

Metodiche di analisi di microrganismi negli alimenti

Campylobacter

- presentazioni EvaOlson1/2

DECISIONE DELLA COMMISSIONE del 19 luglio 2007

- **riguardo al contributo finanziario della Comunità a favore di un'indagine da effettuare negli Stati membri relativa alla diffusione e alla resistenza agli antimicrobici del *campylobacter* spp. nei branchi di polli da ingrasso e alla diffusione del *campylobacter* spp. e della *salmonella* spp. nelle carcasse di pollo**
- → documento *Campylobacter_europa*
- "La presente decisione si applica dal 1° gennaio 2008."

Articolo 1

- La presente decisione fissa le norme relative a un **contributo finanziario** della Comunità a favore di un'indagine da effettuare negli Stati membri avente per oggetto:
 - a) la **diffusione** del *campylobacter* spp. nei branchi di polli da ingrasso e la loro **resistenza agli antimicrobici**;
- nonché
- b) la diffusione del *campylobacter* spp. e della ***salmonella* spp.** nelle carcasse di pollame.

Articolo 4

Modalità di campionamento e di analisi

1. Il campionamento viene effettuato dall'autorità competente, o sotto il suo controllo, in base alle caratteristiche tecniche definite nell'allegato I.
2. I laboratori nazionali di riferimento (LNR) per *salmonella* spp., *campylobacter* spp. e le prove di resistenza agli antimicrobici, effettueranno le relative analisi di campioni e isolati.
3. L'autorità competente può però decidere di far eseguire le analisi dei campioni e degli isolati ad altri laboratori coinvolti nei controlli ufficiali di *salmonella* spp., *campylobacter* spp. e nelle prove di resistenza agli antimicrobici.

Articolo 4 continua

In tal caso, i LNR sosterranno tali laboratori, addestrandone il personale e garantendo che soddisfino le norme sui controlli di qualità attraverso ring test a scadenze regolari.

I laboratori designati conformemente al paragrafo 3, primo comma, del presente articolo che eseguono le prove devono

soddisfare le seguenti condizioni:

- a) disporre di comprovata esperienza nell'uso dei metodi da applicare alla prova;
- b) disporre di un sistema di garanzia della qualità che soddisfi la norma EN/ISO 17025;
- c) sottoporsi alla supervisione dei pertinenti LNR

Allegato I: Specifiche tecniche di cui all'articolo 4

- PARTE A
 - Base di campionamento
- PARTE B
 - Dimensione del campione
 - Dimensione del campione elementare
 - Dimensione del campione secondario

Allegato I: Specifiche tecniche di cui all'articolo 4

- PARTE C
 - Raccolta, trattamento e analisi dei campioni per individuare il *campylobacter* spp nei branchi di polli da ingrasso e provare la sua resistenza antimicrobica
 - Raccolta e trasporto
 - Metodo diagnostico
 - Coltura
 - Conferma e speciazione del genere *campylobacter*
 - Controllo di qualità
 - Conservazione
 - Prove della resistenza antimicrobica

Coltura

- La coltura diretta in ambiente selettivo fornisce una buona stima della diffusione dei *campylobacter*. La coltura diretta del campione va effettuata in un ambiente selettivo adatto al *campylobacter* (ambiente selettivo modificato per *campylobacter*, esente da sangue (CCDA); Karmali; o Preston agar).
- Le piastre vanno incubate a $41,5 \pm 1$ °C, in atmosfera microaerobica, per almeno 48 ± 2 ore. Una crescita può essere accertata dopo 24 ore.
- L'atmosfera microaerobica può essere ottenuta in incubatrici microaerobiche normalmente in commercio (miscela di gas 10 % CO₂/6 % O₂). In mancanza di tali incubatrici, si possono usare sistemi di coltura microaerobici come i contenitori di gas. Esistono in commercio sistemi d'imballaggio sotto gas che forniscono un'atmosfera microaerobica adeguata.
- Per ogni lotto di campioni messo a coltura, vanno previsti adeguati controlli positivi e negativi.

Conferma e speciazione del genere campylobacter

- L'isolamento e la conferma di organismi di *campylobacter* devono avvenire **secondo la norma ISO 10272-1:2006(E)**. Effettuare la speciazione di almeno un isolato di *campylobacter* per lotto usando metodi fenotipici secondo la norma ISO 10272-1:2006(E) o **metodi molecolari** come le tecniche di reazione a catena della polimerasi (PCR).
- Indicare i metodi usati.
- Utilizzare l'isolato speciato per la successiva prova di resistenza antimicrobica.
- Se un laboratorio non ha molta esperienza nel campo della speciazione, conserva l'isolato come descritto al punto 2.4 per il tempo necessario a un'adeguata formazione o lo invia a un laboratorio con maggior esperienza, dopo aver consultato il laboratorio comunitario di riferimento per il *campylobacter*.

Controllo di qualità

- A garanzia della qualità, occorre inviare al laboratorio comunitario di riferimento per il *campylobacter*, a fini di conferma e speciazione, una parte degli isolati di *campylobacter* spp. (non più di 8).
- Una parte di tali isolati va inviata al laboratorio in un unico lotto o trimestralmente. L'eventuale trasporto degli isolati da un laboratorio all'altro va effettuato in modo appropriato (per esempio in tamponi di carbone).

Conservazione

- Se è garantita la sopravvivenza dei ceppi per almeno 2 anni, si conserva almeno un isolato per campione positivo presso i LNR, con il normale metodo di raccolta delle colture degli LNR.

Prove della resistenza antimicrobica

- Nella sorveglianza della resistenza antimicrobica, vanno inclusi 170 isolati di *Campylobacter* per Stato membro.
- Nella sorveglianza non va incluso più di 1 isolato per specie di *Campylobacter* proveniente dallo stesso lotto di macellazione.
- Negli Stati membri in cui, in un determinato anno, è disponibile un numero di isolati inferiore alla dimensione prescritta del campione, tali isolati vanno tutti inclusi nella sorveglianza della resistenza antimicrobica.
- Negli Stati membri in cui è disponibile un numero di isolati superiore, vanno inclusi tutti gli isolati oppure un campione rappresentativo casuale di dimensione pari o maggiore a quella prescritta del campione.
- Gli Stati membri proveranno almeno gli antimicrobici di cui alla tabella 1, usando i valori limite dati e un'adeguata gamma di concentrazioni per determinare la sensibilità del *Campylobacter*

Antimicrobici da testare

Tabella 1

	Antimicrobico	Valore limite (mg/l) R >
<i>Campylobacter jejuni</i>	Eritromicina	4
	Ciprofloxacina	1
	Tetraciclina	2
	Streptomicina	2
	Gentamicina	1
<i>Campylobacter coli</i>	Eritromicina	16
	Ciprofloxacina	1
	Tetraciclina	2
	Streptomicina	4
	gentamicina	2

Prove della resistenza antimicrobica

- Le diluizioni avverranno con i metodi di cui agli orientamenti
 - M31-A3, Performance Standards for Antimicrobial Disk and Dilution Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals (Third Edition) e → **vedi documento**
 - M100-S16, Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility testing (Sixteenth International Supplement), del CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute).

- PARTE D
- Raccolta, trattamento e analisi dei campioni per individuare il *Campylobacter* spp. e la *Salmonella* spp. nelle **carcasse** di polli da ingrasso
- ...

International Organization for Standardization

Home Products Standards development News and media About ISO For ISO Members - FAQs - Fr ISO Store

Products > ISO Standards > By TC > TC 34 Food products > SC 9

ISO Store
ISO Standards
By ICS
By TC

ISO 10272-1:2006

Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. – Part 1: Detection method

Media and price

Language	Format	Add to basket
English	PDF (463 kB)	CHF 86,00
English	Paper	CHF 86,00
French	PDF (490 kB)	CHF 86,00
French	Paper	CHF 86,00

General information

Number of Pages: 16

Edition: 1 (Monolingual) ICS: 07.100.30

Status: Published Stage: 80.20 (2009-01-15)

TC/SC: TC 34/SC 9

Abstract

ISO 10272-1:2006 describes a horizontal method for the detection of *Campylobacter* spp.

It is applicable to products intended for human consumption or for the feeding of animals, and to environmental samples in the area of food production and food handling, subject to the limitations stated in the Introduction.

Revision information

Revises: ISO 10272:1995

Revises: ISO 10272:1995/Cor 1:1996

Revises: ISO 10272:1995/Cor 2:1997

Corrigenda, Amendments and other parts

ISO/TR 10272-2:2006

© 2009 ISO Privacy Policy Name and logo Sitemap Contact ISO Guided tour of ISO-Online Print Increase text size Reduce text size

International Organization for Standardization

Home Products Standards development News and media About ISO For ISO Members - FAQs - Fr ISO Store

Products > ISO Standards > By TC > TC 34 Food products > SC 9

ISO Store
ISO Standards
By ICS
By TC

ISO 21527-1:2008

Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds – Part 1: Colony count technique in products with water activity greater than 0,85

Media and price

Language	Format	Add to basket
English	PDF (463 kB)	CHF 86,00
English	Paper	CHF 86,00
French	PDF (490 kB)	CHF 86,00
French	Paper	CHF 86,00

General information

Number of Pages: 16

Edition: 1 (Monolingual) ICS: 07.100.30

Status: Published Stage: 80.20 (2009-01-15)

TC/SC: TC 34/SC 9

Abstract

ISO 21527-1:2008 describes a horizontal method for the detection of *Campylobacter* spp.

It is applicable to products intended for human consumption or for the feeding of animals, and to environmental samples in the area of food production and food handling, subject to the limitations stated in the Introduction.

Revision information

Revises: ISO 10272:1995

Revises: ISO 10272:1995/Cor 1:1996

Revises: ISO 10272:1995/Cor 2:1997

Corrigenda, Amendments and other parts

ISO/TR 10272-2:2006

© 2009 ISO Privacy Policy Name and logo Sitemap Contact ISO Guided tour of ISO-Online Print Increase text size Reduce text size

Prodotti di microrganismi

Micotossine

Micotossine

- esiste una precisa regolamentazione europea (Regolamento n. 466/01/CE) che tutela il consumatore imponendo i limiti di legge per la presenza di tali sostanze tossiche negli alimenti.
- alla normativa europea, con cui la legislazione italiana è coerente, si affianca un'intensa attività di vigilanza.

Controllo delle micotossine

include

- (a) identificazione della natura e dell'estensione del problema
- (b) introduzione di migliorate procedure di gestione dei problemi individuati
- (c) monitoraggio regolare di cibi e mangimi come parte di un programma di controllo qualità
 - procedure di analisi
 - procedure di campionamento adeguate

Controllo delle micotossine

- molto dibattito sulla dimensione del campione da prelevare durante il campionamento,
- in generale la dimensione del campione dovrebbe aumentare all'aumentare della dimensione del materiale, es. noci, mais e riso → 20, 10 and 5kg rispettivamente
- INOLTRE attenzione alla rappresentatività (se il campionamento avviene sulla superficie del campione)

Alcune osservazioni

- Carichi di granaglie → migliaia di tonnellate di materiale
 - → problema di campionamento (500 tonnellate)
 - → di rappresentatività del campione (da torri di pesata, nastri trasportatori, camion, container, problema di movimento veloce della merce → sistemi automatici di campionamento se possibile
- riduzione del campione per l'analisi
 - deve mantenere la rappresentatività

Aspetti preventivi durante la fase di coltivazione

- Pre-raccolto
 - rotazione delle aree coltivate
 - uso di antifungini
 - uso di varietà resistenti all'attacco fungino
 - uso di sementi biotech
 - programmi intensivi di controllo degli insetti e delle piante infestanti
 - condizioni di non-aridità

Aspetti preventivi durante la fase di coltivazione

- Raccolto
 - rispetto di tempi e modalità del raccolto (luce solare, contatto con il terreno, non ritardare i tempi di raccolta)
 - essiccamento rapido e controllato mantenendo umidità <10%

Aspetti preventivi post-raccolto

- Post-raccolto (stoccaggio)
 - controllo umidità e temperatura
 - controllo insetti
 - predisposizione di adeguate procedure di pulizia e disinfestazione dei silos

Aspetti preventivi post-raccolto

- Post-raccolto (trasformazione) - HACCP
 - controllo ingredienti
 - controllo condizioni conservazione ingredienti (umidità e temperatura)
 - temperature di lavorazione
 - utilizzo ceppi non tossinogeni
 - buone pratiche di fabbricazione

RIFERIMENTI NORMATIVI micotossine

- **Regolamento (CE) N. 401/2006 della Commissione del 23/02/2006 relativo ai metodi di campionamento e di analisi per il controllo ufficiale dei tenori di micotossine nei prodotti alimentari**
- **Regolamento (CE) N. 1881/2006** della Commissione del 19/12/2006 che definisce i tenori massimi di alcuni contaminanti alimentari
- **Regolamento n. 856/2005/CE** che modifica il Regolamento n. 466/01/CE, per quanto riguarda le **Fusarium-tossine**
- **Regolamento n. 183/2005/CE** relativo all'igiene dei mangimi
- **Nota della Regione Emilia-Romagna prot. SAS 42298/04** "Piano regionale per la ricerca di aflatoxina M1 nel formaggio a pasta dura e a lunga stagionatura (tipo grana)"
- **Nota del ministero della Salute prot.D.G.V.A./IX/25664/F. del 24 agosto 2004** relativa ai metodi di campionamento e analisi per la ricerca di aflatoxine nei formaggi.

RIFERIMENTI NORMATIVI micotossine

- **Decreto legislativo 10.05.2004 n. 149** recepimento delle Direttive 2001/102/CE, 2002/32/CE e 2003/100 /CE
- **Decreto ministeriale 17/4/2004** recepimento della Direttiva 2003/78/CE
- **Direttiva 2003/100/CE della Commissione del 31 dicembre 2003** che modifica l'allegato I della direttiva 2002/32/CE del Parlamento europeo e del Consiglio del 7 maggio 2002 relativa alle sostanze indesiderabili nell'alimentazione degli animali. Recepita con Decreto legislativo 10.05.2004 n. 149
- **Nota del Ministero della Salute prot. n. 609/1774/388 del 12/12/2003**, "Linee guida direttici per il controllo delle aflatoxine nei mangimi e nel latte".
- **Circolare Ministeriale n.6 del 28 novembre 2003** "Valori massimi ammissibili di ocratossina A nel cacao".
- **Nota del Ministero della Salute prot. n. 614/24315/AG 77/1356 del 29/7/2003** "Piano Nazionale di vigilanza e controlli sanitari sull'alimentazione animale".
- **Decreto del Ministero della Salute 23 dicembre 2002, n. 317** "Regolamento interministeriale recante norme di attuazione della direttiva 1999/29/CE, relativa alle sostanze ed ai prodotti indesiderabili nell'alimentazione degli animali".

RIFERIMENTI NORMATIVI micotossine

- **Direttiva 2002/32/CE del Parlamento europeo e del Consiglio del 7 maggio 2002** relativa alle sostanze indesiderabili nell'alimentazione degli animali. Recepita con Decreto legislativo 10.05.2004 n. 149
- **Direttiva 2001/102/CE del Consiglio del 27 novembre 2001** che modifica la direttiva 1999/29/CE del consiglio relativa alle sostanze e ai prodotti indesiderabili nell'alimentazione degli animali". Recepita con Decreto legislativo 10.05.2004 n. 149
- **Decreto Ministeriale 23/12/2000**. "Recepimento della Direttiva 98/53/CE della Commissione che fissa i metodi di prelievo e metodi di analisi per il controllo ufficiale dei tenori massimi di alcuni contaminanti nei prodotti alimentari".
- **Circolare Ministeriale n.10 del 9 giugno 1999**. "Direttive in materia di controllo ufficiale di prodotti alimentari: valori massimi ammissibili di micotossine nelle derrate alimentari di origine nazionale, comunitaria e Paesi terzi"
- **Decreto Legislativo 26 maggio 1997, n. 155**, " Attuazione della Direttiva 93/43/CEE e 96/3/CE concernente l'igiene dei prodotti alimentari".
- **Legge del 30 aprile 1962, n° 283**, "Disciplina igienica della produzione e della vendita delle sostanze alimentari e delle bevande" e successivo Regolamento di esecuzione DPR 327/80

Altri strumenti di aggiornamento

Rete Telematica Europea di Informazione sulle Micotossine (EMAN)

- A. CHREVATIDIS, A. EGGINGTON, M. PIACENTINI, P. WILSON and P. PATEL
- Leatherhead Food RA, Randalls Road, Leatherhead, Surrey KT22 7RY, UK
Tel: +44(0)1372 822386, Fax: +44(0)1372 822229,
E-mail: achrevatidis@lfra.co.uk
- nell'ambito di un progetto finanziato dalla Commissione Europea, è stata creata una rete telematica europea costituita da un gruppo multidisciplinare di esperti e di Istituzioni di riferimento nazionali per l'aggiornamento di tutti gli operatori potenzialmente interessati ai più recenti sviluppi degli studi sulle micotossine.

Obiettivi del progetto

- stabilire un **collegamento** tra tutte le organizzazioni, aziende e persone interessate o direttamente coinvolte nelle problematiche delle micotossine;
- **organizzare e aggiornare** periodicamente un sito web dedicato all'argomento;
- proseguire l'aggiornamento del sito web, **anche dopo la scadenza** del progetto, con i fondi derivanti dalla sua utilizzazione commerciale.
- Ciascuna Istituzione è responsabile dello sviluppo e del mantenimento del sito web e, rispondendo alle domande pervenute via internet, funge da punto di riferimento nazionale interattivo,
- Il progetto prevede inoltre l'organizzazione annuale di congressi e di gruppi di lavoro, la preparazione e la distribuzione semestrale di bollettini informativi e di schede monometriche, e la realizzazione di corsi di formazione interattivi on-line.
- Il risultato complessivo del progetto dovrebbe consistere nello sviluppo di una rete telematica europea in grado di fornire via web informazioni prontamente disponibili sui diversi aspetti riguardanti le micotossine (<http://www.mycotoxins.org>)

Metodiche di analisi

- HPLC (High performance liquid chromatography) per aflatoxine, ocratossina A, zearalenone, deossinivalenolo (DON) e fumonisine.
- high performance thin layer chromatography (HPTLC) per aflatoxine
- gas liquid chromatography (GLC) per DON, T-2 toxin and zearalenone.
- Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA) per aflatoxine, ocratossina A, deossinivalenolo, T-2 toxin e zearalenone.
- **Nonostante l'utilizzo di tecniche costose e sofisticate come HPLC, HPTLC, GLC and ELISA, di solito l'accordo tra laboratori non è soddisfacente quando si analizzano campioni identici (Coker, 1984)!**

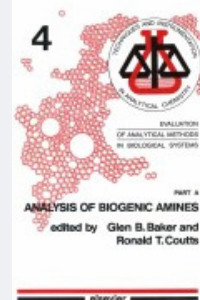
Prospettiva

- C'è un reale bisogno urgente di metodi analitici semplici, robusti, a basso costo per la maggior parte delle micotossine, che possano essere utilizzati di routine nei laboratori dei paesi in via di sviluppo

Prodotti di microrganismi

Amine biogene

- Evaluation of Analytical Methods in Biological Systems: Analysis of biogenic amines / edited by Glen B. Baker and Ronald T. Coutts
- Di Rokus A. De Zeeuw, Glen B. Baker, Ronald Thomson Coutts
- Edizione: illustrata
- Pubblicato da Elsevier, **1982**
- ISBN 0444421106, 9780444421104
- 308 pagine



AB in pesce deteriorato

Histamine (or scombrototoxin), putrescine, cadaverine, tyramine and agmatine biogenic amines are produced from the decarboxylation of histidine, ornithine, lysine tyrosine and arginine respectively by decarboxylase enzymes from some bacteria present in spoiling fish.

Histamine Fish Poisoning (HFP) is often referred to as scombrototoxin poisoning because of the frequent association of the illness with the consumption of spoiled scombroid fish such as tuna and mackerel.

The formation of histamine in fish products is directly correlated with the concentration of histidine in the tissue and the level of micro-organisms present in the product, due to bacterial histidine decarboxylase reaction

Biogenic amines have been proposed as indicators of spoilage of fish. It is interesting to note that most of the biogenic amines are stable to thermal processing, so their presence in finished canned products is a good indication that the raw material was spoiled prior to heating.

Law regulations for histamine

Regulation (EC) 2073/2005 establishes histamine maximum levels for species especially rich in histidine:

"Nine samples must be taken from each batch. These must fulfil the following requirements :

- the mean value must not exceed 100 ppm;
- two samples may have a value of more than 100 ppm but less than 200 ppm;
- no sample may have a value exceeding 200 ppm."

Those species belong to the families: Scombridae, Clupeidae, Engraulidae, Coryfenidae, Pomatomidae and Scombrosidae.

However, fish belonging to these families which have undergone enzyme ripening treatment in brine may have higher histamine levels but not more than twice the above values.

The FDA guidelines 1998c for tuna, mahi mahi and related fish advised histamine levels "500 ppm set based on toxicity, 50 ppm set as defect action level, because histamine is generally not uniformly distributed in a decomposed fish. Therefore, if 50 ppm is found in one section, there is the possibility that other units may exceed 500 ppm".

Analytical methods (histamine and BA)

Biological methods were the first methods of evaluation of scombroid toxin, they measured such parameters as amount of contraction of a histamine sensitive organ as guinea pig ileum and the first AOAC method of determination of histamine in food was a biological method (AOAC Official method 954.04), but these techniques have been supplanted by simpler and more convenient methods.

Analytical methods (histamine and BA)

- **Quantitative methods:**
 - **Fluorimetric techniques** have been developed for an accurate measurement of histamine and with the evolution of the techniques new procedures were tested.
 - Now, the **chromatographic techniques**, such as gas chromatography (GC), high performance liquid chromatography (HPLC), and high performance thin layer chromatography (HPTLC),
 - as well as **capillary electrophoresis**, offer one major advantage: they allow the simultaneous analysis of histamine and others biogenic amines in fish and fishery products. HPLC techniques are the most used today
- **Semi-quantitative methods:**
 - they are suitable for routine screening of histamine. Some convenient immuno-enzymatic kits are commercialised and other techniques such as colorimetric, thin layer chromatography (TLC) and enzymatic methods are used for many years.

Methods for routine testing in QC laboratories

With regard to quality control methods for scombrototoxin: To ensure the safety regarding histamine it is preferable to use a **rapid method** to do a screening, even if the method is semi-quantitative, **because it allow checking a great quantity of samples**. However it is necessary to define the limits of the method and to validate its reliability in comparison with a reference method; and in case of doubt regarding the results or in the event of dispute, the official method must be used.

The colorimetric, TLC and enzymatic methods require in general a small commitment of equipment and inexpensive reagents, however they are qualitative or at best semi-quantitative.

Methods for routine testing in QC laboratories

The immuno-enzymatic test kits giving quantitative results require little equipment, a photometer, and some reagents that are sold ready to use. Several ELISA procedures have been developed by companies which produce qualitative and/or quantitative analysis kits for the measure of histamine. They are able to distinguish between products that contained less than 50 ppm and those that contained more than 50 ppm.

HPTLC can be used as screening test in quality control laboratories; it can replace old TLC methods, improving the quality of the results, is not expensive and doesn't require sophisticated instrumentation. It is also a sensitive and reproducible method.

Methods for validation

The AOAC fluorimetric method (977.13 - Association of Official Analytical Chemists) is used to compare the performance of new methods in comparative studies. It is recommended by Codex Alimentarius as reference method.

→ vedi documento

Methods for validation

An HPLC method based on extraction of biogenic amines with perchloric acid, followed by direct HPLC analysis of the extract on a reverse phase column with on-line derivatization with ophthalaldehyde and fluorescence detection at 365/418 nm was studied in a European project, tested on several food matrices. It is a German reference method (Amtliche-Sammlung-von-Untersuchungsverfahren-nach-Paragraph-35-LMBG., L 10.00-5).

Quantitative precise methods often need relative sophisticated equipment and skilled technicians. HPLC technique being sophisticated, the method can be used in specialized laboratories to check some samples after a first screening test.

Standards
Histamine.2HCl, Putrescine.2HCl, Cadaverine.2HCl and other biogenic amines are commercially available.

Recommendations

Sample management: Histamine and biogenic amines are produced by enzymatic reaction, their level increases in the chain, even under chilling condition, so it is important to perform the analysis very quickly after the sampling or when it is possible, depending on the method, to prepare the acidic extract that can be kept about one week at +4°C. Histamine and biogenic amines are heat and acid stable and they cannot be destroyed by cooking or freezing.

Expression of Analytical Results: The analysis result should be expressed clearly, i.e. histamine in mg/kg with the reference of the used method and details about the sampling (nature, date, place).

Metodo ufficiale per UE

Official methods of reference

HPLC method (separation of dansyl-derivatives) is the reference method of the Commission Regulation (EC) N° 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs. It is a technique published by Malle et al. (1996) followed by an internal validation (Duflos et al., 1999).

Technical references

Commission Regulation (EC) N° 2073/2005 of 15 November 2005 on microbiological criteria for foodstuffs.

Malle P., Valle M., Bouclet S. Assay of biogenic amines involved in fish decomposition. J. AOAC Internat., 1996, 79, 43-49.

Duflos G., Dervin C., Malle P., Bouquet S. Relevance of matrix effect in determination of biogenic amines in plaice (*Pleuronectes platessa*) and witing (*Merlangius merlangus*). AOAC Internat., 1999, 82, 1097-1101.

Prodotti di microrganismi

Antibiotico-resistenza

ITALIANCRAB
Il Centro di Referenza
Attività del CRAB
Progetti di ricerca
Pubblicazioni e rapporti
Documenti e immagini
Dove siamo
Interpretazione ABG
Bibliografia
Programma di Gestione CRAB

Centro Nazionale di Referenza per l'Antibiotico-resistenza

Presso la sede centrale dell'Istituto zooprofilattico sperimentale del Lazio e della Toscana è attivato il "Centro di referenza nazionale per l'antibiotico-resistenza" (Dal D.M. 8/5-2002 della Gazz. Uff. 22 maggio 2002, n. 119).

Qual è l'importanza di un Centro di Referenza Nazionale?

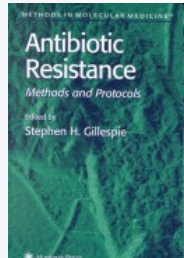
L'esistenza di un Centro di Referenza che implementi un sistema di monitoraggio sull'antibiotico-resistenza è stato il primo passo per avviare attività di sorveglianza, per ottenere dati epidemiologici accurati, per rendere possibile l'attività di reporting e per permettere in un immediato futuro l'acquisizione di informazioni sul rischio di diffusione dell'antibiotico-resistenza negli animali e, lungo la filiera produttiva, anche all'uomo.

Missioni

Il Centro di Referenza per l'antibiotico-resistenza (CRAB) si propone di operare in un network nazionale, prevalentemente costituito dalla rete degli Istituti Zooprofilattici Sperimentali (IZS/IZSP), rappresentati dalle realtà italiane, per favorire standardizzazione ed armonizzazione di metodiche analitiche e di reporting, oltre che promuovere la qualità del servizio fornito dai laboratori veterinari in tema di test di sensibilità agli antibiotici, attività di importante supporto nella scelta della terapia nell'ambito della pratica clinica.

Il Centro di Referenza ha inoltre l'obiettivo di avviare e mantenere un Sistema di Sorveglianza sull'antibiotico-resistenza in medicina veterinaria. Lo scopo è

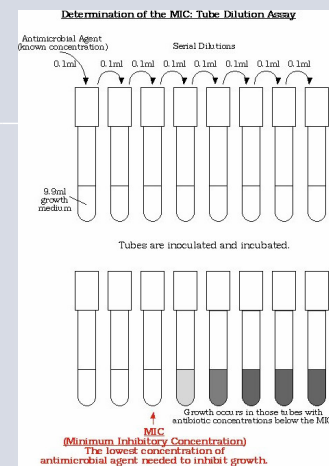
- Antibiotic Resistance: Methods and Protocols
- Di Stephen H. Gillespie
- Pubblicato da Humana Press, 2001
- ISBN 0896037770, 9780896037779
- 287 pagine



Test fenotipici

Tube-dilution and broth micro-dilution test

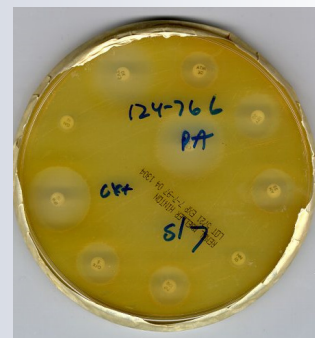
- Tube-dilution and broth micro-dilution test
 - dilutions of antibiotics are added to individual tube or plastic wells containing a liquid growth medium and then inoculated with the bacterial suspension.
 - The lowest concentration of antimicrobial which prevents growth represents the MIC (minimum inhibitory concentration)



Disk diffusion test (Kirby-Bauer procedure)

- a standardized bacterial inoculum is applied onto the entire surface of an agar plate. Then, paper discs impregnated with antibiotics are placed on the surface of the agar.
- The width of the inhibition zone on the plate gives an indication of the sensitivity of the bacteria to the agents being tested

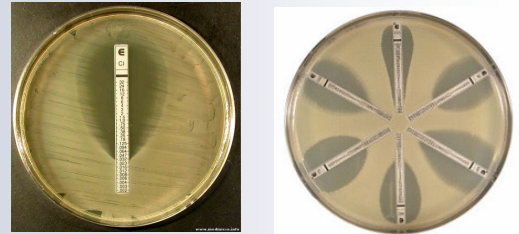
Disk diffusion



E-test

- A reagent strip is placed onto the surface of an inoculated agar plate and a continuous antibiotic gradient is formed under the strip.
- The resulting inhibition ellipse on the plate intersects the scale of the reagent strip at the MIC value

E-test



Svantaggi

- only culturable bacteria can be tested
- results are dependent to the physiological state of the cultures

Alternative

- ibridazione
 - Based on the specific recognition and annealing of a DNA fragment to its complement sequence
 - Single-stranded probes marked with a fluorescent, chemiluminescent or radioactive molecule are employed
 - routinely carried out in studies aimed to the plasmidic/genomic localization of AR genes
- Disadvantages:
 - needs large quantities of DNA
 - time-consuming

Alternative

- PCR
 - A number of primer pairs (designed on specific target regions) are available for the amplification of nearly all known AR genes

Primer pair	Specificity	Sequence (5'-3')	Amplified area (bp)	Reference for primers
isaB-1	isaB	GTGGACAAGGTGACACAGAG	406	1
isaB-2	isaB	CGGTAAGTGTGTCACAGC	406	1
isaD-1	isaD	AACCTAGGCATCTGGCTCAC	313	1
isaD-2	isaD	CTCAGCTCCAGCAATATGAGTA	313	1
isaK-1	isaK	TGGATAGGACAGCGAGTA	189	1
isaK-2	isaK	CAGCAATCTCTACTCTT	189	1
isaA-1	isaA	TGTAAAAGGATGTAAAAGAA	641	2
isaA-2	isaA	CTCTGAGGTTTAAATATGAG	641	2
isaB-1	isaB	GAAAAGGTACTCAACCAATA	619	2
isaB-2	isaB	MTGAGGAGTACTAATATGTTTAC	619	2
isaC-1	isaC	CTAAAACATATATAGATATA	612	2
isaC-2	isaC	GCTAATATGTTTAAATGTCAAT	612	2
A1	isaA	GGGAAAAGGCAATTC	712	3
A2	isaA	GTACAGTGGGGGTTA	712	3
B1	isaB	ATGGGAAGGATATGTC	615	4
B2	isaB	GATTTGTTCTGAGGTC	615	4
isa-1	isa1	GAGCATAAAGGGATACCAAAATC	489	4
isa-2	isa2	CCCTGCATTGCTTAAAAACTGG	489	4
isa2-1	isa2	ACTTCAGACATGCTGCTTTC	173	5
isa2-2	isa2	TGACACTTTTATAGGAAAGC	173	5
isa3-1	isa3	GGGATCATAGGTCATTATC	436	6
isa3-2	isa3	AACGATTTGGACGATAGC	436	6

1. Ng et al., 2001. *Mol. Cell. Probes* 15:209-215.
 2. Saito et al., 1996. *Antonie van Leeuwenhoek* 69:2502-2506.
 3. Datta-Mercier et al., 1995. *J. Clin. Microbiol.* 33:24-27.
 4. Kim et al., 2000. *Antonie van Leeuwenhoek* 74:2676-2679.
 5. Mouton et al., 2000. *J. Clin. Microbiol.* 38:572-576.
 6. Pridel et al., 1991. *Antonie van Leeuwenhoek* 55:2568-2573.

Alternative

- DNA array (It is based on the principle of hybridisation)
 - a collection of probes (up to some hundreds) is bound to a solid surface like glass or silicon
 - DNA probes can be cDNA, PCR products or synthetic oligonucleotides
 - the length of the probes is variable and depends on the type of probe and on the specificity of the assay
 - DNA array technology allows the screening of several sequences at the same time → it is useful to study the occurrence and/or the expression of many different genes
 - microarray for the detection of up to 90 AR genes (Perreten *et al.*, 2005, *J Clin Microbiol.* 43:2291-2302)

Buone pratiche a portata del cittadino

Buone pratiche a portata del cittadino

- Consigli pratici per limitare il rischio alimentare

Nel punto vendita

- Controllare sempre l'etichetta dei prodotti
- Controllare sempre sull'etichetta la data di scadenza del prodotto
- Controllare sempre che la confezione dei prodotti acquistati sia in buono stato. Per gli alimenti inscatolati, scegliere solo alimenti in lattine integre e non danneggiate verificando il buono stato della lattina dopo lo svuotamento.
- Acquistare preferibilmente alimenti di origine vegetale di stagione.
- Acquistare preferibilmente alimenti prodotti in Italia o nel resto d'Europa: sono i più controllati.
- Alla cassa, dividere i prodotti in diverse borse: una per la frutta e la verdura, una per la carne o il pesce e una per il resto della spesa

Buone pratiche a portata del cittadino

A casa

- Conservazione dei prodotti alimentari
 - Mantenere gli alimenti che possono essere conservati a temperatura ambiente nelle loro confezioni intatte e conservarli in luogo fresco e asciutto.
 - Ridurre al minimo l'interruzione della catena del freddo durante la conservazione di un alimento.
 - Conservare i cibi che devono essere mantenuti a una temperatura inferiore a 5 °C in frigorifero o in freezer (-18 °C).
- Evitare di scongelare un cibo e poi ricongelarlo
- Scongelare sempre gli alimenti in frigorifero (dopo averli posti in un contenitore che raccolga l'acqua)
- Evitare di scongelare un alimento in acqua calda o a temperatura ambiente, perché potrebbero svilupparsi microrganismi

Buone pratiche a portata del cittadino

- Raffreddare velocemente i cibi cotti, perché durante la fase di raffreddamento possono svilupparsi microrganismi o tossine
- Per evitare lo sviluppo di microrganismi è importante mantenere i cibi cotti a una temperatura maggiore di 60°C e quelli freschi a una temperatura inferiore a 5°C
- Organizzare in modo ordinato il frigorifero e il freezer, disponendo i prodotti negli appositi contenitori richiudibili:
 - conservare le uova nel proprio contenitore;
 - conservare la carne in frigorifero per un massimo di 2 o 3 giorni;
 - conservare pesce e altri prodotti ittici in frigorifero fino alla preparazione, per un massimo di 1 giorno, riposti in contenitori richiudibili;
 - conservare latte, latticini, formaggi e salumi in frigorifero fino all'utilizzo e non oltre la data di scadenza.

Buone pratiche a portata del cittadino

A casa

- **Lavaggio**
 - Lavare sempre i prodotti di origine vegetale almeno 3 volte con acqua abbondante (eventualmente si può aggiungere un w cucchiaino di bicarbonato di sodio per litro di acqua al primo lavaggio).
- **Cottura**
 - La cottura facilita la conservazione dei cibi perché può limitare la crescita microbica o eliminare i microrganismi presenti nell'alimento.
 - Ogni alimento deve essere cucinato a determinate temperature, al di sotto delle quali c'è il rischio che gli eventuali microrganismi sviluppino tossine.
 - Per una cottura efficace, le temperature indicate dovrebbero raggiungere il cuore del prodotto (esistono appositi termometri da cucina) es. Bistecca, carne di maiale, agnello, manzo 63 °C, Pesce e frutti di mare 63 °C, Hamburger, carne macinata (eccetto pollo) e uova 71 °C, Carne di pollo 82 °C.
 - Quando non si ha il termometro, si possono seguire alcune precauzioni:
 - il pesce deve avere la parte più spessa opaca e, al contatto con la forchetta, deve sfaldarsi;
 - le uova devono essere cotte finché sia l'albume sia il tuorlo risultino solidi;
 - i gamberetti devono essere cotti a fuoco lento per 3-5 minuti, fino a che il guscio non diventi rosso;
 - i molluschi devono cuocere finché il loro guscio non si è aperto e da quel momento per ulteriori 5 minuti.

Buone pratiche a portata del cittadino

A casa

■ Preparazione delle conserve

- Nella preparazione delle conserve casalinghe bisogna evitare lo sviluppo di un microrganismo, il *Clostridium botulinum*, ed eliminare la tossina da esso prodotta. Tale microrganismo, in grado di crescere in alimenti non acidi (pH maggiore di 4.5), è stato trovato più frequentemente nei seguenti alimenti: mais, peperoni, fagiolini, melanzane, barbabietole, funghi, spinaci, tonno, paté, affettati confezionati sottovuoto e pesce conservato.
- a livello domestico i rischi sono più elevati, anche perché la contaminazione può non essere visibile a occhio nudo.
- → osservare in modo molto scrupoloso la pulizia e l'igiene durante le fasi di preparazione e conservazione del prodotto ed effettuare un adeguato processo di cottura
- Il contenuto di sale, o l'impiego di correttivi di acidità aiutano a limitare lo sviluppo del microrganismo e, quindi, anche la produzione di tossina

Buone pratiche a portata del cittadino

- A casa
- Pulizia Per preparare un cibo sano la pulizia è fondamentale e indispensabile.
- regole per evitare la diffusione di microrganismi nel cibo che consumiamo.
 - Lavarsi le mani, nel modo più accurato possibile: prima di iniziare a cucinare o a mangiare; prima di toccare il cibo che verrà consumato crudo; dopo aver toccato carne, pesce, pollo e verdure crude; dopo aver toccato i piatti sporchi; dopo aver toccato il bidone della spazzatura; dopo aver toccato materiale tossico; dopo aver utilizzato la toilette; dopo aver fumato, mangiato, bevuto; dopo essersi soffiati il naso.
 - Utilizzare acqua corrente potabile, per almeno 15-20 secondi, usando saponi o detersivi; asciugarsi le mani solo con salviette pulite o materiale monouso. Queste precauzioni possono sembrare eccessive, ma bisogna ricordarsi che i microrganismi hanno dimensioni non visibili a occhio nudo. Le mani possono sembrare pulite, ma conservare microrganismi, per esempio sotto le unghie. Una corretta igiene permette di liberarsi dei microrganismi coinvolti in patologie alimentari.
 - Mantenere sempre il lavandino, il fornello, il forno e il frigorifero puliti.

Buone pratiche a portata del cittadino

A casa

- Lavare sempre l'area usata per la preparazione dei cibi prima e dopo il suo utilizzo.
- Utilizzare utensili non porosi e facilmente lavabili. Preferire un tagliere in materiale plastico a uno in legno e lavarlo sempre con acqua e detersivo per le stoviglie dopo averlo utilizzato con alimenti crudi (verdure, pesce, carne ecc.) e prima di utilizzarlo per tagliare cibi pronti al consumo o cotti.
- Utilizzare sempre utensili puliti e lavarli ogni volta tra la preparazione di diversi cibi.
- Prima di aprire le scatolette pulire il coperchio e lavare l'apricatole dopo ogni utilizzo.
- Non mettere un alimento cotto e pronto al consumo in piatti o contenitori non puliti o già utilizzati per il cibo crudo.
- Lavare sempre frutta e verdura con acqua corrente potabile. Non usare saponi o detersivi ma solo uno spazzolino apposto per rimuovere le piccole incrostazioni che possono essere presenti sulla buccia.
- Pulire accuratamente le stoviglie (sciacquare abbondantemente le stoviglie prima di riporle; utilizzare stoviglie e sacchetti in materiale adatto per l'uso alimentare)

Buone pratiche a portata del cittadino

A casa

- **Altre raccomandazioni per evitare contaminazione incrociata** (i microrganismi passano da alimenti crudi o non ancora lavati ad alimenti cotti o pronti per il consumo):
 - lavare, risciacquare e pulire le superfici di taglio, tutti gli utensili e i coltelli alla fine della preparazione di un alimento o tra la preparazione di alimenti diversi;
 - non riutilizzare cucchiali o forchette usati per assaggiare i cibi;
 - conservare il cibo avanzato o in attesa di cottura in contenitori chiusi in frigorifero;
 - usare utensili puliti per miscelare e servire il cibo;
 - non far sgocciolare le carni crude su altro cibo presente nel frigorifero;
 - conservare i cibi non lavati o crudi e gli alimenti pronti al consumo in ripiani diversi del frigorifero;
 - non conservare alimenti cotti e crudi nello stesso contenitore;
 - non lasciare sul tavolo per più di 2 ore il cibo pronto;
 - riporre nel frigorifero gli avanzi dei pasti il più presto possibile e consumarli entro 1 o 2 giorni al massimo.

Altri riferimenti

- **REGOLAMENTO (CE) N. 152/2009 DELLA COMMISSIONE del 27 gennaio 2009**
- **che fissa i metodi di campionamento e d'analisi per i controlli ufficiali degli alimenti per gli animali**

Riferimenti

- <http://www.federica.unina.it/medicina-veterinaria/valutazione-nutrizionale-degli-alimenti-e-dei-sottoprodotti/analisi-chimica-degli-alimenti-di-interesse-zootecnico-i/>
- **European Food Safety Authority**
Largo N. Palli 5/A - I-43100 Parma, Italy
Tel: +39 0521 036 111, Fax: +39 0521 036 110, info@efsa.europa.eu, www.efsa.europa.eu

Riferimenti

- ECDC
http://ecdc.europa.eu/en/About_us/Key_documents/
- ISS
<http://www.iss.it/spva/docu/cont.php?id=267&lang=1&tipo=6>

Riferimenti

- controllo micotossine
- <http://www.fao.org/docrep/t1838e/T1838E0c.htm#The%20control%20of%20mycotoxins>
- http://www.arpa.emr.it/cms3/documenti/alimenti/micotossine_miraglia.pdf
- sampling e analisi
<http://www.fao.org/docrep/t1838e/T1838E0d.htm#Sampling%20and%20analysis>

Riferimenti

- AR Centro Nazionale di Referenza per l'Antibioticoresistenza <http://195.45.99.82:800/>
- LIBRI
- **Metodiche analitiche per il laboratorio di analisi degli alimenti di Cancellieri Angelo, Italia Francesco, Manzone Gaetano 1999, "**
- Analisi dei prodotti alimentari di Tateo Fernando Editore: Chiriotti Data di Pubblicazione: 1978
- Biotecnologie e chimica analitica. Carunchio V, ed. Roma: Aracne Editrice; 2001