

T~magazine

1° semestre 2022 / Numero 7 - Tentamus Italia



- 1** | Una nuova Azienda si unisce al Gruppo Tentamus in Italia!
A new company is joining the Tentamus Group in Italy!
- 2** | Aspetti di biocompatibilità dei dispositivi medici
Aspects of medical devices biocompatibility
- 3** | Allerta ossido di etilene in matrici vegetali
Ethylene oxide alert in plant matrices
- 4** | *Listeria monocytogenes* «un patogeno senza tempo»
Listeria monocytogenes «a timeless pathogen»
- 5** | *In-vivo veritas?*
In-vivo veritas?
- 6** | Fermentazione malolattica: fermi di fermentazione e come prevenirli
Malolactic fermentation: fermentation stops and how to prevent them
- 7** | I batteri nella depurazione biologica: piccoli organismi, grande missione
Bacteria in biological purification: small organisms, big mission
- 8** | News dal mondo Tentamus
News from Tentamus' world
- 9** | L'esperto risponde
Ask the Expert

“La vita non è aspettare che passi la tempesta, ma imparare a ballare sotto la pioggia”.
“Life isn’t about waiting for the storm to pass. It’s about learning to dance in the rain”.

(Mahatma Gandhi)

In effetti, guardare a quello che la storia ci sta “regalando” da qualche anno a questa parte, come fosse una prolungata scuola di ballo, forse aiuterebbe anche i più pessimisti ad affrontare le intemperie con uno spirito diverso.

I campioni del “non sarà più come prima”, i professionisti del “pessimismo cosmico” sono lì alla finestra, pronti ad aspettare l’ennesima buona occasione per diventare i protagonisti con l’anatema: “io l’avevo detto che finiva così”.

Eppure basterebbe un libro di storia, una veloce lettura tra una lamentela e l’altra, per comprendere che, con chirurgica sistematicità, ogni epoca ha avuto le sue tempeste. Ogni epoca ha avuto chi ha ballato sotto la pioggia e ci ha condotto fino a qui.

Ogni epoca ci insegna che dobbiamo essere interessati al futuro; in fondo, è lì che passeremo il resto della nostra vita.

Ora, capisco anche che ci sia chi non ha voglia di imparare passi di danza.

Almeno, di grazia, non buttate olio sulla pista per farci scivolare. Spostatevi per favore...solo un attimo, fateci ballare. Almeno il tempo di un reef di chitarra.

Oggi, più che mai, è tempo di “Rock & Roll”.



Nicola Berruti
Country Manager Tentamus Italia

Indeed, looking at what history has been ‘giving’ us for the past few years, as if it were an extended dance school, would perhaps help even the most pessimistic, to face the bad weather with a different spirit.

The champions of “nothing will ever be the same again”, the experts of “cosmic pessimism” are there at the window, waiting for yet another good opportunity to become the protagonists of the scene and ready to hurl the anathema: “I said it would end like this”.

Yet all it takes is a history book, a quick read between one complaint and another, to understand that, with surgical systematicity, every era has had its storms. Every epoch has had those who danced in the rain and led us here.

Every era teaches us that we must be interested in the future; after all, that is where we will spend the rest of our lives.

Now, I also understand that there are those who have no desire to learn dance steps.

At least, please don’t throw oil on the track to make us slide. Move over please please... just a moment, let us dance. At least the time of a guitar reef.

Today, more than ever, it’s time for “Rock & Roll”.

Alcune immagini sono state realizzate prima dell'emergenza Covid-19
Some of the pictures were taken before Covid-19 emergency

T-Word FOR YOU *(all’ultima pagina troverete gli approfondimenti dei termini evidenziati nel Magazine)*
(on the last page you will find the details of the terms highlighted in the Magazine)

Un nuova Azienda si unisce al Gruppo Tentamus in Italia!

I Gruppo Tentamus è orgoglioso di dare il benvenuto alla Società ISEMED Srl, all'interno della sua rete internazionale di laboratori e fornitori di servizi.

ISEMED, con sede a Imola (BO), offre servizi di consulenza per l'immissione sul mercato, europeo ed internazionale, di dispositivi medici, dispositivi medico diagnostici in vitro, cosmetici e farmaci.

L'Azienda si rivolge alle imprese operanti nel settore dei Dispositivi Medici e Diagnostici in Vitro, per favorirne lo sviluppo tecnico, economico, commerciale e regolamentare, nelle principali aree economiche mondiali.

"Il nostro obiettivo è quello di fornire alle aziende Italiane la massima competenza tecnica e regolamentare per un supporto efficace per lo sviluppo del mercato internazionale nel settore dei Dispositivi Medici, IVD, cosmetici, biocidi. Aiutiamo le aziende a stabilire le strategie regolamentari più idonee per evitare le insidie poste dalle leggi locali che possono rallentare il processo produttivo e commerciale. La nostra competenza è comprovata dai numerosi corsi di formazione erogati per conto di Organismi Notificati Italiani di primaria importanza e con la docenza svolta personalmente nel master di II livello in Ingegneria Clinica per l'Università di Bologna", spiega l'Ing. Guido Bonapace di ISEMED.

Il Country Manager di Tentamus Italia Nicola Berruti aggiunge: *"Entriamo con grande entusiasmo in un settore, quello medicale, caratterizzato da un forte dinamismo e da un altissimo livello di innovazione. L'ingresso di ISEMED all'interno del Gruppo rappresenta, dunque, uno step fondamentale per il consolidamento e crescita sul territorio nazionale, al fine di garantire al mercato un servizio sempre più completo e radicato in tutti i settori".*

ISEMED è l'unica società di consulenza del settore medicale accreditata presso il Ministero dello Sviluppo Economico (MISE) come Temporary Export Manager (cod. TEM_00000142).



A new company is joining the Tentamus Group in Italy!



The Tentamus Group is proud to welcome ISEMED Srl to its international network of laboratories and service providers.



The Tentamus Group is proud to welcome ISEMED Srl to its international network of laboratories and service providers.

ISEMED, based in Imola (BO), provides consulting services for the marketing market of medical devices, in vitro diagnostic medical devices, pharmaceuticals and cosmetics on the European and international market.

The company's customer group is made up of companies operating in the field of medical devices and in vitro diagnostics. ISEMED promotes their technical, economic, commercial and regulatory development, in the main world economic areas.

"Our goal is to provide Italian Companies the greatest possible technical and regulatory competence and an effective support for the development of the international market of medical devices, IDV, cosmetics, biocidal products. We help Companies to establish regulatory strategies in order to avoid the pitfalls imposed by local laws that slow down the production and commercial process. Our competence is proven by numerous training courses we provide on behalf of the main Italian Notified Bodies, as well as by Master's Degree II course in Clinical Engineering for the University of Bologna, which I personally carry out", explains Eng. Guido Bonapace of ISEMED.

The Country Manager of Tentamus Italia, Nicola Berruti adds: "With great enthusiasm, we are entering a sector, the Medical Device one, which is characterized by a strong dynamic and a very high level of innovation. The entry of ISEMED within the Tentamus Group therefore represents a fundamental step for the consolidation and growth of Tentamus on the national territory: our aim is to ensure the market an increasingly complete and rooted service in all sectors".

ISEMED is the only consulting firm in the medical sector accredited by the Economic Development Ministry (MISE) as Temporary Export Manager (cod. TEM_00000142).

L'AZIENDA IN BREVE

I NOSTRI CLIENTI:

Fabbricanti e Distributori di Dispositivi Medici e Dispositivi medico-diagnostici In Vitro.

IL NOSTRO TEAM:

10+ dipendenti

CONTATTI:

+39 0542 683803
www.isemed.eu
info@isemed.eu

LA NOSTRA STORIA:

inizia nel 2008

SERVIZI SPECIALI:

Valutazione clinica, Validazione software, Documentazione tecnica di prodotto e Sistema Qualità

IL NOSTRO MANAGEMENT:

Ing. Guido Bonapace
Matteo Placci
Claudia Bandini

INDUSTRIES WE SERVE:

Medical Device / In Vitro Diagnostics Manufacturers and distributors

OUR SERVICES:

regulatory compliance to major worldwide economical areas or countries

OUR TEAM:

10+ employees

CONTACT US:

+39 0542 683803
www.isemed.eu
info@isemed.eu

OUR STORY:

began in 2008

SPECIAL SERVICE:

Clinical evaluation, software validation, product technical documentation, quality system

OUR MANAGEMENT:

Ing. Guido Bonapace
Matteo Placci
Claudia Bandini

LOCATION PROFILE

Aspetti di biocompatibilità dei dispositivi medici

Ing. Guido Bonapace, General Manager di ISEMED

Quasi tutti i dispositivi medici entrano in contatto con il paziente per svolgere la loro azione clinica. Questo comporta che i materiali con cui sono costruiti garantiscano la sicurezza e le prestazioni previste dal fabbricante. La biocompatibilità è uno dei principali elementi di sicurezza che occorre verificare prima di mettere sul mercato un nuovo dispositivo medico.

La marcatura CE di un dispositivo medico non può prescindere dalla valutazione di biocompatibilità dei materiali utilizzati per la parte applicata o per quella che entra in contatto con il paziente.

Per il suo meccanismo d'azione il dispositivo medico può avere una tipologia di contatto che dipende dal tempo di impiego e dalla natura del contatto. I test da eseguire sui materiali sono specificati nella ISO 10993-1:2018.

La durata può essere:

- Limitata se < 24h
- Prolungata se < 30 giorni
- Permanente se > 30 giorni

Le modalità di contatto sono invece categorizzate come:

- Contatto superficiale con Pelle integra, Mucose o Membrane, Superfici lese o compromesse;
- Dispositivi comunicanti con l'esterno in contatto con Circuiti sanguigni indiretti, Tessuti/Osso/Dentina, Circolazione sanguigna;
- Dispositivi impiantabili in contatto con Tessuto/Osso, Sangue.

Per determinare le prove di laboratorio da eseguire, è necessario eseguire la caratterizzazione chimico-fisica dei materiali secondo la ISO 10993-18, le durate e le modalità di contatto, unitamente all'analisi dei rischi.

Le prove descritte dalla serie ISO 10993 comprendono:

- la citotossicità (ISO 10993-5);
- i test di irritazione e sensibilizzazione (ISO 10993-10 e ISO 10993-23);
- la genotossicità, carcinogenicità e tossicità sulla riproduzione (ISO 10993-3);
- la tossicità sistemica, compresa quella acuta, subacuta, subcronica e cronica;
- la pirogenicità (ISO 10993-11);
- l'emocompatibilità (ISO 10993-4);
- gli effetti dopo l'impianto (ISO 10993-6).

Così come un dispositivo a contatto con la pelle integra, per meno di 24 ore, deve soddisfare i requisiti di citotossicità, sensibilizzazione ed irritazione, un dispositivo impiantabile, a contatto con il sangue, deve prendere in esame tutti i test a meno che i materiali utilizzati non siano già stati testati per lo stesso scopo.

ISEMED è la società di consulenza che assiste le aziende del settore medicale ad ottenere l'autorizzazione alla commercializzazione dei propri dispositivi medici nei principali mercati mondiali, dando tutto il supporto necessario alla definizione e realizzazione dei test di biocompatibilità al fine di realizzare tutta la documentazione necessaria al processo di marcatura CE.



Aspects of medical devices biocompatibility

Eng. Guido Bonapace, General Manager at ISEMED



Almost all medical devices come into contact with the patient to perform their clinical action. This implies that the materials with which medical devices are made of must guarantee and ensure the safety and performance expected by the manufacturer. Biocompatibility is one of the main safety elements that must be verified before putting a new medical device on the market.

CE Marking of a medical device cannot ignore the biocompatibility's assessment of the materials used both for the implantable part or for the part that comes into contact with the patient.

According to its own mechanism of action, the medical device can have a type of contact depending on the time of use and on the nature of the contact. The tests to be performed on the materials are specified in ISO 10993-1:2018.

The duration of the exposure can be as follows:

- Limited if < 24h
- Prolonged if < 30 days
- Long Term if > 30 days

The possible nature of body contact can be categorized as:

- Medical device in contact with Intact Skin, Mucous or Membranes, Breached or Compromised Surfaces;
- Externally communicating medical devices in contact with Indirect Blood Circuits, Tissue/Bone/Dentin, Blood Circulation;
- Implantable devices in contact with Tissue/Bone, Blood.

In order to determine the laboratory tests to be performed, both chemical and physical characterization of the materials have to be carried out according to ISO 10993-18, along with contact duration and risk analysis.

The tests described by the ISO 10993 series include:

- cytotoxicity (ISO 10993-5);
- irritation and skin sensitization (ISO 10993-10 and ISO 10993-23);
- genotoxicity, carcinogenicity and reproductive toxicity (ISO 10993-3);
- systemic toxicity including acute, subacute, subchronic and chronic toxicity and pyrogenicity (ISO 10993-11);
- interactions with blood (ISO 10993-4);
- local effects after implantation (ISO 10993-6).

Just as a device in contact with undamaged skin, for less than 24 hours, must meet the requirements for cytotoxicity, sensitisation and irritation, an implantable device, in contact with blood, must consider all tests unless the materials used have already been tested for the same purpose.

ISEMED is the consultancy partner that assists companies in the medical sector in obtaining marketing authorisation for their medical devices in the world's major markets, providing all the support necessary for the definition and implementation of biocompatibility tests in order to produce all the necessary documentation for the CE marking process.



Allerta ossido di etilene in matrici vegetali

- Gian Piero Luciani, Technical Manager di Tentamus Agriparadigma
- Paolo Pucci, Sales Area Manager di Tentamus Agriparadigma

Origine dell'allerta

La prima allerta dell'ossido di etilene è stata pubblicata sul sito del RASFF - sistema di allerta rapido per alimenti e mangimi, il giorno 09-09-2020 dal Belgio, sul prodotto semi di sesamo dove è stato riscontrato ossido di etilene in concentrazione di $30,1 \pm 8,7$ mg/kg - ppm - con limite uguale a 0,05 mg/kg - ppm.

La prima allerta pubblicata dall'Italia è stata registrata in data 20-10-2020.

Da allora fino ad aprile 2022 sono stati pubblicati più di 900 alert sul portale RASFF riguardanti la presenza di ossido di etilene in prodotti alimentari. L'ossido di etilene si può trovare in alte concentrazioni nei semi di sesamo e in altri prodotti come riso, noci, legumi, cereali, spezie, frutta e verdura, semi, caffè, gomma di guar (E412) e anche nella farina di semi di carrube (E410). Tutti i prodotti citati sono provenienti da paesi extracomunitari e particolarmente allarmante è la situazione dei prodotti alimentari provenienti dall'India.

In India l'ossido di etilene è comunemente impiegato sulle derrate alimentari per disinfettare e sterilizzare; questa pratica è in uso soprattutto nelle derrate alimentari che vengono esportate in Europa per prevenire la degradazione del prodotto durante il trasporto che avviene prevalentemente via mare ed ha una durata di alcune settimane e/o mesi.

Per quanto riguarda le derrate alimentari ed i prodotti derivati la normativa prevede un Livello Massimo di Residuo stabilito dal Reg. (EU) 2015/868 compreso nell'intervallo 0,02-0,10 mg/kg a seconda del tipo di prodotto, mentre per il limite degli additivi si

deve fare riferimento al Regolamento 231 del 2012 - che stabilisce le specifiche degli additivi alimentari elencati negli allegati II e III del regolamento (CE) n. 1333/2008 del Parlamento europeo e del Consiglio.

Le notifiche del sistema di allerta

Il sistema RASFF è stato ideato per la prima volta nel 1979 su proposta del Consiglio europeo ed è stato istituito ufficialmente con il Regolamento (CE) n. 178/2002, come definito dall'articolo 50; è un sistema di allarme, sotto forma di rete, per la notifica di un rischio diretto o indiretto per la salute umana dovuto ad alimenti o mangimi.

In seguito all'accertamento, e talvolta anche al sospetto, di una non conformità le autorità competenti attivano il sistema di notifica RASFF.

Quando le non conformità sono associate ad un rischio (serio, non serio o indeciso) per la salute umana, animale o per l'ambiente le notifiche attivate sono quelle del sistema di allerta.

Queste si distinguono in:

- allerte
- information for follow-up
- information for attention
- border rejection
- news

Nel caso in cui il prodotto oggetto di notifica sia ancora disponibile sul mercato è necessario attivare le misure di ritiro e richiamo come previsto dal regolamento (CE) 178/2002.



Il laboratorio Tentamus Agriparadigma (sede di Ravenna) ha validato il metodo di analisi "metodo UNI 15662" ed è stato accreditato ACCREDIA sulle seguenti matrici:

- Alimenti particolari (spezie, tè, caffè, cacao, ecc.)
- Alimenti di origine vegetale ad alto contenuto di acqua
- Alimenti di origine vegetale ad alto contenuto di acido e acqua freschi e loro trasformati
- Alimenti di origine vegetale ad alto contenuto di zucchero e a basso contenuto di acqua
- Alimenti di origine vegetale ad alto contenuto di olio e loro trasformati
- Alimenti di origine vegetale ad alto contenuto di amido e/o proteine, a basso contenuto di acqua e grasso e loro trasformati

Per quanto riguarda la matrice Mangimi di origine vegetale (escluso paglia, fieno e premiscele) il metodo impiegato è il metodo interno 202 AGRI 2022 Rev. 15, anche questo metodo attualmente è accreditato ACCREDIA.

Sia il metodo UNI 15662 che il metodo 202 AGRI hanno un limite di quantificazione (LOQ) uguale a 0,010 mg/Kg e nella sede di Ravenna vengono eseguiti in routine in pochi giorni lavorativi dall'arrivo del campione in laboratorio.

L'ossido di etilene

L'ossido di etilene a pressione e temperatura ambiente si presenta in forma di gas incolore (temperatura di ebollizione di 10.4°C), di odore etereo dolce, estremamente infiammabile, irritante e tossico per inalazione.

È una molecola molto piccola, volatile con elevata capacità di diffondere e penetrare negli alimenti; particolarmente reattiva, ha tossicità acuta moderata, ma elevata propensione a reagire con una gran varietà di sostanze compreso il DNA.

Queste proprietà spiegano sia la sua efficacia come agente sterilizzante, sia le sue caratteristiche di genotossicità, mutagenicità e cancerogenicità.

L'evaporazione e la reazione con i componenti della matrice sono le principali vie di eliminazione dell'ossido di etilene; dopo fumigazione è stata riscontrata la riduzione fino a 1 ppm di ossido di etilene dopo 2 settimane dal trattamento per prodotti stoccati in ambiente areato.

Uno dei principali prodotti di degradazione dell'ossido di etilene è il 2-cloroetano; particolarmente importante in quanto principale indicatore del trattamento con ossido di etilene di un alimento e perché prende parte alla definizione del residuo.

Il 2-cloroetano in condizioni di pressione e tempe-

ratura ambiente è un liquido incolore di odore etereo (temperatura di ebollizione 129°C) completamente miscibile in acqua.

L'ossido di etilene scompare rapidamente negli alimenti attraverso l'evaporazione o le reazioni, quindi l'esposizione dei consumatori ai residui correlati all'ossido di etilene mediante il consumo di alimenti riguarda principalmente i suoi prodotti di reazione. Come riportato il più rilevante di questi è il 2-cloroetano; l'Autorità tedesca per la valutazione dei rischi (BfR) ha valutato la tossicità del 2-cloroetano e ha deciso di seguire l'approccio precauzionale e considerare il 2-cloroetano altrettanto tossico dell'ossido di etilene.

Alla stessa conclusione è giunta l'autorità europea per la sicurezza alimentare EFSA.

Come si rileva

Dal punto di vista analitico sia l'ossido di etilene che il 2-cloroetano sono molecole che non si prestano all'analisi mediante i metodi usuali utilizzati per l'analisi multiresiduale degli antiparassitari.

Infatti non sono analizzabili mediante tecnica LC/MS/MS data la mancanza di gruppi funzionali ionizzabili e non sono facilmente analizzabili mediante GC/MS/MS data l'elevata volatilità rispetto ai comuni antiparassitari.

Il laboratorio comunitario di riferimento per i metodi singoli, CVUA di Stoccarda, ha sviluppato un metodo GC/MS/MS specifico che è stato pubblicato sul portale dei laboratori comunitari nel dicembre 2020.

L'approccio utilizzato consiste nell'utilizzo di condizioni di analisi più comuni all'analisi dei solventi, e prevede sia una fase di estrazione ottimizzata che l'utilizzo di un GC/MS/MS specifico dedicato a sostanze altamente volatili.

Attualmente il metodo sviluppato a Stoccarda è quello comunemente utilizzato dai laboratori Comunitari pubblici e privati.



Ethylene oxide alert in plant matrices

- Gian Piero Luciani, Technical Manager at Tentamus Agriparadigma
- Paolo Pucci, Sales Area Manager at Tentamus Agriparadigma



Origin of the alert

The first ethylene oxide alert was published on 09-09-2020 by Belgium on the RASFF - Rapid Alert System for Food and Feed website, concerning sesame seeds in which ethylene oxide was found in a concentration of 30.1 ± 8.7 mg/kg – ppm – with the threshold being 0.05 mg/kg – ppm.

The first alert issued by Italy was dated 20-10-2020.

From then until April 2022, more than 900 alerts have been reported on the RASFF portal concerning the presence of ethylene oxide in foodstuffs.

Ethylene oxide can be found in high concentrations in sesame seeds and in other products such as rice, nuts, pulses, cereals, spices, fruit and vegetables, seeds, coffee, guar gum (E412), and in locust bean gum (E410). All these products are from non-EU countries, in particular the situation of foodstuffs from India is quite alarming.

In India Ethylene oxide is commonly used to disinfect and sterilise foodstuffs; this practice is especially common with foodstuffs that are exported to Europe in order to prevent food products from spoiling during transport, mainly by sea, which may take several weeks and/or months.

Concerning foodstuffs and by-products, the law establishes a Maximum Residue Level set out in Regulation (EU) 2015/868 within the range 0.02-0.10 mg/kg range depending on the type of product, while the threshold for additives can be found in Regulation 231 of 2012 - which sets out the specifications for food additives listed in Annexes II and III of Regulation (EC) No. 1333/2008 of the European Parliament and of the Council.

Alert system notifications

The RASFF system was conceived in 1979, following a proposal by the European Council, and officially introduced by Regulation (EC) No. 178/2002, as defined in Article 50; it is an alert system, in the form of a network, for notifying of a direct or indirect risk to human health posed by food or feed.

Following the detection, and sometimes even the suspicion, of non-compliance, the competent authorities activate the RASFF notification system.

If the non-compliance is associated with risk (serious, non-serious or uncertain) to human health, animal health or the environment, the alert system notifications are activated.

These can be divided into:

- alerts
- information for follow-up
- information for attention
- border rejection
- news

If the notified product is still available on the market, recall and withdrawal measures must be put in place, as required by Regulation (EC) 178/2002.

Ethylene oxide

At room pressure and temperature, ethylene oxide is in the form of a colourless gas (with a boiling temperature of 10.4 °C). It has a sweet ethereal odour, is extremely flammable, irritating, and toxic by inhalation.

It is a very small and volatile molecule that has a remarkable ability to spread and penetrate foodstuffs; it is highly reactive and has moderate acute toxicity, but it is also very likely to react with a wide range of substances, including DNA.

These properties demonstrate its efficacy as a sterilising agent, as well as its genotoxicity, mutagenicity, and carcinogenicity.

The main ways of eliminating ethylene oxide are through evaporation and reaction with matrix components; following fumigation, a decrease of up to 1ppm of ethylene oxide was observed two weeks after treatment for products stored in an aerated environment.

One of the primary breakdown products of ethylene oxide is 2-chloroethanol, which is of crucial importance as it is the main indicator that a food product has been treated with ethylene oxide and plays a role in the residue definition.

At room temperature and pressure, 2-chloroethanol is a colourless liquid with an ethereal odour (with a boiling point of 129 °C), which can be completely mixed with water.

Since ethylene oxide quickly disappears in food through evaporation or reactions, consumer exposure to ethylene oxide-related residues through food consumption primarily occurs through its reaction products.

As mentioned, the most significant of them is 2-chloroethanol; the German Federal Institute for Risk Assessment (BfR) assessed the toxicity of 2-chloroethanol

and decided to take a precautionary approach by considering 2-chloroethanol to be just as toxic as ethylene oxide.

The European Food Safety Authority (EFSA) has come to the same conclusion.

How it is detected

Analytically, molecules such as ethylene oxide and 2-chloroethanol are not suitable to be analysed with the usual methods applied to the multiresidue analysis of antiparasitics.

As a matter of fact, they cannot be analysed using the LC/MS/MS technique, since they lack ionisable functional groups. They are also not easy to analyse via GC/MS/MS since they are highly volatile compared to common antiparasitics.

The EU Reference Laboratory for Single Residue Methods (CVUA - Chemisches und Veterinäruntersuchungsamt) in Stuttgart developed a specific GC/MS/MS method that was published on the EU lab portal in December 2020.

The chosen approach involves using analysis conditions that are more commonly applied to the solvent analysis and entails an optimised extraction step and the use of a specific GC/MS/MS dedicated to highly volatile substances. As of today, the method developed in Stuttgart is the method most commonly used by public and private laboratories in the EU.

The Tentamus Agriparadigma srl laboratory based in Ravenna has validated the analysis method – UNI 15662 method – and has been accredited by ACCREDIA for the following matrices:

- Specific foods (spices, tea, coffee, cocoa, etc.)
- Plant-based foods with a high water content
- Fresh and processed plant-based foods with a high acid and water content
- Plant-based foods with high sugar content and low water content
- Fresh and processed plant-based foods with high oil content
- Plant-based foods with high starch and/or protein content, low water content, and low fats and derivatives

As for the plant-based Feed matrix (not including straw, hay, and premixes), the in-house method 202 AGRI 2022 Rev. 15 is used, which has also been accredited by ACCREDIA.

The UNI 15662 method and the 202 AGRI method both have a limit of quantification (LOQ) of 0.010 mg/kg. In Ravenna, they are routinely performed within a few working days once the sample arrives at the laboratory.

Listeria monocytogenes

«un patogeno senza tempo»

- Dott.ssa Elisabetta Genta, Operation Manager di Laemmegroup
- Dott. Alessandro Pessione, Biologic Area Manager di Laemmegroup

Ad inizio 2022 la normativa nazionale si è adeguata definitivamente alla regolamentazione europea, infatti è stata considerata inapplicabile l'OM del 7.12.1993 (quantificazione di *Listeria* con metodo MPN). Il legislatore europeo nel 2005, all'interno del pacchetto igiene, inserisce, nel Reg. CE 2073 come criterio di sicurezza alimentare, la *Listeria monocytogenes* unicamente per gli alimenti pronti al consumo, prevedendo come limite per la sicurezza alimentare il valore di 100 ufc/g o l'assenza in 25 g a seconda della tipologia di alimento o del momento della shelf life in cui viene effettuata l'analisi.

Per i prodotti da destinare a cottura, invece, la presenza di *L. monocytogenes*, in precedenza regolamentata dall'OM del 7.12.1993 (con limiti di accettabilità compresi tra 11 e 110 MPN/g), non è al momento formalmente normata dalla legislazione vigente.

La definizione di un limite di accettabilità per i prodotti destinati al consumo previa cottura si ritrova nell'Allegato 7 del Provvedimento (naz.) 10 novembre 2016, che indica come valore guida ≤ 1000 ufc/g.

Per una corretta classificazione dei prodotti e per la definizione delle loro specifiche microbiologiche, è quindi sempre più importante una chiara identificazione della tipologia di alimento (ready to eat o meno) e della sua destinazione d'uso (consumo tal quale, previa cottura o previa ulteriore lavorazione) tramite l'etichettatura o la condivisione delle specifiche tecniche.

Per i prodotti RTE il Regolamento CE 2073/05 definisce per *L. monocytogenes* il limite di 100 ufc/g fino a fine vita, pertanto se un prodotto è considerato terreno favorevole alla crescita di *L. monocytogenes* diventa difficile "predirne" la concentrazione finale e quindi a scopo cautelativo per questi prodotti è richiesta l'assenza.

Ma come capire se l'alimento è terreno favorevole allo sviluppo di *Listeria*? Il Reg. CE 2073/05 definisce chiaramente 2 parametri: pH e Aw.

E se il prodotto presenta un Aw e/o un pH che lo classificherebbero come terreno favorevole si può dimostrare che non lo è?

Sì, infatti la possibilità di crescita è influenzata non solo dai valori di pH e attività dell'acqua ma anche da altri fattori intrinseci quali concentrazione di sale (NaCl), microflora presente nell'alimento, presenza di conservanti nonché da fattori estrinseci

quali modalità di confezionamento, eventuale atmosfera protettiva, modalità e condizioni di conservazione (temperatura).

E come si combinano questi fattori? Spesso agiscono in sinergia, ma essendo difficile definire modelli di crescita che prendano in considerazione tutte le caratteristiche specifiche e peculiari di un prodotto, l'unico modo per verificare se l'alimento sia o meno terreno favorevole è l'esecuzione di un challenge test.

Esistono due tipi di challenge test, il più utilizzato permette di determinare il potenziale di crescita, alternativamente si può procedere determinando la massima velocità di crescita di *L. monocytogenes*, che, sebbene si presti ad estrapolazioni predittive, richiede un gran numero di prove sperimentali con conseguente aumento dei costi.

La realizzazione di un challenge test è un processo che si compone di diverse fasi e non è possibile definire a priori uno studio standard; di fatto in funzione dei risultati ottenuti nei vari step, si andranno a stabilire gli stadi successivi:

Caratterizzazione del prodotto

Milestone di un challenge test è definire in modo chiaro ed univoco le caratteristiche del prodotto oggetto di studio.

Infatti i risultati che verranno ottenuti saranno applicabili esclusivamente a prodotti realizzati con uguale ricetta, processo, confezionamento e modalità di conservazione e con pH, Aw e flora microbica costante.

Questi 3 parametri devono essere determinati sperimentalmente su più lotti di produzione per dimostrare la standardizzazione del prodotto, gli altri vengono riportati sulla base di quanto indicato dal produttore.

Preparazione dell'inoculo

Il laboratorio prepara la sospensione con cui contaminare l'alimento tale da garantire una contaminazione nel range di concentrazione compreso tra 50 e 200 ufc/g, utilizzando ceppi opportunamente caratterizzati, diversi a seconda della matrice e delle sue caratteristiche.

Programma di studio e contaminazione delle aliquote

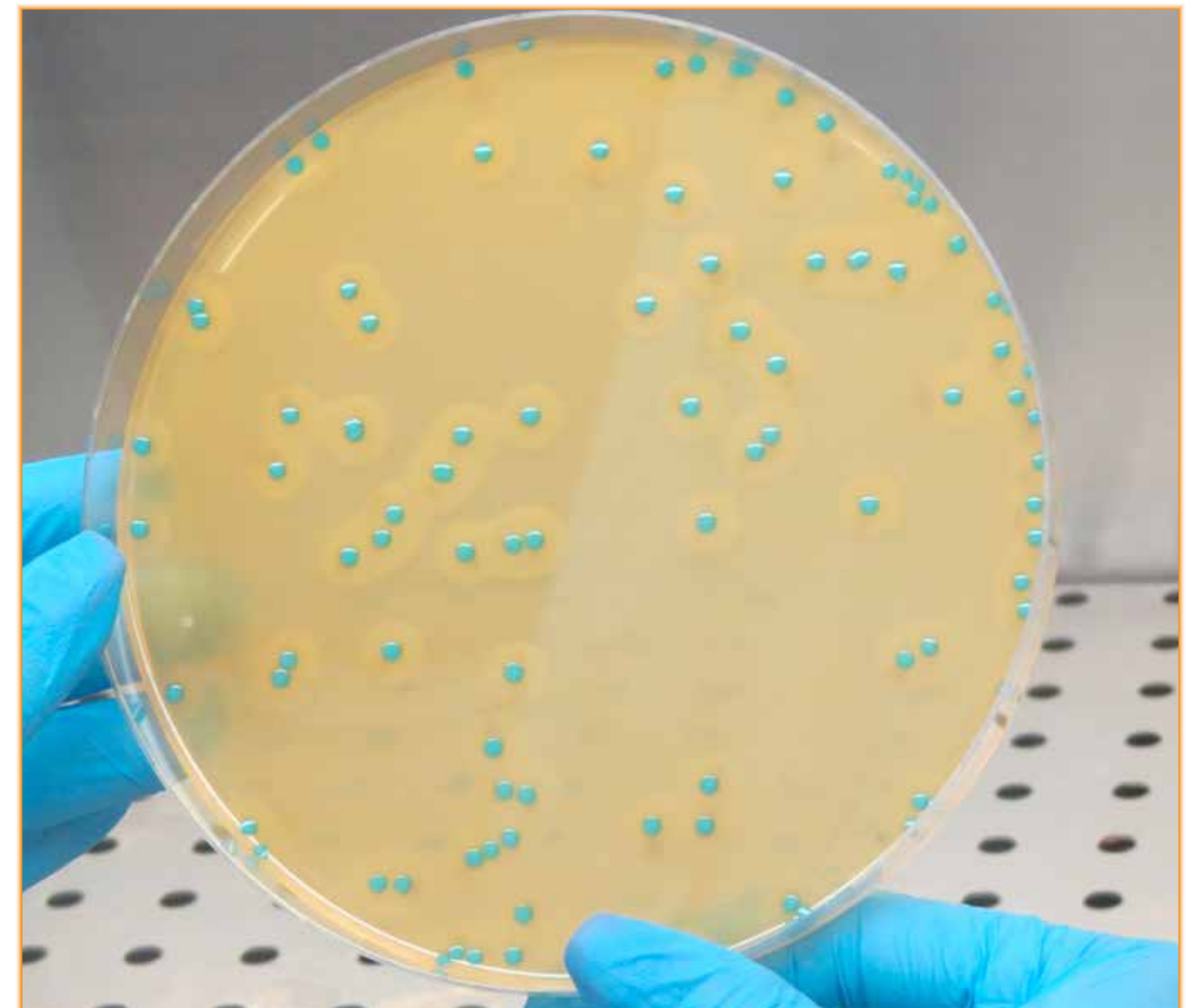
In seguito alla caratterizzazione del prodotto ed alla valutazione dei risultati, è possibile definire il programma di studio, stabilendo per le fasi successive, la numerosità dei lotti, delle aliquote, degli step, ecc. Quindi si procede con la contaminazione, che viene eseguita sul prodotto confezionato a fine produzione. È importante eseguire una contaminazione omogenea, senza alterare le caratteristiche chimico-fisiche dell'alimento né il suo packaging.

Fase analitica

I campioni vengono analizzati a tempo zero, al termine della shelf life in esame (T finale) e in 3 tempi intermedi concordati tra laboratorio e produttore. L'analisi principale è il conteggio di *L. monocytogenes*, a cui si affiancano altri parametri, necessari per interpretare i risultati.

Elaborazione dei dati e stesura relazione finale

I numerosi risultati ottenuti vengono elaborati, valutati e riportati in una relazione finale, dove sono riassunti tutti gli step sopra indicati e dove viene esplicitato il giudizio finale determinato dal valore del potenziale di crescita ottenuto: se risulta $< 0.5 \log_{10}$ l'alimento può essere considerato terreno non favorevole per la proliferazione di *L. monocytogenes*.





Definizioni:

Alimenti pronti al consumo che non costituiscono terreno favorevole alla crescita di *Listeria monocytogenes*
Prodotti con pH ≤ 4,4 o Aw ≤ 0.92 e i prodotti con pH ≤5,0 e Aw ≤ 0,94 e i prodotti con un periodo di conservabilità inferiore a 5 giorni. Possono appartenere a questa categoria anche prodotti diversi purché vi sia una giustificazione scientifica.

Challenge test
Test che consente di verificare, attraverso un processo sperimentale, se un alimento ha la capacità di favorire o meno la crescita di microrganismi patogeni o alteranti.

Normativa di riferimento:

Normativa nazionale:
Legge n°283 del 30/4/1962
Ordinanza ministeriale del 11/10/1978 aggiornata con O.M. del 7/12/1993 (ad oggi non più applicabile).

Normativa europea:
Reg. CE 2073/2005 e s.m.i.

Linee guida
Provvedimento (naz.) 10 novembre 2016 - Intesa, ai sensi dell’articolo 8, comma 6, della legge 5 giugno 2003, n. 131, tra il Governo, le Regioni e le Province autonome di Trento e Bolzano sul documento concernente “Linee guida per il controllo ufficiale ai sensi dei Regolamenti (CE) 882/2004 e 854/2004”.
EUROLm TECHNICAL GUIDANCE DOCUMENT on challenge tests and durability studies for assessing shelf life of ready-to-eat foods related to *Listeria monocytogenes* (Version 4, 1 Luglio 2021).

Limiti

Categoria alimentare	Limiti	Metodo d'analisi di riferimento	Fase a cui si applica il criterio
1.1. Alimenti pronti per lattanti e alimenti pronti a fini medici speciali	N.R. in 25 g - 10u.c.	EN/ISO 11290-1	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
1.2. Alimenti pronti che costituiscono terreno favorevole alla crescita di <i>Listeria monocytogenes</i> diversi da quelli destinati ai lattanti e a fini medici speciali	100 ufc/g - 5u.c.	EN/ISO 11290-2	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
	N.R. in 25 g - 5u.c.	EN/ISO 11290-1	Prima che gli alimenti non siano più sotto il controllo diretto dell'operatore del settore alimentare che li produce
1.3. Alimenti pronti che non costituiscono terreno favorevole alla crescita di <i>Listeria monocytogenes</i> , diversi da quelli destinati ai lattanti e a fini medici speciali	100 ufc/g - 5u.c.	EN/ISO 11290-2	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
Prodotti da destinare a cottura (Allegato 7 linea guida del 10/11/2016)	1000 ufc/g	EN/ISO 11290-2	

Definitions

Ready-to-eat foods that are not a breeding ground for *Listeria monocytogenes*

Products with a pH ≤ 4.4 or Aw ≤ 0.92, products with a pH ≤ 5.0 and Aw ≤ 0.94, and products with a shelf life of less than 5 days.

Different types of products can fall into this category, provided that there is scientific justification.

Challenge test

Through this test, based on an experimental process, it is possible to verify whether or not a food product is likely to favour the growth of pathogenic or altering microorganisms.

Reference legislation:

National legislation:

(It.) Law No. 283 of 30/4/1962
(It.) Ministerial Order of 11/10/1978 updated by Ministerial Order of 7/12/1993 (no longer applicable today).

European legislation:

Reg. (EC) 2073/2005 as amended.

Guidelines

National measure 10 November 2016 - Agreement, pursuant to Article 8, paragraph 6, of Law No. 131 of 5 June 2003, between the Government, the Regions and the Autonomous Provinces of Trento and Bolzano on the document concerning “Guidelines for official control pursuant to Regulations (EC) 882/2004 and 854/2004”.

EURL Lm TECHNICAL GUIDANCE DOCUMENT on challenge tests and durability studies for assessing shelf life of ready-to-eat foods related to *Listeria monocytogenes* (Version 4, 1 July 2021).

Limits

Food category	Limits	Reference method of analysis	Stage to which the criterion applies
1.1. Ready-to-eat infant food and ready-to-eat food for special medical purposes	N.R. in 25 g - 10u.c.	EN/ISO 11290-1	Products placed on the market during their shelf life
1.2. Ready-to-eat food that is a breeding ground for <i>Listeria monocytogenes</i> other than food intended for infants and special medical purposes	100 ufc/g - 5u.c.	EN/ISO 11290-2	Products placed on the market during their shelf life
	N.R. in 25 g - 5u.c.	EN/ISO 11290-1	Before food products are no longer under the direct supervision of the food business operator that produces them
1.3. Ready-to-eat food that is not a breeding ground for <i>Listeria monocytogenes</i> other than food intended for infants and for special medical purposes	100 ufc/g - 5u.c.	EN/ISO 11290-2	Products placed on the market during their shelf life
Products to be cooked (Annex 7 guideline of 10/11/2016)	1000 ufc/g	EN/ISO 11290-2	

Listeria monocytogenes
«a timeless pathogen»



- Dott.ssa Elisabetta Genta, Operation Manager at Laemmegroup
- Dott. Alessandro Pessione, Biologic Area Manager at Laemmegroup

In early 2022, national legislation was finally brought into line with European regulations. As a matter of fact, the **Ministerial Order of 7.12.1993 (quantification of *Listeria* with the MPN method) was deemed inapplicable**. In 2005, as part of the hygiene package, European legislation included *Listeria monocytogenes* in Reg. (EC) No. 2073 as a food safety criterion **for ready-to-eat food only, with a limit of 100 cfu/g or absence in 25 g depending on the type of food or the time of shelf life at which the analysis is conducted**.

On the other hand, for products intended for cooking, the presence of *L. monocytogenes*, previously regulated by the Ministerial Order of 7.12.1993 (with acceptability limits between 11 and 110 MPN/g), is currently not formally regulated by current legislation. The definition of an acceptability limit for products intended for consumption after cooking can be found in Annex 7 to the national measure of 10 November 2016, which specifies ≤1000 cfu/g as a reference value. In order to properly classify products and define their microbiological specifications, it is therefore becoming increasingly important to clearly specify what type of food it is (ready to eat or not) and its intended use (to be eaten as it is, to be cooked or to be further processed) using labels or by sharing product specifications.

For RTE products, Regulation EC 2073/05 sets a limit of 100 cfu/g for *L. monocytogenes* until the product's end of life. This means that if a product is considered a breeding ground for *L. monocytogenes*, it is hard to “predict” its final concentration; consequently, as a precautionary measure, these products must not contain it.

But how can we tell if a food product is a good breeding ground for *Listeria*? Regulation (EC) 2073/05 clearly sets out 2 parameters: pH and Aw.

But what if the product has an Aw and/or pH that would classify it as a breeding ground? Can it be proven that it is not?

Yes, indeed: the chance of growth is influenced not only by pH values and water activity but also by other intrinsic factors such as salt concentration (NaCl), microflora contained in the food product, presence of preservatives, and extrinsic factors such as the type of packaging used, protective atmosphere (if any), and storage methods and conditions (temperature).

And how do these factors come into play? In many cases, they act synergistically. However, since it is hard to define growth models that take into account all the specific and unique characteristics of a certain product, the only way to check whether or not the food product is a breeding ground is to **perform a challenge test**.

There are two types of challenge tests: **the most frequently used test determines the growth potential**. Another option is to determine the maximum growth rate of *L. monocytogenes*: although suitable for predictive extrapolation, it involves performing numerous experimental tests, resulting in increased costs.

Performing a challenge test is a process that is made up of several steps, and a standard study cannot be defined beforehand; in fact, the next stages will be determined based on the results achieved in these various steps:

Product characterisation

The milestone of a challenge test is to clearly and unambiguously define the characteristics of the product being studied. The obtained results will only be applicable to products that are made with the same recipe, process, packaging and storage method and with constant pH, Aw and microbial flora. These three parameters are to be determined through experiments conducted on multiple production batches in order to prove that the product is standardised, while the others are reported according to the manufacturer's specifications.

Preparation of the inoculum

The laboratory prepares the suspension with which the food product will be contaminated to ensure contamination in a concentration range between 50 and 200 cfu/g, using suitably characterised strains, which differ according to the matrix and its characteristics.

Study programme and contamination of aliquots

Once the product has been characterised and the results have been evaluated, the study programme can be defined by deciding on the number of batches, aliquots, steps, etc. for the subsequent stages. The next step is contamination, which takes place on the packaged product after production. Homogenous contamination is of paramount importance, and it must be carried out without altering the chemical and physical characteristics of the food product or its packaging.

Analytical phase

The samples are analysed at time zero, at the end of the shelf life being examined (final T) and at three intermediate times as agreed between the laboratory and the manufacturer. The primary analysis is the count of *L. monocytogenes*, alongside other parameters required to interpret the results.

Processing data and drafting the final report

All the results obtained are processed, evaluated and listed in a final report, where all the steps mentioned above are summed up, and where the final judgement determined by the value of the growth potential obtained is stated: if it is <0.5 log10, the food product is regarded as not being a breeding ground for the proliferation of *L. monocytogenes*.

In-vivo veritas?

- Francesca Turra, Microbiology Analyst di Renolab

- Matteo Calassanzio, Head of Microbiology Department di Renolab

Milioni di animali vengono utilizzati ogni anno per lo studio di nuovi farmaci, per testare gli effetti tossici di fertilizzanti e pesticidi, prodotti casalinghi e prodotti dell'industria come coloranti e vernici. Negli ultimi anni si sta delineando, però, un trend sempre più rivolto verso la sostituzione e riduzione dei test di tossicità eseguiti su animali in-vivo; non a caso l'impiego di animali vertebrati per fini scientifici nel nostro paese è regolamentato dal Decreto legislativo del 4 marzo 2014, n. 26 che attua la Direttiva europea n. 2010/63/UE per la protezione degli animali utilizzati a fini scientifici.

L'ECHA (agenzia europea delle sostanze chimiche) ha pubblicato nel 2016 una guida pratica "all'uso di alternative alla sperimentazione sugli animali" allo scopo di evitare sperimentazioni superflue sugli animali vertebrati e di continuare ad assicurare la disponibilità di informazioni sulle proprietà delle sostanze chimiche per la classificazione e la valutazione dei rischi. L'agenzia supporta le aziende nell'attuazione e rispetto delle legislazioni specifiche dell'UE sulle sostanze chimiche o i biocidi garantendo l'uso sicuro per la salute e l'ambiente in base ai seguenti regolamenti:

- ✓ REACH (Registration, Evaluation Authorisation and Restriction of Chemicals)
- ✓ Classificazione, etichettatura e imballaggio (CLP)
- ✓ Regolamento sui biocidi (BPR)
- ✓ Regolamento sul previo assenso informato (PIC)

Effettuare una sperimentazione *in-vitro* significa eseguirla al di fuori di un organismo vivente, solitamente utilizzando tessuti, organi o cellule isolati. I recenti progressi nella scienza tossicologica, nella bioinformatica e nella biologia dei sistemi hanno fornito i mezzi per trasformare la tossicologia in una

scienza predittiva. I modelli animali sono modelli approssimativi per le risposte tossiche umane: utilizzando queste conoscenze sui processi fisici, chimici e biologici, è possibile adottare un approccio multidisciplinare basato su ipotesi, integrando metodi *in-vitro* con metodologie computazionali (in silico) ed approcci omici (ad es. proteomica, genomica e metabolomica: approcci promettenti per studiare l'impatto di sostanze tossiche sull'espressione di geni, proteine e metaboliti cellulari). Grazie a questo approccio integrato, è possibile identificare potenziali sostanze tossiche sulla base della comprensione dei loro meccanismi di azione biologica.

Questi metodi, a volte indicati come "metodi non sperimentali", possono essere utilizzati per ridurre la nostra dipendenza dai test sperimentali e, in particolare, dai test sugli animali, quando questi non sono strettamente necessari.

I metodi *in-vitro* si dividono tra quelli che si conformano ai criteri di convalida internazionali e quelli che non adempiono a tali criteri. Per la registrazione al REACH, è preferibile usare metodi sufficientemente ben sviluppati secondo i criteri internazionali per lo sviluppo delle sperimentazioni – Ad es. i criteri di prevalidazione del Centro Europeo per la con-

valida di metodi alternativi (ECVAM). Le modifiche apportate nel 2016 agli allegati VII e VIII del regolamento REACH rendono i metodi di sperimentazione *in-vitro* l'opzione predefinita per alcune proprietà tossicologiche.

Il REACH si applica in linea di principio a tutte le sostanze chimiche industriali, ma anche di uso comune, che devono essere classificate secondo l'approccio stabilito dal CLP (regolamento (CE) n. 1272/2008). I pericoli relativi alle sostanze chimiche devono essere comunicati chiaramente ai lavoratori e ai consumatori, attraverso la classificazione e l'etichettatura delle sostanze stesse.

Questa classificazione può essere determinata con l'applicazione dei metodi di prova *in-vitro*, descritti nel regolamento 440/2008 per la determinazione delle proprietà chimico-fisiche, di tossicità e di ecotossicità delle sostanze chimiche applicabili al fine del regolamento REACH.

I test previsti devono essere condotti, secondo quanto descritto nelle specifiche OECD Test Guidelines, in centri di ricerca certificati per le GLP (Good Laboratory Practice) e devono essere validati da centri come l'ECVAM che ha proprio il compito di validare nuovi test di tossicità *in-vitro*, che possano sostituire, almeno in parte, i test in vivo.

I modelli sperimentali che non prevedono l'utilizzo di animali si inseriscono nel contesto della strategia definita delle 3 R ovvero Replacement (sostituzione), Reduction (riduzione) e Refinement (ottimizzazione).

Questa strategia prevede infatti di utilizzare, quando è possibile, dei metodi alternativi di analisi, di ridurre il numero di cavie utilizzate e migliorare le condizioni degli animali in laboratorio al fine di limitarne la sofferenza. In quest'ottica di salvaguardia e protezione delle specie animali, già a partire dal 2013,

gli stati membri dell'Unione Europea hanno abolito la sperimentazione animale per la produzione di cosmetici, ma è bene sottolineare che l'uso dell'animale rimane ancora fondamentale per esempio nel contesto medico, farmaceutico o veterinario per via della grande somiglianza biologica con l'uomo.

Grazie all'attività di validazione dell'ECVAM, che ha reso disponibili un numero sempre maggiore di test *in-vitro*, dal 2016 al 2019 è triplicato l'uso dei test di corrosione/irritazione cutanea, quadruplicato quello per lesioni oculari gravi/irritazioni oculari ed è aumentato di oltre venti volte l'utilizzo di quelli di sensibilizzazione cutanea.

Renolab è in grado di supportare le aziende nello sviluppo di test tossicologici *in-vitro* in accordo con le BPL, tra cui alcuni esempi sono OECD 437, 431, 439, 492 e altri test, sempre nel campo dei saggi di irritazione cutanea e oculare, affinché si possano limitare gli esperimenti condotti sugli animali se non necessari. Inoltre, l'uso dei test *in-vitro* assume una notevole importanza perché consentirebbe la classificazione non solo delle sostanze e delle miscele, come richiesto dal regolamento CLP 1272/2008, ma anche l'attribuzione delle caratteristiche di pericolo dei rifiuti al fine dello smaltimento che viene regolamentato dalla direttiva UE n. 1357/2014 sui rifiuti, in linea proprio con il regolamento CLP. I test *in-vitro* sopra elencati, per esempio, verrebbero utilizzati per escludere la classificazione di pericolo di rifiuti appartenenti alle categorie **HP4 Irritante** per irritazione cutanea e lesioni oculari e **HP8 Corrosivo** in particolare a livello cutaneo.



In-vivo veritas?

- Francesca Turra, Microbiology Analyst at Renolab

- Matteo Calassanzio, Head of Microbiology Department at Renolab



Tillions of animals are used every year to study new drugs and test the toxic effects of fertilisers and pesticides, household products and industrial products such as dyes and paints. In recent years, however, there has been an increasing trend towards replacing and reducing toxicity tests performed on in-vivo animals. Not surprisingly, the use of vertebrate animals for scientific purposes in our country is regulated by (It.) Legislative Decree No. 26 of 4 March 2014, implementing European Directive No. 2010/63/EU on the protection of animals used for scientific purposes.

In 2016, ECHA (European Chemicals Agency) published a practical guide on “how to use alternatives to animal testing” to avoid unnecessary testing on vertebrate animals and to ensure that information on the properties of chemicals remains available for classification and risk assessment. The agency assists companies in implementing and complying with specific EU legislation on chemicals or biocides by ensuring that they are used safely concerning health and the environment, and in compliance with the following regulations:

- ✓ REACH (Registration, Evaluation Authorisation and Restriction of Chemicals)
- ✓ Classification, Labelling and Packaging (CLP)
- ✓ Biocidal Products Regulation (BPR)
- ✓ Prior Informed Consent (PIC) Regulation

Conducting an in-vitro experiment means that it is performed outside a living organism, normally using isolated tissues, organs or cells. New advances in toxicological sciences, bioinformatics and systems biology have given us the means to turn toxicology into a predictive science. Animal models are only approximate models for human toxic responses: by harnessing this knowledge of physical, chemical and biological processes, we can adopt a multidisciplinary hypothesis-based approach, combining in-vitro methods with computational (in silico) and omics approaches (such as proteomics, genomics and metabolomics: these are all promising approaches for studying the impact of toxic substances on the expression of genes, proteins and cell metabolites).

This integrated approach allows potential toxic substances to be identified by understanding their mechanisms of biological action. Moreover, by using these methods, occasionally referred to as “non-experimental methods”, we can start relying less on experimental tests, especially animal tests, when they are not strictly necessary.

In-vitro methods can be divided into methods that comply with international validation criteria and those that do not comply with such criteria. To register with REACH, it is advisable to use sufficiently well-developed methods based on international criteria for the development of trials, such as the prevalidation criteria of the European Centre for the Validation of Alternative Methods (ECVAM). The amendments made in 2016 to Annexes VII and VIII of REACH make in-vitro testing methods the default option for specific toxicological properties.

In principle, REACH applies to all industrial chemical substances and commonly used chemicals as well, which must be classified according to the approach set out in the CLP (Regulation (EC) No. 1272/2008). Workers and

consumers must be well informed about the hazards of chemicals through substance classification and labelling.

This classification can be determined by applying the in-vitro test methods described in Regulation 440/2008 to assess the physical, chemical, toxicity and ecotoxicity properties of chemicals applicable for the purpose of the REACH regulation. The required tests must be conducted as described in the specific OECD Test Guidelines in research centres certified according to GLP (Good Laboratory Practice), and they must also be validated by centres such as ECVAM, whose task is actually to validate new in-vitro toxicity tests that can replace, at least in part, in-vivo tests. Experimental models that do not involve the use of animals fit into the context of the so-called three-R strategy, that is, Replacement, Reduction and Refinement. In fact, this strategy involves using – whenever possible – alternative methods of analysis, reducing the number of test subject used, and improving the conditions of animals in the laboratory to minimise their suffering. As part of this effort to preserve and protect animal species, the EU member states banned animal testing for the production of cosmetics as early as 2013. Nevertheless, it is worth noting that the use of animals for such purposes is still crucial, for example, in the medical, pharmaceutical or veterinary fields, since their biological characteristics are very similar to those of humans.

As a result of ECVAM's validation activities, which have made an increasing number of in-vitro tests available, the use of skin corrosion/irritation tests increased threefold from 2016 to 2019, and has even increased fourfold for severe eye injury/eye irritation, while the use of skin sensitisation tests has increased more than twentyfold.

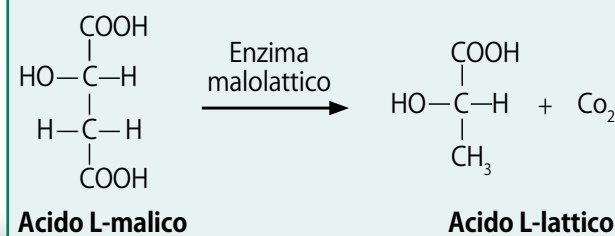
Renolab assists companies with developing in-vitro toxicological tests in compliance with the GLP. A few examples are OECD 437, 431, 439, 492 and other tests, also in the area of skin and eye irritation tests, so that animal experiments that are not necessary can be minimised. Moreover, the use of in-vitro tests is particularly important as it would allow not only substances and mixtures to be classified, as required by the CLP Regulation 1272/2008, but also the hazard characteristics of waste to be assigned for disposal purposes, which is regulated by EU Directive No. 1357/2014 on waste, and is precisely in line with the CLP Regulation. For instance, the in-vitro tests listed above could be used to exclude the hazard classification of waste belonging to the categories **HP4 Irritant** – skin irritation and eye damage, and **HP8 Corrosive**, in particular for the skin.

Fermentazione malolattica: fermi di fermentazione e come prevenirli

Dr. Andrea Lisca, Microbiology & Molecular Biology Manager di C.A.I.M.

La fermentazione malolattica è stato un argomento molto dibattuto nel tempo. “È dal 1922-1928 in Borgogna con i lavori di L. Ferre (1922) e, in particolare, a partire dal 1936-1938 con quelli di J. Ribèreau-Gayon a Bordeaux che è stata chiaramente dimostrata l'esistenza del fenomeno e, soprattutto, la sua importanza come tappa fondamentale nella vinificazione dei vini rossi di qualità. Eppure le conoscenze teoriche su questo fenomeno, in apparenza semplici, sono state difficili da far accettare. Per lungo tempo la fermentazione malolattica è stata descritta, nei libri di enologia, nel capitolo delle malattie del vino. Allo stesso tempo certe scuole ufficiali di enologia ne contestavano la stessa esistenza, e soprattutto l'interesse di questa fermentazione secondaria”. [P. Ribèreau-Gayon]

La malolattica è una fermentazione condotta esclusivamente dai Batteri Lattici (LAB), una grande “famiglia” che comprende moltissimi generi diversi. La reazione chimica si traduce in una semplice decarbossilazione dell'Ac. malico che, con la perdita di una molecola di anidride carbonica, si converte in Ac. lattico. Il metabolismo complesso dei LAB, oltre alla produzione di lattato, genera altre molecole che conferiscono alla matrice, sul piano gustativo, un considerevole miglioramento.



Il sapore proprio dell'acido malico, corrispondente all'asprezza acida della mela non matura, mal si armonizza con l'astringenza dei tannini.

La sua sostituzione con l'anione lattico, acido del latte molto più dolce e meno aggressivo sulle papille gustative, genera un ammorbidimento del vino che è il primo risultato della riduzione dell'acidità.

I vini rossi perdono, così, il loro carattere acido, ruvido, e diventano più morbidi, più corposi e più “grassi”.

Il controllo del vino per questa fermentazione, normalmente, inizia dopo la svinatura eseguendo analisi specifiche per verificare la presenza di precursori chimici come l'Ac. malico e zuccheri residui. Per garantire un buon sviluppo microbico è necessa-

rio valutare anche pH, azoto residuo, titolo alcolometrico e la concentrazione di solforosa libera (SO_2). I Batteri Lattici sono microrganismi abbastanza “delicati”, pertanto può capitare che la fermentazione malolattica non “parta” a causa di diversi fattori che nella pratica di cantina si cerca sempre di prevenire. Il primo elemento da tenere in considerazione, in caso di fermo di fermentazione, è il pH che per un'ottimale crescita microbica *in vitro* è fissato tra 4.2 e 4.5 ma nella matrice vino la fermentazione diviene possibile già oltre pH 3.3. Per l'ottimale sviluppo dei microrganismi altri fattori limite sono la temperatura che deve aggirarsi tra i 20 e 25 °C e il grado di solfitazione che non deve mai essere eccessivo altrimenti ritarderebbe il progredire della fermentazione.

La grande sensibilità dei batteri al diossido di zolfo è ben nota, ed essendo maggiore dei lieviti permette di avviare la fermentazione alcolica con sicurezza. D'altra parte il diossido di zolfo interviene sui batteri, non solamente come frazione libera, ma anche come frazione combinata.

Per questa ragione, al termine di una conservazione di parecchi mesi, con solfitazioni tradizionali che aumentano regolarmente il tenore in SO_2 totale, la fermentazione malolattica diventa difficile, se non impossibile, anche con un basso tenore di SO_2 libera. Generalmente, in una cantina che abbia vinificato in condizioni ottimali parecchie vasche, è possibile che la fermentazione malolattica non avvenga in tutte. Per ovviare al problema, inizialmente, si devono riportare i parametri chimici a livelli ottimali di sviluppo per i LAB. Successivamente è possibile

o utilizzare una massa già in fermentazione come inoculo massiccio per le altre vasche o:

- Inoculare il mosto prima della fermentazione alcolica o durante (co-inoculo); il mezzo privo alcool, si presta meglio allo sviluppo batterico,
- Usare una biomassa batterica non proliferante, cioè una coltura *starter* sufficientemente elevata da assicurare la degradazione dell'Ac. malico senza moltiplicazione cellulare,
- Inoculare il vino, dopo la fermentazione alcolica principale con *starter* industriale riattivato in matrice subito prima dell'impiego. Questa fase di adattamento risulta uno step fondamentale per meglio agevolare il microrganismo in fase di sviluppo.

Per le colture *starter* si impiegano, in genere, ceppi di *Oenococcus oeni*, specie batterica meglio adattata alla fermentazione malolattica. Per molto tempo un inoculo di questo tipo ha portato a diversi insuccessi, poiché i ceppi inoculati non riuscivano a svilupparsi nella matrice vino a causa delle diverse condizioni ambientali (es. pH e grado alcolico). L'interpretazione di questo fenomeno si può trovare nel processo di sviluppo industriale in cui essi sono coltivati su mezzi favorevoli alla loro crescita e sono quindi adattati a queste condizioni ottimali. Quando vengono trasferiti nel vino, mezzo infinitamente meno favorevole, devono subire un adattamento di matrice che è tanto più difficile quanto più i parametri chimici sono sfavorevoli. Per ovviare a questo problema le aziende produttrici hanno adattato il processo di sintesi e attuato una selezione dei ceppi più confacenti alla matrice di destinazione.





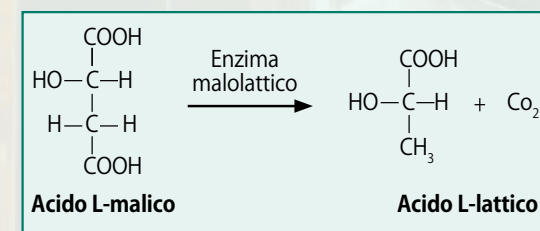
Malolactic fermentation: stuck fermentation and how to prevent it

Dr Andrea Lisca, Microbiology & Molecular Biology Manager at C.A.I.M.

Over the years, malolactic fermentation has been a widely debated topic. “The phenomenon and, especially, its importance as a key step in making high-quality red wines has been demonstrated since 1922-1928 in Burgundy with the work of L. Ferre (1922) and, in particular, from 1936-1938 with that of J. Ribèreau-Gayon in Bordeaux. And yet theoretical knowledge about this phenomenon, although apparently simple, has not been easy for many to accept. Malolactic fermentation has long been described in oenology books in the chapter concerning wine diseases. In parallel, certain official schools of oenology questioned the very existence, and above all the appeal, of this secondary fermentation”. [P. Ribèreau-Gayon]

Lactic Acid Bacteria (LAB), a large “family” comprising many different genera, are exclusively responsible for malolactic fermentation.

The chemical reaction takes place as a simple decarboxylation of Malic acid, which, by losing a molecule of carbon dioxide, converts to Lactic acid. The complex metabolism of LAB generates not only lactate production, but also other molecules that considerably enhance the matrix in terms of taste.



The characteristic taste of malic acid, which corresponds to the acidic sharpness of unripe apples, does not harmonise well with the astringent qualities of the tannins.

It is replaced by lactate anion, a milk acid that is much sweeter and less harsh on the taste buds, which allows for a softer wine and is the first result of the reduced acidity. In this way, red wines lose their acidity and roughness and become softer, more full-bodied, and “fatter”.

Checking wine for such fermentation generally starts after racking by conducting specific analyses to determine whether chemical precursors such as Malic acid and residual sugars are present. In order to ensure that microbes develop well, the pH, residual nitrogen, alcoholic strength and concentration of free sulphur dioxide (SO₂) also need to be assessed.

Lactic bacteria are rather “delicate” micro-organisms; therefore, it may often be the case that malolactic fermentation does not ‘start’ due to various factors that should always be avoided in winemaking.

The first element to be considered when stuck fermentation occurs is the pH, which for optimal microbial growth in vitro is set at between 4.2 and 4.5. However, in the wine matrix, fermentation is already possible above a pH of 3.3.

When it comes to ensuring that microorganisms develop in the best possible way, other limiting factors are temperature, which has to be between 20 and 25 °C, and the degree of sulphurisation, which should never be excessively high since it would delay the progress of fermentation.

It is a well-known fact that bacteria are highly sensitive to sulphur dioxide, and since they are more sensitive to it than yeasts, alcoholic fermentation can safely begin. Sulphur dioxide, on the other hand, acts on bacteria not only as a free fraction but also as a combined fraction.

For this reason, after being stored for several months, with traditional sulphurisation that regularly increases the total SO₂ content, malolactic fermentation becomes difficult, or even impossible, even with a low free SO₂ content.

In general, if a winery has vinified a number of vats under optimal conditions, it is likely that malolactic fermentation will not take place in all of them. Initially, to solve this problem, the chemical parameters need to be restored to optimal developmental levels for LAB. It is then possible to use an already fermenting mass as a massive inoculum for the other tanks or, alternatively:

- The must should be inoculated before alcoholic fermentation or during alcoholic fermentation (co-inoculation); this is because the alcohol-free medium is better suited to bacterial development;
- Non-proliferating bacterial biomass should be used, that is, a starter culture that is high enough to ensure Malic acid breakdown without cell multiplication;
- Wine should be inoculated, after the primary alcoholic fermentation, with an industrial starter, which is reactivated in the matrix shortly before use. This adaptation phase is a key step to make it easier for the microorganism to develop;

Strains of *Oenococcus oeni*, a bacterial species that is best adapted to malolactic fermentation, are generally used for starter cultures. For a very long time, this type of inoculation resulted in a series of failures since the inoculated strains could not develop in the wine matrix because of varying environmental conditions (e.g. pH and alcohol content). An interpretation of this phenomenon may be found in the industrial development process whereby they are cultivated on media that favour their growth, so they adapt to these optimal conditions. When transferred into wine, which is an infinitely less favourable medium, they are subjected to a matrix adaptation that is made more difficult if the chemical parameters are not favourable. To address this issue, wine producers have adapted the synthesis process and selected the strains that are best suited to the target matrix.

I batteri nella depurazione biologica: piccoli organismi, grande missione

- Dott.ssa Giulia Carini, Head of Chemistry and Biology di MK
- Dott. Jacopo Cima, Chemistry Laboratory Technician di MK

La depurazione biologica a fanghi attivi è conosciuta da più di 80 anni e tutt'oggi è utilizzata nella maggior parte dei trattamenti dei liquami civili ed industriali. I controlli convenzionali come le determinazioni chimiche non sempre forniscono indicazioni efficienti sulla qualità biologica di depurazione, per questo l'osservazione microscopica del fiocco di fango è un utile strumento di monitoraggio, diagnosi e gestione del processo depurativo dei liquami.

I batteri vengono comunemente associati allo sporco e alle patologie più disparate, ma sono proprio alcuni microrganismi a favorire opere di decontaminazione, come accade nel caso della depurazione biologica delle acque.

Il processo a fanghi attivi infatti si basa sulla formazione di aggregati batterici (fiocchi di fango) su cui altri microrganismi possono svilupparsi.

I microrganismi presenti nei fanghi di depurazione delle acque sono come una grande e numerosa popolazione di lavoratori che senza mai concedersi il minimo riposo operano per noi, convertendo le sostanze organiche complesse in sostanze inorganiche più semplici, come: CO_2 , H_2O , NH_4^+ , NO_2^- e NO_3^- .

La comunità microbica si differenzia in base alle condizioni ambientali che si presentano ed è rappresentata sia da decompositori (batteri e funghi) che da consumatori (protozoi ciliati, flagellati e piccoli metazoi), i quali predano i batteri dispersi e altri organismi.

Il riconoscimento delle varie forme di consumatori che costituiscono la microfauna è di fondamentale importanza al fine della valutazione della performance del reattore biologico.

Infatti, l'identificazione della specie più presente permette all'operatore di stimare il grado di efficienza depurativa e di avere indicazioni sulle cause di eventuali disfunzioni (Indice Biotico del Fango **SBI**).

Per individuare la densità numerica e la diversità di *taxa* presenti nel fango attivo, in laboratorio si allestisce un vetrino con 25 μl di campione che verrà poi osservato al microscopio ottico in campo chiaro a 100x.

I principali microrganismi consumatori ricono-

scibili nel fango attivo appartengono ai seguenti *taxa*: ciliati, flagellati, amebe e piccoli metazoi.

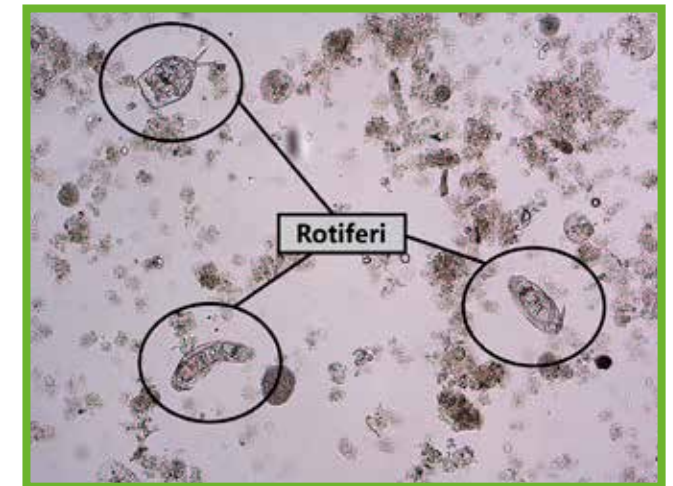
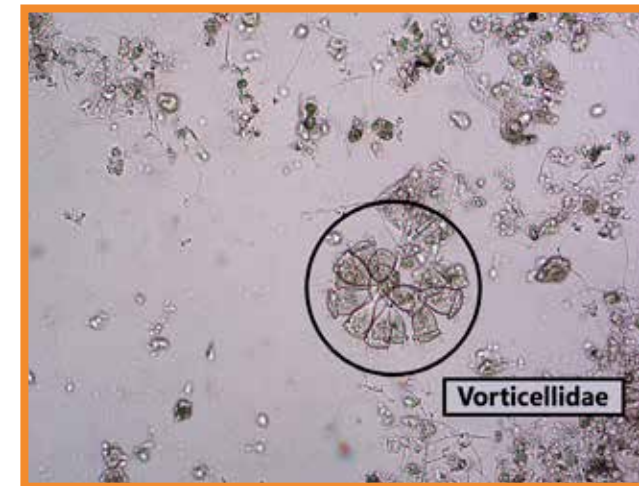
I ciliati sono un gruppo di microconsumatori con dimensioni relativamente grandi rispetto agli altri protozoi (20-200 μm).

I loro movimenti veloci e la loro varietà di forme li rendono in special modo evidenti all'osservazione microscopica. Le ciglia di cui sono dotati sono utilizzate per la locomozione e per trattenere le particelle sospese intorno ad essi.

Una famiglia di ciliati molto comune nei fanghi attivi è quella delle *Vorticellidae*, presenti come individui singoli o elementi coloniali, caratterizzate dal corpo a forma di campana. La loro presenza è indice di molteplici caratteristiche del fango, ma generalmente sono associate ad un fango giovane, una buona ossigenazione ed un'elevata efficienza depurativa del reattore biologico.

Un altro di gruppo di protozoi in genere molto numeroso nei fanghi attivi è quello dei flagellati. Questi microrganismi possiedono uno o più flagelli, ovvero prolungamenti mobili di lunghezza maggiore rispetto alle ciglia, con movimenti paragonabili a quelli di una frusta.

La loro assenza può indicare che il reattore biologico sta ricevendo liquami diluiti o che presentano un basso carico organico. Al contrario, la presenza di grandi quantità di piccoli flagellati è associata ad un sovraccarico organico in ingresso, ad una scarsa efficienza depurativa del reattore biologico, con l'effluente finale che conterà alte concentrazioni di **BOD**.



Le amebe sono protozoi privi di membrana cellulare che si muovono per mezzo di proiezioni del citoplasma, che servono anche per catturare il cibo.

Alcune amebe posseggono una teca di materiale organico o di particelle inorganiche saldate intorno al corpo. Sono molto abbondanti o dominanti nei fanghi caratterizzati da basso carico, lungo tempo di ritenzione e alta concentrazione di ossigeno disciolto, condizioni che permettono di ottenere una completa nitrificazione. In tali condizioni la qualità dell'effluente è eccellente e la performance biologica dell'impianto raggiunge i massimi valori. I metazoi sono costituiti da più cellule e per questo il loro ciclo riproduttivo è più lento di quello dei protozoi. La loro presenza negli impianti di depurazione è indice di un fango con età avanzata, ma ben strutturato.

Le specie di metazoi più comunemente osservati nei fanghi attivi sono: rotiferi, nematodi, oligocheti e gastrotrichi.

Guardando il campione di fiocco al microscopio ottico, è possibile imbattersi nei batteri filamentosi che sono causa di problemi di bulking.

Questo fenomeno avviene quando questi microrganismi creano dei ponti tra i fiocchi di fango, causando una riduzione della velocità di sedimentazione. L'eccessiva presenza di batteri filamentosi può essere dovuta ad una serie di fattori tra cui: nutrienti carenti, basso ossigeno disciolto, pH basso, acque settiche ricche di solfuri. È perciò importante identificare e stimare la microfauna del reattore biologico al fine di conoscerne le condizioni e predisporre eventuali interventi correttivi.

Bacteria in biological purification: small organisms, big mission

- Dr. Giulia Carini, Head of Chemistry and Biology at MK
- Dr. Jacopo Cima, Chemistry Laboratory Technician at MK



Biological activated sludge purification has been popular for more than 80 years and is still used today in almost all civil and industrial sewage treatments. Conventional checks such as chemical determinations do not always provide accurate information on the biological quality of sewage, which is why microscopic observation of sludge flocs is extremely helpful for monitoring, diagnosing, and managing the sewage purification process.

While bacteria are normally associated with dirt and a wide range of diseases, certain microorganisms are actually involved in decontamination activities, as is the case with biological water purification. As a matter of fact, the activated sludge process relies on the formation of bacterial aggregates (sludge flocs) on which other microorganisms can grow.

The microorganisms in sewage sludge are like a large workforce that, without ever taking a break, work for us, transforming complex organic substances into more simple inorganic substances, such as: CO_2 , H_2O , NH_4^+ , NO_2^- e NO_3^- . The microbial community varies depending on environmental conditions and consists of both decomposers (bacteria and fungi) and consumers (ciliated protozoa, flagellates, and small metazoans), which prey on scattered bacteria and other organisms.

It is essential to recognise the different forms of consumers that make up the microfauna to assess the performance of the bioreactor. In fact, by identifying the most commonly found species, operators can estimate the degree of purification efficiency and get an idea of what is causing any dysfunctions (**SBI**, i.e. Biotic Sludge Index).

In order to determine the number density and diversity of taxa in activated sludge, a slide is prepared in the laboratory with a 25 μl of the sample, which is then observed under an optical microscope in bright field mode at 100x.

The main consumer microorganisms that can be recognised in activated sludge belong to the following taxa: ciliates, flagellates, amoebae, and small metazoans.

Ciliates are a group of micro consumers that are relatively large in size compared to other protozoa (20-200 μm). Their fast movements and different shapes make them particularly noticeable when observed under a microscope. The cilia they have are used for locomotion and to retain particles suspended around them.

A very common family of ciliates in activated sludge is that of the Vorticellidae, which are found as single individuals or in the form of colonies and have a bell-shaped body. While their presence reflects many sludge characteristics, they are usually associated with young sludge, good oxygenation, and the bioreactor has high purification efficiency.

Another group of protozoa that is usually quite common in activated sludge is that of flagellates. These microorganisms have one or more flagella, that is, mobile extensions longer than the cilia, with movements similar to those of a whip. If they are absent, this may mean that the bioreactor is receiving diluted sewage or that it has a low organic load. Instead, a large number of small flagellates is associated with an overload of incoming organic materials, and poor purification efficiency of the bioreactor, with the final effluent having high **BOD** concentrations.

Amoebas are protozoa that lack a cell membrane and move by projecting cytoplasm, which also helps them catch food. Some amoebae have a theca of organic material or inorganic particles attached to their body. They are highly abundant or dominant in sludge with low loading, long retention time, and high dissolved oxygen concentration, all conditions that lead to complete nitrification. Under such conditions, effluent quality is excellent, and the biological performance of the plant reaches maximum values.

Metazoa are made up of several cells, which is why their reproductive cycle is slower than that of protozoa. If they are found in sewage treatment plants, it means that the sludge is old but well structured. The metazoan species most frequently observed in activated sludge are rotifers, nematodes, oligochaetes, and gastrotrichs.

By looking at the floc sample under an optical microscope, filamentous bacteria can be observed, which are the cause of bulking issues. This occurs when these microorganisms create bridges between the sludge flocs, resulting in a reduced sedimentation rate. An excessive amount of filamentous bacteria can be due to several factors such as nutrient deficiency, low dissolved oxygen, low pH, and sulphide-rich septic waters. Consequently, it is crucial to identify and estimate the microfauna in the bioreactor to understand its condition and, if necessary, take corrective action.

NEWS DAL MONDO TENTAMUS

SPECIAZIONE DEI METALLI
PER L'ARSENICO INORGANICOMETALS SPECIATION
FOR INORGANIC ARSENIC

Esistono due diverse forme di arsenico: organico e inorganico – e i Columbia Labs eseguono test su entrambi.

L'arsenico inorganico è altamente tossico e può costituire, pertanto, un problema di salute pubblica; la forma di arsenico organica (comunemente presente nel pesce e nei frutti di mare) è meno dannosa. La principale fonte di esposizione all'arsenico inorganico è il cibo; in particolare, prodotti trasformati a base di cereali come pane di frumento, riso, latte, latticini e l'acqua potabile.

Il team di test nutrizionali di Columbia Labs consiglia di misurare prima l'arsenico totale e, successivamente, se il livello è eccessivo o supera il limite, di proseguire con l'analisi della speciazione in modo da determinare se l'arsenico inorganico è al di sopra o al di sotto dei limiti di qualità interni.

Nell'UE non sono previsti limiti per gli alimenti in generale, ma l'organismo dell'ONU per gli standard alimentari, la Codex Alimentarius Commission, ha fissato un livello massimo di arsenico nel riso equivalente a 0,2 mg per kg.

La FDA ha stabilito un livello massimo di concentrazione per l'arsenico inorganico nei cereali di riso per bambini di 100 µg/kg o 100 ppb. Questo stesso limite è diventato quello generalmente applicato a tutti prodotti alimentari.

Per ulteriori informazioni sui test dell'arsenico e sulla speciazione inorganica dell'arsenico, inviare una mail a: info@columbialaboratories.com. Un articolo di Robert Thomas sulla rivista "Spectroscopy" su questo argomento si concentra sulla regolamentazione dei metalli pesanti negli alimenti per bambini e mette in evidenza come la FDA sia stata richiamata da una sottocommissione del Congresso per non aver adeguatamente garantito la sicurezza alimentare dei cibi per bambini.

**Columbia Food Laboratories,
Inc. 12423 NE Whitaker Way - Portland, OR 97230, USA**



There are two different forms of arsenic: organic and inorganic – and Columbia Labs tests for both. Inorganic arsenic is highly toxic and is therefore a public health concern; the organic form (commonly found in fish and seafood) is less harmful.

The main source of exposure to inorganic arsenic is food; particularly grain-based processed products such as wheat bread, rice, milk, dairy products, and drinking water.

The nutritional testing team at Columbia Labs recommends measuring total arsenic first and then, if the level is too high or exceeds the limit, to continue with speciation analysis to determine whether the inorganic arsenic is above or below the internal quality limits.

No limits are set in EU for food in general, but, a maximum level for arsenic in rice has been set by the UN food standards body, the Codex Alimentarius Commission, at 0.2 mg per kg.

The FDA has established an action level for inorganic arsenic in infant rice cereals of 100 µg/kg or 100 ppb. This limit is generally applied to food products as a recommended action limit for inorganic arsenic.

For more information about Arsenic Testing, and Inorganic Arsenic Speciation, please email: info@columbialaboratories.com

An article by Robert Thomas in the 'Spectroscopy' magazine on this topic focuses on the regulation of heavy metals in baby food and highlights how the FDA was reprimanded by a congressional subcommittee for failing to adequately ensure the food safety of baby food.

**Columbia Food Laboratories,
Inc. 12423 NE Whitaker Way - Portland, OR 97230, USA**

NUOVA GESTIONE A BILACON GMBH

Da oltre 30 anni Bilacon supporta i clienti nel campo degli alimenti, dei mangimi, degli integratori alimentari e dei cosmetici con uno spettro analitico ampio e accreditato. Bilacon offre in un'unica struttura le competenze di analisi sensoriale, strumentale, chimico-fisica e microbiologica e risponde a tutte le domande sulla sicurezza dei prodotti dei clienti.

Nell'aprile 2022, la gestione di Bilacon GmbH è stata affidata a Karsten Ott e a Lutz Lehmann, che sostituiscono Abgar Barseyten in questo ruolo, svolto per oltre 10 anni, consentendogli di concentrarsi maggiormente sui suoi compiti di CEO del Gruppo Tentamus. "Sono convinto che questo sia il momento giusto per cedere la gestione e dedicarmi alla crescita e al successo di Tentamus – ha dichiarato Barseyten. – Con i colleghi Ott e Lehmann, affido la gestione a due leader molto esperti e assolutamente all'altezza del compito".

Karsten Ott lavora in azienda dal 1992 e ha diretto il dipartimento di analisi strumentali fino al 2018. Nel 2018 ha assunto la direzione di Bilacon a Berlino e ora attende con impazienza le sue nuove responsabilità come Managing Director: "Insieme siamo riusciti ad ottenere molto negli ultimi anni e, come nuovo Managing Director, vorrei continuare su questa strada e raggiungere ulteriori sviluppi positivi".

Lutz Lehmann è responsabile della regione DACH all'interno del Gruppo Tentamus dall'inizio dell'anno e non vede l'ora di "continuare il fruttuoso lavoro di Abgar Barseyten insieme a Karsten Ott".

Con i cambiamenti strutturali e di personale a livello operativo e strategico, Bilacon GmbH è nelle condizioni ottimali per proseguire il suo percorso di crescita e per offrire ai propri clienti il miglior servizio.

Bilacon GmbH - An der Industriebahn 5 - 13088 Berlino, Germania



TENTASTART

Consulenza per start-up per un ingresso di successo nel mercato

Hai una grande idea imprenditoriale, sei nella fase di start up della tua azienda di cosmetici o hai già creato una start up alimentare e ora sei alle prese con i primi passi per commercializzare i tuoi prodotti in sicurezza?

Ottimo, allora TentaStart è quello che fa per te.

Anche se sei un piccolo produttore, devi poter offrire un prodotto sicuro. Che si tratti di cioccolato, frullati, prodotti a base di canapa, dispositivi medici, cosmetici o integratori alimentari, in particolare per start-up e piccoli produttori, offriamo pacchetti di analisi di laboratorio e consigli di avvio che renderanno i tuoi prodotti commerciabili.

TentaStart ti guida nell'immettere i tuoi prodotti sul mercato in modo sicuro e offre ai nuovi imprenditori una consulenza iniziale individuale in cui gli esperti forniscono informazioni pratiche e complete su tutti i "must have" e tutte le sfide. Uno sguardo al concept e al packaging ci permette di valutare immediatamente quali misure e quali aspetti prendere in considerazione.

Come ti possiamo aiutare

- Etichettatura corretta dei tuoi prodotti alimentari
- Analisi dei tuoi prodotti in laboratorio
- Consulenza e supporto per la sicurezza dei tuoi prodotti

TENTASTART SOSTIENE I SEGUENTI SETTORI

Tentastart per start-up alimentari e integratori alimentari

In collaborazione con Bilacon, aiutiamo le start-up dell'industria alimentare e degli integratori alimentari a portare i propri prodotti sul mercato con successo e in totale sicurezza.

Grazie alla consulenza iniziale gratuita potrai conoscere i "must have" per la tua start-up alimentare e risolvere ogni dubbio. Ti offriamo supporto in ogni tua attività, indipendentemente dalla fase in cui ti trovi, dall'idea al prodotto pronto per essere immesso sul mercato.

Ti aiutiamo a creare un piano di analisi per l'esame della commerciabilità degli alimenti e ti supportiamo con la corretta etichettatura sulla confezione dei prodotti.

Inoltre, ti aiutiamo ad affrontare la giungla delle analisi nutrizionali, dei controlli sulla durata di conservazione e di tutte le altre analisi rilevanti per il tuo prodotto. Ti offriamo il nostro supporto in tutti i settori dell'industria alimentare: dalla consulenza sui prodotti e le analisi di laboratorio agli audit in loco.



TENTASTART

Start-up Consultancy for a successful market entry

You have a great business idea, are in the start-up phase of your own cosmetics company or are already the founder of your own food start-up and are now dealing with the right steps to safely market your products? Great – then

TentaStart is the right place for you. Even as a small manufacturer you want to be able to offer a safe product. Whether chocolate, smoothies, hemp products, medical devices, cosmetics or dietary supplements, especially for start-ups and small manufacturers,

we offer investigation packages and start-up advice that will make your products marketable.

TentaStart supports you in bringing your products safely to market and offers founders an individual initial consultation in which the experts provide practical and comprehensive information about the "must haves" and all challenges.

A look at the concept and packaging allows us to immediately assess what needs to be considered and what measures need to be taken.

Where we support you

- Correct Labelling of Your Food Products
- Analysis of your products in the laboratory
- Hygiene Consulting & Audits

TENTASTART SUPPORTS THE FOLLOWING SECTORS

Tentastart for food start-ups & dietary supplements

In cooperation with Bilacon, we help start-ups with products from the food and nutritional supplements industries to bring them successfully and safely into the market.

Thanks to the free initial consultation you can learn about the 'must-haves' for your food start-up and resolve any doubts. We offer you support in all your activities, regardless of the stage you are in, from idea to market-ready product.

We help you create an analysis plan for food marketability testing and support you with correct labelling on product packaging.

We also help you deal with the jungle of nutritional analyses, shelf-life checks and all other analyses relevant to your product. We support you in all areas of the food industry: from product consulting and laboratory analyses to on-site audits.



NEW MANAGEMENT AT BILACON GMBH

For more than 30 years, Bilacon has been supporting customers in the field of food, feed, food supplements and cosmetics with an extensive, accredited analytical spectrum. Bilacon offers sensory, instrumental, chemical-physical and microbiological analysis expertise in a single facility and answers all customer product safety questions.

In April 2022, the management of Bilacon GmbH was handed over to Karsten Ott and Lutz Lehmann, who replace Abgar Barseyten in this role, which he held for more than 10 years, allowing him to concentrate more on his tasks as CEO of the Tentamus Group. "I am convinced that this is the right time to hand over the management and dedicate myself to the growth and success of Tentamus," he said Barseyten. - Together with my colleagues Ott and Lehmann, I am entrusting the management to two very experienced leaders who are absolutely up to the task'. Karsten Ott has been with the company since 1992 and headed the instrumental analysis department until 2018. In 2018 he took over the management of Bilacon in Berlin and is now looking forward to his new responsibilities as Managing Director: "Together we have managed to achieve a lot in recent years and, as the new Managing Director, I would like to continue on this path and achieve further positive developments."

Lutz Lehmann has been responsible for the DACH region within the Tentamus Group since the beginning of the year and is looking forward to "continuing the successful work of Abgar Barseyten together with Karsten Ott".

With the structural and personnel changes on the operational and strategic level, Bilacon GmbH is well placed to continue its growth path and to offer its customers the best service.

Bilacon GmbH - An der Industriebahn 5 - 13088 Berlin, Germany



L'esperto RISPONDE

Ask the Expert



Cari Lettori, all'interno di questo spazio, abbiamo voluto racchiudere alcune, fra le tante, domande che ci avete inviato in questi mesi. Continuate a scrivere al vostro Laboratorio di riferimento; i nostri tecnici saranno a vostra disposizione per rispondere alle vostre domande. Le più frequenti e significative verranno riprese nel prossimo numero in uscita a dicembre 2022.

Dear Readers, within this space, we wanted to encapsulate some of the many questions you have sent us in recent months. Please continue to write to your reference laboratory; our technicians will be at your disposal to answer your questions. your questions. The most frequent and significant ones will be taken up in the next issue to be published in December 2022.

Una volta emesso un Rapporto di Prova (RdP) è possibile richiedere l'emendamento eliminando alcuni parametri o modificando la descrizione?

I RdP sono documenti ufficiali utilizzati per controllare la conformità di prodotti alimentari con implicazione sulla salute dei consumatori. Il laboratorio è responsabile della correttezza dei dati sia analitici che descrittivi del campione. Per questo deve controllare la liceità delle richieste di modifiche che comportano l'emissione di emendamento al RdP. In particolare:

- Non è possibile modificare la denominazione commerciale e il lotto di campioni ricevuti in confezioni pronte per la commercializzazione. La risoluzione EA 2014 (33)31 recepita da Accredia il 02/04/2015 indica che "il laboratorio non deve assumersi la responsabilità di dichiarare che il prodotto con il nuovo nome/marchio commerciale è esattamente identico a quello analizzato; questa responsabilità è a carico del cliente".
- Non è possibile scorporare o eliminare parametri non conformi fatto salvo riportare in emendamento la descrizione puntuale della modifica apportata: il laboratorio conserva registrazione di tutte le fasi del processo (come previsto da UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2018 par. 7.5) ed è obbligato a metterla a disposizione in caso di controllo delle Autorità per la vigilanza sul mercato.

Richieste di modifiche ai RdP non in linea con la trasparenza e l'eticità vengono rifiutate per non esporre il cliente e il laboratorio stesso al rischio di sanzioni in caso di controlli.

• agriparadigma@agriparadigma.it •

Once a Test Report (TR) has been issued, can an amendment be requested by omitting certain parameters or changing the description?

Test Reports are official documents used to check the compliance of food products that may affect consumers' health. The laboratory must ensure that the samples' analytical and descriptive data are correct. For this reason, the laboratory must check the lawfulness of requests of changes resulting in the issue of amendments to the TR. Specifically: The trade name and batch of samples received in ready-to-market packages cannot be changed. EA Resolution 2014 (33)31 implemented by Accredia on 02/04/2015 sets out that "the laboratory should not be held liable for stating that the product with the new name/trademark is exactly the same as the one analysed; this is the client's responsibility".

Non-compliant parameters cannot be split up or omitted unless the specific description of the change is included in the amendment: the laboratory must keep records of all the steps involved in the process (as set out in UNI CEI EN ISO/IEC 17025:2018 par. 7.5) and is expected to make them available whenever the Market Surveillance Authorities perform checks.

Requests for changes to the TR that are not in line with the principles of transparency and ethics are rejected to avoid exposing the client, and the laboratory itself to a fine in case checks are performed.



Se il mio prodotto dovesse risultare corrosivo dopo aver eseguito il test "Corrosive to metals" - UN Test C.1, Section 37, UN-MTC, cosa devo fare?

In accordo alle "Recommendations on the Transport of Dangerous Goods-Seventh revised ed. - United Nations, 2019", deve essere valutato e descritto il tipo di corrosione verificatosi sui provini sottoposti al test. Qualora si verificasse una corrosione localizzata (pitting) sarà necessario eseguire un'analisi metallografica della superficie del provino, volta ad ottenere la profondità del "pit" (buco). La classificazione in questo caso sarà basata sulla minima profondità raggiunta in 7 giorni di esposizione, se maggiore di 120 micron il prodotto è classificato come corrosivo.

Nel caso in cui si verificasse una corrosione uniforme la classificazione viene effettuata in base alla perdita in peso subita dai provini nei 7 giorni di esposizione: il prodotto è corrosivo se tale perdita di peso è superiore al 13.5%.

What should I do if my product is found to be corrosive after performing the test "Corrosive to metals" - UN Test C.1, Section 37, UN-MTC?

In accordance with the "Recommendations on the Transport of Dangerous Goods-Seventh revised ed. - United Nations, 2019", the type of corrosion occurring on the test specimens will have to be assessed and described. If localised corrosion (pitting) occurs, a metallographic analysis of the specimen surface will have to be conducted to determine the depth of the "pit". In this case, the classification will be based on the minimum depth reached during a 7-day exposure period. If it is larger than 120 microns, the product is classified as corrosive.

If uniform corrosion occurs, classification is based on the weight loss suffered by the specimens during the 7-day exposure period: if this weight loss is greater than 13.5%, the product is corrosive.



• info@renolab-glp.com •

Amminoacidi liberi, dopo idrolisi o totali? La scelta corretta del parametro d'analisi

Gli amminoacidi sono composti chimici organici; la loro unione determina la formazione delle proteine. Il valore biologico di una proteina animale o vegetale è in relazione al contenuto di amminoacidi essenziali. A livello gastroenterico è solo grazie al processo digestivo che si verifica la trasformazione della proteina, assunta con la dieta, in brevi catene peptidiche e, nella maggior parte dei casi, in singoli amminoacidi. Una volta resi disponibili solo una parte di essi, causa molteplici fattori, viene effettivamente digerita ed utilizzata. Nasce così l'esigenza di aggiungere alla dieta degli amminoacidi di sintesi che risultano essere, per contro, disponibili e digeribili al 100%. Il contenuto totale dell'amminoacido X è dato dalla somma dell'amminoacido X proveniente dalla dieta e dell'amminoacido X di sintesi addizionato alla razione alimentare. È possibile discriminare con una analisi i singoli contributi? La risposta è chiaramente affermativa. Se si vuole conoscere il quantitativo di amminoacido X aggiunto di sintesi, in quanto già libero e disponibile, si dovrà far richiesta della forma "libera"; se invece si vuole conoscere il quantitativo dell'amminoacido X introdotto con la dieta e quindi sia la componente naturalmente presente nella razione alimentare che quella di sintesi eventualmente aggiunta, si dovrà far richiesta della forma "dopo idrolisi". L'idrolisi chimica, nel nostro caso, simula quello che succede, appunto, a livello gastroenterico. Se si desidera conoscere entrambi i contributi occorrerà far richiesta del totale, ossia libera e dopo idrolisi.

• info@laemmegroup.it •



Free amino acids, after hydrolysis or total? How to choose the right analysis parameter

Amino acids are organic chemical compounds; when combined, they form proteins. The biological value of an animal or plant protein depends on the number of essential amino acids it contains. At a gastrointestinal level, it is only through the digestive process that dietary protein intake is processed into short peptide chains and, in most cases, into single amino acids. Once only part of them is made available, due to multiple factors, it is actually digested and used. This is why it is necessary to add synthetic amino acids to our diet, which, instead, are 100% available and digestible. The total number of amino acid X is calculated by summing the dietary intake of amino acid X and the synthetic amino acid X added to the food ration. Can individual contributions be distinguished through an analysis? The answer is yes, of course. If we want to know the number of added synthetic amino acid X, as it is already free and available, we will need to ask for the "free" form. However, if we want to know the number of amino acid X taken in through diet, and therefore, both the component that is naturally present in the food ration and the synthetic component that may have been added, we will need to ask for the "after hydrolysis" form. In our case, chemical hydrolysis simulates what happens in the gastrointestinal tract. If we want to know what the amount of these contributions is, we will have to ask for the total, that is, free and after hydrolysis.

In uno stato vitale ma non coltivabile (VBNC) il *Brettanomyces bruxellensis* è capace di danneggiare il vino? La presenza del microrganismo è sempre legata ad un aumento dei fenoli volatili?

La vitalità ma non coltivabilità può essere indotta dalla combinazione di diversi fattori, ad esempio SO_2 molecolare > 0.25 mg/L, carenza di zuccheri e azoto. In questo stato, il microrganismo, non è più in grado di formare direttamente colonie in piastra, riduce il suo volume cellulare alla metà e così anche le sue funzioni vitali. Avendo solo un metabolismo basale non è in grado di causare seri danni al prodotto. Ciò a cui bisogna prestare molta attenzione è che il *Brett* è solo "addormentato" e nel momento in cui la matrice torna ad essere favorevole al suo sviluppo, egli riprende un metabolismo di mantenimento e si replica molto velocemente. Per questo motivo è comunque necessario controllare costantemente la sua concentrazione, utilizzando tecniche analitiche di coltura indipendenti che permettono di determinarne la concentrazione corretta anche in stato VBNC. Per rispondere alla seconda parte della domanda, non sempre un'alta concentrazione fenolica si accompagna ad un incremento o presenza del *B. bruxellensis*, poiché anche altri microrganismi o enzimi liberi del vino sono capaci di trasformare i fenoli.

• info@caimgroup.it •



In a viable but nonculturable (VBNC) state, can *Brettanomyces bruxellensis* spoil wine? Is the presence of microorganisms always linked to an increase in volatile phenols?

A viable but nonculturable state can be triggered by a combination of factors such as molecular $SO_2 > 0.25$ mg/L and sugar and nitrogen deficiency. In this state, the microorganism can no longer develop colonies directly on the plate, its cell volume is halved, and its vital functions are also reduced. Since it only has a basal metabolic rate, it is not able to spoil the product. However, one thing to be aware of is that Brett is only "asleep", and as soon as the matrix becomes favourable for its development again, it resumes a maintenance metabolism and replicates very quickly. This is why it is still necessary to constantly monitor its concentration, using independent analytical techniques for culture to determine the correct concentration also in the VBNC state. As for the second part of the question, a high phenolic concentration does not always go hand in hand with an increase or presence of *B. bruxellensis* since other free microorganisms or enzymes in wine can also transform phenols.

Quali caratteristiche deve possedere il suolo per essere idoneo ad un impianto di tartuficoltura?

Il terreno ideale è prevalentemente calcareo, molto permeabile, con una reazione sub-alkalina (pH compreso tra 7.5 e 8.0) e con granulometria equilibrata nei componenti sabbia, limo e argilla. Di solito è ben dotato di sostanza organica e ricco di carbonato di calcio totale e solubile. Tali parametri vengono determinati in laboratorio tramite un'analisi chimico-fisica. Tuttavia è possibile che differenti specie di tartufo prediligano caratteristiche del suolo non del tutto simili. È importante sapere che, se il terreno è stato sottoposto a forti trattamenti con pesticidi, è opportuno lasciarlo incolto o coltivarlo in maniera biologica con colture erbacee per due o tre anni prima di impiantare la tartufoia.

What characteristics does soil need in order to be considered suitable for truffle growing?

The ideal soil is mainly calcareous and highly permeable with a sub-alkaline reaction (pH between 7.5 and 8.0) and balanced grain size with components such as sand, silt, and clay. It is generally high in organic matter and rich in total and soluble calcium carbonate. Such parameters are ascertained in the laboratory through chemical and physical analysis. Nevertheless, various truffle species may prefer slightly different soil characteristics. It is important to know that if the soil has been heavily treated with pesticides, it should be left uncultivated or cultivated organically with herbaceous crops for two to three years before planting the truffle bed.



• info@mk.it •

T-word FOR YOU

SBI (Indice Biotico del Fango): è un metodo elaborato da P. Madoni nel 1994, che consente di definire la qualità biologica del fango. Si ottiene mediante l'uso di una tabella a due entrate: nelle righe vengono presi in considerazione i gruppi dominanti o prevalenti, nelle colonne il numero delle unità sistematiche di cui è composta la microfauna. I valori di SBI vengono poi convertiti in classi di qualità, con il relativo giudizio.

SBI (Sludge Biotic Index): is a method developed by P. Madoni in 1994, which makes it possible to define the biological quality of the sludge. It is achieved through the use of a two-entry table: in the rows the dominant or prevailing groups are taken into account, in the columns the number of systematic units of which the microfauna is composed. The SBI values are then converted into quality classes, with the corresponding ratings.

BOD (Biologic Oxygen Demand): è un indice della quantità di sostanza organica biodegradabile presente in un campione d'acqua. Durante la degradazione ossidativa della sostanza organica i microrganismi aerobici responsabili consumano ossigeno. Si esprime perciò in quantità di ossigeno consumato per volume di liquido durante un determinato periodo di tempo ad una data temperatura (post 5 giorni a 20°C ed al buio).

BOD (Biologic Oxygen Demand): is an indicator of the amount of biodegradable organic matter contained in a water sample. When organic matter is oxidatively degraded, the aerobic microorganisms involved use up oxygen. Therefore, it is expressed as the amount of oxygen consumed per volume of liquid over a certain period of time at a specific temperature (after 5 days at 20 °C and in the dark).

BPR: Il BPR (Biocidal Products Regulation) è il regolamento UE n. 528/2012 relativo alla messa a disposizione sul mercato e all'uso dei biocidi che ha abrogato la Direttiva 98/8/CE. I biocidi sono sostanze necessarie per combattere gli organismi nocivi per la salute umana o animale e gli organismi che danneggiano i materiali naturali o fabbricati attraverso un'azione diversa da quella fisica o meccanica. Essi possono creare rischi per l'uomo, gli animali e l'ambiente a causa delle loro proprietà intrinseche e delle relative modalità d'uso. Questo regolamento ha come obiettivo l'armonizzazione del mercato a livello dell'UE, la semplificazione, l'approvazione dei principi attivi e l'autorizzazione dei biocidi, non solo promuovendo la riduzione delle sperimentazioni sugli animali, ma anche introducendo obblighi relativi alla condivisione dei dati e incoraggiando l'uso di metodi di sperimentazione alternativi.

The BPR (Biocidal Products Regulation) is the EU Regulation No. 528/2012 governing the placing on the market and the use of biocidal products and it has replaced Directive 98/8/EC. Biocidal products are substances necessary against harmful organisms for human or animal health and organisms damaging natural materials or materials manufactured by an activity not being physical or mechanical. Biocidal products may generate risks to humans, animals and to the environment due to their intrinsic properties and their method of use. This regulation has as its objective the harmonisation EU-wide market alignment, simplification, approval of active substances and authorisation of biocidal products, not only by promoting the reduction of animal testing, but also by introducing data sharing obligations and encouraging the use of alternative testing methods.

SO₂ nel vino: L'anidride solforosa (SO₂) contenuta nel vino può essere presente sotto diverse forme, non tutte ugualmente interessanti dal punto di vista enologico. La troviamo sottoforma:

- SO₂ molecolare con azioni antiossidanti e antisettiche;
- SO₂ (HSO-3) legata a composti con affinità media o debole e che può, nel vino, dissociarsi in funzione della temperatura. Ma non esplica funzioni antiossidanti e antisettiche;
- SO₂ legata in modo permanente con l'acetaldeide;

La somma di tutte e tre le forme danno origine alla SO₂ totale.

SO₂ in wine: Sulfur dioxide (SO₂) can be found in wine in several forms, not all equally interesting from an oenological point of view. We can find:

- molecular SO₂ with antioxidant and antiseptic actions;
- SO₂ (HSO-3) bound to compounds with medium or weak affinity and can dissociate in wine depending on temperature. Though not resulting in antioxidant and antiseptic properties;
- SO₂ permanently bound with acetaldehyde;

The sum of all three forms generates total SO₂.

T~magazine

1° semestre 2022 / Numero 7 - Tentamus Italia

Credits

Progetto: Tentamus Italia

Coordinamento editoriale: Giuseppe Calvi di Coenzo

Copyediting: Redazione e Laboratori Tentamus Italia

Grafic design e stampa: Tipografia Commerciale Ravenna

È vietata la riproduzione anche parziale di questo catalogo.
Reproduction of any part of this catalogue is not allowed.



Tentamus Locations Network 2022: Service Excellence Worldwide



For further information please use our LocationFinder online at tentamus.com/labs





Tentamus Italia S.r.l.
Via Faentina 207/H
48124 Ravenna



A Tentamus Company

Isemed S.r.l.
Via Togliatti 19/X - 40026 Imola (BO)



Tentamus Agriparadigma S.r.l.
Sede legale:
Via Faentina, 207/H - 48124 Ravenna
Sede operativa Ravenna:
Via Faentina, 224 - 48124 Ravenna
Sede operativa Siracusa:
Strada Benali-Tivoli - 96100 Siracusa
Sede operativa Signa (FI):
Via Giorgio La Pira, 24/26 - 50058 Signa



Renolab S.r.l.
Sede legale e operativa:
Via XXV Aprile 19 - 40016 San Giorgio di Piano (BO)



Caim S.r.l.
Sede legale e operativa:
Via Del Turismo, 196 - 58020 Follonica (GR)



Laemmegroup S.r.l.
Sede legale e operativa:
Via Vittime del Vajont 18- 10024 Moncalieri (TO)
Sede operativa Manerbio:
Via Lazio 38 - 25025 Manerbio (BS)



MK S.r.l.
Sede legale e operativa:
Via Giuseppe Antonucci, 2 - 06012 Città di Castello (PG)