

MINISTERO DELLA SANITÀ

DECRETO 31 luglio 1995.

Metodiche di analisi per la determinazione dei coliformi fecali, di Escherichia coli, delle salmonelle, delle biotossine algali PSP (Paralytic Shellfish Poison), delle tossine DSP (Diarrhetic Shellfish Poisoa), del mercurio e del piombo nei molluschi bivalvi.

IL MINISTRO DELLA SANITÀ

Visto il decreto legislativo 30 dicembre 1992, n. 530, recante attuazione della direttiva 91/492/CEE che stabilisce le norme sanitarie applicabili alla produzione e commercializzazione dei molluschi bivalvi vivi;

Visto il decreto legge 21 luglio 1995, n. 294;

Visti i pareri favorevoli del Consiglio superiore di sanità in data 21 settembre 1993 e 12 aprile 1995;

Decreta:

Art. 1.

1. Sono approvate le metodiche di analisi allegate al presente decreto concernenti la determinazione dei coliformi fecali, di Escherichia coli, delle salmonelle, delle biotossine algali PSP (Paralytic Shellfish Poison), delle tossine DSP (Diarrhetic Shellfish Poison), del mercurio e del piombo nei molluschi bivalvi.

2. Il presente decreto sarà pubblicato nella *Gazzetta Ufficiale* della Repubblica italiana.

Roma, 31 luglio 1995

Il Ministro: GUZZANTI

*Registrato alla Corte dei conti il 30 ottobre 1995
Registro n. 1 Sanità, foglio n. 349*

ALLEGATO 1

METODICHE DI ANALISI

A) Determinazione dei coliformi fecali

I campioni prelevati da sottoporre ad analisi devono essere costituiti da 50-200 invertebrati per aliquota, con criterio inverso alla dimensione delle varie specie.

I molluschi, al momento del controllo, vengono isolati, spazzolati in modo da togliere il fango, le incrostazioni, nonché epifiti, epizoi, ecc., eventualmente presenti, lavati con acqua clorata (circa 20 ppm) raffreddata con ghiaccio, sciacquati con acqua distillata sterile.

Ogni singolo mollusco viene aperto con idoneo utensile sterile ed il contenuto (corpo e liquido intervalvare) viene lasciato cadere in un recipiente sterile.

Preparare un omogeneizzato con un minimo di 10 individui, ed accantonarne una quantità compresa tra 50 e 100 g complessivi.

Preparare quindi le seguenti diluizioni dal precedente omogeneizzato:

diluizione A: 10 g di omogeneizzato + 90 g di sol. fisiologica sterile equivalenti a 0,1 g camp./g;

diluizione B: 1 ml di diluizione A + 9 ml di sol. fisiologica sterile equivalenti a 0,01 g camp./g;

diluizione C: 1 ml di diluizione B + 9 ml di sol. fisiologica sterile equivalenti a 0,001 g camp./g.

Seminare le diluizioni di cui sopra secondo il seguente schema:

1 ml 1 diluizione A per provetta, in 5 provette contenenti 9 ml di brodo A1 ciascuna;

1 ml 1 diluizione B per provetta, in 5 provette contenenti 9 ml di brodo A1 ciascuna;

1 ml 1 diluizione C per provetta, in 5 provette contenenti 9 ml di brodo A1 ciascuna.

In caso di molluschi presumibilmente poco contaminati, al fine di una maggiore accuratezza nella valutazione dei risultati, si suggerisce la semina diretta di 1 g di omogeneizzato e delle successive diluizioni A e B. In tal caso i valori riportati in tabella 1 dovranno essere divisi per un fattore 10.

Le provette, una volta inoculate, vanno incubate a $37 \pm 0,5$ °C per 3 ore (rivitalizzazione dei germi stressati) e quindi poste a $44 \pm 0,1$ °C.

Tutte le provette in cui si siano formati, dopo 24 ore di incubazione complessiva, torbidità e una qualsiasi quantità di gas sono considerate positive per coliformi fecali e debbono essere sottoposte alla determinazione successiva. In base al numero delle provette positive si risale al numero più probabile di coliformi fecali/100 g di molluschi applicando la tabella 1.

5) Determinazione di *Escherichia coli*

Dalle provette di brodo A1 risultate positive per la ricerca di coliformi fecali, seminare 0,1 ml della brodocoltura in una provetta contenente 10 ml di acqua triptonata.

Incubare a 44 °C per 24 ore.

La ricerca di *Escherichia coli* risulterà positiva se si rileverà la formazione di indolo nelle provette contenenti acqua triptonata.

La ricerca dell'indolo viene eseguita aggiungendo a ciascuna provetta di acqua triptonata 0,5 ml di reattivo di Kovacs. La reazione è positiva se, dopo breve agitazione, si separa sulla superficie del terreno uno strato colorato di rosso ciliegia.

In base al numero delle provette positive si risale al numero più probabile di *Escherichia coli*/100 g di molluschi applicando la tabella 1.

PREPARAZIONE DEI TERRENI DI COLTURA PER LA DETERMINAZIONE DEI COLIFORMI NEI MOLLUSCHI.**Terreno di coltura A1**

Il terreno A1, che è anche commercializzato in forma disidratata, ha la seguente composizione:

| | |
|------------------|-----------------|
| Lattosio | g 5 |
| Triptone | g 20 |
| NaCl | g 5 |
| Salicina | g 0,5 |
| Acqua distillata | q.b. a ml 1000. |

Dopo aver disciolto i componenti del terreno si aggiunge 1 ml di Triton X-100 e si aggiusta il pH a 6,9 ± 0,1.

Si sterilizza in autoclave a 121 °C per 10 minuti.

Il terreno può essere conservato anche per 7 mesi se mantenuto al buio ed in frigorifero.

Acqua triptonata:

| | |
|------------------|----------------|
| Triptone | g 10 |
| NaCl | g 5 |
| Acqua distillata | q.b. a ml 1000 |

Distribuire in provette e sterilizzare a 121 °C per 10 minuti.

Reattivo di Kovacs:

| | |
|---------------------------|-------|
| p-dimetilaminobenzaldeide | g 5 |
| alcool amilico | ml 75 |
| HCl concentrato | ml 25 |

Sciogliere l'aldeide nell'alcool amilico a b.m. a 50-55 °C. Raffreddare e aggiungere l'acido cloridrico. Conservare a +4 °C al buio. Il colore della soluzione al momento della preparazione è giallo tendente al bruno.

Nota

La ricerca dei coliformi nei molluschi bivalvi può essere effettuata mediante la prova del Numero Più Probabile o mediante qualsiasi altro procedimento batteriologico che presenti lo stesso grado di precisione.

TABELLA MPN

TABELLA 1

| Numero dei tubi positivi | | | Indice MPN per 100 g |
|---------------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|-------------------------|
| 5x1 g dil. A (0,1g campione) | 5x1 g dil. B (0,01g campione) | 5x1 g dil. C (0,001g campione) | |
| 0 | 0 | 1 | 200 |
| 0 | 1 | 0 | 200 |
| 0 | 2 | 0 | 400 |
| 1 | 0 | 0 | 200 |
| 1 | 0 | 1 | 400 |
| 1 | 1 | 0 | 400 |
| 1 | 1 | 1 | 600 |
| 1 | 2 | 0 | 600 |
| 2 | 0 | 0 | 500 |
| 2 | 0 | 1 | 700 |
| 2 | 1 | 0 | 700 |
| 2 | 1 | 1 | 900 |
| 2 | 2 | 0 | 900 |
| 2 | 3 | 0 | 1200 |
| 3 | 0 | 0 | 900 |
| 3 | 0 | 1 | 1100 |
| 3 | 1 | 0 | 1100 |
| 3 | 1 | 1 | 1400 |
| 3 | 2 | 0 | 1400 |
| 3 | 2 | 1 | 1700 |
| 3 | 3 | 0 | 1700 |
| 4 | 0 | 0 | 1300 |
| 4 | 0 | 1 | 1700 |
| 4 | 1 | 0 | 1700 |
| 4 | 1 | 1 | 2100 |
| 4 | 1 | 2 | 2600 |
| 4 | 2 | 0 | 2200 |
| 4 | 2 | 1 | 2600 |
| 4 | 3 | 0 | 2700 |
| 4 | 3 | 1 | 3300 |
| 4 | 4 | 0 | 3400 |
| 5 | 0 | 0 | 2300 |
| 5 | 0 | 1 | 3100 |
| 5 | 0 | 2 | 4300 |
| 5 | 1 | 0 | 3300 |
| 5 | 1 | 1 | 4600 |
| 5 | 1 | 2 | 6300 |
| 5 | 2 | 0 | 4900 |
| 5 | 2 | 1 | 7000 |
| 5 | 2 | 2 | 9400 |
| 5 | 3 | 0 | 7900 |
| 5 | 3 | 1 | 10900 |
| 5 | 3 | 2 | 14100 |
| 5 | 3 | 3 | 17500 |
| 5 | 4 | 0 | 13000 |
| 5 | 4 | 1 | 17200 |
| 5 | 4 | 2 | 22100 |
| 5 | 4 | 3 | 27800 |
| 5 | 4 | 4 | 34500 |
| 5 | 5 | 0 | 24000 |
| 5 | 5 | 1 | 34800 |
| 5 | 5 | 2 | 54200 |
| 5 | 5 | 3 | 91800 |
| 5 | 5 | 4 | 160900 |

C) Determinazione delle salmonelle con metodo rapido**1. MSR/V (Modified Semi-solid Rappaport-Vassiliadis Medium)**

Con tale sistema vengono individuate solo le salmonelle mobili, le quali sono comunque la maggioranza (oltre il 99%).

Modalità di esecuzione:

- prelevare 25 g di polpa e liquido intervalvare di mollusco, omogeneizzare in 225 ml di acqua peptonata tamponata. Incubare a 37 °C per 20 ore (fase di prearricchimento).

Procedere all'arricchimento selettivo direttamente in piastre di MSR/V secondo la seguente procedura:

- depositare tre gocce (0,1 ml circa) della coltura di prearricchimento in punti separati (e lontani tra loro) della superficie di una piastra di terreno MSR/V senza spatolare (effettuare 2 repliche),
- incubare, senza rovesciare la piastra, a 42 °C per 20-24 ore,
- osservare, intorno ai punti di deposizione delle gocce eventuali aloni di crescita (il colore azzurro del terreno appare leggermente rischiarato): essi sono dovuti a batteri mobili che si riproducono bene nel terreno; gli aloni dovuti a sviluppo di salmonelle sono di grandi dimensioni e spesso intercettano il bordo della piastra. La semplice osservazione di un tale alone conferisce alla prova una presuntività di presenza di salmonelle, mentre l'assenza di aloni o la presenza di aloni molto ristretti ($\varnothing < 1,5$ cm) permette di escludere la presenza di salmonelle mobili,
- in caso di positività, procedere comunque ad un accertamento preliminare rapido sul materiale più esterno dell'alone mediante il test di agglutinazione al lattice con sieri anti-H,
- lo stesso materiale più esterno dell'alone può essere prelevato per le subcolture destinate alle prove di identificazione.

Terreno di coltura MSR/V:

| | |
|--------------------------------|-----------------|
| Triptosio | g 4,59 |
| Idrolizzato di caseina (acido) | g 4,59 |
| Cloruro di sodio | g 7,34 |
| Potassio fosfato monobasico | g 1,47 |
| Cloruro di magnesio (anidro) | g 10,93 |
| Verde malachite ossalato | g 0,037 |
| Agar | g 2,7 |
| Acqua distillata | q.b. a ml 1,000 |
| pH | 5,2 ± 0,2 |

La ricerca delle salmonelle può essere effettuata anche utilizzando altri metodi rapidi equipollenti, reperibili in commercio, che presentino lo stesso grado di precisione.

D) Determinazione delle biotossine algali PSP (Paralytic Shellfish Poison)

1. PRINCIPIO

1.1 Il metodo si basa sulla inoculazione intraperitoneale di un estratto di molluschi in topi adulti. La presenza di tossina PSP provoca la morte degli animali.

2. MATERIALI

2.1 Si utilizzano topi albinici di razza Swiss di peso compreso fra i 19 e 21 g. Se il peso è >21 o <19 si applica il fattore di correzione del peso. Non si possono utilizzare topi con peso >23 g e topi già usati.

3. PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

3.1 I molluschi da analizzare vengono puliti esternamente lavandoli con acqua. Si aprono tagliando i muscoli adduttori e si rimuovono i tessuti molli (polpa) del mollusco dalla conchiglia. Non si debbono usare né calore né anestetici prima di aprire il mollusco e bisogna evitare di danneggiare o tagliarne il corpo.

3.2 Circa 100-150 g di polpa vengono trasferiti su una retina di plastica, dove vengono lasciati scolare per 5'.

3.3 Si omogeneizza il campione in frullatore elettrico.

4. ESTRAZIONE DEL CAMPIONE

4.1 Si pesano 100 g di materiale omogeneizzato.

4.2 Si aggiungono 100 ml di HCl 0,25 N, si agita e si verifica che il pH non sia compreso fra 2 e 2,5.

4.3 La miscela viene portata ad ebollizione e si lascia bollire lentamente per 5'.

4.4 Si lascia raffreddare a temperatura ambiente e si verifica nuovamente il valore del pH che deve essere compreso fra 2 e 2,5. Per abbassarlo si aggiunge HCl 5 N, agitando fino ad ottenere il valore del pH voluto. Per alzare il pH si aggiunge alla miscela NaOH 0,1 N lasciandola cadere a gocce ed agitando costantemente per prevenire una alcalinizzazione locale e di conseguenza la distruzione della tossina.

4.5 Si trasferisce la miscela in un cilindro graduato da 200 ml e si porta a volume con acqua.

4.6 Si centrifuga la miscela a 3000 r.p.m. per 5'.

4.7 Il sopranatante viene trasferito in una beuta e si controlla di nuovo il pH.

5. INOCULAZIONE DEGLI ANIMALI

5.1 Si inocula nel peritoneo di ciascun topo test 1 ml di estratto acido.

5.2 Si annota con un cronometro il tempo all'inizio della inoculazione e si osserva attentamente il topo per stabilire il tempo di morte indicato dall'ultimo respiro.

5.3 Si può usare per l'iniziale determinazione un topo solo, ma è preferibile usarne 2 o 3.

5.4 Se il tempo di morte o la mediana dei tempi di morte dei topi è <5 minuti si fa una diluizione per ottenere un tempo di morte compreso tra 5 e 7 minuti.

5.5 Se il tempo di morte di 1 o 2 topi a cui è stato iniettato l'estratto non diluito risulta >7 minuti, tre o più topi devono essere inoculati per stabilire la tossicità del campione.

5.6 Se è necessaria una elevata diluizione, si aggiusta il pH della soluzione aggiungendo gocce di HCl (0,1 o 0,01 N) per portare il pH ad un valore tra 2 e 2,5.

5.7 Si inoculano tre topi con la diluizione che dà un tempo di morte di 5-7 minuti.

6. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

6.1 Si determina il tempo mediano di morte dei topi tenendo presente anche quelli sopravvissuti e tramite la tabella 2 si determinano i corrispondenti valori di unità topo.

6.2 Se il peso degli animali è <19 g o >21 g si opera una correzione per ciascun topo moltiplicando le unità topo corrispondenti al tempo di morte per il fattore di correzione del peso per quel topo ricavato in base alla tabella 3 ed infine si sceglie il valore mediano delle unità topo corrette per gruppo (considerare il tempo di morte dei sopravvissuti come >60 minuti o equivalente a <0,875 U.T. nel calcolo della mediana).

6.3 Si convertono le U.T. in μg di tossina/ml moltiplicandole per il valore del fattore di conversione (C.F.). Quest'ultimo è dato dal rapporto tra μg di tossina PSP della soluzione di riferimento inoculata in peritoneo e l'U.T. corretta:

μg di tossina/100 g di polpa = ($\mu\text{g}/\text{ml}$) x fattore di diluizione x 200.

7. STANDARDIZZAZIONE DEL METODO BIOLOGICO

7.1 Preparare una soluzione standard di lavoro di PSP, utilizzando una soluzione madre USA, fino ad ottenere una concentrazione di 1 $\mu\text{g/ml}$. Si ottiene portando 1 ml di soluzione standard madre a 100 ml con acqua distillata. Questa soluzione è stabile numerose settimane a 3-4 °C.

7.2 Calcolo del valore del C.F. (fattore di conversione).

7.2.1 Si diluiscono aliquote di 10 ml di soluzione standard di lavoro (1 $\mu\text{g/ml}$) con 10-15-20-25-30 ml di H₂O. Il pH delle diluizioni deve essere compreso fra 2 e 4 e non deve mai superare 4,5.

7.2.2 Viene scelta quella diluizione che iniettata in tre o più topi per via intraperitoneale alla dose di 1 ml determina la morte degli animali in un tempo mediano di 5-7 minuti.

7.2.3 La diluizione scelta viene provata con variazioni di +1 ml di H₂O (ad esempio se 10 ml di standard diluiti con 25 ml di H₂O uccidono i topi in 5-7 minuti, si provano soluzioni diluite 10 + 24 e 10 + 26). Si inietta un gruppo di topi con 1 ml di ciascuna delle 2 o 3 diluizioni che determinano la morte nel tempo mediano di 5-7 minuti.

7.2.4 Si inietta una dose di 1 ml a ciascun topo per via intraperitoneale e si determina il tempo di morte corrispondente al tempo trascorso fra l'esecuzione della iniezione e l'ultimo respiro del topo.

7.2.5 Si ripete la prova 1 o 2 giorni più tardi usando le diluizioni preparate come sopra descritto, che differiscono per variazioni di + 1 ml di H₂O rispetto alla diluizione usata.

7.2.6 Si ripete poi l'intero test partendo con nuove diluizioni ottenute dalla soluzione standard di lavoro (1 $\mu\text{g/ml}$) preparata fresca prima dell'uso.

7.2.7 Si calcola il tempo mediano di morte per ciascun gruppo di 10 topi utilizzati e per ciascuna delle diluizioni preparate. Se tutti i gruppi di 10 topi iniettati con qualunque diluizione danno tempi mediani di morte <5 o >7 minuti non si tiene conto dei risultati di questa diluizione nei calcoli successivi. D'altra parte, se anche per uno solo dei gruppi di 10 topi iniettati con una qualsiasi diluizione si verifica un tempo mediano di morte compreso tra 5 e 7, minuti si includono nei calcoli tutti i gruppi di 10 topi usati con questa diluizione, anche se alcuni dei tempi mediani di morte sono <5 o >7 minuti.

7.2.8 Dal tempo mediano di morte per ciascun gruppo di 10 topi di ciascuna delle diluizioni selezionate si determina il tempo mediano di U.T./ml tramite la tabella 2.

7.2.9 Si dividono i μg di tossina calcolati per 1 ml per le U.T./ml al fine di ottenere il fattore di conversione (C.F.) il quale esprime i μg di tossina equivalenti ad 1 U.T.

7.2.10 Si calcola il valore medio del C.F. e si usa tale valore come punto di riferimento per controllare le prove di routine.

7.2.11 I valori di C.F. possono variare in modo significativo nell'ambito dello stesso laboratorio se le tecniche e i topi non sono rigidamente controllati.

8. USO DELLO STANDARD PER PROVE DI ROUTINE SUI MOLLUSCHI

8.1 Si controlla periodicamente il valore del C.F.

8.1.1 Se i molluschi sono analizzati meno di una volta a settimana, si determina il valore del C.F. in ciascun giorno in cui sono effettuate le prove, iniettando 5 topi con opportune diluizioni dello standard di lavoro.

8.1.2 Se le prove vengono effettuate in giorni diversi nell'ambito di una settimana, è necessario fare soltanto un controllo settimanale con diluizioni di standard tali che il tempo mediano di morte risulti compreso tra 5 e 7 minuti. Il valore del C.F. così determinato dovrebbe essere compreso nel valore medio del C.F. $\pm 20\%$.

8.1.3 Se il controllo non cade in questo ambito, si completa un gruppo di 10 topi (aggiungendone 5 ai 5 già iniettati) e si inocula un secondo gruppo di 10 topi con la stessa diluizione di standard.

8.1.4 Si media il valore del C.F. per il secondo gruppo con quello del primo e si prende il risultato come nuovo valore di C.F. Variazioni del C.F. $>20\%$ rappresentano una significativa modificazione della risposta dei topi alla tossina o alle tecniche di laboratorio. Modificazioni di questo tipo richiedono un cambiamento del valore del C.F.

8.1.5 Controlli ripetuti del valore di C.F. di solito conducono a risultati compresi in una variazione del $\pm 20\%$. Se si riscontrano frequentemente variazioni più ampie sarebbe opportuno procedere ad un controllo di tutta la tecnica prima di continuare con le normali prove di routine.

DETERMINAZIONE TOSSINE IDROSOLUBILI - P.S.P. TABELLA 2

| Tempo di morte (minuti) | U.T. | Tempo di morte (minuti) | U.T. |
|----------------------------|------|----------------------------|-------|
| 1:00 | 100 | 5:00 | 1,92 |
| 10 | 66,2 | 05 | 1,89 |
| 15 | 38,3 | 10 | 1,86 |
| 20 | 26,4 | 15 | 1,83 |
| 25 | 20,7 | 20 | 1,80 |
| 30 | 16,5 | 30 | 1,74 |
| 35 | 13,9 | 40 | 1,69 |
| 40 | 11,9 | 45 | 1,67 |
| 45 | 10,4 | 50 | 1,64 |
| 50 | 9,33 | | |
| 55 | 8,42 | 6:00 | 1,60 |
| | | 15 | 1,54 |
| 2:00 | 7,67 | 30 | 1,48 |
| 05 | 7,04 | 45 | 1,43 |
| 10 | 6,52 | | |
| 15 | 6,06 | 7:00 | 1,39 |
| 20 | 5,66 | 15 | 1,35 |
| 25 | 5,32 | 30 | 1,31 |
| 30 | 5,00 | 45 | 1,28 |
| 35 | 4,73 | | |
| 40 | 4,48 | 8:00 | 1,25 |
| 45 | 4,26 | 15 | 1,22 |
| 50 | 4,06 | 30 | 1,20 |
| 55 | 3,88 | 45 | 1,18 |
| | | | |
| 3:00 | 3,70 | 9:00 | 1,16 |
| 05 | 3,57 | 30 | 1,13 |
| 10 | 3,43 | | |
| 15 | 3,31 | 10:00 | 1,11 |
| 20 | 3,19 | 30 | 1,09 |
| 25 | 3,08 | | |
| 30 | 2,98 | 11:00 | 1,075 |
| 35 | 2,28 | 30 | 1,06 |
| 40 | 2,79 | | |
| 45 | 2,71 | 12:00 | 1,05 |
| 50 | 2,63 | | |
| 55 | 2,56 | 13 | 1,03 |
| | | 14 | 1,015 |
| 4:00 | 2,50 | 15 | 1,000 |
| 05 | 2,44 | 16 | 0,99 |
| 10 | 2,38 | 17 | 0,98 |
| 15 | 2,32 | 18 | 0,972 |
| 20 | 2,26 | 19 | 0,965 |
| 25 | 2,21 | 20 | 0,96 |
| 30 | 2,16 | 21 | 0,954 |
| 35 | 2,12 | 22 | 0,948 |
| 40 | 2,08 | 23 | 0,942 |
| 45 | 2,04 | 24 | 0,937 |
| 50 | 2,00 | 25 | 0,934 |
| 55 | 1,96 | 30 | 0,917 |
| | | 40 | 0,898 |
| | | 60 | 0,875 |

TABELLA 3

DETERMINAZIONE TOSSINE IDROSOLUBILI - P.S.P.

| Fattori di correzione del peso | |
|--------------------------------|------------|
| Peso del topo (g) | Unità topo |
| 10 | 0,50 |
| 10,5 | 0,53 |
| 11 | 0,56 |
| 11,5 | 0,59 |
| 12 | 0,62 |
| 12,5 | 0,65 |
| 13 | 0,675 |
| 13,5 | 0,70 |
| 14 | 0,73 |
| 14,5 | 0,76 |
| 15 | 0,785 |
| 15,5 | 0,81 |
| 16 | 0,84 |
| 16,5 | 0,86 |
| 17 | 0,88 |
| 17,5 | 0,905 |
| 18 | 0,93 |
| 18,5 | 0,95 |
| 19 | 0,97 |
| 19,5 | 0,985 |
| 20 | 1,000 |
| 20,5 | 1,015 |
| 21 | 1,03 |
| 21,5 | 1,04 |
| 22 | 1,05 |
| 22,5 | 1,06 |
| 23 | 1,07 |

E) Determinazione delle tossine DSP (Diarrhetic Shellfish Poison)

1. PRINCIPIO

1.1 Il metodo si basa sulla inoculazione intraperitoneale dell'estratto dell'epatopancreas di molluschi in topi adulti. La presenza di tossina DSP provoca negli animali malessere generale e morte.

2. MATERIALI

2.1 Si utilizzano topi albini di razza Swiss del peso di 18-20 g.

2.2 Introdurre gli animali nelle strutture di stabulazione nelle stesse condizioni ambientali in cui si svolgerà il saggio per almeno cinque giorni prima dello stesso.

3. ESTRAZIONE DELLA TOSSINA

3.1 Pulire esternamente con acqua una quantità opportuna di molluschi, prelevare g 25 di epatopancreas e trasferirli su una retina di plastica dove vengono lasciati sgocciolare per 5 minuti.

3.2 Omogeneizzare gli epatopancreas con omogeneizzatore a cavitazione; pesare g 20 di omogeneizzato ed estrarli con ml 100 di acetone mantenendoli per 2 minuti a temperatura ambiente.

3.3 Filtrare per carta da filtro comune.

3.4 Riprendere il residuo rimasto sul filtro e ripetere le operazioni descritte nei punti 3.2 e 3.3 per altre due volte, estraendo con 50 ml di acetone ogni volta.

3.5 Riunire i tre estratti e far evaporare l'acetone in evaporatore rotante a 30-40 °C. Non è necessario eliminare anche l'acqua residua.

3.6 Risospendere il residuo in ml 10-15 di acqua distillata.

3.7 Estrarre la sospensione acquosa con ml 50 di etere etilico. Nel caso si formi, all'interfaccia delle due fasi, un'emulsione non risolubile, questa va separata, addizionata con 10 ml di acqua e riestratta con 25 ml di etere; l'eventuale ulteriore emulsione viene eliminata. Riunire le fasi eterree.

3.8 Ripetere l'operazione del punto 3.7 per due volte lavando con piccole quantità di acqua; riunire gli estratti eterrei ed evaporare.

3.9 Sospendere il residuo in ml 4 di Tween 60 all'1%. Curare la formazione di un'emulsione omogenea e senza grumi, eventualmente con l'uso di ultrasuoni.

4. INOCULAZIONE DEGLI ANIMALI

4.1 Pesare i topi ed annotare il peso di ciascuno, indi inoculare intraperitoneo tre topi con 1 ml della sospensione dell'estratto.

4.2 Tenere gli animali in osservazione per 6 ore, controllando il loro stato ogni 15 minuti. Assumere come tempo di sopravvivenza l'intervallo tra l'inoculazione e l'ultimo controllo in cui risultavano vivi.

5. INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

5.1 Correggere in funzione del peso dei singoli topi i relativi tempi di sopravvivenza osservati, moltiplicandoli per i fattori di correzione riportati nella tabella 4.

5.2 Se almeno due topi hanno un tempo di sopravvivenza inferiore alle 5 ore il saggio risulta positivo.

5.3 Se almeno due topi hanno un tempo di sopravvivenza superiore alle 5 ore il saggio risulta negativo.

5.4 Se si verifica quanto previsto al punto 5.3, ma il terzo topo ha un tempo di sopravvivenza inferiore alle 3 ore, il saggio viene ripetuto su 4 topi, aumentando in proporzione la quantità di epatopancreas di partenza ed il volume della soluzione di Tween. Si determina la mediana dei sette tempi di sopravvivenza registrati complessivamente: se questa è inferiore alle 5 ore il saggio si considera positivo.

TABELLA 4

FATTORI DI CORREZIONE

| Peso del topo (g) | Fattore |
|----------------------|---------|
| 18,0 | 1,14 |
| 18,5 | 1,10 |
| 19,0 | 1,06 |
| 19,5 | 1,03 |
| 20,0 | 1,00 |

F) Metodo di analisi per la determinazione del mercurio nei molluschi bivalvi (Decisione 90/515/CEE della Commissione del 26 settembre 1990)

1. OGGETTO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Il metodo di analisi consente la determinazione del contenuto totale di mercurio nei molluschi.

2. PRINCIPIO

Il campione è mineralizzato con miscela solfonitrica; lo ione mercurio è ridotto allo stato metallico con cloruro stannoso ed estratto dalla soluzione in corrente di aria. I vapori di mercurio sono convogliati in cella cilindrica con finestra di quarzo posta nel cammino ottico di uno spettrofotometro per assorbimento atomico e la determinazione si esegue misurando l'assorbimento alla lunghezza d'onda di 253,6 nanometri.

3. APPARECCHIATURA

3.1 Omogenizzatore ad immersione in acciaio inox

3.2 Digestore costituito da un pallone della capacità di 100 ml munito di collo smeriglio su cui è innestato un refrigerante in vetro borosilicato (fig. 1).

3.3 Dispositivo per la riduzione del mercurio e trascinarsi dei vapori, costituito da un sistema chiuso di gorgogliamento e da una pompa peristaltica per la generazione della corrente d'aria (fig. 2).

3.4 Spettrofotometro per assorbimento atomico munito di cella cilindrica con finestra di quarzo avente cammino ottico di 100 mm e diametro interno di 20 mm, e di lampada a mercurio (a scarica o a catodo cavo).

4. REATTIVI

4.1 Soluzione di riferimento contenente 1000 $\mu\text{g/ml}$ di mercurio
Diluire questa soluzione, al momento dell'uso, con acido solforico 1 N in modo da ottenere una concentrazione di 1 $\mu\text{g/ml}$ di mercurio.

4.2 Miscela solfonitrica (1:1)

Miscelare volumi uguali di acido nitrico concentrato 65% ed acido solforico concentrato 98%.

4.3 Soluzione di cloridrato di idrossilamina (concentrazione 12% p/v)

Sciogliere 12 g di cloruro di sodio e 12 g di cloridrato di idrossilamina in acqua e portare a volume di 100 ml.

4.4 Soluzione di cloruro stannoso biidrato (concentrazione 10% p/v)

Sciogliere 10 g di cloruro stannoso biidrato in acido solforico 1 N (4.5) e portare a volume di 100 ml con lo stesso acido solforico.

4.5 Soluzione di acido solforico 1 N

Diluire opportunamente acido solforico al 98% puro per analisi di metalli in tracce.

5. PROCEDIMENTO

5.1 Mineralizzazione

5.1.1 Pesare direttamente nel pallone del digestore circa 3 g (con la precisione di $\pm 0,01$ g) del campione accuratamente omogeneizzato ed aggiungere 10 ml di miscela solfonitrica (4.2). Agitare e lasciare a temperatura ambiente per circa 10 minuti e riscaldare quindi cautamente con microfiamma regolando la temperatura in modo da mantenere la soluzione solfonitrica sempre in ebollizione incipiente. Proseguire il riscaldamento fino ad ottenere una soluzione limpida. Raffreddare il pallone ed aggiungere dall'alto del refrigerante 30-40 ml di acqua. Far bollire per altri 20 minuti per l'eliminazione degli ossidi di azoto. Raffreddare, lavare il refrigerante con 20 ml di acqua distillata, trasferire in pallone tarato da 100 e portare a volume con acqua distillata.

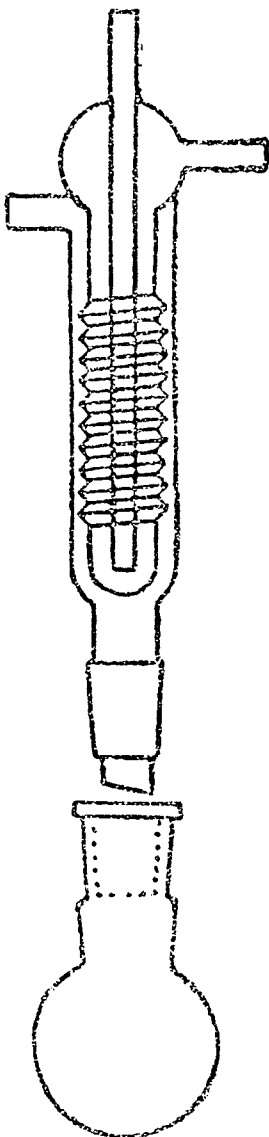


Figura 1

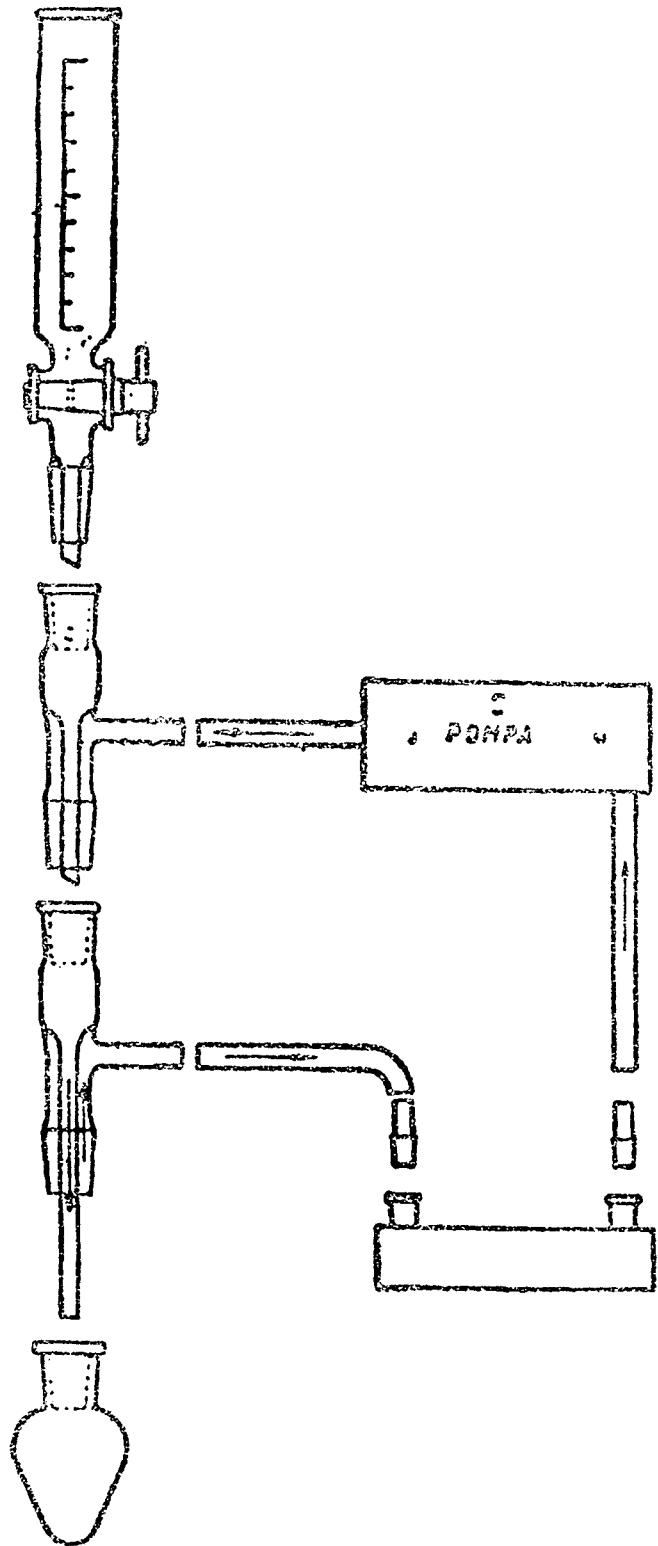


Figura 2

5.2 Determinazione quantitativa

5.2.1 Lettura spettrofotometrica

Predisporre lo strumento nelle seguenti condizioni operative:

Lunghezza d'onda: 253,6 nanometri.

Lettura: con registratore.

Trasferire 5 ml di soluzione del campione mineralizzato nella boccia di gorgogliamento. Aggiungere 0,5 ml di cloridrato di idrossilamina e collegare il palloncino al sistema di gorgogliamento. Versare dall'imbuto di carico 1 ml di cloruro stannoso ed iniziare immediatamente il gorgogliamento dell'aria. Registrare il segnale dell'assorbanza che cresce gradatamente fino ad un massimo e quindi diminuisce lentamente; effettuare la lettura in corrispondenza del massimo.

5.2.2 Curva di taratura

Trasferire in 5 palloni tarati da 100 ml, rispettivamente, 10 ml di miscela solfonitrica e 0 ml - 1 ml - 2 ml - 3 ml - 4 ml di soluzione di riferimento contenente 1 µg/ml di mercurio. Portare al volume di 100 ml con acqua distillata ciascun palloncino.

Eeguire su queste soluzioni la misura dell'assorbanza come descritto al punto 5.2.1.

Con i valori ottenuti si costruisce la curva di taratura.

5.2.3 Calcolo

Riportare sulla curva di taratura la misura dell'assorbanza eseguita al punto 5.2.1 e calcolare la concentrazione del mercurio nella soluzione. Il valore ottenuto diviso per il peso del campione prelevato (5.1.1) espresso in grammi dà il contenuto in mercurio dei molluschi espresso in microgrammi per grammo.

G) Metodo di analisi per la determinazione del piombo nei molluschi bivalvi (Decisione 90/515/CEE della Commissione del 26 settembre 1990)

1. OGGETTO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Il metodo di analisi consente la determinazione del contenuto totale di piombo nei molluschi.

2. PRINCIPIO DEL METODO

Il contenuto totale di piombo nei molluschi è determinato mediante la Spettrofotometria di assorbimento atomico, in fornello di grafite. Allo scopo di ridurre gli effetti interferenti della matrice durante la misura spettrofotometrica è utilizzato il metodo delle addizioni standards.

La mineralizzazione del campione è condotta mediante incenerimento a secco.

3. REATTIVI

3.1 Acido nitrico 65% puro per analisi, metalli in tracce

3.2 Acido cloridrico 37%

3.3 Acido nitrico 65%

3.4 Fosfato biacido di ammonio ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$)

3.5 Nitrato di magnesio ($\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$)

3.6 Modificante di matrice: sciogliere 4 g di fosfato biacido di ammonio (3.4) e 0,2 g di nitrato di magnesio (3.5) in acqua e portare a 100 ml.

3.7 Soluzione concentrata di riferimento di piombo (100 mg Pb/L): sciogliere 159,9 mg di nitrato di piombo ($\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$) in acqua in un pallone tarato da 1000 ml, aggiungere 10 ml di acido nitrico (3.1), portare al volume di 1L ed agitare. Mantenere la soluzione in bottiglia di vetro borosilicato.

3.8 Soluzione di riferimento di piombo (1 mg Pb/L): pipettare 1,0 ml della soluzione di riferimento (3.7), in un pallone tarato da 100 ml. Aggiungere 1 ml di acido nitrico (3.1) e portare al volume di 100 ml con acqua ed agitare.

3.9 Soluzione diluita di riferimento di piombo (10,0 e 20,0 μg Pb/L): pipettare 1,0 e 2,0 ml della soluzione di riferimento (3.8) in palloni tarati da 100 ml, aggiungere a ciascuno 1 ml di acido nitrico (3.1) e portare al volume di 100 ml con acqua ed agitare.

Mantenere la soluzione in bottiglia di polietilene.

Preparare le soluzioni fresche ogni giorno.

3.10 Argon ultrapuro.

4. APPARECCHIATURE, VETRERIA E MATERIALE VARIO

4.1 Omogeneizzazione

4.2 Capsule di platino a fondo piatto, o capsule di quarzo

4.3 Piastra riscaldante, termoregolabile

4.4 Forno a muffola, rivestito internamente in quarzo, con programmatore elettronico di temperatura

4.5 Bilancia analitica

4.6 Palloni tarati, capacità 100 e 1000 ml, con tappi a smeriglio in vetro

4.7 Pipette tarate, di volumi differenti (da 50 μL e 5 ml) con puntali di plastica

4.8 Bottiglie di polietilene, capacità 100 ml

4.9 Spettrofotometro ad assorbimento atomico, munito di fornace di grafite, correttore del fondo, autocampionatore con cuvette in teflon, stampante, lampade a catodo cavo per piombo, tubi di grafite pirolizzati piattforme del L'vov ecc.

Nota

Tutta la vetreria deve essere di vetro borosilicato o vetro di qualità simile. Prima dell'uso la vetreria deve essere lavata a caldo con una soluzione di acido cloridrico (3.2) 1:3

(v/v), quindi risciacquata con acqua distillata, trattata a caldo con una soluzione di acido nitrico (3.3) 1:3 (v/v), e infine risciacquate con acqua bidistillata.

La vetreria deve essere asciugata e conservata in un luogo al riparo da possibili contaminazioni. Le cuvette in teflon devono essere trattate nello stesso modo.

5. PRETRATTAMENTO DEL CAMPIONE

5.1 Campione

Il campione deve essere conservato in modo tale che la sua composizione non sia alterata per disidratazione, condensazione o alterazione.

5.2 Campione per analisi

Il campione per l'analisi deve essere rappresentativo dell'intero campione. Esso deve essere preparato rapidamente macinando 100 g di prodotto fino a completa omogeneizzazione.

6. PROCEDURA

6.1 Incenerimento a secco

2,00 g del prodotto accuratamente omogeneizzato e pesato in capsula di platino, sono sottoposti ad essiccamento e quindi a carbonizzazione su piastra riscaldante in maniera lenta e graduale al fine di evitare perdite per proiezione di matrice. Il residuo carbonioso, trasferito in muffola, viene incenerito per 8 ore alla temperatura di 400 ± 10 °C.

Dopo tale trattamento le ceneri devono risultare perfettamente bianche. Nel caso contrario il residuo, trattato con poche gocce di HNO_3 e nuovamente essiccato, viene sottoposto ad un nuovo ciclo di incenerimento per almeno 4 ore.

Le ceneri riprese con 1 ml di HNO_3 (3.1), vengono riscaldate fino a completa dissoluzione trasferite in un palloncino tarato da 50 ml e portate a volume con H_2O bidistillata.

6.2 Bianco

Condurre l'intero procedimento di mineralizzazione, omettendo la porzione del campione da analizzare.

6.3 Determinazione spettrofotometrica

6.3.1 Condizioni strumentali

La misura strumentale è eseguita mediante uno spettrofotometro di assorbimento atomico, munito di fornace di grafite ed autocampionature, gestiti da un computer completo di stampante grafica.

I parametri strumentali per il piombo sono i seguenti:

| | |
|-------------------------|---------------------|
| Misura strumentale: | Assorbanza |
| Metodi di calibrazione: | Addizioni standards |
| Modo di misura: | Area di picco |
| Fenditura (nm): | 0,7 |

Lunghezza d'onda: 283,3
 Introduzione del campione: campionatore automatico
 Tempo di misura, durante l'atomizzazione (sec.): 3
 Repliche: 3
 Correttore del fondo: inserito durante l'atomizzazione

Tubicini pirolitici di grafite con piattaforma del L'vov

Parametri del fornello di grafite

| Stadio Numero | Temperatura (°C) | Rampa | Tempo Isoterma | Flusso gas (ml/min) |
|---------------|------------------|-------|----------------|---------------------|
| 1 | 90 | 10 | 10 | 300 |
| 2 | 130 | 10 | 20 | 300 |
| 3 | 450 | 15 | 20 | 300 |
| 4 | 800 | 15 | 20 | 300 |
| 5 | 1800 | 0 | 3 | 0 |
| 6 | 2500 | 2 | 2 | 300 |
| 7 | 20 | 2 | 2 | 300 |

Parametri dell'autocampionatore

Volumi (μ L)

| | Standard (20 μ g/L Pb) | Campione | Bianco | Modifican. di matrice Mg(NO ₃) ₂ +NH ₄ H ₂ PO ₄ |
|--------------|----------------------------|----------|--------|---|
| Bianco | --- | --- | 40 | 5 |
| Campione | --- | 20 | 20 | 5 |
| 1° addizione | 10 | 20 | 10 | 5 |
| 2° addizione | 20 | 20 | --- | 5 |

6.3.2 Misura strumentale

Se lo Spettrofotometro dispone di un computer, la concentrazione del piombo nella soluzione del campione è calcolata direttamente dallo strumento con il metodo delle aggiunte standards, e riportata sulla stampante.

Se lo strumento non dispone di un computer, è necessario costruire la retta di taratura con il metodo delle aggiunte standards, riportando in ascisse il valore di concentrazione e in ordinata le assorbanze corrispondenti.

Riportati i tre punti corrispondenti alle tre letture, rispettivamente del campione, del campione più la prima aggiunta e del campione più la seconda aggiunta, costruire la retta passante per i tre punti e prolungarla fino ad intercettare l'asse delle X. Il valore di concentrazione corrispondente all'intercetta rappresenta il valore di concentrazione di piombo, nella soluzione del campione.

Nota

Il metodo delle aggiunte standards è applicato correttamente se i valori di assorbanza del campione e del campione con le due aggiunte rientrano nel campo della linearità.

6.3.3 Calcolo

Il contenuto del piombo nel campione è calcolato mediante la seguente formula:

$$C = \frac{c \cdot V}{1000 \cdot m}$$

C = contenuto di piombo espresso in mg/kg del campione analizzato

c = contenuto di piombo espresso in µg/L nella soluzione del campione

V = il volume della soluzione espresso in ml

m = la porzione del campione per l'analisi espressa in grammi

7. Accuratezza

L'accuratezza del metodo è in funzione della disponibilità di adeguati materiali standards di riferimento. Qualora non siano disponibili materiali simili alla matrice alimentare da analizzare è necessario ricorrere a prove di recupero sulla matrice opportunamente addizionata dell'analista.

8. Limite di rivelabilità

Il limite di rivelabilità del metodo, utilizzando il procedimento di incenerimento a secco, per una porzione di campione di 5 g, è pari a 0,020 mg/kg.

9. Riproducibilità

a) per concentrazioni fino a 100 µg/kg il CV è inferiore a 0,20;

b) per concentrazioni tra 100 µg/kg e 1000 µg/kg il CV è inferiore a 0,15;

c) per concentrazioni maggiori di 1000 µg/kg il CV è inferiore a 0,10.

H) Modalità di costituzione del campione di molluschi bivalvi destinato alle analisi

1. Il campione di molluschi bivalvi da sottoporre ad analisi deve essere costituito da 50-300 invertebrati per aliquota in relazione al tipo di analisi ed alla specie di molluschi oggetto del prelievo, con criterio inverso alla dimensione dei molluschi.

2. Ciascuna delle aliquote di cui al punto 1 può essere utilizzata per un solo tipo di accertamento analitico (microbiologico, chimico, biotossicologico, fisico).

3. I campioni dei molluschi bivalvi devono essere mantenuti, dal momento del prelievo al momento in cui viene iniziata la prima analisi, a temperatura non superiore a +6 °C.

4. I controlli microbiologici vengono eseguiti con le modalità previste dall'art. 4 del decreto legislativo 3 marzo 1993, n. 123.

95A7125