

**ISTITUTO SUPERIORE DI SANITA'**

**Metodi di analisi  
per il controllo microbiologico  
degli alimenti**

Raccolta a cura di  
Dario De Medici, Lucia Fenicia  
Leucio Orefice e Angelo Stacchini

*Laboratorio Alimenti*

ISSN 1123-3117

**Rapporti ISTISAN**

**96/35**

Istituto Superiore di Sanità

**Metodi di analisi per il controllo microbiologico degli alimenti.**

Raccolta a cura di Dario De Medici, Lucia Fenicia, Leucio Orefice e Angelo Stacchini

1996, iv, 166 p. Rapporti ISTISAN 96/35

Il manuale raccoglie i principali metodi di analisi utilizzati per il controllo microbiologico degli alimenti presso l'Istituto Superiore di Sanità. Il testo è articolato in tre differenti sezioni: una parte introduttiva generale nella quale vengono enunciate raccomandazioni e disposizioni di utilizzo comune nell'applicazione di gran parte dei metodi microbiologici; una parte speciale, che riporta i metodi ordinati in base al tipo di parametro ricercato; un elenco di terreni colturali e reagenti impiegati nei metodi illustrati nella sezione precedente. Un aspetto importante da considerare è la necessità di validazione di alcuni tra i metodi proposti e la previsione di edizioni successive che accolgano gli aggiornamenti intervenuti, eventuali integrazioni e correzioni derivanti dalle esperienze applicative.

*Parole chiave:* Igiene e microbiologia degli alimenti, Metodi di analisi

Istituto Superiore di Sanità

**Microbiological methods in food control.**

Collection edited by Dario De Medici, Lucia Fenicia, Leucio Orefice and Angelo Stacchini

1996, iv, 166 p. Rapporti ISTISAN 96/35 (in Italian)

The main analytical methods used by Istituto Superiore di Sanità for food microbiological control are reported. The handbook is composed of three different sections: a wide general introduction that explains the most important operations and procedures used in microbiological methods; the description of the microbiological methods according to different parameters; the composition of all media used in the above methods. Future editions containing revisions and integrations of the methods, due to the validation tests, are foreseen.

*Key words:* Analytical methods, Food microbiology and hygiene

Si ringraziano i Direttori di reparto, il personale del Laboratorio Alimenti e il prof. Giordano De Felip per il lavoro bibliografico, sperimentale e di revisione che ha permesso la compilazione dei metodi riportati.

## INDICE

<b>Introduzione</b>	1
<b>Capitolo 1</b>	3
<b>Raccomandazioni generali per l'effettuazione di analisi microbiologiche</b>	
1. Norme di igiene	3
2. Apparecchiature e vetreria	4
3. Prove biologiche su animali	7
4. Sterilizzazione e preparazione di vetrerie ed utensili	7
5. Tecniche generali per la preparazione e conservazione dei terreni colturali	7
6. Campionamento e trasporto	9
7. Preparazione delle diluizioni scalari per la numerazione dei microrganismi	9
8. Tecniche di conteggio e di isolamento	13
<b>Capitolo 2</b>	23
<b>Analisi microbiologiche</b>	
1. Numerazione dei microrganismi a 30°C	27
2. Numerazione di lieviti e muffe	28
3. Numerazione dei coliformi mediante conteggio delle colonie	34
4. Numerazione dei coliformi mediante tecnica MPN	36
5. Numerazione dell' <i>Escherichia coli</i> presuntivo mediante tecnica MPN	38
6. Numerazione dell' <i>Escherichia coli</i> presuntivo nelle paste surgelate mediante tecnica MPN	41
7. Numerazione dei coliformi fecali e di <i>Escherichia coli</i> presuntivo nei molluschi	43
8. Numerazione di <i>Staphylococcus aureus</i> mediante conteggio delle colonie	45
9. Numerazione di <i>Staphylococcus aureus</i> mediante tecnica MPN	47
10. Ricerca di <i>Salmonella</i> per alimenti non normati	49
11. Ricerca di <i>Salmonella</i> nel latte e derivati	56
12. Ricerca di <i>Salmonella</i> nelle uova fresche	61
13. Ricerca di <i>Salmonella</i> nei molluschi	63
14. Numerazione di <i>Bacillus cereus</i>	66
15. Numerazione di <i>Clostridium perfringens</i>	71
16. Ricerca di <i>Clostridium botulinum</i> e sue tossine	73
17. Ricerca di <i>Campylobacter</i> termoresistente	79
18. Ricerca di <i>Yersinia enterocolitica</i> presumibilmente patogena	84
19. Ricerca di <i>Listeria monocytogenes</i> nel latte e derivati	91
20. Ricerca di <i>Listeria monocytogenes</i> (eccetto latte e derivati)	97
21. Numerazione di <i>Listeria monocytogenes</i>	100
22. Ricerca di <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	102
23. Ricerca di <i>Vibrio cholerae</i>	106
24. Numerazione dei microrganismi caratteristici dello yogurth	111
25. Valutazione della stabilità e della contaminazione delle conserve	113

## Capitolo 3

<b>Terreni di coltura e reagenti</b>	<b>116</b>
1. Plate count agar (PCA)	117
2. Skim-milk agar	117
3. Agar gelisato	117
4. Yeast-dextrose-oxitetraciline-gentamycin agar	118
5. Yeast-dextrose-chloramphenicol agar	118
6. Violet red bile agar	119
7. Brodo bile (2%) lattosio verde brillante	119
8. Brodo lauril solfato triposio a doppia concentrazione (LSBx2)	119
9. Brodo lauril solfato triposio (LSB)	120
10. Brodo E C	120
11. Acqua triptonata	120
12. Reattivo di Kovacs	120
13. Agar di Levine	121
14. Brodo lattosato	121
15. Brodo A1	121
16. Baird Parker agar	122
17. Brain heart infusion broth	123
18. Plasma di coniglio	123
19. Acqua peptonata tamponata	123
20. Terreno di Rappaport-Vassiliadis (RV)	123
21. Terreno selenito-cistina	124
22. Agar rosso fenolo-verde brillante	124
22a. Agar desossicolato citrato	124
23. Agar nutritivo	125
24. Agar triple sugar iron agar (TSI)	125
25. Agar all'urea (Christensen)	126
26. Terreno per la decarbossilazione della lisina	126
27. Reagenti per la ricerca della $\beta$ -galattosidasi.	127
28. Reattivi per la reazione Voges-Proskauer	127
29. Terreno di Muller-Kauffmann	128
30. Bismuto solfito agar	128
31. Terreno Rappaport-Vassiliadis semisolido	129
32. Peptone mannitol bromothymol agar (PEMBA)	129
33. Mannitol egg-yolk polymyxin agar (MYP)	130
34. Agar glucosio	130
35. Reattivi per la determinazione dei nitriti	131
36. Agar al sangue di montone	132
37. Terreno per la mobilità	132
38. Egg yolk-free tryptose sulfite cycloserine agar	133
39. Brodo al tioglicollato	133
40. Terreno motilità-nitrati	134
41. Terreno lattosio-gelatina	134

42. Tampone fosfato gelatina	134
43. Brodo Cooked Meat Medium (CMM)	135
44. Brodo Trypticase Peptone Glucose Yeasts (TPGY)	135
45. Terreno Egg Yolk Agar	135
46. Brodo di Preston	136
47. Brodo di Park e Sanders	137
48. Agar di Skirrow	138
49. Agar di Butzler modificato	139
50. Karmali agar (CSM)	140
51. Campylobacter agar con carbone e desossicolato	141
52. Agar di Preston	142
53. Agar sangue nutritivo con supplementi (NBG)	143
54. Brodo Brucella	143
55. Agar sangue Columbia	144
56. Reagenti per la determinazione dell'idrolisi dell'ippurato	144
57. Agar sangue Mueller Hinton	145
58. Reagente per la rilevazione dell'ossidasi	145
59. Brodo PSB	145
60. Brodo Irgasan Ticarcillina (ITC)	146
61. Cefsulodina irgasan novobiocina agar (CIN)	147
62. Salmonella Shigella agar con sodio desossicolato e sali di calcio (SSDC)	148
63. Agar nutritivo II	148
64. Terreno urea triptofano	148
65. Reagente per la determinazione della triptofano deaminasi	149
66. Agar di Kligler (KIA)	149
67. Terreno per la decarbossilazione dell' ornitina	149
68. Terreno per la fermentazione dei carboidrati	149
69. Simmons Citrate Agar. (Terreno per l'utilizzazione dei citrati)	150
70. Agar bile esculina	150
71. Agar triptone caseina soia	150
72. Reattivi e terreni per la determinazione pirazinamidasi	151
73. Agar triptone-soya al magnesio e all'ossalato	151
74. Brodo di arricchimento selettivo (EB)	152
75. Brodo di arricchimento selettivo tamponato (BEB)	152
76. Terreno di Oxford	153
77. Agar Triptone-Soia-Estratto di lievito (TSYEA)	153
78. Brodo Triptone-Soia-Estratto di lievito (TSYEB)	154
79. Agar sangue II	154
80. Brodo per la utilizzazione dei carboidrati.	155
81. Terreno per la mobilità	155
82. Terreni e reagenti per il CAMP test	155
83. Half Fraser Broth	156
84. Fraser broth	157
85. PALCAM agar	158
86. Brodo Salt polymyxin-B (SPB)	159

87. Brodo "saline glucose. sodio dodecyl lauryl sulfate" (GSTB)	159
88. Acqua peptonata salina alcalina	159
89. Tiosolfato citrato bile saccaroso agar (TCBS)	160
90. Trifeniltetrazolio cloruro soia triptone agar (TSAT)	160
91. Agar nutritivo salino	161
92. Triple sugar saline iron agar	161
93. Agar salino-estratto di carne-lievito (Saline meat-yeast agar)	161
94. Brodo salino per la decarbossilazione della lisina.	162
95. Reagenti per la determinazione dell'indolo II	162
96. Acqua peptonata alcalina II	162
97. Brodo gelatina fosfato	162
98. Agar gelatina-fosfato	163
99. Trypticase soy agar	163
100. Terreno per l'utilizzazione del mannitolo e dell'inositolo (Andrade's broth)	163
101. Terreno per l'arginina diidrolasi	164
102. Terreno MRS acidificato	164
103. Terreno M17	165
104. Brodo M	165
105. Triptone Soia brodo (TSB)	166
106. Triptone Soia brodo al 10% di NaCl e 1% di piruvato (TSBnc)	166
107. Brodo di Sabouraud	166

## Introduzione

La presente raccolta di metodi nasce in un periodo di rapida e complessa evoluzione nel settore dell'*Igiene e della Sicurezza d'uso degli Alimenti*, considerata la necessità di elaborare e codificare in modo omogeneo le numerose acquisizioni tecnico-scientifiche ottenute in anni molto recenti.

Il richiamo delle norme europee all'applicazione dei principi che disciplinano le buone pratiche di laboratorio, settore nel quale l'ISS ha recentemente emanato specifiche linee guida, presuppone anche la dotazione degli strumenti necessari a realizzarli.

In tal senso, per quanto nel nostro paese la normativa nazionale relativa alle procedure analitiche del settore risulti incompleta, nell'ambito dell'analisi chimica e microbiologica applicata al controllo sanitario degli alimenti sono oggi a disposizione degli operatori del settore sia metodi di analisi ufficiali che metodi raccomandati o comunque validati in circuiti nazionali od internazionali, oltre a metodi non validati ma ampiamente utilizzati e collaudati.

In particolare, le metodiche internazionali codificate dall'ISO, grazie all'esperienza in essi trasferita, alle edizioni continuamente aggiornate, al consenso unanimemente riscosso, costituiscono un punto di riferimento di estrema validità per chi opera in questo settore.

Nonostante tale disponibilità, un incentivo particolare a realizzare un primo tentativo di raccolta omogenea di metodi chimici e microbiologici è stato fornito dall'utilità di riportare in modo preferenziale metodologie operative di uso corrente o comunque coerenti con le aspettative in questo settore della Sanità Pubblica, tenendo anche conto dell'esigenza di avere a disposizione un supporto di agile e pratica consultazione per il laboratorista addetto alla vigilanza ed al controllo degli alimenti.

Sono stati così realizzati due manuali, rispettivamente relativi ai metodi chimici e microbiologici. Le basi sulle quali sono stati elaborati sono le stesse metodiche ISO-UNI, quelle ufficiali nazionali e CEE, oltre a lavori pubblicati da ricercatori italiani od esteri ed alle esperienze dirette dei ricercatori dell'I.S.S. nell'applicazione delle stesse metodiche. L'impostazione descrittiva è stata in parte semplificata, rispetto ai protocolli ISO, allo scopo di favorire un utilizzo pratico più agevole, senza per questo far mancare gli elementi essenziali.

Benchè la gran parte delle metodiche sia stata ampiamente sperimentata e quindi da ritenersi di provata affidabilità, in alcuni casi invece si reputa necessario attendere il responso derivante dall'impiego in circuiti di validazione e dall'utilizzo corrente prima che possano stabilmente affermarsi rispetto a eventuali metodiche alternative.

Questo lavoro nasce infatti come uno degli atti concreti del rapporto collaborativo che l'ISS intende stabilire in modo continuativo con le strutture periferiche coinvolte, e, proprio perchè non costituisce un riferimento invariabile, è aperto ai possibili contributi migliorativi derivanti dall'esperienza.

I manuali si compongono di una *parte introduttiva generale* nella quale vengono enunciate raccomandazioni e procedure di utilizzo comune nell'applicazione di gran parte dei metodi e di una *parte speciale*, che riporta i metodi ordinati per tipo di parametro analitico ricercato.

Nel manuale dei metodi microbiologici viene anche riportato un *elenco di terreni colturali e reagenti* impiegati nei metodi illustrati. Nello stesso è stato fatto un cenno anche ai metodi analitici rapidi, ad es. per la *Salmonella*, poiché di impiego sempre più frequente e diffuso. Per quanto in linea di massima tali metodi non possano essere impiegati da soli nel corso di analisi ufficiali, essi possono risultare utili nel caso di screening conoscitivi sottoponendo in ogni caso i risultati positivi a prove di conferma con le metodiche tradizionali.

Le strutture sanitarie periferiche interessate al controllo chimico e microbiologico degli alimenti oltre ad utilizzare direttamente i manuali come uno strumento applicativo, potranno considerarli, in vista della pianificazione ed uniformazione delle procedure adottate nelle strutture stesse, un contributo per la compilazione degli specifici manuali di qualità idonei alle diverse esigenze locali.

Eventuali possibili carenze qualitative e quantitative verranno comunque corrette in successive edizioni, nelle quali verrà tenuto conto anche delle esperienze applicative e di validazione nel frattempo intervenute.

Si ringraziano tutti i colleghi che vorranno, con i loro suggerimenti, contribuire al miglioramento ed all'aggiornamento tecnico-scientifico dei manuali.

A. Stacchini



## Capitolo 1

### RACCOMANDAZIONI GENERALI PER L'EFFETTUAZIONE DI ANALISI MICROBIOLOGICHE

La necessità di isolare o numerare esclusivamente i microrganismi presenti nei campioni da sottoporre ad analisi e quella di non contaminare l'ambiente o gli stessi operatori, rende indispensabile l'adozione di alcune precauzioni, tra cui l'osservanza di accurate condizioni di asepsi nelle fasi di prelievo, trasporto ed analisi, nonché l'adozione di adeguate norme di igiene personale degli operatori addetti a tali operazioni. Maggiori dettagli di quelli di seguito illustrati sono riportati nelle norme ISO 7218:1985, *Microbiology - General guidance for microbiological examinations* e nel manuale "Linee Guida per l'assicurazione della qualità nei laboratori preposti al controllo ufficiale degli alimenti" dell'Istituto Superiore di Sanità.

#### 1. Norme di igiene

##### *Igiene del personale*

Sono raccomandati protezioni per i capelli, guanti monouso e vestiario pulito e in ordine. Gli operatori devono lavarsi le mani (mediante dispositivi che evitino le contaminazioni crociate) prima e dopo l'effettuazione delle operazioni di prelievo ed analisi. Gli operatori stessi devono essere esenti da infezioni delle mani o del viso. Nel laboratorio è sconsigliabile mangiare, bere e fumare. E' sconsigliabile inoltre parlare o tossire durante l'inoculazione di piastre, provette, ecc.

##### *Ambienti di lavoro*

Nella progettazione di laboratori microbiologici, oltre all'osservanza di norme igieniche generali e all'impiego di materiali idonei e resistenti, si richiama l'attenzione su alcuni punti specifici.

I locali debbono essere sufficientemente ampi, in modo da consentire l'agevole collocazione delle apparecchiature e da permettere a ciascun analista di disporre di uno spazio operativo che non interferisca con quelli adiacenti. Debbono essere prese precauzioni per ridurre al minimo il rischio di contaminazione da polvere.

Gli ambienti di lavoro debbono essere mantenuti puliti e ordinati, con periodici controlli del livello di contaminazione ambientale (superfici di lavoro  $<50-100$  u.f.c./cm<sup>2</sup> rilevate con il metodo dell'omogeneizzazione e delle diluizioni scalari per la dispersione dei clusters microbici, aria:  $<300-400$  u.f.c./m<sup>3</sup>).

Nel caso di analisi di prodotti paucimicrobici o sterili i livelli di contaminazione ambientale debbono essere particolarmente bassi (superfici di lavoro previamente deterse con accuratezza e disinfettate; aria  $<50-100$  u.f.c./m<sup>3</sup>), ottenibili anche con l'uso di lampade UV

(tenute accese, se non schermate, solamente durante le ore non lavorative) o preferibilmente con cappe a flusso laminare.

L'area destinata all'analisi dei campioni non deve essere esposta alla luce solare diretta.

Sarebbero opportuni ambienti separati:

- per la preparazione e sterilizzazione dei terreni colturali.
- per il lavaggio delle vetrerie e la sterilizzazione materiale infetto (vetrerie usate e terreni incubati)

Precauzioni particolari sono necessarie per la manipolazione di campioni in polvere per il rischio di dispersione aerea del contenuto microbico.

Simili precauzioni devono essere osservate comunque durante le operazioni di pesata per impedire reciproci scambi di germi tra campione ed ambiente.

## 2. Apparecchiature e vetreria

Il presente elenco non è esaustivo di tutte le apparecchiature e delle caratteristiche tecniche richieste, in quanto si limita a fornire alcuni suggerimenti pratici di frequente applicazione.

### *Omogeneizzatori*

Può essere usato uno dei seguenti apparecchi:

*a-* omogeneizzatore rotante la cui frequenza di rotazione sia compresa tra gli 8.000 e 45.000 giri al minuto, con contenitori di vetro o metallo preferibilmente provvisti di coperchio, che resistano alla operazione di sterilizzazione.

*b-* omogeneizzatore di tipo peristaltico (*stomacher*) con sacchetti sterili di plastica.

I contenitori ed i sacchetti in plastica devono avere una capacità sufficiente per permettere di mescolare correttamente il campione con la quantità appropriata di diluente. In generale il volume del recipiente deve essere circa il doppio della porzione di campione più il diluente.

### *pHmetri*

Devono avere una precisione di misura di  $\pm 0,1$  unità di pH a 25°C.

### *Apparecchio per la determinazione dell'attività dell'acqua ( $A_w$ )*

Devono avere una precisione di misura di almeno  $\pm 0,01$  unità a 25°C.

### *Spettrofotometri e turbidimetri*

Per standardizzare gli inoculi batterici la lunghezza d'onda utilizzata è di 500-550 nm.

### *Incubatori*

Di norma vengono utilizzati incubatori, ventilati per convezione, regolabili da *t.a.* a 65°C, quando le temperature di incubazione sono superiori a quelle ambientali, in caso

contrario vengono impiegati *frigotermostati regolabili* da 0°C a 50°. Controllare giornalmente la temperatura interna degli incubatori con termometri tarati immersi in glicerina o in acqua distillata. La tolleranza dovrebbe essere in linea di massima di  $\pm 0,5^\circ\text{C}$ .

### ***Bagnomaria***

Si utilizzano correntemente apparecchi regolabili da *t.a.* a 100°C. Impiegare acqua distillata o demineralizzata. Ricambiare periodicamente l'acqua nell'apparecchio per evitare lo sviluppo di microrganismi. Si può aggiungere un disinfettante non corrosivo nei *b.m.* tenuti a temperature inferiori a 65-70°C. Un risanamento periodico si può ottenere elevando la temperatura ad almeno 90°C per qualche minuto.

Per una migliore termoregolazione occorre utilizzare modelli a circolazione o ad agitazione d'acqua; l'agitazione non deve produrre la dispersione di goccioline. La tolleranza dovrebbe essere in linea di massima di  $\pm 0,1^\circ\text{C}$ . Per ottenere una corretta temperatura di incubazione assicurarsi che il livello del liquido nei contenitori (beute e provette) sia inferiore a quello del *b.m.*

### ***Sistemi per anaerobiosi***

Consistono in giare, cappe o altri sistemi a tenuta, adatti a creare un ambiente a composizione gassosa controllata. Le condizioni di anaerobiosi devono essere verificate con appositi dispositivi e con manometri.

### ***Autoclave***

Per quanto concerne la sterilizzazione del materiale infetto si richiama l'opportunità della dotazione di due aperture in ambienti diversi (per l'introduzione e l'estrazione del materiale stesso) e termostatabile almeno a 130°C.

### ***Stufe a secco***

Devono essere in grado di operare a 170 - 175°C.

### ***Forno a microonde***

In alcuni casi viene adoperato per sciogliere rapidamente i terreni agarizzati precedentemente preparati in beute o provettoni di vetro.

Tale operazione va effettuata con la massima cautela, solo per terreni poco deperibili. Pertanto, allo scopo di evitare la degradazione di alcuni componenti del terreno, accertarsi di non protrarre il riscaldamento oltre il tempo strettamente sufficiente per la fusione completa.

### ***Centrifughe***

Sarebbe consigliabile dotarle di cappe o di dispositivi di protezione bonificabili per evitare la dispersione di aerosols.

Nel caso di ricerca di alcune tossine batteriche termolabili (*C.botulinum*, *B.cereus*, ecc.) occorre impiegare un apparecchio refrigerato.

### ***Frigoriferi***

Per la conservazione di campioni, terreni, reagenti e per lo scongelamento di campioni congelati, ecc., regolabili tra 0 e 5°C. Devono avere un dispositivo di rilevazione della temperatura (con registrazione almeno della massima e della minima) e, se destinati a conservare ceppi microbici e/o tossine e/o materiale patologico, devono essere dotati di chiusura di sicurezza

### ***Congelatori***

A -20°C, per la conservazione di campioni o reagenti particolarmente deperibili. A -80°C per esigenze particolari (mantenimento di linee cellulari, ceppi batterici, ecc.) Ove necessario saranno dotati di chiusura di sicurezza.

La maggior parte dei batteri può essere conservata a bassa temperatura per alcuni (-20°C) o molti (-70-80°C) anni in un terreno contenente il 15% di glicerolo, senza significativa perdita di vitalità. Inoculare il terreno di coltura liquido con una singola colonia e lasciar crescere per 12 ore circa. Trasferire 0,85 ml di coltura in una provetta sterile adatta al congelamento contenente 0,15 ml di glicerolo sterile. Tappare con tappo a vite e miscelare accuratamente mediante un Vortex e collocare nel congelatore.

### ***Cappe a flusso laminare***

Sostituire i filtri e le eventuali lampade UV con la frequenza prevista dal costruttore. Occorre inoltre eseguire frequentemente controlli di sterilità, ponendo piastre aperte di Plate count agar e Sabouraud per almeno 20' sotto la cappa in funzione e ponendo quindi ad incubare a 30°C e 25°C rispettivamente. Il controllo della regolarità del flusso deve essere effettuato mediante flussimetro. Alla fine di ogni ciclo lavorativo deve essere eseguita una disinfezione della superficie di lavoro.

L'impiego di Bunsen all'interno delle cappe deve essere attuato con estrema cautela, in quanto potrebbe danneggiare i filtri.

### ***Vetreteria***

Il materiale monouso è un'alternativa accettabile a quello riutilizzabile se le caratteristiche sono simili.

**Provette** di uso corrente. Si richiedono provette Ø 8 mm × 160 mm per test che prevedono ridotto scambio di ossigeno con il terreno colturale, ad es. per la prova della lisino-decarbossilasi o del tipo respiratorio di Mossel.

### ***Bottiglie o beute***

**Piastre Petri** Ø da 90 a 100 mm. L'altezza interna deve essere di almeno 10 mm

**Pipette graduate** da 10 ml e da 1 ml, graduate rispettivamente a 0,5 ml e 0,1 ml

**Aghi ed anse di platino-iridio o nichel cromo.** Le anse devono avere un diametro da 1,5 a 3 mm.

### 3. Prove biologiche su animali

Per l'organizzazione delle strutture ed il mantenimento degli animali si rimanda al manuale "Linee Guida per l'assicurazione della qualità nei laboratori preposti al controllo ufficiale degli alimenti" dell'Istituto Superiore di Sanità.

### 4. Sterilizzazione e preparazione di vetreria ed utensili

Sterilizzare la vetreria e gli utensili puliti destinati alle analisi:

- con l'autoclave, a calore umido, a  $121 \pm 1^\circ\text{C}$  per almeno 20 minuti
- con stufe, a calore secco, a  $170-180^\circ\text{C}$  per almeno 1 ora

Controllare periodicamente l'effettivo raggiungimento delle temperature prescritte mediante opportuni indicatori (*B.stearothermophilus*, ATCC 1953, ecc.). L'impiego di termoregistratori può essere necessario per documentare la correttezza del ciclo applicato.

La conservazione della vetreria e degli utensili puliti destinati alle analisi deve essere fatta impiegando protezioni atte a prevenire la ricontaminazione.

#### *Trattamento della vetreria e degli utensili già utilizzati nelle analisi*

Gli utensili riutilizzabili e la vetreria vanno sterilizzati a calore umido, almeno a  $121^\circ\text{C}$  per 20 minuti, prima del lavaggio destinato ad allontanare i residui di campione. Dopo il lavaggio e la preparazione occorre procedere ad una nuova sterilizzazione prima del reimpiego.

I dispositivi monouso vanno sterilizzati prima dell'eliminazione definitiva.

### 5. Tecniche generali per la preparazione e conservazione dei terreni colturali

#### *Preparazione dei terreni colturali*

I componenti base o i terreni disidratati devono essere tenuti in luogo fresco e asciutto, al riparo dalla luce.

L'aggiustamento del pH va effettuato con soluzioni di:

- NaOH            40 g / l
- HCl             35,5 g / l

I valori di pH indicati per i vari terreni e diluenti si intendono misurati a  $25^\circ\text{C}$  circa.

Per i terreni liquidi distribuire generalmente 9 -10 ml in provette di dimensioni  $16 \times 160$  mm, 18-20 ml in provettoni  $20 \times 180$  mm o 50-500 ml in beute di capacità almeno doppia del volume introdotto. Per evidenziare la produzione di gas introdurre prima della sterilizzazione nei suddetti contenitori una campanula di Durham di appropriate dimensioni.

Per i terreni solidi (agarizzati) preparare in quantità di norma non eccedenti 500 ml / contenitore (provettoni o beute di capacità almeno doppia del volume introdotto).

Per la distribuzione dei terreni in piastre vedi successivamente.

### *Sterilizzazione dei terreni colturali*

Generalmente la sterilizzazione dei terreni colturali si effettua a 121°C per 15-20 minuti. Alcuni tipi di terreni possono richiedere temperature più basse o la semplice ebollizione o ancora la filtrazione. Alcuni componenti labili (es. antibiotici, rosso d'uovo, sangue) vanno addizionati sterili ed in condizione di asepsi al terreno base precedentemente sterilizzato in autoclave e successivamente portato ad una temperatura di 45-50°C. In ogni caso, per evitare la degradazione di alcuni componenti del terreno, accertarsi che il tempo richiesto per raggiungere la temperatura di sterilizzazione e quello necessario per il raffreddamento sia il più breve possibile.

### *Conservazione dei terreni colturali*

Se i terreni colturali non vengono usati immediatamente è necessario conservarli al riparo dalla luce ad una temperatura tra 0 e 4°C in condizioni tali che non comportino modifiche apprezzabili nella loro composizione e, salvo casi particolari, per un tempo non superiore ai 30 giorni.

### *Preparazione delle piastre con terreni agarizzati*

Dopo la sterilizzazione, conservare i terreni a 45-50°C in *b.m.* fino al momento dell'uso (per non oltre 4 ore).

Nel caso i terreni siano stati preparati in anticipo e conservati a temperatura di refrigerazione, fonderli in *b.m.* bollente, in autoclave a vapore fluente o in forno a microonde, evitando di protrarre il riscaldamento, quindi procedere come sopra.

Versare, in condizioni di asepsi, l'agar in piastre di Petri standard del diametro necessario al tipo di analisi (generalmente 9-10 cm), in modo da ottenere uno spessore di almeno 2 mm (circa 15 ml/piastra per le piastre di 9-10 cm).

Prima di inoculare la superficie del terreno, ridurre l'umidità superficiale in luogo protetto da contaminazioni rimuovendo il coperchio (A) della piastra e ponendo il fondo capovolto (B) alla temperatura di 45-50°C per 30' finché le goccioline di acqua scompaiono dalla superficie (vedi Figura 1).



Figura 1.- Tecnica per asciugare l'umidità superficiale dell'agar

Non ripetere una seconda volta quest'operazione.

Al momento dell'incubazione le piastre vanno impilate capovolte (eccetto casi particolari) in numero non superiore a 6, lasciando uno spazio intorno alle pile di non meno di 2,5 cm per la circolazione dell'aria.

## 6. Campionamento e trasporto

### *Campionamento*

Prelevare e mantenere il campione in condizioni tali da non modificare in maniera significativa il numero dei microrganismi presenti, rispettando le normative specifiche vigenti per le diverse tipologie di alimenti.

### *Modalità di trasporto e conservazione dei campioni*

Trasportare il campione in condizioni tali da non modificare in maniera significativa il numero dei microrganismi presenti rispettando, ove presenti, le normative specifiche vigenti per le diverse tipologie di alimenti.

Per i prodotti deperibili non congelati o non surgelati, la temperatura di trasporto varia tra 0 e 4°C a seconda del tipo di alimento e del tempo necessario per il trasporto stesso. Tali prodotti andrebbero analizzati entro 36 ore dal prelevamento; nel caso tale termine non possa essere rispettato, essi vanno mantenuti refrigerati o congelati a seconda del tipo di prodotto e dei microrganismi da ricercare.

I campioni prelevati già congelati o surgelati vanno mantenuti in tale stato fino al momento dell'analisi.

Se viene adoperato ghiaccio secco per il trasporto, bisogna evitare il contatto dell'anidride carbonica con il campione per prevenire modifiche del pH.

## 7. Preparazione delle diluizioni scalari per la numerazione dei microrganismi

I dettagli della procedura sono descritti nella norma ISO 6887:1983, *Microbiology - General guidance for the preparation of dilutions for microbiological examination*.

### *Diluenti*

In mancanza di norme specifiche, i diluenti generalmente usati sono:

#### *Soluzione fisiologica*

cloruro di sodio	8,5	g
acqua distillata	1000	ml
pH 7 dopo sterilizzazione		

#### *Soluzione salina peptonata*

peptone	1	g
cloruro di sodio	8,5	g
acqua distillata	1000	ml
pH 7 dopo sterilizzazione		

*Acqua peptonata tamponata*

peptone	10	g
cloruro di sodio	5	g
sodio fosfato monoacido	3,5	g
potassio fosfato biacido	1,5	g
acqua distillata	1000	ml
pH 7 dopo sterilizzazione		

*Soluzione polipeptonata all'1‰*

Peptone (Digerito pepsinico di carne)	0,5	g
Triptone (Digerito pancreatico di caseina)	0,5	g
acqua distillata	1000	ml
pH 7 dopo sterilizzazione		

*Soluzione di Ringer 1/2*

cloruro di sodio	2,25	g
cloruro di potassio	0,105	g
cloruro di calcio.6H <sub>2</sub> O	0,12	g
bicarbonato di sodio	0,05	g
acqua distillata	1000	ml
pH 7 dopo sterilizzazione		

*Soluzione al citrato di sodio*

citrato trisodico diidrato	20	g
acqua	1000	ml
pH 7,5 dopo sterilizzazione		

Per effettuare le diluizioni decimali di norma si distribuisce il diluente in quantità di 9 ml o 90 ml / contenitore. Si sterilizza in autoclave a  $121 \pm 1$  °C per 20'

*Preparazione del campione e delle diluizioni*

I prodotti liquidi possono essere esaminati tal quali e/o previa diluizione diretta. I prodotti solidi vanno comunque sospesi in diluente (*Sospensione madre*) e poi sottoposti ad ulteriori diluizioni.

Per evitare danni da shock termico ai microrganismi, la temperatura del diluente deve essere circa la stessa di quella del campione.

*Il tempo che trascorre tra l'aggiunta del diluente e la semina nei terreni colturali non deve eccedere i 20 - 30 minuti.*



### Prima diluizione

#### - Campioni liquidi non viscosi

Agitare vigorosamente numerose volte il campione per rendere omogenea la distribuzione dei microrganismi. Cercare di limitare la formazione di schiuma o attendere la sua dissoluzione.

Prelevare 1 ml (o 10 ml) del campione con una pipetta ed aggiungerlo a 9 (o, rispettivamente, 90 ml) di diluente.

Agitare, ottenendo così la diluizione 1:10 ( $10^{-1}$ ).

#### - Campioni liquidi viscosi o con notevole componente idrofoba

Si effettua un'omogeneizzazione con il diluente come nel caso precedente, si procede poi alla separazione delle fasi e si utilizza la fase acquosa per le diluizioni successive. Può essere utile aggiungere palline di vetro sterili nei contenitori destinati all'omogeneizzazione mediante agitazione.

Nel caso del burro, l'aliquota del campione da analizzare (almeno 50 g) viene posta in contenitore di vetro con un volume doppio di soluzione Ringer  $\frac{1}{4}$  e riscaldata in *b.m.* a  $45^{\circ}\text{C}$  fino a fusione del campione. Si mescola completamente il burro e la soluzione. Si mantiene il contenitore in bagnomaria fino a che la materia grassa del burro non sia separata dalla fase acquosa. 2 ml di tale fase non diluita corrispondono a 1 g di burro (0,2 ml corrispondono a 0,1 g di burro: diluizione 1:10). Le diluizioni successive si ottengono aggiungendo 2 ml della fase acquosa a ml 98 di Ringer: 1 ml corrisponde a 0,01 g di burro (1:100) e 0,1 ml corrisponde a 0,001 g di burro (1:1000).

#### - Campioni solidi e semisolidi

Pesare in un contenitore sterile (Busta sterile per *Stomacher* o vaso per *Mixer*) una massa *m* del campione di almeno 10 g. A tale quantità aggiungere, a temperatura appropriata, il diluente in misura pari (in ml) a  $9 \times m$ .

Nel caso di utilizzo di buste di plastica per *Stomacher* aggiungere se necessario il diluente in due fasi successive, una prima dell'omogeneizzazione ed una dopo.

Adoperare lo *Stomacher* per 1-2 minuti, secondo la natura del prodotto. Adoperare in alternativa il *Mixer* con impulsi successivi di breve durata, per un tempo sufficiente per raggiungere circa 15.000-20.000 rivoluzioni complessive e comunque non oltre  $2\frac{1}{2}$  minuti.

Di norma viene utilizzato lo *Stomacher*, dando la preferenza al *Mixer* nei soli casi in cui il prodotto è particolarmente resistente alla disgregazione o contiene parti taglienti o appuntite.

Lo *Stomacher* riduce lo stress meccanico sulle cellule microbiche e consente l'impiego di materiale monouso. Se l'omogeneizzazione è condotta secondo i criteri previsti, ciò può condurre a conteggi più elevati che non con l'uso del mixer. Tuttavia un'omogeneizzazione con mixer può in alcuni casi migliorare la separazione e disgregazione dei *clusters* microbici, specie negli alimenti ad elevata consistenza, innalzando con diverso meccanismo i conteggi ottenibili. Pertanto, per consentire una corretta comparazione dei risultati, la metodica utilizzata deve essere riportata nel certificato d'analisi.

I campioni di carne devono essere preventivamente sezionati in asepsi in piccoli frammenti di circa  $1\text{ cm}^3$  e quindi omogeneizzati.

Nel caso dei campioni in polvere è necessario mescolare con cura il contenuto nel recipiente chiuso invertendolo ripetutamente. Se il campione nella sua confezione originale la riempie completamente, non permettendo un mescolamento vigoroso, travasarlo in un recipiente più grande e mescolare. Prelevare 10 g e versarli sotto lenta agitazione in 90 ml di diluente a 45°C. Si può utilizzare in alternativa un omogeneizzatore di tipo peristaltico. Far riposare per 5 min. agitando periodicamente.

Nei prodotti congelati procedere allo scongelamento a 4°C per non più di 24 ore. Campioni costituiti da aliquote di peso inferiore a 100 g vanno scongelati a 4°C per 6-8 ore. Sottoporre immediatamente all'omogeneizzazione con lo Stomacher. Nel caso dei gelati sciogliere in b.m. a 37°C rimuovendo il contenitore non appena il campione si è sciolto. Il diluente non deve superare i 37°C.

*- Preparazione del campione nel caso di latte e derivati per la ricerca qualitativa dei microrganismi*

*Latte*

Agitare vigorosamente il campione per assicurare una ripartizione più uniforme possibile dei microrganismi capovolgendo rapidamente il contenitore con il campione per 25 volte. Evitare la formazione di schiuma o lasciarla disperdere nel caso si formasse. L'intervallo di tempo fra la miscelazione e il prelievo dell'aliquota per l'analisi non dovrebbe superare i 3 minuti.

*Latte in polvere, siero in polvere, latticello in polvere, lattosio, caseina*

Mescolare accuratamente il contenuto in recipiente chiuso scuotendo e capovolgendo ripetutamente. Se il contenitore è troppo pieno per permettere un'agitazione vigorosa, trasferire il contenuto in un recipiente più grande.

*Burro*

Sciogliere in bagnomaria a  $45 \pm 1^\circ \text{C}$  il campione in un contenitore sterile. Agitare durante la fusione e rimuovere il contenitore immediatamente dal bagnomaria non appena il campione si è sciolto.

*Formaggio*

Omogeneizzare (da 1 a 3 minuti) il campione con il diluente o con il terreno liquido riscaldati a 45°C mediante un omogeneizzatore ad alta velocità o di tipo peristaltico, finché l'aliquota per l'analisi è completamente dispersa. Assicurarsi che la temperatura non superi i 45°C.

*Gelati*

Procedere come nel caso del burro ma usando un bagnomaria mantenuto a non più di 37° C.

*Latti fermentati, yogurt, creme pasticcere, dessert*

Miscelare il contenuto del contenitore chiuso scuotendolo ripetutamente e capovolgendo o aprire il contenitore e mescolare il contenuto asetticamente usando una spatola sterile od un cucchiaino.

*Diluizioni successive*

Nel caso delle numerazioni si procede all'effettuazione di diluizioni decimali successive.

Trasferire con una pipetta sterile 1 ml della *prima diluizione* in 9 ml di diluente sterile ad idonea temperatura, evitando il contatto tra la pipetta ed il diluente. Mescolare con cura utilizzando preferibilmente un agitatore automatico (Vortex) per 5-10 secondi e cercando di evitare la fuoriuscita del liquido; si ottiene così la seconda diluizione ( $10^{-2}$  o 1:100).

Ripetere, se necessario, le operazioni sopra descritte prelevando con una nuova pipetta 1 ml della *seconda diluizione* fino al raggiungimento della diluizione idonea a permettere un corretto conteggio dei microrganismi.

## 8. Tecniche di conteggio e di isolamento

### *Numerazione dei microrganismi in terreno solido*

#### *Tecnica di inclusione nella massa (Pour plate)*

Distribuire in doppio 1 ml delle diluizioni da saggiare in piastre di Petri ( $\varnothing$  90-100 mm). Versare il terreno a  $45^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  (12-18 ml/piastra) e mescolare immediatamente mediante lenti ed uniformi movimenti rotativi della piastra sul piano di lavoro, ripetuti per almeno 5 volte, così da ottenere una distribuzione omogenea dei microrganismi nel terreno. Far solidificare ponendo le piastre su una superficie orizzontale pulita e fredda.

In alcuni casi può essere utile versare sulla superficie solidificata un secondo strato di agar non nutritivo\* (4 ml circa, sciolto e raffreddato a  $45^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ ) per evitare lo sviluppo di colonie invasive.

(\*) Terreno *agar-acqua*: agar 12-18 g; acqua distillata 1000 ml; pH 7 dopo sterilizzazione.

Dopo completa solidificazione incubare le piastre come precedentemente specificato (cap. 1, par. 5 - preparazione delle piastre con i terreni agarizzati).

#### *Tecnica della semina in superficie (Spread technique)*

Distribuire uniformemente l'inoculo (0,1-0,2 ml, max 0,5 ml) sulla superficie del terreno precedentemente versato e fatto solidificare nelle piastre, mediante bacchette di vetro o appositi strumenti atti allo spatolamento. Quando l'inoculo è completamente assorbito dal terreno, incubare come precedentemente descritto (cap. 1, par. 5 - preparazione delle piastre con i terreni agarizzati).

#### NOTE:

⇒ Quando si vuole determinare un basso numero di microrganismi, il limite di determinazione può essere elevato di un fattore 10 seminando 1 ml di campione in esame, se liquido, o 1 ml di sospensione madre (diluizione  $10^{-1}$ ) negli altri casi. In questo caso, distribuire l'inoculo sulla superficie di due piastre di Petri  $\varnothing$  90 mm. Effettuare la numerazione sull'insieme delle due piastre come se fosse unica. L'operazione va effettuata in duplice (4 piastre).

⇒ Può essere utile inoculare una piastra e mantenerla a  $+4^{\circ}\text{C}$ , comparandola poi con quelle incubate in termostato per evitare di considerare erroneamente come colonie alcune particelle del prodotto presenti nelle piastre inoculate con le diluizioni più basse.

#### *Conteggio delle colonie*

Scartare le piastre che presentano colonie invasive o veli batterici che ricoprono più di un terzo della superficie.

Prendere in considerazione le piastre che contengono almeno 5 colonie (preferibilmente 15 in caso di terreni selettivi e 30 in caso di terreni non selettivi) e meno di 300 e contarle con precisione, adoperando un dispositivo dotato di lente

d'ingrandimento e di base scura illuminata tangenzialmente, oppure un sistema automatico.

Annotare i conteggi relativi a due diluizioni successive (è necessario che almeno una delle due piastre della medesima diluizione contenga non meno di 15 colonie).

Calcolare il numero di microrganismi per grammo di prodotto con la seguente formula:

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

ove:

- $\sum c$  = somma delle colonie nelle piastre considerate
- $V$  = volume dell'inoculo in ml seminato in ogni piastra (in genere 1 nella tecnica *pour plate*; 0,1 o 0,2 nella tecnica *spread*)
- $n_1$  = numero delle piastre considerate per la prima diluizione
- $n_2$  = numero delle piastre considerate per la seconda diluizione
- $d$  = fattore di diluizione corrispondente alla prima diluizione (in genere 0,1 o 0,01)

Arrotondare il risultato per eccesso o per difetto alle prime due cifre significative e, se uguale o superiore a 100, riportare il risultato sotto la forma:

$$1,0 \div 9,9 \times 10^n \text{ u.f.c./g o ml}$$

ove u.f.c. = unità formanti colonie;  $10^n$  = inverso del fattore di diluizione

Esempio:

Volume inoculo = 1 ml  
 Prima diluizione  $10^{-2}$  : 168 e 215 colonie  
 Seconda diluizione  $10^{-3}$  : 14 e 25 colonie

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

### Conteggi stimati

Se nella diluizione più bassa si riscontrano in entrambe le piastre 5-15 colonie, si esegue la media aritmetica moltiplicando per l'inverso del fattore di diluizione e si esprime come *risultato stimato* (vedi tabella intervalli di confidenza).

Se si riscontrano 1-4 colonie è opportuno ripetere l'analisi (data la probabilità non trascurabile di una contaminazione accidentale), e, in caso di conferma, si procede come nel caso precedente riportando gli intervalli di confidenza (vedi tabella intervalli di confidenza).

Sono riportati nella successiva tabella (tab.1) gli intervalli di confidenza al 95% relativi ai conteggi stimati ottenuti nelle due circostanze precedenti (*numero medio di colonie in coppie di piastre inferiore a 15*).

Tabella 1 - Intervalli di confidenza per conteggi stimati

Conteggio stimato (n. medio colonie)	Intervallo di confidenza 95%	
	Limite inferiore	Limite superiore
1	<1	2
2	<1	4
3	<1	5
4	1	6
5	2	9
6	2	10
7	2	12
8	3	13
9	4	14
10	4	16
11	5	18
12	6	19
13	7	20
14	7	21
15	8	23

Un calcolo *approssimato* più rapido prevede il conteggio delle colonie nelle piastre che ne contengono più di 30 e meno di 300, considerando le due piastre relative ad una stessa diluizione (l'unica possibile o la più bassa). Il numero di microrganismi per grammo viene calcolato effettuando la media aritmetica dei conteggi e moltiplicando per l'inverso del fattore di diluizione.

Nell'esempio precedente:

$$N = \frac{168 + 215}{2} \times 10^2 = 191,5 \times 10^2 = 19150 = 1,9 \times 10^4 \text{ u. f. c. / g o ml}$$

Se in tutte le piastre non vengono riscontrate colonie il risultato va espresso così:

$$\text{meno di } 1 \times 10^n \text{ u. f. c. / g o ml}$$

ove  $10^n$  = inverso del fattore di diluizione più basso, in genere 10 o 100.

I limiti fiduciali teorici nel 95% dei casi sono compresi tra  $\pm 12\%$  e  $\pm 37\%$ .

#### *Conteggio delle colonie nei terreni selettivi*

E' opportuno scartare le piastre con oltre 150 colonie sospette.

Per piastre che contengono tra 15 e 150 colonie sospette in due diluizioni successive calcolare il numero di colonie per ciascuna diluizione, e considerare come *conteggio presuntivo* la media aritmetica dei due valori ottenuti, a meno che il rapporto tra il valore più grande e quello più piccolo non sia superiore a 2; in questo caso considerare come *conteggio presuntivo* il valore più basso.

Per piastre con meno di 15 colonie sospette, effettuare un conteggio presuntivo secondo quanto riportato in precedenza per i conteggi stimati.

Dovendo sottoporre a conferma le colonie sospette (almeno 5 per piastra), l'espressione dei risultati va elaborata come segue:

- se almeno l'80% di tali colonie vengono confermate, considerare come *numero di microrganismi ricercati* lo stesso numero fornito dal conteggio presuntivo;
- negli altri casi calcolare tale numero *rapportandolo alla percentuale di colonie confermate* rispetto al numero complessivo di colonie sospette ottenuto nel conteggio presuntivo.

Arrotondare il risultato definitivo per eccesso o per difetto alle prime due cifre significative e, se uguale o superiore a 100, riportare il risultato sotto la forma:

$$1,0+9,9 \times 10^n \text{ u.f.c./g o ml}$$

ove  $10^n$  è l'inverso del fattore di diluizione

Se in tutte le piastre non vengono riscontrate colonie o non vengono confermate le eventuali colonie sospette, il risultato va espresso sotto la forma:

$$\text{meno di } 1 \times 10^n \text{ u.f.c./g o ml}$$

ove  $10^n$  = inverso del fattore di diluizione più basso, in genere 10.

I limiti fiduciali teorici nel 95% dei casi sono compresi tra  $\pm 16\%$  e  $\pm 52\%$ .

#### *Numerazione dei microrganismi in terreno liquido (MPN)*

Il sistema più comunemente usato è quello cosiddetto "simmetrico" che impiega lo stesso numero di provette per ogni diluizione, con un rapporto tra due diluizioni successive generalmente di 1:10. Questo sistema permette sia di verificare il superamento o meno di un limite definito, che di determinare il numero di microrganismi presenti.

Seminare diluizioni scalari del campione, nelle quantità previste dal metodo specifico, in triplice, in almeno 3 serie di provette, contenenti l'appropriato terreno colturale.

Incubare le provette in termostato, o meglio in bagnomaria, alla temperatura e per il tempo richiesti.

#### *Interpretazione dei risultati*

Registrare il numero e la posizione delle provette positive. La positività viene riconosciuta in base al terreno impiegato ed alla reazione provocata in esso dallo sviluppo microbico.

Scegliere tre diluizioni successive delle quali la più bassa corrisponde alla più alta concentrazione di inoculo. Questa viene considerata la "diluizione base".

Ciò vale anche nel caso in cui non vi sia una diluizione in cui tutte le provette risultano positive [occorre scegliere in tal caso come diluizione base quella che contiene la più alta concentrazione di campione (diluizione più bassa)].

Se invece vi sono due o più diluizioni consecutive in cui tutte le provette risultano positive, scegliere come "diluizione base" quella corrispondente alla più bassa concentrazione di inoculo (diluizione più alta).

Ricostruire il numero caratteristico a tre cifre assegnando il valore 1 ad ogni provetta risultata positiva ed il valore 0 ad ogni provetta risultata negativa, sommando quindi tra loro i valori ottenuti in ciascun gruppo di tre (o cinque) provette inoculate con la stessa diluizione. Leggere poi il corrispondente valore MPN/g (o ml) nella tabella di Mac Crady (tab.2 o 3) e moltiplicare tale valore per l'inverso del fattore di diluizione della prima serie di provette considerata per ricostruire il numero caratteristico.

### *Espressione dei risultati*

Dal valore MPN rilevato dalla tabella, determinare il Numero Più Probabile di microrganismi in una data quantità di campione, per mezzo della formula:

$$C_s = N \frac{F}{V} V_s$$

$C_s$  = concentrazione più probabile di microrganismi nella quantità di riferimento  $V_s$ ;

$N$  = valore MPN letto sulla tabella

$F$  = fattore di diluizione (decimale, centesimale, ecc.) corrispondente alla diluizione base della serie prescelta (ad es.  $F=10, 100$ , ecc.)

$V$  = fattore di diluizione base della tabella (nel caso specifico=1);

$V_s$  = quantità di riferimento scelta per esprimere la concentrazione di microrganismi (generalmente 1g o ml).

Tabella 2 - Valori MPN (Mac Crady)

valori per un inoculo del campione di: 3×1; 3×0,1; 3×0,01 g o ml

Numero carat- teristico	MPN per g	categoria	Limiti di confidenza			
			95 %		99 %	
000	<0,3	-	0,0	0,94	0,0	1,4
001	0,3	3	0,01	0,95	0,0	1,4
010	0,3	2	0,01	1,0	0,0	1,6
011	0,61	0	0,12	1,7	0,05	2,5
020	0,62	3	0,12	1,7	0,05	2,5
030	0,94	0	0,35	3,5	0,18	4,6
100	0,36	1	0,02	1,7	0,01	2,5
101	0,72	2	0,12	1,7	0,05	2,5
102	1,1	0	0,4	3,5	0,2	4,6
110	0,74	1	0,13	2,0	0,06	2,7
111	1,1	3	0,4	3,5	0,2	4,6
120	1,1	2	0,4	3,5	0,2	4,6
121	1,5	3	0,5	3,8	0,2	5,2
130	1,6	3	0,5	3,8	0,2	5,2
200	0,92	1	0,15	3,5	0,07	4,6
201	1,4	2	0,4	3,5	0,2	4,6
202	2,0	0	0,5	3,8	0,2	5,2
210	1,5	1	0,4	3,8	0,2	5,2
211	2,0	2	0,5	3,8	0,2	5,2
212	2,7	0	0,9	9,4	0,5	14,2
220	2,1	1	0,5	4	0,2	5,6
221	2,8	3	0,9	9,4	0,5	14,2
222	3,5	0	0,9	9,4	0,5	14,2
230	2,9	3	0,9	9,4	0,5	14,2
231	3,6	0	0,9	9,4	0,5	14,2
300	2,3	1	0,5	9,4	0,3	14,2
301	3,8	1	0,9	10,4	0,5	15,7
302	6,4	3	1,6	18,1	1	25
310	4,3	1	0,9	18,1	0,5	25
311	7,5	1	1,7	19,9	1,1	27
312	12	3	3	36	2	44
313	16	0	3	38	2	52
320	9,3	1	1,8	36	1,2	43
321	15	1	3	38	2	52
322	21	2	3	40	2	56
323	29	3	9	99	5	152
330	24	1	4	99	3	152
331	46	1	9	198	5	283
332	110	1	20	400	10	570
333	>110	-	-	-	-	-

De Man J.C. MPN Tables, corrected Eur.J.Appl.Biotechnol., 1983, 17, 301-305 riportato in norme ISO 7251-1984

#### Significato delle categorie

La probabilità che il valore MPN ottenuto sia quello corrispondente al numero effettivo di microrganismi nel campione esaminato, va decrescendo quando si passa dalla categoria 1 alle successive (nell'ordine: 2, 3, 0).



Tabella 3 - Valori MPN (Mac Crady)

valori per un inoculo del campione di:  $5 \times 0,1$ ;  $5 \times 0,01$ ;  $5 \times 0,001$  g o ml(tabella derivata dalla norma ISO 7251/1984 rev.1991, da utilizzarsi per la determinazione dei coliformi fecali e dell'*E.coli* nei molluschi)

Numero carat- teristico	MPN per 100 g	categoria	Limiti di confidenza			
			95 %		99 %	
001	180	2	0	650	0	930
010	180	2	10	650	0	930
011	360	3	70	990	20	1400
020	370	3	70	990	20	1400
021	550	0	170	1400	90	2100
030	560	0	170	1400	90	2100
100	200	1	20	990	10	1400
101	400	2	70	1000	20	1400
102	600	0	170	1400	90	2100
110	400	1	70	1100	30	1400
111	610	3	170	1400	90	2100
112	810	0	330	2200	20	2800
120	610	2	180	1400	90	2100
121	820	3	330	2200	200	2800
130	830	3	330	2200	200	2800
131	1000	0	300	2200	200	2800
140	1100	0	300	2200	200	2800
200	450	1	80	1400	40	2100
201	680	2	180	1500	90	2100
202	910	0	330	2200	200	2800
210	680	1	190	1700	100	2300
211	920	2	330	2200	200	2800
212	1200	0	400	2500	200	3400
220	930	1	340	2200	200	2800
221	1200	3	400	2500	200	3400
222	1400	0	600	3400	400	4400
230	1200	3	400	2500	200	3400
231	1400	0	600	3400	400	4400
240	1500	0	600	3400	400	4400
300	780	1	210	2200	120	2800
301	1100	1	400	2200	200	2900
302	1300	3	600	3400	400	4400
310	1100	1	400	2500	200	3400
311	1400	2	600	3400	400	4400
312	1700	3	600	3400	400	4400
320	1400	1	600	3400	400	4400
321	1700	2	700	3900	500	5100
322	2000	0	700	3900	500	5200

continua alla pagina successiva

segue dalla pagina precedente

Numero carat- teristico	MPN per 100 g	categoria	Limiti di confidenza			
			95 %		99 %	
330	1700	2	700	3900	500	5200
331	2100	3	700	3900	500	5200
332	2400	0	1000	6600	700	9400
340	2100	3	700	4000	500	5200
341	2400	0	1000	6600	700	9400
350	2500	0	1000	6600	700	9400
400	1300	1	400	3400	300	4400
401	1700	1	500	3400	400	4400
402	2100	3	700	3900	500	5200
403	2500	0	1000	6600	700	9400
410	1700	1	600	3900	400	5100
411	2100	1	700	4100	500	5300
412	2600	3	1000	6600	700	9400
413	3100	0	1000	6600	700	9400
420	2200	1	700	4800	500	6100
421	2600	2	1000	6600	700	9400
422	3200	3	1000	6600	700	9400
423	3800	0	1300	10000	900	14700
430	2700	1	1000	6600	700	9400
431	3300	2	1000	6600	700	9400
432	3900	3	1300	10000	900	14700
440	3400	2	1300	10000	900	14700
441	4000	3	1300	10000	900	14700
442	4700	0	1400	11300	900	14700
450	4100	3	1300	10000	900	14700
451	4800	0	1400	11300	900	14700
500	2300	1	700	6600	500	9400
501	3100	1	1000	6600	700	9400
502	4300	3	300	10000	900	14700
503	5800	0	2100	14900	1400	20000
510	3300	1	1000	10000	700	14700
511	4600	1	1400	11300	900	14700
512	6300	2	2100	14900	1400	20000
513	8400	3	3400	11000	2100	27000
520	4900	1	1500	14900	900	20000
521	7000	1	2200	16800	1400	23000
522	9400	2	3400	22000	2100	28000
523	12000	3	3000	24000	2000	32000
524	15000	0	6000	35000	4000	45000
530	7900	1	2300	22000	1500	27000
531	11000	1	3000	24000	2000	32000
532	14000	1	5000	35000	3000	45000
533	17000	3	7000	39000	4000	51000
534	21000	3	7000	39000	4000	51000

continua alla pagina successiva

segue dalla pagina precedente

Numero caratteristico	MPN per 100 g	categoria	Limiti di confidenza			
			95 %		99 %	
540	13000	1	3000	35000	3000	45000
541	17000	1	6000	39000	4000	51000
542	22000	1	7000	44000	4000	57000
543	28000	2	10000	70000	6000	92000
544	35000	2	10000	70000	6000	92000
545	43000	0	15000	106000	9000	150000
550	24000	1	7000	70000	4000	92000
551	35000	1	10000	106000	6000	150000
552	54000	1	15000	166000	10000	223000
553	92000	1	23000	253000	15000	338000
554	160000	1	40000	460000	20000	620000
555	>160000	-	-	-	-	-

### Isolamento

Scegliere una colonia separata su una piastra di agar inocolata con il campione o una sua diluizione, strisciarla con un'ansa batteriologica ( $\varnothing$  max 3 mm) su un agar nutritivo non selettivo. Incubare a temperatura opportuna.

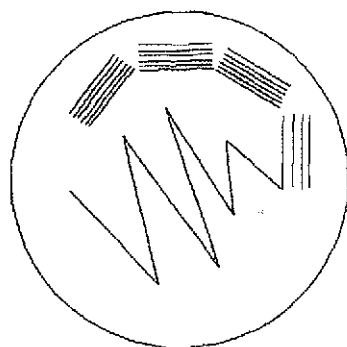


Figura 2 - Schema di uno striscio su terreno di coltura in piastra

Ripetere l'isolamento a partire da una o più delle nuove colonie sviluppate. Ripetere nuovamente l'operazione se dal secondo isolamento si sviluppano ancora colonie di tipo diverso.

Per ottenere colonie ben isolate a partire da una colonia grande può essere utile stemperare il materiale prelevato con l'ansa in 1-2 ml di diluente sterile ed eseguire successivamente lo striscio, come precedentemente indicato.

Se sulla colonia isolata vanno effettuati diversi test, occorre subculturare la stessa in brodo nutritivo o su agar nutritivo a becco di clarino.

***Rapporto di analisi***

Deve specificare in dettaglio il metodo impiegato (terreni con l'eventuale esecuzione del doppio strato nel caso della numerazione in piastra, temperature e tempi di incubazione) e tutte le altre condizioni non prefissate o considerate come opzionali, come pure ogni inconveniente che potrebbe aver influito sul risultato.

## Capitolo 2

### ANALISI MICROBIOLOGICHE

I protocolli di analisi microbiologica illustrano schematicamente, ma in modo esauriente, le procedure necessarie per valutare quali-quantitativamente i parametri microbiologici negli alimenti.

Per rendere più agevole la visualizzazione delle fasi principali relative ai protocolli di cui sopra, viene riportato di seguito uno schema riassuntivo delle stesse, assegnandole alla *ricerca* o alla *numerazione*, a seconda che si tratti di valutazione di presenza/assenza o di valutazione quantitativa del parametro considerato.

Tabella 1.- Schema riassuntivo delle tappe principali delle analisi microbiologiche

Parametro	Ricerca				Numerazione	
	Prearricchimento	Arricchimento selettivo	Isolamento	Identificazione	Presuntiva	Conferma
Microrganismi mesofili					Plate Count agar 25-30°C x 72h	
Lieviti e muffe					Yeast-dextrose-cloramphenicol agar 25°C x 3-5gg	
Lieviti e muffe (carne e derivati)					Yeast dextrose oxitetraciclina gentamicin agar 25°C x 3-5gg	
Coliformi totali (numerazione in terreno solido)					Violet Red Bile Lactose Agar 30°C x 24h	Brodo Bile Verde Brillante 30°C x 24h
Coliformi totali (MPN)					Brodo lauril solfato triptosio 30°C x 24-48h	Brodo Bile Verde Brillante 30°C x 24-48h
Escherichia coli (presuntivo) (MPN)					Brodo lauril solfato triptosio 37°C x 24-48h	Brodo EC 45°C x 24-48h Acqua triptonata 45°C x 48h
E.coli (presuntivo) Paste surgelate (MPN)					Brodo lattosato 37°C x 24-48h	Brodo Bile Verde Brillante 45°C x 24-48h
E.coli (presuntivo) Molluschi (MPN)					Brodo A1 37°C x 3h 44,5°C x 21h	Acqua triptonata 44,5°C x 24h
Staphylococcus aureus					Baird Parker Agar 37°C x 24-48h	Indagini morfologico-colturali, Coagulasi
Staphylococcus aureus (MPN)					TSBcp 37°C x 48h	Baird Parker Agar 37°C x 24-48h Indagini morfologico-colturali, Coagulasi
Salmonella	Acqua peptonata tamponata 37°C x 16-20h	Rappoport Vassiliadis 42°C x 24h Selenito-cistina 37°C x 24-48h	Brilliant Green Agar 37°C x 24h Secondo terreno 37°C x 24h	Kliger Agar, Lisina decarbossilasi, Ureasi, etc. Siero agglutinazione		
Salmonella (latte e derivati)	Idoneo terreno 37°C x 24h	Brodo tetratonato 42°C x 24h Selenito cistina 37°C x 24-48h	Brilliant Green Agar 37°C x 24h Secondo terreno 37°C x 24h	Kliger Agar, Lisina decarbossilasi, Ureasi, etc. Siero agglutinazione		
Clostridium perfringens					EYres -TSC 37°C x 20h	Mobilia, nitrati lattosio, gelatina

continua a pag. seguente

segue dalla pag. precedente

Parametro	R i c e r c a				N u m e r a z i o n e	
	Prearricchimento	Arricchimento selettivo	Isolamento	Identificazione	Presuntiva	Conferma
<i>Clostridium botulinum</i>		CMM 35 °C x 5gg TPGY 26-28 °C x 5gg	Egg Yolk Agar 35 °C x 48h	Ricerca della tossina. Test biochimici e gascromatografi ci		
<i>Bacillus cereus</i>					PEMBA o MYP 30 °C x 24h	Esame microscopico. Ferm. glucosio. NO. Voges Proskauer
<i>Yersinia enterocolitica</i>		PBS 22-25 °C x 3-5gg ITC 22-25 °C x 48h	CIN SSDC 30 °C x 24-48h	Ureasi; Tryptofano deaminasi; Kliger, ossidasi, test biochimici		
<i>Campylobacter termoresistente</i>		Preston broth 42 °C x 18h ParK Sanders Broth 32 °C x 4h 37 °C x 2h 42 °C x 40h	Skirrow agar Secondo terreno Agar sangue con NBG 42 °C x 48h	Esame microscopico Crescita a 25 °C Ossidasi, Zuccheri		
<i>Listeria monocytogenes</i> (latte e derivati)		EB TSYEB + supplement 30 °C x 48h	Oxford Agar 37 °C x 24h-48h TSYEA 37 °C x 24-48h	Esame microscopico, Catalasi, Emolisi, Carboidrati, Mobilità.		
<i>Listeria monocytogenes</i> (alimenti vari)	Half Fraser Broth 30 °C x 24h	Fraser Broth 37 °C x 24-48h	Oxford Agar 37 °C x 24-48h PALCAM Agar 37 °C x 24-48h	Esame microscopico, Catalasi, Emolisi, Carboidrati, Mobilità.		
<i>Listeria monocytogenes</i> (numerazione)					Fraser broth 32 °C x 24-48h Oxford Agar 37 °C x 24-48h	Esame microscopico, Catalasi, Emolisi, Carboidrati, Mobilità, Patogenicità su topini
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>		Salt polymyxin B broth 37 °C x 8h GSTB 37 °C x 8h	TCBS 37 °C x 18h TSAT 37 °C x 24h	Mobilità, ossidasi, TSI Agar e ulteriori prove biochimiche		
<i>Vibrio cholerae</i>		Acqua peptonata, Brodo gelatina fosfato 35 °C x 68h	TCBS 35 °C x 18-24h GPSA 35 °C x 18-24h	TSA, Kliger, String test, Sensibilità ai O/129; Test biochimici		

continua a pag. seguente

segue dalla pag. precedente

Parametro	R i c e r c a				N u m e r a z i o n e	
<i>Lactobacillus bulgaricus</i> e <i>Streptococcus thermophilus</i>					MRS agar 37°Cx72h (anaerobiosi) M17 agar 37°Cx48h	Esame microscopico, Catalasi
Valutazione della stabilità e della contaminazione delle conserve	Preincubazione 30°C x 21 gg e 55°C x 5-7 gg Esame contenitori Caratteri organolettici Esame microscopico pH				- Brodo triptone-soia - Cooked Meat Medium Broth - Sabouraud brodo 30°C x 72 ore	



## 1. Numerazione dei microrganismi a 30°C

---

### 1 - Oggetto e campo di applicazione

Metodo per la numerazione, negli alimenti, dei microrganismi (in maggioranza batteri, in minor parte lieviti e muffe) mediante conteggio delle colonie dopo incubazione in aerobiosi a 30°C in terreno solido.

### 2 - Principio del metodo

Semina per inclusione nella massa di un appropriato terreno solido non selettivo di un volume definito del campione in esame (o della sospensione iniziale) e delle successive diluizioni decimali. Incubazione delle piastre a 30°C per 72 ore. Calcolo del numero di unità formanti colonia di microrganismi per grammo o per millilitro, di campione in base al numero di colonie sviluppatesi sulle piastre alle diluizioni opportunamente scelte.

### 3 - Terreni di coltura e reagenti

- Plate Count Agar (PCA)	n.	1
- Skim-Milk Agar (SMA)	"	2
- Agar Gelisato (AG)	"	3

### 4 - Procedimento

Prelevare asepticamente almeno 10 g del campione e diluirli in rapporto 1:10 usando un idoneo omogeneizzatore.

Eseguire ulteriori diluizioni decimali fino a quella ritenuta presuntivamente utile per un adeguato conteggio (in mancanza di elementi valutativi, fino a 10<sup>-7</sup>) (vedi cap.1 par.7).

Allestire piastre di Plate Count Agar (1) o, nel caso del latte e derivati, di Skim-milk agar (2) e nel caso di paste fresche non congelate, di Agar Gelisato (3), secondo le procedure generali del conteggio dei microrganismi in piastra (semina *pour plate*; vedi cap.1 par.8).

Il terreno al gelisato può essere impiegato anche in quelle circostanze in cui si voglia escludere dal conteggio la componente lattobacillare, particolarmente ricca in alcuni tipi di alimenti, allo scopo di poter meglio valutare la loro contaminazione.

Incubare in aerobiosi a 30°C per 72h; nel caso dell'esame di prodotti della pesca, incubare invece a 25°C per 72h.

### 5 - Espressione dei risultati

Dopo l'incubazione procedere al rilevamento di tutte le colonie presenti, effettuando la numerazione secondo le norme generali del conteggio in piastra delle colonie di microrganismi (vedi cap.1 par.8) e riportando il risultato come u.f.c./g o /ml di campione esaminato.

## 2. Numerazione di lieviti e muffe

### Metodo tradizionale

#### 1 - Oggetto e campo di applicazione

Metodo per la numerazione, negli alimenti, di lieviti e muffe con la tecnica del conteggio delle colonie dopo incubazione a 25°C in terreno solido.

Per lieviti e muffe si intendono i microorganismi con caratteri morfologici tipici che formano colonie entro 5 gg a 25°C nelle condizioni specificate nel metodo.

#### 2 - Principio del metodo

Inoculazione di un volume definito del campione in esame e/o delle sue diluizioni decimali sulla superficie o nella massa di un terreno di coltura selettivo specifico. Incubazione delle piastre in aerobiosi a 25°C per 3-5gg. Calcolo del numero di unità formanti colonia di lieviti e di muffe per grammo o per millilitro di campione, in base al numero di colonie sviluppatesi sulle piastre alle diluizioni opportunamente scelte.

#### 3 - Terreni di coltura e reagenti

- |   |    |   |
|---|----|---|
| - Yeast-dextrose-oxytetraciclina-gentamicin-agar (carne e derivati) | n. | 4 |
| - Yeast-dextrose-chloramphenicol-agar medium (altri alimenti)       | "  | 5 |

#### 4 - Procedimento

*Nota bene:* Considerate le possibili varianti previste, tutte le condizioni specifiche utilizzate nella preparazione del campione e delle piastre devono essere descritte nel rapporto di analisi.

##### *Preparazione del campione*

Per gli alimenti solidi o semisolidi, pesare 10 g di campione in un mixer sterile o in una busta per Stomacher. Aggiungere 90 ml di diluente e procedere all'omogeneizzazione (diluizione 1:10). Se viene impiegato il mixer, attivarlo per un tempo sufficiente affinché vengano effettuate un numero totale di rivoluzioni comprese tra 15000 e 20000, non oltrepassando comunque il tempo limite (vedi nota).

La rigorosa standardizzazione dell'omogeneizzazione del campione e delle diluizioni successive può consentire di limitare la variabilità della frammentazione delle ife fungine e della separazione delle spore, nonché della loro dispersione, con maggiore riproducibilità dei risultati. Per omogeneizzare materiali finemente suddivisi come farina, spezie ecc. e cibi relativamente teneri, come i formaggi molli, è preferibile utilizzare lo Stomacher. In genere è sufficiente un trattamento di circa 1 minuto. Per i formaggi duri o le carni il trattamento in Stomacher (2' circa) deve essere preceduto da un'accurata frammentazione del campione, inoltre può essere utile impiegare i sacchetti per Stomacher dotati di filtro interno per trattenere, al momento del prelievo delle aliquote destinate alla semina o alle diluizioni, le particelle più grossolane. Per alimenti ancora più consistenti, come granaglie e semi oleosi, la triturazione può dare un omogenato migliore, salvo che non si sottoponga il campione, collocato in busta per Stomacher, ad una preliminare macerazione a 0°C-1°C per 10-12 ore. I tempi di triturazione in mixer non dovrebbero mai superare i 2'; infatti trattamenti più lunghi potrebbero frammentare il micelio in segmenti troppo corti per risultare vitali. Il diluente consigliato è la soluzione salina peptonata (vedi cap.1, par. 7). Possono anche essere impiegati altri diluenti, incluso il tampone fosfato. L'aggiunta di Polisorbitan (Tween 80 allo 0,1%) facilita il distacco e la dispersione delle spore. Se i

lieviti devono essere numerati in prodotti secchi o in bevande concentrate (sciroppi), è preferibile che il diluente contenga il 20% di saccarosio o glucosio, poiché le cellule potrebbero essere più suscettibili allo shock osmotico.

Entro 10-15 minuti dall'omogeneizzazione del campione, preparare le ulteriori diluizioni decimali (fino al livello presuntivamente ritenuto utile per effettuare il conteggio), mescolando accuratamente tra l'una e l'altra, se necessario con l'impiego di un vortex per 5-10 secondi. Evitando in modo analogo che il prodotto subisca inopportune sedimentazioni, procedere alle diluizioni decimali dei campioni liquidi.

Le diluizioni seriali per la determinazione dei miceti vengono effettuate analogamente a quanto previsto in batteriologia. Tuttavia, poiché le spore fungine e le cellule dei lieviti sedimentano più rapidamente dei batteri quando sono sospese nel diluente, non devono trascorrere più di pochi secondi tra la fine del mescolamento in provetta ed il prelievo con la pipetta dell'aliquota da trasferire. Dopo il prelievo, anche la sedimentazione nella pipetta è sorprendentemente rapida, per cui l'aggiustamento del liquido ed il rilascio dell'aliquota prevista dovrebbero essere operazioni rapide e precise. Se deve essere rilasciata più di una singola aliquota (per esempio, in due piastre di Petri) occorre che la pipetta, nel periodo intermedio tra le successive operazioni, venga tenuta in posizione quasi orizzontale.

#### *Allestimento delle piastre ed incubazione*

Allestire due piastre di petri per ciascuna diluizione. La prima coppia di piastre deve essere inoculata con il campione tal quale per gli alimenti liquidi e con la diluizione madre (1:10) per gli alimenti solidi e semisolidi (vedi nota).

Ogni piastra dovrà contenere circa 15 ml del terreno Yeast-dextrose-oxytetraciclina-gentamicin-agar (4) (per la carne e i derivati) o del terreno Yeast-dextrose-Chloramphenicol-agar medium (5) (per gli altri alimenti)

Allestire anche una piastra di controllo da non sottoporre ad inoculazione.

Il metodo di semina per spatolamento superficiale è considerato una tecnica più adatta di quella dell'inclusione nella massa del terreno. A causa del loro habitat aerobico, i miceti si sviluppano più lentamente nelle sezioni più profonde dell'agar e potrebbero essere mascherati dalle colonie che si sviluppano sulla superficie. La quantità ottimale di inoculo sulla superficie della piastra è di 0,1 ml; si potranno ottenere risultati migliori se le piastre vengono accuratamente asciugate prima dell'uso (v. cap.1, par.5).

Nel caso si voglia adottare la tecnica dell'inclusione nella massa, l'inoculo deve essere di 1 ml per piastra ed il terreno di coltura, mantenuto a 45°C in b.m., deve essere versato in piastra entro 15-20 minuti dalla fine della preparazione della prima diluizione del campione.

Incubare le piastre a 25°C per 3-5 gg.

In ambienti da temperati a subtropicali, 25°C è la temperatura di incubazione più adatta per il lavoro di routine. Nelle regioni tropicali 30°C è una temperatura adatta per la conta di ifomiceti in prodotti conservati a temperatura ambiente. In regioni fredde e temperate, come l'Europa centrale e settentrionale, è stata raccomandata come temperatura ottimale di incubazione quella di 22°C.

Durante l'incubazione collocare le piastre Petri con il coperchio in alto poiché alcuni tra gli ifomiceti più comuni possono produrre un elevato numero di spore, che in una piastra rovesciata potrebbero essere trasferite al coperchio. Il capovolgimento della piastra di Petri per l'osservazione e la rimozione del coperchio libererebbero numerose spore nell'aria o sui piani di lavoro, causando seri problemi di contaminazione dell'ambiente di lavoro.

I moderni terreni per la conta e l'isolamento di funghi si basano, per l'inibizione dei batteri, sull'uso di antibiotici (Cloramfenicolo, Gentamicina, Tetraciclina) a pH quasi neutro. Tali terreni permettono meglio la ripresa di miceti stressati e molto sensibili ai terreni acidi usati nel passato. Tuttavia occorre tener presente che l'uso di terreni antibiotati ha lo svantaggio di indurre una pressione selettiva

favorevole a ceppi antibiotico-resistenti che tendono a diffondersi nell'ambiente. Per molti anni il Rosa bengala (sensibile alla fotodegradazione!) è stato aggiunto ad una varietà di terreni allo scopo di favorire le colonie ad espansione lenta ed inibire i funghi ad espansione rapida; più recentemente per lo stesso scopo, è stato impiegato il Dichloran (2,6-dicloro-4-nitroanilina). Molte specie a media velocità di espansione, in particolare appartenenti ai generi *Aspergillus* e *Penicillium*, si sviluppano meglio su terreni con nutrienti adeguati; terreni a basso contenuto di nutrienti come *Potato Destrose Agar* vengono poco usati perchè sono selettivi verso alcune di esse.

Oltre ai terreni specificamente indicati nel metodo, il terreno Dichloran-Rosa Bengala-Cloramfenicolo-agar (DRBC) è raccomandato come adatto per un uso generale, sia per la determinazione dei lieviti che delle muffe in diversi tipi di alimenti. Questo terreno contiene sia *Rosa bengala* (25 mg/Kg) che *Dichloran* (2 mg/Kg), che limitano l'espansione delle colonie senza influenzare eccessivamente la germinazione delle spore.

Per la conta di muffe xerofile e lieviti osmotolleranti sono più adatti terreni addizionati con soluti quali glicerolo, glucosio, saccarosio e cloruro di sodio.

Se l'interesse primario riguarda i funghi che producono micotossine, specialmente *Aspergillus flavus* o il *Penicillium viridicatum*, sono disponibili terreni selettivi per queste specie.

### **Interpretazione**

Annotare le colonie presuntive di lieviti ed ifomiceti presenti su ciascuna piastra dopo 3 e 4 gg di incubazione. Dopo 5 gg di incubazione, considerare quelle piastre che contengono tra 15 e 150 colonie e procedere al conteggio separato di ifomiceti e lieviti.

Se si nota una crescita eccessiva di ifomiceti, o se risulta difficile individuare colonie ben isolate, ritenere come valide le colonie rilevate dopo 4 o, se necessario, anche dopo soli 3 gg di incubazione. In tal caso, annotare il periodo di incubazione nel rapporto di analisi.

In genere non è possibile contare più di 150 colonie di ifomiceti, ma nel caso di una crescita rapida, il numero massimo che può essere distinto con una certa accuratezza sarà assai più basso. Anche a causa di tali limitazioni, potrebbero risultare errori di conteggio più elevati di quelli che si riscontrano per i batteri.

In assenza di funghi filamentosi, possono essere contate invece fino a 300 colonie di lieviti per piastra e gli errori risultano comparabili con quelli che ci si aspetta per le conte batteriche.

### **Conferma**

Le colonie batteriche eventualmente presenti risultano generalmente di dimensioni più piccole e con aspetto meno lucido e compatto di quelle riferibili ai lieviti. Le colonie di Ifomiceti possiedono un aspetto superficiale generalmente inconfondibile. Tuttavia, nel caso che le colonie presenti non evidenziassero caratteristiche spiccatamente tipiche, occorre procedere ad un esame microscopico su un aliquota significativa di esse per attuare una corretta distinzione.

Risalire al numero di lieviti ed ifomiceti in base alla percentuale di colonie confermate, all'inoculo effettuato nelle piastre ed alle diluizioni prese in considerazione (vedi cap.1, par. 8).

## **5 - Espressione dei risultati**

Riportare, separatamente, il numero di unità formanti colonie di lieviti ed ifomiceti per g o ml di campione.

L'entità numerica del risultato assume un valore solo orientativo in relazione alla reale invasione fungina del campione.

## Metodo di Howard

### Oggetto e campo di applicazione

Metodo per la numerazione delle muffe nelle conserve di pomodoro, mediante osservazione diretta al microscopio.

Il metodo viene riportato integralmente nella G.U. del 1-9-1975 cui si rimanda.

### Semina diretta su piastra

In alcune circostanze, il metodo delle diluizioni scalari non è il modo più efficace per valutare la contaminazione fungina degli alimenti.

Per gli alimenti particolati come le arachidi o il grano la semina diretta su piastra del campione può fornire risultati più utili.

La semina diretta su piastra fornisce una stima della estensione dell'invasione di un prodotto, dato che comunemente è espresso in percentuale. I risultati non sono facilmente comparabili con quelli ottenuti con il metodo della diluizione.

La semina diretta su piastra (contenente un terreno selettivo) è spesso il modo migliore per studiare il grado di contaminazione di un prodotto da parte di un micete specifico come *Aspergillus flavus*. Questo è il solo metodo soddisfacente per isolare xerofili esigenti come *Xeromyces bisporus*, *Eremascus* e *Chrysosporium xerofilo*.

Se si vogliono mettere in evidenza le ife che sono penetrate e cresciute nel prodotto, i campioni devono essere disinfettati in superficie, eliminando le spore contaminanti adese alla superficie stessa prima della semina in piastra.

La procedura per la disinfezione può essere la seguente: Campioni di un alimento particolato (da 10 a 50 g) vengono immersi in una soluzione di ipoclorito di sodio (concentrazione di ipoclorito 0,4% circa), il rapporto tra il volume della soluzione disinfettante e quello del campione dovrebbe essere approssimativamente di 10:1. Dopo due minuti, la soluzione di ipoclorito viene allontanata (per decantazione attraverso un sacchetto filtrante) e il campione viene risciacquato con acqua sterile, in quantità pari almeno a quella della soluzione disinfettante. Le particelle di alimento vengono adagiate sulle piastre di Petri contenenti terreno adatto usando delle pinze sterili. Il numero ottimale di frammenti di campione per piastra dipenderà dalla loro grandezza: 16-20 grani di frumento od 8-10 grani di arachidi può essere una indicazione. I frammenti non dovrebbero essere troppo numerosi altrimenti risulterebbe difficile leggere la piastra.

### Campionamento dalle superfici

Ci sono diversi metodi per il campionamento diretto della flora fungina sulla superficie di prodotti come frutta, carni, formaggi, salumi, pesce essiccato.

Il prelievo con tamponcini di cotone o di alginato, da eluire e piastrare successivamente, può essere indicato per analisi destinate ad una valutazione qualitativa. Se i campioni sono particolati o possono essere tagliati in frammenti di grandezza adeguata (quadrati di grandezza pari o superiore a 10 mm di lato), una tecnica semplice è quella di pressarli sulla superficie di un idoneo terreno agarizzato posto in una piastra di Petri. Il campione viene quindi rimosso, lasciando una impronta e alcune spore od ife miceliali trasferite formeranno colonie nell'arco di pochi giorni.

### Isolamento di specie fungine

Il termine isolamento è qui usato nel suo significato più stretto: preparazione di una coltura pura libera da ogni contaminazione e pronta per l'identificazione.

**Lieviti.** Le varie tecniche impiegate per l'isolamento dei batteri sono ugualmente adatte per l'isolamento di lieviti. Un metodo classico è quello di disperdere una porzione di una colonia in 2-3 ml di soluzione fisiologica sterile, per poi effettuare uno striscio su una piastra di terreno agarizzato.

Se, dopo incubazione, le colonie che si sviluppano appaiono simili per grandezza e aspetto, la coltura può essere considerata pura. Sono tuttavia consigliabili dei controlli microscopici. La purezza è indicata non tanto dalla uniformità della grandezza delle cellule, quanto dalla somiglianza dell'aspetto di preparati provenienti da colonie diverse. Le colture pure vengono conservate su agar malto a becco di clarino.

**Muffe.** Le tecniche di striscio sono spesso inefficaci per i funghi filamentosi ed in genere non sono raccomandate, per cui si preferisce la tecnica a "puntatura singola o multipla". L'isolamento è subordinato al prelievo di piccoli frammenti di ife o di poche spore da una piastra recente con colonie ben distanziate. Le estremità delle ife della parte più esterna delle colonie sono quelle più libere da contaminazione. Usando un ago di platino, di nichel cromo o d'acciaio, sterilizzato al calore e poi ben raffreddato, prelevare un po' di spore o di ife miceliali e inoculare in un singolo punto sulla piastra di terreno agarizzato o su agar a becco di clarino. Sulle piastre, ripetere, con lo stesso prelievo, in altri due o tre punti distanti.

La purezza della subcoltura è in seguito giudicata in base alla uniformità dell'aspetto delle colonie che si formano dopo l'incubazione. Una coltura mista è spesso indicata da un addensamento di ife nel punto iniziale d'inoculo, circondato da una trama non ben definita di ife disseminate, da colonie con settori dall'aspetto diverso o disomogenei nello sviluppo radiale, da differenze nelle parti posteriori della colonia.

E' generalmente facile isolare i miceti che crescono rapidamente da quelli che crescono più lentamente, dato che i margini delle colonie miste in accrescimento appartengono ai primi. L'isolamento di ifomiceti a crescita lenta in presenza di microrganismi inquinanti a rapida crescita spesso richiede abilità pazienza e ingegnosità. E' consigliabile controllare il punto di inoculo ogni giorno e per parecchi giorni, perchè un particolare stadio nel ciclo vitale può essere vantaggioso per il prelievo. Infatti le colonie a crescita lenta possono germinare più rapidamente, o avere una zona accessibile all'ago prima che la crescita sia ultimata. Se allo stesso stadio la colonia a crescita lenta sporifica abbondantemente, allora può essere fatto un tentativo di prelevare con l'ago le spore. Con l'esperienza, l'uso di diverse temperature di incubazione e di terreni a basso contenuto di  $a_w$  e di nutrienti o l'aggiunta di Dichloran si può raggiungere meglio lo scopo.

### Determinazione della biomassa fungina

In relazione alla effettiva invasione fungina del prodotto, a causa del significato solo orientativo dei risultati ottenibili con il metodo tradizionale di ricerca degli ifomiceti, sono state usate tecniche diverse, chimiche e biochimiche, per valutare in modo più attendibile l'entità dello sviluppo micetico in un alimento. Queste tecniche generalmente si basano sulla determinazione di un unico componente dei miceti che non si trova in altri microrganismi o negli alimenti. Molti di questi metodi sono attualmente in fase di evoluzione.

**Chitina.** La chitina è un polimero della N-acetil-D-glucosammina, ed è il maggior costituente delle pareti delle spore e dei miceli dei funghi.

Si trova anche nell'esoscheletro degli insetti, ma non è presente nei batteri o negli alimenti. Così la chitina contenuta in un alimento o in materiali crudi ci può fornire una stima della contaminazione fungina.

Un metodo fra i più efficaci per la rilevazione della chitina è quello di Ride e Drysdal (1972). Esso prevede l'idrolisi alcalina a 130°C (o, più velocemente, a 121°C in autoclave) che provoca una parziale depolimerizzazione della chitina. Il successivo trattamento con acido nitroso causa la parziale

solubilizzazione e deaminazione dei residui di glucosammina a 2,5-anidro mannosio. Quest'ultimo viene valutato con un metodo colorimetrico, usando come principale reagente il 3-metil-2-benzotiazolone idrazone-HCl. L'analisi completa richiede circa 5 ore.

Un certo numero di studi ha indicato che l'analisi della chitina è una tecnica idonea per stabilire l'estensione dell'invasione fungina in alimenti come grano, semi di soia e orzo.

E' stata ipotizzata la possibilità di adottare questa tecnica in luogo del *metodo di Howard* per la conta delle muffe nei prodotti a base di pomodori. Il metodo della chitina presenta tuttavia alcune insufficienze ed è stato messo in discussione da alcuni autori. La relazione tra peso secco della biomassa fungina e contenuto di chitina varia infatti di almeno un fattore 2 per i diversi miceti che alterano gli alimenti. Alcuni alimenti contengono naturalmente amminopolisaccaridi come glucosammina e galattosammina, i quali dovrebbero essere rimossi per estrazione con acetone, prima dell'idrolisi. Oltre a ciò il contenuto di chitina non aumenta proporzionalmente rispetto alla crescita dei miceti e alla contaminazione da insetti dei campioni, e questo può essere causa di risultati ingannevoli. Materiali come le granaglie contengono frequentemente frammenti di insetti, e quindi è necessario controllarli prima di tentare l'analisi della chitina. Ciononostante la conta fungina secondo il *metodo di Howard* è notoriamente poco accurata ed ha scarsa o nessuna correlazione con l'invasione fungina o la crescita, pertanto l'analisi della chitina necessita di ulteriori studi prima di essere definitivamente abbandonata.

**Ergosterolo.** L'ergosterolo è il maggiore sterolo prodotto dai funghi. Così come la chitina può essere usato per misurare l'invasione fungina in alimenti e materie prime. La metodologia per valutare l'ergosterolo nei cereali è stata approntata da Seitz (1977-79).

I campioni vengono miscelati con etanolo, saponificati con alcali forti, estratti con etere e frazionati con cromatografia liquida ad alta pressione.

L'ergosterolo è rilevato mediante assorbimento nella banda ultravioletta, in modo ottimale a 282 nm, una lunghezza d'onda alla quale gli altri steroli mostrano un'assorbanza piccola o nulla.

Il metodo all'ergosterolo ha una grande sensibilità e, a differenza dell'analisi della chitina, richiede solo un'ora per il completamento.

E' anche più sensibile per i funghi a crescita rapida.

E' evidente che questo è un utile indicatore dell'invasione fungina degli alimenti, ed una promessa come tecnica routinaria per il controllo di qualità.

**Impedometria.** I metaboliti prodotti dalla crescita dei microrganismi nei terreni liquidi alterano l'impedenza del mezzo. La valutazione di questa variazione come misura indiretta della crescita batterica è stata suggerita da Hodley e Senyk (1975) ed è anche stata impiegata per i lieviti. Il metodo può essere esteso anche ai funghi filamentosi.

Jarvis et al. (1983) hanno riportato alcuni risultati relativi all'impiego di questa tecnica prospettando una possibile rivoluzione nelle metodologie quantitative per la valutazione dei funghi negli alimenti.

**Stima dell'ATP.** La valutazione dell'ATP è stata suggerita come misura della biomassa microbica, e le tecniche di bioluminescenza forniscono un metodo di rilevamento molto sensibile. Queste si basano sul fatto che i livelli di ATP nelle cellule vegetali ed animali non viventi sono molto bassi, e che i microrganismi possono effettivamente apportare negli alimenti la parte prevalente di tali molecole; il metodo ha alcune potenzialità nell'analisi microbiologica.

I miceti dovrebbero comunque essere separati dagli altri componenti della matrice alimentare e l'estrazione di molecole di ATP da cellule fungine è un procedimento abbastanza difficile, per cui attualmente risulta poco pratico adattare tale metodo alla micologia degli alimenti.

**Attività della pectinesterasi.** Offen e Dart hanno riportato un metodo rapido per rilevare le spore vitali dagli ifomiceti. La cromatografia gas-liquido viene usata per determinare la quantità di metanolo rilasciato dalla pectina per mezzo dell'azione dell'enzima fungino-pectinesterasi. Sono stati riferiti studi preliminari su sospensioni di *Aspergillus* e *Penicillium* pure e miste a spore.

### 3. Numerazione dei coliformi mediante conteggio delle colonie

#### 1 - Oggetto e campo di applicazione

Metodo per la numerazione dei Coliformi negli alimenti (in particolare nel latte pastorizzato) con la tecnica del conteggio delle colonie a 30°C in terreno solido.

#### 2 - Principio del metodo

Semina per inclusione nella massa del terreno selettivo solido di un volume definito di campione e/o delle sue diluizioni decimali, successiva incubazione delle piastre a 30°C per 24 ore e calcolo del numero di coliformi/g o /ml di campione considerando le colonie caratteristiche e quelle non caratteristiche sottoposte a conferma.

#### 3 - Terreni e reagenti

- |  |    |   |
|--|----|---|
| - Violet Red Bile Lactose Agar (VRBL)        | n. | 6 |
| - Brodo Bile Lattosio Verde Brillante (LBVB) | “  | 7 |

#### 4 - Procedimento

##### *Allestimento delle piastre e incubazione*

Nel caso di prodotti solidi e di prodotti liquidi non paucimicrobici, preparare le opportune diluizioni decimali del campione (cap.1, par.7) e trasferire in due piastre Petri 1 ml della prima diluizione (1:10), procedendo in modo analogo per le diluizioni successive.

Nel caso del *latte pastorizzato*, o di prodotti liquidi paucimicrobici, seminare 3 ml di campione in esame, trasferendoli in tre piastre Petri (1 ml per piastra).

Versare 12 ml circa di agar VRBL (6) in ciascuna delle piastre. Mescolare accuratamente. Lasciare riposare su una superficie orizzontale fino a solidificazione, quindi versare almeno 4 ml di agar VRBL sulla superficie del terreno inoculato. Lasciare solidificare.

Incubare a 30°C per 24 ore.

##### *Interpretazione e conferma*

Contare innanzitutto le colonie caratteristiche nelle piastre che contengono non più di 150 colonie complessivamente.

Le colonie caratteristiche per i Coliformi presentano colore rosso scuro, Ø almeno 0,5 mm con o senza precipitato intorno.

Se tutte le colonie o parte di esse hanno un aspetto non caratteristico effettuare un saggio di conferma su un adeguato numero di esse (3-5) inoculandole con un'ansa in provette di brodo Brilliant green lactose bile (7) ed incubando a 30°C per 24 ore. Considerare Coliformi le colonie che si sviluppano nel terreno producendo gas.

#### 5 - Espressione dei risultati

Dopo l'incubazione procedere al rilevamento di tutte le colonie presenti, effettuando la numerazione secondo le norme generali del conteggio in piastra delle colonie di microrganismi (cap.1, par. 8).



Nel caso del saggio di conferma, calcolare il numero di coliformi in base alla percentuale di colonie confermate.

Per il latte pastorizzato e per i campioni liquidi paucimicrobici esaminati in toto il numero di Coliformi/ml è dato dalla formula :

$$\frac{C}{n}$$

dove C è il numero totale di colonie di coliformi risultato dall'esame del campione (3 ml) ed n il numero di millilitri di campione esaminato (pari a 3).

Se le colonie caratteristiche sono più di 150 per piastra indicare il risultato come "numero probabile di coliformi in 1 g o ml di campione esaminato".

#### 4. Numerazione dei coliformi mediante tecnica MPN

##### 1 - Oggetto e campo di applicazione

Metodo per la numerazione dei Coliformi negli alimenti in terreno liquido.

##### 2 - Principio del metodo

Inoculazione di un terreno di coltura liquido di arricchimento selettivo, con una quantità specificata del campione in esame (o della sospensione iniziale) e delle successive diluizioni decimali. Subcolture delle provette positive in terreno selettivo. Calcolo del numero di *coliformi totali* con la valutazione statistica del numero più probabile basata sulla frequenza delle positività alle varie diluizioni.

##### 3 - Terreni di coltura e reagenti

- Brodo lauril solfato triptosio a doppia concentrazione (LSB×2)	n.	8
- Brodo lauril solfato triptosio (LSB)	"	9
- Brodo Bile Lattosio Verde Brillante (LBVB)	"	7

##### 4 - Procedimento

Prelevare asepticamente almeno 10 g del campione e diluirli (per i formaggi viene utilizzata la soluzione di sodio citrato - vedi cap.1, par. 7 - diluenti) omogeneizzando in rapporto 1:10. Eseguire le ulteriori diluizioni decimali 1:100 e 1:1000, ed eventualmente diluizioni ancora più spinte se si hanno motivi per ritenere possibile un elevato inquinamento da coliformi.

Nel caso di alimenti liquidi paucimicrobici utilizzare per l'inoculo anche il campione indiluito.

##### *Arricchimento selettivo*

Inseminare asepticamente serie di 3 provette, secondo il seguente schema:

- 3 provette contenenti ml 10 di Brodo Lauril solfato triptone a doppia concentrazione (8), ciascuna con 10 ml del materiale in esame diluito 1:10;
- 3 provette contenenti ml 10 di Brodo Lauril solfato triptone (9), ciascuna con ml 1 del materiale in esame diluito 1:10;
- 3 provette contenenti ml 10 di Brodo Lauril solfato triptone, ciascuna con ml 1 del materiale in esame diluito 1:100, oppure con ml 0,1 del materiale in esame diluito 1:10.
- 3 provette contenenti ml 10 di Brodo Lauril solfato triptone, ciascuna con ml 1 del materiale in esame diluito 1:1000, oppure con 0,1 ml del materiale in esame diluito 1:100.

Procedere analogamente con le eventuali diluizioni più spinte.

Incubare a 30°C per 24 ore. La presenza dei coliformi è indicata da intorbidamento e formazione di gas nelle campanule di Durham.

Nel caso non si riscontri produzione di gas incubare per altre 24 ore a 30°C.

**Conferma**

Seminare ml 0,1 delle brodoculture risultate positive, e comunque da tutte le brodoculture dove la torbidità del campione impedisce la evidenziazione della presenza di gas, in altrettante provette contenenti 10 ml di Brodo lattosio bile verde brillante (LBVB, 7).

Incubare a 30°C per 24 ore,

Nel caso non si riscontri presenza di gas incubare le provette fino ad un tempo complessivo di 48 ore.

La presenza dei coliformi è indicata dall'intorbidamento e dalla formazione di gas nelle campanule di Durham.

Per ogni diluizione, contare le provette di LBVB in cui è stato riscontrato intorbidamento e formazione di gas nelle campanule di Durham.

**5 - Espressione dei risultati**

Per risalire al "*numero più probabile*" (MPN) di Coliformi presenti in un grammo (o ml) di alimento, considerare le provette appartenenti a tre diluizioni consecutive significative (vedi cap.1 par. 8 - numerazione dei microrganismi in terreno liquido), ricostruire il numero caratteristico a tre cifre assegnando il valore 1 ad ogni provetta risultata positiva alla conferma ed il valore 0 ad ogni provetta risultata negativa, sommando quindi tra loro i valori ottenuti in ciascun gruppo di tre provette inoculate con la stessa diluizione. Leggere poi il corrispondente valore MPN/g o ml nella tabella di Mac Crady riportata nel cap.1, par.8 (Tabella 2) e moltiplicare tale valore per l'inverso del fattore di diluizione (in genere 10) della prima serie di provette considerata per ricostruire il numero caratteristico.

## 5. Numerazione dell'*Escherichia coli* presuntivo mediante tecnica MPN

### 1 - Oggetto e campo di applicazione

Metodo per la numerazione dell'*E. coli* presuntivo negli alimenti mediante tecnica MPN.

Nel caso che la numerazione dell'*E. coli* presuntivo venga effettuata in parallelo a quella dei *Coliformi totali*, si può utilizzare lo stesso brodo LSB (*Brodo lauril solfato*) incubato a 30°C per eseguire le specifiche subcolture di conferma. In caso contrario il terreno LSB verrà incubato a 37°C.

### 2 - Principio del metodo

Inoculazione di un terreno di coltura liquido di arricchimento selettivo (brodo LSB), con una quantità specificata del campione in esame (o della sospensione iniziale) e delle successive diluizioni decimali e incubazione delle provette a 37°C x 24-48 ore.

Subcolture delle provette positive in ulteriore terreno selettivo liquido ed incubazione a 45°C x 24-48 ore.

Inoculazione in acqua triptonata delle provette positive ed incubazione a 45°C x 24-48 ore.

Determinazione del numero più probabile di *E. coli* presuntivo mediante le tabelle MPN (cap.1, par. 8) considerando le provette di acqua triptonata positive: la differenziazione presuntiva di *E. coli* si basa sulla capacità del microorganismo di produrre a 45°C indolo a partire dal triptone (a differenza degli altri coliformi termotolleranti).

Eventuali ulteriori prove di conferma per la definizione di *E. coli*.

Alcuni ceppi patogeni di *E. coli* non si sviluppano a 45°C.

### 3 - Terreni di coltura e reagenti

- Brodo lauril solfato triptosio a doppia concentrazione (LSBx2)	n.	8
- Brodo lauril solfato triptosio (LSB)	"	9
- Brodo E.C.	"	10
- Acqua Triptonata	"	11
- Reattivo di Kovacks	"	12
- Agar di Levine (EMB)	"	13

### 4 - Procedimento

Prelevare asetticamente almeno 10 g del campione e diluirli in rapporto 1:10. Eseguire le ulteriori diluizioni decimali 1:100 e 1:1000, ed eventualmente diluizioni ancora più spinte se si hanno motivi per ritenere possibile un elevato inquinamento da coliformi.

Nel caso di alimenti liquidi paucimicrobici utilizzare per l'inoculo anche il campione non diluito.

**Arricchimento selettivo**

Inseminare asetticamente serie di 3 provette, secondo il seguente schema:

- 3 provette contenenti ml 10 di Brodo Lauril solfato triptone a doppia concentrazione (8), ciascuna con 10 ml del materiale in esame diluito 1:10;
- 3 provette contenenti ml 10 di Brodo Lauril solfato triptone (9), ciascuna con ml 1 del materiale in esame diluito 1:10;
- 3 provette contenenti ml 10 di Brodo Lauril solfato triptone, ciascuna con ml 1 del materiale in esame diluito 1:100, oppure con ml 0,1 del materiale in esame diluito 1:10.
- 3 provette contenenti ml 10 di Brodo Lauril solfato triptone, ciascuna con ml 1 del materiale in esame diluito 1:1000, oppure con 0,1 ml del materiale in esame diluito 1:100.

Procedere analogamente con le eventuali diluizioni più spinte.

Incubare a 37°C per 24 ore.

Nel caso non si riscontri produzione di gas, oppure la torbidità del terreno impedisca l'osservazione delle campanule, incubare per altre 24 ore a 37°C.

**Secondo arricchimento selettivo**

Da ogni provetta in cui si nota torbidità e produzione di gas, seminare ml 0,1 in un'ulteriore provetta provette contenenti 10 ml del secondo terreno selettivo (Brodo E.C., 10) preriscaldato a 45°C.

Incubare in *b.m.* a 45°C per 24 ore.

Nel caso non si riscontri presenza di gas incubare le provette fino ad un tempo complessivo di 48 ore.

**Prova della produzione di indolo**

Da ogni provetta del terreno di secondo arricchimento in cui si nota torbidità e produzione di gas, seminare ml 0,1 in un'ulteriore provetta contenente 10 ml di *acqua triptonata* (11).

Incubare in *b.m.* a 45°C per 48 ore.

Aggiungere 0,5 ml di reattivo di *Kovacs* (12), mescolare bene ed esaminare dopo 1 minuto. L'eventuale presenza di indolo viene segnalata dalla comparsa di una colorazione rossa nella fase alcolica.

**Interpretazione dei risultati**

Per ogni diluizione, contare il numero delle provette in cui è stata riscontrata produzione di indolo in acqua triptonata.

L'eventuale semina di ml 0,1 dal terreno di primo arricchimento in acqua triptonata per verificare la produzione d'indolo, contemporaneamente all'inoculo del secondo terreno selettivo, permette di ridurre i tempi di analisi di 48 ore, tuttavia in quanto si tratta di una semplificazione della metodica che ne riduce il grado di precisione, tale semplificazione può essere adottata solo in casi di particolare urgenza e deve essere chiaramente specificata nel rapporto d'analisi.

### 5 - Espressione dei risultati

Per risalire al "numero più probabile" (MPN/g o ml) di *E.coli*, vedi *espressione dei risultati* riportata nel metodo della numerazione dei Coliformi mediante tecnica MPN (cap.2, par.4.)

### 6 - Eventuali prove di conferma

Allo scopo di confermare la presenza di *E.coli*, quando questo è richiesto, si procede come segue:

Strisciare un'ansata della coltura prelevata dal brodo E.C. e risultata positiva alla produzione di indolo, su agar di Levine (13).

Incubare a 37°C per 24 ore.

L'*E.coli* in questo terreno appare in colonie isolate, del diametro di 2-3 mm, con una certa tendenza ad una crescita confluyente, che presentano aspetto metallico verdastro se osservate in luce riflessa e centri di color rosso porpora se osservate in luce trasmessa.

Alcune colonie che in terreno di Levine rispondono alle succitate caratteristiche morfologiche vengono sottoposte alla colorazione del Gram (bastoncelli gram-negativi) e alle prove biochimiche di conferma (almeno: Utilizzazione del citrato, Rosso-metile, Voges-Proskauer, Ossidasi), utilizzando preferibilmente sistemi miniaturizzati reperibili in commercio.

## 6. Numerazione dell'*Escherichia coli* presuntivo nelle paste surgelate mediante tecnica MPN

---

### 1 - Oggetto e campo di applicazione

Metodo per la numerazione dell'*Escherichia coli* presuntivo nelle paste surgelate mediante tecnica MPN.

### 2 - Principio del metodo

Inoculazione di un terreno di coltura liquido di arricchimento, con una quantità specificata del campione in esame (o della sospensione iniziale) e delle successive diluizioni decimali. Subcolture ad elevata temperatura delle provette positive in terreno selettivo. La differenziazione presuntiva di *E. coli* si effettua secondo la prova di *Mac Kenzie*, basata sulla capacità del microrganismo di produrre a 45 °C indolo a partire dal triptone (a differenza degli altri coliformi termotolleranti). Calcolo del numero di *E. coli* presuntivo con la valutazione statistica del numero più probabile basata sulla frequenza delle positività alle varie diluizioni. Eventuali ulteriori prove di conferma per la definizione di *E. coli*.

### 3 - Terreni di coltura e reagenti

- Brodo lattosato	n.	14
- Brodo Bile Lattosio Verde Brillante (LBVB)	"	7
- Acqua triptonata	"	11
- Agar di Levine	"	13
- Reattivo di Kovacks	"	12

### 4 - Procedimento

Prelevare asetticamente almeno 10 g del campione e diluirli in acqua peptonata tamponata (vedi cap.1, par. 7 - *diluenti*) previamente refrigerata, omogeneizzando in rapporto 1:10. Eseguire le ulteriori diluizioni decimali 1:100 e 1:1000, ed eventualmente diluizioni ancora più spinte se si hanno motivi per ritenere possibile un elevato inquinamento.

#### *Arricchimento*

Inseminare asetticamente serie di 3 provette, secondo il seguente schema:

- 3 provette contenenti ml 10 di Brodo lattosato (14), ciascuna con 1 ml del materiale in esame diluito 1:10;
- 3 provette contenenti ml 10 di Brodo lattosato, ciascuna con ml 1 del materiale in esame diluito 1:100; oppure con 0,1 ml del materiale in esame diluito 1:10.
- 3 provette contenenti ml 10 di Brodo lattosato, ciascuna con ml 1 del materiale in esame diluito 1:1000, oppure con 0,1 ml del materiale in esame diluito 1:100

Procedere analogamente con le eventuali diluizioni più spinte.

Incubare a 37°C per 24 ore.

Nel caso non si riscontri produzione di gas incubare per altre 24 ore a 37°C.

#### ***Secondo arricchimento e prova dell'indolo***

Dalle brodoculture di brodo lattosato risultate positive (intorbidamento e produzione di gas) eseguire subcolture di ml 0,1 in altrettante provette contenenti 10 ml di Brodo LBVB (14) e in altrettante provette contenenti 10 ml di acqua triptonata preriscaldata a 45°C (11).

Incubare in *b.m.* a 45°C per 48 ore,

Addizionare nelle provette di acqua triptonata 0,5 ml di reattivo di *Kovacs* (12), mescolare bene ed esaminare dopo 1 minuto. L'eventuale presenza di indolo viene segnalata dalla comparsa di una colorazione rossa nella fase alcolica.

La presenza di *E.coli* presuntivo è indicata dall'intorbidamento e dalla formazione di gas nel Brodo LBVB e dalla produzione di indolo in acqua triptonata.

#### ***Interpretazione dei risultati***

Per ogni diluizione, registrare le positività simultanee in EC broth e in acqua triptonata.

#### **5 - Espressione dei risultati**

Per risalire al "*numero più probabile*" (MPN/g o ml) di *E.coli*, vedi *espressione dei risultati* riportata nel metodo della numerazione dei coliformi totali.

#### **6 - Eventuali prove di conferma**

Allo scopo di confermare la presenza di *E.coli*, quando questo è richiesto, si procede come segue:

Strisciare un'ansata prelevata dalle brodoculture risultate indolo-positivo su piastre di agar di Levine (13).

Incubare a 37°C per 24 ore.

L' *E.coli* in questo terreno appare in colonie isolate, del diametro di 2-3 mm, con una certa tendenza ad una crescita confluyente, che presentano aspetto metallico verdastro se osservate a luce riflessa e centri di color rosso porpora se osservate in luce trasmessa.

Alcune colonie che in terreno di Levine rispondono alle succitate caratteristiche morfologiche vengono sottoposte alla colorazione di Gram (bastoncelli Gram-negativi) e alle prove biochimiche di conferma (almeno: utilizzazione del citrato, rosso-metile, Voges-Proskauer, ossidasi) utilizzando preferibilmente sistemi miniaturizzati reperibili in commercio.



## 7. Numerazione dei coliformi fecali e di *Escherichia coli* presuntivo nei molluschi mediante tecnica MPN

---

### 1 - Oggetto e campo di applicazione

Metodo per la ricerca e numerazione dei coliformi termotolleranti o fecali e dell'*Escherichia coli* presuntivo nei molluschi eduli lamellibranchi mediante tecnica MPN.

### 2 - Principio del metodo

Inoculazione di un terreno di coltura liquido di arricchimento selettivo (brodo A1), con una quantità specificata del campione in esame (o della sospensione iniziale) e delle successive diluizioni decimali. Le colture così approntate sono incubate per un breve periodo a temperatura di 37°C e quindi per 21 ore a temperatura elevata (44,5°C). La differenziazione presuntiva di *E.coli* si effettua secondo la prova di Mac Kenzie, condotta su subculture in acqua triptonata delle provette di terreno di arricchimento selettivo risultate positive.

### 3 - Terreni di coltura e reagenti

- Brodo A1	n.	15
- Acqua triptonata	“	11
- Reattivo di Kovacks	“	12

### 4 - Procedimento

#### *Preparazione del campione*

Prelevare da 50 a 200 invertebrati per aliquota, con criterio inverso alla dimensione delle varie specie.

Togliere con una spazzola dai molluschi il fango, le incrostazioni, nonché epifiti, epizoi, ecc., eventualmente presenti

Lavare le valve esterne con acqua clorata (cloro residuo circa 20 ppm) raffreddata con ghiaccio

Sciacquare con acqua distillata sterile.

Aprire ogni singolo mollusco con idoneo utensile sterile e lasciar cadere il contenuto (corpo e liquido intervalvare) in un recipiente sterile.

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

#### *Preparazione delle diluizioni*

Preparare quindi le seguenti diluizioni dal precedente omogeneizzato (la prima in stomacher):

- diluizione A : 10 g di omogeneizzato + 90 ml di sol. fisiologica sterile equivalenti a 0,1 g campione/g
- diluizione B : 1 ml di diluizione A + 9 ml di sol. fisiologica sterile equivalenti a 0,01 g campione/g
- diluizione C : 1 ml di diluizione B + 9 ml di sol. fisiologica sterile equivalenti a 0,001 g camp./g

### ***Numerazione dei coliformi fecali o termotolleranti***

Seminare le diluizioni di cui sopra secondo il seguente schema:

- ml 1 diluizione A per provetta, in 5 provette contenenti 9 ml di brodo A1 (15) ciascuna
- ml 1 diluizione B per provetta, in 5 provette contenenti 9 ml di brodo A1 ciascuna
- ml 1 diluizione C per provetta, in 5 provette contenenti 9 ml di brodo A1 ciascuna

In caso di molluschi presumibilmente poco contaminati, al fine di una maggiore accuratezza nella valutazione dei risultati, si suggerisce la semina diretta di 1 g di omogeneizzato e delle successive diluizioni A e B. In tal caso i valori riportati in tabella 3 (cap. 1) dovranno essere divisi per un fattore 10.

Incubare a 37°C per 3 ore (rivitalizzazione dei germi stressati) e quindi a 44,5°C per 21 ore.

La presenza dei coliformi fecali o termotolleranti è indicata dalla presenza di torbidità e di gas. In base al numero delle provette positive si risale al numero più probabile di coliformi fecali o termotolleranti/100 g molluschi applicando la tabella di Mac Crady (cap. 1, par. 8, Tabella 3).

### ***Numerazione di *Escherichia coli* presuntivo***

Seminare ml 0,1 delle colture in brodo A1 risultate positive per la ricerca dei Coliformi fecali in altrettante provette contenenti ml 10 di acqua triptonata (11).

Incubare a 44,5°C per 24 ore.

Addizionare nelle provette di acqua triptonata 0,5 ml di reattivo di Kovacs (12), mescolare bene ed esaminare dopo 1 minuto. L'eventuale presenza di indolo viene segnalata dalla comparsa di una colorazione rossa nella fase alcolica.

La presenza di *E. coli* presuntivo è indicata, dalla simultanea produzione di indolo in Acqua Triptonata e dalla produzione di gas nelle corrispondenti provette di Brodo A1 allestite per la numerazione dei coliformi fecali.

## **5 - Espressione dei risultati**

Per risalire al "numero più probabile" (MPN) di *Coliformi fecali* ed *E. coli* presuntivo presenti in un grammo (o ml) di mollusco, considerare le provette appartenenti a tre diluizioni consecutive significative (vedi MPN, cap. 1, par. 8), ricostruire per ogni classe di microrganismi il numero caratteristico a tre cifre assegnando il valore 1 ad ogni provetta risultata positiva ed il valore 0 ad ogni provetta risultata negativa e sommando quindi tra loro i valori ottenuti in ciascun gruppo di tre provette inoculate con la stessa diluizione. Leggere poi il corrispondente valore MPN/g (o ml) nella tabella di Mac Crady riportata nel cap. 1, par. 8 (Tabella 3) e moltiplicare tale valore per l'inverso del fattore di diluizione della prima serie di provette considerata per ricostruire il numero caratteristico (in genere 10).

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

Nota bene: La ricerca dei Coliformi fecali e dell'*E. coli* nei molluschi bivalvi può essere effettuata mediante la prova del Numero Più Probabile o mediante qualsiasi altro procedimento batteriologico che presenti lo stesso grado di precisione (DL 530 del 30-12-1992).

## 8. Numerazione di *Staphylococcus aureus* mediante conteggio delle colonie

### 1 - Oggetto e campo di applicazione

Metodo per la numerazione negli alimenti di *Staphylococcus aureus*, mediante conteggio delle colonie in terreno solido.

### 2 - Principio del metodo

Inoculazione della superficie di un terreno di coltura solido selettivo con una quantità specificata del campione in esame (o della sospensione iniziale) e delle successive diluizioni decimali. Incubazione delle piastre a 37°C per 24-48 ore. Calcolo del numero di *S.aureus* per ml, o per g, di campione a partire dal numero di colonie tipiche o comunque sospette sviluppatesi sulle piastre alle diluizioni scelte in modo da produrre un risultato significativo e confermate mediante accertamenti morfologico-colturali e mediante il test della coagulasi.

### 3 - Terreni di coltura e reagenti

- Baird-Parker agar	n.	16
- Brain Hearth Infusion broth (BHI)	"	17
- Plasma di coniglio	"	18

### 4 - Procedimento

#### *Allestimento delle piastre e incubazione*

Prelevare asepticamente almeno 10 g del campione e diluirli in rapporto 1:10. Eseguire ulteriori diluizioni decimali fino ad 1:1000. Diluizioni più elevate sono consigliabili nei casi in cui si sospetti una forte contaminazione.

Eseguendo le operazioni in duplicato, trasferire in una piastra di terreno completo di Baird-Parker (16), con una pipetta sterile, da 0,1 a 0,5 ml di campione in esame, se liquido, o da 0,1 a 0,5 ml di sospensione iniziale (diluizione 1:10) negli altri casi. Gli inoculi superiori a 0,1 ml sono indicati nel caso vengano attesi conteggi bassi; si raccomanda tuttavia di distribuire su due piastre (Ø 90-100 mm), oppure su una piastra di dimensioni maggiori di quelle ordinarie ( ad es. Ø140 mm), gli inoculi maggiori di 0,25 ml.

Ripetere la procedura per la diluizione 1:100 e, se ritenuto necessario, per le diluizioni successive.

Utilizzando una spatola sterile in vetro (una per ogni piastra), distribuire con attenzione l'inoculo sulla superficie dell'agar il più rapidamente possibile, cercando di non toccare i bordi della piastra.

Lasciare asciugare le piastre a temperatura ambiente per circa 15 minuti.

Incubare in aerobiosi a 37°C per 24-48 ore.

Dopo le prime 24 ore segnare la posizione sul fondo delle piastre delle colonie tipiche presenti, dopo le seconde 24 ore segnare le ulteriori colonie tipiche comparse ed eseguire

il conteggio complessivo. Considerare preferenzialmente le piastre che contengono da 15 a 150 colonie sospette.

Le colonie tipiche sono nere, lucenti e convesse (diametro 1-1,5 mm dopo incubazione per 24 ore e 1,5-2,5 mm dopo incubazione per 48 ore), circondate da un alone chiaro che può apparire parzialmente opaco. Dopo incubazione per 24 ore, in questo alone chiaro può essere presente un anello opalescente, situato in immediato contatto con le colonie. Occorre tuttavia considerare colonie non tipiche, prive di alone, ma simili alle precedenti, che sono parimenti sospette: queste colonie vanno contate a parte. Le colonie sospette atipiche si formano frequentemente da ceppi di *S.aureus* che contaminano i prodotti lattiero-caseari. Vengono invece prodotte raramente da ceppi di *S.aureus* che contaminano altri prodotti. Per ragioni di opportunità statistica il limite inferiore per il numero di colonie per piastra è stato indicato in 15, ma, per scopi pratici, si richiede talvolta la valutazione di numeri inferiori di *S.aureus*. Attenersi pertanto alle norme generali indicate nel cap.1, par.8 riguardo ai conteggi nei terreni selettivi ed ai conteggi stimati (<15 colonie/piastra).

Selezionare, per la conferma, almeno cinque colonie tipiche ed altrettante atipiche, ma sospette, da ciascuna piastra.

#### **Conferma**

Da ogni colonia selezionata, prelevare, con un ago sterile, una porzione di materiale e trasferirlo in una provetta con 10 ml di Brain Heart Infusion (17).

Incubare a 37°C per 18-24 ore.

Eeguire l'esame morfologico previa colorazione Gram dei microrganismi sviluppati nelle singole brodocolture per accertarne l'aspetto tipico (cocchi Gram-positivi a grappolo).

Per il test della coagulasi, aggiungere asetticamente 0,1 ml di ogni brodocoltura a 0,3-0,5 ml di plasma di coniglio (18) (salvo che quantità diverse vengano indicate dal produttore) in una provetta sterile di 10x75 mm e incubare a 37°C. Verificare la coagulazione del plasma dopo 4-6 ore (salvo che altre condizioni non siano specificate dal produttore). Eeguire in parallelo un controllo negativo con BHI (17) sterile. Considerare positivo il test se il volume del coagulo occupa più del 75 % del volume originario del liquido.

#### **5 - Espressione dei risultati**

Riportare il numero di *S.aureus* /g o ml di campione, riferendosi alle norme riportate nel cap. 1, par. 8, relative al conteggio in piastra ed al conteggio nei terreni selettivi.

In particolare, sommare i conteggi medi calcolati di *S.aureus* ottenuti da colonie tipiche e atipiche confermate, tenendo conto dei rispettivi fattori di diluizione e del volume dell'inoculo.

## 9. Numerazione di *Staphylococcus aureus* mediante tecnica MPN

---

### 1 - Oggetto e campo di applicazione

Metodo per la numerazione di *Staphylococcus aureus* negli alimenti mediante tecnica MPN. Questa tecnica analitica viene utilizzata quando si deve determinare un piccolo numero di *S.aureus* o nel caso l'alimento sia contaminato da un elevato numero di germi competitori.

### 2 - Principio del metodo

Inoculazione di un terreno di coltura liquido di arricchimento selettivo, con una quantità specificata del campione in esame (o della sospensione iniziale) e delle successive diluizioni decimali. Subcolture delle provette positive in terreno selettivo solido, e conferma delle colonie tipiche sviluppate mediante accertamenti morfologico-colturali e mediante il test della coagulasi.

Calcolo del numero di *S.aureus* con la valutazione statistica del numero più probabile basata sulla frequenza delle positività alle varie diluizioni.

### 3 - Terreni di coltura e reagenti

- Brodo soia triptone al 10% in cloruro di sodio e l'1% in piruvato di sodio (TSBcp)	n.	106
- Baird-Parker agar	"	16
- Brain Hearth Infusion broth (BHI)	"	17
- Plasma di coniglio	"	18

### 4 - Procedimento

Prelevare asetticamente preferibilmente 50 g del campione e diluirli in acqua peptonata tamponata in rapporto 1:10 e procedere all'omogeneizzazione. Eseguire ulteriori diluizioni decimali fino ad 1:1000. Diluizioni più elevate sono consigliabili nei casi in cui si sospetti una forte contaminazione.

Nel caso di alimenti liquidi paucimicrobici utilizzare per l'inoculo anche il campione indiluito.

#### *Arricchimento selettivo*

Inseminare asetticamente serie di 3 provette, secondo il seguente schema:

- 3 provette contenenti ml 10 di Brodo soia triptone al 10% in cloruro di sodio e l'1% in piruvato di sodio (TSBcp, 106) ciascuna con ml 1 del materiale in esame diluito 1:10;
- 3 provette contenenti ml 10 di TSBcp, ciascuna con ml 1 del materiale in esame diluito 1:100.
- 3 provette contenenti ml 10 di TSBcp, ciascuna con ml 1 del materiale in esame diluito 1:1000

Procedere analogamente con le eventuali diluizioni più spinte.

Incubare in aerobiosi a 37°C per 48 ore.

Strisciare un'ansata prelevata dalle brodocolture precedentemente ben miscelate utilizzando un vortex, dove è stato notato un'intorbidamento, su piastre di Baird Parker agar.

Incubare in aerobiosi a 37°C per 24-48 ore.

Le colonie tipiche sono nere, lucenti e convesse (diametro 1-1,5 mm dopo incubazione per 24 ore e 1,5-2,5 mm dopo incubazione per 48 ore), circondate da un alone chiaro che può apparire parzialmente opaco. Dopo incubazione per 24 ore, in questa alone chiaro può essere presente un anello opalescente, situato in immediato contatto con le colonie.

Selezionare da ogni piastra dove vi è stata crescita almeno una colonia tipica.

#### *Conferma*

Trasferire ogni colonia selezionata o parte di essa, con un ago sterile, in una provetta con 10 ml di Brain Hearth Infusion (17).

Incubare a 37°C per 18-24 ore.

Eeguire l'*esame morfologico* previa colorazione Gram dei microrganismi sviluppatisi nelle singole brodocolture per accertarne l'aspetto tipico (cocchi Gram-positivi a grappolo).

Per il *test della coagulasi* aggiungere asetticamente 0,1 ml di ogni brodocoltura a 0,3-0,5 ml di plasma di coniglio (18) (salvo che quantità diverse vengano indicate dal produttore) in una provetta sterile di 10×75 mm e *incubare* a 37°C. Verificare la coagulazione del plasma dopo 4-6 ore (salvo che altre condizioni non siano specificate dal produttore). Eeguire in parallelo un controllo negativo con BHI (17) sterile. Considerare positivo il test se il volume del coagulo occupa più del 75 % del volume originario del liquido.

#### **5 - Espressione dei risultati**

Per risalire al "*numero più probabile*" (MPN) di *S.aureus* presenti in un grammo (o ml) di alimento, considerare le provette appartenenti a tre diluizioni consecutive significative (vedi cap.1 par. 8: MPN), ricostruire il numero caratteristico a tre cifre assegnando il valore 1 ad ogni provetta risultata positiva alla conferma ed il valore 0 ad ogni provetta risultata negativa, sommando quindi tra loro i valori ottenuti in ciascun gruppo di tre provette inoculate con la stessa diluizione. Leggere poi il corrispondente valore MPN/g o ml nella tabella di Mac Crady riportata nel cap. 1, par.8 (Tabella 2) e moltiplicare tale valore per l'inverso del fattore di diluizione (in genere 10) della prima serie di provette considerata per ricostruire il numero caratteristico.

## 10. Ricerca di *Salmonella* per alimenti non normati

---

### 1 - Oggetto e campo di applicazione

Metodo per la ricerca di *Salmonella* negli alimenti ad esclusione del latte e derivati, uova fresche, molluschi.

### 2 - Principio del metodo

La ricerca di *Salmonella* necessita di quattro stadi successivi in quanto questi microrganismi possono essere presenti in numero basso ed insieme ad un grande numero di altre Enterobacteriaceae o di altre famiglie di batteri (vedere anche il diagramma sul procedimento - fig. 3):

#### - *Prearricchimento in terreno liquido non selettivo*

Semina del campione da analizzare in acqua peptonata tamponata, ed incubazione a 37°C per 16-20 ore.

#### - *Arricchimento in terreno liquido selettivo*

Subcoltura in brodo Rappaport-Vassiliadis verde malachite-cloruro di magnesio (RV) ed in brodo selenito-cistina (SC). Incubazione del brodo RV a 42°C per 24 ore, e del brodo SC a 37°C per 24 e 48 ore.

#### - *Isolamento*

Semina delle colture di arricchimento in due terreni selettivi solidi:

→ Agar verde brillante/rosso fenolo (BGA),

→ secondo terreno selettivo solido (ad es. Desossicolato-citrato) la cui scelta è affidata alla discrezione e all'esperienza del laboratorio che esegue l'analisi.

Incubazione a 37°C ed esame dopo 24 e 48 ore, per accertare la presenza di colonie riferibili a *Salmonella*.

#### - *Identificazione e conferma*

Esecuzione di subcolture di colonie riferibili a *Salmonella* e conferma per mezzo di appositi test biochimici e sierologici.

### 3 - Terreni di coltura, reagenti e sieri

- Acqua peptonata tamponata (APT)	n.	19
- Terreno Rappaport-Vassiliadis (RV)	"	20
- Terreno Selenito-cistina (SC)	"	21
- Agar rosso fenolo-verde brillante (BGA) (Edel e Kampelmacher)	"	22
- Agar Nutritivo (NA)	"	23
- Agar TSI	"	24
- Agar all'urea	"	25
- Terreno per la decarbossilazione della lisina	"	26
Vengono utilizzate provette di 8 mm di diametro e 160 mm di lunghezza		
- Reagenti per la ricerca della $\beta$ -galattosidasi.	"	27
- Reagenti per la reazione Voges-Proskauer	"	28

- Reagenti per la ricerca dell'indolo (reatt. di Kovacks)
- Sieri agglutinanti

" 12

#### 4 - Procedimento

##### *Prearricchimento*

Aggiungere a 25 g di campione 225 ml (oppure a 1g di campione 9 ml o ancora a 10 g di campione 90 ml) di Acqua peptonata tamponata (19).

Nel caso in cui il campione disponibile abbia un peso inferiore a 25 g, usare la quantità necessaria di terreno di prearricchimento per arrivare alla diluizione di circa 1:10 (massa/volume), riportando le condizioni sul verbale di analisi.

Per ridurre il lavoro relativo all'esame di più unità campionarie da 25 g di un alimento di uno specifico lotto, quando sia provato che riunendo le varie porzioni dell'alimento (*campionamento in pool*) non si abbiano effetti sul risultato finale, le porzioni stesse possono essere riunite. Per esempio, se 10 porzioni da 25g devono essere esaminate, riunire in un'unica porzione da 250g le 10 unità ed aggiungere 2,25 l di brodo di prearricchimento. In alternativa, dopo l'incubazione, 10 volumi da 0,1 ml e 10 volumi da 10 ml del brodo di prearricchimento possono essere riuniti e seminati rispettivamente in 100 ml di terreno RV e in 1 l di terreno selenito-cistina (vedi arricchimento selettivo).

Prodotti alimentari disidratati, in polvere, possono necessitare di un particolare procedimento di reidratazione per aumentare l'efficacia del recupero di *Salmonella*. Due tecniche possono essere utilizzate a questo scopo: quella dell'immersione e quella dell'agitazione.

Incubare a 37°C, per non meno di 16 ore e non più di 20 ore.

##### *Arricchimento selettivo*

Trasferire 0,1 ml della coltura del prearricchimento in una provetta contenente 10 ml di terreno di Rappaport-Vassiliadis (RV) (20); trasferire 10 ml della stessa coltura in una beuta contenente 100 ml di terreno Selenito-cistina (SC) (21).

Incubare i due terreni come segue:

- il terreno RV a 42°C per 24 ore.
- il terreno SC a 37°C per 24 ore e 48 ore.

In alcuni casi, può essere vantaggioso incubare il terreno selenito-cistina a 41°-42°C. Questa modifica dovrà ovviamente essere indicata nel *rapporto di analisi*.

##### *Isolamento*

Dopo incubazione di 24 ore dei terreni di arricchimento selettivo, prelevare un'ansata da ciascuna beuta e strisciarla ognuna su una distinta piastra di Agar verde brillante-rosso fenolo (BGA) (22) in modo da ottenere delle colonie ben isolate. Analogamente prelevare un'altra ansata da ciascuna beuta e strisciarla ognuna sulla superficie di una distinta piastra con il secondo terreno di isolamento (es.: 22 bis).

Incubare le piastre a 37°C per 20-24 ore.

Dopo ulteriori 24 ore di incubazione del terreno SC, ripetere da quest'ultimo l'isolamento sui due terreni selettivi solidi.

Dopo l'incubazione prescritta, esaminare le piastre per accertare la presenza di colonie sospette, riferibili a *Salmonella*.



Su agar verde brillante-rosso fenolo le colonie di *Salmonella* appaiono rosa-rosse circondate spesso da un ampio alone da rosso a rosso-violetto. Tale alone ha tendenza ad una facile confluenza con quelli circostanti generati da altre colonie.

Se la crescita è scarsa o se non è presente nessuna colonia tipica di *Salmonella* reincubare a 37°C per altre 18-24 ore.

Riesaminare le piastre per evidenziare la presenza di colonie tipiche di *Salmonella*.

Le colonie sospette devono essere sottoposte a conferma; il riconoscimento di colonie di *Salmonella* è in larga parte dovuto all'esperienza, in quanto il loro aspetto può essere vario, non solo fra specie diverse, ma anche in rapporto ad un lotto di terreno rispetto ad un altro. Il riconoscimento può essere facilitato dall'utilizzazione, sulle colonie sospette, di antisieri polivalenti per *Salmonella*.

### **Identificazione e conferma**

#### **Selezione delle colonie**

Per la conferma, prelevare da ogni piastra cinque colonie considerate tipiche o sospette. Se sono meno di cinque, prenderle in considerazione tutte.

Seminare le colonie selezionate sulla superficie di piastre di Agar nutritivo (23) preventivamente asciugato, in modo che si sviluppino colonie ben isolate. Incubare le piastre a 37°C per 18-24 ore. Allestire colture pure ed utilizzarle per la conferma biochimica e sierologica.

#### **Conferma biochimica**

Mediante un'ago da infissione o mediante ago-spatola, inoculare i seguenti terreni, con ciascuna delle colture pure ottenuta dalle colonie selezionate sui terreni selettivi.

##### **- Agar TSI (24)**

Seminare la superficie del terreno tramite strisciamento ed il fondo per infissione. Incubare a 37°C per 24 ore. Interpretare i risultati come segue:

##### **Fondo provetta ->**

giallo	= glucosio positivo (fermentazione del glucosio)
rosso o immodificato	= glucosio negativo (non fermentazione del glucosio)
nero	= formazione di idrogeno solforato (H <sub>2</sub> S)
bolle o fessurazioni del terreno	= produzione di gas dal glucosio

##### **Superficie inclinata ->**

gialla	= lattosio e/o saccarosio positivo (utilizzo degli zuccheri)
rossa o immodificata	= lattosio e saccarosio negativi (mancata utilizzazione)

Le tipiche colture di *Salmonella* danno luogo ad una superficie inclinata rossa o rosso-violacea (reazione alcalina) con formazione di gas ed ingiallimento (reazione acida) del fondo provetta, oltre a formazione (in circa il 90% dei casi) di idrogeno solforato prevalentemente lungo il canale di infissione (annerimento del terreno).

Quando si isola una delle rare salmonelle lattosio-positive, la superficie inclinata del TSI appare gialla. Perciò la conferma preliminare di *Salmonella* non può essere basata solo sui risultati del terreno TSI.

**- Agar all'urea di Christensen (25)**

Seminare sulla superficie inclinata del terreno. Incubare a 37°C per 24 ore ed esaminare ad intervalli.

Se la reazione è positiva, la degradazione dell'urea libera ammoniaca, che farà virare il rosso fenolo da incolore a rosa ed in seguito ad un rosso intenso. La reazione è spesso evidente già dopo 2-4 ore.

**- Terreno per la decarbossilazione della lisina (26)**

Inoculare il terreno immediatamente sotto la superficie del mezzo liquido. Incubare a 37°C per 24 ore.

Una colorazione violetta indica una reazione positiva, mentre una colorazione gialla indica una reazione negativa.

**- Reagenti per il rilevamento della  $\beta$ -galattosidasi (27)**

In alternativa si possono usare dischi di carta impregnati di substrato ONPG (ortonitrofenil- $\beta$ -galattopiranoside) già pronti, disponibili in commercio.

Sospendere un'ansata della coltura in una provetta contenente 0,25 ml di soluzione fisiologica. Aggiungere una goccia di toluene ed agitare il tubo. Mettere la provetta in bagnomaria a 37°C e lasciare per qualche minuto. Aggiungere 0,25 ml di reagente per l'evidenziazione della  $\beta$ -galattosidasi e mescolare. Rimettere la provetta in bagnomaria a 37°C per 24 ore esaminandola ad intervalli.

Una colorazione gialla indica una reazione positiva. Spesso la reazione è visibile entro 20 minuti.

Se si usano dischetti di carta già pronti seguire le istruzioni della casa produttrice.

**- Reagenti per la reazione di Voges-Proskauer (28)**

Sospendere un'ansata della coltura in una provetta sterile contenente 0,2 ml di terreno VP. Incubare per 24 ore a 37°C. Dopo l'incubazione, aggiungere 2 gocce di soluzione di creatina, 3 gocce di soluzione etanolica di  $\alpha$ -naftolo e 2 gocce di soluzione di idrossido di potassio, agitare dopo l'aggiunta di ogni reagente.

L'apparire di una colorazione da rosa a rosso brillante entro 15 minuti indica una reazione positiva.

**- Reagenti per la ricerca dell'indolo (12)**

Inoculare una provetta contenente 5 ml di terreno triptone-triptofano con la colonia sospetta. Incubare a 37°C per 24 ore. Dopo incubazione, aggiungere 1 ml di reagente di Kovacs (12) ed agitare delicatamente.

La formazione di un anello rosso indica una reazione positiva. Un anello giallo-bruno indica una reazione negativa.

**Interpretazione delle prove biochimiche**

Solitamente il genere *Salmonella* è caratterizzato dalle reazioni descritte nella Tabella 2.

Tabella 2 - Reazioni biochimiche per il genere *Salmonella*

Test (1)	Reazione	% di salmonelle che mostrano la reazione (2)
Glucosio, TSI (formazione di acido)	+	100
Glucosio, TSI (formazione di gas)	+	91,9 (3)
Lattosio, TSI	-	99,2 (4)
Saccarosio, TSI	-	99,5
Acido solfidrico, TSI	+	91,6
Idrolisi dell'urea	-	100
Decarbossilazione della lisina	+	94,6
Reazione della $\beta$ -galattosidasi	-	98,5 (4)
Reazione di Voges-Proskauer	-	100
Reazione dell'indolo	-	98,9

(1) W.H.Ewing e M.M.Ball. The biochemical reactions of members of the genus *Salmonella*. National Communicable Disease Center, Atlanta, Georgia, USA (1966).

(2) Queste percentuali indicano solamente che non tutti i ceppi di *Salmonella* mostrano una reazione sicuramente positiva o negativa. Queste percentuali possono variare frequentemente.

(3) *Salmonella typhi* non genera gas.

(4) *Salmonella* sottogenere III (*Arizona*) dà reazioni positive o negative al lattosio ma è sempre  $\beta$ -galattosidasi positiva. *Salmonella* sottogenere II dà reazione negativa al lattosio ma può dare una reazione positiva alla  $\beta$ -galattosidasi. Per lo studio delle colonie si possono usare tests biochimici complementari.

Per gli accertamenti biochimici possono essere usate, in alternativa, le gallerie di identificazione attualmente disponibili in commercio.

### Conferma sierologica

La presenza degli antigeni O e Vi di *Salmonella* è provata dall'agglutinazione su vetrino con il siero appropriato, partendo da colture pure e dopo l'eliminazione dei ceppi auto-agglutinanti.

#### - Evidenziazione di ceppi auto-agglutinanti

Mettere una goccia di soluzione fisiologica su un vetrino pulito. Miscelare in questa goccia parte della coltura da esaminare così da ottenere una sospensione torbida ed omogenea. Fare oscillare delicatamente per 30-60 secondi. Osservare il risultato contro una superficie scura, preferibilmente con l'aiuto di una lente d'ingrandimento.

Se i batteri si riuniscono in gruppi più o meno distinti, la coltura è considerata auto-agglutinante, e non sarà sottoposta ai saggi seguenti in quanto sarà impossibile riconoscere gli antigeni.

#### - Evidenziazione degli antigeni O

A partire da una coltura pura, riconosciuta non auto-agglutinante, operare come al punto 1, ma usando una goccia di antisiero polivalente anti-O in luogo della soluzione fisiologica.

Utilizzare i sieri poli- e monovalenti l'uno di seguito all'altro.

Sono disponibili in commercio numerosi tipi di sieri agglutinanti contenenti anticorpi per uno o più antigeni O (sieri mono- o polivalenti anti-O ) e sieri anti-Vi. Si raccomanda di utilizzare sieri di accertata affidabilità.

Se si verifica una agglutinazione, la reazione è considerata positiva.

*- Evidenziazione dell'antigene Vi*

Operare come al punto 1 usando però una goccia di *antisiero Vi* in luogo della soluzione fisiologica.

*Interpretazione complessiva delle reazioni biochimiche e sierologiche*

La Tabella 3 riassume l'interpretazione dei saggi di conferma effettuati sulle colonie in esame.

Tabella 3 - Interpretazione dei saggi di conferma per Salmonella

Reazioni biochimiche	Autoagglutinazione	Reazioni sierologiche	Interpretazione
tipiche	no	antigeni (O ,Vi) positivi	si considera Salmonella
tipiche	no	tutte le reazioni negative	potrebbe essere Salmonella
tipiche	si	non provate	potrebbe essere Salmonella
non tipiche	no	antigeni (O,Vi) positivi	potrebbe essere Salmonella
non tipiche	no	tutte le reazioni negative	non si considera Salmonella

*Conferma definitiva*

I ceppi che sono considerati *Salmonella*, o che possono essere *Salmonella* (vedi tabella precedente), saranno inviati ad un Centro di riferimento per una definitiva tipizzazione sierologica.

L'invio sarà accompagnato da tutte le possibili informazioni relative ai ceppi.

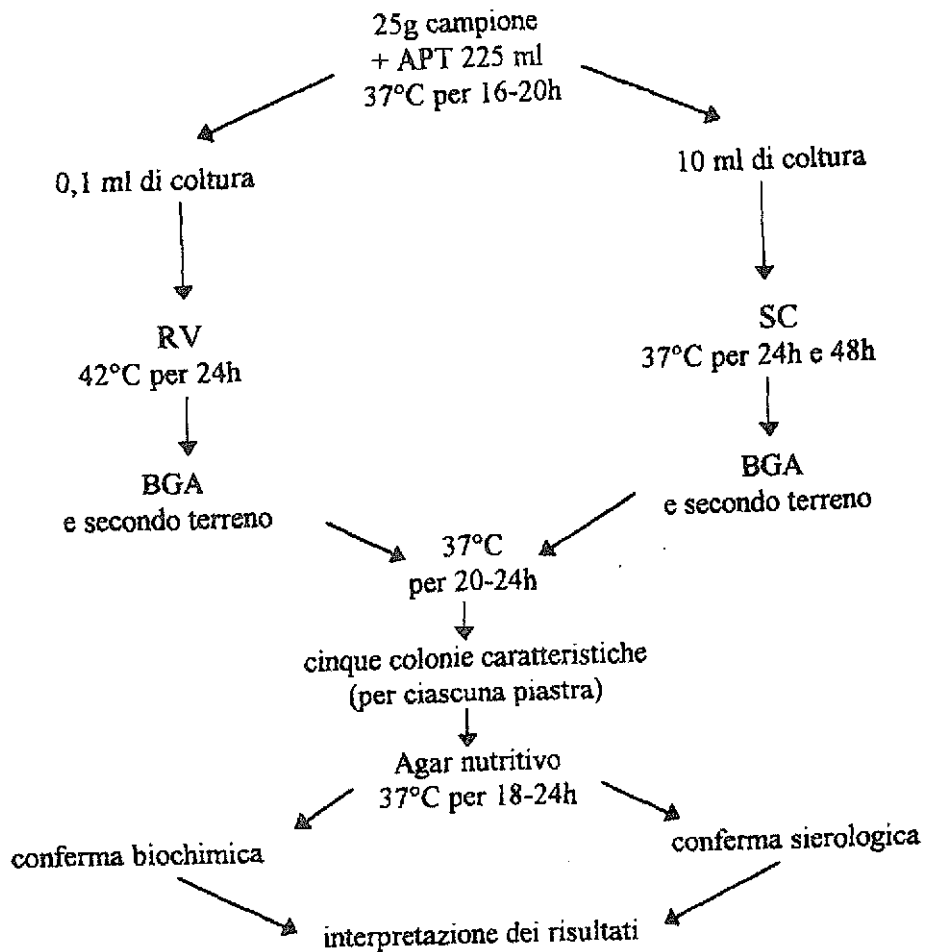


Figura 3 - Diagramma sintetico di procedura per la ricerca di Salmonella (con 25 g di campione)

#### Sistemi diagnostici rapidi

Possono essere utilizzati sistemi diagnostici rapidi invece dei procedimenti descritti per la conferma biochimica di colonie tipiche o sospette. In questi casi, dovranno essere seguite scrupolosamente le istruzioni fornite dalla ditta produttrice.

#### 5 - Espressione dei risultati

In seguito all'interpretazione dei risultati deve essere indicata la presenza o assenza di *Salmonella* nell'aliquota di campione esaminata (1, 10 o 25 g o ml).

## 11. Ricerca di *Salmonella* nel latte e derivati

---

### 1 - Oggetto e campo di applicazione

Metodo per la ricerca di *Salmonella* nel latte e nei suoi derivati.

### 2 - Principio del metodo

La ricerca di *Salmonella* necessita di quattro stadi successivi in quanto questi microrganismi possono essere presenti in poche unità ed insieme ad un gran numero di Enterobacteriaceae o di altre famiglie di batteri (vedere anche il diagramma sul procedimento - fig.4):

#### - Prearricchimento in terreno liquido

Semina della porzione di campione da analizzare nell'idoneo terreno di prearricchimento. Incubazione a 37°C per 16-20 ore.

#### - Arricchimento in terreno liquido selettivo

Semina della coltura di prearricchimento in brodo al tetrionato ed in brodo selenito cistina. Incubazione del brodo al tetrionato a 42°C e del brodo selenito cistina a 37°C per 24 e 48 ore.

#### - Isolamento

Semina delle colture ottenute nell'arricchimento sui due terreni selettivi solidi:

→ agar verde brillante-rosso fenolo

→ agar bismuto-solfito (questo terreno permette il recupero dei ceppi di *Salmonella* lattosio-positivi).

Incubazione a 37°C, esame dopo 24 ore e dopo 48 ore per accertare la presenza di colonie riferibili a *Salmonella*.

#### - Identificazione e conferma

Esecuzione di subcolture di colonie riferibili a *Salmonella* e conferma per mezzo di appositi test biochimici e sierologici.

### 3 - Terreni di coltura, reagenti e sieri

- Acqua peptonata tamponata	n.	19
- Terreno al Tetrionato di Muller-Kauffmann (MK)	"	29
- Terreno Selenito-cistina (SC)	"	21
- Agar rosso fenolo-verde brillante (BGA) (Edel e Kampelmacher)	"	22
- Agar bismuto-solfito	"	30
- Agar Nutritivo (NA)	"	23
- Agar TSI	"	24
- Agar all'urea	"	25
- Terreno per la decarbossilazione della lisina	"	26
Vengono utilizzate provette di 8 mm di diametro e 160 mm di lunghezza,		
- Reagenti per la ricerca della $\beta$ -galattosidasi.	"	27
- Reagenti per la reazione Voges-Proskauer	"	28

- Reagenti per la ricerca dell'indolo (reatt. di Kovacks)
- Soluzione fisiologica
- Sieri

" 12

Sono disponibili in commercio vari tipi di sieri agglutinanti con anticorpi per uno o più antigeni O (sieri mono o polival. anti-O) e sieri anti-Vi. Si raccomanda di utilizzare sieri di accertata affidabilità.

#### 4 - Procedimento

Si riporta innanzitutto uno schema riassuntivo relativo alla preparazione delle prime due tappe del procedimento, per rendere più agevole la descrizione dello stesso.

Tabella 4: Sommario della preparazione del prearricchimento e dell'arricchimento

Prodotto	Dimensione campione	Terreno di prearricchim. (1)	Metodo di preparazione	Terreno di arricchim. selettivo
Latte	50 ml (2x25ml)	Nessuno	Miscelare	225 ml MK 225 ml SC
Latte in polvere	25 g	Acqua distillata più soluz. verde brillante	imbibire per 60 ± 10 min non miscelare (2)	100 ml MK 100 ml SC
Siero e latticello in polvere	25 g	Acqua distillata più soluz. verde brillante	Miscelare	100 ml MK 100 ml SC
Lattosio	25 g	225 ml acqua peptonata tamponata	Miscelare	100 ml MK 100 ml SC
Caseina formaggio	25 g	225 ml acqua peptonata tamponata	Omogeneiz. max a 45° C	100 ml MK 100 ml SC
Burro	25 ml	225 ml acqua peptonata tamponata	Miscelare	100 ml MK 100 ml SC
Derivati del latte congelati	25 ml	225 ml acqua peptonata tamponata	Miscelare	100 ml MK 100 ml SC
Latti fermentati, yogurt, crema pastic. e dessert	25 g	225 ml acqua peptonata tamponata	Miscelare	100 ml MK 100 ml SC

(1) Quando viene usato il terreno di prearricchimento, dopo incubazione a 37°C per 20 ore, eseguire subcolture di 10 ml in ciascun terreno di arricchimento.

(2) Se dopo 3 ore d'incubazione il latte in polvere non si è ancora sciolto, mescolare, agitando, il contenuto delle beute.

#### Prearricchimento

Aggiungere l'aliquota di saggio del campione al terreno di prearricchimento secondo le procedure di seguito descritte ed omogeneizzare tenendo anche conto delle modalità dettagliate indicate nel cap.1, par. 7 "Preparazione del campione nel caso di latte e derivati per la ricerca qualitativa dei microrganismi"

*Latte*

Non è necessario il prearricchimento. Si esegue l'arricchimento usando 25 ml di campione d'analisi e 225 di terreno di arricchimento rispettivamente.

*Latte in polvere*

Preparare una beuta con 225 ml di acqua distillata sterile ed 1 ml di soluzione di verde brillante. Pesare 25 g del campione d'analisi asepticamente e versarlo sulla superficie del liquido nella beuta. Chiudere la beuta, senza agitare. Mantenerla immobile a temperatura ambiente per  $60 \pm 10$  min. prima dell'incubazione. Non è necessario regolare il pH. Se dopo 3 ore di incubazione il latte in polvere non si è ancora sciolto, mescolare il contenuto della beuta agitando bene.

*Siero in polvere, latticello in polvere*

Pesare asepticamente 25 g del campione per l'analisi dentro una beuta contenente 225 ml di acqua distillata sterile. Agitare fino a soluzione completa ed aggiungere 1 ml di soluzione verde brillante.

*Lattosio*

Pesare asepticamente 25 g del campione per l'analisi in una beuta contenente 225 ml di terreno di prearricchimento (19) ed agitare sino a soluzione completa.

*Formaggio e caseina*

Pesare asepticamente 25 g del campione per l'analisi dentro il contenitore sterile di un omogeneizzatore ad alta velocità o di tipo peristaltico. Aggiungere 225 ml del terreno di prearricchimento (19) a 45°C. Omogeneizzare finché l'aliquota per l'analisi è completamente dispersa (da 1 a 3 min.). Assicurarsi che la temperatura a cui avviene la dispersione non superi i 45° C.

*Burro*

Agitare il campione per l'analisi precedentemente sciolto e con una pipetta, riscaldata a circa 45° C, trasferire 25 ml del campione in un flacone contenente 225 ml di terreno di prearricchimento (19). Miscelare.

*Prodotti lattieri congelati (compresi i gelati da consumo)*

Pipettare 25 ml del campione per l'analisi scongelato in un flacone contenente 225 ml di terreno di prearricchimento (19), agitare e lasciar disperdere.

*Latti fermentati, yogurt, crema pasticcera e dessert*

Pesare asepticamente 25 g del campione per l'analisi in una beuta contenente palline di vetro e 225 ml del terreno di prearricchimento (19) e agitare fino a dispersione omogenea.

Per ridurre il lavoro relativo all'esame di più unità campionarie da 25 g di un alimento di uno specifico lotto, quando sia provato che riunendo le varie porzioni (*campionamento in pool*) non si abbiano effetti sul risultato finale per quel particolare alimento, le porzioni stesse possono essere riunite. Per esempio, se 10 porzioni da 25 g devono essere esaminate, riunire in un'unica porzione da 250 g e sciogliere o far disperdere in 2,25 litri di terreno di prearricchimento. In alternativa, dopo l'incubazione, i 10 volumi da 10 ml del terreno di prearricchimento provenienti da 10 porzioni test separate possono essere riunite in 1 litro di terreno selettivo di arricchimento. Salvo diversamente indicato, controllare il pH della sospensione e regolarlo, se necessario, a 6,8.

Incubare a 37°C, per non meno di 16 ore e non più di 20 ore.



**Arricchimento**

Trasferire 10 ml di terreno di prearricchimento dopo incubazione, in una beuta contenente 100 ml di terreno di arricchimento selettivo al Tetrionato (29); trasferire ulteriori 10 ml del terreno di prearricchimento incubato in una beuta contenente 100 ml di terreno selettivo di arricchimento Selenito-cistina (21)

Nel caso del latte, trasferire, asepticamente, 25 ml della porzione di campione per l'analisi in 225 ml di terreno al Tetrionato (29) ed un'ulteriore aliquota di 25 ml in 225 ml di terreno Selenito-cistina (21).

*Incubare* il terreno al tetrionato per 18- 24 ore a 42°C e il terreno selenito cistina per 18-24 ore a 37° C.

Proseguire dopo un primo isolamento (vedi success.), l'incubazione delle beute per ulteriori 18 -24 ore per entrambi i terreni.

**Isolamento**

Dopo incubazione per 24 ore prelevare un'ansata da ciascuna beuta e strisciarla sulla superficie di una piastra di Agar verde brillante-rosso fenolo (22) in modo da ottenere delle colonie ben isolate. Nello stesso modo strisciare un'ansata da ciascuna beuta sulla superficie di piastre di Agar bismuto-solfito (30).

Incubare le piastre capovolte a 37°C per 20-24 ore.

Dopo il periodo totale di incubazione di 48 ore in terreno selenito-cistina ripetere l'isolamento sui due terreni selettivi solidi.

Dopo incubazione per 20-24 ore esaminare le piastre per accertare la presenza di tipiche colonie di *Salmonella*.

Su agar verde brillante-rosso fenolo le colonie di *Salmonella* sono rosa-rosse circondate da un'alone da rosso a rosso-violetto.

Se la crescita è scarsa o se non è presente nessuna colonia tipica di *Salmonella* reincubare a 37°C per altre 18-24 ore.

Riesaminare le piastre per evidenziare la presenza di colonie tipiche di *Salmonella*.

Le colonie sospette devono essere sottoposte a conferma; il riconoscimento di colonie di *Salmonella* è in larga parte dovuto all'esperienza, in quanto il loro aspetto può essere vario, non solo fra specie diverse, ma anche in rapporto ad un lotto di terreno rispetto ad un altro. Il riconoscimento può essere facilitato dall'utilizzazione, sulle colonie sospette, di antisieri polivalenti per *Salmonella*.

**Identificazione e conferma**

Per quanto riguarda le procedure di identificazione e conferma riferirsi al metodo "Ricerca di *Salmonella* negli alimenti non normati" riportato precedentemente (par. 10).

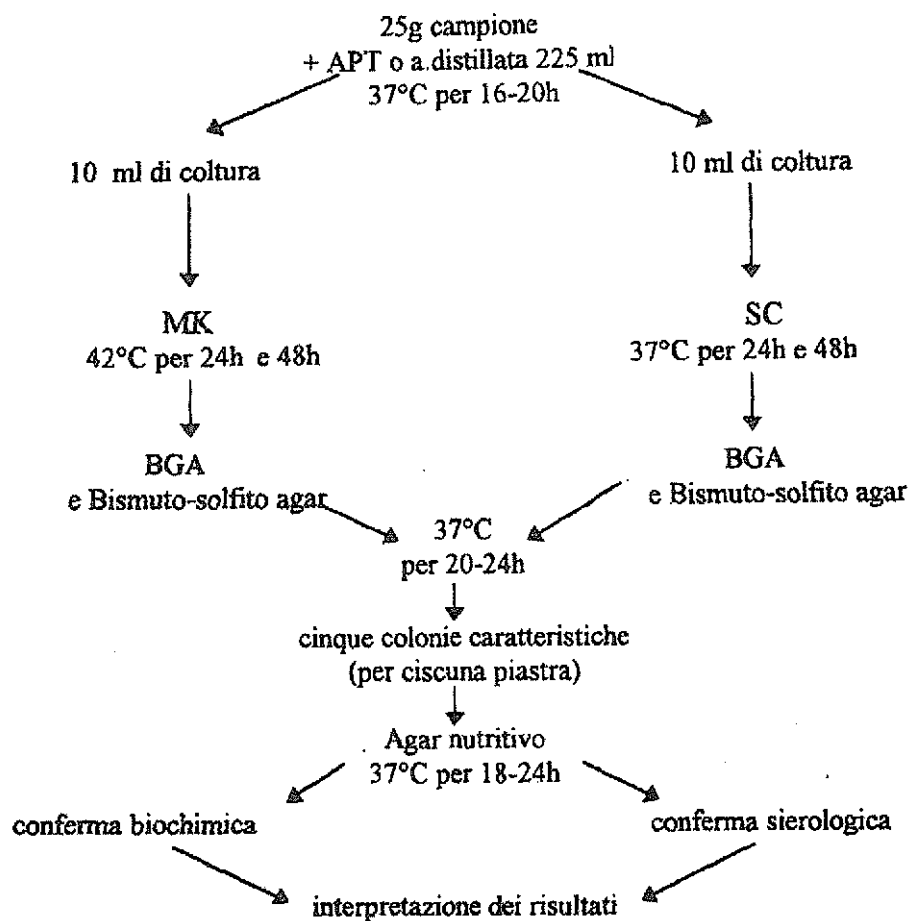


Figura 4 - Diagramma sintetico di procedura per la ricerca di Salmonella (latte escluso)

### 5 - Espressione dei risultati

In seguito all'interpretazione dei risultati deve essere indicata la presenza o assenza di *Salmonella* nell'aliquota di campione esaminata (25 o 50 g o ml).

## 12. Ricerca di *Salmonella* nelle uova fresche

### 1 - Oggetto e campo di applicazione

Metodo per la ricerca di *Salmonella* nelle uova fresche.

### 2 - Principio del metodo

La ricerca di *Salmonella* necessita di quattro stadi successivi in quanto questi microrganismi possono essere presenti in numero basso ed insieme ad un grande numero di altre Enterobacteriaceae o di altre famiglie di batteri.

#### - Prearricchimento in terreno liquido non selettivo

Semina del campione da analizzare in acqua peptonata tamponata, ed incubazione a 37°C per 16-20 ore.

#### - Arricchimento in terreno liquido selettivo

Subcoltura in brodo Rappaport-Vassiliadis verde malachite-cloruro di magnesio (RV) ed in brodo Tetrionato di Muller-Kauffmann (MK). Incubazione delle colture a 42°C per 24 ore.

#### - Isolamento

Semina delle colture di arricchimento in due terreni selettivi solidi:

→ Agar verde brillante/rosso fenolo (BGA),

→ secondo terreno selettivo solido (ad es. Desossicolato-citrato) la cui scelta è affidata alla discrezione e all'esperienza del laboratorio che esegue l'analisi.

Incubazione a 37°C ed esame dopo 24 e 48 ore, per accertare la presenza di colonie riferibili a *Salmonella*.

#### - Identificazione e conferma

Esecuzione di subcolture di colonie riferibili a *Salmonella* e conferma per mezzo di appositi test biochimici e sierologici.

### 3 - Terreni di coltura, reagenti e sieri

- Acqua peptonata tamponata (APT)	n.	19
- Terreno Rappaport-Vassiliadis (RV)	"	20
- Terreno al tetrionato di Muller-Kauffmann	"	29
- Agar rosso fenolo-verde brillante (BGA) (Edel e Kampelmacher)	"	22
- Agar Nutritivo (NA)	"	23
- Agar TSI	"	24
- Agar all'urea	"	25
- Terreno per la decarbossilazione della lisina	"	26
Vengono utilizzate provette di 8 mm di diametro e 160 mm di lunghezza		
- Reagenti per la ricerca della $\beta$ -galattosidasi.	"	27
- Reagenti per la reazione Voges-Proskauer	"	28
- Reagenti per la ricerca dell'indolo (reatt. di Kovacks)	"	12
- Sieri agglutinanti		

#### **4 - Procedimento**

##### ***Preparazione del campione e prearricchimento***

Il campione deve essere costituito preferibilmente da 10 uova prelevate da varie confezioni dello stesso lotto, con il criterio della randomizzazione.

L'analisi deve essere condotta separatamente sui gusci e sul tuorlo-albume. Ciò in quanto la contaminazione profonda assume un significato più rilevante, essendosi sicuramente verificata nell'ovaio dell'animale e non, come talvolta avviene per i gusci, dopo la deposizione.

##### ***Gusci***

Separare in maniera asettica il guscio dal contenuto dell'uovo (tuorlo e albume).

Triturare i gusci in *Stomacher* in acqua peptonata tamponata nel rapporto ponderale di 1:10 ed incubare a 37°C per 16-20 ore.

##### ***Tuorli e albumi***

Separare in maniera asettica il contenuto dell'uovo (tuorlo e albume) dal guscio.

Omogeneizzare insieme i tuorli e gli albumi in *Stomacher*, prelevare g 50 di omogeneizzato, e porli in 450 ml di acqua peptonata tamponata.

Incubare a 37°C per 16-20 ore.

##### ***Arricchimento selettivo***

Dalle colture di prearricchimento di gusci e tuorli-albumi eseguire separatamente subcolture nel modo seguente:

- ml 10 in ml 100 di Terreno di Muller-Kauffmann (29)
- ml 0,1 in ml 10 di Terreno di Rappaport-Vassiliadis (20)

Incubare a 42°C per 24 ore

##### ***Isolamento e fasi successive di conferma***

Procedere come nel metodo per la ricerca di *Salmonella* in alimenti non normati.

#### **5 - Espressione dei risultati**

In seguito all'interpretazione dei risultati deve essere indicata la presenza o assenza di *Salmonella* nell'aliquota di campione esaminata.

### 13. Ricerca di *Salmonella* nei molluschi

#### 1 - Oggetto e campo di applicazione

Metodo per la ricerca di *Salmonella* nei molluschi

#### 2 - Principio del metodo

Con tale metodo vengono individuate solo le salmonelle mobili, le quali costituiscono la maggioranza (oltre il 95 %).

#### 3 - Terreni di coltura e reagenti

- Acqua peptonata tamponata	n.	19
- Terreno MSRV (Rappaport-Vassiliadis semisolido)	"	31
- siero agglutinante anti-H		

#### 4 - Procedimento

##### *Prearricchimento*

Prelevare 25 g di polpa di mollusco, omogeneizzare in stomacher in 225 ml di Acqua peptonata tamponata. (19). Incubare a 37°C per 20 ore (fase di prearricchimento).

Allo scopo di ridurre ulteriormente i tempi di analisi, può essere utilizzato il prearricchimento in brodo M (104) per 8 ore a 37°C.

##### *Arricchimento selettivo ed identificazione*

Depositare tre gocce (0,1 ml circa) della coltura di prearricchimento in punti separati (e lontani tra loro) della superficie di una piastra di terreno MSRV (31) senza spatolare (effettuare 2 repliche).

Incubare, senza rovesciare la piastra, a 42°C per 20-24 ore.

Osservare, intorno ai punti di deposizione delle gocce, eventuali aloni di crescita (il colore azzurro del terreno appare leggermente rischiarato): essi sono dovuti a batteri mobili che si riproducono bene nel terreno; gli aloni dovuti a sviluppo di salmonelle sono di grandi dimensioni e spesso raggiungono il bordo della piastra. La semplice osservazione di un tale alone conferisce alla prova una presuntività di presenza di salmonelle, mentre l'assenza di aloni o la presenza di aloni molto ristretti ( $\varnothing < 1,5$  cm) permette di escludere la presenza di salmonelle mobili.

##### *Conferma*

In caso di positività, procedere comunque ad un accertamento preliminare rapido sul materiale più esterno dell'alone mediante il test di agglutinazione al lattice con sieri anti-H, lo stesso materiale più esterno dell'alone può essere prelevato per le subcolture destinate alle prove di identificazione.

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

#### 5 - Espressione dei risultati

In seguito all'interpretazione dei risultati deve essere indicata la presenza o assenza di *Salmonella* nell'aliquota di campione esaminata (25 g).

### Generalità sulle metodiche rapide per la ricerca di *Salmonella*

Le prove elencate non possono essere impiegate da sole nel corso di analisi ufficiali. Esse possono essere utili nel caso di screening conoscitivi ed i risultati positivi vanno in ogni caso sottoposti a conferma con le metodiche tradizionali.

#### Identificazione su terreno selettivo di primo isolamento

Vengono impiegati accorgimenti che aumentano le probabilità di riconoscimento delle colonie tipiche nella fase di primo isolamento, rispetto a quelle che si verificano con l'adozione delle metodiche tradizionali.

- Già l'impiego di particolari terreni d'isolamento può aumentare tali probabilità, se questi abbinano un'alta selettività con caratteristiche cromatico-morfologiche delle colonie tipiche, peculiari (o quasi) del genere *Salmonella*. In alcuni casi si può impiegare il Rambach agar, più selettivo rispetto ad altri terreni di uso più consolidato, quali il DCA, l'Hektoen o il Mc Conkey.

- Un'altra possibilità è quella dell'*agglutinazione preliminare* con antisieri polivalenti, tuttavia l'esiguità del materiale fornito da una singola colonia può costringere ad operare su pools microbici per riunione di colonie diverse. In tal caso una risposta negativa non è esente da possibili errori dovuti all'interferenza del terreno o all'eccessiva presenza di microrganismi estranei, e, d'altra parte, un'eventuale risposta positiva non permette di giungere alla tipizzazione del microrganismo che ha dato luogo all'agglutinazione. Né il tentativo di riavviare le comuni procedure di identificazione su eventuali colonie sospette non prelevate garantisce la possibilità di ritrovare lo stesso microrganismo.

- Più recentemente hanno assunto interesse crescente i derivati dell'umbelliferone, in quanto substrati specifici e sensibili per evidenziare alcune attività enzimatiche microbiche. Per rivelare la presenza di colonie di salmonelle è stato proposto l'impiego del *4-metilumbelliferilcaprilato*, il quale evidenzia selettivamente la presenza della  $C_8$  esterasi prodotta dalle salmonelle stesse, venendo idrolizzato dall'enzima e liberando una sostanza fluorescente alla luce UV: il *4-metilumbelliferone*.

In pratica, sulle colonie con i caratteri presuntivi tipici di *Salmonella* si depono una goccia di soluzione del reattivo e, dopo 3-5 minuti di contatto, si osserva alla *luce di Wood* (366 nm) l'eventuale comparsa di fluorescenza (quest'ultima denota positività). Le colonie fluorescenti, in quanto non perdono vitalità, possono essere prelevate e successivamente sottoposte alle comuni procedure di identificazione.

#### MSRV (*Modified Semi-solid Rappaport-Vassiliadis Medium*)

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

Dopo la fase di prearricchimento (in acqua peptonata tamponata o meglio in brodo M al mannitolo) procedere all'arricchimento selettivo direttamente in piastre di MSRVR secondo la seguente procedura:

- depositare tre gocce (0.1 ml circa) della coltura di prearricchimento in punti separati (e lontani tra loro) della superficie di una piastra di terreno MSRVR senza spatolare (effettuare 2 repliche),
- incubare, senza rovesciare la piastra, a 42°C x 20-24 ore,
- osservare, intorno ai punti di deposizione delle gocce eventuali aloni di crescita (rischiarano leggermente il colore azzurro del terreno): essi sono dovuti a batteri mobili che si riproducono bene nel terreno; gli aloni dovuti a sviluppo di salmonelle sono di grandi dimensioni e spesso intercettano il bordo della piastra. La semplice osservazione di un tale alone conferisce alla prova una presuntività di presenza di salmonelle, mentre l'assenza di aloni o la presenza di aloni molto ristretti ( $\varnothing < 1.5$  cm) permette di escludere la presenza di salmonelle mobili.
- in caso di positività, procedere ad un accertamento preliminare rapido sul materiale più esterno dell'alone mediante il *test di agglutinazione al lattice* con sieri anti-H.
- lo stesso materiale più esterno dell'alone può essere prelevato per le subcolture destinate alle prove di identificazione.

### **Altre metodiche**

**Immunofluorescenza:** Dopo le comuni procedure di arricchimento selettivo, si può esaminare alla microscopia in luce UV un vetrino del brodo, fissandolo opportunamente (ad es. con la soluzione di Kirckpatrick) e cimentandolo con anticorpi somatici anti-*Salmonella* marcati con fluorescina (*metodo diretto*) oppure con anticorpi somatici normali e con anti-anticorpi marcati a loro volta con fluorescina (*metodo indiretto*). È un metodo di screening riconosciuto dall'A.O.A.C.

**Impedimetria:** Le salmonelle, sviluppandosi in un brodo selettivo *Selenite + ossido di trimetil-amina + dulcitol* sono capaci di modificare in 24 ore (o meno) la resistenza elettrica propria del terreno non inoculato. La variazione può essere apprezzata con un conduttimetro od un impedometro sufficientemente sensibili. Più le cariche di partenza sono elevate, più rapida sarà la risposta.

**Metodo ELISA:** Dopo le consuete fasi di prearricchimento ed arricchimento selettivo, si procede all'inoculo del brodo M (al mannitolo), i cui componenti facilitano la produzione di antigeni flagellari. Il metodo utilizza anticorpi, generalmente monoclonali, diretti contro tali antigeni (comuni ai diversi sierotipi di salmonelle) e coniugati con enzimi rivelatori (fosfatasi, perossidasi). Un'aliquota del brodo M viene fatta reagire per microtitolazione in piastra, con gli anticorpi coniugati. Dopo i consueti lavaggi, viene aggiunto il substrato dell'enzima, che, dopo breve incubazione in presenza dell'enzima stesso, modifica il proprio colore o quello di un'ulteriore sostanza aggiunta. La lettura viene fatta al fotometro.

Un inconveniente può essere costituito dal fatto che lo sviluppo del colore tende a risentire negativamente dell'interferenza di alcuni componenti dell'alimento.

## 14. Numerazione di *Bacillus cereus*

---

### 1 - Oggetto e campo di applicazione

Metodo per la numerazione di *Bacillus cereus*-gruppo e di *B. cereus* negli alimenti mediante la tecnica del conteggio delle colonie a 30°C.

### 2 - Principio del metodo

Semina, sulla superficie di un terreno selettivo solido, di una quantità determinata di campione utilizzando la tecnica descritta nel cap. 1, par. 8.

Incubazione delle piastre in aerobiosi a 30° per 18-48 ore.

Calcolo del numero di *Bacillus cereus* /g o /ml di campione, considerando le colonie caratteristiche sviluppatesi sul terreno ai livelli di diluizione che danno un risultato significativo e confermate con i test specifici descritti.

### 3 - Terreni di coltura e reagenti

- Peptone Mannitol Bromthymol blue Agar (PEMBA)	n.	32
- Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar (MYP)	"	33
- Glucose Agar	"	34.
- Reagenti per la reazione di Voges-Proskauer	"	28
- Reattivi per la determinazione dei nitriti	"	35.
- Agar al sangue di montone	"	36
- Terreno per la mobilità	"	37
- Reattivi per la evidenziazione dei cristalli parasporali		

### 4 - Procedimento

#### *Allestimento delle piastre e incubazione*

Seminare per spatolamento 0,1 ml del campione, se liquido, o della sospensione madre per i prodotti non liquidi, su due piastre di terreno completo PEMBA (32), o, a scelta, MYP agar (33).

Ripetere la procedura per le diluizioni successive fino a 10<sup>-6</sup>.

Nel caso di campioni fortemente contaminati da altri microrganismi può essere vantaggioso seminare una replica delle diluizioni ritenute più significative, trattata a 65°C per 10' in *b.m.* Tale trattamento ha anche la funzione di favorire la germinazione delle spore in seguito allo shock termico.

Incubare in aerobiosi a 30°C per 18-24 ore. Se le colonie non sono chiaramente visibili, incubare le piastre per ulteriori 24 ore.

Contare tutte le colonie tipiche, presenti solo nelle le piastre contenenti da 15 a 150 colonie (vedi cap. 1, par. 8).

Le colonie tipiche si presentano:

- nel PEMBA, dentate, di circa 5 mm di diametro, di colorazione blu-turchese, circondate generalmente da un alone opaco di precipitazione dello stesso colore;
- nel MYP con caratteristiche simili ma di colore rosa.



Data la scarsa produzione di lecitinasi da parte di alcuni ceppi di *B.cereus*., anche le colonie prive di alone di precipitazione, ma con le altre caratteristiche tipiche, dovrebbero essere sottoposte a test di conferma,

### *Conferma*

Selezionare almeno cinque colonie tipiche da ciascuna piastra. Quando sono presenti meno di cinque colonie tipiche, utilizzare tutte per le prove di conferma.

Quando non è possibile prelevare colonie ben isolate, strisciare, con un ansa di platino, cinque colonie presuntive in piastre contenenti il terreno completo PEMBA. Incubare a 30°C per 18-24 ore. Selezionare per ogni piastra almeno una colonia caratteristica ben isolata da utilizzare per le prove di conferma.

#### *- Metodo di colorazione rapida di conferma*

Preparare degli strisci su vetrino, prelevando dalla parte centrale di colonie di un giorno o dal bordo di colonie di due giorni

Asciugare il vetrino all'aria e fissare delicatamente alla fiamma.

Collocare il vetrino su acqua bollente e coprire con Verde malachite 5% p/v

Dopo due minuti, lavare ed asciugare il vetrino.

Colorare per 15 minuti con nero Sudan 0,3% p/v in alcol etilico 70%.

Lavare con xilolo per 5 secondi e asciugare.

Effettuare una soluzione di contrasto con una soluzione di safranina 0,5% p/v per 20 secondi.

Lavare e lasciar asciugare

Osservare al microscopio ad immersione.

Le cellule vegetative di *B.cereus* hanno il seguente aspetto caratteristico:

cellule di 4-5 µm di lunghezza e 1-1,5 µm di larghezza, con estremi squadrati ed angoli tondi.

Le spore si colorano di verde più o meno pallido, si trovano in posizione centrale o paracentrale e non presentano lo sporangio.

I globuli lipidici sono neri e il citoplasma vegetativo rosso.

#### *- Test di fermentazione del glucosio*

Inoculare colonie isolate usando un ago di platino centralmente e in profondità in una provetta contenente l'agar glucosio (34) riscaldato di recente.

In caso di positività si apprezzerà un colore giallo del terreno sia in profondità che in superficie, normalmente accompagnato da produzione di gas.

#### *- Reazione di Voges-Proskauer (28)*

Inoculare le colonie selezionate in provette contenenti il terreno VP.

Incubare a 30 °C per 24 ore.

Trasferire da ogni provetta 1 ml della coltura in un'altra provetta pulita per la ricerca dell'acetil-metilcarbinolo.

Aggiungere 0,2 ml di soluzione di Idrossido di Potassio, 0,6 ml di soluzione di  $\alpha$ -naftolo ed alcuni cristalli di creatina.

Agitare vigorosamente, quindi lasciar riposare per un ora.

La formazione di un colore rosa eosina indica che la reazione è positiva.

**- Riduzione dei nitrati**

Inoculare le colonie selezionate in provette contenenti il terreno per i nitrati (35).

Incubate a 30 °C per 24 ore.

Aggiungere da 0,2 a 0,5 ml di reattivo per i nitrati in ogni provetta con una pipetta. Tale operazione deve essere effettuata utilizzando una propipetta o un apparecchio di aspirazione (pipettatrice).

La formazione di un colore rosso indica l'avvenuta riduzione dei nitrati a nitriti.

Se dopo 15 minuti dall'aggiunta del reattivo non si ha formazione del colore rosso aggiungere una piccola quantità di polvere di zinco e attendere 10 minuti.

Se dopo l'aggiunta della polvere di zinco si forma un colore rosso, il test di conferma è negativo.

**Tabella 5.- Interpretazione dei risultati delle prove biochimiche per *B.cereus* (gruppo)**

<i>Test</i>	<i>Reazioni tipiche di Bacillus cereus - gruppo</i>
PEMBA	Le colonie tipiche sono dentate, di circa 5 mm di diametro e di colorazione blu turchese, generalmente circondate da un alone di precipitazione (mannitolo- lecitinasi+).
MYP	Le colonie tipiche sono di circa 5 mm di diametro e di colorazione rosa, generalmente circondate da un alone di precipitazione (mannitolo- lecitinasi+).
Esame microscopico	Le cellule vegetative sono di 4-5 µm di lunghezza e 1-1,5µm di larghezza, con estremi squadrati ed angoli tondi. Le spore si colorano di verde più o meno pallido, si trovano in posizione centrale o paracentrale e non presentano lo sporangio. Presenza di globuli lipidici di color nero e di citoplasma rosso.
Test di fermentazione del Glucosio	Fermentazione del glucosio, con produzione di un colore giallo e, usualmente, di gas
Reazione di Voges-Proskauer	Produzione di acetilmetilcarbinolo (95% dei casi), evidenziata da una colorazione rosa dopo addizione dei reattivi
Riduzione dei nitrati	Riduzione dei nitrati a nitriti evidenziata da una colorazione rossa dopo addizione dei reattivi.

**5 - Espressione dei risultati**

Riportare il numero di *B.cereus-gruppo*/ g o ml di campione, riferendosi alle norme riportate nel cap.1, par.8, relative al conteggio in piastra ed al conteggio nei terreni selettivi.

## 6 - Differenziazione dei membri del gruppo *B.cereus*.

Le seguenti prove permettono di differenziare il *B.cereus* da altri *Bacillus* strettamente correlati tassonomicamente come il *B.cereus* var.*mycoides*, il *B. thuringiensis* e il *B. anthracis*.

Prove differenziali:

- Emolisi su Agar sangue di montone
- Aspetto delle colonie su Agar sangue
- Mobilità
- Presenza cristalli parasporali

### *Emolisi su agar sangue*

Seminare la superficie del terreno (36) con la coltura in esame ed incubare per 24 ore a 30°.

Osservare la presenza di emolisi. Il *B.cereus* mostra una zona di 2-4 mm di emolisi completa (beta emolisi) intorno alla colonia.

Aspetto delle colonie su agar sangue: vedi interpretazione dei risultati

### *Prova di mobilità*

Seminare per infissione la colonia nell'agar (37) fino al fondo della provetta. Incubare per 18-20 ore a 30°C ed osservare il tipo di crescita lungo il tratto d'inoculazione.

I ceppi mobili producono una crescita diffusa nel terreno mentre i ceppi non mobili crescono solo lungo il tratto di inoculazione.

Il *B.cereus* var.*mycoides* spesso produce una crescita sfrangiata nel terreno semisolido dovuta ad una espansione cellulare e non a presenza di flagelli.

### *Presenza dei cristalli parasporali*

- Preparare uno striscio su vetrino dalla coltura della colonia in esame.
- Ricoprire il vetrino con metanolo ed attendere 30 secondi.
- Eliminare il metanolo ed asciugare all'aria
- Colorare con fucsina (soluzione fucsina basica 0,5 % o fucsina acida di Ziehl)
- Scaldare il vetrino fino a sviluppo di vapori ripetendo l'operazione dopo 1-2 min.
- Attendere 30 sec. lavare con acqua ed asciugare.

Lettura: Osservare al microscopio con obiettivo ad immersione la presenza di spore libere e cristalli tetragonali di colore scuro. I cristalli liberi di tossina sono generalmente abbondanti dopo 3 giorni ma non si osservano se non vi è lisi dello sporangio.

**Tabella 6 - Interpretazione dei risultati delle prove di differenziazione dei membri di *B.cereus* -gruppo.**

Test	<i>B.cereus</i>	<i>B.cereus</i> var. <i>mycoides</i>	<i>B.thuringiensis</i>	<i>B.anthraxis</i>
<i>Emolisi su Agar Sanguè</i>	+	(+)	(+)	-
<i>Aspetto colomie su Agar sangue</i>	verdastre	rizoidi	verdastre	grigiastre
<i>Mobilità</i>	+	-	+	-
<i>Cristalli parasporali</i>	-	-	+	-

### 7 - Ricerca della tossina diarroica

Agglutinazione passiva inversa al lattice in piastra microtitre

## 15. Numerazione di *Clostridium perfringens*

---

### 1 - Oggetto e campo di applicazione

Metodo per la numerazione di *Clostridium perfringens* negli alimenti mediante la tecnica del conteggio in piastra.

### 2 - Principio del metodo

Semina per inclusione nella massa di un terreno solido (cap. 1, par. 8) aggiungendo, dopo solidificazione, un sottile strato dello stesso terreno.

Incubazione delle piastre in anaerobiosi a 37°C per 20 ore. Calcolo del numero di colonie caratteristiche (colonie nere). Effettuazione dei test di conferma sulle colonie caratteristiche e calcolo del n. di *C. perfringens* per ml o g di campione.

### 3 - Terreni di coltura e reagenti

- Egg yolk- free tryptose-sulfite-cycloserine agar (EYfree -TSC)	n.	38
- Brodo al tioglicollato	"	39
- Terreno mobilità-nitrati	"	40
- Terreno lattosio-gelatina	"	41
- Reattivi per l'evidenziazione dei nitriti	"	35

### 4 - Procedimento

#### *Numerazione*

Trasferire 1 ml del campione, se liquido, o della sospensione iniziale, se solido, e delle successive diluizioni in doppio al centro di piastre di Petri. Versare 15-20 ml del terreno EYfree -TSC (38) mescolare bene e far solidificare.

Aggiungere uno strato di 10 ml dello stesso terreno.

Incubare in anaerobiosi a 37°C x 20 ore. Non ritardare la lettura per evitare un eccessivo annerimento del terreno.

Contare le colonie nere.

#### *Conferma*

##### *Selezione delle colonie*

Scegliere 5-10 colonie caratteristiche o tutte, se presenti in numero inferiore. In caso non sia possibile reperire colonie ben isolate, seminare una porzione di patina in brodo al tioglicollato (39), incubare a 37°C per 18-24 ore, eseguire strisci sul terreno base dell'EYfree -TSC, ricoprendo con 10 ml dello stesso terreno. Incubare a 37 °C per 18-24 ore. Scegliere almeno 1 colonia caratteristica per piastra.

##### *Conferma biochimica*

###### *- Prova della mobilità e dei nitrati*

Seminare per infissione le colonie selezionate nel terreno *mobilità-nitrati* (40)

Incubare in anaerobiosi a 37°C per 24 ore

Esaminare le provette per il tipo di crescita lungo il canale d'infissione.

La mobilità è messa in evidenza da una crescita diffusa a partire dal canale d'infissione nella massa del terreno.

Per evidenziare la presenza di nitriti aggiungere 0,2-0,5 ml del reattivo dei nitriti (35) ad ogni provetta. Una colorazione rossa entro 15 minuti indica una reazione positiva, in caso contrario (persistenza della colorazione gialla), aggiungere una piccola quantità di polvere di zinco ed aspettare per 10 minuti. Lo sviluppo di una colorazione rossa indica reazione negativa (persistenza di nitrati). La persistenza della colorazione gialla indica reazione positiva (assenza di nitrati).

#### - Prova del lattosio - gelatina

Inoculare le colonie selezionate nel terreno *lattosio-gelatina* (41). Incubare in anaerobiosi a 37°C per 24-48 ore. Esaminare le provette per presenza di gas e di colore giallo, che indicano fermentazione del lattosio. Raffreddare le provette per 1 ora in frigorifero per evidenziare la liquefazione della gelatina.

#### *Interpretazione dei risultati*

I microrganismi che producono colonie nere su EYfree -TSC non mobili, che riducono i nitrati a nitriti, producono acido e gas dal lattosio e liquefano la gelatina in 48 ore si considerano *Clostridium perfringens*.

Le colture che mostrano una debole reazione dei nitriti (colorazione rosa) dovrebbero essere considerate negative, poiché *C.perfringens* dà un'intensa ed immediata reazione.

#### 5 - Espressione dei risultati

Riportare il numero di *C.perfringens*/g o ml di campione esaminato, riferendosi alle norme riportate nel cap. 1, par. 8, relative al conteggio in piastra ed al conteggio nei terreni selettivi.

#### 6 - Ricerca della tossina

Per la ricerca quantitativa dell'enterotossina di *C.perfringens* nelle feci e nella brodocultura del ceppo isolato si può utilizzare il metodo RPLA (Reversed passive latex agglutination). Per indurre la sporulazione e quindi la tossinogenesi del ceppo isolato è necessario utilizzare particolari terreni, tra i quali il *brodo di Duncan e Strong modificato* (estratto di lievito 0,4 %; proteose peptone 1,5%; amido solubile 0,4%; tioglicollato di sodio 0,1%; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 1%)

## 16. Ricerca di *Clostridium botulinum* e sue tossine

---

### 1 - Oggetto e campo di applicazione

Metodo per la ricerca di *Clostridium botulinum* tipo A, B, E e sue tossine negli alimenti.

### 2 - Principio del metodo

Ricerca delle tossine botuliniche negli alimenti mediante inoculazione intraperitoneale (IP) dell'alimento tal quale o previa estrazione con tampone-fosfato gelatina, in topi ceppo Swiss (*Mouse Test*).

Topi inoculati IP con l'estratto di un alimento o con una brodocoltura di *C.botulinum* che contiene  $\geq 1$  dose minima letale (MDL) di tossina botulinica muoiono entro 72 ore dopo la manifestazione dei sintomi caratteristici di intossicazione botulinica. La identificazione della tossina si basa sul principio che l'antitossina omologa è in grado di proteggere i topi dai sintomi, mentre le altre antitossine non sono in grado di farlo.

Ricerca delle forme vitali di *C.botulinum* presenti nell'alimento mediante semina del campione in idonei terreni colturali. Determinazione della presenza di *C.botulinum* nelle colture di arricchimento mediante ricerca delle sue tossine. Isolamento delle colture pure mediante strisci su idonei terreni solidi, conferma mediante ricerca della produzione di tossina.

Eventuale effettuazione di test biochimici e gascromatografici e per la caratterizzazione dei ceppi isolati.

### 3 - Terreni di coltura e reagenti

- Tampone fosfato gelatina	n	42
- Cooked Meat Medium Broth (CMM)	"	43
- Trypticase Peptone Glucose Yeast Extract Broth (TPGY)	"	44
- Egg Yolk Agar	"	45
- Antitossine monovalenti (anti-A, anti-B, anti-E) e polivalenti (anti-ABE)		

#### PRECAUZIONI:

La tossina botulinica è termolabile e poco stabile a pH alcalino per cui sarebbe opportuno conservare i campioni da analizzare e le colture in frigorifero ed eventualmente acidificare leggermente il materiale tossico da conservare.

Durante l'effettuazione del MOUSE TEST controllare accuratamente i sintomi dei topi inoculati per distinguere il botulismo da altre cause di morte quali alte concentrazioni saline, acidi, prodotti di degradazione delle proteine o altre sostanze tossiche eventualmente presenti nell'alimento.

Le tossine botuliniche sono le proteine più letali che si conoscono: la tossicità specifica per il tipo A è  $1 \times 10^8$  LD 50/mg di proteina per cui bisogna evitare con cura la formazione di aerosol e non pipettare mai con la bocca.

#### 4 - Procedimento

##### *Fasi preliminari*

Gli alimenti sospetti devono essere esaminati il più presto possibile dopo la loro raccolta. Lasciare i contenitori chiusi fino al momento dell'analisi, altrimenti raccogliere gli alimenti sfusi in contenitori sterili (buste Stomacher).

I campioni devono essere mantenuti refrigerati fino al momento dell'analisi ad esclusione delle conserve non aperte.

Registrare i dati per l'identificazione del prodotto, la Ditta produttrice o il produttore artigianale, il tipo di contenitore, il peso, le informazioni riportate in etichetta, il lotto di produzione e/o il codice, le condizioni del contenitore.

Prima di aprire gli alimenti inscatolati, pulire il coperchio con soluzioni disinfettanti, fare agire per qualche minuto, quindi asciugare la superficie. I contenitori con i fondelli deformati dovrebbero essere raffreddati prima dell'apertura e flambati con estrema cautela.

Aprire sterilmente il contenitore. Eventualmente porre la scatola in una busta di plastica ampia per evitare la formazione di aerosol.

Registrare le condizioni dell'alimento ed eventuali segni di decomposizione: presenza di gas, colore scuro, odore putrido ecc. Osservare i vari ingredienti che per la loro presenza e concentrazione nel prodotto potrebbero causare morte aspecifica se iniettati IP nel topo (es. elevate concentrazioni di sale come nelle acciughe).

Misurare il pH.

##### *Ricerca ed identificazione delle tossine botuliniche negli alimenti e nelle colture di arricchimento*

###### a) Ricerca delle tossine

###### *Preparazione del campione ed estrazione delle tossine*

*Alimenti solidi* - Trasferire sterilmente una porzione dell'alimento (possibilmente 50g), tal quale o con poco liquido, in un mortaio sterile prepesato. Aggiungere una uguale quantità di *tampone fosfato gelatina (42)* freddo e tritare con un pestello sterile.

L'omogeneizzazione si può effettuare anche in busta stomacher evitando però il riscaldamento del campione.

Porre a 4°C per 6-8 ore

Centrifugare a 12000 × g per 20 min. a 4°C in centrifuga refrigerata. A volte è necessaria una seconda centrifugazione per chiarificare l'estratto.

Utilizzare il surnatante per la ricerca ed identificazione della tossina.

*Alimenti liquidi* - Se limpidi possono essere utilizzati tal quali. Controllare il pH ed eventualmente portarlo vicino alla neutralità con HCl o NaOH 1N. Altrimenti centrifugarli come per quelli solidi e sottoporre il surnatante alla ricerca della tossina.

N.B.: Le tossine dei tipi non proteolitici, se presenti negli alimenti, necessitano dell'attivazione con la tripsina per essere determinate.



### *Trattamenti preliminari al mouse test*

#### *- Tripsinizzazione*

Portare il surnatante a pH 6,2 con NaOH od HCl 1 N. Aggiungere a 1,8 ml di surnatante 0,2 ml di una soluzione acquosa di tripsina ed incubare a 37 °C per 1 ora con lievi agitazioni ripetute.

*Soluzione di tripsina:* porre 1,5 g di tripsina 1:250 Difco in 100 ml di acqua distillata sterile. Agitare di tanto in tanto e lasciare a temperatura ambiente finché la maggior parte della tripsina è disciolta. Misurare il pH della soluzione e aggiustarlo a pH 6 se necessario. Sterilizzare mediante filtrazione e refrigerare.

#### *- Trattamento con antisieri*

Il trattamento con gli antisieri si effettua addizionando a 1 ml del surnatante 0,25 ml dell'antitossina e mantenendo a 37 °C per 30 min. in b.m.

Il trattamento con l'antitossina polivalente anti-A-B-E permette una conferma della presenza di tossina botulinica mentre il trattamento con le antitossine monospecifiche anti-A, anti-B, anti-E permette la sua identificazione.

#### *- Trattamento termico*

Il trattamento del surnatante a 100°C per 10 min. ha lo scopo di inattivare l'eventuale tossina botulinica presente, termolabile, e funge quindi da controllo negativo.

### *Mouse test*

Preparare il surnatante trattato e non trattato secondo lo schema n. 1, ed inoculare IP diverse coppie di topi con 0,5 ml di preparazione/topo.

#### SCHEMA n. 1

COPPIA TOPI	SURNATANTE	TRATTAMENTO
n. 1	1 ml	nessuno
n. 2	1.8 ml	0.2 ml sol.tripsina
n. 3	1 ml	0.25 ml anti A-B-E*
n. 4	1.5 ml	100°C per 10 min. in b.m.

(\*) titolo: 750 U.I. anti-A, 500 U.I. anti-B, 50 U.I. anti-E.

Generalmente, in presenza di tossina botulinica, i topi muoiono entro 6-24 ore.

Controllare, comunque, i topi periodicamente per 72 ore. È molto importante osservare i sintomi dei topi nelle prime 24 ore dopo le inoculazioni.

I sintomi di botulismo nel topo appaiono generalmente entro 4 ore dall'inoculazione e sono in sequenza: arruffamento del pelo, respirazione affannosa a mantice, paralisi degli arti fino alla morte per blocco respiratorio.

La presenza di tossina botulinica è evidenziata dal seguente risultato

Coppia n. 1	2 morti
Coppia n. 2	2 morti
Coppia n. 3	2 vivi
Coppia n. 4	2 vivi

*La morte dei topi senza i segni clinici di botulismo non è una prova sufficiente della presenza di tossina botulinica.*

I topi che muoiono immediatamente dopo l'inoculazione sono danneggiati dall'inoculazione stessa o reagiscono ad altre sostanze tossiche presenti diverse dalla tossina botulinica (es. composti azotati, elevate concentrazioni di sali).

Gli agenti chimici, possono essere eliminati con la dialisi. *Se nessun tipo di trattamento rileva la presenza di tossina, il risultato rimane indeterminato o il campione non contiene tossina.*

Se muoiono i topi della coppia n.1 e n.2 proseguire per la identificazione della tossina secondo lo schema n. 2, se muoiono solo i topi della coppia n. 2 proseguire nello stesso modo ma sul surnatante trattato con tripsina,

(Nel caso però di morte di tutti gli animali è consigliabile ripetere il test diluendo 1:5 il surnatante con tampone fosfato gelatina in quanto potrebbero essere presenti oltre la tossina botulinica altre sostanze tossiche termoresistenti).

#### b) Identificazione delle tossine

A tale fine occorre determinare la Minima Dose Letale (MDL) diluendo il surnatante in tampone fosfato gelatina 1:2, 1:10, 1:100, 1:1000 ed inoculando separatamente una coppia di topi IP con 0,5 ml di ogni diluizione/topo. Osservare i topi ogni giorno per 72 ore per i sintomi di botulismo e registrare la morte. Se tutti i topi muoiono alle diluizioni saggiare ripetere usando ulteriori diluizioni per determinare l'end point o la MLD come stima della tossina presente. La MLD è contenuta nella più alta diluizione che uccide tutti e due i topi. In questo modo si calcola la MLD/ml.

Dopo aver determinato la MDL, utilizzare la diluizione precedente a quella che uccide tutti i topi (es. se i topi muoiono fino alla diluizione 1:100 ma non a quella 1:1000 utilizzare la diluizione 1:10).

Trattare questa con i sieri monospecifici anti-A, anti-B, anti-E (titolo 10 UI/ml) aggiungendo ad 1 ml separatamente 0,25 ml dei sieri monovalenti secondo lo schema 2 e mantenendo a 37°C per 30 min. in *b.m.* Inoculare separatamente diverse coppie di topini con 0,5 ml delle preparazioni/topo Se si deve utilizzare il fluido tripsinizzato prepararne uno tripsinizzato di fresco perché la tripsina nel tempo distrugge la tossina. Trattare tale preparazione come precedentemente descritto determinando la MDL e trattando con gli antisieri specifici.

#### SCHEMA n 2

coppia topi	dil. estratto	trattamento
n.1	1 ml	nessuno
n.2	1 ml	0,25 ml antiA
n.3	1 ml	0,25 ml antiB
n.4	1 ml	0,25 ml antiE

Controllare i topi periodicamente fino a 3 giorni.

## *Ricerca delle spore di C.botulinum ed identificazione*

### *Preparazione del campione*

*Alimenti solidi* - Trasferire sterilmente una porzione dell'alimento (possibilmente 50 g), tal quale o con poco liquido, in un mortaio sterile prepesato. Aggiungere una uguale quantità di *tampone fosfato gelatina* (42) freddo e tritare con un pestello sterile. In alternativa piccoli pezzi del prodotto possono essere inoculati direttamente nel brodo di arricchimento con una pinza sterile.

*Alimenti liquidi* - Inoculare direttamente l'alimento nel terreno di coltura usando una pipetta sterile.

*Esame microscopico* - Effettuare l'esame microscopico del campione in esame e registrare i tipi dei microrganismi presenti, la forma dei bastoncelli, il loro numero approssimato, la presenza e la eventuale localizzazione di spore.

### *Preparazione delle colture di arricchimento*

- Prima dell'inoculazione nel brodo di arricchimento, riscaldare il terreno, anche se preparato di recente, in *b.m.* bollente per 15 min. Raffreddare rapidamente in acqua fredda senza agitare.
- Inoculare 1-2 g di alimento solido (o sua sospensione, preparata come precedentemente descritto) o 1-2 ml di alimento liquido, in 15 ml di brodo di arricchimento. Inoculare due provette di CMM (43) e due provette di TPGY (44). Introdurre lentamente l'inoculo sotto la superficie del brodo. Trattare una provetta di TPGY ed una di CMM a 80°C per 10 minuti.
- Incubare il CMM a 35°C ed il TPGY a 26-28°C.
- Dopo 5 giorni di incubazione esaminare ogni coltura per torbidità, produzione gas, odore e eventuale digestione della carne. Esaminare le colture microscopicamente, osservando la morfologia dei bastoncelli, la presenza di spore e la localizzazione di queste nella cellula.
- Sottoporre tutte le colture alla ricerca della tossina centrifugando parte del brodo (circa 10 ml) a 12000 × g per 20 min. a 4°C e utilizzando il surnatante come precedentemente descritto (*Ricerca ed identificazione delle tossine botuliniche*).
- Dalle colture risultate positive per la presenza di tossina botulinica (conservate in frigorifero), si procede all'isolamento del microrganismo.

### *Isolamento*

La possibilità di isolare *Clostridium botulinum* in coltura pura da una coltura mista è notevolmente facilitata dalla presenza di spore in quanto possono essere effettuati dei trattamenti che eliminano almeno in parte le forme vegetative della flora accessoria, permettendo una selezione delle spore botuliniche.

Considerando però che la resistenza termica delle spore dei tipi non proteolitici è minore di quella dei tipi proteolitici, è utile nel primo caso sostituire il classico trattamento termico ad un trattamento con alcool.

#### *Trattamento termico*

Trattare 1-2 ml della coltura di arricchimento che mostra forme sporali a 80 °C per 10 minuti.

*Trattamento con alcool*

A 1-2 ml della coltura di arricchimento aggiungere un ugual volume di etanolo assoluto sterilizzato per filtrazione.

Mescolare l'alcool con la coltura ed incubare a t.a. per un'ora agitando ogni 15'.

Effettuare strisci su piastre contenenti Egg Yolk Agar (45), o altro terreno analogo preincubato in anaerobiosi per alcuni giorni, in modo da avere colonie ben isolate. A volte può essere utile diluire la coltura prima di effettuare lo striscio, per ottenere colonie isolate.

Per prevenire l'invasività delle colonie essiccare bene le piastre prima della semina.

Incubare le piastre a 35°C per circa 48 ore in anaerobiosi.

Selezionare circa 10 colonie tipiche ben isolate: su Egg Yolk agar le colonie di *C. botulinum* sono generalmente rugose con contorno irregolare e mostrano una superficie iridescente quando osservate a luce obliqua. Questo effetto è dovuto all'azione della lipasi che dà un aspetto perlaceo che si estende anche oltre la colonia e ne segue i contorni.

Bisogna però tener presente che tali caratteristiche biochimiche sono comuni ad altri *Clostridium* non tossici normalmente isolati dagli alimenti. Per tale motivo tutte le colonie sospette vanno sottoposte alla prova di tossinogenesi.

Inoculare ogni colonia in una provetta di brodo TPGY.

Incubare le provette per 5 giorni a 35°C (oppure a 26°C nel caso di riscontro positivo per tossina di tipo E dalla coltura dell'alimento) ed effettuare la ricerca della tossina (prescindendo dall'identificazione) mediante la prova biologica su tutte le colture ottenute.

Strisciare nuovamente ogni coltura risultata positiva alla prova biologica in doppio su Egg Yolk ed incubare rispettivamente in anaerobiosi e aerobiosi a 35°C. Se si sviluppano colonie tipiche di *C. botulinum* dopo 48 ore solamente in anaerobiosi e non sulle piastre incubate in aerobiosi, la coltura può essere considerata pura.

È importante però considerare l'eventualità, anche se molto rara, che l'agente tossigeno non sia il *C. botulinum* ma un altro clostridio con caratteristiche biochimiche diverse, produttore di tossina botulinica.

Sarebbe quindi necessario, se tutte le colonie lipasi positive saggiate fossero non tossigene, considerare anche le lipasi negative.

I ceppi isolati vengono sottoposti all'esame della produzione di tossina (la quale deve essere identificata) ed eventualmente a test biochimici e gascromatografici per l'identificazione finale.

## 17. Ricerca di *Campylobacter* termoresistente

---

### 1 - Oggetto e campo di applicazione

Ricerca di *Campylobacter* termoresistente negli alimenti.

### 2 - Principio del metodo

La ricerca di *Campylobacter* termoresistente si articola nelle seguenti fasi (vedi anche diagramma sintetico di procedura) :

#### I - Arricchimento in terreni liquidi

Inoculo dell'aliquota di saggio in due terreni liquidi (\*) di arricchimento e relative incubazioni in microaerofilia (atmosfera al 5% di ossigeno);

(\*) - *Preston broth* (incubaz. a 42 °C per 18 ore)

- *Park-Sanders broth* (incubaz. a 32 °C per 4 ore, poi a 37 °C per 2 ore e infine a 42 °C per 40-42 ore).

#### II - Isolamento e identificazione

Semina delle colture ottenute nei terreni di arricchimento, su terreni solidi selettivi (\*) e loro incubazione a 42 °C per 48 ore in microaerofilia.

(\*) - *Skirrow agar* e un'altro terreno solido selettivo (*Butzler agar* modificato, *Karmali agar* (CSM), *Campylobacter agar* con carbone e desossicolato (CCDA) o *Preston agar*).

- *Agar sangue nutritivo* con supplemento (NBG), inoculato usando il metodo differenziale di filtrazione.

Le colonie presuntivamente identificate come *Campylobacter* termoresistente vengono sottoposte a test biochimici di conferma.

### 3 - Terreni e reagenti

- Preston Broth	n.	46
- Park-Sanders Broth	"	47
- Skirrow agar	"	48
- Butzler agar modificato	"	49
- Karmali agar (CSM)	"	50
- Campylobacter agar con carbone e desossicolato (CCDA)	"	51
- Preston Agar	"	52
- Agar sangue nutritivo con supplementi (NBG)	"	53
- Brucella broth	"	54
- Agar sangue Columbia	"	55
- Triple sugar iron agar (TSI agar)	"	24
- Soluzione di perossido d'idrogeno al 3%		
- Reagenti per il test di idrolisi dell'ippurato	"	56
- Mueller-Hinton agar sangue	"	57
- Reagenti per la rilevazione dell'ossidasi	"	58

#### 4 - Procedimento

##### *Arricchimento selettivo*

Aggiungere a 25 g di campione 225 ml di Preston broth (46) e 25g di campione a 225 ml di Park and Sanders broth (47)

Nel caso in cui il campione disponibile abbia un peso inferiore a 50 g, dividere a metà il campione ed usare le quantità necessarie di terreno di arricchimento per arrivare alla diluizione di circa 1:10 (massa/volume).

Incubare il Preston broth a 42°C in microaerofilia per 18 ore.

Incubare il Parker Sanders broth a 32 °C per 4 ore; aggiungere poi la soluzione antibiotica B (vedi composizione) in ragione del 5% del volume complessivo del terreno.

Incubare a 37 °C per ulteriori 2 ore ed infine a 42 °C in microaerofila per 40 - 42 ore.

##### *Isolamento diretto*

Per i prodotti che si sospetta altamente contaminati da *Campylobacter* termoresistente, effettuare strisci multipli direttamente dal Preston broth inoculato, prima della sua incubazione, su Skirrow agar (48) e su un altro terreno fra quelli elencati (Modified Butzler Agar 49, Karmali agar 50, CCDA 51, Preston agar 46)

Incubare entrambi i terreni a 42°C in microaerofilia per 24-48 o più ore e procedere all'identificazione come successivamente descritto.

##### *Isolamento secondario ed identificazione*

Dopo incubazione del Preston broth e del Park and Sanders broth, effettuare strisci multipli su Skirrow agar e su un altro terreno fra quelli elencati (Modified Butzler Agar, Karmali agar, CCDA, Preston agar)

Incubare i due tipi di terreno (4 piastre) a 42°C in microaerofilia per 24-48 o più ore e procedere all'identificazione come successivamente descritto.

Contemporaneamente, usando una pipetta Pasteur, prelevare 8 gocce da ciascun terreno di arricchimento selettivo (Preston broth e Park and Sanders broth) e distribuirle su due membrane filtranti di nitrocellulosa ( $\varnothing$  85 mm, pori da 0,65  $\mu$ m) poste sulla superficie di altrettante piastre di NBG agar (53).

Dopo circa 1 ora a 37°C, dopo che le gocce di liquido sono passate attraverso la membrana, rimuoverla con una pinza sterile.

Incubare le due piastre a 42°C in microaerofilia per 24-48 o più ore e procedere all'identificazione come successivamente descritto.

Esaminare tutte le piastre ottenute per il riconoscimento di colonie caratteristiche di *Campylobacter* termoresistente:

- Su Skirrow agar si presentano piccole, lisce, convesse, traslucide, non pigmentate, non emolitiche e possono tendere a sciamare.
- Su NBG agar si presentano piccole, grigiastre, traslucide e a volte irregolari.

##### *Conferma*

Selezionare almeno cinque colonie caratteristiche da ciascuna piastra. Se sono meno di cinque, prelevarle tutte.

Da ciascuna colonia preparare una sospensione in 1 ml di Brucella broth (54) ed osservare a fresco al microscopio a contrasto di fase la morfologia e la mobilità. Prendere

in considerazione le sospensioni nelle quali si osservano piccoli bacilli ricurvi, con caratteristico movimento rotatorio. Seminare con queste, mediante strisci multipli, la superficie di piastre di Agar Sangue Columbia (55) in modo da ottenere colture pure. Incubare a 42°C per 24 ore in microaerofilia e sottoporre tali colture pure ai test biochimici e morfologici.

### *Colorazione del Gram*

#### *Crescita a 25 °C*

Inoculare una provetta di *Brucella broth* con la coltura, incubare a 25°C in microaerofilia per 2-5 giorni. Osservare l'eventuale crescita.

### *Conferma biochimica*

#### *- Reazione dell'ossidasi*

Usando un'ansa o un un'ago di platino iridio, strisciare la coltura su carta da filtro inumidita con il reagente per l'ossidasi (58) o su un dischetto di carta disponibile in commercio. Evitare l'uso di anse o di aghi di nichel-cromo.

Il test viene considerato positivo se il colore vira al color malva, violetto o blu scuro dopo 10 secondi.

#### *- Agar TSI*

Inoculare con un ago la coltura sulla superficie a becco di clarino del terreno con uno striscio longitudinale e per infissione fino a raggiungere il fondo della provetta.

Incubate a 42 °C per 24 ore o fino a 5 giorni, se necessario, in microaerofilia.

Interpretare i cambiamenti di colore come segue:

#### *Fondo provetta ->*

giallo	= glucosio positivo (fermentazione del glucosio)
rosso o immodificato	= glucosio negativo (non fermentazione del glucosio)
nero	= formazione di idrogeno solforato (H <sub>2</sub> S). Questo dato permette di differenziare i ceppi di <i>Campylobacter</i> termoresistente.
bolle o fessurazioni del terreno	= produzione di gas dal glucosio

#### *Superficie inclinata ->*

gialla	= lattosio e/o saccarosio positivo (utilizzo di uno od entrambi gli zuccheri)
rossa o immodificata	= lattosio e saccarosio negativi (nessuno zucchero utilizzato)

#### *- Reazione della catalasi*

Prelevare un'ansata della coltura su TSI agar e depositarla in una goccia di perossido d'idrogeno al 3% posta su un vetrino. La reazione viene considerata positiva in caso di sviluppo di bollicine di gas entro 30 secondi.

#### *- Test di sensibilità all'acido nalidixico ed alla cefalotina*

Questo test permette di differenziare i ceppi di *Campylobacter* termoresistente.

Con la coltura preparare una sospensione con densità 0.5 della scala Mc Farland nel *Brucella broth*. Quindi diluire questa sospensione 1/10 nello stesso brodo e versarla sulla superficie dell'agar Muller Hinton contenente il 5% sangue (57).

Lasciare in contatto per 5 minuti, quindi eliminare la sospensione in eccesso.

Depositare un disco di acido nalidixico (30 µg) e un disco di cefalotina (30 µg) sulla superficie dell'agar.

Incubare a 37 °C per 24 ore in microaerofilia.

Interpretare i cambiamenti che avvengono come segue:

presenza di zona di inibizione anche minima	sensibile
assenza di zona di inibizione	resistente

#### - Test dell'idrolisi dell'ippurato

Questo test permette di differenziare i ceppi di *Campylobacter* termoresistente.

Inoculare 0,5 ml di soluzione di ippurato di sodio (56a) con una ansata della coltura pura. Mescolare ed incubare in *b.m.* a 37°C per 2 ore. Aggiungere 0,2 ml della soluzione di ninidrina al 3,5 % (56b). Incubare per altri 10 ' in *b.m.* a 37°C.

La reazione è positiva se sviluppa una colorazione violetta. Una lieve colorazione violetta è considerata reazione negativa.

Il *Campylobacter* termoresistente mostra le seguenti caratteristiche:

morfologia	bacilli piccoli curvi
mobilità	+
Gram	-
Crescita a 25 °C	-
Ossidasi	-
Lattosio	-
Glucosio	-
Saccarosio	-
Gas	-
Catalasi	+
Cefalotina	R

Si ammette la presenza di *Campylobacter* termoresistente se almeno una colonia mostra le sopracitate caratteristiche.

Tra i *Campylobacter* termoresistenti, le specie che si incontrano più frequentemente sono il *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* e *Campylobacter laridis*.

In tabella vengono illustrate le caratteristiche differenziali.

	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. laridis</i>
H <sub>2</sub> S (TSI)	(*)	(+)	-
Acido nalidixico	S	S	R
Idrolisi dell'ippurato	+	-	-

(\*) leggero sviluppo di H<sub>2</sub>S nell'acqua di sineresi dopo 5 giorni



## 5 - Espressione dei risultati

In base all'interpretazione dei risultati riferire la presenza o assenza di *Campylobacter termoresistente* nella aliquota di campione esaminata.

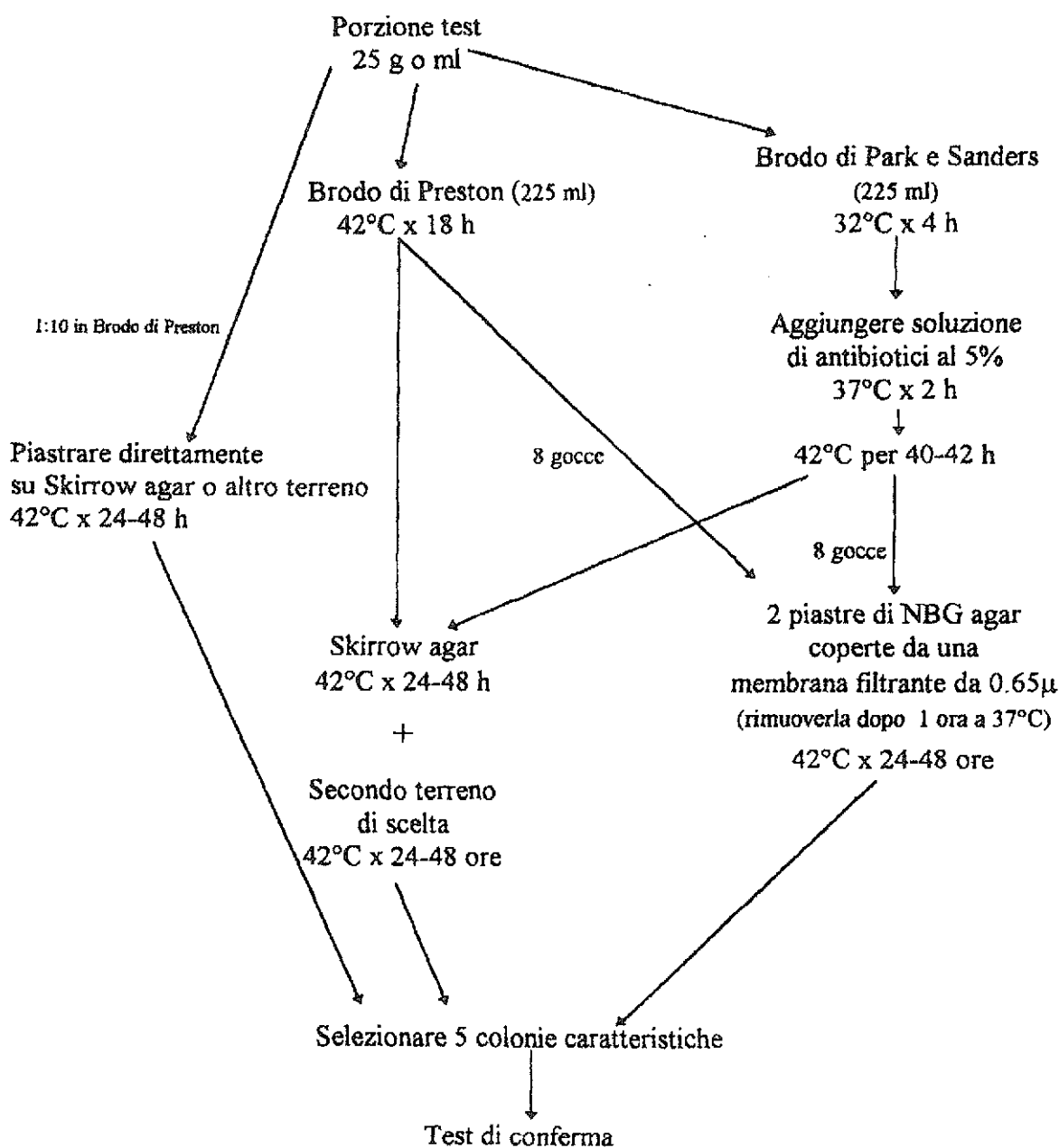


Figura 5 - Diagramma sintetico di procedura per la ricerca di *Campylobacter termoresistente*

## 18. Ricerca di *Yersinia enterocolitica* presumibilmente patogena

### 1 - Oggetto e campo di applicazione

Metodo per la ricerca di *Yersinia enterocolitica* presumibilmente patogena negli alimenti.

### 2 - Principio del metodo

La ricerca di *Y. enterocolitica* presumibilmente patogena negli alimenti necessita di tre stadi successivi. (Vedere anche il diagramma sintetico del procedimento)

#### - Arricchimento in terreno liquido selettivo

Semina della porzione di campione da analizzare in due differenti terreni di arricchimento:

- Brodo PSB (Incubazione 22-25°C per 3-5 gg)
- Brodo ITC (Incubazione a 22-25°C per 48 ore)

#### - Isolamento

Semina delle colture ottenute precedentemente su due terreni selettivi solidi :

- Agar CIN
- Agar SSDC

Incubazione a 30°C, esaminare dopo 24 ore e, se necessario, dopo 48 ore.  
Verifica della presenza di colonie riferibili a *Y. enterocolitica*.

#### - Conferma ed identificazione

Esecuzione di subcolture di colonie riferibili a *Y. enterocolitica*, e conferma per mezzo di appositi test biochimici e sierologici, nonché di test di determinazione della patogenicità.

### 3 - Terreni di coltura e reagenti

- Brodo PSB (peptone, sorbitolo, sali biliari.)	n.	59
- Brodo ITC (irgasan, ticarcillina, clorato di potassio)	"	60
- Agar CIN (cefsulotina, irgasan, novobiocina)	"	61
- Agar SSDC (Salmonella-Shigella, desossicolato di Sodio, sali di calcio)	"	62
- Agar nutritivo II	"	63
- Terreno Urea triptofano	"	64
- Reagenti per la determinazione della triptofano-deaminasi	"	65
- Kligler Agar	"	66
- Reagenti per la determinazione dell'ossidasi	"	58
- Terreno per la decarbossilazione della lisina	"	26
- Terreno per la decarbossilazione dell'ornitina	"	67
- Terreno per la fermentazione dei carboidrati (Saccarosio, Ramnosio, Salicina)	"	68
- Terreno Citrato-Simmons	"	69
- Agar bile esculina	"	70
- Agar triptone, caseina, soya	"	71
- Reagenti e terreni per la determinazione della pirazinamidasi	"	72

- Agar triptone, caseina, soya, al magnesio e all'ossalato
- Sieri agglutinanti contenenti gli anticorpi contro i principali sierotipi abitualmente patogeni.

#### 4 - Procedimento

##### *Preparazione delle sospensioni madre*

- Preparare la prima soluzione madre diluendo una quantità x di campione da analizzare con il terreno di arricchimento PSB (59) in modo da ottenere un rapporto campione/terreno di 1/10
- Preparare la seconda soluzione madre diluendo una quantità x di campione da analizzare con il terreno di arricchimento ITC (60) in modo da ottenere un rapporto campione/terreno di 1/100

##### *Arricchimento*

Incubare le due sospensioni madre nel modo seguente:

- il terreno PBS a 22° o a 25°C per 1-3 gg con agitazione o per 5 gg senza agitazione.
- Il terreno ITC a 25°C per 48 ore

##### *Isolamento*

- seminare con ansa la coltura ottenuta in terreno PBS su agar CIN (61)
- parallelamente, prelevare 0,5 ml della stessa coltura e porli in 4,5 ml di soluzione di KOH (20) e agitare.
- dopo 20 secondi, seminare con ansa su terreno Agar CIN
- seminare con ansa la coltura ottenuta in terreno ITC su agar SSDC (62)
- incubare le piastre capovolte a 30°C
- dopo 24 ore di incubazione esaminare le piastre con un una lente o transilluminando obliquamente la piastra al fine di evidenziare la presenza di colonie caratteristiche di *Y. enterocolitica*

Su agar CIN le colonie caratteristiche di *Y. enterocolitica* sono piccole, lisce con centro rosso o bordo incolore

Su agar SSDC le colonie caratteristiche di *Y. enterocolitica* sono grigie con contorno non ben definito, non iridescenti e finemente granulose.

Se lo sviluppo delle colonie è lento, se la colorazione è debole o se non ci sono colonie caratteristiche prolungare l'incubazione fino a 48 ore specialmente per il terreno SSDC

##### *Identificazione e conferma*

Per la conferma, prelevare da ogni piastra cinque colonie considerate tipiche o sospette.

Se sulla piastra ci sono meno di cinque colonie tipiche o sospette, prenderle in considerazione tutte.

Seminare le colonie selezionate sulla superficie di piastre di agar nutritivo (63) preventivamente asciugato in modo che si sviluppino colonie ben isolate.

Incubare le piastre a 30°C per 24 ore.

Allestire colture pure ed utilizzarle per la conferma biochimica e sierologica.

*Tests presuntivi*

Inoculare con colonie ben isolate presenti sull'agar nutritivo i terreni Urea-Triptofano(64) e Kligler (66).

Conservare le piastre di Agar Nutritivo in frigorifero per l'esecuzione di test biochimici supplementari e delle prove di patogenicità.

*- Determinazione dell'ureasi*

Inoculare il terreno Urea Triptofano immediatamente sotto la superficie del liquido.

Una colorazione rosa violetta indica una reazione positiva all'ureasi.

Una colorazione giallo arancio indica una reazione negativa all'ureasi.

*- Determinazione della triptofano-deaminasi*

Aggiungere tre gocce di reagente (65) nella stessa provetta utilizzata per la determinazione dell'ureasi.

Una colorazione marrone indica una reazione positiva alla triptofano deaminasi.

*- Terreno Kligler agar*

Procedere ad infissione e striscio in Kligler agar a becco di clarino.

Incubare a 30°C per 24-48 ore. Interpretare i cambiamenti del terreno come riportato in tabella

*Fondo provetta ->*

giallo	= glucosio positivo (fermentazione del glucosio)
rosso o immodificato	= glucosio negativo (non fermentazione del glucosio)
nero	= formazione di idrogeno solforato (H <sub>2</sub> S).
bolle o fessurazioni del terreno	= produzione di gas dal glucosio

*Superficie inclinata ->*

gialla	= lattosio positivo
rossa o immodificata	= lattosio negativo (mancata utilizzazione del lattosio)

In caso di positività per *Y. enterocolitica* il becco di clarino apparirà rosso e il fondo della provetta giallo (glucosio positivo) e senza annerimento (H<sub>2</sub>S negativo).

*- Ricerca dell'ossidasi*

Prelevare una porzione della colonia isolata e strisciarla su carta da filtro imbevuta del reagente per l'ossidasi (58) (disponibili anche commercialmente).

Considerare il test negativo se il colore non cambia a violetto o blu scuro in 10 sec.

*Scelta delle colonie per i saggi biochimici di conferma*

Prendere in considerazione le colonie:

Ureasi	+
Trptofano deaminasi	-
Glucosio	+
Gas dal Glucosio	-
Lattosio	-
H <sub>2</sub> S	-
Ossidasi	-

Alcuni rari ceppi di *Y. enterocolitica* lattosio-positivi sono stati isolati da prodotti caseari

*Test biochimici di conferma*

Con ciascuna colonia isolata su agar nutritivo e selezionata secondo lo schema precedente seminare i terreni di identificazione:

*- Ricerca della lisina decarbossilasi*

Inoculare appena al di sotto della superficie del terreno liquido per la decarbossilazione della lisina (26). Incubare per 24 ore a 30°C.

Un colore violetto dopo incubazione indica reazione positiva, un colore giallo indica reazione negativa.

*- Ricerca dell'ornitina decarbossilasi*

Inoculare appena al di sotto della superficie del terreno liquido per la decarbossilazione dell'ornitina (67). Incubare per 24 ore a 30°C.

Un colore violetto dopo incubazione indica reazione positiva, un colore giallo indica reazione negativa.

*- Fermentazione del saccarosio e del ramnosio*

Inoculare appena al di sotto della superficie del terreno liquido per la fermentazione del saccarosio e del ramnosio (68). Incubare per 24 ore a 30°C. Un colore giallo dopo incubazione indica reazione positiva, un colore rosso indica reazione negativa.

*- Utilizzazione del citrato*

Inoculare per strisciamento il terreno Citrato-Simmons (69). Incubare a 30°C per 24 ore. La reazione è positiva quando il terreno vira al blu.

*Selezione delle colonie per i tests presuntivi di patogenicità*

Prendere in considerazione le colonie

Lisina decarbossilasi	-
ornitina decarbossilasi	+
Ramnosio	-
Saccarosio	+
Citrato	-

Rari ceppi di *Y. enterocolitica* presumibilmente patogena saccarosio-negativi sono stati isolati dalla carne suina.

### *Test presuntivi di patogenicità*

Con ciascuna colonia isolata su agar nutritivo e selezionata secondo lo schema precedente seminare i terreni per la determinazione della tossicità presuntiva.

#### *- Fermentazione della salicina*

Inoculare appena al di sotto della superficie del terreno liquido per la fermentazione dei carboidrati (68). Incubare per 24 ore a 30°C.

Un colore giallo dopo incubazione indica reazione positiva, un colore rosso indica reazione negativa.

#### *- Ricerca dell'esculina*

Inoculare per strisciamento il terreno Agar bile esculina (70). Incubare a 30°C per 24 ore. Un alone nero attorno alle colonie indica una reazione positiva.

#### *- Ricerca della pirazinamidasi*

Seminare una larga porzione del becco di clarino del terreno per la ricerca della pirazinamidasi (72) con la colonia in esame.

Incubare a 30°C per 48 ore. Aggiungere 1 ml di solfato ferroso ammoniacale (72)

Una reazione rosa-marrone indica una reazione positiva.

### *Scelta delle colonie per il saggio di conferma di patogenicità e la conferma sierologica*

Prendere in considerazione le colonie:

Salicina	—
Esculina	—
Pirazinamidasi	—

### *Test di conferma della patogenicità*

#### *- Ricerca dell'esigenza di calcio a 37°C.*

Sospendere ciascuna colonia isolata su Agar Nutritivo e isolata secondo lo schema precedente in soluzione fisiologica (in modo da ottenere una sospensione di circa  $10^3$  batteri/ml).

Inoculare ogni sospensione per spatolamento superficiale su:

due piastre di agar triptone caseina soia (71)

e

due piastre di agar triptone caseina soia al magnesio e all'ossalato (73)

Incubare rispettivamente una piastra di ogni terreno per 48 ore a 25°C, e l'altra a 37°C.

La reazione è considerata positiva se a 25°C le colonie hanno una grandezza omogenea e se a 37°C, in presenza di magnesio ossalato si osserva una inibizione della coltura.

Ad esempio, in caso di crescita omogenea a 25°C si considera positiva la prova se a 37°C si osserva una coltura dissociata in piccole colonie di circa 0,1 mm di diametro e in grandi colonie di 0,5-1 mm di diametro (con una percentuale di piccole colonie superiore a 20%).

Interpretazione:

Le colonie inibite sono calcio dipendenti e presumibilmente patogene.

*Interpretazione dei test biochimici e di patogenicità*

*Yersinia enterocolitica* presumibilmente patogena generalmente mostra i seguenti risultati

Urea	+
Triptofano deaminasi	-
Glucosio	+
Gas da glucosio	-
Lattosio	-
Idrogeno Solforato	-
Ossidasi	-
Lisina decarbossilasi	-
Ornitina decarbossilasi	+
Saccarosio	+
Ramnosio	-
Citrato	-
Salicina	-
Esculina	-
Pirazinamidasi	-
Richiesta di calcio a 37°C	+

Da un punto di vista epidemiologico, è molto interessante mettere in evidenza gli antigeni somatici della *Y. enterocolitica*.

I ceppi presumibilmente patogeni appartengono più frequentemente ai gruppi 0:3; 0:8; 0:9; 0:5,27 e 0:13.

**5 - Espressione dei risultati**

In base ai risultati ottenuti indicare la presenza o assenza di *Y. enterocolitica* presumibilmente patogena nell'aliquota di campione esaminata.

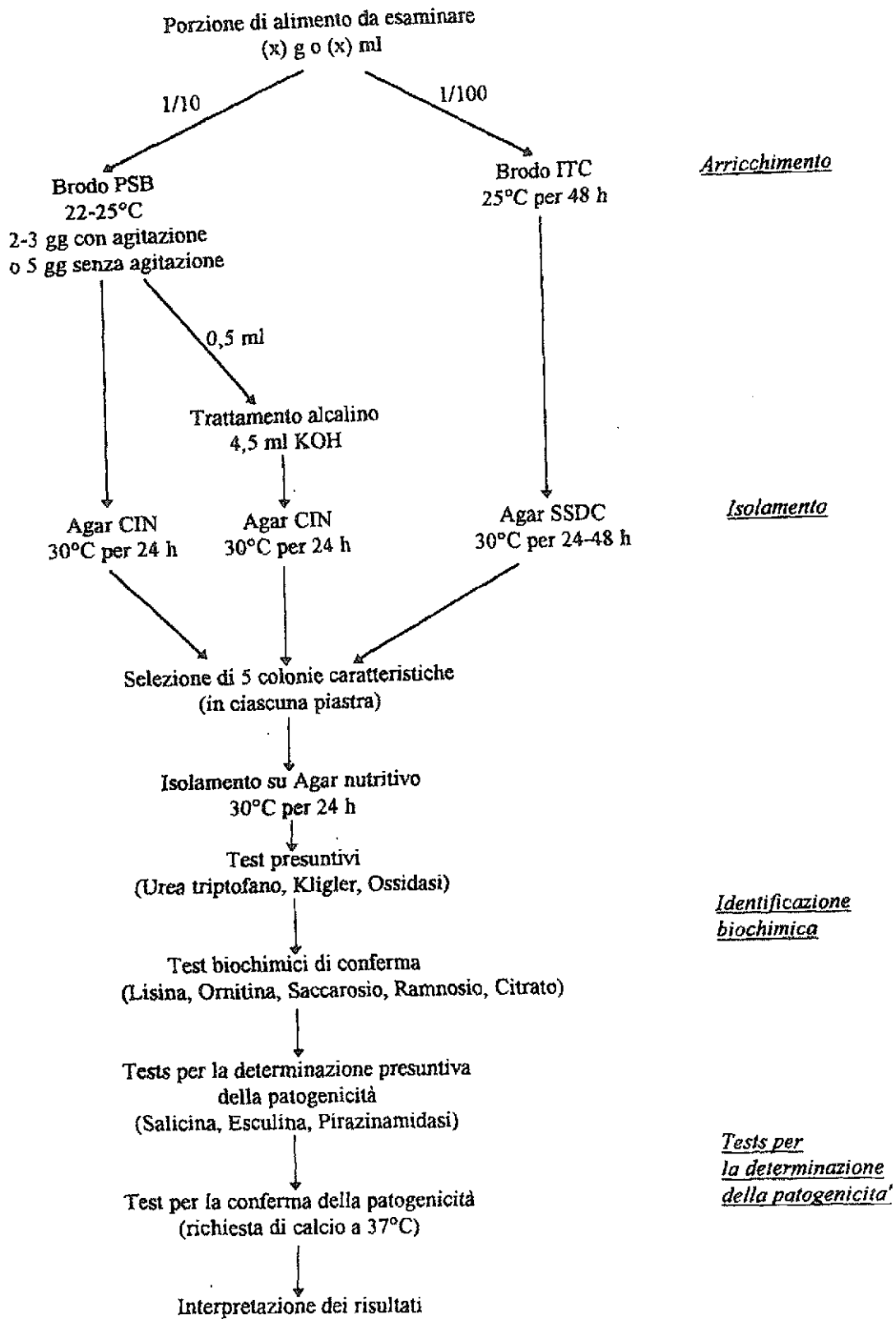


Figura 6 - Diagramma sintetico di procedura per la ricerca di *Yersinia enterocolitica*



## 19. Ricerca di *Listeria monocytogenes* nel latte e derivati

---

### 1 - Oggetto e campo di applicazione

Metodo per la Ricerca di *Listeria monocytogenes* nel latte e derivati.

### 2 - Principio del metodo

La ricerca di *Listeria monocytogenes* necessita di almeno tre fasi (vedi anche diagramma sintetico del procedimento):

- arricchimento in brodo selettivo a 30°C per 48 ore
- isolamento in terreni selettivi a 37°C per 48 ore per accertare la presenza di colonie *presuntive* di *Listeria spp.*
- Effettuazione di subcolture delle colonie presuntive, in terreni solidi non selettivi, ed esecuzione di test biochimici, morfologici e fisiologici per la conferma e l'identificazione.

### 3 - Terreni di coltura e reagenti

- Brodo d'arricchimento selettivo (EB)	n. 74
- Brodo d'arricchimento selettivo tamponato (BEB)	" 75
- Agar Oxford	" 76
- Palcam agar	" 85
- Agar Triptone-soya-estratto di lievito (TSYEA)	" 77
- Brodo Triptone soya-estratto di lievito (TSYEB)	" 78
- Agar sangue II	" 79
- Brodo per l'utilizzazione degli idrati di carbonio	" 80
- Terreno per la mobilità	" 81
- Terreni e reagenti per il CAMP test	" 82

### 4 - Procedimento

#### **Arricchimento**

Addizionare 25 g o ml del campione a 225 ml del terreno di arricchimento (74).

- *Latte in polvere e siero in polvere*: agitare fino a dissoluzione
- *Formaggio e caseina*: l'aggiunta del terreno deve essere fatta dopo averlo portato a 45°C, omogeneizzare per 1-3 min. fino a completa dispersione.
- *Burro*: trasferire l'aliquota del campione precedentemente fuso con una pipetta preriscaldata a 45°C nel terreno di arricchimento e mescolare.
- *Gelati e prodotti lattieri congelati*: il campione deve essere precedentemente fuso e mantenuto in bagno- maria a non più di 37°C.
- *Latti fermentati, Yogurt, Creme, Desserts*: eseguire l'omogeneizzazione in flaconi contenenti palline di vetro.

Si veda per ulteriori dettagli anche al cap. 1, par. 7 (*Preparazione del campione nel caso di latte e derivati per la ricerca qualitativa dei microrganismi.*).

Per ridurre il lavoro relativo all'esame di più unità campionarie da 25g di un alimento di uno specifico lotto, e quando sia provato che riunendo le varie porzioni dell'alimento (*campionamento in pool*) non si abbiano effetti sul risultato finale, le porzioni stesse possono essere riunite. Per esempio, se 10 porzioni da 25g devono essere esaminate, riunire in un'unica porzione da 250g le 10 unità ed aggiungere 2,25 l di brodo di prearricchimento

Salvo indicazioni contrarie verificare il pH della sospensione ed aggiustarlo se necessario a  $7,3 \pm 0,1$ , per i prodotti fermentati è conveniente utilizzare terreni di arricchimento tamponato (75).

Incubare a 30°C per 48 ore.

### *Isolamento ed identificazione presuntiva*

Prelevare con un'ansata dalla coltura di arricchimento e strisciarla su una piastra di agar Oxford (76) in modo da ottenere colonie ben isolate. Nel caso di campioni fortemente contaminati da flora microbica accessoria, come nel caso di formaggi prodotti con latte non pastorizzato, è conveniente utilizzare anche il Palcam agar (85) in ragione della sua maggiore selettività.

Incubare le piastre capovolte a 37°C x 24-48 ore. E' preferibile incubare il PALCAM in microaerofilia (CO<sub>2</sub> 5-12%; O<sub>2</sub> 5-15%; N<sub>2</sub> 75%). Esaminare quindi le piastre per presenza di tipiche colonie di *Listeria* spp.

Su Oxford Agar le colonie tipiche si presentano dopo 24 ore di incubazione piccole (Ø circa 1 mm), di color marrone scuro circondate da un alone nero. Dopo 48 ore le colonie sono nere di 2-3 mm, con alone nero e con una depressione centrale.

Esporre le piastre di PALCAM dopo incubazione all'aria per 1 ora, affinché raggiungano una colorazione da rosa a porpora. Le colonie tipiche di *Listeria* spp. si presentano da verdi a grigio-verdi, piccole (Ø 1,5-2 mm) a volte con centro nero ma sempre con alone nero.

### *Conferma*

Prelevare dalla piastra di terreno d'isolamento almeno 5 colonie caratteristiche (se sono meno di 5 utilizzarle tutte) ed eseguire subcolture, mediante striscio, in differenti piastre di Agar TSYEA (77)

Incubare a 37°C x 24 ore o finché la crescita sia soddisfacente.

E' importante che lo spessore dell'agar nella piastra sia sottile (15 ml per piastra) per un buona visualizzazione alla illuminazione sec. Henry.

Tale illuminazione si produce facendo incidere a 45° un fascio di luce bianca su uno specchio, in modo da rinviarla con lo stesso angolo sotto la piastra appositamente sollevata con un sostegno.

Alla luce normale le colonie di *Listeria* spp. appaiono di 1-2 mm di diametro, incolori, opache, convesse con contorno regolare.

Alla luce di Henry le colonie mostrano una colorazione blu ed una superficie granulosa.

### Test biochimici

#### - Reazione della catalasi

Prelevare una colonia tipica e stemperarla in una goccia di perossido d'idrogeno al 3% posta su un vetrino. La reazione viene considerata positiva in caso di sviluppo di bollicine di gas entro 30 secondi. *Listeria spp.* risulta catalasi positiva.

#### - Colorazione di Gram

Effettuare la colorazione di Gram su una tipica colonia su TYSEA. Le cellule di *Listeria spp.* si presentano come bastoncini Gram-positivi.

#### - Mobilità

Scegliere una colonia tipica su TSYEA e sospenderla in una provetta contenente TSYEB (78). Incubare a 20-25°C per 8-24 ore finché il terreno appare torbido.

Depositare con un'ansa una goccia della coltura sul vetrino ricoprendola con un coprioggetti. Al microscopio con obiettivo ad immersione, preferibilmente in contrasto di fase, *Listeria spp.* appare in forma di bastoncini corti e sottili e mostrano una discreta mobilità, con evidenti oscillazioni e rotazioni del corpo batterico. E' utile la comparazione con una coltura di riferimento.

I bastoncini che sono dotati di una motilità rapida e priva di oscillazioni non sono ascrivibili a *Listeria spp.*

Un'ulteriore verifica può essere fatta seminando per infissione il terreno per la mobilità (81) ed incubando a 25°C per 48 ore. Esaminare la crescita lungo il canale di infissione; se negativa incubare per altri 5 giorni. *Listeria spp.* produce una crescita a forma d'ombrello lungo il canale d'infissione.

#### - Emolisi

Su colonie con caratteristiche morfologiche e fisiologiche di *Listeria spp.* ricercare l'attività emolitica.

Asciugare la superficie di una piastra di agar sangue.

Disegnare una griglia sulla parte inferiore della piastra in modo che questa risulti separata in 20-25 aree/piastra.

Prelevare colonie tipiche dal TSYEA e seminarle per infissione in ciascuna area; contemporaneamente effettuare il controllo positivo e negativo seminando nella stessa maniera *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* e *L. innocua*.

Incubare a 37 °C ed esaminare dopo 24-48 ore.

La *L. monocytogenes* mostra una ristretta zona di chiarificazione ( $\beta$ -emolisi), *L. innocua* non mostra zone di chiarificazione, *L. ivanovii* mostra generalmente una zona di chiarificazione ( $\beta$ -emolisi) ampia e ben evidenziata.

Per meglio evidenziare l'attività emolitica può essere utile mantenere le piastre per alcune ore in frigorifero.

### Ulteriori conferme biochimiche

Prelevare le colonie tipiche e sospenderle in una provetta contenente TSYEB.

#### - Utilizzazione dei carboidrati

Inoculare i diversi brodi di fermentazione dei carboidrati con un'ansata della coltura di TSYEB.

Incubare per 7 giorni a 37°C, anche se generalmente la reazione positiva (colorazione gialla dovuta alla formazione di acido) si evidenzia generalmente dopo 24 -48 ore.

### CAMP test (82)

Strisciare colture di *Staphylococcus aureus* e *Rodococcus equii* (colture di reazione) ciascuna in una singola linea sottile attraverso la piastra di agar sangue (79), cosicché le due colture siano parallele e sufficientemente separate (vedi schema). E' bene considerare il fatto che non tutti i ceppi di *S. aureus* e *R. equii* sono adatti al test, il che costituisce un limite alla esatta interpretazione del test stesso.

Per ottenere una linea sottile inoculare mantenendo l'ago o l'ansa ad angolo retto sull'agar.

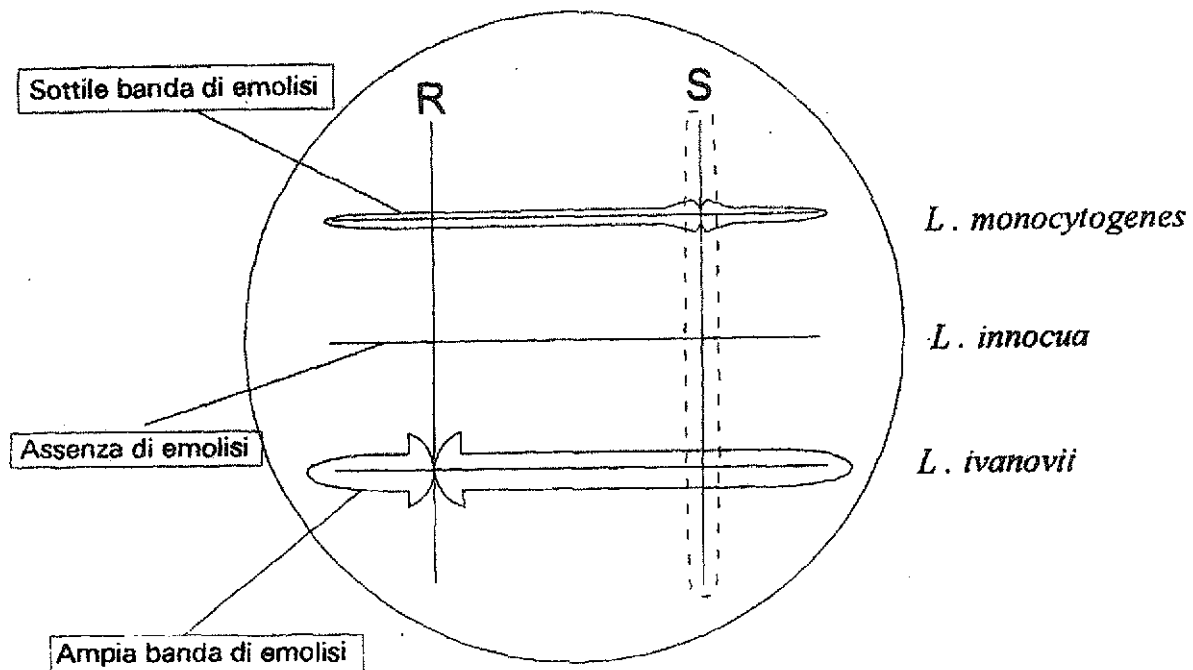


Figura 7 : Schema del CAMP test

Strisciare i ceppi in esame allo stesso modo ma ortogonalmente alle due colture di reazione in modo tale che le colture in esame non intersechino le colture di reazione ma si fermino a 1-2 mm da esse (vedi schema).

Seminare nella stessa maniera le colture di controllo (*L. monocytogenes* *L. ivanovii* e *L. innocua*)

Incubare le piastre a 37°C per 18-24 ore.

Per l'interpretazione dei risultati vedere la tabella e lo schema

Tabella 7- Risultati del CAMP test

	Reazione positiva	Reazione negativa
Zona di adiacenza ad <i>S. aureus</i>	piccola zona arrotondata ( $\varnothing$ circa 2 mm) di intensa emolisi all'interno della debole zona di emolisi dovuta allo <i>S. aureus</i>	
Zona di adiacenza ad <i>R. equi</i>	larga area (5-10 mm) di emolisi a punta di freccia	piccola zona di debole emolisi di circa 1 mm

*Interpretazione delle caratteristiche morfologiche, fisiologiche e delle reazioni biochimiche*

*Listeria spp.* si presenta in forma di piccoli bastoncelli Gram-positivi (solamente nelle colture di 24 ore), mobili, catalasi positivi.

*L. monocytogenes* è ramnosio-positiva e xylosio negativa.

*L. monocytogenes* ed *L. seeligeri* presentano una reazione di CAMP positiva con *S. aureus* ma non con *R. equi*.

*L. ivanovii* reagisce con *R. equi* ma non con *S. aureus*.

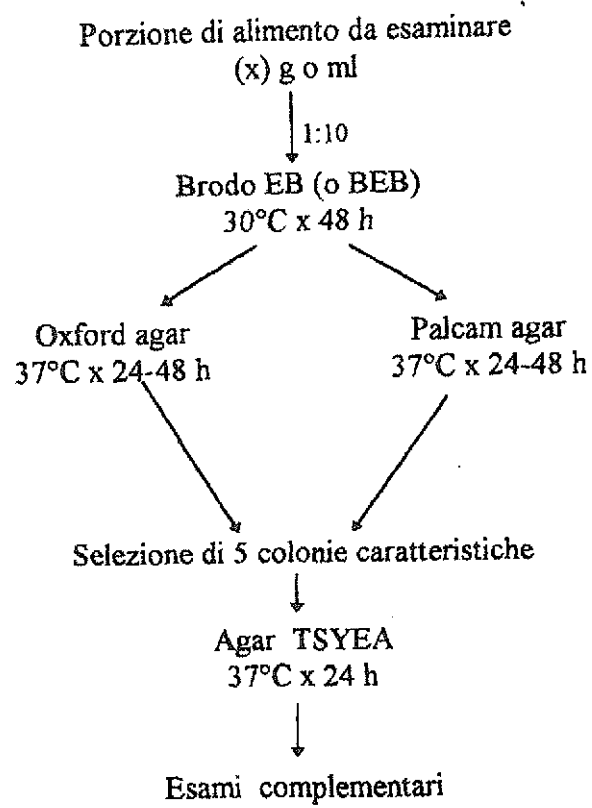
Le altre *Listeria* presentano reazioni negative sia con *R. equi* che con *S. aureus*.

I ceppi così identificati possono essere inviati per l'identificazione definitiva ad un laboratorio di riferimento di *Listeria*.

Al fine di verificare se i terreni di arricchimento ed identificazione permettano una buona crescita di *L. monocytogenes* effettuare in parallelo un controllo seminando in ulteriore aliquota di terreno di arricchimento con una diluizione (10-100 cellule/beuta) di una coltura di *L. monocytogenes* recentemente isolata e procedendo come per il campione in esame.

### 5 - Espressione dei risultati

In base all'interpretazione dei risultati riferire la presenza o assenza di *L. monocytogenes* alla aliquota di campione esaminata (25 g o ml).



**Figura 8** - Diagramma sintetico di procedura per la ricerca di *Listeria monocytogenes* nel latte e derivati

## 20. Ricerca di *Listeria monocytogenes* negli alimenti (eccettuato latte e derivati)

---

### 1 - Oggetto e campo di applicazione

Metodo per la ricerca di *Listeria monocytogenes* negli alimenti ad esclusione del latte e derivati.

### 2 - Principio del metodo

In genere la ricerca di *L.monocytogenes* necessita di due fasi successive (vedi anche schema)

*L.monocytogenes* può essere presente in piccolo numero e spesso accompagnata da un numero elevato di specie differenti appartenenti allo stesso genere o di altri generi. Occorre pertanto un terreno selettivo che sia anche in grado di far sviluppare gli stipti di *L.monocytogenes* stressati. Il terreno di arricchimento primario selettivo con ridotta concentrazione di inibenti (Half Fraser) combina entrambe queste esigenze.

### 3 - Terreni di coltura e reagenti

- Half Fraser broth	n.	83
- Fraser broth	"	84
- Oxford agar	"	76
- Palcam agar	"	85
- Agar Triptone-soya-estratto di lievito (TSYEA)	"	77
- Brodo Triptone soya-estratto di lievito (TSYEB)	"	78
- Agar sangue II	"	79
- Brodo per l'utilizzazione degli idrati di carbonio	"	80
- Terreno per la mobilità	"	81
- Terreni e reagenti per il CAMP test	"	82

La prima fase consiste nell'inoculazione di un terreno di arricchimento primario contenente cloruro di litio e metà della concentrazione di acriflavina ed acido nalidixico (Half Fraser Broth) che è anche usato come diluente dell'aliquota del campione in esame, e nella sua incubazione a 30°C x 24 - 48 ore

La seconda fase consiste nella subcoltura dell'arricchimento primario in un terreno di arricchimento secondario a concentrazione intera di inibenti (Fraser Broth) e nella sua incubazione a 37°C x 24-48 ore.

Da entrambe le colture di arricchimento si eseguono isolamenti su due terreni solidi selettivi (Oxford agar e PALCAM Agar) che vengono incubati a 37°C x 24-48 ore ed esaminati per la presenza di colonie con caratteristiche presuntive di *L.monocytogenes*. Infine tali colonie vengono sottoposte ai test morfologici, fisiologici e biochimici di conferma.

#### 4 - Procedimento

##### *Arricchimento primario selettivo*

Aggiungere a 25 g di campione 225 ml di Half Fraser Broth (83).

Nel caso in cui il campione disponibile abbia un peso inferiore a 25 g, usare la quantità necessaria di terreno di arricchimento primario per arrivare alla diluizione di circa 1:10 (massa/volume).

Incubare a 30°C x 24 - 48 ore.

##### *Arricchimento secondario selettivo*

Seminare 0,1 ml della coltura di 24 ore di arricchimento primario in una provetta contenente 10 ml di terreno di arricchimento secondario (Fraser Broth, 84). Incubare per 24-48 ore a 37°C

##### *Isolamento ed Identificazione*

Eseguire sia dall'arricchimento primario che da quello secondario dopo 24 e 48 ore d'incubazione strisci multipli su Oxford Agar (76) e PALCAM Agar (85). Incubare le piastre capovolte a 37°C x 24-48 ore. E' preferibile incubare il PALCAM in microaerofilia (CO<sub>2</sub> 5-12%; O<sub>2</sub> 5-15%; N<sub>2</sub> 75%). Esaminare quindi le piastre per presenza di tipiche colonie di *Listeria* spp.

Su Oxford Agar le colonie tipiche si presentano dopo 24 ore di incubazione piccole (Ø circa 1- mm) , di color marrone scuro circondate da un alone nero. Dopo 48 ore le colonie sono nere di 2-3 mm, con alone nero e con una depressione centrale.

Esporre le piastre di PALCAM dopo incubazione all'aria per 1 ora, affinché raggiungano la propria colorazione da rosa a porpora. Le colonie tipiche di *Listeria* spp. si presentano verdi, piccole (Ø1,5-2 mm) a volte con centro nero ma sempre con alone nero.

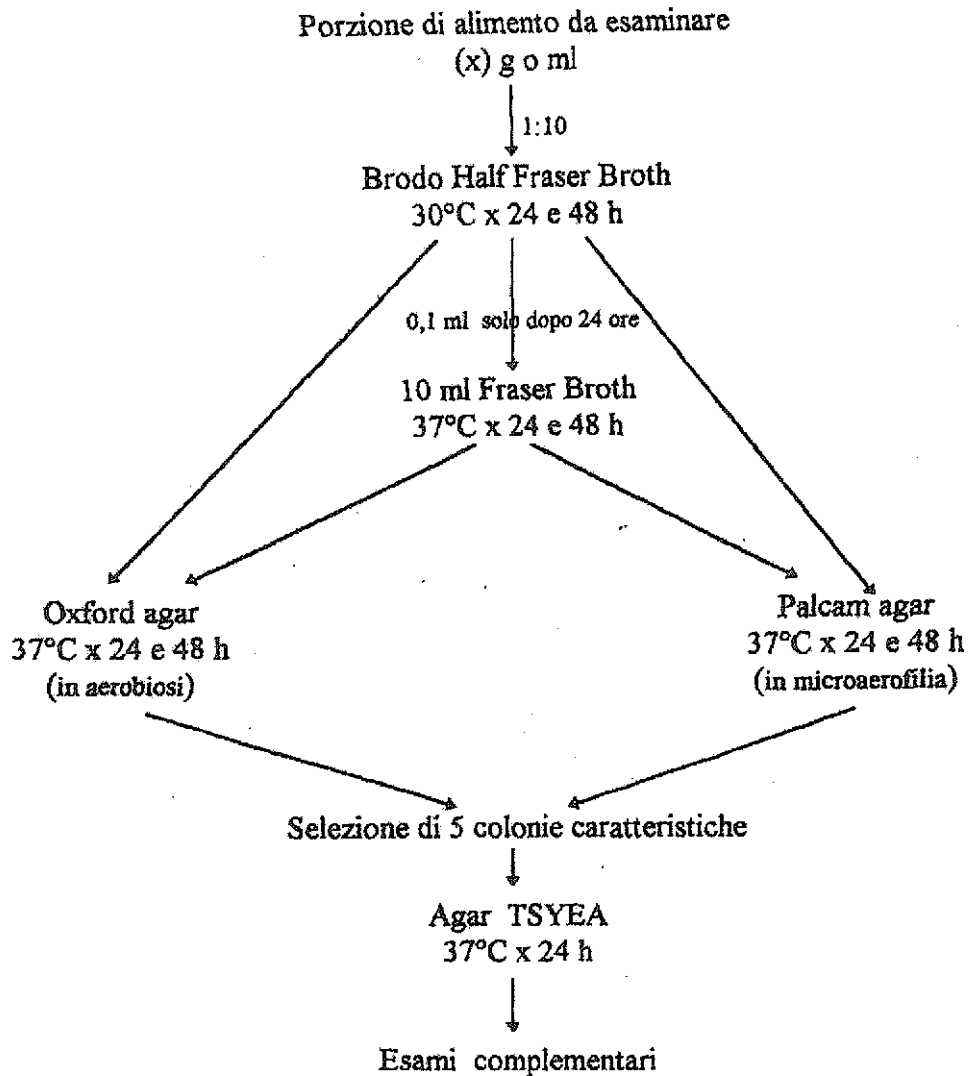
##### *Conferma*

Vedi metodo per la ricerca della *L.monocytogenes* nel latte e derivati.

#### 5 - Espressione dei risultati

In base all'interpretazione dei risultati riferire la presenza o assenza di *L.monocytogenes* alla aliquota di campione esaminata (25 g o ml) .





**Figura 9 - Diagramma sintetico di procedura per la ricerca di *Listeria monocytogenes* negli alimenti (eccettuato latte e derivati)**

## 21. Numerazione di *Listeria monocytogenes*

### 1 / 2 - Oggetto e campo d'applicazione

Metodo per la numerazione di *L.monocytogenes* negli alimenti (vedi anche O.M. 7-12-1993: Limiti di *L.monocytogenes* in alcuni prodotti alimentari) pubblicato sulla G.U. n.291 del 13-12-1993)

### 3 - Terreni di coltura e reagenti

- Acqua peptonata tamponata (APT)	n.	19
- Fraser broth	"	84
- Oxford agar	"	76
- Agar Triptone-soya-estratto di lievito (TSYEA)	"	77
- Brodo Triptone soya-estratto di lievito (TSYEB)	"	78
- Columbia Blood Agar	"	55
- Brodo per l'utilizzazione degli idrati di carbonio	"	80
- Terreno per la mobilità	"	81

### 4 - Procedimento (sintesi)

- Aggiungere 10 g del prodotto a 90 ml di Acqua peptonata tamponata (19)
- Omogeneizzare per 2-3'
- Allestire diluizioni scalari fino a  $10^{-3}$
- Seminare in triplice 1 ml delle diluizioni ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ ) in 9 ml di Fraser Broth (84)

N.B.: per i prodotti surgelati o comunque sottoposti a trattamento termico seminare in triplice 1 ml di ciascuna diluizione in 9 ml di TSB con lo 0.6% di estratto di lievito (78) e, dopo incubazione per 18-20 ore a 32° C, subcolturare 1 ml di ciascuna provetta in 9 ml di Fraser Broth.

- Incubare a 32° C per 24-48 ore
- Dalle brodocolture positive (viraggio del terreno verso il nero) prelevare un'ansata ed eseguire strisci su Oxford Agar (76)
- Incubare a 37° C per 24-48 ore
- Selezionare almeno 5 colonie caratteristiche (colonie brune circondate da alone scuro) e seminare in TSA con lo 0.6 % di estratto di lievito (77).
- Incubare a 37° C per 24 ore
- Sottoporre le colonie selezionate alla colorazione del Gram e al test della catalasi
- Seminare per infissione le colonie Gram positive e catalasi positive in piastre di Columbia Agar Base addizionato con il 5% di sangue di montone (55)
- Incubare a 37° C per 24 ore
- Seminare le colonie emolitiche in TSB addizionato con lo 0.6% di estratto di lievito (78)
- Incubare a 37° C per 24 ore
- Utilizzare le brodocolture per le seguenti prove:  
*fermentazione degli zuccheri* (mannitolo, ramnosio e xilosio): seminare un'ansata delle brodocolture nel terreno per la fermentazione degli zuccheri (80) ed incubare per 1-7 gg a 37° C

*mobilità*: seminare per infissione in terreno semisolido. Incubare a t.a. per 2-5 gg  
*test biologico*: Preparare 10 ml di brodocoltura di 24 ore contenente circa  $10^9$  cellule complessive e centrifugarla a circa 4000 rpm per 30 min.; lavare il sedimento, e risospenderlo in 1 ml di soluzione fisiologica. Inoculare 5 topini Swiss (16-18 g) per via intraperitoneale, ciascuno con 0.1 ml di sospensione. I ceppi patogeni uccidono i topi entro 5 giorni.

#### 5 - Espressione dei risultati

In base alle provette risultate positive, risalire al numero più probabile di *L.monocytogenes* in 1 g di alimento (vedi cap.1 par. 8)

## 22. Ricerca di *Vibrio parahaemolyticus* negli alimenti

### 1 - Oggetto e campo di applicazione

Metodo per la Ricerca di *Vibrio parahaemolyticus* negli alimenti.

### 2 - Principio del metodo

La ricerca di *V. parahaemolyticus* necessita di tre fasi:

- arricchimento in due brodi (SPB e GST o APA) a 35°-37°C per 6-8 ore
- isolamento in due terreni selettivi (TCBS e TSAT) a 35°-37°C per 18-24 o 48 ore a seconda del terreno per accertare la presenza di colonie riferibili a *V. parahaemolyticus*.
- identificazione e conferma mediante l'esecuzione di test biochimici sulle colonie selezionate.

### 3 - Terreni di coltura e reagenti

- Brodo Salt polymyxine B (SPB)	n.	86
- Brodo Saline-glucose-sodium duodecyl lauryl-sulfate (GSTB)	"	87
- Acqua Peptonata salina Alcalina (APA)	"	88
- Agar Tiosolfato-citrato-bile-saccarosio (TCBS)	"	89
- Agar trifeniltetrazolio cloruro soia triptone (TSAT)	"	90
- Agar nutritivo salino	"	91
- Triple sugar iron agar salino (TSI-S)	"	92
- Agar salino estratto di carne-lievito	"	93
- Terreno salino per la decarbossilazione della lisina	"	94
- reagenti per la determinazione dell'indolo	"	95
- reagenti per la determinazione dell'ossidasi	"	58
- reagenti per la ricerca della $\beta$ -galattosidasi	"	27

### 4 - Procedimento

#### *Arricchimento*

Eeguire le semine in due terreni di arricchimento.

- 25g di campione sono addizionati a 225 ml di Salt polymyxin B broth (SPB, 86) avendo cura di omogeneizzare la sospensione (mediante Stomacher o agitazione meccanica).
- 25g di campione sono addizionati a 225 ml di Brodo "saline glucose - sodio dodecyl lauryl sulfate" (GSTB, 87) o in Acqua peptonata alcalina (APA) avendo cura di omogeneizzare la sospensione (mediante Stomacher o agitazione meccanica).

Se la quantità di campione non è di 25 g usare la quantità di terreno necessario per ottenere una diluizione 10<sup>-1</sup>.

Incubare entrambi i terreni per 7-8 ore a 35°-37°C

**Isolamento**

Al fine di ottenere colonie isolate, prelevando ansate dal SPB e dal GSTB o APA, eseguire parallelamente strisci nei due terreni selettivi diversi (TCBS, 89; TSAT, 90)

Incubare le piastre di TCBS a 35-37°C x 18 ore

Incubare le piastre di TSAT a 35- 37°C x 20-24 ore.

Le colonie riferibili a *V.parahaemolyticus* si presentano come segue:

TCBS- di pochi mm di diametro (2-3) lisce e di color verde (saccarosio negative)

TSAT- di pochi mm di diametro (2-3), lisce, piatte, di colore rosso scuro (riduzione del cloruro di trifeniltetrazolio)

Se lo sviluppo delle colonie è lento, se la colorazione è debole, o in assenza di colonie caratteristiche, continuare l'incubazione fino a 24 ore per il TCBS e per 48 per il TSAT.

**Identificazione**

Prelevare da ogni piastra, ove disponibili, almeno 4 colonie caratteristiche (se sono meno di 5 utilizzarle tutte) ed effettuare subcolture, mediante striscio, in differenti piastre di Agar nutritivo salino (91) (incubare a 35°C-37°C x 18-24 ore).

Le colture pure in Agar nutritivo salino vengono adoperate per i test microbiologici e biochimici

**Test presuntivi****- Ossidasi**

Prelevare una porzione della colonia isolata e strisciarla su carta da filtro imbevuta del reagente per l'ossidasi (disponibili anche commercialmente).

Considerare il test negativo se il colore non cambia a violetto o blu scuro in 10 sec.

**- Esame microscopico**

Stemperare una colonia pura in soluzione salina . Prelevare una goccia e osservare al microscopio.

Inoculare una provetta di acqua peptonata salina alcalina. Incubare a 35°C-37°C e quindi esaminare la motilità.

**Prove biochimiche**

- Seminare per infissione e striscio in TSI-S agar a becco di clarino delle colonie sospette (saccarosio-negative, ossidasi-positive e positive al test di mobilità).

Incubare a 35- 37°C x 24 ore

Interpretare i cambiamenti del terreno come riportato nello schema:

Fondo	Giallo	Glucosio positivo (fermentazione del glucosio)
	Rosso o senza cambiamento di colore	Glucosio negativo (non fermenta il glucosio)
	Nero	Formazione di idrogeno solforato (H <sub>2</sub> S)
	bolle o rottura dell'agar	Formazione di gas dal glucosio
Superficie	Giallo	Lattosio o/e saccarosio positivo (uno o entrambi gli zuccheri utilizzati)
	Rosso o senza cambiamento di colore	Lattosio e saccarosio negativo (nessuno zucchero utilizzato)

In caso di positività per *V.parahaemolyticus* il becco di clarino apparirà rosso (lattosio e saccarosio negativo) e il fondo della provetta giallo (glucosio positivo) senza formazione di gas e senza annerimento (H<sub>2</sub>S negativo).

*- Determinazione del tipo respiratorio*

Inoculare mediante ago di platino una provetta di "Saline meat-yeast" agar sciolto in precedenza e non ancora solidificato. Raffreddare rapidamente in acqua e ghiaccio. Incubare per 24 ore a 35- 37°C.

Osservare la zona di crescita e determinare se il microrganismo è aerobio o anaerobio.

*- Ricerca della lisina decarbossilasi*

Inoculare appena al di sotto della superficie del brodo "Saline lysine decarboxylation". Incubare per 24 ore a 35°C - 37°C.

Un colore rosso dopo incubazione indica reazione positiva, un colore giallo indica reazione negativa.

*- Determinazione dell'indolo.*

Inoculare una provetta contenente il terreno "Saline tryptone/tryptophan". Incubare per 24 ore a 35°- 37°C.

Dopo l'incubazione aggiungere al terreno 1 ml di Kovacs.

La formazione di un anello rosso indica reazione positiva.

*- Ricerca della β-galattosidasi*

Sospendere un'ansata della coltura pura in una provetta contenente 0,25 ml di soluzione salina. Aggiungere una goccia di toluene ed agitare. Porre in bagno - maria a 37°C per pochi minuti. Aggiungere 0,25 ml del reagente per la determinazione della β-galattosidasi e mescolare. Porre in bagno - maria a 37°C per 24 ore ed osservare ad intervalli. Il riscontro di una colorazione gialla, che in genere apparirà dopo meno di 30 minuti, indica reazione positiva. L'assenza di colorazione indica reazione negativa.

**Interpretazione dei risultati**

*Vibrio parahaemolyticus* generalmente mostra le seguenti reazioni

Saccarosio	-
Ossidasi	+
Motilità	+
Glucosio	+
Formazione di gas dal glucosio	-
Lattosio	-
H <sub>2</sub> S	-
Crescita in aerobiosi o anaerobiosi	+
Decarbossilazione della lisina	+
Produzione di Indolo	+
β- galattosidasi	-

**5 - Espressione dei risultati**

Deve essere indicata la presenza o l'assenza di *V. parahaemolyticus* nell'aliquota di campione esaminata (in genere 25 g).

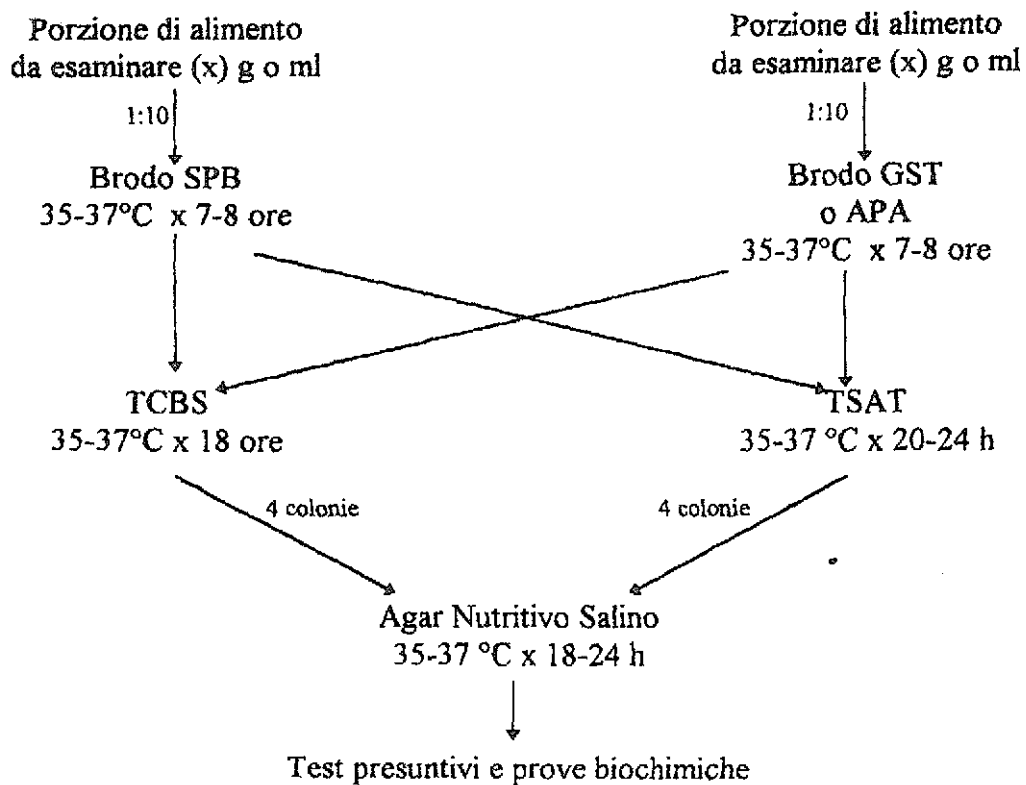


Figura 10 - Diagramma sintetico di procedura per la ricerca di *Vibrio parahaemolyticus* negli alimenti

## 23. Ricerca del *Vibrio cholerae*

---

### 1 - Oggetto e campo di applicazione

Metodo per la ricerca di *Vibrio cholerae* negli alimenti.

### 2 - Principio del metodo

Il metodo si articola in tre fasi:

La prima fase prevede l'arricchimento in due terreni liquidi (Acqua peptonata alcalina e GPSB) a 35°C per 6-8 ore.

La seconda fase consiste nell'isolamento in due terreni selettivi (TCBS e GPSA) a 35°C per 18-24 ore.

L'ultima fase riguarda l'identificazione e la conferma mediante l'esecuzione di test specifici sulle colonie selezionate.

Solo i tests di tipizzazione definitiva (sieroagglutinazione, tipizzazione fagica), permettono una diagnosi di certezza sulle specie microbiche isolate.

### 3 - Terreni di coltura, reagenti e sieri

- Acqua peptonata alcalina	n.	96
- Brodo Gelatina fosfato (GPSB)	"	97
- Agar Gelatina fosfato (GPSA)	"	98
- Agar Tiosolfato-citrato-bile-saccarosio (TCBS)	"	89
- Kligler agar	"	66
- Trypticase soy agar (TSA)	"	99
- Reagenti per il test dell'ossidasi	"	58
- Glucose agar	"	34
- Terreno per l'utilizzazione del mannitolo e dell'inositolo (Andrade's broth)	"	100
- Terreno per la decarbossilazione della lisina	"	26
- Terreno per la decarbossilazione dell'ornitina	"	67
- Terreno per l'arginina-diidrolasi	"	101
- Sieri polivalenti, sieri anti-Inaba e anti-Ogawa		

### 4 - Procedimento

#### *Campionamento*

Per qualsiasi tipo di prodotto da sottoporre ad analisi il campione da prelevare deve essere rappresentativo e comunque non inferiore a 200 g per aliquota

Nel caso di prodotti ittici, ogni campione sarà costituito da 5-10 individui nel caso di prodotti di media taglia e da 20- 50 individui nel caso di molluschi o pesci di piccola taglia.

Il campione deve essere mantenuto ad una temperatura di 2-4°C durante il trasporto in laboratorio e fino al momento dell'analisi che comunque dovrebbe essere fatta entro 6 ore.



**Preparazione del campione**

Nel caso dei molluschi ogni esemplare viene lavato esternamente con acqua distillata, quindi si apre sterilmente il guscio prelevando il corpo ed il liquido intervalvare.

Da ogni campione si prelevano 100 g di materiale che vengono sottoposti ad omogeneizzazione (prodotti come pesci e vegetali possono anche essere tagliati in piccoli pezzi)

**Arricchimento**

Pesare 25 g dell'omogeneizzato e seminarli in 225 ml di Acqua peptonata (96) (1% di peptone, 1% di NaCl, pH 8.4). Seminare ulteriori 25 g di omogeneizzato in 225 ml di GPSB (97).

Incubare entrambi i terreni a 35°C per 6-8 ore.

**Isolamento**

Prelevare un'ansata dalla superficie del liquido di ciascun brodo di arricchimento ed eseguire isolamenti per strisci multipli su piastre di TCBS (89) e di GPSA (98) agar. Incubare a 35°C per 18-24 ore.

Le colonie sospette di *V.cholerae* appaiono larghe da 2 a 3 mm, lisce, gialle a causa della fermentazione del saccarosio (ceppi lento-fermentanti possono apparire verdi), leggermente appiattite con centro opaco e periferia traslucida.

Le specie batteriche che possono interferire in questa fase sono: *V.alginolyticus*, *V.anguillarum*, *V.fluvialis*, *V.metschnikovii* e le specie di *Aeromonas*.

**Prove di conferma**

Trasferire le colonie sospette parallelamente su terreno agarizzato non selettivo quale il trypticase soia agar con 1% di NaCl (99) e in provette di Kliger Iron agar (66) mediante striscio ed infissione. Incubare a 35°C per 24 ore. Utilizzare le colture cresciute su TSA per l'esecuzione dei test biochimici e delle prove sierologiche.

Su Kliger le colture di *V.cholerae* provocano un viraggio acido (giallo) del fondo della provetta mentre la zona a becco di clarino rimane rossa senza produzione di gas né di H<sub>2</sub>S.

Altri test di conferma utili per l'identificazione presuntiva del *V.cholerae* sono:

**- String test**

Tutti i ceppi di *V.cholerae* sono positivi.

Emulsionare un'ansata prelevata dalla provetta di TSA agar in una goccia di soluzione salina allo 0,85% con lo 0,5% di sodio desossicolato. In circa 1 minuto si forma una massa gelatinosa. Immergendo e sollevando (per 2-3 cm) da essa un'ansa batteriologica mucosa si noterà la formazione di filamenti.

**- Sensibilità al vibriostatico 0/129.**

Dischetti sterili per antibiogramma (Ø 5-6 mm) vengono imbevuti con 0,03 ml di soluzione acquosa di 0/129 (2,4- diamino- 6,7 diisopropilpteridina fosfato 25 mg in 15 ml di H<sub>2</sub>O sterile) e posti ad asciugare in un essiccatore. Per facilitare l'operazione di imbibizione, si dispongono 100 dischetti in un contenitore di vetro addizionandovi 3 ml di soluzione, indi si provvede ad agitare fino ad assorbimento completo. I dischetti

da 50 µg di vibriostatico così ottenuti possono essere conservati a 4°C per 1 mese o più.

Si prepara una piastra di *Nutrient agar* cospargendola con un tampone con una brodocoltura di 2-3 ore del vibrione in esame. Dopo aver lasciato asciugare si depono un dischetto di vibriostatico e si incuba a 35°C per 12-18 ore.

*V. cholerae*, *V. vulnificus* e ceppi di *Plesiomonas shigelloides* vengono inibiti, mentre *V. parahaemolyticus*, *Aeromonas spp.*, *Pseudomonas spp.* e le *Enterobacteriaceae* risultano resistenti.

*V. cholerae* dovrebbe risultare inibito anche da dischetti dosati a 10 µg di vibriostatico.

### Prove di identificazione

*I test biochimici principali sono:*

Presenza Ossidasi	+	(100)
Utilizzazione Citrato	+	(74)
Utilizzazione D-mannitolo	+	(99.8)
Utilizzazione meso-inositolo	-	(0)
Decarbossilazione L-lisina	+	(100)
Decarbossilazione L-ornitina	+	(99.2)
Decarbossilazione L-Arginina	-	(0)

#### - Ossidasi

Prelevare una porzione della colonia isolata e strisciarla su carta da filtro imbevuta del reagente per l'ossidasi (58) (disponibili anche commercialmente).

Considerare il test negativo se il colore non cambia a violetto o blu scuro in 10 sec.

#### - Fermentazione del Glucosio

Dopo inoculazione del terreno (34) coprire con alcune gocce di olio minerale sterile. Incubare per 24 ore a 35°C. Esaminare ogni 24 ore per 4 giorni. *V. cholerae* darà reazione positiva (colorazione gialla) a questo test. Scartare tutte le colture negative a questo test.

#### - Produzione di acido dal mannitolo ed inositolo

Dopo inoculazione del terreno di Andrade (100) incubare a 35°C. Esaminare ogni 24 ore per 4 giorni. La reazione positiva è rilevata dalla produzione di acidità e conseguente viraggio del colore del terreno al giallo. *V. cholerae* darà reazione positiva al test per il mannitolo e negativa al test dell'inositolo. Le colture che daranno reazione negativa al solo mannitolo non devono essere comunque scartate.

#### - Lisina, ornitina e arginina decarbossilasi

Inoculare i tre terreni liquidi per la decarbossilazione (26, 67, 101) con un'ansata della coltura pura. Aggiungere alcune gocce di olio minerale sterile. Incubare per 24 ore a 35°C. Esaminare ogni 24 ore per 4 giorni. Un colore rosso porpora dopo incubazione indica reazione negativa, un colore giallo indica reazione positiva

*Reazioni biochimiche del V.cholerae*

Test o Substrato	Reazione Positiva	Reazione Negativa	<i>V. cholerae</i>
H <sub>2</sub> S (Kliger)	annerimento	mancanza di annerimento	-
Produzione di gas	sollevamento o rottura del terreno	mancanza di sollev. o rottura	-
Destrosio	giallo	porpora	+
Mannitolo	giallo	porpora	+
Inositolo	giallo	porpora	+
Decarbossilazione:			
Lisina	porpora	giallo	+
Arginina	porpora	giallo	-
Ornitina	porpora	giallo	+

Procedere alle prove biochimiche anche mediante sistemi diagnostici rapidi (tipo API 20 NE).

Eeguire le prove di agglutinazione mediante gli appositi sieri polivalenti ed una agglutinazione di conferma mediante i sieri anti-Inaba e anti-Ogawa. In caso di positività verranno eseguite la determinazione del biotipo e la tipizzazione fagica (*per tali ricerche i ceppi isolati potranno essere inviati ai Centri di Riferimento Nazionali per i germi patogeni enterici*).

La differenziazione del biotipo El Tor dai biotipi classici richiede le seguenti prove:

- sensibilità al fago IV di Mukerjee's (El Tor: resistente, classici: sensibili)
- sensibilità alla Polimixina B (El Tor: resistente, classici: sensibili)
- emolisi con emazie di montone all'1% (El Tor: emolitico)
- agglutinazione emazie di pollo (El Tor: agglutinante)
- reazione di Voges-Proskauer (VP) a 22°C (El Tor: positiva)

### 5 - Espressione dei risultati

In seguito all'interpretazione dei risultati si indichi la presenza o assenza di *V. cholerae* nell'aliquota di campione esaminata.

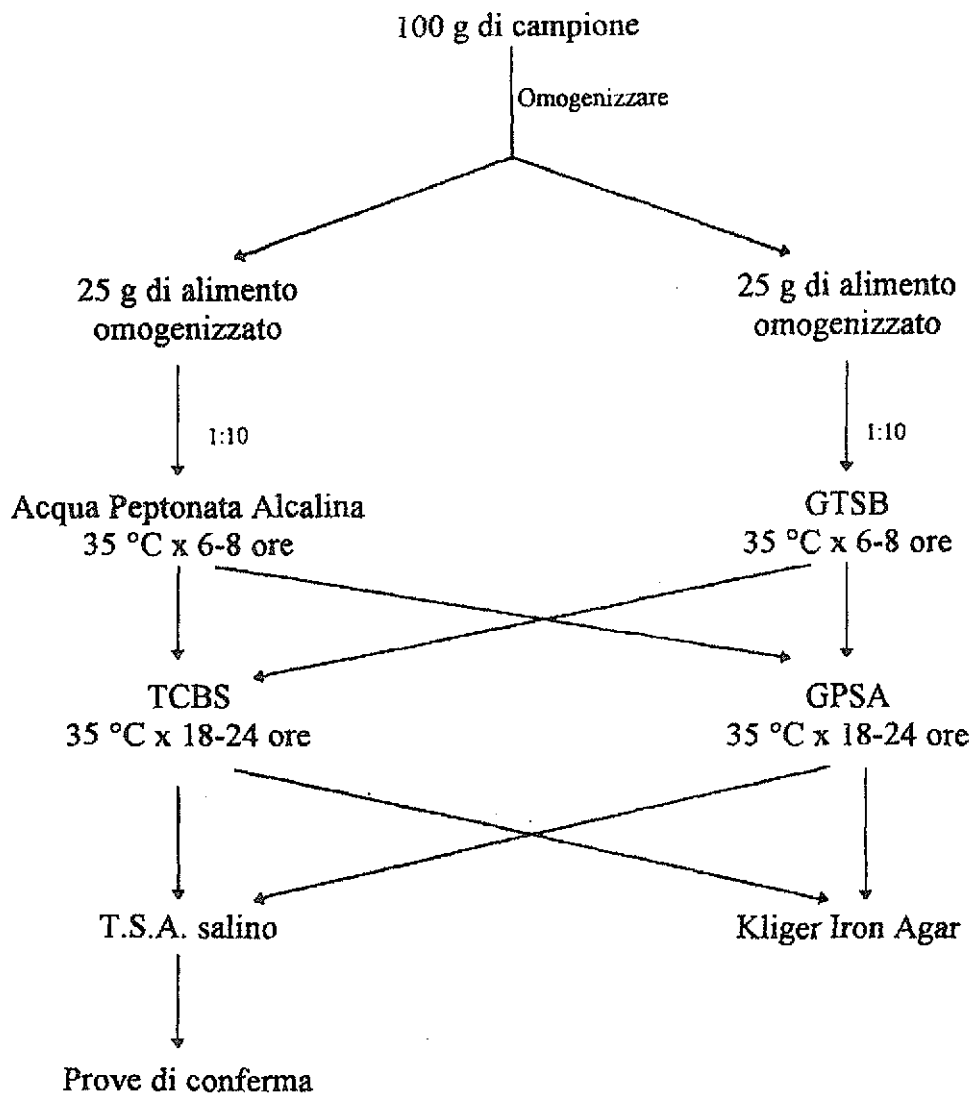


Figura 11 - Diagramma sintetico di procedura per la ricerca di *Vibrio cholerae* negli alimenti

## 24. Numerazione dei microrganismi caratteristici dello yogurt

### 1 - Oggetto e campo di applicazione

Metodo per la numerazione della microflora caratteristica dello yogurt, rappresentata dallo *Streptococcus thermophilus* (*Lactococcus thermophilus*) e dal *Lactobacillus bulgaricus* (*Lactobacillus delbrueckii* var. *bulgaricus*).

### 2 - Principio del metodo

La numerazione dello *S.thermophilus* e del *L.bulgaricus* viene effettuata separatamente in due specifici terreni di coltura selettivi solidi. La semina avviene per inclusione nella massa, di un volume definito del campione in esame e delle sue diluizioni. Per *L. bulgaricus* viene utilizzato il terreno MRS acidificato ed un'incubazione in anaerobiosi a 37 °C per 72 ore; mentre per *S. thermophilus* il terreno M17 ed un'incubazione a 37 °C per 48 ore. Il calcolo del numero dei due microrganismi per grammo di campione viene effettuato a partire dal numero di colonie sviluppatesi sulle piastre opportunamente scelte.

### 3 - Terreni di coltura e reagenti

- Terreno MRS acidificato	n.	102
- Terreno M17	"	103

### 4 - Procedimento

- Effettuare un esame microscopico del campione per valutare la quantità presuntiva dei due microrganismi nel campione in esame, al fine di determinare le diluizioni da saggiare.
- Prelevare asetticamente almeno 10 g del campione e diluirli in rapporto 1:10 usando la soluzione di Ringer ¼ o una soluzione polipeptonata 1‰ (vedi RGAM, par. G).
- Eseguire ulteriori diluizioni decimali fino a quella ritenuta presuntivamente utile per un adeguato conteggio.

#### Numerazione del *Lactobacillus bulgaricus*

- Allestire piastre di terreno MRS acidificato (102), secondo le procedure generali del conteggio dei microrganismi in piastra (tecnica della semina *pour plate*).
- Incubare in una giara per colture in anaerobiosi a 37°C per 72h.  
In questo terreno il *L. bulgaricus* forma caratteristiche colonie lenticolari, spesso a forma di stella, di 1-3 mm di grandezza. Osservare su fondo scuro.
- Confermare un'aliquota significativa delle colonie mediante esame morfologico microscopico, previa colorazione di Gram, ed esame della catalasi (bastoncelli Gram-positivi asporigeni, catalasi negativi).

#### Numerazione dello *Streptococcus thermophilus*

- Allestire piastre di terreno M17 (103), secondo le procedure generali del conteggio dei microrganismi in piastra (tecnica della semina *pour plate*).
- Incubare in anaerobiosi a 37°C per 48 ore.

In questo terreno lo *S. thermophilus* forma caratteristiche colonie lenticolari visibili dopo 18- 24 ore, che raggiungono un diametro di 1-2 mm di grandezza dopo 48 ore di incubazione. Osservare su fondo scuro.

- Confermare un'aliquota significativa delle colonie mediante esame morfologico microscopico, previa colorazione di Gram, e della catalasi (cocchi Gram-positivi disposti in brevi catene o a coppie, catalasi negativi).

Nota Bene: Sia nel caso del conteggio di *S. thermophilus* che del *L. bulgaricus* devono essere prese in considerazione solo le colonie di maggiori dimensioni, in caso di evidente dimorfismo delle stesse.

#### **5 - Espressione dei risultati**

Dopo l'incubazione procedere al rilevamento delle colonie, effettuando il conteggio secondo le norme generali della numerazione in terreno solido (vedi RGAM, par. H1.3).

## 25. Valutazione della stabilità e della contaminazione delle conserve

### 1 - Oggetto e campo di applicazione

Metodo per la valutazione della stabilità e della contaminazione delle conserve. Questo metodo può essere utilizzato per la valutazione di conserve aventi un pH > 4,5. Sono esclusi i prodotti lattiero-caseari.

Di norma in condizioni di stabilità si riscontra assenza di microrganismi vitali potenzialmente patogeni e di microrganismi saprofiti capaci di riprodursi alle comuni temperature di stoccaggio. Questi ultimi comunque sono in numero assai ridotto.

### 2 - Principio del metodo

Il metodo si basa sulla preincubazione dei contenitori prima dell'esame per 1-3 settimane a temperature di 30°C e 55 °C, sull'esame dei difetti esterni ed interni dei contenitori e sulla valutazione semiquantitativa dei microrganismi presenti nel prodotto mediante semina in appropriati terreni colturali.

### 3 - Terreni di coltura e reagenti

- Triptone soia brodo (TSB)	“	105
- Cooked Meat Medium Broth (CMM)	“	43
- Brodo di Sabouraud (SAB)	“	107

### 4 - Procedimento

#### *Preincubazione*

Conservare due contenitori a temperatura ambiente e porre dodici contenitori in termostato su carta da filtro, incubandone otto a 30°C per 21 gg e quattro a 55°C per 7 gg, esaminando giornalmente l'aspetto esteriore ed apprezzando eventuali fughe del contenuto. I contenitori bombati o con perdite vanno estratti in anticipo ed eventualmente esaminati per verificare la natura del difetto.

I tempi di preincubazione a 55°C variano in diversi metodi tra 5 e 10 gg, quelli a 30°-35°C da 10 a 30 gg

#### *Analisi*

- I contenitori devono essere preventivamente esaminati per evidenziare eventuali difetti esterni, i quali, se presenti vanno registrati. Le circostanze potranno consigliare un approfondimento delle analisi sui contenitori difettosi.
- In caso di assenza di difetti esterni, scegliere casualmente 2 contenitori preincubati a 30°C e 2 preincubati a 55°C, conservando i restanti a 4°C per eventuali ripetizioni dell'analisi.
- Le operazioni successive devono essere condotte in un ambiente particolarmente asettico, preferibilmente sotto cappa a flusso laminare, per evitare che eventuali risultati positivi possano essere riferibili a contaminazione intervenuta durante l'effettuazione dell'analisi.

- Detergere accuratamente i quattro contenitori scelti in precedenza utilizzando una soluzione detergente-disinfettante non infiammabile (ad esempio soluzione di esaclorofene al 3%) ed asciugarli successivamente con carta pulita. Sterilizzare la parte superiore dei contenitori (o comunque la zona destinata all'apertura) con una soluzione di ipoclorito di sodio (100 ppm di cloro) e asciugarla rapidamente al calore.
- Aprire i contenitori utilizzando, se necessario, un apriscatole sterile ed apprezzare la depressione interna o l'eventuale fuoriuscita di gas.
- Dalle scatole, preincubate e non, prelevare asepticamente con idoneo strumento sterile, preferibilmente utilizzando una pipetta di vetro tagliata, 10 g o ml di prodotto e diluirli in rapporto 1:10, 1:100 ed 1:1000. Effettuare, in duplice, la semina di 1 ml delle diluizioni ottenute in altrettante provette contenenti 9 ml di brodo triptone-soia (TSB, 105), 9 ml di Cooked Meat Medium Broth (CMM, 43\*) e 9 ml di brodo di Sabouraud (SAB, 107)

\* Terreni alternativi proposti sono il *Reinforced Clostridial Medium*, il *Fluid Thioglycollate medium*, il *Terreno di Brewer* al tioglicollato con indicatore. E' in ogni caso consigliabile adottare l'incubazione in giare per anaerobiosi.

Incubare il TSB e il CMM a 30°-37°C per 72 ore (il CMM in giara per anaerobiosi) e il SAB a 30°C per 72 ore, osservando giornalmente l'eventuale sviluppo di torbidità. I risultati debbono essere analoghi in entrambe le repliche per essere ritenuti significativi. Essi forniranno l'ordine di grandezza della quantità di germi vitali eventualmente presenti nella conserva (generalmente col prodotto non preincubato non si deve apprezzare sviluppo nelle colture inoculate con la diluizione 1:1000).

- A partire dai contenitori preincubati e non, misurare, il pH del contenuto ed allestire un vetrino (metodo per deposizione=liquidi o impronta diretta=solidi) colorato con Gram esaminando 10-20 campi microscopici (1000X) allo scopo di ottenere il conteggio medio dei microrganismi per campo.

Occorre prestare particolare attenzione a componenti non microbiche del prodotto che potrebbero essere confuse con microrganismi e considerare l'eventuale presenza di microrganismi tipici o addizionati al prodotto stesso.

- Descrivere i caratteri organolettici (limitatamente a colore, odore, consistenza).
- Valutare l'aspetto interno dei contenitori.

## 5 - Espressione dei risultati

Riportare i risultati come:

- presenza o assenza di difetti esterni o interni dei contenitori di presumibile origine fisica o microbiologica;
- presenza o assenza di apprezzabili quantità di gas nei contenitori;
- caratteri organolettici del contenuto;
- pH ed esame microscopico del contenuto;
- presenza o assenza di microrganismi vitali e, in caso di presenza, ordine di grandezza (*entità della contaminazione*);



- eventuali *difetti di stabilità* dovuti a scostamenti significativi dei risultati analitici ottenuti con i contenitori preincubati in rapporto a quelli ottenuti con i contenitori non preincubati.

Differenze di pH tra contenitori preincubati e non, superiori a 0,5 unità e/o conteggi medi batterici /campo microscopico superiori (nei preincubati) di almeno 10 volte, sono indice di insufficiente stabilità.