

## Metodi analitici per lo studio delle matrici alimentari

Hanno collaborato alla stesura:

per i metodi  
chimici

Giuseppe Biasimi  
Aldo Armenzoni  
Sandro Sbaragli  
Maria Manfredini  
Giulio Barbieri  
Ermanno Errani  
Simona Coppi  
Enzo Ricci  
Costanza Baldrati  
Antonio Semprini  
Sergio Marini

PMP Piacenza  
PMP Parma  
PMP Parma  
PMP Reggio Emilia  
PMP Modena  
PMP Bologna  
PMP Ferrara  
PMP Ferrara  
PMP Ravenna  
PMP Forlì  
PMP Rimini

per i metodi  
microbiologici

Daniela Bernardi  
Mariella Magri  
Giovanni Martinelli  
Clara Vannini  
Edgardo Contato  
Fausto Mughetti  
Ettore Bertaccini  
Rita Rossi

Hanno coordinato il lavoro dei gruppi:

Marinella Natali  
Gian Carlo Pavoni  
Giuseppe Poda

Regione Emilia-Romagna  
PMP Bologna Settore chimico-ambientale  
PMP Bologna Settore biotossicologico

La Collana *Dossier* è pubblicata a cura di:  
Sedi (Settore documentazione e informazione su rischi e  
danni in ambienti di vita e di lavoro) - Pmp - Us1 28  
Bologna, via Triachini, 17 tel. 051/392436-392575

Regione Emilia-Romagna, Servizi sanitari di prevenzione Bologna,  
via Aldo Moro, 30 - tel. 051/283182-283152

Copia del volume può essere richiesta al Sedi

Redazione: Rossella Salmaso, Sedi  
Stampa: Regione Emilia-Romagna,  
Bologna, Settembre 1993.

*L'Assessorato regionale alla Sanità ha individuato, per l'anno 1991, tra gli obiettivi prioritari nell'ambito dell'attività di vigilanza e controllo dei Servizi e Presidi di prevenzione delle Usi sui prodotti alimentari, l'attuazione di un piano di ispezioni, campionamenti ed analisi da effettuarsi principalmente sulla produzione locale di formaggi.*

*Nel corso di tale programma sono state effettuate circa 900 ispezioni ed è stato analizzato un migliaio di campioni di formaggi, di cui circa 800 prelevati alla produzione e circa 200 al consumo. Sono stati analizzati anche circa 600 tamponi ambientali effettuati per valutare la contaminazione microbica delle superfici di lavoro e delle attrezzature dei luoghi di produzione.*

*Per quanto attiene alla parte analitica i parametri chimici e microbiologici da ricercare sono stati individuati rispetto ai rischi da contaminazione, in relazione all'ambiente, alle materie prime, alla stagionalità ed al tipo di produzione.*

*La necessità di poter valutare uniformemente i dati ha fatto emergere l'esigenza di individuare le metodiche analitiche di riferimento nonché di standardizzare le procedure in uso nella rete laboratoristica di sanità pubblica dell'Emilia-Romagna.*

*A tal fine un gruppo di lavoro costituito da operatori di tutti i Presidi multizonali di prevenzione della regione ha effettuato una ricognizione delle metodiche utilizzabili per la determinazione dei parametri da ricercare con particolare riferimento a quelle non espressamente individuate dalla legislazione vigente.*

*L'impegnativo, produttivo e qualificato lavoro svolto da tale gruppo ha portato alla definizione dei metodi descritti nel presente volume che intende essere non solo uno strumento di lavoro ed un punto di riferimento per gli operatori, ma anche una garanzia di trasparenza e di uniformità di comportamento dei laboratori di sanità pubblica della nostra regione.*

*Occorre poi segnalare che, oltre alla realizzazione di questo manuale, saranno promosse ulteriori iniziative tese a permettere di raggiungere la maggiore omogeneità di comportamento possibile quali un corso formativo per operatori addetti ad analisi sugli alimenti, l'attuazione di controlli di qualità interlaboratorio e la revisione delle metodiche utilizzate per la determinazione di alcuni altri parametri.*

*Un ringraziamento sentito per l'impegno e la passione dimostrati da tutti i componenti il gruppo di lavoro.*

*Paolo Tori*



## INDICE

1. Metodi per la ricerca di parametri microbiologici	pag. 7
1.1 Ricerca di coliformi e di <i>E. Coli</i>	" 8
1.2 Ricerca di <i>Staphylococcus aureus</i>	" 16
1.3 Ricerca di <i>Salmonella ssp.</i>	" 19
1.4 Ricerca di <i>Listeria ssp.</i>	" 24
1.5 Ricerca di <i>Yersinia enterocolitica</i>	" 28
1.6 Igiene ambientale: controllo microbiologico delle superfici	" 35
2. Metodi per la ricerca di parametri chimici	" 41
2.1 Determinazione dell'anatossina M1 nei formaggi	" 42
2.2 Determinazione dello iodio totale nei formaggi	" 46
2.3 Determinazione dei metalli pesanti nei formaggi	" 49
2.4 Determinazione dei pesticidi organoclorurati	" 51



## 1. METODI PER LA RICERCA DI PARAMETRI MICROBIOLOGICI

Per caratterizzare l'assetto microbiologico delle matrici alimentari esistono diverse procedure alcune delle quali sono proprie del tipo di alimento mentre altre dipendono solo dall'obiettivo analitico.

Dal punto di vista delle metodologie tradizionali il percorso che usualmente si segue consta essenzialmente di quattro fasi:

1. campionamento;
2. preparazione del campione;
3. semina nei terreni colturali, eventualmente preceduta da uno o più prearricchimenti e da uno o più arricchimenti selettivi;
4. identificazione (tipizzazione) degli stipiti batterie!.

Ciascuno dei momenti operativi indicati può essere eseguito con terreni e procedure diverse che, pur essendo singolarmente corrette, portano all'espressione di risultati anche molto difformi. A questo si deve aggiungere che per le ricerche quantitative è possibile adottare due filosofie di indagine:

1. la tecnica del numero più probabile, presupponendo microrganismi da contare distribuiti casualmente nell'omogenato del campione, permette di ottenere una valutazione "non assoluta" del numero (il risultato viene espresso in MPN/g o MPN/ml );
2. la tecnica della conta diretta che partendo dal presupposto che ciascuna cellula microbica presente nel campione può formare una colonia visibile in un terreno agarizzato, permette (almeno in via teorica) una valutazione "assoluta" del numero (il risultato è espresso in UFC/g o in UFC/ml).

In questa prima fase, viene proposto il percorso analitico da seguire per la determinazione di:

1. coliformi, *E.coli*, *St.aureus* (non specificatamente enterotossico) nel gruppo dei germi indicatori dello stato igienico
2. *Salmonella spp* e *St.aureus* enterotossico nel gruppo dei "patogeni classici"
3. *L. monocytogenes* e *Y. enterocolitica* (biosierotipi patogeni) nel gruppo dei cosiddetti "patogeni emergenti" ad attitudine psicrofila
4. Indicatori (germi mesofili aerobi, gruppo coliformi, *E. coli*, gruppo streptococchi fecali, *St. aureus* non enterotossico) e patogeni (*Salmonella spp.* e *L. monocytogenes*) sulle superfici (piani di lavoro ed attrezzature) a contatto con gli alimenti.

### AVVERTENZA

Salvo diversa indicazione, i metodi che vengono proposti prescindono dal tipo di alimento ed ovviamente si intendono sostituiti sia dai successivi aggiornamenti che da diverse indicazioni nazionali o comunitarie.

## 1.1 RICERCA DI COLIFORMI E *E. COLI*

### Preparazione dell'omogenato

La prima operazione analitica è la preparazione dell'omogenato o "prima diluizione": 30g dell'alimento, formati avendo cura di prelevare in punti diversi e vari della massa totale del campione, vengono addizionati a 270ml di acqua triptonata all'1‰ (4).

La miscela campione/diluyente viene immediatamente omogeneizzata in un omogeneizzatore peristaltico (Stomacher).

Il tempo di omogeneizzazione deve essere sufficiente a permettere il passaggio delle cellule microbiche dal campione al diluyente, ma non tanto lungo da determinare una perdita di vitalità dei microorganismi; generalmente 1 minuto viene considerato un tempo accettabile per ottenere la massima resa con il minimo danno per la componente microbica del campione in esame.

### Determinazione dei coliformi totali

Sono ritenuti possibili due approcci analitici (2,3):

- a) metodo per inclusione in piastra;
- b) metodo del numero più probabile.

a) semina diretta in piastra

A partire dall'omogenato che costituisce la diluizione 1:10, si allestiscono le diluizioni decimali più consone all'intervallo del contenuto in coliformi prevedibile nell'alimento in esame, utilizzando acqua triptonata all'1‰ nel seguente modo: 10ml dell'omogenato 1:10 vengono trasferiti in 90ml di acqua triptonata all'1‰ e di qui in serie per 3-6 diluizioni decimali.

Da ognuna di queste diverse diluizioni decimali vengono allestite in doppio per inclusione ed in ragione di 1 ml, piastre di Violet Red Bile Agar (VRBA) in doppio strato.

Vengono inoltre allestite piastre per le prove di bianco del terreno e del diluyente usati.

Le piastre, dopo solidificazione dell'Agar, sono poste ad incubare in termostato a 35-37°C per 24h.

Si procede al conteggio delle colonie in ciascuna piastra e si calcola la concentrazione di microorganismi per grammo utilizzando la seguente formula:

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



C = somma delle colonie contate nelle diverse piastre alle due diluizioni prese in esame

V = volume dell'inoculo depresso nella piastra

$n_1$  = numero di piastre contate alla diluizione più bassa

$n_2$  = numero di piastre contate alla diluizione più alta

d = diluizione relativa ai primi conteggi effettuati

Il risultato corrisponde al numero stimato delle Unità Formanti Colonie di coliformi per unità di peso (grammo) del campione in esame (U.F.C./g).

b) metodo del numero più probabile (MPN)

La tecnica MPN, a differenza della tecnica di conteggio in piastra che si basa sulla numerazione effettiva delle colonie, è fondata sulla deduzione in termini statistici del numero di coliformi che è più probabile che siano presenti nel campione in esame.

Partendo dalle diverse e più appropriate diluizioni del campione, vengono insemenate con ogni singola diluizione (in ragione di Imi per provetta), terne di provette contenenti 10ml di Laurylsulphate Tryptose Broth, contenenti campanule di Durham, che si pongono ad incubare a 32°C per 48h.

Vengono poste ad incubare anche una provetta di terreno tal quale ed una provetta di terreno inoculato con Imi di diluente, per le prove di bianco.

La formazione di gas all'interno delle campanule, visibile come piccole o grandi bolle e l'intorbidimento del mezzo di coltura sono indicative della presenza di microrganismi capaci di fermentare il lattosio "presuntivamente" appartenenti al gruppo dei coliformi.

La conferma dei risultati presuntivamente positivi, si ottiene riseminando una ansata (10µl) da ciascuna provetta con sviluppo di gas, in analoga provetta con campanula di Durham contenente 10ml di Brilliant Green Lactose Bile 2%.

Si pone quindi ad incubare a 32°C per 48h insieme ad una provetta di bianco (solo terreno) e si osserva di nuovo lo sviluppo di gas in ogni singola provetta.

Per la traduzione del risultato delle prove in Numero Più Probabile di batteri per grammo di campione si tiene conto delle ultime tre serie di tubi. La combinazione numerica che si ottiene viene cercata sulle tabelle MPN che indicano, per ogni combinazione di risultati, il valore suggerito di batteri per grammo (vedi tabelle allegate) (1).

#### Determinazione di *Escherichia coli*

Per la ricerca presuntiva di *Escherichia coli* si parte normalmente dalle colture in brodo che hanno dato risultato positivo (sviluppo di gas) alla prova MPN per coliformi.

Così da ogni provetta positiva di Laurylsulphate Tryptose Broth vengono seminate con ansa (10µl) provette contenenti 10ml di *Escherichia coli*

medium (3) o 10ml di Brilliant Green Bile 2% con campanula di Durham.

Si pone ad incubare a 44,5°C per 48h e si osserva lo sviluppo di gas. Le provette con sviluppo di gas vengono intese positive per la presenza di coliformi termotolleranti (fecali).

Da ogni provetta positiva si inocula un'ansata per strisciamento su piastre di Levine Methylene Agar e si incuba a 35°-37°C per 24h.

Le colonie tipiche vengono trapiantate su agar slant e testate mediante colorazione di Gram e prove IMVIC o sistemi miniaturizzati di identificazione.

Per la stima MPN di *Escherichia coli* si segue lo stesso metodo precedentemente indicato per la determinazione dei coliformi.

### **Terreni culturali e reagenti**

Commercialmente disponibili

Tabelle MPN (3 tubi per diluizione) 1)

Diluizione 10<sup>-1</sup>/0 - 0,1g

Combinazioni positive	MPN/g	limite di confidenza al 95%	
		Inferiore	- Superiore
0-0-0	<0.03	<0.005	0.09
0-0-1	0.03	<0.005	0.09
0-1-0	0.03	<0.005	0.13
0-2-0	—	—	—
1-0-0	0.04	<0.005	0.20
1-0-1	0.07	0.01	0.21
1-1-0	0.07	0.01	0.23
1-1-1	0.11	0.03	0.36
1-2-0	0.11	0.03	0.36
2-0-0	0.09	0.01	0.36
2-0-1	0.14	0.03	0.37
2-1-0	0.15	0.03	0.44
2-1-1	0.2	0.07	0.89
2-2-0	0.21	0.04	0.47
2-2-1	0.28	0.10	1.50
2-3-0	—	~	—
3-0-0	0.23	0.04	1.20
3-0-1	0.39	0.07	1.30
3-0-2	0.64	0.15	3.80
3-1-0	0.43	0.07	2.10
3-1-1	0.75	0.14	2.30
3-1-2	1.20	0.30	3.80
3-2-0	0.93	0.15	3.80
3-2-1	1.5	0.30	4.40
3-2-2	2.1	0.35	4.70
3-3-0	2.4	0.36	13.0
3-3-1	4.6	0.71	24.0
3-3-2	11.0	1.50	48.0
3-3-3	>11.0	>1.50	>48.0

2) Diluizione 1 - 0,1 - 0,01g

Combinazioni positive	MPN/g	limite di al confidenza 95%	
		Inferiore	- Superiore
0-0-0	<0.3	<0.05	0.9
0-0-1	0.3	<0.05	0.9
0-1-0	0.3	<0.05	1.3
0-2-0	~	—	—
1-0-0	0.4	<0.05	2.0
1-0-1	0.7	0.1	2.1
1-1-0	0.7	0.1	2.3
1-1-1	1.1	0.3	3.6
1-2-0	1.1	0.3	3.6
2-0-0	0.9	0.1	3.6
2-0-1	1.4	0.3	3.7
2-1-0	1.5	0.3	4.4
2-1-1	2.0	0.7	8.9
2-2-0	2.1	0.4	4.7
2-2-1	2.8	1.0	15.0
2-3-0	—	—	—
3-0-0	2.3	0.4	12.0
3-0-1	3.9	0.7	13.0
3-0-2	6.4	1.5	38.0
3-1-0	4.3	0.7	21.0
3-1-1	7.5	1.4	23.0
3-1-2	12.0	3.0	38.0
3-2-0	9.3	1.5	38.0
3-2-1	15	3.0	44.0
3-2-2	21	3.5	47.0
3-3-0	24	3.6	130
3-3-1	46	7.1	240
3-3-2	110	15.0	480
3-3-3	>110	>15.0	>480

3) Diluizione 0,1 - 0,01 - 0,001g

Combinazioni positive	MPN/g	limite di al confidenza 95%	
		Inferiore	-Superiore
0-0-0	<3	<0.5	<9
0-0-1	3	<0.5	9
0-1-0	3	<0.5	13
0-2-0	—	—	—
1-0-0	4.0	<0.5	20
1-0-1	7.0	1.0	21
1-1-0	7.0	1.0	23
1-1-1	11	3.0	36
1-2-0	11	3.0	36
2-0-0	9.0	1.0	36
2-0-1	14	3.0	37
2-1-0	15	3.0	44
2-1-1	20	7.0	89
2-2-0	21	4.0	47
2-2-1	28	10	150
2-3-0	—	---	—
3-0-0	23	4.0	120
3-0-1	39	7.0	130
3-0-2	64	15	380
3-1-0	43	7.0	210
3-1-1	75	14	230
3-1-2	120	30	380
3-2-0	93	15	380
3-2-1	150	30	440
3-2-2	210	35	470
3-3-0	240	36	1300
3-3-1	460	71	2400
3-3-2	1100	150	4800
3-3-3	>1100	>150	>4800

4) Diluizione 0,01 - 0,001 - 0,0001g

Combinazioni positive	MPN/g	limite di al confidenza 95%	
		Inferiore	-Superiore
0-0-0	<30	<5	<90
0-0-1	30	<5	90
0-1-0	30	<5	130
0-2-0	—	—	—
1-0-0	40	<5	200
1-0-1	70	10	210
1-1-0	70	10	230
1-1-1	110	30	360
1-2-0	110	30	360
2-0-0	90	10	360
2-0-1	140	30	370
2-1-0	150	30	440
2-1-1	200	70	890
2-2-0	210	40	470
2-2-1	280	10	1500
2-3-0	—	---	—
3-0-0	230	40	1200
3-0-1	390	70	1300
3-0-2	640	150	3800
3-1-0	430	70	2100
3-1-1	750	140	2300
3-1-2	1200	300	3800
3-2-0	930	150	3800
3-2-1	1500	300	4400
3-2-2	2100	350	4700
3-3-0	2400	360	13000
3-3-1	4600	710	24000
3-3-2	11000	1500	48000
3-3-3	>11000	>1500	>48000

## **Bibliografia**

- 1) Barnard J.R., MacClure F.D. (1984): Most Probable Number Determination. In: "Bacteriological Analytical Manual" U.S.Food and Drug Administration AOAC, Arlington, Virginia.
- 2) Hitchins A.D., Hartman P.A., Todd E.C.D. (1992): Coliforms - *Escherichia coli* and its Toxins. In: "Compendium of methods for the microbiological examination of foods". American Public Health Association, Washington DC.
- 3) Mehlman I.J., Andrews W.H., Wentz B.A. (1984): Coliforms bacteria. In: "Bacteriological Analytical Manual" U.S.Food and Drug Administration AOAC, Arlington, Virginia.
- 4) Ordinanza Ministeriale 11 ottobre 1978: Limiti di cariche microbiche tollerabili in determinate sostanze alimentari e bevande. Gazzetta Ufficiale n.346 del 13 dicembre 1978.

## 1.2 RICERCA DI STAPHYLOCOCCUS AUREUS

### Preparazione dell'omogenato

La prima operazione analitica è la preparazione dell'omogenato o "prima diluizione": 30g dell'alimento, formati avendo cura di prelevare in punti diversi e vari della massa totale del campione, vengono addizionati a 270ml di acqua triptonata all'1‰ (4).

La miscela campione/diluyente viene immediatamente omogeneizzata in un omogeneizzatore peristaltico (Stomacher).

Il tempo di omogeneizzazione deve essere sufficiente a permettere il passaggio delle cellule microbiche dal campione al diluyente, ma non tanto lungo da determinare una perdita di vitalità dei microrganismi; generalmente 1 minuto viene considerato un tempo accettabile per ottenere la massima resa con il minimo danno per la componente microbica del campione in esame.

### Determinazione di *Staphylococcus aureus*

La ricerca e conta dello *Staphylococcus aureus* si realizza utilizzando piastre Baird-Parker Medium addizionate di Egg-Yolk (1).

A partire dall'omogenato e dalle successive diluizioni si trasferiscono 0,1 ml sulla superficie del terreno solidificato in piastra e operando rapidamente, per evitare contaminazioni, si stende uniformemente l'inoculo sulla superficie del terreno con l'aiuto di spatole ad L.

Usualmente si impiegano le diluizioni 1:10 e 1:100 che vengono seminate in doppio.

Per ogni serie analitica vengono allestite una prova in bianco per il terreno di coltura (piastra di terreno non inocolata) e una per pipette e diluyente (0,1 ml di diluyente spatolato sulla piastra).

Le piastre vengono poste ad incubare a 37°C per 48h.

Ultimata l'incubazione si procede alla conta delle colonie tipiche (colonie nere), tenendo separatamente conto del numero delle colonie con aloni di chiarificazione e di quelle che ne sono prive.

Il numero totale di colonie contate (colonie con/senza aloni di chiarificazione) moltiplicato per il reciproco della diluizione, corrisponde al numero stimato delle UFC di sospetti *St. aureus* per grammo di campione.

Si procede quindi alla identificazione dei diversi tipi morfologici di colonie sospette cresciute in piastra, sottoponendo sia le colonie con aloni di chiarificazione che quelle che ne sono prive al test della coagulasi e della termonucleasi (2,6,7).

Solo le colonie coagulasi e/o termonucleasi positive vengono contate quali Stafilococchi aurei.

Il risultato è espresso in U.F.C./gr.



### **Determinazione di *Staphylococcus aureus* enterotossico.**

10 ml di omogenato vengono trasferiti in una provetta contenente 10 ml di Giolitti-Cantoni Broth a doppia concentrazione (1).

Il terreno inoculato viene coperto con uno strato di agar al 2% e incubato a 37° C per 48h.

In caso di positività della prova presuntiva, denunciata dall'annerimento del mezzo di coltura e/o dalla formazione di un precipitato nero, si procede al piastramento su Baird-Parker addizionato di Egg-Yolk per strisciamento superficiale con ansa.

Per l'identificazione di *Staphylococcus aureus* si procede come precedentemente descritto.

Sulle colonie di *Staphylococcus aureus* eventualmente isolate, si testa la capacità di produrre enterotossine tipiche.

Il microorganismo isolato viene seminato in Tryptone Soya Broth e posto a incubare a 37° C per 18-24 h, preferibilmente sotto agitazione.

La brodocoltura viene quindi centrifugata a 3.000 rpm per 20 minuti; il surnatante viene filtrato su membrana (0,2-0,45[μm]) e il filtrato costituisce il campione da testare per la ricerca delle enterotossine stafilococciche A B C D, mediante un test di agglutinazione passiva inversa al lattice (3,5,8) che fornisce risultati semi-quantitativi.

### **Terreni colturali e reagenti**

Commercialmente disponibili.

### **Bibliografia**

- 1) Baird-Parker, A.C. (1962): An improved diagnostic and selective medium for isolating coagulase positive staphylococci. J. Appl. Bacteriol. 25:12-19.
- 2) Kloos W.E. (1990): Systematics and the natural history of staphylococci. In Symposium: " Staphylococci". The Society for Applied Bacteriology Symposium Series n.19. J. Appl. Bacteriol. Supplement 69: 25s-37s.
- 3) Oda T. (1978): Application of SP - Sephadex chromatography to the purification of staphylococcal enterotoxins A,B,C2. Jpn. J.Bacteriol. 33:743-752.
- 4) Ordinanza Ministeriale 11 ottobre 1978: Limiti di cariche microbiche tollerabili in determinate sostanze alimentari e bevande. Gazzetta Ufficiale n.346 del 13 dicembre 1978.

- 5) Park E.E./ Szabo R. (1986): Evaluation of the reversed passive latex agglutination (RPLA) test kit for detection of staphylococcal enterotoxins A, B, C and D in Foods. *Can. J. Microbiol.* 32: 723-727.
- 6) Rayman, M.K., Park C.E., Philpott J., Dodd E.CD. (1975): Reassessment of the coagulase and thermostable nuclease tests as means of identifying *Staphylococcus aureus*. *J. Appl. Microbiol.* 29:451-454.
- 7) Sperber W.H., Tatini S.R. (1975): Interpretation of the tube coagulase test for identification of *Staphylococcus aureus*. *J. Appl. Microbiol.* 29:502-505.
- 8) Wieneke A.A., Gilbert R.J. (1987): Comparison of four methods for the detection of staphylococcal enterotoxin in foods from outbreaks of food poisoning. *Int. J. Food Microbiol.* 4:135-143.

### 1.3 RICERCA DI SALMONELLA SPP

#### **Prearricchimento**

Aggiungere a 25g. di campione a 225ml di Acqua Peptonata Tamponata (BPW), omogeneizzare per 1 minuto in Stomacher e incubare a 37°C per 18-24 ore (2)(3)(4)(5).

#### **Arricchimento selettivo in brodo**

Trasferire 0.1 ml della coltura di prearricchimento in 10 ml di Rappaport-Vassiliadis (RV) (oppure Imi in 100 ml di RV) e incubare a 42°C per 24h (3)(4)(7).

Contemporaneamente trasferire altri 10 ml della coltura in 100 ml di uno dei seguenti brodi:

Selenite Cistina (SC), incubare a 42°C per 24h (4)(5)\*;

Selenite Cistina, incubare a 37°C per 24h (1)(3);-

Tetrationso Verde Brillante (TBG), incubare a 42°C per 24 h (4);\*

Tetrationso Verde Brillante (TBG), incubare a 37°C per 24 h;

Muller-Kauffmann Verde Brillante (MKTBG), incubare a 37°C per 24h (5). Si consiglia l'uso di SC a 42°C, RV a 42°C e TBG a 37°C

\*NB: secondo alcuni autori (2) il rinvenimento di salmonelle aumenta sensibilmente se il SC viene incubato a 42°C piuttosto che a 37°C.

#### **Isolamento selettivo in piastra**

Prelevare un'ansata della brodocoltura di arricchimento e strisciarla su :

Agar Desossicolato Citrato Lattosio modificato da Hynes (DCA)(4)(5);

e su di un'altro terreno scelto tra i seguenti:

Agar al Verde Brillante (BGA) (3)(4)(5);

Agar Enterico Hektoen (HA) (1);

Agar al Solfito di Bismuto (BSA) (WW

Incubare tutte le piastre di terreno inoculate a 37°C per 24h.

[\*\* La percentuale di recupero delle salmonelle secondo alcuni autori è più elevata in BSA (2)]

Dopo averle incubate per 24h a 37°C esaminare le piastre per la presenza di colonie tipiche di salmonelle. Se dopo tale tempo di incubazione lo sviluppo batterico è lento o non sono presenti colonie tipiche, reincubare a 37°C per altre 24h e, trascorso tale tempo, riesaminare le piastre.

## **Test di conferma biochimici**

Da ogni piastra in cui si è avuto sviluppo di colonie tipiche trapiantare almeno di 3 colonie in agar nutritivo a becco di clarino (1)(2)(3)(5) e incubare a 37°C per 24h. Successivamente passare le colonie cresciute in agar nutritivo in:

Agar Triplo Zucchero (TSI) (1)(2)(3)(6);

Agar Urea di Christensen (UC) (1)(2)(3)(7)

e incubare a 37°C per 24 h.

Le colonie che presentano caratteristiche tipiche su TSI e su UC vengono saggiate per le seguenti prove biochimiche:

decarbossilazione della lisina (1)(2)(3)(5)

produzione della beta-galattosidasi (3)(5)

reazione di Voges-Proskauer (1)(3)

produzione di indolo (1)(3).

(NB: tali prove biochimiche possono essere eseguite con l'impiego di test miniaturizzati quali API 20E etc.) (1)

## **Test sierologici**

Le colonie sospette vengono saggiate con antigeni somatici polivalenti, specifici e con antigeni flagellar! per risalire al sierotipo (4-5).

## **Terreni colturali e reagenti**

Commercialmente disponibili.

### **Caratteristiche delle colonie di *Salmonella* sui terreni selettivi**

- AGAR DESOSSICOLATO LATTOSIO CITRATO (HYNES)

Colonie incolori: ceppi di *Salmonella* produttori di H<sub>2</sub>S sviluppano un centro nero.

- AGAR VERDE BRILLANTE

Colonie incolori, rosa o rosse traslucide od opache circondate da terreno da rosa a rosso vivo. Alcuni ceppi producono colonie verdi trasparenti qualora crescano in presenza di microrganismi fermentanti lattosio o saccarosio (6).

- AGAR ENTERICO HEKTOEN

Colonie verde blu con o senza centro nero, il terreno vira al blu. Alcuni ceppi atipici possono produrre colonie gialle con o senza centro nero (1).

#### - AGAR AL SOLFITO DI BISMUTO

Colonie nere, marroni o grigie a volte con riflessi metallici; il terreno circostante di solito all'inizio è marrone ma può diventare nero con il protrarsi dell'incubazione producendo il cosiddetto effetto alone. Alcuni ceppi possono produrre colonie verdi (1).

## **SALMONELLE - Diagramma di**

### **procedura PREARRICCHIMENTO**

25 gr di campione

+  
225ml di **acqua peptonata tamponata** incubare a 37°C per 18-24 ore

### **ARRICCHIMENTO SELETTIVO**

0,1ml di coltura in 10 ml di : Rappaport Vassiliadis* incubare a 42°C per 24h	10 ml di coltura in 100ml di: Selenite Cistina* incubare a 35-42°C per 24h
---	--

oppure

Tetrationato Verde Brillante\*  
incubare a 35-42°C per 24h

oppure

Muller Kauffmann Tetrationato Verde  
Brillante  
incubare a 37°C per 24h

### **ISOLAMENTO IN TERRENO SELETTIVO**

Strisciare le brodoculture di arricchimento in:

- **Desossicolato citrato (Hynes)** (incubare a 37°C per 24h) e su un altro terreno scelto tra:
- **Agar enterico Hektoen** (incubare a 37°C per 24h);
- **Agar al Solfito di Bismuto** (incubare a 37°C per 24h);
- **Agar al verde Brillante** ( incubare a 37°C per 24h).

Trapiantare le colonie tipiche su Agar Nutritivo, incubare a 37°C per 24h.

Tests Biochimici

Tests Sierologici

Agar Triplo Zucchero

Urea

Kits miniaturizzati

- Per l'arricchimento selettivo si suggerisce l'uso di RV a 42°C, SC a 42°C e TBG a 37°C.

## Bibliografia

- 1) Andrews W. H., Poelma P.L., Wilson C.R. Isolation and identification of *Salmonella Species*. In: Bacteriological Analytical Manual, 6th ed. Association of Official Analytical Chemists (AOAC): Arlington, Virginia, 1984:Cap.7.
- 2) D'Aoust J.Y. *Salmonella*. In: Doyle M.P. ed. Foodborne Bacterial Pathogens. New York. M. Dekker Inc. 1989:326-445.
- 3) International Organization for Standardization (ISO). International Standard ISO 6579, 2nd ed. Microbiology-general guidance on methods for the detection of *Salmonella*. International Organization for Standardization, Geneva, 1990.
- 4) International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). Microorganisms in foods 1. Their significance and methods of enumeration, 2nd ed. University of Toronto press-, Toronto, Ontario, 1978.
- 5) Legislazione italiana O.M. 11/10/1978 Gazzetta Ufficiale della Repubblica italiana del 13/12/1978
- 6) Poelma P.L., Silliker J.H. *Salmonella*. In: Speck M.L. ed. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. American Public Health Association Washington D.C: American Public Health Association (APHA). 1976 301-326.
- 7) Vassiliadis P., E. Pateraki, N. Papaiconomou, J.A. Papadakis and D. Trichopoulos. Nouveau procédé d'enrichissement de *Salmonella*. Annales de Microbiologie (Istitut Pasteur), 1976,127B 195-200.

## 1.4 RICERCA DI *LISTERIA SPP*

### **Arricchimento selettivo**

Aggiungere a 25gr di campione 225ml di Listeria Enrichment Broth (LEB), omogeneizzare per 1 minuto in Stomacher 400 ed incubare a 30°C per 48 ore (facoltativamente l'arricchimento può essere prolungato per un periodo complessivo di 7 giorni).

### **Sub-arricchimento selettivo**

Dopo 24h trasferire 0,1 ml della coltura di arricchimento in 9,9 ml di LEB. ed incubare a 30°C per 24h.

### **Isolamento selettivo**

Prelevare una ansata rispettivamente dall'arricchimento e dal sub-arricchimento e strisciare su piastra di Palcam agar o di Oxford agar. Incubare le piastre a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  per 24 + 24h. In Palcam le colonie si presentano di colore grigio-verdastro con centro nero infossato circondate da un alone nero in contrasto con il colore rossastro del terreno, hanno il diametro di 0,5-2 mm, sono rotonde con margini netti. In Oxford agar le colonie si presentano grigio-marroni con concavità crateriforme al centro ed alone nero.

### **Test di conferma**

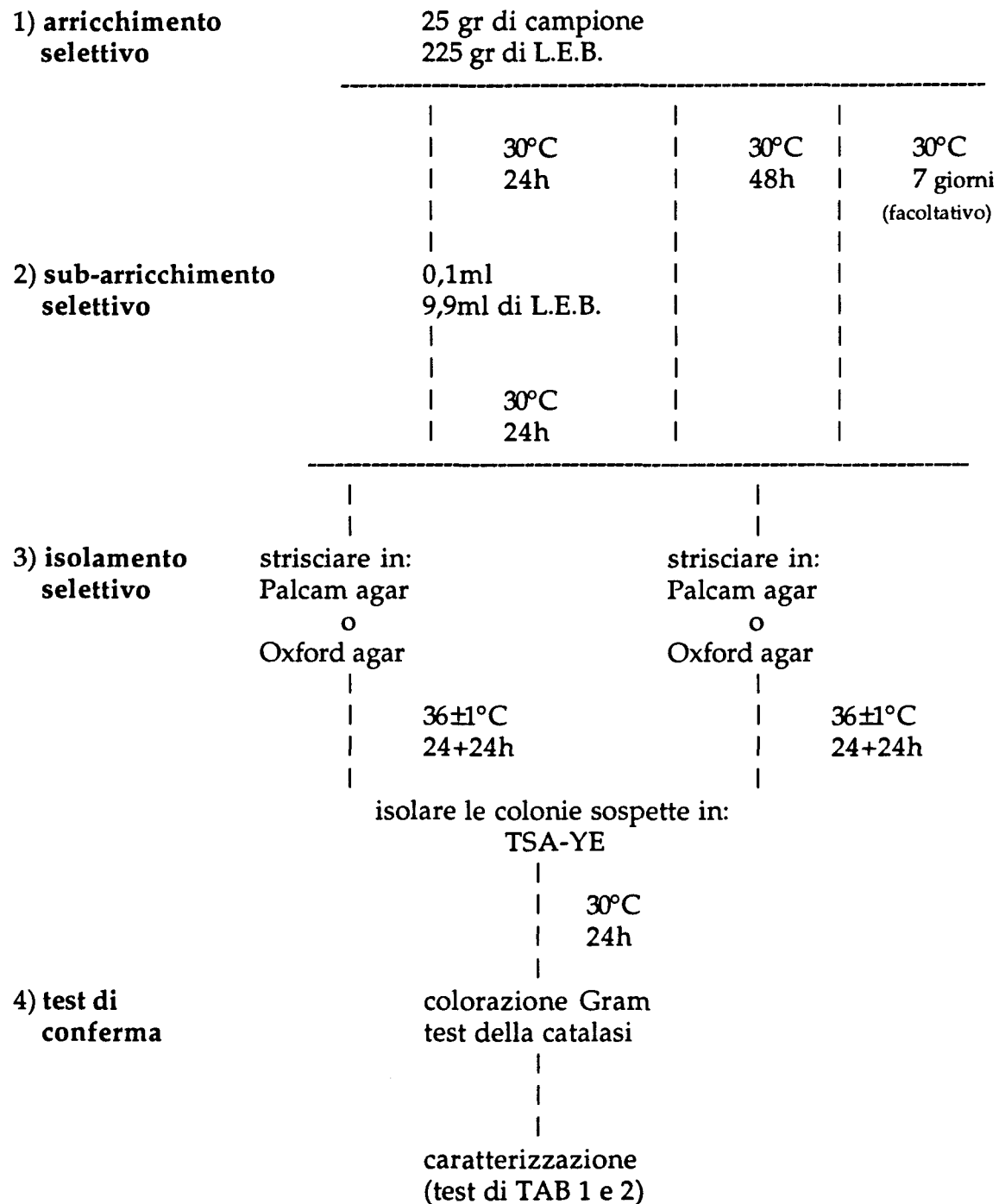
Strisciare per isolamento le colonie sospette in piastre di Trypticase Soy Agar con 0,6% di estratto di lievito (TSA - YE) ed incubare a 30°C per 24h (o fino a crescita soddisfacente). Sugli stipiti isolati eseguire la colorazione Gram (colture di non più 24h) ed il test delle catalasi; se le risposte sono positive procedere secondo lo schema di caratterizzazione biochimica come indicato da Lovett (1989) (TAB 1 e 2).

### **Terreni culturali e reagenti**

Commercialmente disponibili.



Diagramma di procedura in *Listeria spp*



Tab. 1 Differenziazione di *Listeria spp.*

SPECIE	EMOLISI (beta)	RIDUZIONE nitrati	UTILIZZAZIONE		
			Mannitolo	Ramnosio	Xilosio
<i>L.monocytogenes</i>	+	-	-	+	-
<i>L.ivanovii</i>	+	-	-	-	+
<i>L.innocua</i>	-	-	-	V*	-
<i>L.welshimeri</i>	-	-	-	V*	+
<i>L.seeligeri</i>	+	-	+	-	+
<i>L.grayi</i>	-	-	+	-	-
<i>L.murrayi</i>	-	+	-	V*	-

\*: V = variabile

Tab. 2 Camp test di *Listeria spp.*

SPECIE	REAZIONE EMOLITICA	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Rhodococcus equi</i>
<i>L. monocytogenes</i>	+	-
<i>L. ivanovii</i>	-	+
<i>L. innocua</i>	-	-
<i>L. welshimeri</i>	-	-
<i>L. seeligeri</i>	+	-

### Bibliografia

- 1) Bortolussi R., Schiodi W.F., Aibritton W.L. (1985): *Listeria* - In: "Manual of clinical microbiology" 4th ed. pp205-208. American society for Microbiology -Washington, DC.
- 2) Curtis G.D.W., Mitchell R.G., King A.F., Griffin E.J. (1989): A selective differential medium for the isolation of *Listeria monocytogenes* Lett. Appl. Microbiol.8:95-99.
- 3) Donnelly C.W., Brackett R.E., Doores S., Lee W.H., Lovett J. (1992): *Listeria* -In: "Compendium of methods for the microbiological examination of foods". American Public Health Association, Washington, DC.

- 4) Lovett J., Francis D.W., Hunt J. M. (1987): *Listeria monocytogenes* in raw milk: Detection, incidence, and pathogenicity. J. Food Prot. 50:188-192.
- 5) Lovett J., Hitchins A.D. (1989): Listeria isolation. In: "Supplement Bacteriological Analytical manual" (Second Printing). U.S. Food and Drug Administration. AOAC, Arlington, Virginia.
- 6) McBride M.E., Girard K.F. (1960): A selective method for the isolation of *Listeria monocytogenes* from mixed bacterial populations. J. Lab. clin. Med. 55:153-157.
- 7) Terplan G.(1988): Provisional IDF recommended method: milk and milk products. Detection of *Listeria monocytogenes*. Int. Dairy Federation, Brussels.

## 1.5 RICERCA DI *YERSINIA ENTEROCOLITICA*

### Arricchimento

Si pesano 25gr di alimento ai quali si aggiungono 225ml di brodo di arricchimento P.S.B. (peptone, sorbitolo e sali biliari), si omogeneizza e si incuba a 22-25°C per 3-5gg (2).

Si pesa 1gr di alimento al quale si aggiungono 100 ml di brodo di arricchimento I.T.C. (irgasan, ticarcillina, clorato di potassio), si omogeneizza e si incuba a 22-25°C per 2gg (6) (quest'ultima fase di arricchimento è solo consigliata).

### Isolamento

Al termine dell'incubazione si prendono 0,5 ml del brodo di arricchimento e si uniscono a 4,5 ml di KHO allo 0,25% in soluzione fisiologica, si lascia a contatto per non più di 20 secondi (1), poi si semina in superficie con ansa da 10 microlitri su terreno selettivo (CIN medium, terreno proposto e modificato da Schiemann (3)). Contemporaneamente si effettua la semina in superficie dal brodo di arricchimento su terreno selettivo, senza il passaggio in KOH.

Si incubano le piastre a 28°C per 24-48h (2) (4) (6).

### Identificazione

Le colonie sospette, che si presentano con un centro rosso circondato da un alone trasparente, vengono confermate mediante identificazione biochimica utilizzando Kligler Iron Agar (KIA) (28°C per 24+24h).

I ceppi che mostrano reazione tipica (alcalina/acida, senza H<sub>2</sub>S con produzione di gas debole o assente) sono inoculati in Christensen's urea agar a 28°C (inoculo pesante) e valutati a partire da 3h per 24h. Nel caso di test positivo si procede con le prove indicate in tab.1 (2).

Un aspetto caratteristico di *Yersinia spp* è la dipendenza alla temperatura di un certo numero di reazioni biochimiche (4) (5) (7). Alcune reazioni sono positive a 25°C mentre sono negative a 37°C; la temperatura di transizione è di 30°C e per evitare confusione quando si eseguono reazioni biochimiche si raccomanda un rapporto tempo/temperatura di 3g a meno di 30°C (range consigliato 25-28°C).

In caso di positività per *Yersinia enterocolitica* si procede all'identificazione del biotipo con i test di tab. 2 (2), utilizzando i terreni ed i reagenti suggeriti da Schiemann (4). Infine, come test facoltativi, si effettua l'identificazione sierologica (tab. 3) e le prove di patogenicità (test di dipendenza al calcio), utilizzando i terreni ed i reagenti suggeriti da Weagant (7).

## Terreni colturali e reagenti

### 1) Peptone - Sorbitolo - Sali biliari (PSB)

- Peptone	5 gr
- Sodiofosfato bibasico anidro ( $\text{Na}_2\text{HPO}_2$ )	8,23 gr
- Sodiofosfato monobasico ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 - \text{H}_2\text{O}$ )	1,2 gr
- Cloruro di sodio	5 gr
- Sali biliari n. 3 (DIFCO)	1,5 gr
- D. Sorbitelo	10 gr
- Acqua distillata	1000 ml

Sterilizzare 15 minuti a  $121^\circ\text{C}$

pH 7/6

### 2) Irgasan - Ticarcillina - Clorato di potassio (ITC)

- Triptone	10 gr
- Estratto di lievito	1 gr
- Cloruro di magnesio ( $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ )	60 gr
- Verde di Malachite (0,2%)	5 ml
- Cloruro di sodio	5 gr
- $\text{KClO}_3$	1 gr
- Acqua distillata	1000 ml

pH  $6,9 \pm 0,1$  distribuire in flaconi da 100 ml sterilizzare 15 minuti a  $121^\circ\text{C}$ .

Prima dell'uso aggiungere:

- Irgasan allo 0,1% in alcool  $95^\circ$ : 0,1 ml per 100 ml di base;
- Ticarcillina allo 0,1 %: 0,1 ml per 100 ml di base. (sterilizzare con filtro 0,2  $\mu\text{m}$ )

3) Gli altri terreni e reagenti proposti sono distribuiti commercialmente.

Tab. 1: Caratteri biochimici principali di *Yersinia pseudotuberculosis* e di *Yersinia enterocolitica*

	<i>Y. pseudotuberculosis</i>	<i>Y. enterocolitica</i>
Glucosio	+	+
Gas del glucosio	-	-(f)
H <sub>2</sub> S	-	-
Lattosio	-	-
ONPG	+	+/-
Ureasi	+	+
Indolo	-	d
Fenilalanina deaminasi -	-	-
Lisina	-	-
Ornitina	-	+ (sotto 30°)/-
Adonitolo	+	-
Dulcitolio	-	-
Mannitolo	+	+
Cellobiosio	-	+
Melibiosio	+/-	-
Ramnosio	+	-
Saccarosio	-	+
Acetoino	-	+ (sotto 30°)/-
Citrato (Simmons)	-/(+)	-

(+) : reazione positiva lenta

+/- : maggioranza di ceppi positivi

-/+ : maggioranza dei ceppi negativi

(f) : molto debole

d : differenti tipi biochimici

Tab. 2: identificazione biochimica di *Y. enterocolitica* e delle specie apparentate

	Tw 80	Es 24h	Py	In	Xy	Sa	Rh	Mè	VP	Ci	
<i>Y. enterocolitica</i>											
biograppo 1A	+	+*	+*	+	+	+	-	-	+	-	
biograppo 1B	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	
biograppo 2	-	-	-	(+)	+	+	-	-	+	-	(1)
biograppo 3	-	-	-	-	+	+	-	-	+/-	-	
biograppo 4	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	
biograppo 5	-	-	-	-	v	+/-	-	-	(+)	-	(2)
<i>Y. intermedia</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
<i>Y. frederiksenii</i>	+	v	+	+	+	+	+	-	+/-	v	
<i>Y. Kristensenii</i>	v	-	+/(+)	v	+	-	-	-	-	-	
<i>Y. mollarettii</i>	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	(3)
<i>Y. bercovieri</i>	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	(4)
<i>Y. aldovae</i>	v	-	+	-	+	-	+	-	+	v	
<i>Y. rohdei</i>	-	-	+	-	+	+	-	v	-	+	

T = tween

E = esculina

P = pirazinamidasi

I = indolo

X = xilosio

S = saccarosio

R = ramnosio

M = melibiosio

V = VP

C = citrato

1 = NO<sub>3</sub><sup>+</sup>, treolosio +

2 = NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, treolosio -

3 = sorbosio+, fucosio-

4 = sorbosio-, fucosio+

v = variabile

+/- = maggioranza di ceppi positivi

(+) = reazione lenta o debole

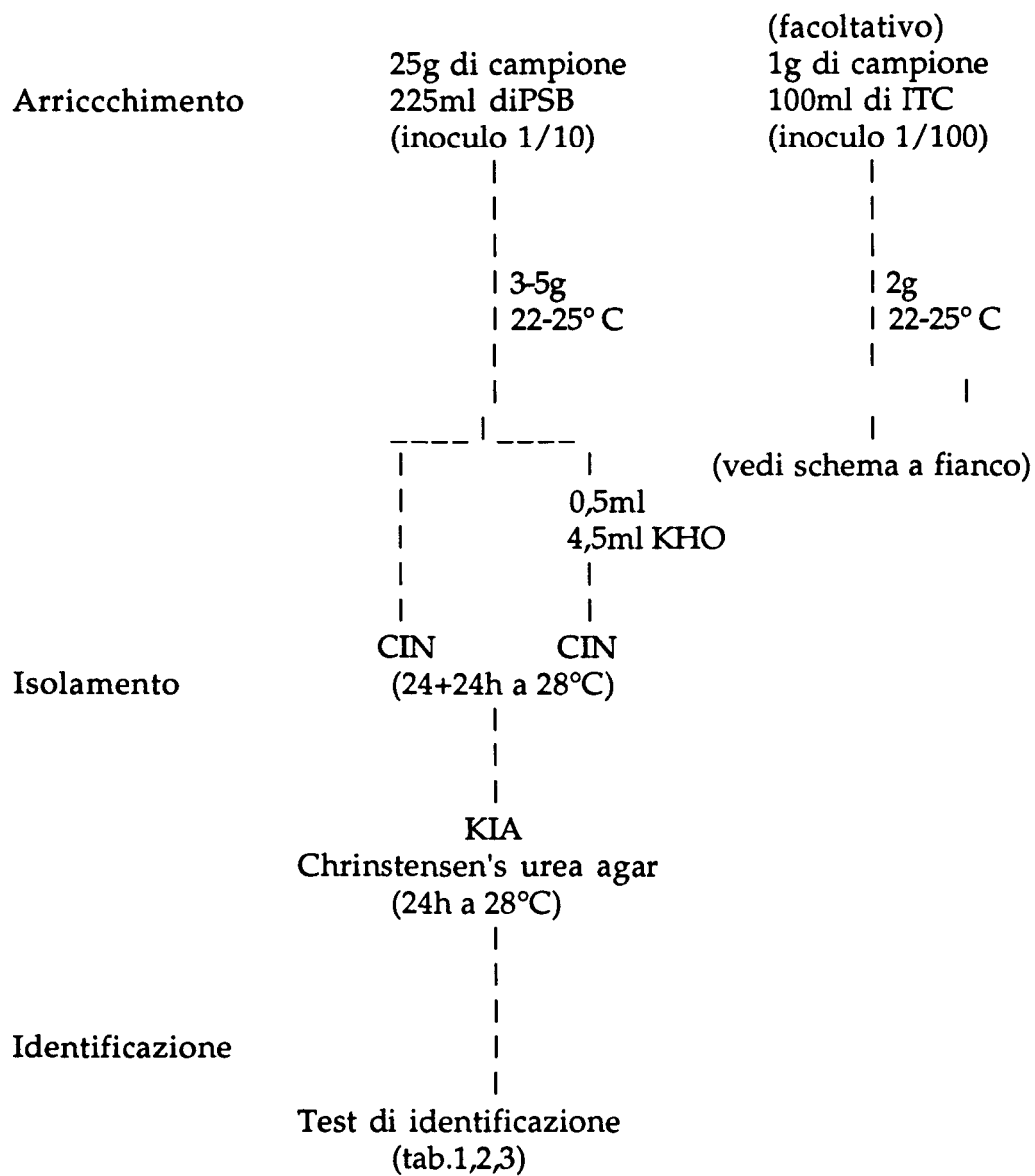
\* = rari ceppi possono essere negativi per una due reazioni

Tab. 3: correlazione fra biogruppi, sierogruppi ed ecologia dei ceppi di *Y. enterocolitica*

Biogruppi	Sierogruppi	Ecologia
1A	Diversi	Ubiquitari: alimenti, acque, animali (uomo)
1B	0:8,0:13a,13b 0:18,0:20,0:21 0:4	Uomo ( America del Nord)
2	0:9,0:5,27	Uomo, maiale
3	0:1,2,3, 0:5,27/0:3	Roditore, cincillà, (uomo), maiale
4	0:3	Uomo, maiale
5	0:2,3	Lepre, capra
<i>Y. intermedia</i>		
<i>Y. frederiksenii</i>		
<i>Y. Kristensenii</i>		Ubiquitari, ambientali
<i>Y. aldovae</i>		
<i>Y. rodhei</i>		
<i>Y. mollaretii</i>		
<i>Y. bercovieri</i>		



Diagramma di procedura per *Y. enterocolitica* negli alimenti



## Bibliografia

- 1) Aulisio C.C.G., Mehiman I.J., Sanders A.C.(1980) Alkali method for rapid recovery of *Y. enterocolitica* and *Y. Pseudotuberculosis* from foods. *Applied and Environmental Microbiology* 39: 135-140.
- 2) Catteau M. (1991). *Yersinia* - In: "Les Cours de Microbiologie des aliments". Institute Pasteur de Lille.
- 3) Schiemann D.A.(1979). Synthesis of a selective agar medium for *Yersinia enterolitica*. - *Canadian Journal Microbiology*, 25: 1298 - 1304.
- 4) Schiemann D.A., Wauters G. (1992). *Yersinia*. - In: "Compendium of methods for the microbiological examination of foods". -American Public Health Association, Washington, DC.
- 5) Varman A.H., Evans M.G. (1991). *Yersinia*. "Food borne pathogens". - Published Wolfe Publishing Ltd, London, England.
- 6) Wauters G., Grossens V., Janssens M., Vandepitte J. (1988). New enrichment method for isolation of pathogenic *Yersinia enterolitica* serogroup 0:3 from pork. - *Applied and Environmental Microbiology*, 4: 851-854.
- 7) Weagant S.D., Aulisio C.C.G., Stanfield J.T. (1987). *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pseudotuberculosis*. - In "Supplement Bacteriological Analytical manual". U.S. Food and Drug Administration. AOAC, Arlington, Virginia.

## **1.6 IGIENE AMBIENTALE: CONTROLLO MICROBIOLOGICO DELLE SUPERFICI**

### **Introduzione**

In alcuni stabilimenti, come quelli in cui sono prodotti alimenti fermentati naturalmente, si può associare una flora batterica tipica dei prodotti (lattobacilli, lieviti, ecc...) all'ambiente di lavorazione (strumentazione compresa) ed in generale, quando le interazioni alimenti/ambienti sono sotto controllo, si realizzano condizioni che contribuiscono alla stabilità stessa degli alimenti prodotti. Tuttavia, prescindendo da questi casi, il concetto di una flora batterica tipica dei piani di lavoro e delle attrezzature usate nelle lavorazioni è poco credibile (4), tanto più che, fra le sorgenti di contaminazione degli alimenti, di particolare rilievo si sono dimostrati l'ambiente di lavoro e la strumentazione (4,7,9).

Se le pratiche di pulizia e le abitudini igieniche del personale non sono sufficienti, si ha facilmente un accumulo di microrganismi che possono essere trasferiti dall'ambiente all'alimento e qui, in condizioni opportune, moltiplicarsi fino a raggiungere la quantità in grado di provocare l'infezione o il deterioramento dell'alimento.

Questa condizione può essere raggiunta senza visibile aumento di sporcizia (4), ad esempio è stato provato che attraverso gli stracci usati per asciugare superfici apparentemente pulite, si può avere il trasferimento ad altre suppellettili od alle mani di microrganismi in quantità sufficiente da costituire un potenziale rischio qualora vengano a contatto con alimenti (11).

Non a caso le attrezzature contaminate sono risultate coinvolte in episodi di tossinfezione alimentare (1). Da ciò scaturisce l'esigenza di disporre di protocolli di pulizia ed eventualmente di disinfezione che comprendano i metodi, i materiali usati e la frequenza degli interventi.

Anche dal punto di vista del sistema HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point) la sanitizzazione ambientale è considerata una operazione che controlla il rischio e che, pur non potendo garantire in modo assoluto ( $CCP_2$ ), è ugualmente indispensabile per salvaguardare qualità e salubrità degli alimenti (4).

Poiché non è possibile misurare l'effetto delle pratiche di pulizia e di sanificazione è importante verificarne l'efficacia.

Per questi motivi un programma di monitoraggio microbiologico ambientale deve essere finalizzato alla (13):

- verifica dell'efficacia del protocollo di pulizia e disinfezione;
- determinazione della frequenza dei cicli di pulizia;
- valutazione della presenza dei patogeni;
- quantificazione dei microrganismi responsabili del deterioramento.

## Parametri batteriologici considerati

Tra i parametri usati per comprendere la situazione inquinante si suggerisce la valutazione della carica batterica (conta dei batteri mesofili aerobi), la ricerca del gruppo dei coliformi totali e fecali, la ricerca di *E.coli*, del gruppo degli streptococchi fecali, di *St. aureus*, intesi come indicatori di buone pratiche igieniche (3,5,9), di *Salmonella spp.* e di *L. monocytogenes*, come patogeni.

- La carica batterica (conta dei germi mesofili aerobici) allo scopo di avere un quadro generale dello stato igienico e per valutare se le pulizie eseguite sono efficaci e contribuiscono a contenere il livello di contaminazione e di crescita batterica (3,7).
- I coliformi al duplice scopo di avere un utile criterio di confronto e di valutazione da un lato della loro capacità (ed in via deduttiva degli enterobatteri) di impiantarsi, sopravvivere e moltiplicarsi nelle condizioni offerte dagli ambienti in esame e dall'altro per ottenere informazioni di massima sulle condizioni igieniche (7).
- *E. coli* in quanto indicatore di originaria derivazione fecale e potenziale patogeno (9).
- Streptococchi fecali in relazione alla loro riconosciuta maggiore resistenza di sopravvivere in condizioni ambientali difficili (9), e come indicatori di germi di origine sia ambientale che fecale (2).
- *Staphylococcus aureus* nel suo duplice ruolo di indicatore di buone pratiche di pulizia e di potenziale patogeno (9).
- *Salmonella spp.* quale patogeno enterico a larga diffusione specie negli alimenti di origine animale.
- *Ustoria spp.* quale germe ad attitudine psicrotrofa e come responsabile di malattie trasmesse con gli alimenti (*L. monocytogenes*).

## Tecnica di campionamento e di semina

Le ricerche si eseguono sulle superfici dei piani e delle attrezzature dopo che sono state effettuate le normali pratiche di pulizia (13), con valutazioni quantitative (UFC/cm<sup>2</sup>) per gli indicatori e qualitative (presenza/assenza) per i patogeni ricercati.

Per eseguire i prelievi esistono metodi di lavaggio e metodi di contatto; questi ultimi, che sono i più usati, si dividono in:

- a - metodo del tampone di cotone
- b - metodo della garza
- c - metodo dell'impronta con substrati agarizzati.

a - metodo del tampone di cotone (quantitativo: U.F.C./cm<sup>2</sup>)

Può essere usato per prelievi da ogni tipo di superficie, sia piana che a morfologia irregolare. Un tampone di cotone sterile al momento dell'uso è inumidito in soluzione di Ringer, quindi strofinato in un'area di 100 cm<sup>2</sup>

(delimitata da una sagoma preconfezionata sterilmente) ed infine trasferito in una provetta contenente 10 ml di soluzione di Ringer come mezzo di trasporto e diluente (13).

Quando il prelievo è eseguito su superfici precedentemente sottoposte all'azione di disinfettanti chimici, alla soluzione diluente deve essere aggiunto appropriato neutralizzante (\*).

In laboratorio la sospensione, ottenuta mediante prolungata agitazione manuale e spremitura del tampone nel diluente, è impiegata per le ricerche microbiologiche, usando:

- 1) per la carica batterica totale mesofila aerobica: Piate Count Agar o nel caso si vogliano evitare interferenze con lattobatteri agar al gelisato (32°C per 24h);
- 2) per i coliformi totali e fecali e per *E. coli*: Violet red bile agar, (37°C e 44,5°C per 24h);
- 3) per gli streptococchi fecali: m-Enterococcus Agar (37°C per 48h);
- 4) per *St.aureus*: Baird-Parker Agar (Baird-Parker base agar più Egg Yolk Tellurite Emulsion).

Per l'identificazione delle colonie isolate si useranno criteri morfologici, tintoriali (colorazione Gram) e test biochimici.

\* Neutralizzanti comunemente usati sono il Tween 80 attivo contro i composti fendici, la lecitina di soia attiva contro i sali di ammonio quaternari, il tiosolfato di sodio contro il doro, ecc.

#### b - Metodo della garza (qualitativo)

A causa delle grandi superfici campionato questo metodo è particolarmente adatto alla ricerca di patogeni (*Salmonella spp*, *L.monocytogenes*, ecc...). Si usa una garza sterile, inumidita con soluzione di Ringer, strofinata diverse volte su tutta la superficie in esame.

Successivamente la garza viene introdotta direttamente in un matraccio contenente o:

- il brodo selettivo per la ricerca, che in laboratorio è incubato secondo il rapporto tempo/temperatura proprio del metodo;
- almeno 50ml di soluzione di Ringer come mezzo di trasporto e diluente; in laboratorio si procede all'eluizione della garza, quindi l'eluato è seminato nei terreni selettivi per *Salmonella spp* e *L.monocytogenes* secondo le indicazioni proprie dei rispettivi metodi.

Nel caso che le superfici da esaminare siano state disinfettate è opportuno aggiungere un idoneo neutralizzante al mezzo di trasporto della garza; inoltre nel caso che le superfici siano "untuose" si dovranno usare soluzioni contenenti dallo 0,5% all'1% di Tween 80.

C - Metodo dell'impronta con substrato agarizzato (8)  
(quantitativo U.F.C./cm<sup>2</sup>; superfici piane)

La piastra contenente un terreno agarizzato non nutritivo (eventualmente addizionato di neutralizzante) e distribuito in modo tale da formare una sporgenza convessa verso l'esterno (circa 16 ml di terreno in piastre RODAC di 6 cm di diametro), viene appoggiata sulla superficie da esaminare, si esercita una modica pressione, quindi la piastra è ruotata di 360° sulla superficie stessa tenendone fisso il centro. La zona centrale viene incisa con un tagliente delimitando un'area di 10 cm<sup>2</sup>; il tassello così risultante prelevato sterilmente, è immesso in un sacchetto sterile per omogenizzatore Stomacher insieme a 100 ml di soluzione Ringer. Si omogenizza per 1 minuto e si lascia riposare per 15, In seguito l'omogeneizzato e le sue diluizioni decimali vengono utilizzati per le ricerche indicate (vedi metodo del tampone di cotone).

### **Standard di riferimento**

Per la valutazione microbiologica dello stato igienico dei piani di lavoro e delle attrezzature, la letteratura propone standard che da un lato riportano valori di carica batterica (germi mesofili aerobici) oltre i quali la superficie risente di una sanificazione non corretta e dall'altro valori soglia oltre i quali si presenta il rischio di un peggioramento della qualità dell'alimento che entra a contatto con la superficie.

I livelli che vengono indicati per verificare la corretta sanitizzazione delle superfici sono di poche U.F.C./cm<sup>2</sup> (6,7,10,12,13), e generalmente non superano le 50 U.F.C./cm<sup>2</sup> per la carica batterica mesofila aerobica ed 1 U.F.C./cm<sup>2</sup> per gli altri indicatori (streptococchi fecali).

Viceversa i valori limite della carica microbica oltre i quali si può avere un peggioramento della qualità dell'alimento ed una sua maggiore deteriorabilità hanno ordini di grandezza pari a 10<sup>4</sup>- 10<sup>5</sup> U.F.C./cm<sup>2</sup> (8).

I parametri indicati vengono rappresentati in una tabella (tab.1) in cui i livelli intermedi tra il valore più basso (buona pulizia) e quello più alto (ambiente non sanificato) sono stati aggiunti in ragione di un ordine di grandezza per livello allo scopo di avere un criterio che indichi di quanto le superfici, allontanandosi dalle condizioni ideali, si avvicinino alle condizioni di non accettabilità.

- Tab. 1: classificazione delle superfici e delle attrezzature in base alla carica batterica presente, secondo gli standard proposti in letteratura

Carica batterica (JFC/cm <sup>2</sup> )	Giudizio
A= <50	accettabile
B = 50 -10 <sup>2</sup>	valore superiore di accettabilità
C= 10 <sup>2</sup> -10 <sup>3</sup>	carica batterica alta
D= 10 <sup>3</sup> -10 <sup>4</sup>	carica batterica altissima
E=>10 <sup>4</sup>	non accettabile

### **Bibliografia**

- 1) Bean e Griffin (1990): Food borne disease outbreaks in the United States, 1973 - 1987: pathogens, vehicles and trends. Journal of Food Protection, 53,804-817.
- 2) Cantoni C., D'Aubert S., Bersani C. (1984): Focolai di inquinamento microbico nella produzione e distribuzione degli alimenti carnei e della pesca. In "Aspetti igienici della produzione degli alimenti. Istituto Superiore di Sanità, Rapporto ISTISAN 84/5, 35-121.
- 3) ICMSF - International Commission on Microbiological Specifications for Foods (1986): Microorganisms in Foods, 2. Sampling for microbiological analysis principles and specific application. University of Toronto Press.
- 4) ICMSF - International Commission on Microbiological Specifications for Foods (1987): Microorganisms in Foods, 4. Application of the HACCP system to ensure microbiological safety and quality . Blackwell Scientific Publications, Oxford.
- 5) Mossel D.A.A. (1989): Adequate protection of the public against food-transmitted diseases of microbial aetiology. International Journal of Food Microbiology, 9,271-294.
- 6) Nortje G.L., Nel L., Jordaan E., Badenhorst K., Goedhart G., Holzapfel W.H., Grimbeek R.J., (1990): A quantitative survey of a meat production chain to determine the microbial profile of the final product. Journal of Food

Protection, 53, 411-417.

7) Orefice L. (1984): Monitoraggio microbiologico a livello di locali, attrezzature e personale nell'industria alimentare. In: "Aspetti igienici della produzione degli alimenti. Istituto Superiore di Sanità, Rapporto ISTISAN 8-5, 135-149.

8) Orefice L., Maiolatesi R., Di Virgilio A. (1988): Indagini sulla contaminazione microbica delle superfici di alcuni ambienti di produzione e di vendita degli alimenti. *Igiene e Sanità Pubblica*, 44, 267-275.

9) Organisation Mondiale de la Santé (1976): Risques microbiologiques liés aux aliments. In: "Aspects microbiologiques de l'Hygiène". *Seriè de Rapports techniques* 598, 57-75.

10) Patterson J.T. (1971): Microbiological assessment of surfaces. *Journal of Foods Technology*, 6, 63-72.

11) Scott E., Bloomfield S.F. (1990): The survival and transfer of microbial contamination via cloths, hands, utensils. *Journal of Applied Bacteriology*, 68, 271-278.

12) Solberg M., Buckaiew J.L., Chen C.M., Schaffner D.W., O'Neill K., McDonell J., Post L.S., Boderk M. (1990): Microbiological safety assurance systems for foodservice facilities. *Food Technology*, 12, 68-73.

13) Sveum W.H., Moberg L.J., Rude R.A., Frank J.F. (1992): Microbiological monitoring of the foods processing environment. In: "Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods". American Public Health Association Washington.



## 2. METODI DI ANALISI PER LA RICERCA DI PARAMETRI CHIMICI

Le metodiche di analisi dei formaggi sono normate dal DM 21.4.1986, che ufficializza un certo numero di determinazioni, nonché dal DM 24/6/72 che descrive il metodo ufficiale per la determinazione della formaldeide. Altri metodi di riferimento sono quelli riportati dalle norme internazionali FIL-IDF emanate dalla Federazione Internazionale di Latteria, e quelle AOAC, mentre per ricerche di parametri le cui metodiche non sono riportate ufficialmente, si fa riferimento alla bibliografia esistente in materia.

Il presente lavoro riporta le metodiche-guida individuate per la ricerca dei parametri: metalli pesanti, pesticidi clorurati, aflatossina MI e iodio.

Le metodiche-guida sono state scelte fra i metodi sottoposti all'attenzione del gruppo di lavoro, secondo i seguenti criteri:

- a) specificità, esattezza, precisione, ripetibilità
- b) limiti di rivelabilità
- e) sensibilità
- d) praticabilità ed applicabilità

Ogni metodo descritto, oltre alle specifiche delle modalità di esecuzione ed ai riferimenti bibliografici, riporta i limiti di rilevabilità.

### AVVERTENZA

Salvo diversa indicazione, i metodi che vengono proposti prescindono dal tipo di alimento ed ovviamente si intendono sostituiti sia dai successivi aggiornamenti che da diverse indicazioni nazionali o comunitarie.

### RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

- 1)AOAC Standard Methods 15th Ed. 1990
- 2) Baldi et al., I Convegno di Chimica degli Alimenti, ottobre 1990, Atti, 43-44
- 3) Bijl JP et al., J. of AOAC 70(3) 1987,472-474
- 4) Mitsuhashi T, Kaneda Y, J of AOAC 73(5) 1990, 790-792 Pesticide Analytical Manual, Food & Drug Admin., Washington, WA
- 5) Solvky T et al., J.A.O.A.C. 1979(52), 581-584
- 6) Styve et al., Dtsch. Lebensm. Rund. 73, 41-43

## 2.1 DETERMINAZIONE DELL'AFLATOSSINA M<sub>1</sub> NEI FORMAGGI

L'analisi dell'afatossina M<sub>1</sub> può essere suddivisa nelle seguenti fasi:

- 1 - isolamento dell'afatossina M<sub>1</sub>
  - a - estrazione
  - b - purificazione
- 2 - determinazione quali-quantitativa

In letteratura sono proposte molte varianti degli stadi suddetti, in particolare delle fasi 1.a e 1.b, mentre la determinazione quali-quantitativa viene eseguita quasi esclusivamente mediante HPTLC o HPLC con rivelatore a fluorescenza e conferma dell'identità della afatossina per formazione dell'emiacetale con acido trifluoroacetico.

Si riportano di seguito le due metodiche di estrazione e purificazione maggiormente utilizzate, mentre per l'analisi strumentale si riporta un unico schema comune ad entrambe le procedure. La molecola dell'afatossina M<sub>1</sub> teme la luce solare diretta, per cui le analisi andrebbero eseguite in ambienti non eccessivamente illuminati; è necessario pertanto controllare periodicamente il titolo esatto degli standard concentrati come descritto dai metodi AOAC (15th Ed. 1990, n.970.44 e 971.22). Non va dimenticato che l'afatossina M<sub>1</sub> è un composto altamente cancerogeno, che va manipolato con opportune precauzioni (guanti ed occhiali); la vetreria va decontaminata per immersione in ipoclorito di sodio per una notte.

### METODO N. 1

#### Principio del metodo

L'afatossina M<sub>1</sub> è estratta con acetone, l'estratto purificato su fase solida (C18 poi silice).

#### Estrazione

Pesare 20g di formaggio tagliato in piccoli pezzi, ed aggiungere acqua in quantità tale da avere un volume costante di 40 ml di acqua (la quantità di acqua necessaria andrà determinata in relazione all'umidità del campione). Aggiungere 120 ml di acetone. Mescolare 2 min. in omogeneizzatore o 30 min. in agitatore; filtrare su filtro a pieghe, ed evaporare 80 ml di filtrato (equivalenti a 10g di formaggio) in evaporatore rotante a 40°C per eliminare l'acetone. Filtrare la fase acquosa con filtro in vetro poroso da 10 µm.

#### Purificazione

Condizionare la cartuccia C18 con 5 ml di acetonitrile, poi con 5 ml di acqua, quindi far passare il campione a 4-5ml/min. Lavare la cartuccia con 5 ml di

acqua, poi con 20ml di acetonitrile-acqua (1+9) scartando gli eluati. Eluire l'aflatossina  $M_1$  con 2 ml di acetonitrile. Evaporare la frazione raccolta con un leggero flusso di azoto, eliminare le ultime tracce di acqua aggiungendo 200 $\mu$ l di toluene-etanolo (1+1) e evaporare a secchezza. Riprendere il residuo con 1 ml di diclorometano. Prelavare la cartuccia di silice con 5 ml di diclorometano; caricare il residuo disciolto in diclorometano, lavando due volte con 1 ml di diclorometano; scartare gli eluati. Lavare la cartuccia di silice con 5 ml di etere etilico. Eluire l'aflatossina  $M_1$  con 8 ml di cloroformio-acetone (4+1) raccogliendo gli eluati in provetta; evaporare a 40°C con azoto e disciogliere il residuo in 100  $\mu$ l di benzene-acetonitrile (9+1) per l'analisi HPTLC, o nella fase mobile utilizzata per l'analisi HPLC.

## **METODO N. 2**

### **Principio del metodo**

L'aflatossina  $M_1$  viene estratta con cloroformio e, dopo aver allontanato il grasso con etere di petrolio, purificata su colonna di silice.

### **Estrazione**

In una beuta con tappo a smeriglio da 500 ml pesare 50g di formaggio macinato, aggiungere 2,5 ml di soluzione satura di cloruro di sodio e 100 ml di cloroformio: agitare su agitatore meccanico per 30 minuti. Filtrare in un cilindro graduato da 100 ml annotando il volume raccolto. Versare il filtrato in un pallone da 250 ml e ripetere l'estrazione con altri 80 ml di cloroformio. Unire le fasi cloroformiche ed evaporare sotto pressione ridotta su b.m. a 40°C (il campione non va a secco perché rimane il residuo grasso).

Riprendere con 60 ml di acetone e 40 ml di acqua e versare il tutto in un imbuto separatore da 250 ml. Lavare il pallone con 40 ml di etere di petrolio 40°-70° e travasare nell'imbuto separatore. Agitare l'imbuto per 20 secondi ed eliminare l'estratto etereo. Ripetere l'estrazione con altri 20 ml di etere di petrolio. Estrarre l'aflatossina  $M_1$  dalla fase acetonica con 20 ml di cloroformio la prima volta, poi con 20 ml di cloroformio-acetone 1:1 la seconda, agitando per un minuto. Riunire le fasi cloroformiche e portare a secco con evaporatore rotante sotto pressione ridotta su b.m. a 40°C.

### **Purificazione**

Versare circa 10 ml di cloroformio nella colonna cromatografica (30x1 cm con rubinetto in teflon), aggiungere 2g di sodio solfato anidro, 2g di gel di silice imbibito di cloroformio, e 2g di sodio solfato anidro. Lasciare eluire il solvente fino allo strato superiore di solfato sodico, senza andare a secco. Riprendere l'estratto del campione con cloroformio (3 ml per 3 volte) e caricarlo in colonna. Eluire con:

- 25 ml di toluene-acido acetico 9:1
- 25 ml di n-esano

- 25 ml di n-esano: etere etilico: acetonitrile 6:3:1

Raccogliere in un pallone da 250 ml l'aflatossina  $M_1$  eluendo con 40 ml di cloroformio:acetone 4:1. Evaporare con evaporatore rotante su b.m. a 40°C. Riprendere con cloroformio trasferendo quantitativamente in fiala a fondo conico, quindi portare a secco con azoto. L'estratto è pronto per l'analisi cromatografica.

## **ANALISI CROMATOGRAFICA**

### **Strumentazione**

Cromatografo liquido con rivelatore fluorimetrico (ex=366 nm; em=430 nm): colonna C18 4.6x250 mm, fase mobile acetonitrile/acqua 30/70, filtrata attraverso membrane da 0-45µm e degassata con elio. lastre TLC: silica gel 60 senza indicatore di fluorescenza, cm 10x10 soluzioni di sviluppo per TLC:

a) etere etilico-metanolo-acqua (95+4+1);

b) cloroformio-acetone (70+30).

Soluzione standard aflatossina  $M_1$ : 10 µg/ml in cloroformio. Soluzioni di lavoro: evaporare aliquote di soluzione standard e portare a 0.1, 0.2 e 0.4µg/ml, riprendendo con benzene-acetonitrile (9+1) per TLC o con acetonitrile-acqua (30+70) per l'analisi HPLC.

**Per TLC:** depositare sulla lastra 20 µl di ogni soluzione standard e 20 + 50µl di estratto. Sviluppare nella prima direzione con etere etilico-metanolo-acqua (95+4+1). Asciugare per 10 minuti in ambiente ventilato con luci attenuate. Sviluppare nella seconda direzione con cloroformio-acetone (70+30), asciugare, osservare brevemente la macchia fluorescente a 365nm marcando con una matita. La determinazione quantitativa va eseguita mediante confronto visuale di standard a concentrazione opportuna, oppure mediante un fluorodensitometro (eccitazione 366nm, emissione 430nm).

**Per HPLC:** equilibrare il sistema con la miscela eluente al flusso di 1.0 ml/min; iniettare in sequenza le soluzioni standard e il campione, determinando la concentrazione del campione mediante una curva di taratura (l'aflatossina  $M_1$  esce dopo 5+7 minuti)

## **CONFERMA DELL'IDENTITÀ DELL'AFLATOSSINA**

**Per TLC:** essiccare con azoto aliquote di soluzioni standard e di campione. aggiungere 50 µl di anidride acetica, 50 µl di piridina ed agitare. Scaldare 15' a 50°C, evaporare con azoto, riprendere con 50 µl di benzene-acetonitrile (9+1), depositare e sviluppare come già descritto sulla lastra. Osservando a 365nm si nota la scomparsa della macchia originale dell' $M_1$  e la comparsa del derivato acetilato.

**Per HPLC:** essiccare con azoto aliquote di soluzioni standard e di campione: aggiungere 100 ml di acido trifluoroacetico, 10  $\mu$ l di acqua, agitare, scaldare 15' a 50°C, evaporare con azoto, disciogliere in 50  $\mu$ l di miscela eluente; iniettando nelle stesse condizioni sopra riportate si nota la scomparsa del picco dell'anatossina M<sub>1</sub> e la comparsa del picco della M2a (2+3 min).

**PRESTAZIONI DEL METODO:**

Recupero  $\geq$  80% Limite di rilevabilità: con HPTLC 0.05 $\mu$ g/Kg (p.p.b.), con HPLC 0.02 $\mu$ g/Kg.

## 2.2 DETERMINAZIONE DELLO IODIO TOTALE NEI FORMAGGI

L'analisi dello iodio inorganico totale ai livelli di sensibilità richiesti viene eseguita sfruttando la formazione di uno iodio-chetone (dal 2-butanone o dal 3-pentanone) che può essere determinato per gascromatografia con rivelatore a cattura di elettroni (ECD).

Si riportano di seguito le due metodiche di estrazione e purificazione maggiormente utilizzate, mentre per l'analisi gascromatografica si riportano alcuni parametri strumentali utilizzati nella pratica, avendo presente che anche altre configurazioni possono dare risultati analoghi.

### METODO N. 1

#### Principio del metodo

Si utilizza la reazione di iodurazione del 3-pentanone, dopo incenerimento alcalino del campione: il composto così ottenuto è estratto ed analizzato per GC-ECD.

#### Materiali e strumentazione

Capsule di nichel di capacità 100 ml

Forno a muffola termostatabile fino ad almeno 550°C

Filtri in fibra di vetro (Whatman GF/A)

Comune vetreria da laboratorio.

#### Reagenti

a) 3-pentanone: soluzione al 4% (v/v) in acqua

b) potassio bicromato: soluzione allo 0,5% (p/v) in acqua

c) potassio nitrato: soluzione al 20% (p/v) in acqua

d) acido solfamminico: soluzione al 10% (p/v) in acqua

e) n-esano: di grado pesticidi

f) iodio: 1) soluzione madre (1mg I/ml) ottenuta sciogliendo 131mg di KI in acqua e portando a 100 l; si conserva per almeno tre mesi 2) soluzioni di lavoro: diluire la soluzione 1) per preparare soluzioni contenenti da 0,01 a 0,1 µg/ml di I; si conservano in frigorifero per almeno due settimane.

#### Procedimento

Pesare accuratamente 2 grammi di campione in capsula di nichel: aggiungere 2ml di etanolo, 4ml di KOH 4M e 2ml di soluzione di KNO<sub>3</sub>.

Mescolare bene con una bacchetta di vetro, asciugare la miscela su piastra a 105°C. Mettere la capsula in muffola fredda, e portare la temperatura in due ore a 550°C, mantenendovela per altre 5 ore.

Dopo raffreddamento, aggiungere 30 ml di acqua e tritare le ceneri con bacchetta di vetro: far bollire attentamente per 5 minuti, filtrare la soluzione

risultante in un pallone tarato da 50 ml attraverso un filtro di fibra di vetro (Whatman GF/A).

Lavare la capsula e il filtro con 10 ml di acqua, neutralizzare il filtrato con  $H_2SO_4$  2M usando come indicatore il metilarancio. Aggiungere 2 ml di soluzione di acido solfamnico e portare a volume con acqua (soluzione campione).

### **Derivatizzazione**

Prelevare 25 ml esatti di soluzione campione in imbuto separatore da 100 ml; aggiungere in successione 1 ml di 3-pentanone 4%, 1 ml di potassio bicromato 0.5%, 1 ml di acido solforico 5M ed agitare.

Dopo 5 minuti, aggiungere 10 ml di n-esano ed agitare vigorosamente per 1 minuto. Lasciar separare la miscela in due fasi, scartare la fase acquosa inferiore, lavare l'esano con 10 ml di acqua, trasferire l'esano in provetta con tappo in vetro, aggiungendo una piccola quantità di sodio solfato anidro. Iniettare 2  $\mu$ l di soluzione al gascromatografo: seguire la stessa procedura per le soluzioni standard.

## **METODO N. 2**

### **Principio del metodo**

Il campione viene sciolto in acqua, chiarificato col reattivo di Carrez, e sul filtrato limpido si esegue la derivatizzazione con 2-butanone in ambiente acido.

Il derivato si estrae con n-esano e si analizza per GC-ECD.

### **Reagenti**

- a) metil-etilchetone (2-butanone) per cromatografia
- b) soluzione di sodio nitrito (20 mg/100ml acqua): si conserva in frigo e va preparata settimanalmente
- c) agente chiarificante: soluzione 1: 21.9 g di acetato di zinco e 3 ml di acido acetico glaciale in 100 ml di acqua soluzione 2: 10.6 g di ferrocianuro di potassio in 100 ml di acqua
- d) acido solforico concentrato
- e) n-esano: di grado pesticidi
- f) iodio: 1) soluzione madre (1 mg I/ml) ottenuta sciogliendo 131mg di KI in acqua e portando a 100 ml; si conserva per almeno tre mesi 2) soluzioni di lavoro: diluire la soluzione 1) per preparare soluzioni contenenti da 0,01 a 0,1  $\mu$ g/ml di I; si conservano in frigo per almeno due settimane.

### **Procedimento**

Omogeneizzare in frullatore 10 g di formaggio macinato e 60 ml di acqua per circa un minuto; aggiungere 5 ml di ciascuna delle soluzioni chiarificanti e omogeneizzare per altri due minuti. Centrifugare e filtrare il liquido. A 20 ml di filtrato limpido aggiungere 0.7 ml di acido solforico conc., 0.5 ml di

2-butanone e 1 ml di sodio nitrito e agitare.

Lasciare reagire a T ambiente per 20 minuti, trasferire in imbuto separatore ed estrarre due volte con n-esano. Filtrare lo strato organico su filtro SP e portare a 25 ml con n-esano: iniettare fino a 10 µl al gascromatografo. Preparare alla stessa maniera un bianco dei reagenti e le soluzioni standard diluendo opportunamente la soluzione madre di ioduro 1 mg/ml.

### **ANALISI GASCROMATOGRAFICA**

Gascromatografo con rivelatore a cattura di elettroni, operante ad una delle seguenti condizioni:

- a) colonna in vetro 2m x 3mm impaccata con 10% DEGS a 1% H3P04 su Chromosorb W DMCS 60-80 mesh, inj = 180°C, det = 260°C, colonna = 140°C
- b) colonna capillare HP-1 12m x 0.2mm, inj = 250°C, det = 280°C, programma da 60° a 150° a 10°/mm.
- e) colonna capillare SPB-1 inj = 150°C, det = 250°C, isoterma a 50°

### **PRESTAZIONI**

Recupero  $\geq$  91%

Limite di rilevabilità = 0.05µg/g (p.p.m.)

Comune vetreria da laboratorio.



## **2.3 DETERMINAZIONE DEI METALLI PESANTI NEI FORMAGGI**

### **Principio del metodo**

Il campione viene mineralizzato per incenerimento a secco, per digestione ad umido o con microonde, diluito con acqua ed analizzato per spettrofotometria ad assorbimento atomico con fornetto di grafite (per Pb-Cr-Cd-Cu) o in fiamma aria-acetilene (per Cu-Zn).

### **Reagenti e strumentazione**

Mineralizzazione a secco: capsule di porcellana o di platino, forno a muffola termostatabile fino ad almeno 450°C

Mineralizzazione con microonde: sistema a microonde con potenza programmabile, dotato di contenitori in teflon con idoneo sistema di chiusura.

Spettrofotometro per assorbimento atomico con lampade specifiche per gli elementi ricercati, munito di correzione del fondo al deuterio o ad effetto Zeeman.

Tutti i reagenti e gli acidi utilizzati devono essere della massima purezza possibile, e comunque specifici per analisi di metalli in tracce (Suprapur Merck, Spectrosol BDH, Ultrex Baker,...).

Tutta la vetreria utilizzata va decontaminata per immersione in acido nitrico 10% per almeno una notte, indi risciacquata con acqua bidistillata.

### **Procedimento a secco**

Pesare esattamente in capsula di porcellana o di platino 5g di campione omogeneizzato, essiccarlo in stufa a 105°C, incenerirlo in muffola aumentando gradualmente la temperatura fino a 400 ° 450°C per almeno 10 ore. Se dopo tale trattamento le ceneri non risultassero perfettamente bianche, trattare il residuo con 1 ml di HNO<sub>3</sub> concentrato, essiccare nuovamente e incenerire ancora per altre 4 ore. Riprendere le ceneri con pochi cc di acido nitrico 10% e trasferire quantitativamente in pallone tarato da 25 ml, portando a volume con acqua.

### **Procedimento a umido**

Pesare esattamente in tubo da mineralizzazione (provettone per azoto) da 2 a 3g di campione omogeneizzato, aggiungere 20 ml di acido perclorico/nitrico (2:1 v/v), coprire con parafilm e lasciare a riposo per una notte. Si scalda sul mineralizzatore dapprima lentamente poi, a scomparsa dei fumi rossastri, ad alta temperatura fino a piccolo volume (1 - 2cc). Raffreddare, riprendere con acqua e trasferire quantitativamente in pallone tarato da 25 ml, portando a volume con acqua.

### **Procedimento con microonde**

Pesare esattamente nel contenitore di teflon da 0.5 a 1 g di campione omogeneizzato, aggiungere da 5 a 20 ml (a seconda delle istruzioni del sistema a microonde) di acido nitrico 70%, e procedere sino a mineralizzazione totale, con eventuale aggiunta intermedia di acqua ossigenata. Trasferire quantitativamente in pallone tarato da 25ml, portando a volume con acqua.

### **Determinazione strumentale**

Si rimanda ai manuali di istruzione degli strumenti per i dettagli, e si riportano le condizioni principali:

Pb	283.3nm	inc.	650°C	atom.	1600°
Cr	357.9nm	inc.	1100°C	atom.	2600°
Cd	228.8nm	inc.	700°C	atom.	1500°
Cu	325-Onm	inc.	1200°C	atom.	2300°
Zn	213.9nm				

### **PRESTAZIONI**

Recuperi: generalmente dell'ordine del 100 %

Limite di rilevabilità (riferiti al formaggio):

Pb	= 0.01 + 0.05mg/Kg
Cr	= 0.01 + 0.05mg/Kg
Cd	= 0.001+ 0.005mg/Kg
Cu	= 0.02 + 0.05mg/Kg (fornetto)
	= 0.1 + 0.5mg/Kg (fiamma)
Zn	= 0.1 + 0.2mg/Kg

## 2.4 DETERMINAZIONE DEI PESTICIDI ORGANOCLORURATI

### METODO N. 1 (PURIFICAZIONE MEDIANTE GPC)

Pesare una quantità di campione equivalente a circa 3g di grasso in un becker da 250 ml e trasferirlo quantitativamente in imbuto separatore da 1l con un totale di 100 ml di acqua.

Aggiungere 10 ml di una soluzione di potassio ossalato al 5% e miscelare in maniera omogenea. Aggiungere 100 ml di alcool etilico ed agitare per un minuto fino ad omogeneizzazione, evitando il più possibile la formazione di emulsioni o schiume (più probabili partendo da latticini o derivati liofilizzati o in polvere). Aggiungere 200 ml di etere etilico ed agitare per 2 minuti. Aggiungere 200 ml di etere di petrolio ed agitare per 1 minuto. Lasciare riposare per 10 minuti e scaricare la fase acquosa sottostante quando la fase organica risulta ben separata e limpida.

Dopo un minuto, scaricare l'eventuale altra fase acquosa separatasi. Filtrare la fase organica su sodio solfato anidro e lavare l'imbuto separatore con 3 aliquote da 15 ml di etere di petrolio.

Portare delicatamente a secchezza su evaporatore rotante e purificare con GPC prima di eseguire le analisi GC.

### Condizioni GPC per la purificazione di matrici lipidiche nella determinazione di residui di pesticidi

CONDIZIONE GPC	A	B
lunghezza (cm)	40	30
diametro (cm)	2.5	2.5
flusso (cm/min)	5	5
grammi di BIO BEADS SX-3	60	50
scarto (ml)	150	100
raccolta (ml)	175	180

#### FLUENTI:

A metilene cloruro - cicloesano 50:50

B metilene cloruro - cicloesano 15:85

La frazione raccolta secondo le condizioni di colonna A contiene i pesticidi organoclorurati, organofosforati, policlorobifenili, idrocarburi policiclici aromatici.

La frazione di cui alla colonna B contiene i pesticidi organoclorurati e organofosforati.

La quantità di grasso da caricare non deve superare gli 0.1 grammi per ml di miscela eluente. Gli oli, il burro, la margarina possono essere direttamente diluiti con la miscela eluente e purificati.

## **METODO N. 2 (PURIFICAZIONE MEDIANTE SPE)**

### **Estrazione**

Prelevare 5g di formaggio tritato ed omogeneizzato, aggiungere 50 ml di acqua e 100 ml di acetone; mettere in bagno ad ultrasuoni per 5 minuti. Aggiungere 15 grammi di NaCl e 75 ml di n-esano; mettere in bagno ad ultrasuoni per 15 minuti. Separare l'estratto in imbuto separatore.

### **Purificazione**

Prelevare 5 ml dell'estratto e portarli a secco in evaporatore rotante; riprendere con 2 ml di acetone e 2 ml di acqua.

Condizionare la colonnina SPE C 18 con:

5 ml di n-esano

5 ml di metanolo

5 ml di miscela acetone-acqua 1:1

aggiungere il campione; lavare la colonnina con 5 ml di acetone, poi con 5 ml di acqua; seccare bene la colonnina per 30 minuti;

eluire con 2 + 2ml di miscela esano/etere etilico 1:1

tirare a secco l'eluato con una leggera corrente di azoto e riprendere con 1 ml di isoottano.

L'estratto è pronto per l'analisi GC.

### **Condizioni gascromatografiche**

Colonna ULTRA 2 (ditta HP) 25m x 0.32mm, 0.52µm film

rivelatore ECD

iniettore split a 250°C

programma di temperatura: da 150 a 280°C con incremento di 3 gradi al minuto.

### **Principi attivi determinati**

Esaclorocicloesano isomero alfa;

esaclorocicloesano isomero beta;

lindano;

esaclorobenzene;

endrin;

eldrin;

eptacloro;

eptacloro epossido;

dieldrin;

DDT e tutti i suoi isomeri;

limite di rivelabilità: 0.001 mg/Kg