurezza microbiologica

Istituto Superiore di Sanità

Guidelines and methods for the microbiological analysis of cosmetics.

Edited by Lucia Bonadonna and Marcella Marletta

2013, viii, 94 p. Rapporti ISTISAN 13/15 (in Italian)

In Italy the Law 713/1986, derived from the Directive 76/768/EEC and its integrations, regulates the cosmetic sector. If the microbiological aspects are considered, taking into account the principles of the directive, the Law 713/1986 does not decide the cosmetics to be sterile products, but it establishes that presence of microorganisms has to be limited. Nevertheless the regulation itself did not specify the test procedures for the microbiological analysis. For this reason this volume has been elaborated. In fact, it gathers reference analytical methods for the detection of microbiological parameters that can be helpful for evaluating the safety characteristics of cosmetics.

Key words: Cosmetics; Methods; Microbiological safety; Pathogens

Per informazioni su questo documento rivolgersi a: lucia.bonadonna@iss.it.

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

Citare questo documento come segue:

Bonadonna L, Marletta M (Ed.). *Linee guida e metodi per l'analisi microbiologica dei prodotti cosmetici*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2013. (Rapporti ISTISAN 13/15).

Presidente dell'Istituto Superiore di Sanità e Direttore responsabile: *Fabrizio Oleari*
Registro della Stampa - Tribunale di Roma n. 131/88 del 1° marzo 1988 (serie: *Rapporti e congressi ISTISAN*)

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



**Ha contribuito alla stesura del presente rapporto il Gruppo di lavoro
“Metodi microbiologici per l’analisi dei cosmetici”**

Lucia BONADONNA (*coordinatore*)

Dipartimento di Ambiente e connessa Prevenzione Primaria, Istituto Superiore di Sanità, Roma

Istituto Superiore di Sanità, Roma

Dipartimento di Ambiente e connessa Prevenzione Primaria

Rossella BRIANCESCO

Pierluigi MELONI

Maurizio SEMPRONI

Centro Nazionale ONDICO

Daniela DE ORSI

Rosa PARADISO (*collaboratrice esterna*)

Azienda Sanitaria di Firenze, Firenze

Laboratorio di Sanità Pubblica

Valeria LI DONNI

Elisabetta ZANIERI

Azienda Sanitaria dell’Alto Adige, Bressanone

Servizio di Igiene e Sanità Pubblica

Maria Grazia ZUCCARO

INDICE

Presentazione	v
Premessa	vii
Introduzione	1
Analisi microbiologiche dei prodotti cosmetici: linee guida per le buone pratiche di laboratorio	
0. Introduzione	4
1. Ambienti di lavoro	5
2. Apparecchiature e attrezzature di base	7
3. Vetreria e materiale monouso	16
4. Ceppi di microrganismi	17
5. Personale	17
6. Preparazione e sterilizzazione dei terreni colturali e dei reagenti	18
7. Campioni di laboratorio	21
8. Pratiche operative	23
9. Tecniche microbiologiche di base	26
10. Tecniche base di isolamento e conta	29
11. Preparazione e taratura degli inoculi	30
Procedure operative per l'analisi microbiologica dei prodotti cosmetici	
1. Prelievo, manipolazione e conservazione dei prodotti cosmetici	31
2. Trattamento dei campioni	31
3. Tecniche colturali	33
Determinazione e conteggio dei batteri vitali mesofili aerobi	
0. Generalità	36
1. Campo di applicazione	36
2. Termini e definizioni	36
3. Metodo	37
Determinazione di <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
0. Generalità	49
1. Campo di applicazione	50
2. Termini e definizioni	50
3. Metodo	50
Determinazione e conteggio di funghi e lieviti	
0. Generalità	56
1. Campo di applicazione	56
2. Termini e definizioni	57
3. Metodo	57

Determinazione di *Candida albicans*

0. Generalità.....	66
1. Campo di applicazione.....	66
2. Termini e definizioni	66
3. Metodo.....	67

Determinazione di *Escherichia coli*

0. Generalità.....	73
1. Campo di applicazione.....	73
2. Termini e definizioni	73
3. Metodo.....	74

Determinazione di *Staphylococcus aureus*

0. Generalità.....	80
1. Campo di applicazione.....	80
2. Termini e definizioni	81
3. Metodo.....	81

Appendice A

Sistema Rapid Alert Exchange (RAPEX): segnalazioni relative ai cosmetici dal 2006.....	89
--	----

PRESENTAZIONE

Come tutti i prodotti destinati ai consumatori, anche i cosmetici devono rispondere a precise disposizioni legislative che garantiscano la sicurezza del prodotto e tutelino i consumatori.

Sicurezza, qualità ed efficacia sono i requisiti che devono essere valutati dai diversi soggetti che operano nel settore. Sicuramente i soggetti coinvolti in queste attività di controllo sono rappresentati dall'industria produttrice, con il compito di valutare il cosmetico nella sua complessità; dall'autorità sanitaria, con il compito di vigilare negli stabilimenti di produzione e sugli importatori, controllando gli aspetti tecnici e amministrativi e verificando la rispondenza della produzione alle norme legislative – e in questo contesto, diverse regioni hanno adottato piani di controllo sui prodotti cosmetici con l'approvazione di linee operative per determinare criteri e azioni uniformi di sorveglianza; e non ultimo, dall'autorità sanitaria centrale che ha l'incarico di predisporre tutti gli aggiornamenti normativi del settore e di preparare metodiche analitiche microbiologiche e chimiche che devono essere applicate dai laboratori periferici per la verifica della qualità e sicurezza dei prodotti.

In questo ambito, l'Istituto Superiore di Sanità, anche su richiesta del Ministero della Salute, è chiamato a svolgere un complesso lavoro tecnico di consulenza. In particolare, è incaricato della preparazione di metodi ufficiali per l'identificazione e il dosaggio delle sostanze sottoposte a restrizioni e di quelle proibite, a valutare particolari prescrizioni per la conservazione del prodotto e, non ultimo, a fornire criteri di purezza microbiologica e chimica con i relativi metodi di analisi.

Al momento in cui si scrive la normativa italiana di riferimento per i prodotti cosmetici è la Legge 713/1986, modificata più volte nel corso degli anni, seguendo l'iter evolutivo delle direttive europee, ed emendata in più di 55 occasioni. Tuttavia, sta per entrare definitivamente in vigore il Regolamento 1223/2009 che intende rafforzare e chiarire le attuali norme sulla sicurezza dei cosmetici, sulle responsabilità dei produttori e sui controlli da eseguire. Il Regolamento ha quindi come obiettivo primario la tutela della salute del consumatore e, a questo scopo, fornisce la possibilità di armonizzare le disposizioni già esistenti in materia, sia tenendo conto dei progressi e dei cambiamenti avvenuti nel settore, sia apportando precisazioni sulle caratteristiche e sulla definizione dei prodotti, sui requisiti di produzione, sugli aspetti di sicurezza e sui criteri per le attività di sorveglianza e controllo sul mercato.

È anche per uniformare le procedure analitiche che è stato quindi elaborato questo manuale di metodi microbiologici che può rappresentare un riferimento destinato agli operatori del settore e a tutti coloro che sono interessati alle problematiche igieniche del prodotto cosmetico. La ricerca dei microrganismi e l'attività di prevenzione necessaria per realizzare un corretto programma di controllo dell'adeguatezza microbiologica dei cosmetici presuppongono una conoscenza approfondita della materia. È per questo che il volume, risultato dell'attività del "Gruppo di Lavoro per i Metodi microbiologici per l'analisi dei cosmetici" con esperienze specifiche nel campo e il supporto fornito dai dati di letteratura attualmente disponibili, acquista un significato estremamente attuale e, in mancanza di requisiti e metodologie ufficiali, fornisce il supporto tecnico necessario per adempiere correttamente anche ai nuovi futuri disposti normativi.

Loredana Musmeci
*Direttore del Dipartimento di Ambiente
e Connessa Prevenzione Primaria*

PREMESSA

Il settore cosmetico sembra non avere risentito particolarmente dell'attuale rallentamento mondiale dei consumi. Infatti, anche se a livello nazionale è segnalata in questo campo una propensione al consumo più cauta, dall'altra parte sembra ormai impossibile rinunciare del tutto all'uso, divenuto ormai quotidiano, di prodotti per l'igiene e la bellezza personale.

Secondo dati dell'Associazione Europea delle industrie cosmetiche (già COLIPA - *European Cosmetic, Toiletry and Perfumery Association* e ora *Cosmetics Europe*), Germania, Francia, Italia e Regno Unito sono i Paesi leader per il consumo di cosmetici in Europa. Inoltre, in Italia, dal 2009, a fronte di valori tendenzialmente negativi sul piano dei consumi dei beni non durevoli, l'andamento dei consumi per i prodotti cosmetici sul mercato interno è rimasto stabilmente positivo. Tuttavia, per il 2012, l'Associazione Italiana delle Imprese cosmetiche (UNIPRO), se da una parte ha osservato una diminuzione dei consumi rispetto ad anni precedenti, ha confermato che la grande distribuzione è il più importante canale di vendita per questi prodotti.

Risulta comunque sempre più evidente l'importanza per i consumatori di avere precise garanzie sulla qualità e sulla sicurezza dei prodotti che utilizzano.

È proprio la Legge 713/1986, all'art. 7 comma 1, che stabilisce che i prodotti cosmetici devono essere fabbricati, manipolati, confezionati e venduti in modo tale da non causare danni per la salute nelle normali condizioni di impiego e in quelle ragionevolmente prevedibili. Questo significa che nei cosmetici non possono essere contenuti determinati microrganismi che potrebbero rappresentare una condizione di rischio per la salute dei consumatori, oltre ad alcune specifiche sostanze. Di altre sostanze viene richiesta una specifica bassa concentrazione.

In realtà, una carenza normativa di fronte alla quale si trova l'operatore, che deve effettuare i controlli di qualità batteriologica dei prodotti, è quella legata alla definizione di parametri ufficiali, limiti di accettabilità e metodi analitici da utilizzare. Infatti, nonostante in diversi Paesi siano state emanate proposte di normative specifiche, non si è raggiunto ancora un accordo a livello europeo che abbia stabilito requisiti microbiologici, valori limite e metodologie ufficiali.

Come conseguenza, per quanto attiene i criteri di valutazione microbiologica e i parametri microbici da determinare, in mancanza di specifiche disposizioni normative, i laboratori pubblici di controllo spesso si sono finora trovati davanti alla necessità di fare riferimento a procedure analitiche non specificatamente predisposte per l'esame di questi prodotti. Si sono ispirati invece spesso a metodi riportati dalla Farmacopea Ufficiale che hanno rappresentato un presupposto metodologico anche per i prodotti cosmetici per i quali, analogamente ai farmaci per uso topico non obbligatoriamente sterili, non è richiesta la sterilità o, altrimenti, a indicazioni fornite dalle linee guida del COLIPA (ora *Cosmetics Europe*), se non addirittura a metodi non appropriati e adattati da altri utilizzati per l'analisi di altre matrici. Parametri e valori di riferimento per stabilire la qualità microbiologica dei prodotti finiti sono tuttavia riportati nelle linee guida del *Scientific Committee on Consumer Safety (SCCS) (Notes of guidance for testing of cosmetic ingredients and their safety evaluation)* che forniscono indicazioni riguardanti i diversi aspetti relativi alla valutazione e alla sicurezza dei cosmetici. Queste linee guida rivestono un ruolo importante e possono fornire un orientamento per tutti coloro che operano nel settore per adeguare e implementare in misura adeguata le attività di vigilanza e di controllo.

Il comma 2 dell'art. 7 della Legge 713/1986 prevede la necessità, tenendo conto delle direttive comunitarie, di definire i metodi di analisi necessari per controllare la composizione dei prodotti cosmetici e i criteri di purezza batteriologica e chimica.

In tale contesto, e in linea di continuità con le attività svolte dal Gruppo di Lavoro per l'elaborazione dei metodi microbiologici sono stati predisposti metodi di analisi che i laboratori pubblici operanti nel settore possono impiegare per i controlli delle caratteristiche di sicurezza microbiologica dei cosmetici.

La necessità di disporre di metodiche omogenee e confrontabili sul territorio nazionale e che, nello stesso tempo, diano le dovute garanzie di qualità del dato analitico, ha quindi condotto alla produzione dei metodi riportati in questo volume che prendono in considerazione procedure analitiche specificatamente elaborate per i prodotti cosmetici da enti di standardizzazione. Ad integrazione delle metodologie utili per l'esame microbiologico, sono riportati anche criteri di buone pratiche di laboratorio per l'assicurazione di qualità del dato.

Lucia Bonadonna e Marcella Marletta

INTRODUZIONE

In Italia il settore cosmetico è disciplinato, fino all'11 luglio 2013, dalla Legge 11 ottobre 1986 n. 713 e successive modifiche e integrazioni, che costituisce il recepimento della Direttiva 76/768/CEE e s.m.i.

Obiettivo principale di questa normativa è la sicurezza del consumatore che utilizza prodotti cosmetici. Pertanto, le disposizioni e le restrizioni introdotte dal legislatore europeo sono principalmente rivolte a questo obiettivo, anche attraverso una precisa responsabilizzazione del produttore, chiamato a valutare la sicurezza di ciascun cosmetico prima della sua commercializzazione.

Da una breve analisi della legislazione del settore cosmetico si possono evidenziare alcuni aspetti di particolare rilievo sul tema dei criteri microbiologici. Innanzitutto la Legge 713/1986, riprendendo i principi della Direttiva CEE 76/768/CEE, non attribuisce come carattere essenziale ai prodotti cosmetici la sterilità, ma stabilisce che in essi debba essere limitata la presenza di microrganismi.

Un decreto che è possibile definire collegato ad essa, il DM 9 luglio 1987, n. 328, inerente i criteri di massima in ordine all'idoneità dei locali e delle attrezzature delle officine di produzione dei cosmetici, evidenzia alcuni concetti base inerenti le norme di buona produzione che supportano l'azienda nel gestire la produzione, la conservazione dei prodotti e garantiscono la qualità e la sicurezza, assicurandone i requisiti stabiliti.

In particolare, nel DM n. 328 viene espressamente vietata la contiguità tra gli ambienti produttivi e quelli adibiti alla vendita al dettaglio e sottolinea la necessità che tutte le zone produttive siano costruite in modo da permettere una razionale e corretta pulizia e sanitizzazione.

Gli impianti, i macchinari e le attrezzature devono essere realizzati in modo da garantire il prodotto sotto il profilo sanitario e rendere agevoli le procedure di trattamento igienico. Analogo concetto viene espresso nei confronti di tutti i contenitori di materie prime e di prodotti finiti.

Particolare attenzione viene rivolta all'acqua, materia prima usata nella maggior parte dei prodotti cosmetici. Poiché l'acqua è, nella gran parte dei casi, componente importante di questi prodotti, prima del suo utilizzo ne viene raccomandato il controllo considerando le sue caratteristiche microbiologiche, mentre per gli impianti di deionizzazione, addolcimento e distillazione vengono richiesti opportuni sistemi di abbattimento della carica microbica.

Disposizioni specifiche vengono fornite per gli indumenti di lavoro utilizzati nelle industrie di produzione, per l'ubicazione di servizi igienici e spogliatoi, che devono essere nettamente separati dagli ambienti produttivi, e per quanto riguarda l'eliminazione dei rifiuti solidi e liquidi che devono essere smaltiti in maniera adeguata.

Il Responsabile della produzione è anche tenuto a controllare periodicamente lo stato igienico degli ambienti e delle attrezzature, nonché ad emettere ordini di servizio e a fornire le più corrette e specifiche informazioni sulla produzione in funzione delle diverse caratteristiche chimico-fisiche e microbiologiche del prodotto.

Il decreto n. 328 non rappresenta alcun recepimento di direttive europee, infatti non trova eguali nelle legislazioni degli altri Paesi dell'Unione Europea. Per tornare invece a livello europeo, si deve ricordare che l'art. 8 della Direttiva 76/768/CEE demanda al Comitato scientifico di cosmetologia il compito di determinare i criteri di purezza batteriologica e chimica dei prodotti cosmetici e i relativi metodi di controllo.

Per questo motivo, nel 1977, nell'ambito di un gruppo di lavoro della Commissione CEE fu costituito un "Sottocomitato Microbiologico", composto da rappresentanti governativi, avente il compito di elaborare una proposta che potesse divenire oggetto di direttiva specificatamente dedicata agli aspetti microbiologici.

L'elaborazione di tale direttiva fu in seguito molto contrastata per le divergenti valutazioni all'interno del gruppo di esperti governativi; alcuni di essi ritenevano infatti eccessivo il criterio di istituire un controllo microbiologico obbligatorio per tutti i prodotti cosmetici. Anche per questo motivo, di tale direttiva non venne mai presentata una stesura definitiva.

Invece, nel 1993 la Direttiva 93/35/CE, VI modifica della Direttiva 76/768/CEE, recepita in Italia con il DL.vo 126/1997, ha introdotto l'obbligo, per i produttori, di redigere un "dossier" per ogni prodotto cosmetico immesso sul mercato europeo. In tale dossier viene esplicitamente previsto che, ai fini della sicurezza per l'uso da parte del consumatore, ogni prodotto cosmetico sia valutato da un esperto che deve prendere in considerazione tra gli altri, anche "b) le specifiche fisico-chimiche e microbiologiche delle materie prime e del prodotto finito e i criteri di purezza e i criteri di controllo microbiologico dei prodotti cosmetici" (art. 10-ter Legge 713/1986 e s.m.i.).

Grazie all'introduzione del meccanismo della valutazione della sicurezza, la legislazione europea ha fatto un ulteriore decisivo passo in avanti verso una sempre più efficace protezione del consumatore durante l'utilizzo dei prodotti cosmetici. Anche dal punto di vista microbiologico è questo il criterio oggi in vigore.

Pur nella sua estrema sintesi, la disposizione legislativa consente di evidenziare alcuni aspetti rilevanti.

Per ciascun prodotto cosmetico, al fine della valutazione della sicurezza, devono essere prese in considerazione le specifiche microbiologiche sia del prodotto finito che delle sue materie prime. Allo stesso scopo, devono essere individuati, per ciascun prodotto cosmetico, adeguati criteri di controllo microbiologico. Il legislatore non ha quindi introdotto limiti o criteri obbligatori espliciti in ambito microbiologico, ma ha incaricato il produttore di affrontare la questione con un approccio che si potrebbe definire "caso per caso", da ritagliare su misura per ciascun prodotto cosmetico, sempre con il fine ultimo della sicurezza igienica dell'utilizzatore di quel prodotto.

Questo moderno approccio legislativo presuppone che gli operatori del settore cosmetico, il comparto produttivo come anche gli organi di controllo, siano adeguatamente preparati dal punto di vista tecnico e legislativo, per affrontare valutazioni e analisi in modo corretto e coerente. È in questa ottica che risulta chiara l'importanza di mettere a disposizione di tutti gli operatori del settore metodi analitici solidi e funzionali, in grado di fornire risultati affidabili sui quali fondare le corrette valutazioni sulla sicurezza dei prodotti cosmetici.

È comunque con la Direttiva 2003/15/CE (nota anche come VII Modifica), adottata in Italia con il DL.vo n. 50 del 15 febbraio 2005, che è stato introdotto un nuovo requisito per le etichette dei prodotti cosmetici denominato "Periodo post-apertura" o PaO (dall'inglese *Period after Opening*). Il PaO indica il periodo, successivo al primo utilizzo da parte del consumatore, durante il quale il prodotto, se utilizzato e conservato in modo corretto, può rimanere conforme ai requisiti generali di sicurezza. In questo ambito si tiene conto dei diversi fattori che possono influire sulla qualità microbiologica dei cosmetici dal momento in cui il consumatore "apre" il prodotto.

La cosiddetta Direttiva Cosmetici sarà sostituita comunque dal Regolamento 1223/2009 che, entrato in vigore l'11 gennaio 2010, tuttavia, sta per avere completa ed effettiva applicazione dall'11 luglio 2013.

Questa disposizione normativa, adottata dal Parlamento Europeo e dal Consiglio dell'Unione Europea a marzo del 2009, ha lo scopo di armonizzare gli ordinamenti già esistenti in materia,

introducendo miglioramenti sostanziali e creando un unico strumento giuridico di riferimento per tutti gli Stati appartenenti all'Unione Europea. Consiste essenzialmente in una ricomposizione della Direttiva sui Cosmetici e non introduce modifiche fondamentali nei requisiti informativi sul prodotto previsti dalla Direttiva.

Il Regolamento rappresenta un concreto avanzamento nel campo della sicurezza dei prodotti cosmetici. Infatti, oltre a rendere più stringenti le norme sull'utilizzo di sostanze cancerogene, chiarisce gli aspetti legati alla responsabilità dei produttori, alla tracciabilità dei prodotti e alle attività di controllo e di cosmetovigilanza e introduce nuove disposizioni sul ricorso sicuro ai nanomateriali.

La Legge 713/1986 e s.m.i. continuerà ad avere applicazione solo per le parti non incompatibili con il Regolamento europeo i cui elementi fondamentali riguardano:

- un'ampia definizione di cosmetico, che non ammette categorie intermedie fra cosmetici e farmaci. Una puntualizzazione resa necessaria in considerazione dell'elevato numero di prodotti *borderline* comparsi in questi ultimi anni sul mercato europeo;
- un sistema di controllo *in-market* da parte degli Stati membri e un sistema di "cosmetovigilanza", aperto a tutte le autorità del mercato interno. Le autorità competenti possono inoltre richiedere la formulazione in caso di "fondati dubbi" sulla sicurezza del cosmetico e ritirarlo dal mercato in caso di non conformità ai requisiti del Regolamento;
- la possibilità di identificare la persona, giuridica o fisica, responsabile dell'immissione sul mercato UE del cosmetico. In altre parole, se il prodotto venduto non fosse conforme ai requisiti stabiliti, spetterà a questo soggetto il compito di adottare tutte le misure correttive necessarie, inclusi, la notifica alle autorità competenti e il ritiro dal mercato;
- un sistema che disciplina gli specifici ingredienti attraverso liste positive e negative che comprendono elenchi di sostanze delle quali non è consentito l'uso (circa 1400), 250 tra conservanti, filtri solari e coloranti (liste positive) e circa 200 altre sostanze il cui impiego è limitato;
- l'obbligo per fabbricanti e importatori di prodotti cosmetici di detenere le informazioni relative al prodotto, già istituito dal VI Emendamento alla Direttiva sui Cosmetici (Direttiva 93/35/CEE), introducendo il concetto di "documentazione informativa sul prodotto", ("Product Information File", PIF), necessaria a dimostrare la conformità di un prodotto sulla base di una valutazione della sicurezza che tenga conto di tutti gli aspetti della qualità a garanzia della tutela del consumatore.

Tra le novità importanti, comunque, ne emerge una in particolare: la cosiddetta "notifica online" attraverso la quale, con l'utilizzo di un sistema informatico unico per tutta l'UE, la persona responsabile (il produttore o l'importatore) può inserire i dati sui prodotti in formato elettronico, aggiornandoli quando necessario.

ANALISI MICROBIOLOGICHE DEI PRODOTTI COSMETICI: LINEE GUIDA PER LE BUONE PRATICHE DI LABORATORIO

0. Introduzione

Le indagini microbiologiche presuppongono l'uso di specifiche attrezzature di laboratorio. Di seguito vengono indicate e descritte alcune attrezzature di uso più comune nei laboratori per le analisi microbiologiche dei prodotti cosmetici.

Per l'esecuzione di prove microbiologiche su prodotti cosmetici potrebbe essere opportuno seguire procedure idonee, dettagliate di seguito e riferite alle prescrizioni di carattere generale riportate nella norma UNI ISO 21148.

Per l'organizzazione di un laboratorio di microbiologia è comunque necessario attenersi a quanto definito dal DL.vo 81/2008 e s.m.i. che così stabilisce: "il datore di lavoro adotta idonee misure di contenimento in conformità all'Allegato XLVII".

Per ottenere elevati standard di sicurezza e prevenzione per coloro che lavorano in laboratorio è necessario che gli operatori siano comunque adeguatamente informati sui rischi e sulle corrette modalità di utilizzo delle apparecchiature presenti nel laboratorio, nonché sulle modalità di manipolazione di matrici di diversa natura, sull'uso delle cappe biohazard e dei Dispositivi di Protezione Individuale (DPI). È opportuno anche pianificare un sistema che preveda lo svolgimento di attività di formazione per l'acquisizione delle conoscenze e delle capacità sull'attuale normativa in materia di prevenzione dei rischi derivanti dall'uso di sostanze chimiche, di agenti fisici e di agenti biologici in ambiente laboratoristico, sulle metodologie di valutazione del rischio, sull'uso e sul corretto impiego dei dispositivi di protezione individuale e sulla gestione delle emergenze.

In considerazione del gruppo di appartenenza degli agenti biologici con cui si opera, per uso deliberato o per esposizione potenziale, agli operatori dei laboratori devono essere garantite dal datore di lavoro misure idonee e livelli di contenimento conformi a quanto indicato nell'Allegato XLVII del DL.vo 81/2008 e s.m.i., fatto salvo quanto specificatamente previsto dall'Allegato XLVI, punto 6.

Pertanto, le caratteristiche strutturali per i laboratori di base, dove si fa uso di materiali con possibile contaminazione da agenti patogeni per l'uomo, devono essere tali da assicurare spazi interni tali da garantire gli spostamenti e le attività in sicurezza, evitando possibili scontri accidentali contro le apparecchiature o tra gli operatori. Quindi, prima dell'acquisto di qualsiasi apparecchiatura per il laboratorio è necessario sia definito, all'interno dei locali, il posizionamento della strumentazione da acquistare. Dovrà essere pertanto valutato che lo spazio e la collocazione assegnati allo strumento siano idonei per l'esecuzione delle Procedure Operative Standard; le condizioni ambientali (temperatura, umidità, insolazione) e al contorno (es. presenza di vibrazioni) siano adeguate e siano rispettate le norme di sicurezza sia in rapporto ad eventuali rischi ambientali (diffusione di bioaerosol e polveri, di sostanze tossiche), sia in relazione alle strutture e agli impianti.

Quando si eseguono le analisi microbiologiche per i prodotti cosmetici, è di particolare importanza che:

- siano isolati o enumerati solo i microrganismi presenti nei campioni;
- i microrganismi non contaminino l'ambiente (aria, superfici).

Per conseguire questo obiettivo, è necessario dedicare attenzione all'igiene personale e utilizzare tecniche di lavoro che garantiscano, per quanto possibile, l'esclusione di contaminazione estranea.

Pertanto, nel presente capitolo è possibile fornire solo alcuni esempi delle precauzioni da assumere durante le analisi microbiologiche.

Per lo svolgimento di analisi microbiologiche è essenziale una conoscenza completa delle tecniche microbiologiche e dei microrganismi di interesse. È importante che le analisi, dal campionamento all'ottenimento dei risultati, siano condotte con la maggiore accuratezza possibile e l'esperienza nel campo dell'analisi microbiologica risulta fondamentale.

È necessario assumere precauzioni speciali non solo per motivi di igiene, ma anche per garantire la riproducibilità dei risultati. Non è possibile specificare tutte le precauzioni da prendere in tutte le circostanze, ma il presente capitolo fornisce almeno le principali misure da assumere per la preparazione, sterilizzazione e conservazione dei terreni e per l'utilizzo delle apparecchiature.

Le procedure analitiche sono descritte nei singoli metodi. Possono essere utilizzati altri procedimenti microbiologici alternativi, purché adeguati alla matrice da analizzare, la loro equivalenza sia stata dimostrata o il metodo sia stato altrimenti considerato idoneo.

1. Ambienti di lavoro

Le condizioni ambientali dei locali dove vengono effettuate determinazioni microbiologiche devono essere tali da non invalidare i risultati, né influenzare l'incertezza di misura e garantire la sicurezza degli operatori.

Per produrre risultati di qualità servono presupposti adeguati. Un'organizzazione idonea del laboratorio, la sua collocazione, le condizioni strutturali e ambientali, esterne e interne possono avere influenza sul personale, sul funzionamento delle attrezzature e anche sull'efficienza e l'efficacia del programma di assicurazione di qualità.

I requisiti di base che dovrebbe possedere un laboratorio e il suo ambiente per essere in grado di produrre risultati di qualità schematicamente dovrebbero basarsi su:

- spazio sufficiente;
- disposizione concepita per l'efficienza;
- spazio sufficiente per le attrezzature;
- ufficio per il personale amministrativo;
- guardaroba per tutto il personale;
- depositi per i campioni, le attrezzature, i reagenti e la vetreria.

Le funzioni di base del laboratorio dovrebbero svolgersi preferibilmente in aree separate o in parti definite della zona principale del laboratorio, distinguendo le zone in base alle operazioni da svolgere:

- ricevimento, conservazione, preparazione e trattamento dei campioni;
- preparazione e sterilizzazione dei terreni colturali, dell'attrezzatura e della vetreria;
- esecuzione delle analisi: pesatura, diluizioni, inoculi, subcolture, incubazione, mantenimenti dei ceppi, ecc.;
- decontaminazione e pulizia dell'apparecchiatura, della vetreria e trattamento dei rifiuti derivati dall'analisi.

In condizioni ideali, un laboratorio di microbiologia dovrebbe comporsi di una serie di aree separate; in alternativa è comunque necessario che lo svolgimento del lavoro sia tale da distinguere le zone 'pulite' da quelle 'sporche'.

Si deve avere cura di ubicare i locali in modo da evitare il rischio di contaminazione crociata.

Dovrà essere garantita la sicurezza del personale. A tale scopo è opportuno tenere in considerazione quanto indicato dal DL.vo 81/2008 e s.m.i dove viene fatto riferimento anche alle misure da applicare all'interno dei laboratori di microbiologia in funzione della natura degli agenti biologici da ricercare o trattare al fine di valutare i rischi per i lavoratori.

Pertanto, il datore di lavoro dovrà assicurare che l'uso di agenti biologici sia eseguito in aree di lavoro corrispondenti almeno al secondo livello di contenimento (per agenti biologici del gruppo 2); in aree di lavoro corrispondenti almeno al terzo livello di contenimento (per agenti biologici del gruppo 3); in aree di lavoro corrispondenti almeno al quarto livello di contenimento (per agenti biologici del gruppo 4).

Nei laboratori potenzialmente esposti a contaminazione da agenti biologici patogeni il datore di lavoro deve adottare misure corrispondenti almeno a quelle del secondo livello di contenimento. In Tabella 1 sono richiamati i rapporti tra gruppi di rischio e livelli, operazioni e attrezzature di sicurezza.

Tabella 1. Relazione fra gruppi di rischio e livelli, operazioni e attrezzature di sicurezza per i laboratorio di analisi microbiologica

Gruppo di rischio	Livello di biosicurezza	Esempi di laboratori	Operazioni di laboratorio	Attrezzature di sicurezza
1	di base (livello 1)	di base	BTM ^a	Nessuna; si lavora su normali banconi
2	di base (livello 2)	servizi sanitari primari; ospedali di livello primario; laboratori di analisi	BTM più indumenti protettivi; simbolo del rischio biologico sulla porta	Normali banconi più CSB ^b per eventuali aerosol
3	di sicurezza (livello 3)	diagnostica speciale	come per il livello 2 più indumenti speciali, accesso controllato, flusso d'aria controllato	CSB e/o altri mezzi primari di contenimento per tutte le attività
4	di massima sicurezza (livello 4)	unità di lavoro con patogeni pericolosi	come per il livello 3 più ingressi con camera stagna, doccia obbligatoria all'uscita, precauzioni speciali per l'eliminazione dei rifiuti	CSB classe III o tute pressurizzate, autoclavi a doppia apertura, aria filtrata

^a BTM, buona tecnica microbiologica

^b CSB, cappa di sicurezza biologica

I laboratori microbiologici devono essere considerati ambienti contaminati e il sistema di ventilazione dovrebbe essere concepito in modo da evitare il passaggio dell'aria dai laboratori alle sale attigue. Qualora all'interno dei locali debba essere mantenuto un certo livello di temperatura, umidità e aerazione (ricambio d'aria), dovranno essere installati idonei sistemi di condizionamento e filtrazione dell'aria che non dovranno creare interferenze con l'esecuzione delle prove e compromettere l'attendibilità dei risultati.

I terreni di coltura, i prodotti chimici e i reattivi dovranno essere stoccati in armadi di sicurezza e in zone protette dalla luce diretta del sole per non alterarne le prestazioni.

I locali dovranno essere protetti da condizioni ambientali anomale quali umidità, polvere, temperature elevate, vibrazioni ed esposizione a luce solare diretta.

I locali dovranno essere tenuti chiusi durante l'esecuzione delle prove e ne dovrà essere vietato l'accesso a persone non autorizzate, in modo particolare minori. In tutti i locali del

laboratorio sarà tassativamente vietato fumare e, tramite opportune segnalazioni dovranno essere elencate le generali norme di igiene e di buon comportamento.

Tutte le apparecchiature e le sorgenti di alimentazione dovranno essere adatte all'uso e l'adeguamento a particolari condizioni ambientali dovrà essere sottoposto a controllo.

Il monitoraggio biologico degli ambienti costituisce un punto basilare per avere la garanzia di operare in locali dove le prove non vengono influenzate da inquinamenti indipendenti dalla natura del materiale in esame.

Banconi, muri e pavimenti dovranno essere lisci, facili da pulire e disinfettare e adattabili a facili manutenzioni e riparazioni. I banconi dovranno essere attrezzati in modo idoneo con gas, dispositivi di scarico, elettricità, acqua distillata e rubinetti di acqua fredda e calda.

Periodicamente, per le superfici di lavoro, si consiglia di effettuare, tramite l'uso di piastre a contatto, la determinazione della carica microbica, di muffe e lieviti dopo l'attività lavorativa e dopo la disinfezione per controllare l'efficienza della pulizia. Allo stesso modo si potranno applicare gli stessi controlli a termostati, frigoriferi e cappe e in casi di contaminazione si potrà procedere alla sanitizzazione. Tutte le operazioni di pulizia, disinfezione e sanitizzazione dovranno essere monitorate con idonei sistemi di controllo da porre in atto all'interno del laboratorio; di ogni operazione dovrà essere necessario tenere apposita registrazione.

Le frequenze dei controlli saranno definite all'interno di ogni laboratorio in funzione dell'effettivo carico inquinante gravitante sul laboratorio stesso.

Per il controllo dell'aria ambiente e dell'aria della cappa a flusso laminare si potranno utilizzare campionatori meccanici o l'eseguire l'analisi qualitativa gravitazionale con capsule contenenti terreni colturali lasciate aperte per un certo intervallo di tempo.

Nel caso i controlli e i processi di sanitizzazione non abbiano frequenze molto elevate, generalmente potranno essere mensili o semestrali, è bene, per dimostrare che le prove non vengono influenzate da eventuali inquinamenti ambientali, porre, ad ogni ciclo di determinazioni, una capsula di terreno colturale non seminato (bianco) che segua il normale ciclo lavorativo e che non dovrà presentare alcuna crescita alla fine del ciclo stesso.

2. Apparecchiature e attrezzature di base

2.1. Generalità

Le apparecchiature di prova in dotazione ad un laboratorio di microbiologia devono garantire affidabilità di funzionamento e di risposta in modo da non alterare l'accuratezza e la precisione del risultato finale della prova. Pertanto dovranno essere sempre tenute in perfetta efficienza e installate in locali che garantiscano una adeguata protezione dal deterioramento; l'efficienza dovrà essere garantita con opportune procedure per la manutenzione e la taratura.

Di seguito, per opportuna conoscenza, vengono riportate le definizioni di manutenzione ordinaria, straordinaria, programmata e di taratura.

- *Manutenzione ordinaria*
operazioni che devono essere messe in atto dall'operatore al momento dell'uso per garantire il buon funzionamento dell'apparecchiatura.
- *Manutenzione programmata*
intervento che viene effettuato a tempi prefissati per evitare decadimenti nel buon funzionamento dell'apparecchiatura. Questi interventi sono normalmente affidati alla ditta fornitrice con la quale si dovrebbe stipulare un contratto di manutenzione annuale.

- *Manutenzione straordinaria*
intervento effettuato dopo il verificarsi di guasti o malfunzionamenti. Questo tipo di interventi vengono effettuati su specifica richiesta e vengono eseguiti normalmente da un tecnico specializzato della ditta fornitrice dopo che l'operatore ha verificato l'anomalia di comportamento.
- *Taratura*
operazione atta a garantire che l'apparecchio e lo strumento in uso siano in grado di fornire misure entro i limiti di tolleranza previsti dal capitolato d'acquisto. In senso stretto, la definizione si addice maggiormente a quelle apparecchiature che possono fare riferimento a strumenti campioni primari; per le altre può essere intesa come insieme di operazioni finalizzate al controllo del buon funzionamento dell'apparecchiatura.

Nell'ambito dei controlli da effettuarsi in laboratorio, sarà opportuno prevedere quindi:

- modalità di taratura e manutenzione;
- loro frequenza;
- personale responsabile delle verifiche.

Per ogni apparecchiatura dovrà essere prevista un'apposita "Scheda" che dovrà riportare tutte le informazioni utili sulla provenienza, l'acquisto, l'installazione, il collaudo, le date di ricevimento e messa in funzione, i riferimenti alle procedure di taratura e manutenzione quando necessari, la loro periodicità e i dati del fornitore e dell'assistenza tecnica.

Dovrà essere predisposta inoltre una "Scheda di Manutenzione" che riporti tutte le operazioni effettuate relative alla verifica, alle sostituzioni, alla pulizia con la data di svolgimento dell'operazione e la firma del tecnico che l'ha effettuata.

Dovrà essere prevista inoltre una "Scheda di Taratura" su cui verrà riportato il riferimento alla procedura di taratura, il programma di taratura, la data di svolgimento della stessa e della futura taratura, la firma del tecnico e i riferimenti ai campioni primari o materiali di riferimento utilizzati per il controllo. Qualora la taratura venga attuata da un centro esterno dovrà essere riportata tutta la documentazione inerente.

Un'apparecchiatura che, a seguito di taratura, abbia rilevato una non idoneità al suo utilizzo, dovrà essere messa fuori servizio. L'evento dovrà essere segnalato apponendo un'etichetta visibile sull'apparecchiatura con la dicitura "Fuori Servizio" e la data in cui l'evento è stato rilevato. L'apparecchiatura non potrà essere in nessun modo utilizzata fino a quando la riparazione o la taratura di nuovo effettuata non dimostrino che è di nuovo funzionante. L'evento dovrà essere riportato sulla scheda di taratura.

Di seguito sono elencate le principali apparecchiature di un laboratorio di microbiologia dove vengono effettuati controlli di prodotti cosmetici; sono anche descritte le operazioni di base di manutenzione e taratura cui sottoporre le apparecchiature.

2.2. Apparecchi per sterilizzazione

2.2.1. Autoclavi

La sterilizzazione a vapore saturo sotto pressione (per terreni di coltura, vetreria, attrezzature filtranti, ecc.) richiede l'impiego di autoclavi di capacità adeguate al materiale da sterilizzare che non dovrà essere eccessivamente ammassato. La sterilizzazione di norma si effettua alla temperatura di $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ con una atmosfera di pressione per un tempo di 15 minuti.

Per il corretto uso dell'autoclave attenersi scrupolosamente alle indicazioni del costruttore. L'autoclave non deve essere utilizzata contemporaneamente per sterilizzare i materiali puliti e

decontaminare i materiali usati. Quando possibile, per questi due processi si dovrebbero utilizzare autoclavi separate.

L'autoclave va mantenuta in perfette condizioni operative. I controlli dello stato di sicurezza devono essere effettuati secondo le disposizioni legislative vigenti.

La taratura va effettuata almeno con frequenza annuale controllando la correlazione tra pressione e temperatura tramite un manometro campione certificato oppure va fatta effettuare da ditte specializzate che rilascino idoneo documento di avvenuta taratura.

In ogni caso è bene effettuare le operazioni di manutenzione di seguito indicate.

- *Verifica dell'efficienza del termometro nelle condizioni operative*
Impostare la temperatura e il tempo di durata dei cicli richiesti e controllare che, quando l'autoclave è in pressione, il valore di temperatura sia conforme a quello riportato sulla tabella di correlazione pressione/temperatura del vapore saturo.
- *Verifica dell'efficienza del blocco del portello nelle condizioni di esercizio*
Controllare che, quando è in corso il ciclo di sterilizzazione, il dispositivo di blocco del portello rimanga bloccato e il portello non si apra.
- *Verifica del livello dell'acqua*
Prima dell'avvio di un ciclo di sterilizzazione controllare che il livello dell'acqua nell'autoclave sia compreso fra l'indice minimo e il massimo riportati sull'indicatore di livello.
- *Verifica funzionale dello sfiato*
Mentre l'autoclave raggiunge la pressione di esercizio, verificare la tenuta delle valvole manuali di sfiato.
- *Verifica dello stato di conservazione della guarnizione del portello*
Verificare che non vi siano rotture, scorie o frammenti; lubrificare con grasso al silicone, evitare l'uso di prodotti chimici.
- *Verifica dell'efficienza della valvola di sicurezza*
Impostare un valore di pressione superiore al valore indicato dall'indice rosso sul manometro e controllare che, prima di raggiungere tale valore, la valvola di sicurezza cominci a sfiatare.
- *Controllo del dispositivo elettronico di livello*
Mentre l'autoclave è in funzione, scaricare lentamente l'acqua aprendo il rubinetto di scarico e verificare che raggiunto il livello minimo intervenga l'allarme e si accenda la spia di segnalazione.
- *Ispezione della camera*
Ispezionare l'interno della camera e del portello dell'autoclave per controllarne lo stato di conservazione; pulire le superfici interne con detergente idoneo per superfici in acciaio rimuovendo eventuali residui e incrostazioni;
- *Controllo dell'efficienza dei processi di sterilizzazione.*
Utilizzare indicatori biologici come strisce o ampole di spore di *Bacillus stearothermophilus* normalmente disponibili in commercio. Si consiglia di effettuare questo controllo con frequenza almeno mensile.

2.2.2. Lampade a raggi UV

I sistemi di sterilizzazione con raggi ultravioletti (UV) sono particolarmente idonei per la sterilizzazione dell'ambiente sotto cappa o per piccoli locali. È da tenere presente che la vita media di una lampada a UV è di circa 5000 ore e che comunque è necessario effettuare, per mantenerne l'efficacia, una sua manutenzione periodica (pulizia con eliminazione della polvere, ecc.).

Per l'individuazione di alcuni microrganismi cresciuti in brodi o su terreni di coltura si ricorre, in alcuni casi, all'uso di una speciale lampada a raggi ultravioletti, la lampada di Wood, che permette di evidenziare la presenza dei microrganismi specifici che, ad una determinata lunghezza d'onda, fluorescono.

L'uso di lampade a raggi ultravioletti richiede particolari precauzioni per evitare danni agli occhi e alla pelle degli operatori (usare DPI).

2.2.3. Stufe a secco

Le stufe devono consentire il raggiungimento della temperatura di $(170 \pm 10)^\circ\text{C}$ per circa 2 ore. È necessario che siano corredate di un termometro a gambo lungo, di precisione accettabile nell'intervallo fra 160°C e 180°C e di un idoneo sistema di termoregolazione. È altresì opportuno che siano fornite di un sistema di interruttore a tempo che consenta di programmare il tempo di sterilizzazione. Per il corretto uso delle stufe attenersi scrupolosamente alle indicazioni del costruttore e prevedere l'esecuzione di controlli periodici da parte di ditte specializzate.

2.3. Attrezzature per l'incubazione

2.3.1. Armadi termostatici, camere termostatiche e termostati

Questi apparecchi dovranno garantire la stabilità della temperatura d'incubazione prefissata e assicurare nei vari scomparti una temperatura costante, entro limiti di variazione non eccedenti $\pm 1^\circ\text{C}$. Sia gli armadi termostatici che le camere termostatiche e i termostati dovranno essere muniti di un doppio sistema di termoregolazione, uno per il mantenimento della temperatura di esercizio e l'altro regolato ad una temperatura lievemente superiore (temperatura massima di sicurezza) che non dovrà mai essere superata. Quando viene impostata una temperatura è assolutamente preferibile mantenerla fissa e non modificarla per evitare squilibri nell'impostazione.

Di norma vengono utilizzati incubatori regolabili, a temperatura variabile da quella ambiente a 80°C . Per temperature intorno ai 20°C sono comunque da utilizzare frigotermostati. Essi devono garantire la temperatura di incubazione prevista dal metodo analitico.

Per il controllo visivo della temperatura, è opportuno che queste apparecchiature siano provviste di termometri con una scala che consenta la lettura di 1°C , o di un display e, possibilmente, di un sistema termometrico di registrazione.

Gli armadi termostatici di notevoli dimensioni e le camere termostatiche dovranno essere muniti di un idoneo sistema di circolazione dell'aria che consenta il mantenimento della temperatura richiesta in tutti i punti del vano.

È altresì opportuno che queste apparecchiature siano dotate di un sistema che consenta il mantenimento di un livello di umidità compreso fra il 75 e l'80%. Ciò può essere ottenuto anche con un recipiente contenente acqua, collocato sul fondo.

Il materiale posto ad incubare dovrà essere disposto in modo da consentire la circolazione del calore e non essere eccessivamente ammassato.

La normale manutenzione prevede pulizia, decontaminazione e rimozione della polvere dal sistema di ventilazione. Occorre inoltre controllare giornalmente la temperatura dell'incubatore con un termometro il cui bulbo sia immerso in glicerolo contenuto in una bottiglia sigillata, oppure, qualora ne siano dotati, controllando la temperatura indicata dal termometro permanente installato sull'apparecchiatura. La deviazione tra la temperatura impostata e quella rilevata non dovrà essere superiore a $\pm 1^\circ\text{C}$ per i termostati/frigotermostati impostati a 20°C , a 36°C e a 44°C .

Per la taratura, e quindi per il controllo del termometro permanente, utilizzare un termometro di riferimento certificato (fatto tarare annualmente) inserito nella camera del termostato e registrare i valori di temperatura per un intervallo di tempo di almeno 4 ore con frequenze di 30 minuti avendo cura di non aprire lo sportello del termostato durante l'esecuzione del controllo.

È bene annotare gli esiti del controllo di taratura su apposito registro, riportando per ogni rilevamento:

- l'ora in cui il rilevamento è stato effettuato;
- il valore di temperatura letto sul termometro campione di riferimento;
- il valore di temperatura letto sul termometro permanente installato sull'apparecchiatura;
- la deviazione evidenziata;
- la deviazione massima ammissibile;
- la data di effettuazione, la data del successivo controllo di taratura e la firma di chi l'ha effettuata.

2.3.2. Bagni termostatici

I bagni termostatici sono di due tipi:

- bagni controllati termostaticamente, idonei per l'incubazione dei terreni colturali inoculati, per le prove di identificazione, ecc.;
- bagnomaria a temperatura controllata per il mantenimento dei terreni di agar sterili allo stato fuso da utilizzarsi successivamente nei procedimenti specificati.

Dovranno garantire la stabilità della temperatura d'incubazione prefissata ed essere provvisti di un doppio sistema di controllo della temperatura costituito da un sistema di esercizio e l'altro regolato ad una temperatura superiore (temperatura di sicurezza) che non dovrà mai essere superata. Dovranno inoltre essere provvisti di termometri per il controllo visivo della temperatura e possibilmente di un sistema termometrico di registrazione ed eventualmente di un idoneo sistema di agitazione dell'acqua. Per il loro riempimento è necessario utilizzare acqua distillata che deve essere comunque rinnovata regolarmente. Per evitare fenomeni di corrosione è opportuno utilizzare filiere o idonei cestelli di acciaio inossidabile o di materiale plastico idoneo. L'eventuale sviluppo di alghe o di funghi nell'acqua deve essere eliminato con soluzioni di composti ammoniacali quaternari da fare agire per circa 24 ore, provvedendo poi allo svuotamento, risciacquo e successivo riempimento con acqua distillata.

Per una buona manutenzione controllare periodicamente i termometri permanenti installati confrontandoli con un termometro campione di riferimento certificato usando la stessa procedura indicata nel caso degli incubatori. Tenere anche per questi apposita registrazione.

2.4. Bilance

In laboratori attrezzati per l'esecuzione di indagini microbiologiche può essere sufficiente disporre di bilance che permettono di pesare quantità intorno a 150 g con sensibilità di $\pm 0,1$ g.

Per la pesata di additivi, reagenti, coloranti ecc., è necessario disporre di una bilancia analitica con una sensibilità di $\pm 0,1$ mg.

Le bilance dovranno essere collocate su supporti stabili anti-vibrazioni e controllate che siano a bolla. Per la manutenzione si richiede una pulizia periodica.

Per quanto riguarda il controllo, si utilizzano campioni di riferimento da confrontare almeno con frequenza annuale con campioni di riferimento primari. Almeno una volta l'anno è opportuno fare effettuare una taratura con materiale certificato verificando l'intervallo di misura completo della bilancia da personale qualificato o da un ente esterno che rilasci un certificato di taratura.

2.5. Cappe per la sicurezza biologica

La maggior parte delle attività di laboratorio, quali la miscelazione, la sonicazione, la frantumazione, l'agitazione, lo scuotimento di materiale infetto, come anche l'isolamento da brodi di coltura, possono inavvertitamente generare bioaerosol pericolosi la cui formazione e dispersione deve essere ridotta al minimo.

È pertanto buona norma, per garantire la qualità del dato analitico e la protezione dell'operatore, eseguire queste operazioni in una cappa di sicurezza biologica di tipo appropriato.

Esistono tre tipi di cappe di sicurezza biologica: classe I, II, e III (Tabella 2). La loro efficacia dipende dal flusso dell'aria, dalla capacità di contenimento, dall'integrità dei filtri HEPA (*High Efficiency Particulate Air*) e, nel caso delle cappe I e II, dalla loro posizione nella stanza in relazione alle correnti di aria e ai movimenti del personale (vanno poste lontano dalle zone di passaggio e da correnti d'aria provenienti da porte, finestre e dall'impianto di aerazione).

Tabella 2. Caratteristiche delle cappe per la sicurezza biologica

Classe	Aria in ricircolo %	Caratteristiche	Impieghi	Protezione		
				operatore	ambiente	campione
I		apertura frontale, aria esterna dall'apertura frontale, filtro HEPA sull'aria in uscita	basso rischio; microrganismi di gruppo 1-2	buono	ottimo	scarso
II A	70	apertura frontale con ingresso dell'aria, flusso laminare verticale, filtro HEPA sull'aria in ingresso e uscita, se sostanze mutagene, cancerogene, radioattive l'aria espulsa deve essere convogliata all'esterno	medio rischio; microrganismi di gruppo 2-3	buona	ottima	ottima
II B 1	30					
II B 2	0					
III		chiusura ermetica, a pressione negativa, accesso consentito da guanti; filtro HEPA sull'aria in ingresso, doppio filtro HEPA sull'aria in uscita	alto rischio; microrganismi di gruppo 4	ottima	ottima	buona

Di norma, per eseguire analisi microbiologiche ambientali che prevedano la ricerca di microrganismi a rischio basso o moderato (gruppi di rischio 1 e 2) vengono utilizzate cappe a flusso laminare di classe I o II.

La cappa di sicurezza biologica classe I è una cappa ventilata aperta frontalmente progettata per la protezione dell'operatore, tramite un flusso d'aria entrante che non viene rimandata in circolo. Non proteggono dalla contaminazione i materiali all'interno della cappa (la sterilità non è quindi garantita). È dotata di un filtro HEPA allo scarico per proteggere l'ambiente dalla fuoriuscita di microrganismi

La cappa di sicurezza biologica classe II è una cappa ventilata aperta frontalmente progettata per la protezione dell'operatore, dei prodotti al suo interno e dell'ambiente circostante. Il flusso laminare è comune a tutte le cappe di classe II mentre in base alla percentuale di aria riciclata e alla velocità dell'aria le cappe di classe II sono suddivise in diversi tipi. Questi tipi di cappa sono utilizzabile per eseguire analisi microbiologiche ambientali che prevedano la ricerca di microrganismi a rischio medio (gruppi di rischio 2 e 3). È caratterizzata da un flusso d'aria in ingresso e con filtrazione sia dell'aria aspirata sia di quella espulsa: il flusso laminare, proveniente dal filtro HEPA, scende perpendicolarmente al piano di lavoro evitando di investire l'operatore, l'aria espulsa deve essere filtrata da un secondo filtro HEPA e, se ricircolata nello stesso locale, da un filtro supplementare a carbone attivo posto a valle del filtro HEPA, per trattenere eventuali frazioni gassose.

Esistono anche cappe di sicurezza biologica classe III, ventilate e totalmente chiuse, a tenuta d'aria e pressione negativa. L'aria in ingresso passa per un filtro HEPA e quella in uscita passa per due filtri HEPA posti in serie. L'attività analitica all'interno di essa viene svolta con guanti a manica in gomma attaccati alla cappa. Sono usate per lavorare con agenti biologici ad alto rischio (gruppo di rischio 4) e forniscono una barriera totale tra l'operatore e il lavoro. Nelle cappe classe III non vanno usati gas infiammabili.

Le cappe di sicurezza biologica non proteggono le mani dell'operatore in caso di versamenti, punture, tagli o cattiva tecnica di lavoro

Per le cappe a flusso laminare le normali operazioni di manutenzione consistono nella sostituzione dei prefiltri secondo le indicazioni della ditta costruttrice, nella pulizia/disinfezione delle superfici interne con opportuni disinfettanti e nel controllo dell'efficienza dei filtri. Se le cappe sono dotate di sistema a lampade a raggi ultravioletti, è necessario predisporre cicli di accensione a cappa chiusa con successiva attivazione del flusso per garantire l'allontanamento dell'ozono presente in atmosfera.

Verificare periodicamente la presenza di microrganismi nell'aria filtrata esponendo per 30 minuti capsule di Petri aperte contenenti terreni colturali agarizzati per la crescita degli eterotrofi e dei miceti, disposte in punti rappresentativi della superficie di lavoro o, in alternativa, usare contatori di particelle.

2.6. Dispensatori

Si intendono quelle apparecchiature utilizzate per distribuire terreni di coltura e reagenti in provette, bottiglie o capsule di Petri.

È opportuno controllare l'accuratezza dei volumi dispensati e, nel caso si debbano distribuire reagenti o terreni sterili, è opportuno controllare che le parti dell'apparecchio in contatto con essi siano in condizioni asettiche.

Mantenere le apparecchiature in perfette condizioni mediante accurata pulizia dopo ogni ciclo lavorativo, in accordo alle indicazioni della ditta costruttrice.

2.7. Frigoriferi, celle frigorifere, congelatori

Frigoriferi e congelatori devono avere un dispositivo di rilevazione della temperatura e impiegare per il controllo interno un termometro a minima e a massima oppure un termometro con bulbo immerso in glicerolo.

I frigoriferi devono assicurare una temperatura di $(5 \pm 3)^{\circ}\text{C}$ e i congelatori da utilizzare possono essere quelli che raggiungono temperature di $(-20 \pm 3)^{\circ}\text{C}$ e $(-70 \pm 3)^{\circ}\text{C}$.

I frigoriferi e le celle frigorifere devono essere caricati in modo che l'aria circoli liberamente, e i congelatori caricati con accortezza in modo da mantenere all'interno una temperatura bassa.

Laddove è possibile, frigoriferi, termostati e congelatori dovrebbero essere messi sotto gruppo di continuità; in caso contrario sarebbe necessario predisporre sistemi che evidenzino le eventuali anomalie dovute al conseguente rialzo termico.

È opportuno tenere nettamente separati, all'interno dei frigoriferi, terreni di coltura e reagenti non inoculati da campioni da analizzare, ceppi di microrganismi e terreni inoculati.

Devono essere effettuate con cadenza periodica operazioni che prevedano:

- rimozione della polvere dalle piastre esterne di aerazione;
- sbrinamento;
- pulizia e decontaminazione dell'interno delle celle, dei frigoriferi e dei congelatori.

Controllare periodicamente i termometri permanenti installati su frigoriferi e congelatori confrontandoli con un termometro campione di riferimento certificato e usando la stessa procedura indicata nel caso degli incubatori. Tenere anche per questi apposita registrazione.

2.8. Membrane filtranti e apparecchiature per filtrazione

2.8.1. Apparecchiatura per la filtrazione

Nel caso venga utilizzato il metodo di filtrazione su membrana per l'esame batteriologico di prodotti cosmetici, deve essere usato un sistema di filtrazione su membrana o un'apparecchiatura di filtrazione costruita con materiale idoneo, con un portafiltro di almeno 50 mL. Dette apparecchiature devono essere adatte per l'impiego di membrane filtranti del diametro di 47-50 mm. Sono costituite da una rampa con supporti e contenitori che possono essere in acciaio inossidabile, vetro, policarbonato o polipropilene. Possono essere impiegate apparecchiature singole o in serie, utilizzando, come sistema aspirante, una pompa da vuoto azionata elettricamente o una pompa ad acqua in grado di fornire una portata di filtrazione uniforme (il dispositivo deve essere impostato in modo da ottenere la filtrazione di 100 mL di liquido in meno di 2 min). È essenziale che fra sistema filtrante e sistema aspirante sia interposto un idoneo sistema per la raccolta dell'acqua filtrata.

I supporti e i contenitori devono essere sterilizzati in autoclave a $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ per 15 minuti, dopo accurato lavaggio e asciugatura e prima della sterilizzazione devono essere avvolti in carta idonea per mantenere la sterilità durante la conservazione prima dell'uso. Possono essere utilizzati entro due settimane dalla sterilizzazione, se conservati in condizioni ottimali. Nel caso in cui vengano usati, durante la procedura di filtrazione, gli stessi contenitori, va da sé che, tra una filtrazione e l'altra, vadano sterilizzati in maniera rapida, ma efficace.

2.8.2. Membrane filtranti

Le membrane filtranti per uso batteriologico sono generalmente costituite da dischi di esteri di cellulosa con pori uniformemente distribuiti; sono comunque utilizzate, per situazioni particolari, anche membrane di nylon e policarbonato. Il tipo di materiale della membrana è scelto in modo tale che i batteri non siano influenzati dai componenti residui del campione da esaminare. Generalmente per le analisi microbiologiche si utilizzano membrane con pori aventi un diametro nominale di $0,45 \mu\text{m}$ ($\pm 0,02 \mu\text{m}$) (pori simmetrici da $0,45 \mu\text{m}$ oppure pori asimmetrici da $0,2-0,7 \mu\text{m}$). Le membrane, a causa della loro porosità hanno la capacità di trattenere sulla loro superficie, all'atto della filtrazione, i microrganismi contenuti nel campione che svilupperanno colonie sulla superficie della membrana, dopo un idoneo periodo di incubazione, per passaggio per capillarità dei principi del terreno colturale.

Esistono in commercio membrane filtranti di vario diametro. Per l'esame batteriologico dei prodotti cosmetici vengono normalmente utilizzate membrane del diametro di 47-50 mm.

In commercio si trovano confezioni già sterili pronte per l'uso, in genere sterilizzate con raggi gamma o con ossido di etilene.

Le membrane si differenziano a seconda della ditta di produzione. Problemi si possono verificare in relazione al tipo di membrane utilizzate: inibizione batterica in corrispondenza della linea del reticolo, sciamatura delle colonie, crescita lungo la linea del reticolo, presenza di zone idrofobiche. Per evitare, pertanto, l'uso di membrane non idonee, sarebbe consigliabile verificarne l'efficienza prima delle analisi.

È preferibile utilizzare membrane sterili confezionate singolarmente o in nastri, purché sigillate e certificate dalla ditta produttrice. Registrare la data di ricevimento e il numero di ogni lotto di membrane acquistate e verificare la capacità di sviluppo di colonie.

2.9. Microscopio ottico

Per le normali procedure di analisi microbiologica (es. colorazione di Gram) è sufficiente disporre di un microscopio ottico con obiettivi 10, 40 e 100x, vetrini portaoggetti e coprioggetti e olio ad immersione. Dopo ogni utilizzo rimuovere il residuo di olio sulle lenti con carta ottica. Quando non in uso, il microscopio va tenuto coperto e al riparo dalla luce, per evitare danni alle lenti.

Microscopi con caratteristiche particolari (a epifluorescenza, stereomicroscopio) possono essere utilizzati per specifiche attività analitiche.

È opportuno collocare i microscopi in posizione stabile. Per il microscopio ottico si consiglia la dotazione di un sistema per l'osservazione in contrasto di fase e di una serie di obiettivi, in modo da coprire un intervallo di ingrandimenti sufficientemente elevato, e di sistemi per la regolazione dell'intensità luminosa.

La manutenzione consiste nella rimozione sia della polvere dagli oculari e dagli obiettivi usando cartine ottiche sia, dopo l'uso, di tracce di olio dagli obiettivi usati per immersione. Controllare saltuariamente la lubrificazione delle parti mobili e sostituire la lampada di illuminazione, quando necessario, seguendo le istruzioni della ditta costruttrice.

2.10. Misuratori di pH

Il pH dei terreni di coltura e delle soluzioni può essere determinato per via colorimetrica con l'uso di appropriati indicatori (quando non vi siano interferenze provocate dal colore del terreno) effettuando la lettura con l'impiego di comparatori muniti degli appositi dischi o con altro dispositivo appropriato. Tuttavia, le determinazioni possono essere effettuate con più precisione e spediteamente per via potenziometrica con l'uso di piaccametri che devono avere una precisione di misura di $\pm 0,2$ unità di pH a 20°C con soglia di misurazione minima di 0,01 unità di pH.

Gli elettrodi del pHmetro devono essere condizionati e conservati secondo le istruzioni del costruttore. Dopo ogni uso devono essere puliti con acqua distillata.

La taratura va effettuata periodicamente utilizzando soluzioni tampone di riferimento (ad es., pH 4 e pH 7 a 20°C). Le soluzioni vanno conservate nelle migliori condizioni e non oltre la data di scadenza. Le aliquote giornaliere utilizzate devono poi essere scartate dopo la taratura.

Va inoltre controllato periodicamente lo stato di efficienza degli elettrodi registrando i valori in mV in corrispondenza delle tarature a pH 4 e pH 7. La differenza tra due misurazioni in rapporto al valore teorico indicato dal costruttore rappresenta un indice di invecchiamento dell'elettrodo.

2.11. Omogeneizzatore

Questa apparecchiatura (es. miscelatore, Stomacher, ecc.) può essere utilizzata per preparare la sospensione iniziale dai campioni di prova di prodotti solidi o semisolidi.

2.12. Pipette e micropipette

Per le varie operazioni di analisi occorrono pipette di varia capacità (da 1 mL, 2 mL, 5 mL, e 10 mL) graduate fino alla punta, con suddivisione a 0,1 mL.

Micropipette manuali, elettroniche, monocanale o multicanale sono disponibili in commercio. Quelle manuali sono le più utilizzate all'interno dei laboratori. Si consiglia l'utilizzo di puntali monouso; inoltre è opportuno mantenere la pipetta a temperatura ambiente, evitare che subisca urti, tenerla in posizione verticale e procedere ad una regolare pulizia, manutenzione e taratura.

Per la sicurezza dell'operatore è necessario non pipettare con la bocca.

2.13. Termometri

I termometri in utilizzo presso il laboratorio devono essere tarati periodicamente mediante confronto con strumenti certificati da appositi enti. A titolo esemplificativo ci si può dotare di un termometro campione primario fatto tarare annualmente da un ente accreditato con cui effettuare tutte le verifiche indicate per incubatori, celle frigorifere, congelatori.

3. Vetreria e materiale monouso

3.1. Generalità

È da preferire la vetreria fabbricata con vetro neutro, resistente alle temperature di sterilizzazione. Prima della sterilizzazione – da effettuare con calore secco alla temperatura di $(180 \pm 3)^\circ\text{C}$ per 30 minuti o con calore umido a $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ per 15 minuti – la vetreria deve essere accuratamente lavata in modo da assicurare la completa eliminazione di residui organici o di sostanze che possono esplicare azione antibatterica. Per il controllo della sterilizzazione utilizzare prodotti specifici: indicatori biologici o integratori chimico-fisici per la verifica della sterilizzazione a calore umido e indicatori biologici per la verifica della sterilizzazione a calore secco.

Dopo lavaggio e asciugatura, la vetreria, per essere sterilizzata, deve essere confezionata in modo idoneo a consentire il mantenimento della sterilità durante la conservazione.

Negli ultimi anni si è andato sempre più diffondendo l'uso di materiali plastici monouso, forniti in confezioni già sterili. Il vantaggio di usare questi materiali è legato soprattutto al risparmio di manodopera impiegata nelle lunghe procedure di lavaggio, confezionamento e sterilizzazione dei materiali in vetro. I materiali plastici da usare nel laboratorio batteriologico devono però essere esenti da residui tossici della lavorazione, essere trasparenti e avere segni di calibrazione che corrispondano a precise indicazioni volumetriche. Uno degli svantaggi di utilizzare questi materiali è la produzione di rifiuti ingombranti.

Esistono in commercio anche articoli in materiale plastico che possono essere utilizzati e sottoposti a ripetute sterilizzazioni in autoclave.

3.2. Contenitori di vetro o plastica

È da utilizzare preferibilmente materiale in vetro, resistente alla sterilizzazione.

Le bottiglie e i tubi per diluizione dovranno essere provvisti di tappo smerigliato, a scatto, di gomma o a vite. Possono essere impiegate anche bottiglie (o tubi) di plastica, fabbricate con materiale idoneo e non tossico e resistenti alla sterilizzazione in autoclave.

3.3. Tubi per coltura

I tubi vengono usati per la tecnica dei tubi multipli, per l'esecuzione di test biochimici, per la conservazione di colture batteriche, ecc. Si utilizzano tubi di diverse dimensioni in relazione all'utilizzo. I tubi devono essere chiusi utilizzando preferibilmente tappi in metallo, in materiale plastico o in cotone grezzo. Sono decisamente da preferire i tubi in vetro resistente alla corrosione e alla sterilizzazione; tubi e provette monouso sono consigliabili per l'esecuzione di tecniche molecolari.

3.4. Piastre di Petri

Capsule di Petri in vetro sono state usate per lungo tempo in batteriologia. Negli ultimi anni esse sono state quasi totalmente sostituite da piastre monouso, in materiale plastico che si trovano in commercio già sterili in confezioni sigillate.

L'uso delle capsule di Petri è indispensabile per l'isolamento e la semina di colture e per l'analisi effettuata con la tecnica della filtrazione su membrana. Vengono utilizzate capsule di Petri di varie dimensioni. Il tipo più diffuso ha un diametro di circa 100 mm e un'altezza di 15 mm. Per il metodo di filtrazione, poiché la tecnica standardizzata prevede l'utilizzo di membrane di 47 mm di diametro, si possono usare capsule di diametro anche di 50 mm e dello spessore di 12 mm.

Indipendentemente dal materiale (vetro o plastica) le capsule di Petri devono essere con il fondo perfettamente piano e perfettamente trasparenti al fine di rendere ottimale il riconoscimento delle colonie.

4. Ceppi di microrganismi

I ceppi necessari per la verifica dell'efficacia del metodo sono indicati in ciascun metodo di applicazione.

5. Personale

5.1. Competenza

Tutto il personale che lavora in un laboratorio di microbiologia deve aver ricevuto una formazione adeguata per la conduzione corretta di tutte le operazioni di cui è incaricato.

Il personale che esegue le analisi deve avere una buona conoscenza e sufficiente esperienza pratica con le tecniche microbiologiche e i microrganismi da ricercare.

5.2. Igiene

Nel campo dell'igiene personale, si devono prendere le seguenti precauzioni non solo per evitare la contaminazione dei campioni e dei terreni colturali, ma anche per evitare il rischio di infezione del personale:

- indossare indumenti da laboratorio di colore chiaro, puliti e in buone condizioni, fabbricati con tessuti poco infiammabili; questi indumenti non devono essere indossati fuori dalle aree di lavoro;
- mantenere le unghie perfettamente pulite, ben curate e preferibilmente corte;
- lavare le mani prima e dopo gli esami microbiologici e subito dopo essere andati in bagno o in mensa; per asciugare le mani, utilizzare carta o asciugamani di tessuto, entrambi monouso;
- durante le operazioni di inoculo e semina, evitare di parlare, tossire, ecc;
- non fumare, bere o mangiare nelle zone dove si eseguono le analisi;
- non conservare alimenti destinati al consumo personale nei frigoriferi del laboratorio;
- non far entrare in laboratorio persone con infezioni o malattie che potrebbero contaminare i campioni con microrganismi in grado di invalidare i risultati dovrebbero assumere speciali precauzioni.

6. Preparazione e sterilizzazione dei terreni colturali e dei reagenti

6.1. Generalità

Utilizzare terreni disidratati o già pronti evitando di preparare i terreni dai singoli ingredienti. In questo caso, i risultati ottenuti dalle analisi potrebbero essere difformi rispetto ad analisi svolte utilizzando terreni disidratati e controllati dal produttore. Inoltre, le procedure di preparazione di terreni per singoli componenti, nel caso di sostanze tossiche, potrebbero costituire un rischio aggiuntivo per la salute degli operatori. In queste circostanze, è necessario adottare particolari cautele nella preparazione dei substrati e utilizzare dispositivi di protezione individuale (DPI).

Sulle confezioni dei terreni di coltura disidratati e di reattivi (coloranti, additivi, soluzioni) reperibili in commercio apporre sia la data di ricevimento che quella di effettiva apertura. Quando i reagenti e i terreni sono preparati in laboratorio per pesata dai costituenti di base, devono essere identificati con una etichetta riportante le seguenti informazioni: eventuale diluizione, data di preparazione, data di scadenza, modalità di conservazione, nome del preparatore, eventuali segnali di pericolosità.

L'accurata preparazione dei terreni colturali è una delle fasi fondamentali dell'analisi microbiologica e deve esserle dedicata speciale attenzione.

6.2. Acqua

L'acqua trattata con uno scambiatore ionico (deionizzata) può avere un alto contenuto di microrganismi; è pertanto consigliabile non utilizzare tale acqua senza avere verificato che il contenuto di microrganismi dell'acqua sia basso. Consultare il fabbricante per determinare il modo migliore di ridurre al minimo la contaminazione microbica. L'acqua deionizzata fortemente contaminata che è stata sterilizzata con filtri può contenere ancora sostanze inibenti la crescita di alcuni microrganismi.

Utilizzare acqua distillata o acqua di purezza equivalente, ovvero acqua purificata o acqua deionizzata. Se l'acqua distillata è preparata da acqua clorata, neutralizzare il cloro prima della distillazione.

6.3. Preparazione dei terreni colturali

Per preparare i terreni di coltura, seguire le istruzioni del fabbricante riguardanti le condizioni di immagazzinamento e la data di scadenza.

Non utilizzare i terreni colturali dopo la durata di validità indicata.

Proteggere i terreni in polvere dall'umidità.

Seguire la raccomandazione del fabbricante per la reidratazione.

Distribuire il terreno in contenitori appropriati (capsule di Petri, beute, tubi, ecc.), manualmente o utilizzando apparecchiature automatiche.

6.4. Sterilizzazione

La sterilizzazione dei terreni colturali e dei reagenti può essere eseguita utilizzando diverse tecniche: la sterilizzazione a calore umido e per filtrazione.

A seconda della tecnica utilizzata, una volta sterilizzati, i terreni dovrebbero essere controllati, in particolare per quanto riguarda pH, colore, sterilità e prestazione microbiologica.

6.4.1. Sterilizzazione a calore umido

Utilizzare autoclavi idonee alla sterilizzazione dei terreni (*vedi* 2.2.1 in questo capitolo). In generale, la fase di sterilizzazione richiede 15 minuti o più a $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$. Adattare il ciclo di sterilizzazione come necessario per il volume e il numero di contenitori, la disposizione del carico e il tipo di terreni. L'efficienza della sterilizzazione deve essere verificata utilizzando sistemi appropriati (indicatori, ecc.).

6.4.2. Sterilizzazione mediante filtrazione

La sterilizzazione mediante filtrazione può essere eseguita sotto vuoto o in condizioni pressurizzate.

Utilizzare membrane sterili ed elementi di filtrazione con diametro dei pori di $0,22 \mu\text{m}$ (ad eccezione di alcuni casi, dove è possibile utilizzare $0,45 \mu\text{m}$). Fare riferimento alle istruzioni del fabbricante riguardanti l'utilizzo degli elementi del filtro o delle membrane.

Sterilizzare i diversi componenti dell'apparecchiatura di filtrazione, assemblati o meno, in autoclave per 15 minuti a $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$. Se necessario, dopo il trattamento in autoclave può essere eseguito un assemblaggio asettico sotto cappa microbiologica. Alcune apparecchiature elettriche possono essere direttamente acquistate in condizioni sterili.

6.5. Verifica delle caratteristiche del terreno

Per controllare l'affidabilità e la conformità alle specifiche dei terreni colturali si consiglia di effettuare i controlli di seguito elencati:

– *Controllo del pH*

Misurare il pH utilizzando un pHmetro tarato (*vedi* 2.10. in questo capitolo) dopo la sterilizzazione e il raffreddamento a temperatura ambiente, controllare che il terreno

abbia ad un valore pari a $\pm 0,2$ unità di pH, a meno che non sia indicato altrimenti. Se la deviazione è superiore a quella ammessa modificare il pH mediante aggiunte di NaOH o HCl 0,1 N. Da effettuare qualora siano preparati terreni a partire dai singoli ingredienti (sconsigliato).

– *Controllo della sterilità*

Porre ad incubare una capsula o un tubo contenenti il solo terreno da testare secondo le modalità previste dal metodo analitico, e verificare la completa assenza di crescita batterica e fungina. In caso contrario, scartare tutto il lotto preparato e controllare le procedure di sterilizzazione e preparazione. Da effettuare ad ogni preparazione del terreno.

– *Controllo della fertilità del terreno*

Verificare la sua idoneità alla crescita del microrganismo target. Strisciare sulla superficie del terreno agarizzato o inoculare nel brodo un'ansata di una brodocoltura allestita con un ceppo puro di riferimento certificato. Incubare con le modalità previste dal metodo analitico e verificare la crescita di colonie con le caratteristiche morfologiche tipiche. Ogni laboratorio dovrà stabilire la frequenza di controllo.

– *Controllo della selettività del terreno*

Verificare l'inibizione di crescita di un microrganismo opportunamente scelto. Strisciare sul terreno agarizzato o inoculare nel brodo un'ansata di brodocoltura allestita a partire da un ceppo puro certificato la cui crescita dovrebbe essere inibita nel substrato in esame. Incubare con le stesse modalità indicate dal metodo analitico e verificare l'assenza di crescita di colonie. Ogni laboratorio dovrà stabilire la frequenza di controllo.

Per quanto riguarda i ceppi microbici di controllo per lo svolgimento delle prove di fertilità e selettività dei terreni colturali si rimanda alle indicazioni fornite dalle ditte produttrici.

Tutti i controlli effettuati dovranno essere accuratamente documentati, cioè registrati e archiviati.

6.6. Conservazione

6.6.1. Generalità

Su ogni confezione di flaconi, provette e piastre di Petri appare il nome del terreno e la data di preparazione e/o di scadenza.

6.6.2. Terreni colturali e reagenti preparati in laboratorio

I terreni colturali distribuiti in provette o flaconi e i reagenti che non sono immediatamente utilizzati devono essere protetti dalla luce e dall'essiccazione utilizzando adatti tappi inerti o tappi a vite con rivestimento interno inerte. Devono essere conservati in condizioni che impediscano la modifica della composizione del terreno/reagente.

Non utilizzare mai terreni disidratati.

Prima dell'uso, è auspicabile che la temperatura dei terreni colturali sia pari a quella ambiente, se non specificato diversamente.

6.6.3. Terreni colturali e reagenti pronti all'uso

Per i prodotti pronti per l'uso è necessaria la conformità alle istruzioni del fabbricante per quanto riguarda:

- data di scadenza;
- temperatura e condizioni di conservazione;
- condizioni d'uso (pH, ecc.);
- controllo dell'efficienza.

6.7. Fusione dei terreni colturali agarizzati

Far fondere un terreno colturale ponendolo a bagno in acqua bollente o mediante qualsiasi altro processo che fornisca identici risultati (per esempio, in forno a microonde).

Evitare il surriscaldamento e rimuovere il terreno colturale una volta raggiunta la fusione. Mantenere il terreno colturale allo stato fuso in un bagnomaria a temperatura non superiore a 48°C fino al momento dell'utilizzo, altrimenti conservare in condizioni refrigerate. Non utilizzare mai il terreno colturale a una temperatura superiore ai 48°C. È preferibile non mantenere un terreno fuso per più di 8 ore.

Il terreno inutilizzato deve essere risolidificato per l'uso successivo e conservato in frigorifero.

6.8. Preparazione delle piastre di Petri

Versare il terreno colturale agarizzato fuso nelle piastre di Petri sterili in modo da ottenere uno spessore di almeno da 3 mm a 4 mm (per piastre di 90 mm di diametro sono normalmente richiesti da 15 mL a 20 mL di agar).

Permettere all'agar di raffreddarsi e solidificare collocando le piastre Petri su una superficie pulita e orizzontale.

Utilizzare immediatamente le piastre di Petri così preparate oppure conservarle in condizioni (al buio e alla temperatura e per la durata appropriate) che impediscano la modifica della loro composizione.

Sono disponibili in commercio piastre di terreno agarizzato già preparate e pronte all'uso che comunque hanno tempi relativamente brevi di conservazione. Conservarle e utilizzarle secondo le prescrizioni del fabbricante.

7. Campioni di laboratorio

7.1. Campionamento del prodotto cosmetico

È importante che il prodotto – confezionato o sfuso – sia rappresentativo del prodotto cosmetico da analizzare e che non abbia subito alterazioni durante il trasporto o la conservazione.

Infatti, le procedure che si svolgono dal momento del prelievo all'esecuzione di un'analisi microbiologica rappresentano fasi molto importanti all'interno del processo analitico e possono incidere in misura non trascurabile sull'incertezza totale del risultato dell'analisi. I risultati analitici, e in particolare quelli microbiologici, infatti, devono permettere di stabilire le caratteristiche della matrice analizzata nelle condizioni in cui essa si trova nel momento in cui viene effettuato il prelievo.

Il campionamento deve quindi essere eseguito in conformità a procedure definite e può essere svolto presso gli stabilimenti di produzione, di confezionamento, di deposito e presso le strutture di vendita e riguardare le materie prime, i semilavorati e i prodotti finiti.

Le modalità di campionamento e trattamento dei prodotti cosmetici sono specificate nel DM 22 dicembre 1986 che stabilisce che i prodotti cosmetici devono essere prelevati nella loro confezione originale e così inviati al laboratorio.

In particolare, si definiscono per questo tipo di campionamenti:

- il campione totale, costituito da unità campionarie che hanno lo stesso numero di lotto di fabbricazione;
- le aliquote, che costituiscono la frazione rappresentativa del campione e quindi ciascuna delle parti equivalenti in cui è suddiviso il campione;
- le unità campionarie, di cui una o più di una vanno a costituire un' aliquota. Sono costituite dal prodotto da analizzare in laboratorio per la verifica della qualità microbiologica.

Per i prodotti confezionati, prelevare, quando possibile, confezioni originali, integre e ancora sigillate. Non eseguire frazionamenti. Per i prodotti non confezionati e sfusi utilizzare sempre strumenti sterili, contenitori sterili e tecniche di prelievo che variano in funzione dello stato fisico del prodotto (solido, liquido, in polvere, granuli, ecc.). In questo caso, il prelievo deve essere preceduto da una razionale miscelazione del prodotto che consenta di disperdere in maniera omogenea gli eventuali microrganismo presenti per ottenere un campionamento rappresentativo del prodotto da esaminare. Operare sempre sterilmente.

Ciascuna aliquota dovrebbe comprendere 4 (eventualmente, più una per la revisione) unità campionarie, allestite in modo tale da essere rappresentative del prodotto. Ciascuna unità campionaria dovrebbe contenere almeno 5 gr o mL di prodotto.

Nel caso in cui il materiale a disposizione non sia sufficiente a predisporre tutte le aliquote previste per il campionamento è possibile non allestire l' aliquota per la revisione, rispettando comunque il numero di unità campionarie per le restanti aliquote e il quantitativo minimo di prodotto, per quanto possibile.

Ogni aliquota deve essere racchiusa in una busta trasparente, poi sigillata e etichettata.

7.2. Trasporto

Durante il trasporto in laboratorio, i prodotti da sottoporre ad analisi devono essere conservati in condizioni che riducano al minimo eventuali variazioni del contenuto microbico. Non è necessario trasportarli in condizioni refrigerate. Pertanto, il trasporto deve avvenire nelle stesse condizioni di temperatura presenti al momento del prelievo. Tali condizioni vanno indicate nel verbale di campionamento.

7.3. Ricevimento e conservazione

I prodotti accettati dal laboratorio devono essere registrati e preferibilmente devono essere annotate le seguenti informazioni:

- data di ricevimento;
- caratteristiche dell'operazione di campionamento (data di campionamento, condizioni di campionamento, ecc.);
- nome, riferimento, origine e parte richiedente;
- caratteristiche evidenti del prodotto.

Se necessario, conservare i prodotti da sottoporre ad analisi a temperatura ambiente. È importante non incubare, refrigerare o congelare i prodotti cosmetici prima o dopo l'analisi.

7.4. Manipolazione di prodotti e campioni

Per evitare la contaminazione dei prodotti cosmetici, utilizzare sempre strumenti sterili per l'eventuale apertura della confezione e l'asporto prodotto. Operare allo stesso modo per i prodotti sfusi.

7.5. Analisi da effettuare

L'analisi microbiologica dei prodotti cosmetici deve prevedere la ricerca di:

- batteri vitali mesofili aerobi,
- *Pseudomonas aeruginosa*,
- funghi e lieviti,
- *Candida albicans*,
- *Escherichia coli*,
- *Staphylococcus aureus*,

così come previsto dalle linee guida dell'SCCS che forniscono indicazioni riguardanti i diversi aspetti relativi alla valutazione e alla sicurezza dei cosmetici. Nulla vieta, anche in base a specifiche richieste dell'autorità sanitaria, di ricercare altri parametri microbiologici.

8. Pratiche operative

8.1. Precauzioni igieniche durante le analisi

Al fine di mantenere condizioni di asepsi durante il lavoro seguire le regole qui elencate:

- verificare che l'area di lavoro sia pulita e che non ci siano correnti d'aria (porte e finestre chiuse);
- prima e dopo il lavoro, pulire e disinfettare la superficie di lavoro con disinfettanti appropriati;
- prima di cominciare il lavoro, verificare la disponibilità del materiale necessario per eseguire il lavoro;
- nel caso di lavoro condotto sotto cappa biologica, utilizzare guanti sterili o mani decontaminate;
- quando non si lavora sotto cappa, aprire i campioni in prossimità di una fiamma;
- eseguire il lavoro in modo più rapido possibile, senza fare movimenti superflui;
- sterilizzare anse per inoculo, ecc., prima e dopo l'uso, con un bunsen;
- mantenere pipette, spatole, ecc. usate in contenitori con disinfettanti appropriati (es. soluzione di ipoclorito di sodio per le pipette) prima dello smaltimento;
- mantenere apparecchiature riutilizzabili, eventualmente infette, in contenitori specifici prima della sterilizzazione e prima dell'operazione di lavaggio;
- mantenere l'attrezzatura monouso già usata in contenitori appropriati prima della sterilizzazione;
- raccogliere sversamenti infetti con tamponi di cotone, o qualsiasi altro materiale appropriato, impregnati di disinfettanti; poi pulire e disinfettare la superficie di lavoro prima di continuare.

La manipolazione di prodotti e le successive colture che possono contenere batteri patogeni richiedono precauzioni speciali. Generalmente è necessario l'uso di:

- cappa microbiologica per tutte le manipolazioni richieste per l'esecuzione delle analisi;
- pipette automatiche (il pipettaggio con suzione orale è severamente vietato).

Il diffondersi di gocce è una delle cause principali di contaminazione ambientale e di infezione. Nebulizzazione di gocce può verificarsi:

- quando si utilizzano agitatori, siringhe, ecc.;
- quando si svuotano le pipette soffiandovi;
- quando si sterilizzano anse o aghi di inoculazione bagnati.

È quindi necessario ridurre al minimo la formazione.

8.2. Preparazione della sospensione primaria e delle diluizioni di campioni

8.2.1. Generalità

Nel caso della preparazione della sospensione primaria e delle diluizioni dei campioni, il tempo trascorso tra la fine della preparazione e il momento in cui l'inoculo viene a contatto con il terreno colturale non deve superare i 45 min, se non specificamente richiesto.

La sospensione primaria è preparata da un campione di almeno 1 g o 1 mL del prodotto ben miscelato da sottoporre ad esame.

Registrare *S*, la massa o il volume esatto del campione.

8.2.2. Prodotti miscibili in acqua

Trasferire il campione (*S*) del prodotto in qualsiasi contenitore idoneo ed eseguire una diluizione precisa e appropriata in base al metodo da applicare.

Registrare il fattore di diluizione, *d*.

8.2.3. Prodotti immiscibili in acqua

Trasferire il campione (*S*) del prodotto in qualsiasi contenitore idoneo contenente una quantità appropriata di agente solubilizzante (per esempio, polisorbato 80) ed eseguire una diluizione precisa e appropriata in base al metodo da applicare.

Registrare il fattore di diluizione, *d*.

8.2.4. Neutralizzazione delle proprietà antimicrobiche del prodotto

Prima della determinazione o dell'enumerazione dei microrganismi vitali in un prodotto cosmetico, deve essere neutralizzato l'effetto inibente la crescita microbica che può essere espletato dai conservanti presenti nel campione. In tutti i casi, e a prescindere dalla metodologia, deve essere controllata e verificata la neutralizzazione delle proprietà antimicrobiche del prodotto.

Attenersi alle specifiche riportate nel metodo da applicare.

In Tabella 3 vengono richiamate le informazioni relative a neutralizzanti dell'attività antimicrobica dei conservanti e a liquidi di risciacquo.

Di seguito è riportata la composizione del brodo di neutralizzazione Dey/Engley (Brodo neutralizzante D/E):

Composizione		
Digerito pancreatico di caseina	5	g
Estratto di lievito	2,5	g
Glucosio	10	g
Lecitina di soia	7	g
Tiosolfato di sodio pentaidrato	6	g
Polisorbato 80	5	g
Bisolfito di sodio	2,5	g
Tioglicolato di sodio	1	g
Bromocresolo porpora	0,02	g
Acqua distillata	1000	mL
pH	7,6±0,2	

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara, controlla e conserva secondo le istruzioni della ditta produttrice. Sciogliere tutti i componenti, uno dopo l'altro. Distribuire il terreno in contenitori idonei. Sterilizzare in autoclave a $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ per 15 minuti. Conservare a riparo dalla luce a $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ per non più di un mese in condizioni ottimali.

Tabella 3. Conservanti, composti chimici neutralizzanti, soluzioni di neutralizzanti e liquidi di risciacquo

Conservante	Composti chimici in grado di neutralizzare l'attività antimicrobica del conservante	Esempi di soluzioni di neutralizzanti e di liquidi di risciacquo (per i metodi di filtrazione a membrana)
Composti fenolici: parabeni, fenossietanolo, feniletanolo, ecc. anilidi	Lecitina, polisorbato 80, alcol etossilato, surfattanti non ionici	<ul style="list-style-type: none"> • Polisorbato 80, 30 g/L + lecitina, 3 g/L • Alcol etossilato, 7 g/L + lecitina, 20 g/L + polisorbato 80, 4 g/L • Brodo neutralizzante D/E • Liquido di risciacquo: Acqua distillata; triptone, 1 g/L + NaCl, 9 g/L; polisorbato 80, 5 g/L
Composti di ammonio quaternario	Lecitina, saponina, polisorbato 80, dodecil sodio solfato	<ul style="list-style-type: none"> • Polisorbato 80, 30 g/L + dodecil sodio solfato, 4 g/L + lecitina, 3 g/L • Polisorbato 80, 30 g/L + saponina, 30 g/L + lecitina, 3 g/L • Brodo neutralizzante D/E • Liquido di risciacquo: Acqua distillata; triptone, 1 g/L + NaCl, 9 g/L; polisorbato 80, 5 g/L
Tensioattivi cationici	Alcol etossilato	<ul style="list-style-type: none"> • Brodo neutralizzante D/E • Liquido di risciacquo: Acqua distillata; triptone, 1 g/L + NaCl, 9 g/L; polisorbato 80, 5 g/L
Aldeidi	Glicina, istidina	<ul style="list-style-type: none"> • Lecitina, 3 g/L + polisorbato 80, 30 g/L + L-istidina, 1 g/L • Polisorbato 80, 30 g/L + saponina, 30 g/L + L-istidina, 1 g/L + L-cisteina, 1 g/L • Brodo neutralizzante D/E • Liquido di risciacquo: Polisorbato 80, 3 g/L + L-istidina, 0,5 g/L
Agenti a rilascio di formaldeide		
Composti ossidanti	Tiosolfato di sodio	<ul style="list-style-type: none"> • Tiosolfato di sodio, 5 g/L • Liquido di risciacquo: tiosolfato di sodio, 3 g/L
Isotiazolinoni, imidazoli	Lecitina, saponina ammine, solfati, mercaptani, bisolfito di sodio, tioglicolato di sodio	<ul style="list-style-type: none"> • Polisorbato 80, 30 g/L + saponina, 30 g/L + lecitina, 3 g/L • Liquido di risciacquo: triptone, 1 g/L + NaCl, 9 g/L; polisorbato 80, 5 g/L
Biguanidi	Lecitina, saponina, polisorbato 80	<ul style="list-style-type: none"> • Polisorbato 80, 30 g/L + saponina, 30 g/L + lecitina, 3 g/L • Liquido di risciacquo: triptone, 1 g/L + NaCl, 9 g/L; polisorbato 80, 5 g/L
Sali metallici (Cu, Zn, Hg) Composti organo-mercurici	Bisolfito di sodio, L-cisteina Composti solfidrilici, acido tioglicolico	<ul style="list-style-type: none"> • Tioglicolato di sodio, 0,5 g/L o 5 g/L • L-cisteina, 0,8 g/L o 1,5 g/L • Brodo neutralizzante D/E • Liquido di risciacquo: tioglicolato di sodio, 0,5 g/L

Il pH dei neutralizzanti può essere aggiustato allo stesso valore di quello del prodotto cosmetico.

9. Tecniche microbiologiche di base

9.1. Preparazione di colture pure

Per la preparazione di colture pure selezionare una colonia da un terreno agarizzato o in brodo. Quindi inoculare la colonia selezionata su un terreno colturale agarizzato non selettivo. Dopo incubazione, selezionare una colonia ben isolata. Ripetere l'operazione, se necessario.

Utilizzare le tecniche descritte di seguito. Nei casi specifici possono dimostrarsi necessari diversi metodi.

9.1.1. Semina

Prelevare una piccola quantità dalla superficie di una colonia bene isolata utilizzando la punta di un'ansa sterile.

Quindi eseguire la semina direttamente (metodo diretto) o dopo aver preparato una sospensione cellulare (metodo per diluizione).

9.1.1.1. Metodo diretto

Utilizzando la punta dell'ansa, seminare, in strisciate vicine, una porzione pari a circa un terzo dell'area superficiale del terreno agarizzato. Sterilizzare e raffreddare l'ansa. Dal bordo dell'area inoculata, creare un'altra serie di strisciate, meno vicine tra loro che nel primo caso, sulla metà dell'area superficiale non ancora seminata. Ripetere l'operazione sull'area superficiale restante creando strisciate a distribuzione più ampia.

9.1.1.2. Metodo per diluizione

Sospendere le cellule microbiche in 1÷2 mL della soluzione selezionata, sfregando l'ansa contro la parete della provetta in corrispondenza della superficie del liquido, quindi miscelare bene.

Sterilizzare e raffreddare l'ansa. Utilizzando l'ansa, prelevare una piccola porzione della sospensione microbica e procedere come indicato precedentemente in 9.1.1.1.

9.1.2. Incubazione

Collocare le piastre di Petri inoculate, in posizione rovesciata, nell'incubatore per la durata e la temperatura prescelte.

9.1.3. Selezione

Dopo l'incubazione, selezionare una colonia bene isolata dalla piastra, sia per un successivo isolamento che per le prove da eseguire.

Se possibile, le prove finali dovrebbero essere eseguite utilizzando cellule provenienti da una singola colonia.

9.2. Colorazione di Gram

Questa colorazione consente di osservare la morfologia delle cellule e, di conseguenza, consente di classificarle in due gruppi in base alla colorazione (gram-positivi e gram-negativi). Questa divisione è funzione delle differenze di struttura delle pareti cellulari dei due gruppi ed è correlata ad altre differenze. Esistono numerosi modi di eseguire una colorazione di Gram, ma tutti seguono le fasi descritte di seguito.

9.2.1. Soluzioni

Possono essere utilizzate soluzioni disponibili in commercio. In questo caso, seguire le raccomandazioni del fabbricante.

9.2.1.1. Soluzione di cristal violetto

Composizione		
Cristal violetto	2	g
Etanolo (95%)	20	mL
Ossalato di ammonio (C ₂ H ₈ N ₂ O ₄)	0,8	g
Acqua distillata	80	mL

Sciogliere il cristal violetto in etanolo e ossalato di ammonio e in acqua distillata. Miscelare le due soluzioni e lasciare riposare la miscela per 24 ore prima dell'uso.

9.2.1.2. Soluzione di iodio

Composizione		
Iodio	1	g
Ioduro di potassio (KI)	2	g
Acqua distillata	100	mL

Sciogliere lo ioduro di potassio in 10 mL di acqua distillata, aggiungere lo iodio in frazioni. Dopo lo scioglimento, portare a 100 mL in un matraccio tarato.

9.2.1.3. Soluzione di safranina

Composizione		
Safranina O	0,25	g
Etanolo (95%)	10	mL
Acqua distillata	100	mL

Sciogliere la safranina nell'etanolo, poi miscelare con acqua distillata. Riempire un matraccio tarato fino ad ottenere un volume finale di 100 mL.

Quando si utilizza il cristal violetto, si dovrebbe verificare la stabilità della soluzione. Per la verifica, miscelare una goccia della soluzione di cristal violetto con una goccia di soluzione di iodio su un vetrino per osservare una eventuale cristallizzazione. In caso positivo, non utilizzare la soluzione di cristal violetto.

9.2.2. Tecnica di colorazione

Fissare (es. con la fiamma di un bunsen) il film batterico (coltura di 18÷24 ore) su un vetrino da microscopio. Coprire il film con una piccola aliquota di cristal violetto (9.2.1.1.). Lasciare reagire per 1 minuto. Sciacquare con acqua delicatamente il vetrino inclinato per alcuni secondi.

Coprire il vetrino con la soluzione di iodio (9.2.1.2.). Lasciare reagire per 1 minuto. Sciacquare con acqua delicatamente il vetrino inclinato per alcuni secondi.

Versare, delicatamente e in continuo, un film di etanolo (95%) sul vetrino inclinato per non più di 30 secondi e finché non c'è più il colore violetto. Sciacquare con acqua delicatamente il vetrino inclinato per eliminare l'etanolo.

Coprire il vetrino con la soluzione di safranina (9.2.1.3.) per 10÷20 secondi. Sciacquare delicatamente con acqua il vetrino inclinato. Asciugare tamponando delicatamente il vetrino.

9.2.3. Interpretazione

Esaminare il vetrino sotto l'obiettivo del microscopio (2.9.). Le cellule batteriche che appaiono blu o viola sono individuate come appartenenti a batteri gram-positivi; quelle con colorazione da rosa scuro a rosso sono invece individuate come appartenenti a batteri gram-negativi.

Da una coltura pura di alcune specie di batteri, si possono ottenere sia cellule gram-positive che gram-negative in uno stesso campo di microscopio.

9.3. Prova della catalasi

La rivelazione di questo enzima, che decompone il perossido d'ossigeno (H_2O_2) in acqua e ossigeno, può essere eseguita utilizzando una coltura in brodo, una coltura in agar o una singola colonia su un terreno agarizzato.

9.3.1. Verifica della presenza della catalasi da una coltura in brodo

Aggiungere a 1 mL della coltura, 0,5 mL di una soluzione a 10 volumi (3%) di perossido di ossigeno. Osservare il manifestarsi di bolle di ossigeno (catalasi positiva) o la loro assenza (catalasi negativa).

9.3.2. Verifica della presenza della catalasi da una coltura in terreno agarizzato

Coprire la coltura con 1÷2 mL di una soluzione a 10 volumi (3%) di perossido di ossigeno.

Osservare immediatamente e dopo 5 minuti se si sia verificata la formazione di bolle di ossigeno (catalasi positiva) o meno (catalasi negativa).

9.3.3. Verifica della presenza della catalasi da una colonia

Versare separatamente due gocce di una soluzione di perossido di ossigeno a 10 volumi (3%) su un vetrino da microscopio.

Prelevare una colonia con una bacchetta di vetro o di plastica sterile (non un filo metallico) ed emulsionare delicatamente in una delle due gocce. Osservare immediatamente e anche dopo diversi minuti se si siano formate bolle di ossigeno (catalasi positiva) o meno (catalasi negativa).

L'osservazione può essere condotta a livello macroscopico o utilizzando un microscopio a ingrandimento ridotto.

9.4. Prova della citocromossidasi

La rivelazione dell'enzima è eseguita osservando la variazione di colore di un composto al momento dell'ossidazione sotto l'azione di questo enzima.

9.4.1. Reagente

Composizione	
<i>N,N,N',N'</i> -tetrametil-3- <i>p</i> -fenilendiammina dicloroidrato ($C_{10}H_{16}N_2 \times 2HCl$)	1 g
Acqua distillata	100 mL

Sciogliere il reagente in acqua fredda. Preparare il reagente immediatamente prima dell'uso.

Possono essere utilizzati dischetti o stecche disponibili in commercio. In questo caso, seguire le raccomandazioni del fabbricante. È da segnalare che tale prodotto viene classificato come sostanza pericolosa. Utilizzare dispositivi di protezione individuale durante l'uso.

9.4.2. Procedura

Inumidire con il reagente un pezzo di carta bibula. Prelevare una piccola frazione della coltura batterica ottenuta da un terreno agarizzato utilizzando un filo di platino o una bacchetta di vetro o di plastica (un filo di nichel/cromo fornisce falsi positivi) e depositarlo sulla carta bibula inumidita.

9.4.3. Interpretazione

In caso di presenza dell'enzima citocromossidasi, compare un colore dal violetto al porpora entro 5÷10 secondi. Se il colore non è variato dopo 10 secondi, la prova è considerata negativa.

9.5. Uso delle prove biochimiche per l'identificazione

Possono essere utilizzate per l'identificazione delle specie batteriche le prove biochimiche miniaturizzate disponibili in commercio. Tuttavia, esse non presentano lo stesso livello di affidabilità. Le loro prestazioni devono pertanto essere valutate prima dell'uso, eccetto i casi in cui siano state considerate idonee dal fabbricante e/o da un'organizzazione indipendente.

10. Tecniche base di isolamento e conta

10.1. Inoculo per inclusione

Preparare il terreno, le piastre di Petri, i diluenti e le diluizioni da esaminare in quantità e numero necessari per l'analisi considerando il numero di parametri da ricercare.

Distribuire le aliquote, anche delle eventuali diluizioni, nelle piastre di Petri. Miscelare immediatamente il terreno fuso e l'inoculo facendo attenzione a distribuire omogeneamente il volume del campione all'interno della massa del terreno. Consentire all'agar di raffreddarsi e solidificare collocando le piastre Petri su una superficie orizzontale (il tempo di solidificazione dell'agar non dovrebbe superare i 10 min).

10.2. Inoculo per semina in superficie

Depositare l'aliquota al centro del terreno colturale agarizzato in piastra. Distribuirlo, per spatolamento, uniformemente e il più rapidamente possibile sulla superficie del terreno utilizzando una spatola sterile di vetro o plastica oppure ruotare la piastra finché non vi sia più alcun liquido visibile sulla superficie di agar.

10.3. Filtrazione su membrana

Dopo aver posto una membrana sterile sul dispositivo per filtrare, trasferire una quantità nota del campione nell'imbuto dell'apparecchiatura di filtrazione, assieme ad un piccolo volume di diluente sterile. Filtrare immediatamente e sciacquare con il diluente.

Trasferire la membrana in una piastra di Petri sulla superficie del terreno agarizzato.

11. Preparazione e taratura degli inoculi

11.1. Coltura dei ceppi di riferimento

Per migliorare la ripetibilità e la riproducibilità dei risultati, si raccomanda di utilizzare subcolture cresciute sul terreno agarizzato e con non più di 24 ore di sviluppo.

11.2. Preparazione delle sospensioni cellulari

Prelevare 10 mL di diluente sterile e versarlo in un matraccio sterile da 100 mL contenente 5 g di biglie di vetro sterili. Utilizzando un'ansa, trasferire nel diluente parte della colonia cresciuta sul terreno agarizzato. Immergere l'ansa nel diluente e, sfregandola contro la parete del matraccio, staccare la colonia dall'ansa. Agitare il matraccio per un periodo compreso tra 2 minuti e 3 minuti. Prelevare la parte superiore della sospensione (evitando qualsiasi contatto con le biglie di vetro) e trasferire la sospensione ottenuta in un contenitore sterile.

11.3. Taratura delle sospensioni

Utilizzando un diluente sterile e in base ai dati di taratura prodotti in laboratorio, preparare una sospensione con un numero di cellule tra 1×10^8 UFC/mL e 3×10^8 UFC/mL (per *C. albicans*, da 1×10^7 UFC/mL a 3×10^7 UFC/mL). Per esempio, utilizzare uno spettrofotometro (lunghezza d'onda 620 ± 20 nm) e una cuvetta monouso con lunghezza di 10 mm. Misurare l'assorbanza di una parte dell'aliquota della sospensione e, se necessario, diluire la soluzione. A seconda dei ceppi, si possono riscontrare valori di densità ottica tra 0,150 e 0,460.

Bibliografia di riferimento

UNI ISO 21148:2009. *Cosmetici. Microbiologia - Istruzioni generali per l'analisi microbiologica*. Milano: Ente Italiano di Unificazione; 2009.

PROCEDURE OPERATIVE PER L'ANALISI MICROBIOLOGICA DEI PRODOTTI COSMETICI

Per lo specifico fine analitico, si applicano i seguenti termini e definizioni:

- *Prodotto cosmetico*: prodotto ricevuto nel laboratorio per le analisi.
- *Campione*: porzione del prodotto (almeno 1 g o 1 mL), utilizzato per preparare la sospensione iniziale.

1. Prelievo, manipolazione e conservazione dei prodotti cosmetici

Una volta pervenuti in laboratorio, i prodotti cosmetici devono essere analizzati quanto prima. Qualora non si proceda immediatamente all'analisi, devono essere conservati a temperatura ambiente. Non incubare, non refrigerare né congelare i prodotti cosmetici prima e dopo l'analisi.

Prima dell'apertura i contenitori dei prodotti cosmetici devono essere attentamente ispezionati per verificarne eventuali irregolarità. Prima che la confezione sia aperta e il suo contenuto rimosso, la superficie dei contenitori dovrebbe essere disinfettata utilizzando una garza imbevuta con una soluzione acquosa di etanolo 80% (v:v) e HCl 1% (v:v) o con altro disinfettante, quindi asciugata con una garza sterile.

L'analisi microbiologica deve essere effettuata su una quantità rappresentativa e significativa di campione affinché l'aliquota esaminata presenti tutte le caratteristiche chimico-fisiche e biologiche del prodotto cosmetico di provenienza e affinché risulti ridotto l'errore statistico legato alla procedura analitica. Sarebbe preferibile esaminare 10 g (mL) di prodotto oppure, nel caso in cui la quantità a disposizione sia inferiore, analizzare tutto il materiale a disposizione. In ogni caso, l'esame microbiologico deve essere effettuato su almeno 1 g (mL) di prodotto. Qualora non si raggiunga il quantitativo minimo di 1 g (mL) e siano disponibili più aliquote dello stesso prodotto, si può preparare un campione composito.

Se è disponibile un'unica aliquota del prodotto cosmetico e, oltre alle analisi microbiologiche, sono richieste anche analisi tossicologiche e chimiche, la frazione destinata all'esame microbiologico deve essere prelevata per prima.

Sarebbe preferibile che il prelievo fosse preceduto da un fase di mescolamento del campione da effettuarsi per agitazione meccanica del contenitore o con ausilio di una spatola sterile.

In condizioni di sterilità, prelevare dal contenitore originale 10 g (mL) di prodotto cosmetico utilizzando spatole o pipette sterili e trasferirli in un contenitore sterile. Mescolare accuratamente in condizioni sterili e trasferire almeno 1 g o mL in un contenitore abbastanza capiente da contenere la quantità di diluente necessaria ad effettuare una diluizione 1/10 del campione (porzione del prodotto).

2. Trattamento dei campioni

Prima dell'analisi si deve procedere alla neutralizzazione degli agenti antimicrobici e dei conservanti eventualmente contenuti nei prodotti cosmetici e alla dispersione del prodotto in un

opportuno diluente, neutralizzante o brodo di arricchimento, a seconda del metodo analitico successivamente applicato.

Se il metodo analitico che serve per la ricerca del parametro microbiologico è di tipo qualitativo, il campione dovrà essere disperso in un brodo di arricchimento contenente agenti neutralizzanti e di dispersione (es. Brodo Eugon LT 100). Se, invece, la determinazione del parametro microbiologico prevede l'applicazione di un metodo quantitativo, il campione dovrà essere disperso in un opportuno diluente o diluente neutralizzante.

Se il campione ha caratteristiche fisico-chimiche tali da essere direttamente filtrabile, non è necessario operare la sua dispersione nei diluenti o nel brodo di arricchimento. In questo caso, procedere alla filtrazione di un volume noto attraverso un filtro a membrana con dimensioni nominali dei pori non maggiori di 0,45 µm e ai successivi lavaggi della membrana con acqua o con diluente. Porre la membrana in brodo di arricchimento, per le determinazioni qualitative, o su specifico substrato agarizzato, per le determinazioni quantitative.

Diversamente, se il campione non è filtrabile, procedere alla sua solubilizzazione e omogeneizzazione nella soluzione di diluente o diluente neutralizzante o nel brodo di arricchimento, a seconda del metodo analitico successivamente applicato.

La sospensione così ottenuta è definita sospensione primaria e rappresenta una diluizione 1:10 del prodotto cosmetico iniziale.

In relazione alla natura fisico-chimica del campione si possono adottare specifici accorgimenti per migliorarne la solubilizzazione. In base alle proprietà fisiche e chimiche, i cosmetici possono essere suddivisi nelle seguenti categorie:

- liquidi;
- solidi e polveri;
- creme e oli;
- aerosol.

Per i prodotti liquidi solubili in acqua si può procedere direttamente alla loro filtrazione come sopra indicato o alla diluizione del campione con la soluzione di diluente, di diluente neutralizzante o con il brodo di arricchimento in rapporto 1:10 e alla successiva agitazione meccanica (mediante vortex).

Per i prodotti solidi e per le polveri è necessario disperdere il campione in un agente solubilizzante, emulsionando il campione con una quantità di polisorbato 80 sterile non superiore a metà del suo peso e dissolvendo con l'ausilio di una spatola sterile fino ad ottenere una sospensione omogenea. Se necessario, scaldare fino ad un massimo di 40°C. Aggiungere infine una quantità di diluente, di diluente neutralizzante, oppure di brodo di arricchimento in modo da ottenere una diluizione 1:10 del campione originale.

Per le creme e per gli oli il campione viene emulsionato con una quantità di polisorbato 80 sterile non superiore a metà del suo peso agitando meccanicamente (mediante vortex o includendo palline di vetro sterile nel diluente). Se necessario, scaldare fino ad un massimo di 40°C. Si aggiunge infine una quantità di diluente, di diluente neutralizzante o di brodo di arricchimento in modo da ottenere una diluizione 1:10 del campione originale.

Per gli aerosol, dopo aver disinfettato la valvola erogatrice, si vaporizza una quantità appropriata del contenuto in un contenitore sterile e si effettua una diluizione 1:10 con diluente, con diluente neutralizzante o con brodo di arricchimento.

Dopo aver atteso un tempo non superiore a 15 minuti per consentire la rivitalizzazione dei microrganismi eventualmente presenti, se necessario, possono essere eseguite ulteriori diluizioni seriali utilizzando lo stesso diluente. Per evitare che i microrganismi subiscano danni da shock termico, la temperatura del diluente deve essere molto prossima a quella del campione. Una volta effettuate le diluizioni procedere, entro 20-30 minuti, alla semina nei terreni colturali.

3. Tecniche colturali

3.1. Filtrazione su membrana

Filtrare un volume noto di campione attraverso un filtro a membrana con dimensioni nominali dei pori di 0,45 µm su un idoneo supporto di filtrazione. Lavare la membrana con volumi definiti di acqua o di diluente neutralizzante (di solito 3 lavaggi da 100 mL). Porre poi la membrana in brodo di arricchimento, per le determinazioni qualitative, o su specifico substrato agarizzato, per le determinazioni quantitative. Procedere con l'incubazione.

3.2. Inclusione in agar

Distribuire, generalmente in duplicato, 1 mL della sospensione primaria e/o delle diluizioni da saggiare sul fondo di una piastra di Petri da 9-10 cm. Versare circa 15-18 mL di terreno di coltura, precedentemente fuso e mantenuto a (45±1)°C, in ogni piastra e mescolare immediatamente ruotando le stesse in modo lento e uniforme. Non superare i 15 minuti di intervallo tra il momento dell'inoculo in capsula e l'aggiunta del terreno colturale. Lasciare solidificare su superficie orizzontale pulita e fredda.

Dopo solidificazione dell'agar procedere all'incubazione delle piastre capovolte come indicato nel protocollo analitico del microrganismo ricercato.

Allestire un opportuno controllo di sterilità seminando 1 piastra di terreno di coltura con 1 mL di diluente o di diluente neutralizzante.

3.3. Semina in superficie

Con l'ausilio di una spatola sterile distribuire 0,1-0,2 mL (fino a 0,5 mL) della sospensione primaria e/o delle diluizioni da saggiare sulla superficie del terreno di coltura versato e fatto solidificare nelle piastre. Quando l'inoculo è completamente assorbito dal terreno, incubare le piastre capovolte come indicato nel protocollo analitico del microrganismo ricercato.

Allestire un opportuno controllo di sterilità seminando 1 piastra di terreno di coltura con 0,1 mL di diluente o di diluente neutralizzante.

3.4. Lettura ed espressione dei risultati

Considerare solo le piastre che contengano almeno 5 colonie (meglio 15 per terreni selettivi e 30 per terreni non selettivi) e meno di 300.

Se, nelle piastre inoculate, non sono cresciute colonie, esprimere il risultato come "non rilevato"/mL o g. Se sono presenti più di 300 colonie, esprimere il risultato come >300/mL o /g.

Applicare per il calcolo la seguente formula:

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

dove:

N = numero di microrganismi/mL o g

C = somma delle colonie contate su tutte le piastre valide

V = volume dell'inoculo in mL seminato in ogni piastra

n₁ = numero di piastre considerate alla eventuale prima diluizione considerata

n_2 = numero di piastre considerate alla eventuale seconda diluizione considerata
 d = prima diluizione scelta per il calcolo

Arrotondare il risultato a due cifre significative.

Eventualmente riportare come risultato il numero di microrganismi/mL o g di prodotto moltiplicato per 10^x dove x è potenza di 10.

Esempio:

Volume inoculo: 1 mL
 Prima diluizione 10^{-2} : 168-215 UFC
 Seconda diluizione 10^{-3} : 14-25 UFC

$$N = \frac{168 + 215 + 14 + 25}{1 \times [2 + (0,1 \times 2)] \times 10^{-2}} = \frac{422}{0,022} = 19182 = 1,9 \times 10^4 \text{ UFC/g o mL}$$

Nel caso in cui le piastre presentino un numero di UFC inferiore a 15, dovranno essere segnalati i limiti di confidenza facendo riferimento alla Tabella 1.

Tabella 1. Limiti di confidenza per piastre con un numero di UFC < 15

Numero di UFC	Limite di confidenza al 95%	
	Inferiore	Superiore
1	<1	2
2	<1	4
3	<1	5
4	1	6
5	2	9
6	2	10
7	2	12
8	3	13
9	4	14
10	4	16
11	5	18
12	6	19
13	7	20
14	7	21
15	8	23

3.5. Ricerca di microrganismi specifici

Nei successivi capitoli verranno proposte metodologie analitiche per la ricerca di alcuni microrganismi ritenuti significativi nella determinazione della qualità microbica dei prodotti cosmetici sulla base delle Linee Guida del Comitato Scientifico Europeo.

La ricerca di microrganismi specifici può essere di tipo quantitativo e di tipo qualitativo e si basa in entrambi i casi sull'impiego di terreni colturali selettivi.

Per definizione un terreno colturale selettivo è un substrato di coltura che contiene sostanze che inibiscono la crescita di alcuni microrganismi e favoriscono lo sviluppo di altri (organismi bersaglio).

La ricerca quantitativa di uno specifico microrganismo ne consente l'enumerazione seminando diluizioni del campione (o per inclusione o per spatolamento in superficie o su

membrana) direttamente su terreni colturali selettivi. L'identificazione della specie, qualora necessaria, dovrà comunque essere eseguita con prove biochimiche aggiuntive.

Attraverso la ricerca qualitativa è possibile accertare o escludere la presenza di una data specie o gruppo microbico in un campione analizzato indipendentemente dal numero di cellule microbiche presenti. Quando si formula un giudizio qualitativo è fondamentale che tutte le cellule, anche quelle danneggiate, siano rivitalizzate e crescano sul substrato di coltura; pertanto, in questo caso, prima dell'analisi si procede ad una fase di arricchimento di un'aliquota del campione in un mezzo liquido, successivamente all'isolamento su terreni colturali selettivi e a prove di conferma. Il risultato, in questo modo ottenuto, viene espresso come presenza/assenza del microrganismo ricercato nel volume di campione esaminato.

Nei capitoli successivi vengono proposte alcune metodologie analitiche per la ricerca dei seguenti parametri microbiologici:

- batteri vitali mesofili aerobi;
- *Pseudomonas aeruginosa*;
- funghi e lieviti;
- *Candida albicans*;
- *Escherichia coli*;
- *Staphylococcus aureus*.

Le metodiche proposte sono di tipo quantitativo per la ricerca dei batteri vitali mesofili aerobi e per i funghi e i lieviti, mentre sono di tipo qualitativo per gli altri parametri, considerando che essi devono essere assenti nei prodotti cosmetici.

DETERMINAZIONE E CONTEGGIO DEI BATTERI VITALI MESOFILI AEROBI

0. Generalità

Gli aspetti di sintesi di seguito presentati si riferiscono al parametro batteri vitali mesofili aerobi rilevato con il metodo ISS Co 001A rev. 00.

Il conteggio batteri vitali mesofili aerobi su agar è un parametro che permette di rilevare un gruppo eterogeneo di microrganismi aerobi vivi, in maggioranza batteri, oltre a lieviti e muffe, che hanno differenti capacità metaboliche e richieste nutrizionali. Generalmente tra questi microrganismi sono rilevate specie ambientali o saprofiti, ma possono essere rilevati anche opportunisti patogeni o alcuni patogeni. Tuttavia, le loro concentrazioni non sono generalmente sufficienti ad instaurare condizioni di rischio in soggetti sani.

Il parametro fornisce indicazioni sulla qualità microbiologica generale del prodotto cosmetico e, secondo le raccomandazioni del *Cosmetics Europe* e le linee guida dell'SCCS, le concentrazioni dei batteri vitali mesofili aerobi non devono superare le 1000 UFC/g o mL per i prodotti ad uso generale, mentre per i prodotti usati per i bambini e nell'area perioculare, il limite è di 100 UFC/g o mL.

1. Campo di applicazione

La procedura analitica viene utilizzata per il rilevamento e per la conta dei batteri vitali aerobi mesofili in prodotti cosmetici.

2. Termini e definizioni

Per lo specifico fine analitico, si applicano i seguenti termini e definizioni:

- *Batteri vitali mesofili aerobi*
Batteri che crescono aerobicamente nelle condizioni specificate dalla presente procedura.
- *Brodo di arricchimento*
Terreno liquido non selettivo contenente neutralizzanti e/o agenti di dispersione e utilizzato per il prodotto sottoposto ad analisi.
- *Campione*
Porzione del prodotto (S) di almeno 1 mL o g utilizzata nell'analisi per preparare la sospensione primaria.
- *Diluizione/i del campione*
Diluizione/i della sospensione primaria.
- *Prodotto*
Prodotto cosmetico ricevuto nel laboratorio per le prove.
- *Sospensione primaria*
Sospensione (o soluzione) del campione in un volume definito di un adeguato terreno in brodo (diluente, neutralizzante, brodo di arricchimento o una loro combinazione).

3. Metodo

3.1. Principio del metodo

La procedura analitica permette la conta delle colonie su un terreno agarizzato non selettivo (per inclusione, diffusione o filtrazione) o la verifica della presenza o dell'assenza di crescita batterica dopo arricchimento. Per la determinazione dei batteri vitali mesofili aerobi è sufficiente utilizzare una delle quattro procedure descritte.

Per consentire la crescita e il rilevamento di microrganismi vitali è necessario, per la presenza di sostanze preservanti nei cosmetici, neutralizzare l'effetto antimicrobico. In tutti i casi, e a prescindere dalla metodologia, deve essere verificata la neutralizzazione delle proprietà antimicrobiche del prodotto.

La procedura analitica è in linea con la norma UNI EN ISO 21149.

3.1.1. Conteggio su agar (metodo quantitativo)

La procedura consiste nelle seguenti fasi:

- inclusione in agar o distribuzione sulla superficie dell'agar di una quantità definita della sospensione primaria o diluizione del prodotto, utilizzando un terreno culturale specifico;
- incubazione in aerobiosi a $(30\div 35)^{\circ}\text{C}$ per (72 ± 6) ore;
- conta del numero di unità formanti colonia (UFC) e calcolo del numero di batteri vitali mesofili aerobi per millilitro o per grammo di prodotto.

3.1.2. Filtrazione su membrana (metodo quantitativo)

La procedura consta delle seguenti fasi:

- trasferimento di una quantità di campione nell'apparecchiatura di filtrazione. Filtrazione e lavaggio secondo la procedura di verifica. Trasferimento del filtro sulla superficie del terreno agarizzato specifico
- incubazione in aerobiosi delle membrane a $(30\div 35)^{\circ}\text{C}$ per (72 ± 6) ore
- conta del numero di unità formanti colonia (UFC) e calcolo del numero di batteri vitali mesofili aerobi per millilitro o per grammo di prodotto.

3.1.3. Ricerca dei batteri tramite arricchimento (metodo qualitativo)

La ricerca dei batteri tramite arricchimento prevede le seguenti fasi:

- incubazione a $(30\div 35)^{\circ}\text{C}$ per almeno 20 ore di una quantità definita della sospensione primaria in un terreno liquido non selettivo contenente neutralizzanti e/o agenti di dispersione.
- trasferimento di una quantità definita della sospensione precedente sul terreno agarizzato solido non selettivo.
- incubazione in aerobiosi a $(30\div 35)^{\circ}\text{C}$ per $48\div 72$ ore.
- verifica della crescita ed espressione dei risultati come "Presenza/Assenza" di batteri vitali mesofili aerobi per campione S di prodotto.

3.2. Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio (*vedi* sezione 2. Apparecchiature e attrezzature di base nel capitolo "Analisi microbiologiche dei prodotti cosmetici: linee guida per le buone pratiche di laboratorio").

3.3. Diluenti e terreni di coltura

3.3.1. Diluenti neutralizzanti e diluenti

Il diluente è utilizzato per disperdere il campione. Può contenere neutralizzanti se il campione da sottoporre a prova ha proprietà antimicrobiche. L'efficacia della neutralizzazione deve essere dimostrata prima del conteggio.

3.3.1.1. *Diluente neutralizzante (terreno digerito liquido di caseina – lecitina di soia – polisorbato 20)*

Composizione	
Digerito pancreatico di caseina	20 g
Lecitina di soia	5 g
Polisorbato 20	40 mL
Acqua distillata	960 mL
pH 7,3±0,2	

Sciogliere il polisorbato 20 in 960 mL di acqua miscelando durante il riscaldamento in un bagnomaria a circa 48°C. Aggiungere il digerito pancreatico di caseina e la lecitina di soia. Riscaldare per circa 30 minuti per ottenere una soluzione. Miscelare e distribuire il terreno in contenitori idonei. Sterilizzare in autoclave a (121 ± 3)°C per 15 minuti. Conservare a riparo dalla luce a (5 ± 3)°C per non più di un mese in condizioni ottimali.

3.3.1.2. *Diluente (liquido A)*

Composizione	
Digerito peptico di tessuti animali	1 g
Acqua distillata	1000 mL
pH 7,1±0,2	

Sciogliere 1 g di peptone in acqua distillata. Riscaldare agitando frequentemente. Distribuire in contenitori idonei. Sterilizzare in autoclave a (121 ± 3)°C per 15 minuti. Conservare a riparo dalla luce a (5 ± 3)°C per non più di un mese in condizioni ottimali.

3.3.1.3. *Diluente per la sospensione batterica (soluzione di cloruro di sodio triptone)*

Composizione		
Digerito pancreatico di caseina	1	g
Cloruro di sodio	8,5	g
Acqua distillata	1000	mL
pH 7,0±0,2		

Disciogliere i componenti in acqua miscelando durante il riscaldamento. Distribuire in contenitori idonei. Sterilizzare in autoclave a (121 ± 3)°C per 15 minuti. Conservare a riparo dalla luce a (5 ± 3)°C per non più di un mese in condizioni ottimali.

3.3.2. Terreno di arricchimento

Se si procede con un metodo qualitativo, devono essere utilizzati un brodo di arricchimento e un terreno agarizzato.

Per dissolvere il campione e per aumentare la popolazione microbica iniziale inoculare nel brodo di arricchimento che può contenere neutralizzanti se il campione da sottoporre a prova ha proprietà antimicrobiche.

3.3.2.1. Brodo Eugon LT 100

Composizione	
Digerito pancreatico di caseina	15 g
Digerito papaico di farina di soia	5 g
Sodio cloruro	4 g
Solfito di sodio	0,2 g
Destrosio	5,5 g
L-cistina	0,7 g
Lecitina di uova	1 g
Polisorbato 80	5 g
Octoxilolo 9	1 g
Acqua distillata	1000 mL
pH 7,0±0,2	

In questa formulazione sono contenuti ingredienti neutralizzanti, quali la lecitina e il polisorbato 80, e un agente di dispersione l' octoxilolo 9, che vengono aggiunti quando sono presenti sostanze antimicrobiche e il prodotto è immiscibile in acqua.

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara, controlla e conserva secondo le istruzioni della ditta produttrice. Nella preparazione dai singoli componenti sciogliere, polisorbato 80, octoxilolo 9 e lecitina di uovo, uno dopo l'altro, in acqua bollente. Sciogliere gli altri componenti miscelando durante il riscaldamento. Distribuire il terreno in contenitori idonei. Sterilizzare in autoclave a $(121 \pm 3)^{\circ}\text{C}$ per 15 minuti. Conservare a riparo dalla luce a $(5 \pm 3)^{\circ}\text{C}$ per non più di un mese in condizioni ottimali.

3.3.3. Terreno di crescita

3.3.3.1. Triptone Soia Agar (TSA)

Composizione	
Digerito pancreatico di caseina	15 g
Digerito papaico di farina di soia	5 g
Sodio cloruro	5 g
Agar	15 g
Acqua distillata	1000 mL
pH 7,3±0,2	

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara, controlla e conserva secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente. Sterilizzare in autoclave a $(121 \pm 3)^{\circ}\text{C}$ per 15 minuti. Conservare a riparo dalla luce a $(5 \pm 3)^{\circ}\text{C}$ per non più di un mese in condizioni ottimali.

3.4. Ceppi dei microrganismi per la verifica del metodo

Le prove che seguono permettono di dimostrare che i microrganismi possono crescere nelle condizioni di analisi.

Per verificare l'efficacia dei neutralizzanti, dovrebbero essere utilizzati due ceppi rappresentativi di microrganismi gram-negativi e gram-positivi, generalmente sensibili agli agenti antimicrobici:

- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 o un ceppo equivalente (CIP 82.118 o NCIMB 8626 o NBRC 13275 o KCTC 2513 o altro ceppo di collezione nazionale equivalente); in alternativa, comunque, utilizzare colture di riferimento certificate;
- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 o un ceppo equivalente (CIP 4.83 o NCIMB 9518 o NBRC 13276 o KCTC 1916 o altro ceppo di collezione nazionale equivalente); in alternativa, comunque, utilizzare colture di riferimento certificate.

La coltura dovrebbe essere ricostituita secondo le procedure raccomandate dal produttore.

3.5. Procedura

Utilizzare materiale sterile, apparecchiature e tecniche asettiche per preparare il campione, la sospensione primaria e le diluizioni. Nel caso in cui la sospensione primaria sia preparata in un agente solubilizzante, il tempo trascorso tra la fine della preparazione e il momento in cui l'inoculo viene messo a contatto con il brodo di arricchimento non deve superare i 45 minuti, se non specificamente menzionato nei protocolli o nei documenti di riferimento.

3.5.1. Preparazione della sospensione primaria

La sospensione primaria è preparata da un campione di almeno 1 g o 1 mL del prodotto ben miscelato che deve essere disperso in almeno 9 mL di diluente neutralizzante (3.3.1.1.) o di diluente (3.3.1.2.) o di brodo di arricchimento (3.3.2.1.), a seconda del metodo utilizzato.

Annotare S , cioè il peso o V il volume esatto del campione.

La sospensione primaria è generalmente una diluizione 1:10. Possono essere richiesti volumi maggiori di diluente o di brodo di arricchimento se si prevedono alti livelli di contaminazione e/o se sono ancora presenti proprietà antimicrobiche nella diluizione 1:10.

3.5.2. Metodi quantitativi

3.5.2.1. Diluizioni per i metodi quantitativi

In genere, la sospensione primaria è la prima diluizione contata. Se necessario, possono essere eseguite ulteriori diluizioni seriali (per esempio, diluizione 1:10) dalla sospensione primaria utilizzando lo stesso diluente (a seconda del livello di contaminazione prevista del prodotto).

In genere, la conta è eseguita in duplicato. Ma è possibile utilizzare una sola capsula di Petri nel caso di prove sistematiche oppure se le conte sono eseguite su diluizioni successive dello stesso campione o in base a risultati precedenti.

3.5.2.2. Metodi di conta su agar

3.5.2.2.1. Metodo di inclusione in agar

Usare capsule di Petri di diametro di 90 mm, aggiungere 1 mL della sospensione primaria o della diluizione del campione e versare da 15 mL a 20 mL del terreno TSA (3.3.3.1.) mantenuto in bagnomaria a $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$. Se si utilizzano capsule di Petri più grandi, la quantità di terreno di agar è aumentata di conseguenza.

Miscelare la sospensione primaria e/o la diluizione del campione con il terreno, ruotando o inclinando con cura le capsule, in misura sufficiente a ottenere la dispersione nella compagine

del terreno. Lasciare solidificare la miscela nelle capsule di Petri su una superficie orizzontale a temperatura ambiente.

3.5.2.2.2. Metodo della semina su agar

Usare capsule di Petri di diametro di 90 mm, versare in ciascuna capsula da 15 mL a 20 mL di terreno TSA (3.3.3.1.) mantenuto in bagnomaria a $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$. Se si utilizzano capsule di Petri più grandi, la quantità di terreno di agar è aumentata di conseguenza. Lasciare raffreddare e solidificare le capsule, per esempio sotto cappa sterile. Seminare sulla superficie del terreno agarizzato un volume di almeno 0,1 mL della sospensione primaria e/o della diluizione del campione.

3.5.2.2.3. Metodo della filtrazione su membrana

Utilizzare membrane filtranti con dimensioni nominali dei pori non superiori a 0,45 μm .

Trasferire sulla membrana una quantità appropriata della sospensione primaria o della diluizione del campione (che rappresenti preferibilmente 1 g o 1 mL del prodotto, o meno se è previsto un numero elevato di colonie). Filtrare immediatamente aggiungendo una soluzione sterile adatta (secondo la procedura eseguita durante la verifica, 3.8.3.4.).

Trasferire la membrana sulla superficie del terreno TSA (3.3.3.1.).

3.5.2.2.4. Incubazione

Incubare le capsule di terreno agarizzato capovolte a $(30\div 35)^\circ\text{C}$ per (72 ± 6) ore. Dopo l'incubazione, le capsule devono, se possibile, essere esaminate immediatamente. Altrimenti, possono essere conservate, se non diversamente specificato, per un massimo di 24 ore in frigorifero.

In determinati casi, dove sussista la possibilità di confondere particelle del prodotto con le colonie contate, può essere utile preparare capsule in duplicato contenenti le stesse diluizioni del campione e il terreno all'agar conservate in frigorifero per il confronto con le colture cresciute dopo incubazione.

3.6. Conteggio delle colonie sui terreni agarizzati

Dopo l'incubazione, contare le colonie:

- in capsule di Petri contenenti da 30 a 300 colonie; se sono osservate meno di 30 colonie, fare riferimento a 3.7.2.2.
- su membrane contenenti da 15 a 150 colonie; se sono osservate meno di 15 colonie, fare riferimento a 3.7.2.2.

3.7. Espressione dei risultati

3.7.1. Metodo di calcolo per la conta su agar

Calcolare il numero N di microrganismi presenti nel campione S , utilizzando:

- \bar{m} , la media aritmetica delle conte ottenute dai conteggi in duplicato nell'equazione:

$$N = \bar{m}/(V \times d) \quad [1]$$

- c , il numero di colonie contate in una singola piastra nell'equazione:

$$N = c/(V \times d) \quad [2]$$

- $w\bar{m}$, la media ponderata delle conte ottenute da due diluizioni successive nell'equazione:

$$N = w\bar{m}/(V \times d) \quad [3]$$

dove:

\bar{m} è la media aritmetica delle conte ottenute dai conteggi in duplicato;

V è il volume di inoculo per ogni piastra, in millilitri;

d è il fattore di diluizione corrispondente alla diluizione eseguita per la preparazione della sospensione primaria (3.5.1.) o per la prima diluizione contata;

c è il numero delle colonie contate in una singola piastra;

La media ponderata delle colonie contate da due diluizioni successive è calcolata come segue:

$$w\bar{m}_c = \sum c / n_1 + 0,1 n_2$$

dove:

$\sum c$ è la somma delle colonie contate nelle piastre di due diluizioni successive che hanno dato intervalli di lettura leggibili

n_1 è il numero di piastre contate per la sospensione iniziale (o per la prima diluizione contata);

n_2 è il numero di piastre contate per la diluizione 1:10 della sospensione primaria (o per la seconda diluizione contata).

Arrotondare il risultato calcolato a due cifre significative. Pertanto, approssimare il risultato, per difetto quando il valore è $\leq 0,5$, altrimenti per eccesso. Registrare il numero N ottenuto.

3.7.2. Interpretazione dei risultati

Si dovrebbe tenere conto della variabilità dei conteggi delle colonie sui terreni colturali. Due risultati dovrebbero essere considerati diversi solo se la differenza supera il 50% oppure, quando espressa in scala logaritmica, la differenza supera 0,3.

Per una conta precisa, si dovrebbe tenere conto solo delle piastre con più di 30 colonie e meno di 300, e delle membrane con più di 15 colonie e meno di 150. Controllare che le conte siano ottenute da diluizioni verificate in base al metodo (3.8.).

3.7.2.1. Se il numero di UFC è compreso tra 30 e 300 nelle piastre oppure tra 15 e 150 sulle membrane, esprimere il risultato nel modo seguente:

– se S è almeno 1 g o 1 mL e V è almeno 1 mL, il numero di batteri vitali mesofili aerobi per millilitro o per grammo del campione è $= N/S$;

– se S è minore di 1 g o di 1 mL e/o V è minore di 1 mL, il numero di batteri vitali mesofili aerobi nel campione (annotare la quantità sottoposta a prova del campione tenendo conto di S e V) è $= N$.

dove S è la massa o V il volume del campione

Esprimere il risultato come un numero compreso tra 1,0 e 9,9 moltiplicato per la una potenza di 10 (esempi 1, 2, 3, 7).

3.7.2.2. Dove il numero di UFC è minore di 30 nelle piastre o di 15 sulle membrane, esprimere il risultato come segue:

– se S è almeno 1 g o 1 mL e V è almeno 1 mL, il numero stimato di batteri vitali mesofili aerobi per millilitro o per grammo del campione è $= N/S$;

– se S è minore di 1 g o di 1 mL e/o V è minore di 1 mL, il numero stimato di batteri vitali mesofili aerobi nel campione è $= N$.

dove S è il peso o V il volume esatto del campione.

Esprimere il risultato come un numero compreso tra 1,0 e 9,9 moltiplicato per una potenza di 10 (esempi 4, 5, 6).

3.7.2.3. Se non sono osservate colonie, il risultato è riportato come segue:

- minore di $1/d \times V \times S$ di batteri vitali mesofili aerobi per grammo o millilitro di prodotto (S è almeno 1 g o 1 mL);
- minore di $1/d \times V$ di batteri vitali mesofili aerobi nel campione S (registrare la quantità sottoposta a prova del campione tenendo conto di S e V) (S è minore di 1 g o 1 mL);

dove

d è il fattore di diluizione della sospensione primaria

V è 1 (per la conta con il metodo di inclusione in agar e per la filtrazione su membrana) oppure 0,1 (per il metodo di diffusione su agar).

3.7.3. Esempi

3.7.3.1. Esempio 1: Due piastre per una diluizione

$S = 1$ g o 1 mL; $V = 1$; conte ottenute: per la diluizione 10^{-1} : 38 e 42.

Per l'equazione [1]:

$N = \bar{m}/(V \times d) = 40/(1 \times 10^{-1}) = 40/0,1 = 400$ o 4×10^2 batteri vitali mesofili aerobi per millilitro o per grammo del campione.

3.7.3.2. Esempio 2: Una piastra per una diluizione

$S = 1$ g o 1 mL; $V = 1$; conta ottenuta: per la diluizione 10^{-1} : 60.

Per l'equazione [2]:

$N = c/(V \times d) = 60/(1 \times 10^{-1}) = 60/0,1 = 600$ o 6×10^2 batteri vitali mesofili aerobi per millilitro o per grammo del campione.

3.7.3.3. Esempio 3: Due piastre per due diluizioni

$S = 1$ g o 1 mL; $V = 1$; conte ottenute: per la diluizione 10^{-2} : 235 e 282; per la diluizione 10^{-3} : 31 e 39.

Per l'equazione [3]:

$N = w\bar{m}/(V \times d) = 235 + 282 + 31 + 39/(2 + 0,1 \times 2) \times 10^{-2} = 587/0,022 = 26\ 682$.

Arrotondando il risultato come specificato sopra si ottiene 27 000 o $2,7 \times 10^4$ batteri vitali mesofili aerobi per millilitro o per grammo del campione.

3.7.3.4. Esempio 4: Due membrane per una diluizione

$S = 1$ g o 1 mL; $V = 1$; conte ottenute: per la diluizione 10^{-1} : 18 e 22.

Per l'equazione [1]:

$N = \bar{m}/(V \times d) = 20/(1 \times 10^{-1}) = 20/0,1 = 200$ o 2×10^2 batteri vitali mesofili aerobi per millilitro o per grammo del campione.

3.7.3.5. Esempio 5: Una membrana per una diluizione

$S = 1$ g o 1 mL; $V = 1$; conta ottenuta: per la diluizione 10^{-1} : 65.

Per l'equazione [2]:

$N = c/(V \times d) = 65/(1 \times 10^{-1}) = 65/0,1 = 650$ o $6,5 \times 10^2$ batteri vitali mesofili aerobi per millilitro o per grammo del campione.

3.7.3.6. Esempio 6: Due membrane per due diluizioni

$S = 1$ g o 1 mL; $V = 1$; conte ottenute: per la diluizione 10^{-1} : 121 e 105; per la diluizione 10^{-2} : 15 e 25.

Per l'equazione [3]:

$N = w\bar{m}/(V \times d) = 121 + 105 + 15 + 25/(2 + 0,1 \times 2) \times 10^{-1} = 266/0,22 = 1\ 209$.

Arrotondando il risultato come specificato sopra si ottiene 1 200 o $1,2 \times 10^3$ batteri vitali mesofili aerobi per millilitro o per grammo del campione.

3.7.3.7. Esempio 7: Due piastre per una diluizione

$S = 1$ g o 1 mL; $V = 1$; conte ottenute per la diluizione 10^{-1} : 28 e 22.

Per l'equazione [1]:

$$N = \bar{m}/(V \times d) = 25/(1 \times 10^{-1}) = 25/0,1 = 250.$$

Il numero stimato è 250 o $2,5 \times 10^2$ batteri vitali mesofili aerobi per millilitro o per grammo del campione.

3.7.3.8. Esempio 8

$S = 1$ g o 1 mL; $V = 1$; conte ottenute per la diluizione 10^{-1} : 0 e 0.

Per l'equazione [1]:

$$N \leq 1/(V \times d), \leq 1/(1 \times 10^{-1}), \leq 1/0,1, \leq 10.$$

Il numero stimato è minore di 10 batteri vitali mesofili aerobi per millilitro o per grammo del campione.

3.7.3.9. Esempio 9

$S = 1$ g o 1 mL; $V = 1$; conte ottenute per la diluizione 10^{-1} , 0 e 3.

Per l'equazione [1]:

$$N \leq \bar{m}/(V \times d), \leq 1,5/(1 \times 10^{-1}), \leq 1,5/0,1, \leq 15.$$

Il numero stimato è minore di 15 batteri vitali mesofili aerobi per millilitro o per grammo del campione.

3.8. Neutralizzazione delle proprietà antimicrobiche del prodotto

3.8.1. Generalità

La procedura descritta di seguito deve essere eseguita in parallelo con l'analisi del prodotto da esaminare. Le diverse prove devono tendere e dimostrare che i microrganismi possono crescere nelle condizioni previste dall'analisi e permettono di stabilire che il metodo è idoneo alla crescita dei microrganismi ricercati.

I due ceppi (3.4.) utilizzati per dimostrare la validità di queste proprietà sono generalmente sensibili agli agenti antimicrobici.

3.8.2. Preparazione dell'inoculo

Prima dell'analisi, e per ogni ceppo, inoculare la superficie di un terreno agarizzato non selettivo, non neutralizzante (TSA) (3.3.3.1.). Incubare il terreno a $(30 \div 35)^\circ\text{C}$ per $(18 \div 24)$ ore.

Dopo crescita delle colonie, utilizzando un'ansa sterile, prelevare le colonie e risospendere nel diluente (3.3.1.3.) per ottenere una sospensione tarata di circa 1×10^8 UFC per mL (per esempio, utilizzando uno spettrofotometro).

Utilizzare questa sospensione e le sue diluizioni entro 2 ore.

3.8.3. Verifica dei metodi di conta su terreno agarizzato

3.8.3.1. Principio

Per ogni ceppo miscelare il campione neutralizzato (sospensione primaria o diluizione del campione in base all'attività antimicrobica o alla bassa solubilità del prodotto) con una sospensione dei microrganismi (3.4.). Eseguire la semina su una piastra di Petri o la filtrazione su membrana. Dopo incubazione, controllare la natura delle colonie e confrontare la conta con il controllo (senza il campione).

Se la conta è minore del 50% (0,3 log) rispetto a quella ottenuta nel controllo, modificare la procedura (diluenti, agenti di neutralizzazione o la combinazione di entrambi). La mancata capacità di crescita dell'inoculo invalida la prova a meno che non sia possibile considerare improbabile la contaminazione del prodotto da parte dei microrganismi.

3.8.3.2. Verifica del metodo di inclusione in agar

Miscelare 9 mL della sospensione primaria e/o della/e diluizione/i del campione nel diluente neutralizzante (3.3.1.) con 1 mL di una sospensione dei microrganismi (3.4.) contenente da 1000 UFC/mL a 3000 UFC/mL. Trasferire 1 mL in una piastra di Petri (preferibilmente in duplicato) (piastra *a*, prova di verifica) e versare da 15 mL a 20 mL del terreno TSA fuso (3.3.3.1.) mantenuto in bagnomaria a $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$. In parallelo, seminare in una piastra un controllo (piastra *b*, prova di controllo) utilizzando lo stesso diluente e la stessa sospensione di microrganismi, ma senza il campione.

Dopo incubazione di $(24 \div 72)$ ore a $(30 \div 35)^\circ\text{C}$, contare le colonie sulle piastre *a* e *b*, e confrontare le conte ottenute. Il diluente e il metodo di conta sono ritenuti idonei alla diluizione 1:10 (quando è utilizzato 1 mL della sospensione primaria) se il numero di colonie sulla piastra *a* è almeno il 50% (0,3 log) rispetto al numero di colonie sulla piastra *b*.

3.8.3.3. Verifica del metodo di semina su agar

Miscelare 9 mL della sospensione primaria e/o della/e diluizione/i del campione nel diluente neutralizzante (3.3.1.) con 1 mL di una sospensione dei microrganismi (3.4.) contenente da 10000 UFC/mL a 30000 UFC/mL (o meno, se sono utilizzati 0,5 mL o 1 mL). Distribuire almeno 0,1 mL su una piastra di terreno TSA (3.3.3.1.) (preferibilmente in duplicato) (piastra *a*, prova di verifica). In parallelo, seminare in una piastra un controllo (piastra *b*, prova di controllo) utilizzando lo stesso diluente e la stessa sospensione di microrganismi, ma senza il campione.

Dopo incubazione di $(24 \div 72)$ ore a $(30 \div 35)^\circ\text{C}$, contare le colonie sulle piastre *a* e *b*, e confrontare le conte ottenute. Il diluente e il metodo di conta sono considerati idonei alla diluizione 1:10 (quando è utilizzato 1 mL della sospensione primaria) se il numero di colonie sulla piastra *a* è almeno il 50% (0,3 log) rispetto al numero di colonie sulla piastra *b*.

3.8.3.4. Verifica del metodo di filtrazione su membrana

Miscelare al volume della sospensione primaria o di una diluizione del campione utilizzate nell'analisi (3.5.2.2.3.) una quantità appropriata di una sospensione a titolo noto dei microrganismi (3.4.) corrispondenti a circa 100 UFC.

Filtrare l'intero volume e aggiungere immediatamente volumi definiti di diluente (3.3.1.2.) o diluente neutralizzante (3.3.1.1.). Trasferire la membrana sulla superficie del terreno TSA (3.3.3.1.) (piastra *a*, prova di verifica).

In parallelo, preparare un controllo nelle stesse condizioni di cui sopra, ma senza il prodotto. Filtrare procedendo come per l'analisi (piastra *b*, prova di controllo).

Dopo incubazione di (24÷72) ore a (30÷35)°C, contare le colonie sulle membrane e confrontare le conte ottenute. Il metodo di filtrazione su membrana e il diluente sono considerati idonei se il numero di colonie sulla piastra *a* è almeno il 50% (0,3 log) rispetto al numero di colonie sulla piastra *b*.

3.9. Metodo di arricchimento

3.9.1. Preparazione della sospensione primaria

La sospensione primaria è preparata da un campione di almeno 1 g o 1 mL del prodotto ben miscelato e disperso in almeno 9 mL di brodo di arricchimento (3.3.2.1.). Possono essere richiesti volumi maggiori di brodo di arricchimento se nella diluizione 1:10 sono ancora presenti proprietà antimicrobiche.

3.9.2. Incubazione

Incubare la sospensione primaria preparata nel brodo di arricchimento (3.3.2.1.) a (30÷35)°C per (20÷24) ore.

3.9.3. Subcoltura

Utilizzando una pipetta sterile, trasferire da 0,1 mL a 0,5 mL della brodocoltura sulla superficie del terreno agarizzato TSA solidificato in piastre di Petri di 90 mm di diametro (3.3.3.1.).

3.9.4. Incubazione della subcoltura

Incubare il terreno, con l'accorgimento di capovolgere le capsule, a (30÷35)°C per (48÷72) ore.

3.9.5. Sviluppo delle colonie

Dopo incubazione, controllare la superficie dell'agar e registrare la presenza o l'assenza di crescita.

3.9.6. Espressione dei risultati

In caso di crescita, esprimere il risultato come:

“Presenza di batteri vitali mesofili aerobi nel campione *S*”,

Se non si evidenzia alcuna crescita, esprimere i risultati come:

“Assenza di batteri vitali mesofili aerobi nel campione *S*”.

3.10. Neutralizzazione delle proprietà antimicrobiche del prodotto

3.10.1. Generalità

La procedura descritta di seguito deve essere eseguita in parallelo con l'analisi del prodotto da esaminare. Le diverse prove devono tendere a dimostrare che i microrganismi possono crescere nelle condizioni di analisi e permettono di stabilire che il metodo è idoneo alla crescita dei microrganismi ricercati.

I due ceppi (3.4.) utilizzati per dimostrare la validità di queste proprietà sono generalmente sensibili agli agenti antimicrobici.

3.10.2. Preparazione dell'inoculo

Prima dell'analisi, e per ogni ceppo separatamente, inoculare la superficie di un terreno non selettivo, non neutralizzante (TSA) (3.3.3.1.) e incubare a (30÷35)°C per (18÷24) ore.

Dopo crescita, con un'ansa sterile, prelevare le colonie e risospendere nel diluente (3.3.1.3.) per ottenere una conta finale compresa tra 100 UFC/mL e 500 UFC/mL. Per contare la concentrazione finale dei microrganismi nella sospensione a titolo noto, trasferire 1 mL della sospensione in una piastra di Petri e versarvi da 15 mL a 20 mL del terreno TSA (3.3.3.1.) mantenuto in bagnomaria a (45 ± 1)°C. Lasciare solidificare e poi incubare a (30÷35)°C per (20÷24) ore.

Utilizzare questa sospensione e le sue diluizioni entro 2 ore.

3.10.3. Verifica del metodo di arricchimento

3.10.3.1. Principio

Miscelare il campione in brodo di arricchimento neutralizzante con una sospensione di ciascuno dei due microrganismi (3.4.). Dopo incubazione, subcoltivare una aliquota della brodocoltura su terreno non selettivo, non neutralizzante (TSA) (3.3.3.1.) per controllare la presenza o assenza di crescita dei microrganismi inoculati.

3.10.3.2. Procedura

Preparare due provette o due matracci con la sospensione primaria nelle condizioni scelte per l'analisi - almeno 1 g o 1 mL di prodotto in un volume definito di brodo di arricchimento (3.3.2.1.).

Incubare una provetta o un matraccio con la sospensione primaria (*b*, di controllo) a (30÷35)°C per (20÷24) ore.

Incubare a (30÷35)°C per (20÷24) ore l'altra provetta o l'altro matraccio previo inoculo, in condizioni asettiche, di 0,1 ml della sospensione a titolo noto dei microrganismi (3.4.) (*a*, di verifica).

Per ogni provetta o matraccio, e utilizzando una pipetta sterile, trasferire da 0,1 ml a 0,5 ml (stesse condizioni dell'analisi) della brodocoltura su un terreno non selettivo, non neutralizzante (TSA) (3.3.3.1.) e incubare a (30÷35)°C per (24÷72) ore.

3.10.3.3. Interpretazione dei risultati di verifica

Per ogni ceppo, verificare che la sospensione di batteri a titolo noto contenga tra 100 UFC per ml e 500 UFC per ml.

La neutralizzazione e il metodo sono considerati adeguati quando si manifesta crescita dei microrganismi inoculati: colonie bianco-giallastro per *Staphylococcus aureus* e colonie dal verde al giallo per *Pseudomonas aeruginosa*, sul terreno di verifica (*a*), mentre sul terreno di controllo (*b*) non si manifesta alcuna crescita. Tuttavia, per quanto riguarda il controllo, se si evidenzia crescita sul terreno, il prodotto è contaminato; se non si osserva crescita il metodo è comunque idoneo, ma il prodotto non risulta contaminato.

Invece, la mancanza di crescita sulle piastre di verifica indica ancora presenza di attività antimicrobica; pertanto è necessaria una modifica delle condizioni del metodo che può comprendere: aumento del volume del brodo nutritivo, con la quantità di prodotto invariata, o incorporazione di una quantità sufficiente di agente inattivante nel brodo di arricchimento, o combinazione appropriata di modifiche in modo da consentire la crescita batterica.

Se nonostante l'incorporazione di agenti inattivanti idonei e un sostanziale aumento del volume del brodo non fosse ancora possibile recuperare colture vitali come descritto sopra,

indicare che il prodotto cosmetico non ha probabilità di essere contaminato con le specie batteriche saggiate.

Bibliografia di riferimento

Lundov MD, Moesby L, Zachariae C, Johansen JD. Contamination versus preservation of cosmetics: a review on legislation, usage, infections, and contact allergy. *Contact Dermat* 2009;60:70-8.

UNI EN ISO 21149:2009. *Cosmetici - Microbiologia - Conta e ricerca dei batteri mesofili aerobi*. Milano: Ente Italiano di Unificazione; 2009,

DETERMINAZIONE DI *PSEUDOMONAS AERUGINOSA*

0. Generalità

Gli aspetti di sintesi di seguito presentati si riferiscono al parametro *Pseudomonas aeruginosa* rilevato con il metodo ISS Co 002A rev. 00.

I microrganismi appartenenti alla specie *Pseudomonas aeruginosa* sono batteri a forma di bastoncello diritto o leggermente ricurvo, con lunghezza di 1,5÷3 µm e larghezza compresa tra 0,5 e 0,7 µm, motili tramite uno o più flagelli polari, gram-negativi, aerobi, ossidasi e catalasi positivi, con metabolismo respiratorio ma in grado anche di utilizzare i nitrati come accettori di elettroni alternativi all'ossigeno. La maggioranza dei ceppi cresce a 42°C ma non a 4°C. *P. aeruginosa* si caratterizza per la produzione di pigmenti solubili: piocianina di colore verde-blu, piorubina di colore rossastro-marrone e fluoresceina evidenziabile per fluorescenza. Più del 90% dei ceppi produce piocianina e un rapporto inversamente proporzionale sembra esistere tra i tassi di crescita e la produzione di piocianina; infatti, a decrementi del tasso di crescita corrisponderebbero incrementi nella produzione di questo pigmento.

P. aeruginosa è in grado di aderire a superfici umide o in contatto con liquidi grazie alla produzione, da parte di ceppi mucoidi o non mucoidi, di lipopolisaccaridi e glicoproteine extracellulari, rappresentando quindi uno dei microrganismi propri dei biofilm. Si caratterizza anche per essere multi-resistente agli antibiotici, rappresentando quindi un rischio per la salute soprattutto in ambienti ospedalieri. Oltre ad essere un opportunisto patogeno per soggetti immunocompromessi, e quindi agente potenziale di infezioni delle vie urinarie, delle ustioni e delle ferite, setticemie, gastroenteriti nei neonati, ascessi, broncopolmoniti e meningiti, può anche essere causa di ulcere corneali e cheratiti.

P. aeruginosa è un microrganismo caratterizzato da una elevata capacità di adattamento nell'ambiente. Inoltre, è in grado di crescere in acqua distillata e di sopravvivere nei disinfettanti. Questa plasticità di crescita fa di *P. aeruginosa* un microrganismo che è in grado di colonizzare anche altre matrici non di origine ambientale. È il caso dei prodotti cosmetici e da toiletta in cui può essere rilevato. Risulta infatti che, in creme idratanti, solari e lozioni, può essere presente, così come anche batteri gram-negativi a testimonianza del fatto che sono batteri largamente presenti nell'ambiente e in grado di crescere nonostante i conservanti presenti in questo tipo di prodotti. Altri studi hanno messo in evidenza come alcune infezioni nosocomiali da *P. aeruginosa* potevano essere ricondotte all'utilizzo di lozioni per la pulizia delle mani, contaminate dal batterio e utilizzate dagli infermieri operanti nell'ospedale. Sono stati anche segnalati danni in area perioculare o anche causati da mascara contaminati da *P. aeruginosa* in pazienti ricoverati in ospedale per ulcere corneali.

Il parametro è da considerare un potenziale rischio per la salute del consumatore e manifesta capacità di incidere sulle proprietà chimico-fisiche della formula cosmetica.

Pertanto, secondo le raccomandazioni di *Cosmetics Europe* e le linee guida dell'SCCS, *P. aeruginosa* deve risultare non rilevabile in 1 g o 1 mL nei cosmetici per bambini o in cosmetici da utilizzare nella zona perioculare (Categoria 1), come anche in cosmetici di Categoria 2 in cui deve essere assente in 0,1 g o 0,1 mL del prodotto.

1. Campo di applicazione

La procedura analitica viene utilizzata per il rilevamento e l'identificazione di *Pseudomonas aeruginosa* in prodotti cosmetici.

2. Termini e definizioni

Per lo specifico fine analitico, si applicano i seguenti termini e definizioni:

- *Pseudomonas aeruginosa*
Batterio gram-negativo a forma di bastoncello, mobile; colonie uniformi generalmente pigmentate in marrone o verdastro.
- *Brodo di arricchimento*
Terreno liquido non selettivo contenente neutralizzanti e/o agenti di dispersione e utilizzato per il prodotto sottoposto ad analisi.
- *Campione*
Porzione del prodotto (S) di almeno 1 mL o g utilizzata nell'analisi per preparare la sospensione primaria.
- *Diluizione/i del campione*
Diluizione/i della sospensione primaria.
- *Prodotto*
Prodotto cosmetico ricevuto nel laboratorio per le prove.
- *Sospensione primaria*
Sospensione (o soluzione) del campione in un volume definito di un adeguato terreno in brodo (diluente, neutralizzante, brodo di arricchimento o una loro combinazione).

3. Metodo

3.1. Principio del metodo

La prima fase del metodo consiste nell'eseguire un arricchimento utilizzando un terreno in brodo non selettivo per aumentare il numero di microrganismi. La seconda fase del metodo viene eseguita su un terreno selettivo seguita da prove di conferma.

Deve essere neutralizzata l'eventuale inibizione della crescita microbica. In tutti i casi, deve essere controllata e verificata, a prescindere dalla metodologia, la neutralizzazione delle proprietà antimicrobiche del prodotto.

La procedura analitica è in linea con la norma UNI EN ISO 22717.

3.2. Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio (*vedi* sezione 2. Apparecchiature e attrezzature di base nel capitolo "Analisi microbiologiche dei prodotti cosmetici: linee guida per le buone pratiche di laboratorio").

3.3. Diluenti e terreni di coltura

3.3.1. Terreno di arricchimento

Il brodo di arricchimento è utilizzato per disperdere il campione e per aumentare la popolazione microbica iniziale. Esso può contenere neutralizzanti se il campione ha proprietà antimicrobiche. Deve essere dimostrata l'efficacia della neutralizzazione (3.6.).

Il seguente brodo di arricchimento è idoneo per verificare la presenza di *Pseudomonas aeruginosa* purché sia verificato in conformità a 3.6. Possono essere utilizzati altri diluenti e terreni di coltura qualora si siano dimostrati idonei all'uso.

3.3.1.1. Brodo Eugon LT 100

Composizione	
Digerito pancreatico di caseina	15 g
Digerito papainico di farina di soia	5 g
Sodio cloruro	4 g
Solfito di sodio	0,2 g
Destrosio	5,5 g
L-cistina	0,7 g
Lecitina di uova	1 g
Polisorbato 80	5 g
Octoxilolo 9	1 g
Acqua distillata	1000 mL
pH 7,0±0,2	

In questa formulazione sono contenuti ingredienti neutralizzanti, quali la lecitina e il polisorbato 80, e un agente di dispersione l'octoxilolo 9, che vengono aggiunti quando sono presenti sostanze antimicrobiche e il prodotto è immiscibile in acqua.

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara, controlla e conserva secondo le istruzioni della ditta produttrice. Sciogliere i componenti, polisorbato 80, octoxilolo 9 e lecitina di uova, uno dopo l'altro. Successivamente, sciogliere gli altri componenti miscelando durante il riscaldamento. Distribuire il terreno in contenitori idonei. Sterilizzare in autoclave a $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ per 15 minuti. Conservare a riparo dalla luce a $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ per non più di un mese in condizioni ottimali.

3.3.2. Terreno selettivo per l'isolamento

3.3.2.1 Agar alla Cetrimide

Composizione	
Digerito pancreatico di gelatina	20 g
Cloruro di magnesio	1,4 g
Solfato di potassio	10 g
Cetrimide (cetiltrimetilammonio bromuro)	0,3 g
Agar	13,6 g
Glicerolo	10 mL
Acqua distillata	1000 mL
pH 7,2±0,2	

Il terreno di base si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara, controlla e conserva secondo le istruzioni della ditta produttrice. Aggiungere per ogni litro di terreno 10 mL di glicerolo. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente fino ad ottenere la completa

dissoluzione degli ingredienti. Sterilizzare in autoclave a $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ per 15 minuti. Lasciare raffreddare fino a circa 50°C . Distribuire in piastre di Petri. Conservare a riparo dalla luce a $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ per non più di un mese in condizioni ottimali.

3.3.3. Terreno selettivo per la conferma

3.3.3.1. Terreno agarizzato per la piocianina

Composizione	
Digerito pancreatico di gelatina	20 g
Cloruro di magnesio	1,4 g
Solfato di potassio	10 g
Agar	15 g
Glicerolo	10 mL
Acqua distillata	1000 mL
pH	$7,2 \pm 0,2$

Sciogliere i componenti in acqua e alla fine aggiungere il glicerolo. Riscaldare, agitando frequentemente, poi portare ad ebollizione fino ad ottenere la completa dissoluzione degli ingredienti. Sterilizzare in autoclave a $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ per 15 minuti. Conservare a riparo dalla luce a $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ per non più di un mese in condizioni ottimali.

3.3.4. Diluente per la sospensione batterica

3.3.4.1. Soluzione di cloruro di sodio triptone

Il diluente è utilizzato per la preparazione della sospensione batterica utilizzata per la procedura di verifica (3.6.).

Composizione	
Digerito pancreatico di caseina	1 g
Cloruro di sodio	8,5 g
Acqua distillata	1000 mL
pH	$7,0 \pm 0,2$

Sciogliere i componenti in acqua miscelando durante il riscaldamento. Distribuire in contenitori idonei. Sterilizzare in autoclave a $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ per 15 minuti. Conservare a riparo dalla luce a $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ per non più di un mese in condizioni ottimali.

3.3.5. Terreno di crescita

3.3.5.1. Triptone Soia Agar

Composizione	
Digerito pancreatico di caseina	15 g
Digerito enzimatico di farina di soia	5 g
Sodio cloruro	5 g
Agar	15 g
Acqua distillata	1000 mL
pH	$7,3 \pm 0,2$

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara, controlla e conserva secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente. Sterilizzare in autoclave a $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ per 15 minuti. Conservare a riparo dalla luce a $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ per non più di un mese in condizioni ottimali.

3.4. Ceppi dei microrganismi

Per la verifica delle condizioni di analisi dovrebbe essere utilizzato *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027 o un ceppo equivalente (CIP 82.118 o NCIMB 8626 o NBRC 13275 o KCTC 2513). Utilizzare comunque ceppi certificati.

3.5. Procedura

Utilizzare materiale sterile, apparecchiature e tecniche aseptiche per preparare il campione, la sospensione primaria e le diluizioni. Nel caso della preparazione della sospensione primaria in un agente solubilizzante, il tempo trascorso tra la fine della preparazione e il momento in cui l'inoculo viene a contatto con il brodo di arricchimento non deve superare i 45 min, se non specificamente menzionato in protocolli o documenti di riferimento.

3.5.1. Preparazione della sospensione primaria nel brodo di arricchimento

La fase di arricchimento prevede la miscelazione di un campione di almeno 1 g o 1 mL del prodotto in almeno 9 mL di brodo di arricchimento (3.3.1.1.).

Annotare *S*, il peso o il volume esatto del campione.

Il metodo deve essere controllato per garantire che la composizione (neutralizzante eventualmente aggiunto) e il volume del brodo diano prestazioni soddisfacenti (3.6.).

In alcuni casi, e quando possibile, la filtrazione del prodotto cosmetico attraverso una membrana, in seguito immersa nel brodo di arricchimento, facilita la neutralizzazione delle proprietà antimicrobiche del prodotto (3.6.3.).

3.5.2. Incubazione del brodo di arricchimento

Incubare il brodo di arricchimento miscelato con la sospensione primaria preparata a $(30\div 35)^\circ\text{C}$ per almeno 20 ore (massimo 72 ore).

3.5.3. Isolamento

Dopo incubazione, utilizzando un'ansa sterile, strisciare una aliquota della brodocoltura di arricchimento sulla superficie del terreno selettivo di isolamento (3.3.2.1.) al fine di ottenere colonie isolate.

Incubare la piastra capovolta a $(30\div 35)^\circ\text{C}$ per 24 ore. In caso di risultato negativo protrarre l'incubazione non oltre le 48 ore e ripetere la lettura.

Dopo incubazione verificare le colonie caratteristiche.

I microrganismi, appartenenti alla specie *P. aeruginosa*, producono su Agar alla cetrimide colonie di colore giallo-verde, per la produzione di piocianina, fluorescenti sotto la luce di Wood.

Per verificare la presenza di *P. aeruginosa* è opportuno sottoporre a prove di conferma le colonie tipiche isolate. È anche possibile procedere all'identificazione delle specie con le prove biochimiche dei kit miniaturizzati, disponibili in commercio.

3.5.4. Conferma

Per l'accertamento dell'appartenenza dei microrganismi alla specie *P.aeruginosa*, è opportuno procedere all'esecuzione delle seguenti prove di conferma:

- Colorazione di Gram;
- Prova della citocromossidasi;
- Coltura sul terreno selettivo per la ricerca di piocianina.

Prima di effettuare ciascuna prova, è necessario prelevare con un'ansa sterile le colonie sospette sviluppatesi sul substrato di isolamento isolandole su terreno di crescita Triptone Soia Agar (3.3.5.1.). Incubare a (30÷35)°C per (18÷24) ore. Eseguire tutte le prove su colonie con non più di 24 ore di sviluppo.

3.5.4.1. Colorazione di Gram

Verificare la presenza di gram-negativi a forma di bastoncello (bacilli).

3.5.4.2. Prova della presenza della citocromossidasi

Verificare la presenza dell'enzima in base a "Tecniche microbiologiche di base" (9.4). *P. aeruginosa* è citocromossidasi positivo.

3.5.4.3. Coltura sul terreno di conferma

Inoculare la superficie del terreno agarizzato per la ricerca di piocianina (3.3.3.1.) con colonie isolate sospette cresciute sul terreno Agar alla ceftrimide (3.3.2.1.). Incubare a (30÷35)°C. Verificare la crescita dopo 24 ore, 48 ore e 72 ore. *P. aeruginosa* forma colonie circondate da una zona da blu a verde dovuta alla formazione di piocianina o con una zona da rosso a marrone scuro dovuta alla produzione di piorubina.

3.5.5. Espressione dei risultati

Se le colonie sono confermate come *P. aeruginosa*, esprimere il risultato come:

Presenza di *P. aeruginosa* nel campione, *S*.

Se non è osservata alcuna crescita dopo l'arricchimento e/o non sono state confermate le colonie, esprimere il risultato come:

Assenza di *P. aeruginosa* nel campione, *S*.

3.6. Neutralizzazione delle proprietà antimicrobiche del prodotto

3.6.1. Generalità

Le diverse prove descritte permettono di dimostrare che il microrganismo può crescere nelle condizioni previste dall'analisi.

3.6.2. Preparazione dell'inoculo

Prima dell'analisi, inoculare la superficie del terreno agarizzato non selettivo, non neutralizzante (TSA) (3.3.5.1.), con *P.aeruginosa*. Incubare la piastra a (30÷35)°C per (18÷24) ore.

Con un'ansa sterile, prelevare le colonie e risospendere nel diluente (3.3.4.1.) per ottenere una sospensione con una concentrazione di circa 1×10^8 UFC/mL di *P. aeruginosa* (per esempio, utilizzando uno spettrofotometro).

Utilizzare questa sospensione e le sue diluizioni entro 2 ore.

3.6.3. Verifica del metodo di ricerca

3.6.3.1. Procedura

Nelle provette con 9 mL di diluente (3.3.4.1.), preparare una diluizione della sospensione (3.6.2.) al fine di ottenere una conta finale compresa tra 100 ÷ 500 UFC/mL. Per calcolare la concentrazione finale dei microrganismi vitali nella sospensione diluita, trasferire 1 mL della sospensione in una piastra di Petri e versarvi 15 ÷ 20 mL del terreno TSA (3.3.5.1.) mantenuto in bagnomaria a (45 ± 1)°C. Lasciare solidificare e poi incubare a (34 ± 1)°C per (20 ÷ 24) ore.

Preparare in duplicato la sospensione primaria (3.5.1.) (almeno 1 g o 1 mL di prodotto) in provette o in matracci (per la prova *a* di verifica e per la prova *b* di controllo). Quando si utilizza il metodo di filtrazione per membrana, filtrare in duplicato almeno 1 mL di prodotto e trasferire ogni membrana in una provetta o in un matraccio contenente il brodo di arricchimento nelle condizioni scelte per l'analisi.

Introdurre sterilmente 0,1 mL della sospensione di microrganismi in una provetta o in un matraccio (prova di verifica, *a*).

Miscelare, quindi incubare entrambe le provette o i matracci (prova di verifica *a* e di controllo *b* non inoculato) a (30 ÷ 35)°C per (20 ÷ 24) ore.

Eeguire un isolamento da ognuna delle provette o dei matracci. Utilizzando un'ansa sterile, strisciare sulla superficie del terreno di agar alla cetrimide (3.3.2.1). Incubare a (30 ÷ 35)°C per (24 ÷ 48) ore.

3.6.4. Interpretazione dei risultati di verifica

Verificare che la sospensione batterica contenga 100 ÷ 500 UFC/mL.

La neutralizzazione e il metodo sono considerati idonei se si manifesta crescita di *P. aeruginosa* sulla piastra di verifica, mentre non si osserva crescita sulla piastra di controllo.

Tuttavia, per quanto riguarda il controllo, se si evidenzia crescita sul terreno, il prodotto è contaminato; se non si osserva crescita il metodo è comunque idoneo, ma il prodotto non risulta contaminato.

Invece, la mancanza di crescita sulle piastre di verifica indica ancora la presenza di attività antimicrobica che necessita di una modifica delle condizioni del metodo mediante un aumento del volume del brodo nutritivo, con la quantità di prodotto invariata, o mediante l'incorporazione di una quantità sufficiente di agente inattivante nel brodo di arricchimento, o mediante una combinazione appropriata di modifiche in modo da consentire la crescita di *P. aeruginosa*.

Se nonostante l'incorporazione di agenti inattivanti idonei e un sostanziale aumento del volume del brodo non fosse ancora possibile recuperare culture vitali come descritto sopra, indicare che il prodotto cosmetico non ha probabilità di essere contaminato con *P. aeruginosa*.

Bibliografia di riferimento

- UNI EN ISO 22717:2009. *Cosmetici - Microbiologia - Ricerca di Pseudomonas aeruginosa*. Milano: Ente Italiano di Unificazione; 2009.
- Lundov MD, Zachariae C. Recalls of microbiologically contaminated cosmetics in EU from 2005 to May 2008. *Int J Cosm Sci* 2008;30:471-4.

DETERMINAZIONE E CONTEGGIO DI FUNGHI E LIEVITI

0. Generalità

Gli aspetti di sintesi di seguito presentati si riferiscono al parametro Funghi e lieviti rilevato con il metodo ISS Co 003A rev. 00.

I funghi sono organismi eucarioti, chemiosintetici ed eterotrofi, unicellulari o più spesso organizzati in strutture pluricellulari, che possono raggiungere dimensioni notevoli: possiedono una parete cellulare rigida e si riproducono con produzione di spore (riproduzione sessuata), di tallospore e conidiospore (riproduzione asessuata). La classificazione dei funghi è basata soprattutto sul particolare ciclo vitale, sulla morfologia delle strutture riproduttive e sul tipo di spore prodotte.

Nel gruppo possono essere compresi, oltre agli ifomiceti (funghi filamentosi o muffe), il cui sviluppo avviene per mezzo di ife con produzione di micelio, anche i lieviti che si riproducono per gemmazione. In quest'ultimo caso, in alcune specie i blastoconidi si staccano dalla cellula madre, mentre in altre rimangono attaccati gli uni agli altri a formare lo pseudomicelio.

I funghi sono largamente diffusi in natura, ubiquitari in tutte le matrici ambientali (aria, acqua, suolo). Il metabolismo eterotrofo li costringe ad un tipo di vita dipendente da un ospite e, a seconda che il rapporto sia di tipo neutro, di danno o di vantaggio per l'organismo ospite, vengono rispettivamente suddivisi in saprofiti, parassiti e simbionti. In particolare, i saprofiti sono responsabili della degradazione della sostanza organica e possono vivere negli strati superficiali del suolo e negli ambienti acquatici (fiumi, laghi, mari, acque contaminate da liquami).

Alcune specie fungine sono in grado di produrre, per inalazione, allergie, asma, polmoniti; altre producono effetti tossigeni per ingestione; altre specie ancora, per contatto, possono provocare micosi.

Data la loro ampia versatilità metabolica i funghi sono in grado di contaminare i prodotti cosmetici e la contaminazione può avvenire sia durante il processo di produzione sia durante l'uso da parte del consumatore. La contaminazione dei cosmetici rappresenta un rischio per la salute umana sia come effetto diretto dei microrganismi, sia per la formazione di metaboliti dannosi, oltre che comportare un deterioramento del prodotto che ne diminuisce le prestazioni, degradando i principi attivi. I funghi più comunemente isolati dai prodotti cosmetici che possono rappresentare un fattore di rischio per la salute umana sono *Aspergillus* spp., *Penicillium* spp., potenziali responsabili di reazioni allergiche, *Trichoderma*, che può determinare sintomi infiammatori, *Malassezia furfur* e *Trichophyton* spp., che possono causare dermatomicosi. Tra i lieviti più frequentemente isolati nei cosmetici il genere *Candida* può causare congiuntiviti.

Il parametro fornisce indicazioni sulla qualità microbiologica generale del prodotto cosmetico; tuttavia, non sono previsti valori soglia per questi gruppi di microrganismi.

1. Campo di applicazione

La procedura analitica viene utilizzata per la conta di funghi e lieviti presenti nei cosmetici contando le colonie su terreni selettivi agarizzati dopo incubazione aerobica.

2. Termini e definizioni

Per lo specifico fine analitico, si applicano i seguenti termini e definizioni:

- *Funghi*
Funghi filamentosi che formano micelio, incluse spore e conidi, in grado di crescere nelle condizioni di analisi specificate in questo metodo.
- *Lieviti*
Funghi unicellulari, che si moltiplicano principalmente per gemmazione, in grado di crescere nelle condizioni di analisi specificate nel presente metodo.
- *Brodo di arricchimento*
Terreno liquido non selettivo contenente neutralizzanti e/o agenti di dispersione e utilizzato per il prodotto sottoposto ad analisi.
- *Campione*
Porzione del prodotto (S) di almeno 1 mL o g utilizzata nell'analisi per preparare la sospensione primaria.
- *Diluizione/i del campione*
Diluizione/i della sospensione primaria.
- *Prodotto*
Prodotto cosmetico ricevuto nel laboratorio per le prove.
- *Sospensione primaria*
Sospensione (o soluzione) del campione in un volume definito di un adeguato terreno in brodo (diluente, neutralizzante, brodo di arricchimento o una loro combinazione).

3. Metodo

3.1. Principio del metodo

Questo metodo consente la crescita e il conteggio delle colonie sviluppate su un terreno selettivo agarizzato con due tecniche alternative. La possibile inibizione della crescita fungina dal campione dovrà essere neutralizzata per permettere il rilevamento degli organismi vitali. In tutti i casi, a prescindere dalla metodica, dovrà essere verificata la neutralizzazione delle proprietà antifungine del prodotto.

La procedura analitica è in linea con la norma UNI EN ISO 16212.

3.1.1. Conteggio diretto in piastra

Il conteggio si esegue in base alle seguenti fasi:

- preparazione delle piastre tramite inclusione o spatolamento, utilizzando un terreno culturale specifico;
- inoculo delle piastre utilizzando una quantità definita della sospensione primaria o una diluizione del prodotto;
- incubazione aerobica delle piastre a $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ per 3÷5 giorni;
- conta del numero di unità formanti colonia (UFC) e calcolo del numero per millilitro o per grammo di prodotto.

Una procedura alternativa per l'incubazione è quella di incubare a $(23 \pm 1)^\circ\text{C}$ per 5÷7 giorni usando il terreno culturale senza antibiotici.

3.1.2. Filtrazione su membrana

La filtrazione su membrana è costituita dalle seguenti fasi:

- trasferimento di una quantità opportuna del campione nell'apparecchiatura di filtrazione;
- filtrazione e lavaggio secondo la procedura con trasferimento della membrana sulla superficie del terreno agarizzato specifico;
- incubazione aerobica delle piastre di terreno agarizzato a $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ per 3÷5 giorni;
- conta del numero di unità formanti colonia (UFC) e calcolo del numero per millilitro o per grammo di prodotto.

Una condizione alternativa per l'incubazione è $(23 \pm 1)^\circ\text{C}$ per 5÷7 giorni usando il terreno colturale senza antibiotici.

3.2. Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio (*vedi* sezione 2. Apparecchiature e attrezzature di base nel capitolo "Analisi microbiologiche dei prodotti cosmetici: linee guida per le buone pratiche di laboratorio").

3.3. Diluenti e terreni di coltura

I seguenti diluenti, neutralizzanti e terreni di coltura sono idonei per la conta e dei funghi e dei lieviti. Possono essere utilizzati altri diluenti, neutralizzanti e terreni colturali se si siano dimostrati adatti all'uso.

3.3.1. Diluenti neutralizzanti e diluenti

Il diluente è utilizzato per disperdere il campione. Esso può contenere neutralizzanti se il campione da sottoporre ad analisi ha proprietà antifungine. L'efficacia della neutralizzazione deve essere dimostrata prima del conteggio.

3.3.1.1. *Diluente neutralizzante (Terreno digerito liquido di caseina – lecitina di soia – polisorbato 20)*

Composizione	
Digerito pancreatico di caseina	20 g
Lecitina di soia	5 g
Polisorbato 20	40 mL
Acqua distillata	960 mL
pH 7,3±0,2	

Sciogliere il polisorbato 20 in 960 mL di acqua miscelando durante il riscaldamento in un bagnomaria a non oltre 48°C .

Aggiungere il digerito pancreatico di caseina e la lecitina di soia. Riscaldare per circa 30 minuti per mandarli in soluzione.

Miscelare e distribuire il terreno in contenitori idonei.

Sterilizzare in autoclave a $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ per 15 minuti.

Conservare a riparo dalla luce a $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ per non più di un mese in condizioni ottimali.

3.3.1.2. Diluente (Liquido A)

Composizione	
Digerito peptico di tessuti animali	1 g
Acqua distillata	1000 mL
pH 7,1±0,2	

Sciogliere 1 g di peptone in acqua distillata. Riscaldare agitando frequentemente. Distribuire in contenitori idonei. Sterilizzare in autoclave a (121 ± 3)°C per 15 minuti. Conservare a riparo dalla luce a (5 ± 3)°C per non più di un mese in condizioni ottimali.

3.3.1.3. Diluente per la sospensione dei lieviti (Soluzione di cloruro di sodio triptone)

Composizione	
Digerito pancreatico di caseina	1 g
Cloruro di sodio	8,5 g
Acqua distillata	1000 mL
pH 7,0±0,2	

Disciogliere i componenti in acqua miscelando durante il riscaldamento. Distribuire in contenitori idonei. Sterilizzare in autoclave a (121 ± 3)°C per 15 minuti. Conservare a riparo dalla luce a (5 ± 3)°C per non più di un mese in condizioni ottimali.

3.3.2. Terreni di coltura**3.3.2.1. Sabouraud destrosio cloramfenicolo agar**

Composizione	
Destrosio	40 g
Digerito peptico di tessuti animali	5 g
Digerito pancreatico di caseina	5 g
Cloramfenicolo	0,050 g
Agar	15 g
Acqua distillata	1000 mL
pH 5,6±0,2	

Disciogliere i componenti (incluso il cloramfenicolo) in acqua miscelando durante il riscaldamento. Distribuire in contenitori idonei. Sterilizzare in autoclave a (121 ± 3)°C per 15 minuti. Conservare a riparo dalla luce a (5 ± 3)°C per non più di un mese in condizioni ottimali.

Per la coltivazione del ceppo di riferimento usare il terreno senza cloramfenicolo.

3.4. Ceppi dei microrganismi

Per verificare l'efficacia dei neutralizzanti utilizzare, quale ceppo di riferimento, il lievito *C. albicans* ATCC 10231 o un ceppo equivalente: IP 48.72 o NCPF 3179 o NBRC 1594 o KCTC 17205 o TISTR 5779 o altro ceppo di collezione nazionale equivalente.

Questo lievito, più sensibile dei funghi all'attività antifungina può essere considerato rappresentativo dei funghi per la verifica delle condizioni di analisi. Comunque, in caso di specifiche necessità, la prova per l'efficacia dei neutralizzanti può essere eseguita con un ceppo

di riferimento specifico per i funghi, utilizzando un protocollo adeguato per la preparazione di un inoculo a concentrazione nota.

3.5. Procedura

Utilizzare materiale sterile, apparecchiatura e tecniche asettiche per preparare il campione, la sospensione primaria e le diluizioni. Nel caso della preparazione della sospensione primaria in un appropriato agente solubilizzante, il tempo trascorso tra la fine della preparazione e il momento in cui l'inoculo viene a contatto con il brodo di arricchimento non deve superare i 45 minuti, se non specificamente menzionato in protocolli o documenti di riferimento.

3.5.1. Preparazione della sospensione primaria

La sospensione primaria è preparata da un campione di almeno 1 g o 1 mL del prodotto ben miscelato.

Annotare *S*, il peso o il volume esatto del campione.

La sospensione primaria è generalmente una diluizione 1:10. Possono essere richiesti volumi maggiori di diluente se si prevedono alti livelli di contaminazione e/o se sono ancora presenti proprietà antifungine nella diluizione 1:10.

3.5.2. Metodi di conta

3.5.2.1. Diluizioni per i metodi di conta

In genere, la sospensione primaria viene considerata la prima diluizione. Se necessario, possono essere eseguite ulteriori diluizioni seriali (per esempio, diluizione 1:10) dalla sospensione primaria utilizzando lo stesso diluente (a seconda del livello di contaminazione prevista del prodotto).

In genere, la conta è eseguita utilizzando almeno due piastre di Petri. Ma è possibile utilizzare una sola piastra di Petri se le conte sono eseguite su diluizioni successive dello stesso campione o in base a risultati precedenti.

3.5.2.2. Metodi di conta diretta in piastra

3.5.2.2.1. Metodo di inclusione in piastra

In piastre di Petri aggiungere 1 mL della sospensione primaria e/o della diluizione del campione preparate per la verifica dell'efficacia della neutralizzazione (3.8.) e versare da 15 mL a 20 mL del terreno (3.3.2.1.) mantenuto in bagnomaria a $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$. Miscelare la sospensione primaria e/o la diluizione del campione con il terreno, ruotando o inclinando con cura le piastre, in misura sufficiente a ottenere la dispersione nel terreno. Lasciare solidificare la miscela su una superficie orizzontale a temperatura ambiente.

3.5.2.2.2. Metodo di semina in superficie

In piastre di Petri di diametro compreso tra 85 mm e 100 mm, mettere da 15 mL a 20 mL del terreno (3.3.2.1.) mantenuto in bagnomaria a $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$.

Lasciare raffreddare e solidificare il terreno in piastra. Porre al centro della superficie del terreno solido un volume non minore di 0,1 mL della sospensione primaria e/o di una sua diluizione (vedere 3.8.) e distribuire uniformemente, con un'ansa sterile, sulla superficie.

3.5.2.2.3. Metodo della filtrazione su membrana

Utilizzare membrane con pori di dimensioni nominali di 0,45 μm .

Trasferire una quantità appropriata della sospensione primaria o di una sua diluizione (almeno 1 g o 1 mL del prodotto) sulla membrana. Filtrare immediatamente e lavare la membrana.

Trasferire la membrana sulla superficie del terreno agarizzato (3.3.2.1.).

3.5.2.2.4. Incubazione

Per qualsiasi delle tecniche utilizzate, se non diversamente specificato, collocare le piastre inoculate nell'incubatore impostato a $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ per (3÷5) giorni. Dopo incubazione, le piastre devono, se possibile, essere esaminate immediatamente. Altrimenti, possono essere conservate, se non diversamente specificato, per un massimo di 24 ore in frigorifero.

In determinati casi, dove sussista la possibilità di confondere particelle del prodotto con le colonie cresciute, può essere utile preparare piastre in duplicato contenenti le stesse diluizioni del campione e il terreno agarizzato conservati in frigorifero per un confronto con le piastre incubate dove è avvenuta la crescita.

3.6. Conteggio delle colonie (conte in piastra e metodi di filtrazione su membrana)

Dopo incubazione, contare le colonie. Il conteggio dovrebbe essere effettuato in corrispondenza di diluizioni che presentano un numero di colonie compreso tra 15 e 150 UFC. Se sono contate meno di 15 colonie, fare riferimento a 3.7.2.3.

3.7. Espressione dei risultati

3.7.1. Metodo di calcolo per il conteggio in piastra

Calcolare il numero N di microrganismi presenti nel campione S , utilizzando:

- \bar{m} , la media aritmetica delle conte ottenute dai conteggi in duplicato nell'equazione [1]
 - c , il numero di colonie contate in una singola piastra nell'equazione [2]; oppure
 - $w\bar{m}$, la media ponderata delle conte ottenute da due diluizioni successive nell'equazione [3]:
- in base alle seguenti formule:

$$N = \bar{m}/(V \times d) \quad [1]$$

$$N = c/(V \times d) \quad [2]$$

$$N = w\bar{m}/(V \times d) \quad [3]$$

dove:

\bar{m} è la media aritmetica delle conte ottenute dalle piastre in duplicato;

V è il volume di inoculo applicato a ogni piastra, in millilitri;

d è il fattore di diluizione corrispondente alla sospensione primaria (punto 3.5.1.) o alla prima diluizione contata;

c è il numero delle colonie contate su una singola piastra.

La media ponderata delle colonie contate da due diluizioni successive è calcolata come segue:

$$w\bar{m}_c = \sum c/(n_1+0,1 n_2)$$

dove:

$\sum c$ è la somma delle colonie contate su tutte le piastre ottenute da due diluizioni successive;

n_1 è il numero di piastre della sospensione primaria (o della prima diluizione contata);

n_2 è il numero di piastre della diluizione 1/10 della sospensione primaria (o della seconda diluizione contata).

Arrotondare il risultato calcolato a due cifre significative. Per questo, se l'ultima cifra è minore di 5, la cifra precedente non è modificata; se l'ultima cifra è 5 o maggiore, la cifra precedente è aumentata di un'unità. Procedere per incrementi fino ad ottenere due cifre significative. Registrare il numero N ottenuto.

3.7.2. Interpretazione dei risultati

Si dovrebbe tenere conto della variabilità del conteggio in piastra. Due risultati dovrebbero essere considerati diversi solo se la differenza supera il 50% oppure, quando espressa in scala logaritmica, la differenza supera 0,3.

Per una conta precisa, si dovrebbe tenere conto solo delle piastre o delle membrane con più di 15 colonie e meno di 150 colonie. Controllare che le conte siano ottenute da diluizioni sottoposte a verifica con il metodo prescelto (vedere 3.8.).

3.7.2.1. Se il numero di colonie è maggiore di 15 e minore di 150 sulle piastre o sulle membrane, esprimere il risultato nel modo seguente:

- se S è almeno 1 g o 1 mL, e V è almeno 1 mL, il numero per millilitro o per grammo del campione = N/S ;
- se S è minore di 1 g o di 1 mL e/o V è minore di 1 mL, il numero nel campione (annotare la quantità di campione sottoposta ad analisi tenendo conto di S e V) è = N ;

dove S è il peso e V il volume del campione.

Esprimere il risultato come numero compreso tra 1,0 e 9,9 moltiplicato per una potenza di 10 (vedere esempi 1, 2, 3, 7).

3.7.2.2. Dove il numero di colonie è minore di 15 sulle piastre o sulle membrane, esprimere il risultato come segue:

- se S è almeno 1 g o 1 mL, e V è almeno 1 mL, il numero calcolato per millilitro o per grammo del campione è = N/S ;
- se S è minore di 1 g o di 1 mL e/o V è minore di 1 mL, il numero calcolato nel campione è = N ;

dove S è il peso e V il volume esatto del campione.

Esprimere il risultato come numero compreso tra 1,0 e 9,9 moltiplicato per una potenza di 10 (vedere esempi 4, 5, 6).

3.7.2.3. Se non sono osservate colonie, il risultato è riportato come segue:

- meno di $1/d \times V \times S$ per grammo o millilitro di prodotto (S è almeno 1 g e V è almeno 1 mL);
- meno di $1/d \times V$ nel campione S (registrare la quantità analizzata del campione tenendo conto di S e V) (S è minore di 1 g e V è minore di 1 mL);

dove

d è il fattore di diluizione della sospensione primaria (3.5.1.)

V è 1 (per la conta con il metodo di inclusione in piastra e per la filtrazione su membrana) oppure 0,1 (per il metodo di semina in superficie) (vedere esempi 8, 9).

3.7.3. Esempi

3.7.3.1. Esempio 1: Due piastre per una diluizione

$S = 1$ g o 1 mL; $V = 1$; conte ottenute: per la diluizione 10^{-1} : 38 e 42.

Per l'equazione [1]:

$N = \bar{m}/(V \times d) = 40/(1 \times 10^{-1}) = 40/0,1 = 400$ o 4×10^2 funghi e lieviti per millilitro o per grammo di campione.

3.7.3.2. Esempio 2: Una piastra per una diluizione

$S = 1$ g o 1 mL; $V = 1$; conta ottenuta: per la diluizione 10^{-1} : 60.

Per l'equazione [2]:

$N = c/(V \times d) = 60/(1 \times 10^{-1}) = 60/0,1 = 600$ or 6×10^2 funghi e lieviti per millilitro o per grammo di campione.

3.7.3.3. Esempio 3: Due piastre per due diluizioni

$S = 1$ g o 1 mL; $V = 1$; conte ottenute: per la diluizione 10^{-2} : 235 e 282; per la diluizione 10^{-3} : 31 e 39.

Per l'equazione [3]:

$$N = \overline{wm}/(V \times d) = 235 + 282 + 31 + 39 / (2 + 0,1 \times 2) \times 10^{-2} = 587 / 0,022 = 26\ 682.$$

Arrotondando il risultato come specificato sopra si ottiene 27 000 o $2,7 \times 10^4$ funghi e lieviti per millilitro o per grammo di campione.

3.7.3.4. Esempio 4: Due filtri a membrana per una diluizione

$S = 1$ g o 1 mL; $V = 1$; conte ottenute: per la diluizione 10^{-1} : 18 e 22.

Per l'equazione [1]:

$N = \bar{m}/(V \times d) = 20/(1 \times 10^{-1}) = 20/0,1 = 200$ o 2×10^2 funghi e lieviti per millilitro o per grammo di campione.

3.7.3.5. Esempio 5: Un filtro a membrana per una diluizione

$S = 1$ g o 1 mL; $V = 1$; conta ottenuta: per la diluizione 10^{-1} : 65.

Per l'equazione [2]:

$N = c/(V \times d) = 65/(1 \times 10^{-1}) = 65/0,1 = 650$ o $6,5 \times 10^2$ funghi e lieviti per millilitro o per grammo di campione.

3.7.3.6. Esempio 6: Due filtri a membrana per due diluizioni

$S = 1$ g o 1 mL; $V = 1$; conte ottenute: per la diluizione 10^{-1} : 121 e 105; per la diluizione 10^{-2} : 15 e 25.

Per l'equazione [3]:

$$N = \overline{wm}/(V \times d) = 121 + 105 + 15 + 25 / (2 + 0,1 \times 2) \times 10^{-1} = 266 / 0,22 = 1\ 209.$$

Arrotondando il risultato come specificato sopra si ottiene 1 200 o $1,2 \times 10^3$ funghi e lieviti per millilitro o per grammo di campione.

3.7.3.7. Esempio 7: Due piastre per una diluizione

$S = 1$ g o 1 mL; $V = 1$; conte ottenute per la diluizione 10^{-1} : 28 e 22.

Per l'equazione [1]:

$$N = \bar{m}/(V \times d) = 25/(1 \times 10^{-1}) = 25/0,1 = 250.$$

Il numero stimato è 250 o $2,5 \times 10^2$ funghi e lieviti per millilitro o per grammo di campione.

3.7.3.8. Esempio 8

$S = 1$ g o 1 mL; $V = 1$; conte ottenute per la diluizione 10^{-1} : 0 e 0.

Per l'equazione [1]:

$N \leq 1/d \times V \times S, \leq (1/0,1) \times 1 \times 1, \leq 10$ funghi e lieviti per millilitro o per grammo di campione.

Il numero stimato è minore di 10 funghi e lieviti per millilitro o per grammo di campione.

3.7.3.9. Esempio 9

$S = 1$ g o 1 mL; $V = 1$; conte ottenute per la diluizione 10^{-1} , 0 e 3.

Per l'equazione [1]:

$N \leq \bar{m}/(V \times d), \leq 1,5/(1 \times 10^{-1}), \leq 1,5/0,1, \leq 15$ funghi e lieviti per millilitro o per grammo di campione.

Il numero stimato è minore di 15 funghi e lieviti per millilitro o per grammo di campione.

3.8. Neutralizzazione delle proprietà antifungine del prodotto

3.8.1. Generalità

Le prove di seguito descritte permettono di dimostrare che i microrganismi ricercati possono crescere nelle condizioni previste dall'analisi.

3.8.2. Preparazione dell'inoculo

Prima della prova, inoculare la superficie del terreno agarizzato non selettivo, Sabouraud destrosio agar (SDA) con *C. albicans*. Incubare la piastra a $(33 \pm 1)^\circ\text{C}$ per (18÷24) ore.

Per raccogliere la coltura, utilizzare un'ansa sterile, strisciare la superficie della coltura e rimettere in sospensione nel diluente (3.3.1.3.) per ottenere una sospensione a titolo noto di circa 1×10^6 UFC/mL (per esempio utilizzando uno spettrofotometro).

Utilizzare questa sospensione a concentrazione nota e le sue diluizioni entro 2 ore.

3.8.3. Verifica dei metodi di conta

3.8.3.1. Principio

Miscelare il campione già neutralizzato (sospensione primaria o sua diluizione) con una diluizione del microrganismo di riferimento. Eseguire la semina su un terreno in piastra di Petri o filtrare su membrana. Dopo incubazione, controllare la natura delle colonie e confrontare con una piastra di controllo (senza il campione).

Se la conta è minore del 50% (0,3 log) del controllo, modificare la procedura (diluenti, agenti di neutralizzazione o la combinazione di entrambi). La mancata capacità di crescita dell'inoculo invalida la prova a meno che non sia possibile considerare improbabile la contaminazione del prodotto.

3.8.3.2. Verifica del metodo di inclusione in piastra

Miscelare 9 mL della sospensione primaria e/o della/e diluizione/i del campione nel diluente neutralizzante (3.3.1.) con 1 mL di una sospensione di microrganismi contenenti da 1000 UFC/mL a 3000 UFC/mL. Trasferire 1 mL in una piastra di Petri e versare da 15 mL a 20 mL del terreno (3.3.2.1.) mantenuto in bagnomaria a $(45 \pm 1)^\circ\text{C}$. In parallelo, preparare una piastra di controllo utilizzando lo stesso diluente e la stessa sospensione di microrganismi, ma senza il campione.

Dopo incubazione di (3÷5) giorni a $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$, o usando la condizione alternativa (3.1.1. e 3.1.2.) contare le colonie sulle piastre e confrontare le conte ottenute per la verifica e per il controllo. Il diluente e il metodo di conta sono considerati idonei alla diluizione 1:10 (quando è utilizzato 1 mL della sospensione primaria) se la conta di verifica è almeno il 50% (0,3 log) della conta ottenuta con il controllo.

3.8.3.3. Verifica del metodo di semina in superficie

Miscelare 9 mL della sospensione primaria nel diluente neutralizzante (3.3.1.) con 1 mL di una sospensione di microrganismi contenenti da 10000 UFC/mL a 30000 UFC/mL (o meno, se sono utilizzati 0,5 mL o 1 mL). Distribuire almeno 0,1 mL su una piastra di terreno (3.3.2.1.) solidificato in piastra. In parallelo, preparare una piastra di controllo utilizzando lo stesso diluente e la stessa sospensione di microrganismi, ma senza il campione.

Dopo incubazione di (3÷5) giorni a $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ o usando la condizione alternativa (3.1.1. e 3.1.2.), contare le colonie sulle piastre e confrontare le conte ottenute nella verifica e nel controllo. Il diluente e il metodo di conta sono considerati idonei alla diluizione 1:10 (quando è utilizzato 1 mL della sospensione primaria) se la conta di verifica è almeno 50% (0,3 log) della conta di controllo.

3.8.3.4. Verifica del metodo di filtrazione su membrana

Miscelare al volume della sospensione primaria o di una sua diluizione (3.5.2.2.3.) una quantità appropriata di una sospensione a concentrazione nota di microrganismi corrispondente a circa 100 UFC.

Filtrare l'intero volume e lavare la membrana utilizzando volumi definiti di acqua, diluente (3.3.1.2.) o diluente neutralizzante (3.3.1.1.). Trasferire la membrana sulla superficie di terreno agarizzato (3.3.2.1.). In parallelo, preparare un controllo nelle stesse condizioni di cui sopra, ma senza il prodotto. Operare nelle stesse condizioni.

Dopo incubazione di (3÷5) giorni a $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$ o usando la condizione alternativa (3.1.1. e 3.1.2.), contare le colonie sulle membrane e confrontare le conte ottenute nella verifica e nel controllo. Il metodo di filtrazione su membrana e il diluente sono considerati idonei se la conta di verifica è almeno il 50% (0,3 log) della conta ottenuta dall'analisi del controllo.

Bibliografia di riferimento

UNI EN ISO 16212:2011. *Cosmetici - Microbiologia - Conta di lieviti e muffe*. Milano: Ente Italiano di Unificazione; 2011.

Muhammed HJ. Bacterial and fungal contamination in three brands of cosmetic marketed in Iraq. *Iraqi J Pharm Sci* 2011;20(1):10-2.

DETERMINAZIONE DI *CANDIDA ALBICANS*

0. Generalità

Gli aspetti di sintesi di seguito presentati si riferiscono al parametro batteri vitali mesofili aerobi rilevato con il metodo ISS Co 004A rev. 00.

Candida albicans, microrganismo appartenente al Phylum *Ascomycota* Ordine *Saccharomycetales*, è presente come commensale sulla cute, nella cavità orale, nel tratto intestinale e in quello urogenitale dell'uomo. *C. albicans* è un fungo opportunisto, dimorfo e può svilupparsi sia come blastospore sferiche o ovali sia come micelio. Nello stesso organismo si possono ritrovare sia la forma miceliale che la forma di lievito. *C. albicans* è la specie più frequentemente patogena ed è causa di infezioni acute o subacute nell'uomo e negli animali. Produce sia infezioni superficiali della cute e delle mucose sia infezioni bronco-polmonari e intestinali e, molto meno frequentemente, setticemia con successive localizzazioni profonde. Le infezioni da *C. albicans* sono infezioni endogene; infatti può diventare patogeno qualora si instaurino condizioni ambientali favorevoli al suo attecchimento e alla sua proliferazione, o quando vi sia un indebolimento delle difese organiche in seguito a terapie antibatteriche, corticosteroidi o per malattie debilitanti. Il parametro è da considerare un potenziale rischio per la salute del consumatore perché può causare infezioni per la cute, le mucose o gli occhi e può segnalare condizioni di scarsa igiene nel processo di fabbricazione. Pertanto, secondo le raccomandazioni di *Cosmetics Europe* e le linee guida dell'SCCS, *C. albicans* deve risultare non rilevabile in 1 g o 1 mL nei cosmetici per bambini o in cosmetici da utilizzare nella zona perioculare (Categoria 1), come anche in cosmetici di Categoria 2 in cui deve essere assente in 0,1 g o 0,1 mL del prodotto.

1. Campo di applicazione

La procedura analitica viene utilizzata per il rilevamento e l'identificazione di *C. albicans* in prodotti cosmetici.

2. Termini e definizioni

Per lo specifico fine analitico, si applicano i seguenti termini e definizioni:

- *Candida albicans*
Fungo opportunisto appartenente al Phylum *Ascomycota* che forma colonie bianche o beige, cremose e convesse sulla superficie di un terreno selettivo.
- *Brodo di arricchimento*
Terreno liquido non selettivo contenente neutralizzanti e/o agenti di dispersione e utilizzato per il prodotto sottoposto ad analisi.
- *Campione*
Porzione del prodotto (S) di almeno 1 mL o g utilizzata nell'analisi per preparare la sospensione primaria.
- *Diluizione/i del campione*
Diluizione/i della sospensione primaria.

- *Prodotto*
Prodotto cosmetico ricevuto nel laboratorio per le prove.
- *Sospensione primaria*
Sospensione (o soluzione) del campione in un volume definito di un adeguato terreno in brodo (diluente, neutralizzante, brodo di arricchimento o una loro combinazione).

3. Metodo

3.1. Principio del metodo

Il metodo è di tipo qualitativo (Presenza/Assenza). La prima fase consiste nell'eseguire un arricchimento utilizzando un terreno in brodo non selettivo per aumentare il numero di microrganismi eventualmente presenti nel campione. La seconda fase (isolamento) è eseguita su un terreno selettivo con successive prove di identificazione. Deve essere neutralizzata la possibile inibizione della crescita microbica per la presenza di sostanze antimicrobiche. La procedura analitica è in linea con la norma UNI EN ISO 18416.

3.2. Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio (*vedi* sezione 2. Apparecchiature e attrezzature di base nel capitolo “Analisi microbiologiche dei prodotti cosmetici: linee guida per le buone pratiche di laboratorio”).

3.3. Diluenti e terreni di coltura

3.3.1. Terreno di arricchimento

Il brodo di arricchimento è utilizzato per miscelare il campione e per aumentare la popolazione microbica iniziale. Esso può contenere neutralizzanti se il campione da sottoporre ad analisi ha proprietà antimicrobiche. Deve essere comunque dimostrata nel corso della procedura l'efficacia della neutralizzazione (3.6.). Di seguito il brodo di arricchimento che è idoneo per verificare la presenza di *C. albicans*. Possono essere utilizzati altri diluenti e terreni di coltura qualora si siano dimostrati idonei all'uso.

3.3.1.1. Brodo Eugon LT 100

Composizione	
Digerito pancreatico di caseina	15 g
Digerito papainico di farina di soia	5 g
Sodio cloruro	4 g
Solfito di sodio	0,2 g
Destrosio	5,5 g
L-cistina	0,7 g
Lecitina di uova	1 g
Polisorbato 80	5 g
Octoxilolo 9	1 g
Acqua distillata	1000 mL
pH 7,0±0,2	

In questa formulazione sono contenuti ingredienti neutralizzanti, quali la lecitina e il polisorbato 80 e un agente di dispersione l'octoxilolo 9, che vengono aggiunti quando sono presenti sostanze antimicrobiche e il prodotto è immiscibile in acqua.

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara, controlla e conserva secondo le istruzioni della ditta produttrice.

Prima sciogliere i componenti polisorbato 80, octoxilolo 9 e lecitina di uova, uno dopo l'altro, in acqua distillata preventivamente portata ad ebollizione, fino a completa miscelazione. Sciogliere successivamente gli altri componenti miscelando durante il riscaldamento. Distribuire il terreno in contenitori idonei. Sterilizzare in autoclave a $(121 \pm 3)^{\circ}\text{C}$ per 15 minuti. Conservare a riparo dalla luce e alla temperatura di $(5 \pm 3)^{\circ}\text{C}$ per non più di un mese in condizioni ottimali.

3.3.2. Terreno selettivo per l'isolamento

3.3.2.1. Sabouraud destrosio cloramfenicolo agar (SDCA)

Composizione	
Destrosio	40 g
Digerito peptico di tessuti animali	5 g
Digerito pancreatico di caseina	5 g
Cloramfenicolo	0,050 g
Agar	15 g
Acqua distillata	1000 mL
pH 5,6±0,2	

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara, controlla e conserva seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Disciogliere i componenti (incluso il cloramfenicolo) in acqua miscelando durante il riscaldamento. Distribuire in contenitori idonei. Sterilizzare in autoclave a $(121 \pm 3)^{\circ}\text{C}$ per 15 minuti. Conservare a riparo dalla luce e alla temperatura di $(5 \pm 3)^{\circ}\text{C}$ per non più di un mese in condizioni ottimali.

3.3.3. Terreno per la conferma

3.3.3.1. Corn meal Agar con 1% di polisorbato 80

Composizione	
Digerito di farina di mais	50,0 g
Polisorbato 80	10,0 g
Agar	15,0 g
Acqua distillata	1000 mL
pH 6,0±0,2	

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara, controlla e conserva secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente. Sterilizzare in autoclave a $(121 \pm 3)^{\circ}\text{C}$ per 15 minuti. Conservare a riparo dalla luce e alla temperatura di $(5 \pm 3)^{\circ}\text{C}$ per non più di un mese in condizioni ottimali.

3.3.4. Diluente per la soluzione del lievito

3.3.4.1. Soluzione di cloruro di sodio triptone

Il diluente è utilizzato per la preparazione della soluzione di lievito per la procedura di verifica (vedere 3.6.).

Composizione	
Digerito pancreatico di caseina	1 g
Cloruro di sodio	8,5 g
Acqua distillata	1000 mL
pH 7,0±0,2	

Disciogliere i componenti in acqua distillata miscelando durante il riscaldamento. Distribuire in contenitori idonei. Sterilizzare in autoclave a $(121 \pm 3)^{\circ}\text{C}$ per 15 minuti. Conservare a riparo dalla luce a $(5 \pm 3)^{\circ}\text{C}$ per non più di un mese in condizioni ottimali.

3.3.5. Terreno di coltura agarizzato per la verifica

3.3.5.1. Sabouraud destrosio agar (SDA)

Composizione	
Destrosio	40 g
Digerito peptico di tessuti animali	5 g
Digerito pancreatico di caseina	5 g
Agar	15 g
Acqua distillata	1000 mL
pH 5,6±0,2	

Sciogliere i componenti miscelando durante il riscaldamento. Distribuire il terreno in contenitori idonei. Sterilizzare in autoclave a $(121 \pm 3)^{\circ}\text{C}$ per 15 minuti. Conservare a riparo dalla luce a $(5 \pm 3)^{\circ}\text{C}$ per non più di un mese in condizioni ottimali.

3.4. Ceppi dei microrganismi

Per la verifica delle condizioni di analisi, è utilizzato *C. albicans* ATCC 10231 o un ceppo equivalente (IP 48.72 o NCPF 3179 o NBRC 1594 o KCTC 17205 o altro ceppo di collezione nazionale equivalente). Utilizzare comunque ceppi certificati.

3.5. Procedura

Per preparare il campione utilizzare materiale sterile, apparecchiature e tecniche asettiche, la sospensione primaria e le diluizioni. Nel caso si prepari la sospensione primaria in un adatto agente solubilizzante, il tempo trascorso tra la fine della preparazione e il momento in cui l'inoculo viene a contatto con il brodo di arricchimento non deve superare i 45 minuti, se non specificamente menzionato in protocolli o documenti di riferimento.

3.5.1. Preparazione della sospensione primaria nel brodo di arricchimento

L'arricchimento è preparato da un campione di almeno 1 g o 1 mL del prodotto ben miscelato, disperso in almeno 9 mL di brodo di arricchimento (3.3.1.1.).

Annotare *S*, il peso o *V* il volume esatto del campione.

In alcuni casi, e quando possibile, la filtrazione del prodotto cosmetico attraverso una membrana, in seguito immersa nel brodo di arricchimento, facilita la neutralizzazione delle proprietà antimicrobiche del prodotto (3.6.3.).

3.5.2. Incubazione del brodo di arricchimento

Incubare la sospensione primaria preparata nel brodo di arricchimento a (30÷35)°C per almeno 20 ore (massimo 72 ore).

3.5.3. Isolamento

Utilizzando un'ansa sterile, strisciare una aliquota della brodocoltura ottenuta sul terreno di isolamento Sabouraud destrosio cloramfenicolo agar (3.3.2.1.).

Incubare la piastra capovolta a (30÷35)°C per 24 ore. In caso di risultato negativo protrarre l'incubazione non oltre le 48 ore ripetendo la lettura.

Dopo incubazione verificare le colonie caratteristiche.

I microrganismi, appartenenti alla specie *C. albicans*, producono su Sabouraud destrosio cloramfenicolo agar colonie di colore da bianche a beige, cremose e convesse.

Per verificare la presenza di *C. albicans* è opportuno sottoporre a prove di conferma le colonie tipiche.

3.5.4. Conferma

C. albicans può essere dimorfica ed è in grado di produrre pseudoife, alcune ife vere, e gruppi di blastoconidi rotondeggianti come anche clamidospore. A basse temperature si possono avere forme pseudo-miceliali che possono cambiare in forme unicellulari ad alte temperature.

Procedere all'esecuzione delle prove di conferma di seguito specificate per le colonie isolate sul terreno Sabouraud destrosio cloramfenicolo agar:

- Colorazione di Gram;
- Produzione di tubuli germinativi;
- Coltivazione su corn meal agar con 1% di polisorbato 80.

La presenza di *C. albicans* può essere confermata da altre prove colturali e biochimiche disponibili.

Prima di effettuare ciascuna prova, è necessario prelevare con un'ansa sterile le colonie sospette cresciute sul substrato di isolamento isolandole sul Sabouraud destrosio agar (3.3.5.1.) o su Tryptone Soia Agar (TSA). Incubare a (30÷35)°C per (18÷24) ore. Eseguire tutte le prove su colonie con non più di 24 ore di sviluppo.

3.5.4.1. Colorazione di Gram

Se presente *C. albicans*, l'osservazione al microscopio mostrerà cellule piccole ovali o allungate, talvolta con cellule gemmate, di colore violetto.

3.5.4.2. Produzione di tubuli germinativi

Mettere da 0,5 a 1 mL di siero (di cavallo o di vitello) in provette piccole.

Emulsionare una piccola porzione di colonia nel siero.

Incubare in un bagno termostato a $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ da un'ora e mezzo a 2 ore, o in incubatore a $(37 \pm 1)^\circ\text{C}$ per 3 ore.

Mettere una goccia di siero su un vetrino e coprire con un vetrino coprioggetto; esaminare al microscopio per la produzione di tubuli germinativi.

I tubuli germinativi appaiono come filamenti cilindrici che si originano dalle blastospore, senza nessuna costrizione al punto d'origine e senza rigonfiamenti evidenti lungo il filamento.

La formazione di tubuli germinativi caratterizza la presenza di *C. albicans*.

Se non si formano tubuli germinativi, le colonie possono essere esaminate per la produzione di ife, pseudoife e clamidospore in accordo con 3.5.4.3.

3.5.4.3. Coltivazione su Agar alla farina di granturco con 1% di polisorbato 80

Rimuovere una piccola porzione della colonia isolata ed eseguire una semina sulla superficie del terreno al centro della piastra. Coprire con un vetrino coprioggetto sterile lo striscio.

Incubare a $(30\div 35)^\circ\text{C}$ fino a 3 giorni.

Dopo 24 ore rimuovere il coperchio della piastra ed esaminare la crescita al microscopio attraverso il coprioggetto con ingrandimento da 100x a 400x.

C. albicans produce clamidospore larghe, molto rifrangenti, con pareti spesse le quali si presentano in posizione terminale o su corte braccia laterali.

3.5.5. Espressione dei risultati

Se l'identificazione delle colonie conferma la presenza di questa specie, esprimere il risultato come:

Presenza di *C. albicans* nel campione, *S.*

Se non è osservata alcuna crescita dopo l'arricchimento e/o se l'identificazione delle colonie non conferma la presenza di questa specie, esprimere il risultato come:

Assenza di *C. albicans* nel campione, *S.*

3.6. Neutralizzazione delle proprietà antimicrobiche del prodotto

3.6.1. Generalità

Le prove di seguito descritte permettono di dimostrare che il microrganismo ricercato può crescere nelle condizioni previste dall'analisi.

3.6.2. Preparazione dell'inoculo

Prima della prova, inoculare la superficie del terreno agarizzato non selettivo, non neutralizzante, Sabouraud destrosio agar (3.3.5.1.) o Triptone soia agar (TSA), con *C. albicans*. Incubare a $(30\div 35)^\circ\text{C}$ per $(18\div 24)$ ore.

Per raccogliere la coltura utilizzare un'ansa sterile, strisciare la superficie della coltura e rimettere in sospensione nel diluente (3.3.4.1.) per ottenere una sospensione a titolo noto di circa 1×10^6 UFC per mL (per esempio, utilizzando uno spettrofotometro).

Utilizzare questa sospensione a concentrazione nota e le sue diluizioni entro 2 ore.

3.6.3. Verifica del metodo di ricerca

3.6.3.1. Procedura

Nelle provette da 9 mL di diluente (3.3.4.1.), preparare una diluizione della sospensione (3.6.2.) per ottenere una conta finale compresa tra 100 UFC/mL e 500 UFC/mL. Per contare il

numero di microrganismi vitali nella diluizione finale della sospensione a titolo noto, trasferire 1 L della sospensione in una piastra di Petri e versarvi da 15 mL a 20 mL il terreno (3.3.5.1.) mantenuto in bagnomaria a $(45 \pm 1)^{\circ}\text{C}$. Lasciare solidificare e poi incubare a $(30\div 35)^{\circ}\text{C}$ per $(20\div 24)$ ore.

Preparare in duplicato la sospensione primaria (3.5.1.) (almeno 1 g o 1 mL di prodotto) in una provetta o in un matraccio. Quando si utilizza il metodo di filtrazione per membrana, filtrare in duplicato almeno 1 mL di prodotto e trasferire ogni membrana in una provetta o in un matraccio contenente il brodo di arricchimento. Per la prova di verifica, introdurre sterilmente 0,1 mL della sospensione a concentrazione nota in una provetta o in un matraccio.

Miscelare, quindi incubare entrambe le provette o i matracci (prova di verifica e controllo non inoculato) a $(30\div 35)^{\circ}\text{C}$ per $(20\div 24)$ ore.

Eseguire un isolamento per ogni provetta o matraccio. Utilizzando un'ansa sterile, strisciare un'aliquota della miscela incubata sulla superficie del terreno Sabouraud destrosio cloramfenicolo agar nella piastra di Petri. Incubare a $(30\div 35)^{\circ}\text{C}$ per $(24\div 48)$ ore.

3.6.4. Interpretazione dei risultati di verifica

Verificare che la soluzione a concentrazione nota del lievito contenga tra 100 UFC/mL e 500 UFC/mL.

La neutralizzazione e il metodo di ricerca sono considerati idonei se si manifesta una crescita caratteristica di *C. albicans* sulla piastra di verifica, mentre non si evidenzia crescita sulla piastra di controllo. Tuttavia, per quanto riguarda il controllo, se si evidenzia crescita sul terreno, il prodotto è contaminato; se non si osserva crescita il metodo è comunque idoneo, ma il prodotto non risulta contaminato.

Invece, la mancanza di crescita sulle piastre di verifica indica che è ancora presente attività antimicrobica e che è necessaria una modifica delle condizioni del metodo mediante un aumento del volume del brodo nutritivo, con la quantità di prodotto invariata, o mediante l'incorporazione di una quantità sufficiente di agente inattivante nel brodo di arricchimento, o altrimenti mediante una combinazione di modifiche in modo da consentire la crescita di *C. albicans*.

Se nonostante l'incorporazione di agenti inattivanti idonei e un sostanziale aumento del volume del brodo non fosse ancora possibile recuperare colture vitali annotare che il prodotto cosmetico non ha probabilità di essere contaminato da *C. albicans*.

Bibliografia di riferimento

UNI EN ISO 18416:2009. *Cosmetici - Microbiologia - Ricerca della Candida albicans*. Milano: Ente Italiano di Unificazione; 2009.

Mierzejewski J, Woźniak-Kosek A, Kosek J. Microbes indicators of cosmetic preservation efficiency. Part III: *Candida albicans*. *Mil Pharm Med* 2013;6(1):19-32.

DETERMINAZIONE DI *ESCHERICHIA COLI*

0. Generalità

Gli aspetti di sintesi di seguito presentati si riferiscono al parametro batteri vitali mesofili aerobi rilevato con il metodo ISS Co 005A rev. 00.

Escherichia coli è un batterio a bastoncello, gram-negativo, aerobio e anaerobio facoltativo, non sporigeno. Fa parte della famiglia delle *Enterobacteriaceae* ed è incluso nel gruppo dei coliformi. Secondo la tradizionale classificazione, la specie produce indolo in terreni al triptofano ed è lattosio-fermentante. Si caratterizza anche per la produzione dell'enzima β -glucuronidasi. Nell'ambito del gruppo dei coliformi, *Escherichia coli* è ampiamente rappresentato ed è in esclusivo rapporto con il tratto gastrointestinale dell'uomo e degli animali a sangue caldo, a differenza dei generi *Enterobacter*, *Klebsiella* e *Citrobacter* e delle tante specie di coliformi psicotrofi che si caratterizzano per uno spiccato potenziale di ricrescita una volta pervenuti nell'ambiente.

Nei cosmetici *E. coli* è stato rilevato in prodotti e materie prime di lavorazione artigianale, in ambienti di produzione altamente contaminati. Negli ultimi anni sono stati formulati nuovi substrati, in numero sempre crescente, per la ricerca diretta di *E. coli*, basati sul rilevamento dell'attività enzimatica della β -glucuronidasi. Tuttavia, per l'analisi dei prodotti cosmetici vengono ancora utilizzati i metodi e i terreni colturali più tradizionali.

Non sono definiti valori soglia per questa specie nei prodotti cosmetici. Tuttavia, è obbligatoria l'assenza di *Escherichia coli* in questi prodotti, in relazione al suo ruolo di indicatore primario di contaminazione fecale.

1. Campo di applicazione

La procedura analitica viene utilizzata per il rilevamento e l'identificazione di *Escherichia coli* in prodotti cosmetici.

2. Termini e definizioni

Per lo specifico fine analitico, si applicano i seguenti termini e definizioni:

- *Escherichia coli*
Batterio gram-negativo a forma di bastoncello, mobile; su terreni agarizzati produce colonie lisce uniformi.
- *Brodo di arricchimento*
Terreno liquido non selettivo contenente neutralizzanti e/o agenti di dispersione e utilizzato per il prodotto sottoposto ad analisi.
- *Campione*
Porzione del prodotto (S) di almeno 1 mL o g utilizzata nell'analisi per preparare la sospensione primaria.
- *Diluizione/i del campione*
Diluizione/i della sospensione primaria.

- *Prodotto*
Prodotto cosmetico ricevuto nel laboratorio per le prove.
- *Sospensione primaria*
Sospensione (o soluzione) del campione in un volume definito di un adeguato terreno in brodo (diluente, neutralizzante, brodo di arricchimento o una loro combinazione).

3. Metodo

3.1. Principio del metodo

Il metodo è di tipo qualitativo (Presenza/Assenza). La prima fase consiste nell'eseguire un arricchimento utilizzando un brodo non selettivo per rivitalizzare e aumentare il numero di microrganismi eventualmente presenti. Per la seconda fase (isolamento) si utilizza un terreno selettivo con successive prove di identificazione. Per consentire la ricerca di microrganismi vitali, nel campione da analizzare, deve essere neutralizzato l'effetto inibente che, per la presenza di sostanze antimicrobiche, impedirebbe la crescita microbica dal campione analizzato. In tutti i casi, e a prescindere dalla metodologia, deve essere controllata e verificata la neutralizzazione delle proprietà antimicrobiche del prodotto. La procedura analitica è in linea con la norma UNI EN ISO 21150.

3.2. Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio (*vedi* sezione 2. Apparecchiature e attrezzature di base nel capitolo "Analisi microbiologiche dei prodotti cosmetici: linee guida per le buone pratiche di laboratorio").

3.3. Diluenti e terreni di coltura

3.3.1. Terreno di arricchimento

Il brodo di arricchimento è utilizzato per miscelare il campione e per rivitalizzare la popolazione microbica iniziale. Può contenere neutralizzanti se il campione da sottoporre ad esame ha proprietà antimicrobiche. Nel corso della procedura deve essere dimostrata l'efficacia della neutralizzazione (3.6.). Possono essere utilizzati altri diluenti e terreni di coltura qualora si siano dimostrati idonei all'uso.

3.3.1.1. Brodo Eugon LT 100

Composizione	
Digerito pancreatico di caseina	15 g
Digerito papainico di farina di soia	5 g
Sodio cloruro	4 g
Solfito di sodio	0,2 g
Destrosio	5,5 g
L-cistina	0,7 g
Lecitina di uova	1 g
Polisorbato 80	5 g
Octoxilolo 9	1 g
Acqua distillata	1000 mL
pH 7,0±0,2	

In questa formulazione sono contenuti ingredienti neutralizzanti, quali la lecitina e il polisorbato 80 e un agente di dispersione l'octoxilolo 9, che vengono aggiunti quando sono presenti sostanze antimicrobiche e il prodotto è immiscibile in acqua.

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara, controlla e conserva secondo le istruzioni della ditta produttrice. Sciogliere i componenti, polisorbato 80, octoxilolo 9 e lecitina di uova, uno dopo l'altro, in acqua distillata preventivamente portata ad ebollizione, fino alla loro completa miscelazione. Sciogliere gli altri componenti mescolando durante il riscaldamento. Distribuire il terreno in contenitori idonei. Sterilizzare in autoclave a $(121 \pm 3)^{\circ}\text{C}$ per 15 minuti. Conservare a riparo dalla luce a $(5 \pm 3)^{\circ}\text{C}$ per non più di un mese in condizioni ottimali.

3.3.2. Terreno di isolamento

3.3.2.1. MacConkey agar

Composizione	
Peptone	20 g
Lattosio	10 g
Sodio cloruro	5 g
Sali biliari	1,5 g
Rosso neutro	30 mg
Cristal violetto	1 mg
Agar	15 g
Acqua distillata	1000 mL
pH 7,1 \pm 0,2	

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara, controlla e conserva secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente. Sterilizzare in autoclave a $(121 \pm 3)^{\circ}\text{C}$ per 15 minuti. Conservare a riparo dalla luce a $(5 \pm 3)^{\circ}\text{C}$ per non più di un mese in condizioni ottimali.

3.3.3. Terreno selettivo di conferma

3.3.3.1. Blu di metilene-levine eosina agar

Composizione	
Digerito pancreatico di gelatina	10 g
Fosfato diidrogeno di potassio	2 g
Lattosio	10 g
Eosina Y	400 mg
Blu di metilene	65 mg
Agar	15 g
Acqua distillata	1000 mL
pH 7,1 \pm 0,2	

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara, controlla e conserva secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente. Il terreno finito può non essere limpido.

Distribuire in contenitori idonei e sterilizzare a $(121 \pm 3)^{\circ}\text{C}$ per 15 minuti. Conservare a riparo dalla luce a $(5 \pm 3)^{\circ}\text{C}$ per non più di un mese in condizioni ottimali.

3.3.4. Diluente per la sospensione batterica

3.3.4.1. Soluzione di cloruro di sodio triptone

Il diluente è utilizzato per la preparazione della sospensione batterica utilizzata per la procedura di verifica (3.6.).

Composizione	
Digerito pancreatico di caseina	1 g
Cloruro di sodio	8,5 g
Acqua distillata	1000 mL
pH 7,0±0,2	

Sciogliere i componenti in acqua mescolando durante il riscaldamento. Distribuire in contenitori idonei. Sterilizzare in autoclave a (121 ± 3)°C per 15 minuti. Conservare a riparo dalla luce a (5 ± 3)°C per non più di un mese in condizioni ottimali.

3.3.5. Terreno di crescita

3.3.5.1. Triptone Soia Agar (TSA)

Composizione	
Digerito pancreatico di caseina	15 g
Digerito enzimatico di farina di soia	5 g
Sodio cloruro	5 g
Agar	15 g
Acqua distillata	1000 mL
pH 7,3±0,2	

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara, controlla e conserva secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente. Sterilizzare in autoclave a (121 ± 3)°C per 15 minuti. Conservare a riparo dalla luce a (5 ± 3)°C per non più di un mese in condizioni ottimali.

3.4. Ceppi dei microrganismi

Per la verifica delle condizioni di analisi dovrebbe essere utilizzato *Escherichia coli* ATCC 8739 o un ceppo equivalente (CIP 53.126 o NCIMB 8545 o NBRC 3972 o KCTC 2571 o altro ceppo di collezione nazionale equivalente). Utilizzare comunque ceppi certificati.

3.5. Procedura

Utilizzare materiale sterile, apparecchiature e tecniche aseptiche per preparare il campione, la sospensione primaria e le diluizioni. Nel caso della preparazione della sospensione primaria in un agente solubilizzante, il tempo trascorso tra la fine della preparazione e il momento in cui l'inoculo viene a contatto con il brodo di arricchimento non deve superare i 45 minuti, se non specificamente menzionato in protocolli o documenti di riferimento.

3.5.1. Preparazione della sospensione primaria nel brodo di arricchimento

L'arricchimento è preparato da un campione di almeno 1 g o 1 mL del prodotto ben miscelato in almeno 9 mL di brodo di arricchimento (3.3.1.1.).

Annotare *S*, il peso o *V* il volume esatto del campione.

Il metodo deve essere controllato per garantire che la composizione (neutralizzante eventualmente aggiunto) e il volume del brodo diano prestazioni soddisfacenti (3.6.).

In alcuni casi, e quando possibile, la filtrazione del prodotto cosmetico attraverso una membrana, in seguito immersa nel brodo di arricchimento, facilita la neutralizzazione delle proprietà antimicrobiche del prodotto (3.6.3.).

3.5.2. Sospensione primaria

Il brodo di arricchimento, dopo aggiunta della sospensione primaria, deve essere incubato a (30÷35)°C per almeno 20 ore (massimo 72 ore).

3.5.3. Isolamento

Utilizzando un'ansa sterile, strisciare una aliquota della brodocoltura sul terreno di isolamento MacConkey agar (3.3.2.1.) per ottenere colonie isolate.

Incubare la piastra capovolta a (30÷35)°C per 24 ore. In caso di risultato negativo protrarre l'incubazione non oltre le 48 ore e ripetere la lettura.

Dopo incubazione verificare le eventuali colonie caratteristiche.

I microrganismi appartenenti alla specie *Escherichia coli* producono su MacConkey agar colonie di colore rosso mattone, non mucose, che possono presentare intorno una zona di bile precipitata.

Per verificare la presenza di *Escherichia coli* è opportuno sottoporre a prove di conferma le colonie tipiche. È anche possibile procedere all'identificazione delle specie con le prove biochimiche dei kit miniaturizzati, disponibili in commercio.

3.5.4. Conferma

Per l'accertamento dell'appartenenza dei microrganismi alla specie *Escherichia coli*, è opportuno procedere all'esecuzione delle seguenti prove di conferma:

- Colorazione di Gram;
- Coltura sul terreno Blu di metilene-levine eosina.

Prima di effettuare ciascuna prova, è necessario prelevare con un'ansa sterile le colonie sospette sviluppatesi sul substrato di isolamento isolandole su terreno di crescita Triptone Soia Agar (3.3.5.1.). Incubare a (30÷35)°C per (18÷24) ore. Eseguire tutte le prove su colonie con non più di 24 ore di sviluppo.

3.5.4.1. Colorazione di Gram

Verificare la presenza di bacilli gram-negativi a forma di bastoncello.

3.5.4.2. Coltura sul terreno di conferma

Inoculare la superficie del terreno Blu di metilene-levine eosina agar (3.3.3.1.) con le colonie sospette cresciute sul terreno MacConkey agar. Capovolgere la piastra di Petri e incubare a (30÷35)°C per almeno 24 ore (massimo 48 ore).

Dopo incubazione contare le colonie caratteristiche.

I microrganismi appartenenti alla specie *Escherichia coli* producono sul terreno Blu di metilene-levine eosina agar colonie di colore viola ciclamino con centro nero e riflessi verde metallico sotto la luce riflessa, e di aspetto blu-nero sotto la luce trasmessa.

Le colonie che presentano morfologia tipica sul terreno Blu di metilene-levine eosina agar possono essere sottoposte alla prova della produzione di indolo.

3.5.5. Espressione dei risultati

Se l'identificazione delle colonie conferma la presenza di questa specie, esprimere il risultato come:

Presenza di *Escherichia coli* nel campione, *S.*

Se non è osservata alcuna crescita dopo l'arricchimento e/o se l'identificazione delle colonie non conferma la presenza di questa specie, esprimere il risultato come:

Assenza di *Escherichia coli* nel campione, *S.*

3.6. Neutralizzazione delle proprietà antimicrobiche del prodotto

3.6.1. Generalità

Le diverse prove descritte a seguire dimostrano che il microrganismo può crescere nelle condizioni di analisi.

3.6.2. Preparazione dell'inoculo

Prima della prova, inoculare la superficie del terreno agarizzato non selettivo Triptone soia agar (TSA) (3.3.5.1.), con *Escherichia coli*. Incubare a (30÷35)°C per (18÷24) ore.

Dopo la crescita delle colonie, con un'ansa sterile, strisciare la superficie della coltura e risospendere nel diluente (3.3.4.1.) per ottenere una sospensione tarata di circa 1×10^8 UFC per mL.

Utilizzare questa sospensione a titolo noto e/o le sue diluizioni entro 2 ore.

3.6.3. Verifica del metodo di ricerca

3.6.3.1. Procedura

In 9 mL di diluente (3.3.4.1.), preparare una diluizione della sospensione a titolo noto (3.6.2.) al fine di ottenere una conta finale compresa tra 100 UFC/mL e 500 UFC/mL. Per calcolare la concentrazione finale dei microrganismi vitali nella sospensione diluita, trasferire 1 mL della sospensione in una piastra di Petri e versarvi da 15 mL a 20 mL del terreno (3.3.5.1.) mantenuto in bagnomaria a (45 ± 1)°C. Lasciare solidificare e poi incubare a (30÷35)°C per (20÷24) ore.

Preparare in duplicato la sospensione primaria (3.5.1.) nelle condizioni previste per l'analisi (almeno 1 g o 1 mL di prodotto) in una provetta o in un matraccio. Quando si utilizza il metodo di filtrazione per membrana, filtrare in duplicato almeno 1 mL di prodotto e trasferire ogni membrana in una provetta o in un matraccio contenente il brodo di arricchimento nelle condizioni definite.

Introdurre con metodo asettico 0,1 mL della sospensione a titolo noto diluita in una provetta o in un matraccio (prova di verifica). Miscelare, quindi incubare entrambe le provette o i matracci (prova di verifica e controllo non inoculato) a (30÷35)°C per (20÷24) ore.

Eseguire un isolamento per ogni provetta o matraccio (prova di verifica e controllo non inoculato). Utilizzando un'ansa sterile, strisciare un'aliquota della miscela incubata sulla

superficie del terreno di agar MacConkey nella piastra di Petri (diametro 90 mm). Incubare le piastre a (30÷35)°C per (24÷48) ore.

3.6.4. Interpretazione dei risultati di verifica

Verificare che la sospensione batterica contenga tra 100÷500 UFC/mL.

La neutralizzazione e il metodo sono considerati idonei se si manifesta crescita di *Escherichia coli* con colonie caratteristiche sulla piastra di verifica, mentre non si evidenzia crescita sulla piastra di controllo. Tuttavia, per quanto riguarda il controllo, se si evidenzia crescita sul terreno, il prodotto è contaminato; se non si osserva crescita il metodo è comunque idoneo, ma il prodotto non risulta contaminato.

Invece, la mancanza di crescita sulle piastre di verifica indica che è ancora presente attività antimicrobica e che è necessaria una modifica delle condizioni del metodo mediante un aumento del volume del brodo nutritivo, con la quantità di prodotto invariata, o mediante l'incorporazione di una quantità sufficiente di agente inattivante nel brodo di arricchimento, o mediante una combinazione idonea di procedure che consentano la crescita di *Escherichia coli*.

Se nonostante l'incorporazione di agenti inattivanti idonei e l'aumento del volume del brodo non fosse ancora possibile recuperare culture vitali come descritto sopra, indicare che il prodotto non ha probabilità di essere contaminato da *Escherichia coli*.

Bibliografia di riferimento

UNI EN ISO 21150:2009. *Cosmetici - Microbiologia - Ricerca di Escherichia coli*. Milano: Ente Italiano di Unificazione; 2009.

DETERMINAZIONE DI *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

0. Generalità

Gli aspetti di sintesi di seguito presentati si riferiscono al parametro batteri vitali mesofili aerobi rilevato con il metodo ISS Co 006A rev. 00.

I microrganismi compresi nel genere *Staphylococcus* appartengono alla famiglia delle *Micrococcaceae*, suddivisa in 4 generi: *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Stomatococcus* e *Planococcus*. Sono microrganismi di forma sferica di circa 0,5-1 µm di diametro, in colture in brodo possono presentarsi isolati, doppi, in tetradi e formare ammassi irregolari e a grappolo. Sono gram-positivi, immobili, generalmente privi di capsula, asporigeni e con molte specie cromogene, anaerobi facoltativi, generalmente catalasi positivi, chemorganotrofi.

Gli stafilococchi sono largamente diffusi in natura: si ritrovano nella polvere dei pavimenti, sui muri e su una grande varietà di oggetti inanimati, nonché nelle acque trattate come anche in quelle marine. *S. aureus* è stato isolato, in creme per uso cosmetico e in campioni di talco in polvere e lozioni per il corpo, così come anche in pigmenti per tatuaggi. La contaminazione di questi prodotti può avvenire durante l'uso da parte del consumatore.

Gli stafilococchi sono i più resistenti tra i batteri non sporigeni: possono sopravvivere a svariate condizioni ambientali avverse e sono relativamente resistenti al calore, all'essiccamento e ai disinfettanti. Le popolazioni naturali di *Staphylococcus* sono associate soprattutto alla pelle e alle mucose degli animali a sangue caldo e dell'uomo.

Alcune specie sono saprofiti, altre commensali, e altre ancora opportuniste patogene per l'uomo e per gli animali. Possono produrre diverse tossine, esoenzimi, enzimi lipolitici e coagulasi. Solo *S. aureus* è realmente considerato patogeno. Le altre specie hanno una patogenicità limitata. *S. aureus* può intervenire nella patologia umana soprattutto come agente eziologico di numerose infezioni della cute e delle mucose determinando, in alcuni casi, anche setticemie gravi, e di gravi infiammazioni cutanee anche in soggetti sottoposti a pratiche di tatuaggio. Alcuni biotipi appartenenti alla specie *S. aureus* sono responsabili di gravi infezioni alimentari per la capacità di produrre enterotossine termoresistenti e attive per ingestione.

Il parametro è da considerare un potenziale rischio per la salute del consumatore perché può causare infezioni nell'uomo e può segnalare condizioni di scarsa igiene nel processo di fabbricazione.

Pertanto, secondo le raccomandazioni di *Cosmetics Europe* e le linee guida dell'SCCS, *S. aureus* deve risultare non rilevabile in 1 g o 1 mL nei cosmetici per bambini o in cosmetici da utilizzare nella zona perioculare (Categoria 1), come anche in cosmetici di Categoria 2 in cui deve essere assente in 0,1 g o 0,1 mL del prodotto.

1. Campo di applicazione

La procedura analitica viene utilizzata per il rilevamento e l'identificazione di *Staphylococcus aureus* in prodotti cosmetici.

2. Termini e definizioni

Per lo specifico fine analitico, si applicano i seguenti termini e definizioni:

- *Staphylococcus aureus*
Cocchi gram-positivi, in terreni in brodo si presentano raggruppati principalmente in grappoli, in terreni agarizzati colonie lisce uniformi generalmente pigmentate in giallo.
- *Brodo di arricchimento*
Terreno liquido non selettivo contenente neutralizzanti e/o agenti di dispersione e utilizzato per il prodotto sottoposto ad analisi.
- *Campione*
Porzione del prodotto (S) di almeno 1 mL o g utilizzata nell'analisi per preparare la sospensione primaria.
- *Diluizione/i del campione*
Diluizione/i della sospensione primaria.
- *Prodotto*
Prodotto cosmetico ricevuto nel laboratorio per le prove.
- *Sospensione primaria*
Sospensione (o soluzione) del campione in un volume definito di un adeguato terreno in brodo (diluente, neutralizzante, brodo di arricchimento o una loro combinazione).

3. Metodo

3.1. Principio del metodo

La prima fase della procedura consiste nell'eseguire un arricchimento utilizzando un terreno in brodo non selettivo per aumentare il numero di microrganismi.

Nella seconda fase dell'analisi (isolamento) è utilizzato un terreno selettivo; successivamente vengono eseguite prove di identificazione.

Per consentire la ricerca di microrganismi vitali deve essere neutralizzata la possibile inibizione della crescita microbica dal campione, per la presenza di sostanze antimicrobiche. In tutti i casi, e a prescindere dalla metodologia, deve essere controllata e verificata la neutralizzazione delle proprietà antimicrobiche del prodotto.

La procedura analitica è in linea con la norma UNI EN ISO 22718.

3.2. Strumentazione e vetreria

Normale attrezzatura di laboratorio (*vedi* sezione 2. Apparecchiature e attrezzature di base nel capitolo "Analisi microbiologiche dei prodotti cosmetici: linee guida per le buone pratiche di laboratorio").

3.3. Terreni di coltura e reagenti

3.3.1. Terreno di arricchimento

Il brodo di arricchimento è utilizzato per disperdere il campione e per rivitalizzare la popolazione microbica iniziale. Può contenere neutralizzanti se il campione da sottoporre ad

analisi ha proprietà antimicrobiche. Deve essere dimostrata anche l'efficacia della neutralizzazione (3.6.).

Il brodo di arricchimento è idoneo per verificare la presenza di *Staphylococcus aureus* purché sia verificato in conformità a 3.6. Possono essere utilizzati altri diluenti e terreni di coltura qualora si siano dimostrati idonei all'uso.

3.3.1.1. Brodo Eugon LT 100

Composizione	
Digerito pancreatico di caseina	15 g
Digerito papainico di farina di soia	5 g
Sodio cloruro	4 g
Solfito di sodio	0,2 g
Destrosio	5,5 g
L-cistina	0,7 g
Lecitina di uova	1 g
Polisorbato 80	5 g
Octoxilolo 9	1 g
Acqua distillata	1000 mL
pH 7,0±0,2	

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara, controlla e conserva secondo le istruzioni della ditta produttrice. Sciogliere i componenti, polisorbato 80, octoxilolo 9 e lecitina, che neutralizzano le sostanze inibenti presenti nel campione, uno dopo l'altro, in acqua bollente fino al loro completo scioglimento. Sciogliere gli altri componenti miscelando durante il riscaldamento. Distribuire il terreno in contenitori idonei. Sterilizzare in autoclave a $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ per 15 minuti. Conservare a riparo dalla luce a $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ per non più di un mese in condizioni ottimali.

3.3.2. Terreno di isolamento

3.3.2.1. Terreno di base Baird Parker Agar

Composizione	
Triptone	10 g
Estratto di carne	5 g
Estratto di lievito	1 g
Glicina	12 g
Piruvato di sodio	10 g
Cloruro di litio	5 g
Agar	20 g
Acqua distillata	1000 mL
pH 6,8±0,2	

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara, controlla e conserva secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente fino ad ottenere la completa miscelazione dei componenti. Sterilizzare in autoclave a $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ per 15 minuti. Lasciare raffreddare fino alla temperatura di $(50 \pm 5)^\circ\text{C}$ prima di aggiungere il supplemento.

3.3.2.2. Emulsione di tuorlo d'uovo e tellurito di potassio al 3,5%

L'emulsione, già pronta, è disponibile in commercio. Il tellurito di potassio è classificato come Xi - Irritante. Nella manipolazione seguire le istruzioni della ditta produttrice e adottare precauzioni per la protezione respiratoria, delle mani e della pelle con dispositivi di protezione individuale (DPI).

3.3.2.3. Terreno completo Baird Parker Agar

Composizione	
Terreno di base	1000 mL
Emulsione di tuorlo e tellurito	50 mL

Aggiungere ad 1 L di terreno di base 50 mL di emulsione di tuorlo d'uovo al tellurito di potassio. Agitare per ottenere una soluzione omogenea e distribuire, rispettando le comuni regole di asepsi, in capsule di Petri. Il terreno, pronto per l'uso, può essere conservato a $(5 \pm 3) ^\circ\text{C}$ per non più di una settimana in condizioni ottimali.

3.3.3. Diluente per la sospensione batterica**3.3.3.1. Soluzione di cloruro di sodio triptone**

Il diluente è utilizzato per la preparazione della sospensione batterica utilizzata per la procedura di verifica (3.6.).

Composizione	
Digerito pancreatico di caseina	1 g
Cloruro di sodio	8,5 g
Acqua distillata	1000 mL
pH 7,0 \pm 0,2	

Sciogliere i componenti in acqua miscelando durante il riscaldamento. Distribuire in contenitori idonei. Sterilizzare in autoclave a $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ per 15 minuti.

3.3.4. Terreni di crescita**3.3.4.1. Triptone Soia Agar**

Composizione	
Digerito pancreatico di caseina	15 g
Digerito enzimatico di farina di soia	5 g
Sodio cloruro	5 g
Agar	15 g
Acqua distillata	1000 mL
pH 7,3 \pm 0,2	

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara, controlla e conserva secondo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Riscaldare fino ad ebollizione agitando frequentemente. Sterilizzare in autoclave a $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ per 15 minuti. Conservare a riparo dalla luce a $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$ per non più di un mese in condizioni ottimali.

3.3.4.2. Infuso di cuore e cervello

Composizione	
Infuso di cervello di vitello	200 g
Infuso di cuore di bue	250 g
Peptocomplex	10 g
Glucosio	2 g
Sodio cloruro	5 g
Sodio fosfato bibasico	2,5 g
Acqua distillata	1000 mL
pH 7,4±0,2	

Il terreno si trova anche in commercio in forma disidratata e si prepara, controlla e conserva seguendo le istruzioni della ditta produttrice. Reidratare il terreno in acqua distillata. Distribuire in tubi in ragione di circa di 10 mL/tubo. Sterilizzare in autoclave a $(121 \pm 3)^\circ\text{C}$ per 15 minuti. Il terreno preparato, pronto per l'uso, può essere conservato al buio ad una temperatura inferiore a 20°C .

3.3.5. Reagenti

3.3.5.1. Perossido di idrogeno al 3%

La soluzione, necessaria per la prova della catalasi, è disponibile in commercio alla concentrazione indicata e pronta per l'uso. Conservare al riparo dalla luce diretta alla temperatura di $(5 \pm 3)^\circ\text{C}$.

3.3.5.2. Plasma EDTA o Plasma citrato per la coagulasi

Il plasma di coniglio, necessario per l'individuazione di *S. aureus* coagulasi positivi, si trova anche in commercio in forma disidratata. Reidratare il contenuto del flacone con acqua distillata sterile, seguendo le indicazioni della ditta produttrice. Il plasma ricostituito può essere conservato a $(2-8)^\circ\text{C}$ per 15 giorni e fino a 30 giorni a temperatura intorno a -20°C . Ogni partita di plasma va saggiata sia con un ceppo di controllo coagulasi positivo sia con uno coagulasi negativo: è consigliabile utilizzare come controllo positivo *S. aureus* ATCC 27217 e come controllo negativo *S. simulans* ATCC 11631; in alternativa, comunque, utilizzare colture di riferimento certificate.

È possibile anche servirsi dei test di agglutinazione al lattice disponibili in commercio, che possono sostituire i test per la prova della coagulasi, utilizzando plasma umano o di coniglio.

3.4. Ceppi dei microrganismi

Per la verifica delle condizioni di analisi dovrebbe essere utilizzato *Staphylococcus aureus* ATCC 27217 (ceppo equivalenti: CIP 4.83 o NCIMB 9518). Utilizzare comunque ceppi certificati.

3.5. Procedura

Utilizzare materiale sterile, apparecchiature e tecniche aseptiche per preparare il campione, la sospensione primaria e le diluizioni. Nel caso di preparazione della sospensione primaria in un adatto agente solubilizzante, il tempo trascorso tra la fine della preparazione e il momento in cui l'inoculo viene a contatto con il brodo di arricchimento non deve superare i 45 minuti, se non specificamente menzionato in protocolli o documenti di riferimento.

3.5.1. Preparazione della sospensione primaria nel brodo di arricchimento

L'arricchimento è preparato da un campione di almeno 1 g o 1 mL del prodotto ben miscelato in almeno 9 mL di brodo di arricchimento (3.3.1.1.).

Annotare S , il peso o V il volume esatto del campione.

Il metodo deve essere controllato per garantire che la composizione (con neutralizzante eventualmente aggiunto) e il volume del brodo diano prestazioni soddisfacenti (3.6.3.).

In alcuni casi, e quando possibile, la filtrazione del prodotto cosmetico attraverso una membrana, in seguito immersa nel brodo di arricchimento, facilita la neutralizzazione delle proprietà antimicrobiche del prodotto (3.6.3.).

3.5.2. Incubazione del brodo di arricchimento

Incubare la sospensione primaria preparata nel brodo (3.5.1.) a $(30\pm 35)^{\circ}\text{C}$ per almeno 20 ore (massimo 72 ore).

3.5.3. Isolamento

Utilizzando un'ansa sterile, strisciare un'aliquota della brodocoltura sul terreno di isolamento (3.3.2.3.) al fine di ottenere colonie isolate.

Incubare a $(30\pm 35)^{\circ}\text{C}$ per (24 ± 2) ore. In caso di risultato negativo protrarre l'incubazione per altre (24 ± 2) ore e ripetere la lettura.

Dopo incubazione verificare le colonie caratteristiche. I microrganismi appartenenti al genere *Staphylococcus* coagulasi positivi producono sul substrato di isolamento colonie nere per effetto della riduzione del tellurito a tellurio metallico. Dopo 24 ore di sviluppo le colonie, che appaiono brillanti, lisce e convesse con margini netti, circondate in genere da un alone chiaro dovuto all'attività proteolitica, si presentano con un diametro di $(1\pm 1,5)$ mm; dopo 48 ore di incubazione hanno comunemente un diametro di $(1,5\pm 2,5)$ mm. Le specie appartenenti al genere *Staphylococcus* coagulasi negative sviluppano, invece, colonie nere con margini irregolari, non circondate da alone trasparente.

Per dimostrare la presenza di *S. aureus* è opportuno sottoporre a prove di conferma le colonie nere con e senza alone. Infatti le colonie tipiche di *S. aureus* sono circondate, generalmente, da un doppio alone: uno interno opaco e uno esterno trasparente. Tuttavia alcune colonie possono essere atipiche, senza alcun alone. Sul terreno possono crescere alcuni streptococchi, micrococchi, corinebatteri, enterobatteri, funghi e lieviti. È possibile comunque anche procedere all'identificazione delle specie con le prove biochimiche dei kit miniaturizzati, disponibili in commercio.

3.5.4. Conferma

Per l'accertamento dell'appartenenza delle colonie sospette isolate sul terreno Baird Parker agar alla specie *Staphylococcus aureus*, è opportuno procedere all'esecuzione delle seguenti prove di conferma in relazione a quanto descritto in "Tecniche microbiologiche di base":

- colorazione di Gram;
- prova della catalasi;
- prova della coagulasi.

Prima di effettuare ciascuna prova, è necessario prelevare con un'ansa sterile le colonie sospette sviluppatesi sul substrato di isolamento isolandole su terreno di crescita Triptone Soia Agar (3.3.4.1.). Incubare a $(30\pm 37)^{\circ}\text{C}$ per (22 ± 26) ore. Eseguire tutte le prove su colonie con non più di 24 ore di sviluppo.

3.5.4.1. Colorazione di Gram

Verificare la presenza di cocci gram-positivi in grappoli.

3.5.4.2. Prova della catalasi

La prova differenzia i microrganismi appartenenti alla famiglia delle *Micrococcaceae* da quelli appartenenti alla famiglia delle *Streptococcaceae*.

Stemperare su un vetrino portaoggetti una colonia cresciuta su Triptone Soia Agar (3.3.4.1.) e ricoprirla con alcune gocce di perossido di idrogeno al 3% (3.3.5.1.).

La presenza dell'enzima catalasi è rilevata dallo sviluppo immediato di bollicine di gas.

I microrganismi che fanno parte della famiglia delle *Micrococcaceae*, a cui appartiene il genere *Staphylococcus*, sono catalasi positivi.

3.5.4.3. Prova della coagulasi

La prova evidenzia l'attività coagulante esercitata dagli stafilococchi potenzialmente patogeni sul plasma. Tale attività è dovuta ad almeno due fattori: coagulasi libera (enzima 0) e coagulasi legata o *clumping factor* (antigene della parete cellulare).

L'enzima è presente nella maggior parte dei biotipi appartenenti alla specie *Staphylococcus aureus* e in biotipi appartenenti alle specie *S. intermedius* e *S. hyicus*, opportunisti patogeni per gli animali ed è sempre assente nelle specie saprofiti e commensali.

3.5.4.3.1. Prova della coagulasi libera in provetta

Prelevare con un'ansa sterile una colonia cresciuta su Triptone Soia Agar, stemperarla in Infuso di Cuore e Cervello (3.3.4.2.). Incubare a (35÷37)°C per (22÷26) ore.

Dosare in una provetta sterile 0,5 mL di plasma EDTA o plasma citrato (3.3.5.2.) e 0,5 mL della brodocoltura sviluppatasi in Infuso di Cuore e Cervello, utilizzando pipette sterili.

In alternativa, emulsionare 2-4 colonie, cresciute su Triptone Soia Agar, nella provetta contenente il plasma EDTA o plasma citrato (3.3.5.2.); miscelare delicatamente e incubare a (35÷37)°C, preferibilmente in bagno termostato. Durante le prime 4 ore d'incubazione, effettuare la lettura ogni ora, inclinando la provetta da un lato con cura e senza agitare. Nei due terzi o in tutto il mezzo colturale la presenza dell'enzima coagulasi è rivelata da un coagulo ben gelificato. Se la prova risulta negativa, incubare ancora la provetta e ripetere la lettura dopo altre (22÷26) ore.

Il test in provetta accerta sia la coagulasi libera sia la coagulasi legata.

3.5.4.3.2. Prova della coagulasi legata

Prelevare con un'ansa sterile una colonia cresciuta su Triptone Soia Agar, stemperarla in una goccia d'acqua su un vetrino portaoggetti. Miscelare la sospensione ottenuta con un'ansata di plasma EDTA o plasma citrato. Gli Stafilococchi positivi alla coagulasi legata producono ammassi macroscopici entro (5÷15) sec. Se un biotipo è positivo alla coagulasi legata è sicuramente positivo anche alla coagulasi libera, se è negativo alla coagulasi legata può essere sia negativo che positivo alla coagulasi libera; pertanto è necessario confermare la prova su vetrino con quella in provetta.

Il test è indicato come tecnica di screening in presenza di numerosi campioni.

3.5.5. Espressione dei risultati

Se l'identificazione delle colonie conferma la presenza di questa specie, esprimere il risultato come:

Presenza di *Staphylococcus aureus* nel campione, *S.*

Se non è osservata alcuna crescita dopo l'arricchimento e/o se l'identificazione delle colonie non conferma la presenza di questa specie, esprimere il risultato come:

Assenza di *Staphylococcus aureus* nel campione, S.

3.6. Neutralizzazione delle proprietà antimicrobiche del prodotto

3.6.1. Generalità

Le diverse prove sotto descritte dimostrano che il microorganismo può crescere nelle condizioni di analisi.

3.6.2. Preparazione dell'inoculo

Prima della prova, inoculare la superficie di un terreno non selettivo, non neutralizzante (TSA) (3.3.4.1.) con *Staphylococcus aureus* (3.4.). Incubare la piastra a (30÷35)°C per (18÷24) ore.

Per raccogliere la coltura, utilizzare un'ansa sterile, strisciare la superficie della coltura e risospendere nel diluente (3.3.3.1.) per ottenere una sospensione a concentrazione nota di circa 1×10^8 UFC per mL (misurando con uno spettrofotometro).

Utilizzare questa sospensione e le sue diluizioni entro 2 ore.

3.6.3. Verifica del metodo di ricerca

3.6.3.1. Procedura

Nelle provette da 9 mL di diluente, preparare una diluizione della sospensione a concentrazione nota per ottenere una conta finale compresa tra 100 UFC per mL e 500 UFC per mL. Per il conteggio della concentrazione finale dei microrganismi vitali nella sospensione diluita, trasferire 1 mL della sospensione in una piastra di Petri e versarvi da 15 mL a 20 mL del terreno TSA mantenuto in bagnomaria a (45 ± 1)°C. Lasciare solidificare e poi incubare a (30÷35)°C per (20÷24) ore.

Preparare in duplicato la sospensione primaria nelle condizioni scelte per la prova (almeno 1 g o 1 mL di prodotto, volume definito di brodo di arricchimento) in una provetta o in un matraccio. Quando si utilizza il metodo di filtrazione per membrana, filtrare in duplicato almeno 1 mL di prodotto e trasferire ogni membrana in una provetta o in un matraccio contenente il brodo di arricchimento.

Introdurre, sterilmente, 0,1 mL della sospensione di microrganismi in una provetta o in un matraccio (prova di verifica). Miscelare, quindi incubare entrambe le provette o i matracci (prova di verifica e di controllo non inoculato) a (30÷35)°C per (20÷24) ore.

Eeguire un isolamento per ogni provetta o matraccio (prova di verifica e di controllo non inoculato). Utilizzando un'ansa sterile, strisciare un'aliquota della miscela sulla superficie di una piastra di Petri (diametro 90 mm) contenente circa da 15 mL a 20 mL di terreno di Baird Parker agar (3.3.2.3.). Incubare le piastre a (30÷35)°C per (24÷48) ore.

3.6.3.2. Interpretazione dei risultati di verifica

Verificare che la sospensione batterica contenga tra 100 UFC per mL e 500 UFC per mL.

La neutralizzazione e il metodo di ricerca sono considerati idonei se si manifesta crescita di *Staphylococcus aureus* sulla piastra di verifica, mentre non c'è crescita sulla piastra di controllo.

Tuttavia, per quanto riguarda il controllo, se si evidenzia crescita sul terreno, il prodotto è contaminato; se non si osserva crescita il metodo è comunque idoneo, ma il prodotto non risulta contaminato.

Invece, la mancanza di crescita sulle piastre di verifica indica che è ancora presente attività antimicrobica e necessita di una modifica delle condizioni del metodo mediante un aumento del volume del brodo nutritivo, con la quantità di prodotto invariata, o mediante l'incorporazione di una quantità sufficiente di agente inattivante nel brodo di arricchimento, o mediante una combinazione appropriata di modifiche in modo da consentire la crescita di *Staphylococcus aureus*.

Se nonostante l'incorporazione di agenti inattivanti idonei e un sostanziale aumento del volume del brodo non fosse ancora possibile recuperare culture vitali come descritto sopra, riportare che il prodotto non ha probabilità di essere contaminato da *Staphylococcus aureus*.

Bibliografia di riferimento

UNI EN ISO 22718:2009. *Cosmetici - Microbiologia - Ricerca di Staphylococcus aureus*. Ente Italiano di Unificazione; 2009.

Macvren Dashen M, Fremu Chollom P, Ngueme Okechalu J, Ashulee Ma'aji J. Microbiological quality assessment of some brands of cosmetics powders sold within Jos Metropolis, Plateau State. *J Microbiol Biotech Res* 2011;1(2):101-6.

APPENDICE A

**Sistema Rapid Alert Exchange (RAPEX):
segnalazioni relative ai cosmetici dal 2006**

Il Sistema Rapid Alert Exchange (RAPEX) è stato istituito nel 2004 in seguito al recepimento, con DL.vo 172/2004, della Direttiva sulla sicurezza generale dei prodotti, la Direttiva 2001/95/CE.

Il RAPEX rappresenta un meccanismo di rapido scambio di informazioni tra gli Stati membri e la Commissione Europea sulle misure, preventive e restrittive, da adottare nei confronti di tutti quei prodotti di consumo (ad eccezione di alimenti, farmaci e dispositivi medici) che presentino un grave rischio per la salute e la sicurezza dei consumatori. Tali misure possono essere adottate volontariamente da un produttore o un distributore oppure imposte, o comunque richieste, dall'autorità di uno Stato membro responsabile del controllo della sicurezza del prodotto oggetto della notifica.

A cadenza settimanale, sul sito della Commissione, è possibile valutare le nuove segnalazioni, i possibili rischi connessi all'utilizzo del prodotto e le misure adottate dal paese notificante. Le informazioni diffuse attraverso il sistema RAPEX, contribuiscono così a limitare o impedire la circolazione, e quindi la commercializzazione e l'utilizzo, di prodotti pericolosi.

In questo modo, i vari Paesi possono verificare l'eventuale presenza sul proprio territorio del prodotto segnalato e adottare gli opportuni provvedimenti (richiamo volontario, ritiro, sequestro) e ogni Stato membro è tenuto poi a informare tutti gli altri dei provvedimenti adottati nel proprio territorio.

Nella *Gazzetta Ufficiale dell'Unione europea* L 22 del 26.1.2010 è stata pubblicata la Decisione della Commissione europea 2010/15/UE del 16 dicembre 2009 con cui sono state adottate le linee guida per la gestione del sistema comunitario d'informazione RAPEX, nonché della procedura di notifica di cui all'art. 11 della Direttiva 2001/95/CE relativa alla sicurezza generale dei prodotti.

Di seguito vengono riportate le segnalazioni, suddivise per anno, riguardanti cosmetici in cui sono stati riscontrati problemi di natura microbiologica.

Segnalazioni del Sistema RAPEX sui problemi microbiologici riguardanti i cosmetici, suddivise per anno

Anno	Tipologia di prodotto	Paese di origine	Paese segnalante	Risultati delle analisi
2006	35 segnalazioni relative ai cosmetici (5 hanno riguardato aspetti microbiologici)			
	Crema gel notte	Ucraina	Estonia	<i>Candida albicans</i>
	Maschera contorno occhi	Grecia	Grecia	Batteri vitali aerobi ($5,8 \times 10^4 \div 5 \times 10^6$ UFC/g)
	Crema per bambini	Russia	Estonia	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Batteri vitali aerobi ($3 \div 6,5 \times 10^3$ UFC/g)
	Gel dermico	Danimarca	Norvegia	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Batteri vitali aerobi ($4,3 \times 10^5$ UFC/g e $3,2 \times 10^6$ UFC/g)
	Make-up per bambini	Cina	Spagna	Batteri vitali aerobi ($1,3 \times 10^4$ UFC/g) Muffe e lieviti ($7,9 \times 10^3$ UFC/g)
2007	88 segnalazioni relative ai cosmetici (9 hanno riguardato aspetti microbiologici)			
	Lozione corpo	Austria	Austria	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	Crema corpo	Australia	Finlandia	Batteri vitali aerobi (1×10^6 UFC/g)
	Dentifricio	Cina	Francia	<i>Klebsiella oxytoca</i> <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Batteri vitali aerobi (media $4,2 \times 10^6$ UFC/g)
	Balsamo contorno occhi	Germania	Germania	<i>Staphylococcus aureus</i> (0,5 g)
	Struccante	Francia	Francia	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Batteri vitali aerobi ($> 3 \times 10^6$ UFC/mL)
	Crema notte	Russia	Estonia	Batteri vitali aerobi ($> 1,7 \times 10^4$ UFC/g)
	Struccante make-up	Francia	Francia	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Batteri vitali aerobi ($> 5 \times 10^5$ UFC/mL)

segue

continua

Anno	Tipologia di prodotto	Paese di origine	Paese segnalante	Risultati delle analisi
2008	64 segnalazioni relative ai cosmetici (9 hanno riguardato aspetti microbiologici)			
	Crema per bambini	Germania	Austria	Batteri vitali aerobi (3168 UFC/g)
	Lozione solare	Austria	Germania	Batteri vitali aerobi (8,0 x 10 ⁶ UFC/g) Tra questi, isolati: <i>Enterobacter</i> , <i>Enterococcus faecium</i> e <i>Enterococcus</i> sp
	Make-up per bambini	Hong Kong	Spagna	Batteri vitali aerobi (1,3 x 10 ³ UFC/g)
	Inchiostro per tatuaggio di superficie	Stati Uniti	Germania	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1,1 x 10 ⁶ ; 8,1 x 10 ⁷ UFC/g) Batteri vitali aerobi (3,6 x 10 ⁶ UFC/g) Lieviti (9 x 10 ⁵ UFC/g)
	Latte detergente	Germania	Germania	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (< 10 ² - 6 x 10 ² UFC/g)
	Dentifricio	Sud Africa	Spagna	Batteri vitali aerobi (1,1 x 10 ⁶ UFC/g)
	Balsamo per bambini	Belgio	Belgio	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	Crema contorno occhi	Francia	Francia	<i>Rhizobium radiobacter</i>
	Dentifricio	Irlanda	Spagna	Batteri vitali aerobi (1 x 10 ⁴ UFC/g) Enterobatteriacee totali (1,6 x 10 ³ UFC/g)
2009	88 segnalazioni relative ai cosmetici (7 hanno riguardato aspetti microbiologici)			
	Spray orale e per lavaggio bocca	Germania	Germania	<i>Burkholderia cepacia</i> presuntivo
	Crema per peeling	Polonia	Francia	<i>Achromobacter xylosoxidans</i> Batteri vitali aerobi (3 x 10 ⁶ UFC/g)
	Crema solare	Repubblica Ceca	Slovacchia	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (1,5 x 10 ⁵ ÷1,9 x 10 ⁶ UFC/g) Batteri vitali aerobi (7,2 x 10 ⁵ ÷7,5 x 10 ⁶ UFC/g)
	Collutorio	Regno Unito	Regno Unito	Batteri vitali aerobi
	Lozione	Ungheria	Germania	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Batteri vitali aerobi (1,9 x 10 ⁷ UFC/g)
	Crema da massaggio	Austria	Austria	<i>Staphylococcus aureus</i>
	Lubrificante	Francia	Polonia	Lieviti
2010	67 segnalazioni relative ai cosmetici (6 hanno riguardato problemi microbiologici)			
	Latte detergente	Italia	Portogallo	Lieviti e muffe (4,3 x 10 ⁵ - 6 x 10 ⁶ UFC/g) Batteri vitali aerobi (8,2 x 10 ⁵ - 7,5 x 10 ⁶ UFC/g)
	Inchiostro per tatuaggio all'hennè	India	Germania	<i>Bacillus firmus</i> <i>Pantoea agglomerans</i> (2,6 x 10 ⁶ UFC/g su superficie cutanea)
	Gel Bagno	Cina	Germania	<i>Burkholderia cepacia</i> (>10 ⁷ UFC/g)
	Pasta lavamani	Germania	Germania	<i>P. aeruginosa</i> (8,2 x 10 ⁶ UFC/g)
	Shampoo	Filippine	Germania	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> Batteri vitali aerobi (>5,7 x 10 ⁵ UFC/g)
	Crema penis	Germania	Germania	<i>Enterobacter gergoviae</i> (1,6 x 10 ⁴ UFC/g) Batteri vitali aerobi (4,4 x 10 ⁵ UFC/g)

segue

continua

Anno	Tipologia di prodotto	Paese di origine	Paese segnalante	Risultati delle analisi
2011	106 segnalazioni relative ai cosmetici (8 hanno riguardato problemi microbiologici)			
	Crema depigmentante	Spagna	Portogallo	Batteri vitali aerobi (1083 UFC/g)
	Crema per gli occhi	Israele	Finlandia	Batteri vitali aerobi ($2,9 \times 10^5$ UFC/g) tra cui <i>Enterobacter gergoviae</i>
	Dentifricio in polvere	India	Germania	Batteri vitali aerobi ($5,4 \times 10^5$ UFC/g) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Enterococcus faecium</i>
	Shampoo/gel doccia	Germania	Germania	Batteri vitali aerob ($1,1 \times 10^6$ - 19×10^6 UFC/g); <i>Enterobacter cloacae</i> <i>Citrobacter freundii</i> <i>Klebsiella pneumoniae pneumoniae</i> <i>Pseudomonas putida</i>
	Make up per gli occhi	Pakistan	Francia	Batteri vitali aerobi (5×10^3 UFC/g)
	Fitness gel	Turchia	Germania	Batteri vitali aerobi ($4,1 \times 10^5$ - $5,2 \times 10^5$ UFC/g) <i>Burkholderia cepacia</i>
	Shampoo per bambini, sapone in schiuma, gel, crema e lozione	Danimarca	Germania	<i>Enterobacter gergoviae</i>
	Crema da giorno colorata	Italia	Germania	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ($\geq 3 \times 10^6$ UFC/g)
2012	81 segnalazioni relative ai cosmetici (8 hanno riguardato problemi microbiologici)			
	Burro di caritè	Germania	Austria	Batteri vitali aerobi ($\geq 3 \times 10^3$ UFC/g) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>C. albicans</i>
	Body scrub	Cina	Germania	Batteri vitali aerobi (48×10^5 UFC/g) <i>Burkholderia cepacia</i>
	Make up	Cina	Gran Bretagna	Funghi
	Bagno latte per bambini	Germania	Germania	<i>Serratia marcescens</i>
	Siero anti-rughe	Stati Uniti	Olanda	<i>Pseudomonas</i> spp ($1,5 \times 10^5$ UFC/g)
	Grasso di marmotta	Germania	Austria	Batteri vitali aerobi ($\geq 76 \times 10^5$ UFC/g) <i>Enterobacteriaceae</i> ($\geq 67 \times 10^5$ UFC/g) <i>Pseudomonas</i> spp. ($\geq 61 \times 10^5$ UFC/g)
	Pasta lavamani	Germania	Germania	Batteri vitali aerobi ($1,9 \times 10^7$ UFC/g) <i>Enterobacter gergoviae</i>
	Shampoo	Austria	Austria	Batteri vitali aerobi ($2,4 \times 10^4$ UFC/mL) <i>Pantoea</i> ($8,7 \times 10^3$ UFC/mL) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (2×10^4 UFC/mL)

segue

continua

Anno	Tipologia di prodotto	Paese di origine	Paese segnalante	Risultati delle analisi
2013	64 segnalazioni relative ai cosmetici (9 hanno riguardato problemi microbiologici (fino alla 35 ^a settimana)			
	Henna	Repubblica Ceca	Slovacchia	Batteri vitali aerobi (1,4 x 10 ⁵ UFC/g; 1,9 x 10 ⁴ UFC/g; 2,6 x 10 ⁴ UFC/g)
	Gel da massaggio	Tailandia	Germania	Batteri vitali aerobi (1,2 x 10 ⁵ UFC/g; 5,1 x 10 ⁵ UFC/g) <i>Enterobacteriaceae</i>
	Crema per le mani	Germania	Austria	Batteri vitali aerobi (≥ 10 ³ UFC/g) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (≥ 13 x 10 ⁴ UFC/g) <i>Enterobacteriaceae</i>
	Coloranti per capelli	Germania	Slovacchia	Batteri vitali aerobi (9,0 x 10 ⁴ UFC/g)
	Crema per la pelle	Germania	Germania	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (> 6 x 10 ⁴ UFC/g) Batteri vitali aerobi (2,6 x 10 ⁶ UFC/g)
	Crema	Olanda	Regno Unito	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (>1,5 x 10 ⁴ UFC/g) Batteri vitali aerobi (>3 x 10 ³ UFC/g)
	Shampoo	Estonia	India	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
	Detergente	Germania	Austria	<i>Burkholderia cepacia</i>
	Shampoo e bagnoschiuma	Spagna	sconosciuto	Batteri vitali aerobi

*Stampato da Ugo Quintily SpA
Viale Enrico Ortolani 149/151, 00125 Roma*

Roma, luglio-settembre 2013 (n. 3) 6° Suppl.