FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE E ZOOTECNICHE
BRESCIA

MICROBI E ALIMENTI

Maurizio Zavanella - Riccardo Muliari - Renzo Mioni - Mario D'Incau

EDITO A CURA DELLA
FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE
E ZOOTECNICHE - BRESCIA

70

MICROBI E ALIMENTI

Nella stessa collana sono stati pubblicati i seguenti volumi:

1 - 1979 Infezioni respiratorie del bovino
2 - 1980 L'oggi e il domani della sulfamidoterapia veterinaria
3 - 1980 Ormoni della riproduzione e Medicina Veterinaria
4 - 1980 Gli antibiotici nella pratica veterinaria
5 - 1981 La leucosi bovina enzootica
6 - 1981 La «Scuola per la Ricerca Scientifica» di Brescia
7 - 1982 Gli indicatori di Sanità Veterinaria nel Servizio Sanitario Nazionale
8 - 1982 Le elmintiasi nell'allevamento intensivo del bovino
9 - 1983 Zoonosi ed animali da compagnia
10 - 1983 Le infezioni da Escherichia coli degli animali
11 - 1983 Immunogenetica animale e immunopatologia veterinaria
12 - 1984 5° Congresso Nazionale Associazione Scientifica di Produzione Animale
13 - 1984 Il controllo delle affezioni respiratorie del cavallo
14 - 1984 1° Simposio Internazionale di Medicina veterinaria sul cavallo da competizione
15 - 1985 La malattia di Aujeszky. Attualità e prospettive di profilassi nell'allevamento suino
16 - 1986 Immunologia comparata della malattia neoplastica
17 - 1986 6° Congresso Nazionale Associazione Scientifica di Produzione Animale
18 - 1987 Embryo transfer oggi: problemi biologici e tecnici aperti e prospettive
19 - 1987 Coniglicoltura: tecniche di gestione, ecopatologia e *marketing*
20 - 1988 Trentennale della Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche di Brescia, 1956-1986
21 - 1989 Le infezioni erpetiche del bovino e del suino
22 - 1989 Nuove frontiere della diagnostica nelle scienze veterinarie
23 - 1989 La rabbia silvestre: risultati e prospettive della vaccinazione orale in Europa
24 - 1989 Chick Anemia ed infezioni enteriche virali nei volatili
25 - 1990 Mappaggio del genoma bovino
26 - 1990 Riproduzione nella specie suina
27 - 1990 La nube di Chernobyl sul territorio bresciano
28 - 1991 Le immunodeficienze da retrovirus e le encefalopatie spongiformi
29 - 1991 La sindrome chetosica nel bovino
30 - 1991 Atti del convegno annuale del gruppo di lavoro delle regioni alpine per la profilassi delle mastiti
31 - 1991 Allevamento delle piccole specie
32 - 1992 Gestione e protezione del patrimonio faunistico
33 - 1992 Allevamento e malattie del visone
34 - 1993 Atti del XIX Meeting annuale della S.I.P.A.S., e del Convegno su Malattie dismetaboliche del suino
35 - 1993 Stato dell'arte delle ricerche italiane nel settore delle biotecnologie applicate alle scienze veterinarie e zootecniche - Atti 1a conferenza nazionale
36 - 1993 Argomenti di patologia veterinaria
37 - 1994 Stato dell'arte delle ricerche italiane sul settore delle biotecnologie applicate alle scienze veterinarie e zootecniche
38 - 1995 Atti del XIX corso in patologia suina e tecnica dell'allevamento
39 - 1995 Quale bioetica in campo animale? Le frontiere dell'ingegneria genetica

40 - 1996 Principi e metodi di tossicologia in vitro
41 - 1996 Diagnostica istologica dei tumori degli animali
42 - 1998 Umanesimo ed animalismo
43 - 1998 Atti del Convegno scientifico sulle enteropatie del coniglio
44 - 1998 Lezioni di citologia diagnostica veterinaria
45 - 2000 Metodi di analisi microbiologica degli alimenti
46 - 2000 Animali, terapia dell'anima
47 - 2001 Quarantacinquesimo della Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche di Brescia, 1955- 2000
48 - 2001 Atti III Convegno Nazionale di Storia della Medicina Veterinaria
49 - 2001 Tipizzare le salmonelle
50 - 2002 Atti della giornata di studio in cardiologia veterinaria
51 - 2002 La valutazione del benessere nella specie bovina
52 - 2003 La ipofertilità della bovina da latte
53 - 2003 Il benessere dei suini e delle bovine da latte: punti critici e valutazione in allevamento
54 - 2003 Proceedings of the 37th international congress of the ISAE
55 - 2004 Riproduzione e benessere in coniglicoltura: recenti acquisizioni scientifiche e trasferibilità in campo
56 - 2004 Guida alla diagnosi necroscopica in patologia suina
57 - 2004 Atti del XXVII corso in patologia suina e tecnica dell'allevamento
58 - 2005 Piccola storia della Medicina Veterinaria raccontata dai francobolli
59 - 2005 IV Congresso Italiano di Storia della Medicina Veterinaria
60 - 2005 Atti del XXVIII corso in patologia suina e tecnica dell'allevamento
61 - 2006 Atlante di patologia cardiovascolare degli animali da reddito
62 - 2006 50° Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche di Brescia, 1955- 2005
63 - 2006 Guida alla diagnosi necroscopica in patologia del coniglio
64 - 2006 Atti del XXIX corso in patologia suina e tecnica dell'allevamento
65 - 2006 Proceedings of the 2nd International Equitation Science Symposium
66 - 2007 Piccola storia della Medicina Veterinaria raccontata dai francobolli - II edizione
67 - 2007 Il benessere degli animali da reddito: quale e come valutarlo
68 - 2007 Proceedings of the 6th International Veterinary Behaviour Meeting
69 - 2007 Atti del XXX corso in patologia suina

NOTE BIOGRAFICHE DEGLI AUTORI

MAURIZIO ZAVANELLA,
laureato a Padova in Scienze Biologiche, ha lavorato dal 1966 al 1998 a Brescia, nella sede centrale dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna. Ha diretto il Dipartimento di Batteriologia, avviando nel 1972 il Reparto di Microbiologia degli Alimenti.

RICCARDO MULIARI,
è laureato in Medicina Veterinaria. Lavora come Dirigente Veterinario presso la Sezione Territoriale di Verona dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie, dove ricopre il ruolo di Responsabile del Laboratorio Controllo Alimenti.
Si occupa, inoltre, di diagnostica anatomo-patologica e batteriologica delle malattie animali ed ha l'incarico di Assicuratore della qualità della Sezione di Verona.

RENZO MIONI,
si è laureato in Scienze Biologiche all'Università di Padova nel 1976.
Attualmente ha assunto l'incarico di Direttore della SCI – Struttura Complessa di Microbiologia Alimentare presso l'Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie di Legnaro (Padova).

MARIO D'INCAU,
ha 44 anni e lavora a Brescia nel Reparto di Batteriologia Specializzata dell'Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia-Romagna "Bruno Ubertini", dove si occupa prevalentemente di argomenti relativi alle infezioni da batteri enteropatogeni e all'antibiotico-resistenza.
Nello stesso Istituto ha lavorato, in qualità prima di borsista e poi di contrattista, alla Sezione Diagnostica e nel Reparto di Microbiologia degli Alimenti della sede di Brescia.
È stato inoltre veterinario aziendale dei centri di produzione suinicola Goland e veterinario ufficiale dell'Azienda U.L.S.S. di Chioggia (VE) dove ha ricoperto, tra gli altri, l'incarico di ispettore nel locale mercato ittico.

FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE E ZOOTECNICHE
- BRESCIA -

MICROBI E ALIMENTI

MAURIZIO ZAVANELLA
Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche - Brescia

RICCARDO MULIARI
Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie - Verona

RENZO MIONI
Istituto Zooprofilattico Sperimentale delle Venezie - Padova

MARIO D'INCAU
Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia - Brescia

EDITO A CURA DELLA
FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE
E ZOOTECNICHE - BRESCIA
Via A. Bianchi, 1 - 25124 Brescia

ISBN 978-88-902814-4-0

© Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche - Brescia, febbraio 2008

Tipografia Camuna - Brescia 2008

PREFAZIONE

Sette anni fa veniva pubblicato un manuale, intitolato "Metodi per l'analisi microbiologica degli alimenti", edito a cura della Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche di Brescia.

Il quaderno, recante il numero progressivo 45, conteneva una raccolta di metodiche di laboratorio, selezionate dall'Autore sulla base dei requisiti di semplicità, economia ed affidabilità.

Rapidamente esaurite le copie disponibili, si è ritenuto di fare cosa utile predisponendo una nuova edizione, che appare ampliata notevolmente nella parte informativa generale ed ovviamente riveduta, a distanza di tempo, sulla parte tecnica di laboratorio.

Preme far notare la comparsa di "cenni storici" all'interno di ogni argomento. Una novità con la quale si è voluto ricordare al lettore l'apporto recato da numerosissimi Autori al progresso delle scienze diagnostiche riguardanti l'igiene degli alimenti e le malattie trasmissibili con gli stessi.

Questo manuale è, ancora una volta, dedicato soprattutto ai giovani che frequentano le Scuole di Specializzazione Universitaria, i Corsi di Diploma Universitario per Tecnici di Laboratorio Biomedico, le Scuole di Istruzione Superiore per Tecnici di Laboratorio.

Un settore d'istruzione in cui ben figura la Fondazione di Brescia con le sue Scuole di Specializzazione triennale post-universitaria ed i suoi Corsi annuali di Perfezionamento.

Il nuovo quaderno, che verrà in seguito introdotto nel sito Internet *www.fondiz.it*, potrà essere inoltre d'aiuto a quanti operano nel settore del controllo degli alimenti, sia in forma istituzionale (Zooprofilattici, ARPA, Università, ASL) che nell'espletamento obbligatorio dell'autocontrollo aziendale ai sensi delle disposizioni comunitarie recentemente rinnovate.

Brescia, febbraio 2008

Il Segretario della Fondazione
Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche
di Brescia
Dr. Stefano Capretti

INDICE

CAPITOLO 1 - Introduzione
Requisiti attesi in un alimento ... 1
Origine dei rischi alimentari ... 3
La microbiologia e lo studio delle malattie legate agli alimenti ... 4
Classificazione funzionale delle sostanze alimentari di maggior diffusione ... 5
Microrganismi normalmente presenti negli alimenti ... 6
Carni fresche e congelate ... 7
Carni comunque preparate ... 8
Prodotti ittici ... 9
Prodotti di gastronomia ... 10
Latte ... 10
Derivati fermentati e non fermentati del latte ... 11
Uova e ovoprodotti ... 12
Prodotti di pasticceria ... 13
Miele ... 13
Paste alimentari ... 14
Acqua potabile ... 14
Acque minerali e altre bevande ... 14
Vegetali e frutta ... 14
Semiconserve ... 15
Conserve ... 15
Prodotti della IV gamma ... 15
Cause di modificazione della flora batterica e di deterioramento degli alimenti ... 16
Alcuni dati orientativi sulle cariche microbiche in prodotti alimentari e mangimi ... 23
Microrganismi patogeni e loro distribuzione preferenziale negli alimenti ... 33
Principali agenti eziologici di malattie infettive legate ad alimenti ... 36
Tossinfezione da *Salmonella* ... 37
Tossinfezione da *Shigella* ... 37
Malattie da *Escherichia coli* ... 38
Tossinfezioni da *Yersinia enterocolitica* ... 38
Tossinfezioni da *Vibrio cholerae* ... 39
Tossinfezioni da vibrioni alofili ... 39
Tossinfezioni da *Aeromonas* e *Plesiomonas* ... 39
Tossinfezioni da *Campylobacter jejuni* e *C. coli* ... 39
Intossicazione da *Clostridium botulinum* ... 40
Intossicazione da *Clostridium perfringens* ... 40
Tossinfezioni da *Bacillus cereus* ... 41
Intossicazione da *Staphylococcus aureus* ... 41
Infezioni da *Listeria monocytogenes* ... 42
Infezioni da *Brucella* ... 42
Intossicazioni alimentari provocate da tossine diverse ... 42
Diagnosi presuntiva di malattia di origine alimentare ... 44
Ricerche batteriologiche nei casi di intossicazione o tossinfezione alimentare ... 47
Alcune osservazioni sui limiti delle attuali metodologie analitiche ... 49

CAPITOLO 2 - Gestione dei campioni per le analisi microbiologiche
Cenni storici sulle principali disposizioni legislative in Italia ... 53
I nuovi orientamenti introdotti dalla recente normativa europea ... 56

CAPITOLO 3 - Analisi batteriologiche su alimenti
Preparazione del campione per le analisi ... 63
Ricerche batteriologiche più indicate per le varie categorie di alimenti ... 65

CAPITOLO 4 - Prove tipicamente qualitative
Salmonella ... 69
Shigella ... 75
Listeria monocytogenes - Ricerca qualitativa ... 77
Vibrioni ... 84
Vibrio cholerae O1 e O139 ... 84
Vibrio parahaemolyticus e vibrioni correlati ... 86
Campylobacter jejuni e *coli* ... 91
Yersinia enterocolitica ... 95
Brucella ... 99
Escherichia coli O157:H7 ... 102
Clostridium botulinum ... 108

CAPITOLO 5 - Prove tipicamente quantitative
Conta batterica totale ... 111
Conta batterica totale mesofila ... 112
Metodo della conta standard in piastra *(Pour Plate Method)* ... 112
Metodo della semina in superficie *(Surface Spread Plate)* ... 115
Metodo *Drop Plate* (Micrometodo) ... 116
Conta batterica totale psicrofila ... 117
Conta batterica totale termofila ... 118
Conta dei batteri termodurici ... 118
Conta dei batteri alofili ... 118
Conta dei batteri lipolitici ... 119
Enterobacteriaceae ... 122
Coliformi ... 124
Escherichia coli ... 128
Streptococchi fecali ... 132
Lattobacilli ... 135
Stafilococchi coagulasi-positivi ... 139
Micrococchi ... 143
Anaerobi solfito-riduttori (spore) ... 145
Clostridium perfringens ... 149
Bacillus cereus ... 154
Pseudomonas aeruginosa ... 158
Aeromonas hydrophila ... 161
Brochothrix thermosphacta ... 165
Listeria monocytogenes ... 167
Metodo MPN ... 167
Metodo della piastratura diretta ... 169
Salmonella ... 171
Miceti (muffe e lieviti) ... 173

CAPITOLO 6 - Ricerca delle tossine batteriche
Dimostrazione delle tossine batteriche ... 175
Ricerca della tossina ST di *Escherichia coli* ... 176
Ricerca della tossina LT di *Escherichia coli* ... 176
Ricerca delle verotossine (Shiga tossine) di *Escherichia coli* ... 177
Ricerca delle tossine prodotte da *Staphylococcus aureus* ... 177
Ricerca delle tossine prodotte da *Clostridium perfringens* ... 179
Ricerca delle tossine prodotte da *Clostridium botulinum* ... 180
Ricerca delle tossine prodotte da *Vibrio cholerae* ... 181
Ricerca delle tossine prodotte da *Bacillus cereus* ... 182
Ricerca delle endotossine di germi Gram-negativi ... 182
Altre tossine legate a batteri: le biotossine marine ... 183
Altre tossine ... 186
Diagnosi di laboratorio delle tossine marine ... 186

CAPITOLO 7 - Controllo microbiologico di produzione nelle aziende alimentari
Determinazione del *p*H e dell'attività dell'acqua ... 189
Sostanze inibenti ... 191
Metodo con *Bacillus subtilis* ... 192
Metodo con *Bacillus stearothermophilus var.calidolactis* ... 194
Sterilità delle conserve in scatola ... 197
Controlli su ambienti di lavorazione degli alimenti ... 199
Analisi quantitative ... 199
Esame dell'aria ambiente ... 199
Esame dell'acqua ... 199
Esame delle superfici di lavorazione ... 201
Analisi qualitative ... 202
Controlli eseguibili sulla superficie dei prodotti ... 203
La qualità microbiologica ... 206

CAPITOLO 8 - Normativa sugli alimenti dal punto di vista microbiologico
Regolamento (CE) 2073/2005 ... 213
Norme di legge precedenti il Regolamento (CE) 2073/2005 ... 241
Norme i cui prodotti non sono contemplati dal Regolamento (CE) 2073/2005 ... 244

CAPITOLO 9 - Alcuni cenni sui metodi non convenzionali
Test di tipo fisico-chimico ... 245
Test di tipo immunologico ... 247
Test di natura genetica ... 248
Esempi applicativi ... 251
Commenti sul futuro dei metodi non tradizionali ... 252

APPENDICE
Composizione di terreni, soluzioni e reattivi ... 257
Protocollo operativo consigliato per lo smaltimento dei rifiuti in laboratorio ... 281
Tabella MPN ... 281
I metodi ISO ... 282

CAP. 1
Introduzione

REQUISITI ATTESI IN UN ALIMENTO

L'alimentazione ha da sempre rappresentato un problema fondamentale per la sopravvivenza e lo sviluppo dell'uomo. Gli alimenti costituiscono infatti la fonte dell'energia e dei principi nutritivi necessari alla crescita e allo sviluppo dell'organismo, il quale ha bisogno di una varietà di nutrienti energetici (carboidrati, grassi e proteine) e non energetici (fondamentalmente vitamine e sali minerali).

La scelta di quali alimenti consumare è la risultante di un complesso sistema di relazioni causali e di interrelazioni con fattori economici, demografici e sociali. In particolare, nella distribuzione dei livelli di consumo intervengono soprattutto il livello di reddito, la struttura della popolazione e l'insieme delle tradizioni culturali, degli usi, delle abitudini e delle credenze religiose delle diverse popolazioni. Nei paesi maggiormente sviluppati, ad esempio, la proporzione di calorie derivanti da alimenti di origine animale registra attualmente valori superiori al 20% delle calorie totali della dieta, a fronte di valori attestantisi attorno al 7% tipici dei paesi in via di sviluppo.

A prescindere dalle differenze riscontabili, è tuttavia certo che il prerequisito indispensabile di ogni prodotto alimentare è rappresentato dall'essere sicuro. ***Sicurezza*** significa che l'alimento deve essere esente dai rischi di provocare danni alla salute del consumatore.

Una volta soddisfatto il prerequisito della sicurezza, non è facile semplificare cosa il pubblico si aspetti dal cibo che sceglie, vista l'evoluzione delle abitudini e le fluttuazioni della consumazione. L'insieme delle caratteristiche di volta in volta ricercate negli alimenti contribuisce a definire la loro ***qualità***, intesa come la capacità di essere adatti agli usi e alle funzioni cui sono destinati e per i quali sono stati scelti, garantendo la piena soddisfazione degli utilizzatori. Certamente, la ricerca di una *qualità organolettica* nell'alimentazione resta un'esigenza primordiale, probabilmente perché inizialmente suggerita dai sensi, e costituisce il centro delle attese per la formulazione di un giudizio. La qualità, evidentemente, è un concetto del tutto relativo e ampiamente variabile, a seconda delle diverse utilizzazioni degli alimenti e sulla base delle multiformi influenze di carattere culturale e di vere e proprie mode più o meno razionali.

La *qualità microbiologica* è una parte delle molteplici aspettative in fatto di alimentazione e si concentra su due aspetti essenziali:

- l'assenza di rischio per la salute pubblica causato dalla presenza nell'alimento di microrganismi patogeni e/o delle loro tossine;
- l'assenza per tutte le persone coinvolte nelle fasi di produzione, distribuzione e consumazione di alimenti di rischi derivanti dallo sviluppo di microrganismi saprofiti responsabili di alterazioni e deterioramenti e, conseguentemente, di perdita di sostanza alimentare.

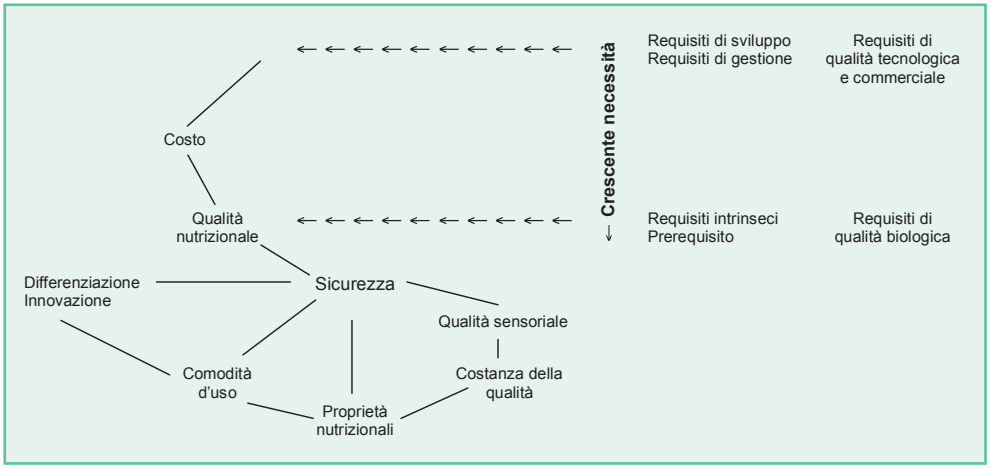
L'assenza di rischi per la salute equivale al concetto, già espresso, di sicurezza, che, come schematizzato nella Figura 1, si situa in posizione centrale rispetto al complicato flusso dei requisiti alimentari attesi.

Come ha scritto Mossel nel 1972, nessuna attività umana è priva di rischio, compresa l'azione del bere e del mangiare. Secondo questo Autore, per assenza di rischio nell'alimentazione bisogna intendere *"il più basso livello di rischio ragionevolmente realizzabile che si può raggiungere e mantenere con un intervento appropriato"*. Da questo punto di vista, il rischio microbiologico è particolarmente insidioso e, come ha affermato Jouve nel 1990, non può essere mantenuto al più basso livello possibile se non a prezzo di una lotta incessante, i cui risultati non sono mai definitivi.

Non c'è da meravigliarsi se il rischio microbiologico, fra tutti quelli associati all'alimentazione, viene identificato dagli esperti scientifici come il più preoccupante. È tuttavia curioso il fatto che questo tipo di pericolo non venga percepito in maniera altrettanto grave dal grande pubblico. Alcune inchieste hanno rivelato infatti che, nell'opinione comune, i rischi maggiori in fatto di alimentazione corrisponderebbero ai pericoli *chimici* (pesticidi e inquinamento), seguiti dai rischi *nutrizionali* (colesterolo, obesità) e dal problema delle *frodi*.

Il rischio microbiologico è catalogato all'ultimo posto, per cui sembra verosimile che il grande pubblico tema maggiormente altri pericoli, probabilmente influenzato dal loro carattere spettacolare.

Figura 1. Requisiti attesi in un alimento



ORIGINE DEI RISCHI ALIMENTARI

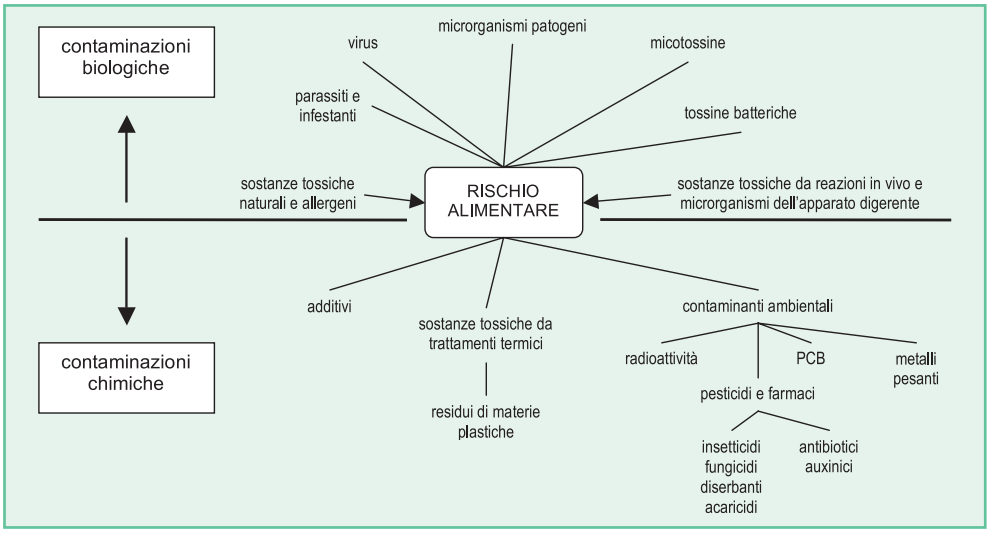
Un alimento è considerato pericoloso per la salute quando contiene agenti fisici, chimici o biologici che possono arrecare danno a chi lo consuma. Nella assoluta maggioranza dei casi, le malattie trasmesse con il consumo di alimenti sono classificabili come intossicazioni (avvelenamenti) o come infezioni. Le prime si verificano per ingestione di prodotti alimentari che contengono preformate sostanze tossiche, le quali possono essere:

- presenti naturalmente nei tessuti di alcune specie animali o vegetali dalle quali originano gli alimenti (animali o piante velenosi);
- prodotte e rilasciate da microrganismi che abbiano avuto modo di contaminare l'alimento e di moltiplicarvisi (tossine batteriche, fungine, algali);
- presenti negli ambienti di produzione, trasformazione, preparazione, conservazione e trasporto degli alimenti ed entrate accidentalmente in contatto con gli alimenti stessi (intossicazioni da elementi e composti chimici).

Le infezioni di origine alimentare sono causate dal consumo di alimenti contaminati con organismi patogeni. La maggior parte degli alimenti ospita una popolazione microbica naturale che può accrescersi durante i processi di trasformazione e conservazione cui vengono sottoposti gli alimenti stessi, oppure può aumentare per effetto della contaminazione atmosferica o di quella derivante dal contatto con utensili, animali e uomini. La presenza di questi microrganismi può far variare semplicemente le caratteristiche organolettiche dell'alimento, oppure può determinare lo sviluppo di agenti patogeni, rendendo quindi l'alimento pericoloso per il consumatore.

Gli agenti patogeni possono esplicare la loro azione attraverso la produzione *in vivo* di tossine (si tratta, per lo più, di enterotossine che vengono prodotte nell'intestino), oppure in virtù della loro capacità di invadere la mucosa intestinale e, eventualmente, di superarla e di raggiungere altri tessuti e organi (infezioni invasive).

Nello schema seguente si vuole far notare come il rischio microbiologico occupi gran parte dello spazio riservato ai pericoli di natura biologica, perché interessa batteri, miceti, virus, parassiti unicellulari e un gran numero di sostanze tossiche prodotte dai medesimi agenti, peraltro spesso non ancora ben conosciute.



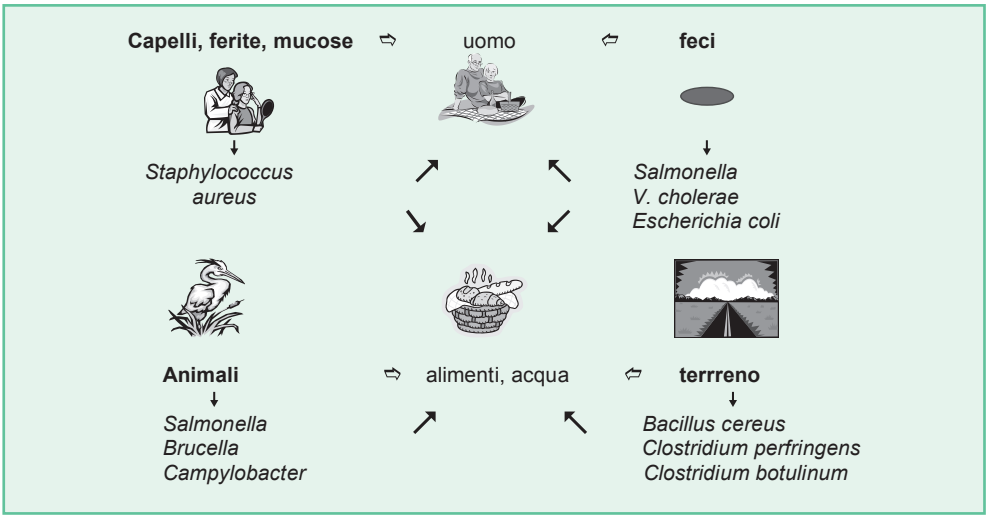
LA MICROBIOLOGIA E LO STUDIO DELLE MALATTIE LEGATE AGLI ALIMENTI

La microbiologia è l'unica scienza efficace per studiare la diffusione delle malattie veicolate da alimenti. Gran parte dell'epidemiologia relativa alle patologie gastro-intestinali è stata costruita sulla base delle indagini condotte con il supporto delle analisi microbiologiche e la diagnostica di laboratorio.

La microbiologia applicata al settore alimentare ha conosciuto uno sviluppo notevolissimo nel corso degli ultimi due secoli. Il suo campo di indagine principale riguarda essenzialmente lo studio delle specie microbiche presenti nelle diverse tipologie di alimenti, con l'intento di individuarne la provenienza e analizzarne il comportamento durante i differenti processi di trasformazione e conservazione cui vengono sottoposti gli alimenti. Rientrano in questo ambito anche le ricerche volte a sviluppare e mettere a punto le modalità e le tecniche più appropriate per ottenere un controllo o una riduzione più o meno spinta del numero di microrganismi inizialmente presenti in un alimento, allo scopo principale di prolungarne il più possibile la conservazione.

La microbiologia degli alimenti pone inoltre particolare attenzione allo studio di determinati gruppi microbici, la cui presenza negli alimenti può determinare l'insorgenza nell'uomo di sindromi morbose comunemente conosciute con il termine di tossinfezioni alimentari. Di questi microrganismi è importante studiare non solo le caratteristiche di sopravvivenza e moltiplicazione nelle diverse matrici alimentari, ma anche l'epidemiologia delle malattie che essi sostengono, al fine di individuare con precisione le associazioni tra il verificarsi di determinati eventi e circostanze e il rischio di trasmissione di tali malattie attraverso gli alimenti.

Lo schema seguente offre un esempio delle complesse relazioni fra animali, ambiente, alimenti e l'uomo, in relazione alle malattie che vedono come protagonisti alcuni alimenti.



CLASSIFICAZIONE FUNZIONALE DELLE SOSTANZE ALIMENTARI DI MAGGIOR DIFFUSIONE

Sono state elaborate molte tabelle circa la suddivisione in gruppi degli alimenti destinati all'uomo. Nel testo sarà tenuto presente il tipo di classificazione che segue.

GRUPPI FUNZIONALI	ESEMPI DI ALCUNI PRODOTTI DEL GRUPPO
1. CARNI FRESCHE DI BOVINO, SUINO, EQUINO, OVINO, CONIGLIO (commercializzate refrigerate o congelate)	Muscolatura (sotto forma di carcasse, mezzene, quarti e tagli anatomici) e visceri edibili interi
2. CARNI MACINATE (o ridotte in pezzi inferiori a 100 grammi)	Carne trita, pezzi di carne disossata e frazionata, visceri ridotti in pezzi
3. POLLAME IN GENERE (volatili interi o divisi in parti)	Soggetti allevati venduti interi o porzionati (petti, ali, cosce) costituiti da polli, tacchini, faraone, anatre, quaglie, struzzi
4. SELVAGGINA	Carni di animali non d'allevamento (cacciagione comprendente uccelli, lepri, cinghiali e altri selvatici)
5. CARNI PREPARATE (prodotti di salumeria o insaccati)	Prodotti venduti: - freschi (salsiccia, cotechino, zampone) - stagionati (prosciutto crudo, *speck*, salame) - cotti (prosciutto cotto, mortadella, *wurstel*, insaccati precotti e confezionati)
6. PESCE FRESCO (refrigerato o congelato)	Pesce intero sotto pelle Tranci, filetti Pesce affumicato
7. MOLLUSCHI E CROSTACEI	Freschi Precotti
8. LATTE E DERIVATI	Latte pasteurizzato, UHT e sterilizzato Panna pasteurizzata Burro *Yogurt* e dessert a base di latte Formaggi Latte in polvere Gelati
9. PASTE ALIMENTARI	
10. UOVA E DERIVATI	Uova da consumo Creme e maionese
11. PREPARAZIONI GASTRONOMICHE	Crude (insalate russe, spiedini, arrotolati) Cotte (piatti pronti da riscaldare)
12. VEGETALI E FRUTTA	
13. PRODOTTI DELLA IV GAMMA	Vegetali conservati in atmosfera modificata
14. CONSERVE STERILIZZATE	

MICRORGANISMI NORMALMENTE PRESENTI NEGLI ALIMENTI

L'igienista e il microbiologo, in particolare, devono conoscere la localizzazione *normale* dei germi presenti sopra o dentro le diverse tipologie di alimenti. Ogni valutazione successiva di contaminazione, infatti, non può esistere senza la nozione qualitativa e, soprattutto, quantitativa dei microrganismi che normalmente colonizzano ciò che mangiamo.

Batteri Gram-negativi	aerobi	*Acetobacter, Acinetobacter, Brucella, Flavobacterium, Moraxella, Pseudomonas, Xantomonas*
	microaerofili	*Campylobacter*
	anaerobi facoltativi	*E.coli, Klebsiella, Proteus, Salmonella, Shigella, Serratia, Yersinia, Vibrio, Plesiomonas, Aeromonas*
Batteri Gram-positivi	aerobi facoltativi	*Brochothrix, Listeria*
	anaerobi aerotolleranti	*Lactobacillus*
Cocchi Gram-positivi	aerobi	*Micrococcus*
	microaerofili aerobi	*Aerococcus*
	anaerobi facoltativi	*Staphylococcus*
	anaerobi aerotolleranti	*Streptococcus, Pediococcus, Leuconostoc, Enterococcus, Lactococcus*
	anaerobi	*Sarcina*
Batteri corineformi	aerobi	*Corynebacterium, Brevibacterium, Mycobacterium*
	anaerobi facoltativi	*Propionibacterium*
	anaerobi	*Bifidobacterium*
Batteri Gram-positivi sporigeni	aerobi/anaerobi facoltativi	*Bacillus cereus*
Batteri appartenenti a gruppi particolari	anaerobi	*Clostridium (perfringens, botulinum)*
	aerobi	*Halococcus, Halobacterium*
	ospiti cellulari obbligati	*Rickettsie (Coxiella burnetii*)

Non si può tracciare, a tutt'oggi, una mappa sistematica dei microrganismi presenti nei vari alimenti. Dalle informazioni frammentarie pubblicate nei vari lavori scientifici emerge tuttavia un blando tentativo di dare organicità alla materia.

Almeno per dimostrare l'esistenza di un principio d'interesse sul problema, vengono riportati alcuni esempi. In essi, si fa menzione di germi ospiti abituali degli alimenti, i ***saprofiti***, e di altri germi che compaiono sulla scena in un secondo tempo, accompagnati dalla comparsa di alterazioni organolettiche, chiamati "deterioranti". Oltre a questi, si nominano i microrganismi ***potenzialmente patogeni***, pericolosi per la salute. Si accenna, infine, a batteri che svolgono un'azione benefica, aiutando a salvare dal degrado alcuni alimenti deperibili.

Questa rapida trattazione non pretende assolutamente di essere una disamina esaustiva della materia. È da accettare piuttosto nella veste di un riassunto.

CARNI FRESCHE E CONGELATE

Si sa che, *in vivo*, il *p*H del muscolo è pressoché neutro (circa 7,2) e che, dopo la macellazione, esso scende a valori compresi tra 5,3 e 5,8 per azione enzimatica sul glicogeno, che viene trasformato in acido lattico. La frollatura in frigorifero a -1/+2°C si completa in 10-14 giorni per le carni bovine e in 2-4 giorni per quelle suine. In questo periodo, diminuiscono di quantità i germi Gram-negativi, sostituiti da Gram-positivi microaerofili, specialmente lattobacilli e *Brochothrix thermosphacta.*

La contaminazione superficiale di una carcassa bovina può raggiungere valori di 10^3-10^5 germi aerobi mesofili per cm^2, di cui un centinaio circa sono rappresentati da coliformi e da psicrofili. La velocità di moltiplicazione dei germi sulla superficie delle carni è abbastanza elevata. Per esempio, a +8 °C *Escherichia coli* si quadruplica in 48 ore. La stessa evoluzione della flora batterica si manifesta, seppure ritardata, nelle carni poste **sotto vuoto**, in cui prevalgono *Carnobacterium* e *Brochothrix thermosphacta*, o nelle carni confezionate **in atmosfera modificata.**

La carne è un terreno ideale per i germi. Dopo la macellazione, deve essere trattata con precauzioni igieniche e rapidamente raffreddata, "a cuore", sotto i +4 °C (entro 10-16 ore nei suini, 15-24 ore nei bovini). La conservazione dovrebbe avvenire a temperature comprese tra -1 e +2°C. L'interno del muscolo di un animale appena macellato è di norma sterile e, tutt'al più, può possedere da 1 a 10 germi per 100 grammi di carne (enterobatteri, *Clostridium perfringens*). Con il prolungarsi del periodo di conservazione, la carica microbica totale (CBT) della carne può arrivare fino a 10^6 germi/grammo senza apprezzabili variazioni organolettiche. Si manifesta la comparsa dell'odore sgradevole quando la CBT supera 10^7 germi/grammo, mentre, con 10^8 germi/grammo, si nota la formazione di mucillagine superficiale.

Sono maggiormente sensibili alla proliferazione batterica le carni in pezzi, tritate, disossate meccanicamente, in quanto, oltre a una superficie esposta maggiore, subiscono una serie di manipolazioni. In particolare, la **carne trita**, presentando una superficie esposta maggiore, va incontro a un aumento rapidissimo della carica microbica, tanto che la sua durata è da considerare limitata a un giorno in frigorifero da 0 a +2°C.

Le alterazioni organolettiche legate alla proliferazione batterica si producono, inizialmente, in superficie, ad opera di germi Gram-negativi, come *Pseudomonas fluorescens, Acinetobacter, Alcaligenes, Moraxella, Serratia, Citrobacter, Proteus*, e Gram-positivi, come *Staphylococcus* e *Bacillus. S*uccessivamente, l'azione si sposta in profondità, per invasione di germi Gram-positivi, come *Clostridium perfringens, Clostridium hystolyticum, Clostridium sporogenes, Enterococcus, Bacillus*, e, in minore misura, Gram-negativi, tra cui il genere *Proteus*. Le carni ovine presentano una percentuale maggiore di *Clostridium perfringens* in profondità.

Le carni di animali eccessivamente affaticati e stressati prima della macellazione (denominate DFD, da *dark*, *firm*, *dry*, cioè scure, dure, secche) sono soggette ad alterazioni precoci, dovute allo sviluppo di batteri lattici, *Serratia, Brochothrix thermosphacta.* Sono soggette a degradazione precoce anche le carni di suino che perdono colore e consistenza, diventando essudative (carni denominate PSE, da *pale*, *soft*, *exudative*, cioè pallide, molli, essudative).

Sulle **carni congelate** sfuse si possono produrre macchie bianche, scure o azzurre, dovute allo sviluppo di muffe dei generi *Penicillium, Cladosporium, Sporotrichum.* I lieviti possono essere presenti con i generi *Trichosporon*, *Candida* e *Rhodotorula*. La contaminazione da miceti (muffe e lieviti) si manifesta quando l'umidità ambientale è ridotta o quando l'animale è stato trattato con antibiotici. Nelle carni si osserva raramente, perché le muffe sono sopraffatte dai batteri aerobi, che possiedono una maggiore velocità di moltiplicazione.

Le carni rosse non danno grossi problemi dal punto di vista sanitario, se vengano consumate ben cotte. Solo nel caso di insufficiente trattamento termico, si presenta, infatti, il rischio di so-

pravvivenza di salmonelle, stafilococchi, clostridi ed *E. coli* enterotossici. I pericoli sanitari sono però tendenzialmente limitati alla cottura degli *hamburger* e alla preparazione di alcuni piatti tipici a base di carni bovine o equine che vengono tradizionalmente consumati crudi o poco cotti.

Nel **pollame** vivo, la contaminazione microbica proviene dalla lettiera, dall'acqua e dal mangime ed è concentrata in superficie. Nell'animale macellato, essa è la conseguenza diretta dell'igiene di macellazione e può raggiungere, sulla pelle, concentrazioni pari a 10^5 germi per cm^2 di superficie. I principali microrganismi sono rappresentati da *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Corynebacterium* ed enterobatteriacee.

Nelle fasi di deterioramento microbico, si apprezza, sulla carcassa o sui tagli anatomici, la formazione di una viscosità superficiale, seguita dalla comparsa di odore sgradevole e, infine, da aspetto mucillaginoso della carne. I germi più largamente coinvolti nei fenomeni di deterioramento del pollame sono *Pseudomonas*, *Shewanella putrefaciens*, *Acinetobacter* e *Moraxella*.

I microrganismi patogeni che più frequentemente contaminano le carni di pollo (e del pollame in genere) sono *Salmonella*, *Staphylococcus aureus*, *Clostridium perfringens*, *Campylobacter jejuni*, *Yersinia enterocolitica*.

CARNI COMUNQUE PREPARATE

La preparazione dei prodotti genericamente chiamati salumi o insaccati inizia con la triturazione di tessuto muscolare magro e di lardo. A questo stadio, la flora è composta da enterobatteri, micrococchi, lattobacilli, *Pseudomonas*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens*, *Brochothrix thermosphacta* e muffe (*Penicillium*, *Aspergillus*).

La conservazione prolungata degli insaccati viene ottenuta con la salatura. In pratica, si aggiunge sodio cloruro al 2,4-3% (che ha la funzione di abbassare l'A_w a 0,96-0,95) e nitrati oppure addirittura nitriti (fino a 150 mg/kg), che servono a mantenere il colore rosso vivo della carne, a frenare l'ossidazione dei grassi e a favorire la selezione di lattobacilli e micrococchi, utili per la maturazione del prodotto finito. L'aggiunta di nitrati ha anche l'importante funzione di impedire la moltiplicazione di *Clostridium botulinum.*

L'aggiunta di droghe, un'ulteriore riduzione di A_w ottenuta durante la stagionatura, le modificazioni della flora microbica che avvengono nel corso della maturazione della carne (con abbassamento del *p*H, eventualmente favorito dall'aggiunta di zucchero), la cottura o l'affumicamento completano la serie degli interventi conservativi che precludono lo sviluppo delle specie microbiche indesiderate.

Nella preparazione industriale dei **salami stagionati,** vengono normalmente impiegati *starter* microbici (*Micrococcus, Staphylococcus carnosus e xylosus, Pediococcus, Lactobacillus* delle specie *plantarum, pentosus, sakei, curvatus*), oltre a lieviti per la formazione di aromi particolari e muffe (*Penicillium chrysogenum e nalgiovense*) per la formazione dello strato superficiale bianco. I germi aggiunti hanno la capacità di favorire la conservazione dei salami per antagonismo con la flora originale della carne, di creare l'aroma tipico di questi prodotti e di migliorarne il colore. I micrococchi, in particolare, hanno funzioni proteolitiche e lipolitiche, riducono i nitrati a nitriti e producono la catalasi, che annulla la tossicità dell'acqua ossigenata formata dai batteri.

I lattobacilli e i micrococchi si moltiplicano rapidamente nell'impasto di carne per la produzione dei salami e sostituiscono le *Enterobacteriaceae* durante le 4-8 settimane necessarie per ottenere la stagionatura in condizioni decrescenti di temperatura, che passa gradualmente da 20 a 13 °C, e umidità, che viene portata dal 90 all'80%.

Dopo pochi giorni dall'inizio della stagionatura, i lattobacilli raggiungono concentrazioni elevatissime (anche 10^8/grammo), operano la fermentazione lattica dei carboidrati, abbassano

il *p*H a 4,9-5,3 e favoriscono le modificazioni della struttura proteica dell'impasto, stabilizzando microbiologicamente il prodotto. Al termine della stagionatura, gli insaccati possono presentare valori di A_w di 0,90-0,80 e di *p*H di 5,7-5,9.

Nella preparazione dei **prosciutti crudi**, con le eccezioni dei prosciutti di Parma e di San Daniele, vengono impiegate salamoie contenenti sodio cloruro al 20%, nitrati, nitriti, acido ascorbico, polifosfati, zucchero. Nel corso di tali trattamenti, che possono durare da pochi giorni fino a 2 mesi a temperatura inferiore a +5 °C, la flora microbica è composta, prevalentemente, da lattobacilli, micrococchi, vibrioni alofili, lieviti, *Enterococcus*, alcuni Gram-negativi. Dopo una fase di asciugatura, che può durare anche un mese, subentra la fase di stagionatura, della durata variabile da nove mesi a due anni, durante la quale la A_w si riduce fino a valori di 0,96.

Nella produzione del **prosciutto cotto**, il trattamento termico consente di raggiungere una temperatura di circa 68 °C. A ciò fa seguito un rapido raffreddamento a -1 °C. Al termine della lavorazione, possono sopravvivere quasi esclusivamente batteri Gram-negativi e streptococchi.

Nella produzione della **mortadella**, preparata con carne suina, bovina, polvere di latte, sale, nitrato, nitrito, spezie, fosfati, il trattamento termico viene effettuato a 78 °C per 16-18 ore. Al termine, la A_w finale si stabilizza su valori di 0,95-0,94. In queste condizioni, possono sopravvivere, ma solo al centro della massa, lattobacilli, streptococchi fecali, bacilli Gram-positivi e alcuni germi Gram-negativi.

Negli **insaccati crudi**, freschi e stagionati, i germi maggiormente responsabili di alterazioni sono rappresentati dagli enterobatteri (che provocano putrefazione interna e sviluppo di gas), dagli stafilococchi, dai lattobacilli eterofermentanti e dalle muffe (che danno alterazioni superficiali del budello).

Nei prosciutti crudi, le alterazioni possono derivare da moltiplicazione, in prossimità dell'osso, di enterobatteri (*Proteus, Serratia, Citrobacter, Enterobacter*), i quali, se in concentrazione superiore a 10^6 per grammo, provocano putrefazione e formazione di idrogeno solforato, e di clostridi.

I germi patogeni, presenti occasionalmente nelle carni lavorate sopra citate, sono teoricamente parecchi, ma, in base alle frequenze d'isolamento, si possono restringere a salmonelle (nelle salsicce fresche) e a stafilococchi, salmonelle, listerie (negli insaccati stagionati). Statisticamente, è ormai assodato che hanno rilevanza le tossinfezioni da salmonelle veicolate da salsicce fresche, perché queste vengono spesso consumate dopo sommaria cottura, che non bonifica l'interno del prodotto.

PRODOTTI ITTICI

Il **pesce** è soggetto a una rapida moltiplicazione batterica, in quanto la sua carne ha un *p*H quasi neutro, un alto contenuto d'acqua libera (A_w 0,98-0,99) e molte sostanze nutrienti solubili.

La flora batterica normale è costituita, principalmente, da Gram-negativi e *Pseudomonas*, la cui presenza, oltre a processi di alterazione organolettica e di degradazione del prodotto, può comportare la produzione di sostanze tossiche (istamina), soprattutto nei pesci ricchi di istidina (sgombri, tonno).

L'alterazione del pesce è primariamente dovuta a *Shewanella putrefaciens e Pseudomonas fluorescens.* Altri germi dannosi per la conservazione sono rappresentati da *Moraxella, Acinetobacter, Bacillus, Halococcus, Halobacterium e Halomonas.* I fenomeni alterativi sono particolarmente spiccati nei salmoni, nelle aringhe e negli sgombri, dove i lipidi vengono prontamente attaccati dai batteri con rapido irrancidimento.

I batteri demoliscono le proteine, con formazione di ammoniaca, acido solfidrico, indolo e ammine dall'odore sgradevole (trimetilammina), già a partire da 10^6 germi per grammo. Nei molluschi, la proliferazione batterica provoca fermentazione del glicogeno con abbassamento del *p*H.

In alcuni paesi, come il Giappone, il consumo di pesce crudo comporta il rischio di tossinfezioni da *Vibrio parahaemolyticus* e altri vibrioni alofili similari (*alginolyticus, fluvialis, hollisae, mimicus, metschnikovii*). Altri patogeni veicolati dal pesce sono *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum* tipo E*, Erysipelothrix insidiosa*, *Edwardsiella tarda*, *Shigella*, *Vibrio cholerae.*

Nei **crostacei** (gamberi, granchi, aragoste) e nei **molluschi** (cozze, ostriche, seppie, calamari), possono essere presenti salmonelle, shigelle, *Vibrio cholerae* e *Vibrio parahaemolyticus.*

Naturalmente, la contaminazione microbica dei prodotti ittici dipende, in primo luogo, dal livello di inquinamento e dalla temperatura dei bacini di pesca. Uno degli esempi più clamorosi dell'influsso ambientale sulla salubrità del pescato è fornito dal fenomeno dell'accumulo nei tessuti dei pesci di biotossine marine, conseguenza dell'eutrofizzazione dei mari in estate. Le biotossine marine, sintetizzate da microalghe planctoniche e bentoniche e da alcuni batteri, possono causare mortalità nei pesci e intossicazioni nell'uomo, rappresentate da sindromi neurotossiche (PSP, NSP, ASP) e sindromi gastro-intestinali (DSP).

PRODOTTI DI GASTRONOMIA

I prodotti di gastronomia costituiscono un raggruppamento molto eterogeneo di prodotti alimentari, accumunati dal fatto di subire una manipolazione spinta ed elaborata prima di essere pronti per il consumo. Spesso, inoltre, i singoli prodotti finiti derivano da una mescolanza di più ingredienti (materie prime) di diversa natura. Sono alimenti frequentemente ricchi di germi, apportati dalle materie prime e dalla preparazione fatta spesso in situazioni ambientali disagevoli e in condizioni igieniche precarie (mancanza di spazio, mescolanza di ingredienti crudi e cotti, manipolazione). Le insalate russe, le insalate capricciose, le salse a base di uova, il vitello tonnato contengono una lista di microrganismi fin troppo lunga da riportare. Certamente, stafilococchi, clostridi, salmonelle, listerie e *Campylobacter* vi primeggiano.

LATTE

Nel **latte crudo** alla raccolta, si possono trovare germi di derivazione ambientale o provenienti da una contaminazione di origine fecale, tra cui micrococchi, stafilococchi, corinebatteri, bacilli Gram-negativi (*Pseudomonas, Enterobacteriaceae*), lattobacilli, *Bacillaceae*, bacilli Gram-positivi, clostridi, lieviti e muffe. Il latte può essere contaminato anche da germi patogeni, quali *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis, Brucella abortus*, *Brucella melitensis, Streptococcus agalactiae* (germe responsabile della mastite contagiosa bovina*), Staphylococcus aureus, Salmonella, Campylobacter jejuni.* Fortunatamente, i trattamenti termici di pasteurizzazione o di riscaldamento ad elevate temperature (latte UHT) hanno drasticamente ridotto questi rischi.

DERIVATI FERMENTATI E NON FERMENTATI DEL LATTE

Latti fermentati

Nati anticamente per preservare il latte dalla degradazione microbica, i prodotti a base di latte fermentato sono diventati generi alimentari di valore probiotico e dietetico. Si ottengono da latte bovino, ovino, caprino o bufalino per aggiunta di microrganismi diversi.

Le specie di microrganismi utilizzate condizionano la tipologia di latte fermentato prodotto. Nella produzione del *buttermilch*, vengono impiegati batteri mesofili (*Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*). Si utilizzano batteri termofili (*Streptococcus thermophilus*, Lactobacillus bulgaricus) nella produzione dello yogurt classico e batteri di origine intestinale (*Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*) in quella di alcune varietà particolari di *yogurt*. Gli *starter* lattici e alcuni generi di lieviti (*Saccharomyces*, *Kluyveromyces*, *Candida*, *Torulopsis*) vengono impiegati nella fabbricazione del *kefir* e del *koumiss*. Alcune muffe, infine, (*Geotrichum candidum*) trovano impiego nella produzione del vilii.

Il prodotto commercialmente più diffuso è lo *yogurt*, preparato mediante fermentazione del latte (che deve risultare privo di residui di antibiotici) condotta a temperatura elevata (42- 45 °C) e per tempi brevi (2-3 ore). Lo *yogurt* è caratterizzato da valori di *p*H di 4,2-4,3 e da un contenuto elevato di germi (maggiore di 10^8/grammo).

Il deterioramento dello *yogurt* è infrequente e può essere attribuito a inquinamento da coliformi o da lieviti acido-tolleranti, oppure da muffe.

Episodi di intossicazione da patogeni sono pure rari, anche se sono stati descritti casi sostenuti da *Listeria monocytogenes*.

Formaggi

Nelle produzioni di caseificio, il latte crudo viene quasi sempre sottoposto a un preventivo trattamento di pasteurizzazione, per distruggere la flora patogena in esso eventualmente presente. Fanno eccezione solo alcuni tipi di formaggi tipici, che vengono preparati con latte crudo o con latte misto.

La successiva caseificazione comporta una disidratazione, per cui il grasso e la caseina del latte (intero, scremato, presente come crema o panna) vengono concentrati da 6 a 12 volte. Nella pratica, il processo di caseificazione può svolgersi con modalità diverse. Esso può infatti consistere in una acidificazione del latte per ottenerne la coagulazione (cagliata) mediante l'aggiunta di caglio o presame (procedimento seguito nella fabbricazione della maggior parte dei formaggi), in una acidificazione diretta a *p*H 4,6 (solo per formaggi tipo *cottage*), in una acidificazione con riscaldamento a 80-90 °C (nei formaggi tipo *quark*), nell'impiego di batteri lattici *starter* (metodo industriale attualmente preferito).

La cagliata, dopo separazione dal siero, viene riscaldata (cottura), pressata, salata, posta in forme a maturare (stagionatura). Durante questo periodo, ogni tipo di formaggio acquista struttura e aroma caratteristici, grazie a una serie di reazioni biochimiche operate su caseina, grassi, lattosio dagli enzimi endogeni del latte, dei microrganismi *starter* o dal caglio.

L'impiego di colture microbiche *starter* garantisce una fermentazione del lattosio (con produzione di acido lattico) controllata e uniforme, per cui si possono standardizzare le caratteristiche del formaggio che si vuol ottenere. Gli *starter* possono contenere una o più specie microbiche di batteri mesofili (*Lactococcus lactis*, *Leuconostoc mesenteroides*, come avviene per i formaggi freschi) o di batteri termofili (*Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus helveticus* e *bulgaricus*, usati, ad esempio, nei formaggi grana, pecorino, provolone, mozzarella). Esistono anche *starter* "secondari", che conferiscono a particolari prodotti aspetto o sapore tipici. Si tratta di muffe utilizzate nella produzione di formaggi a crosta fiorita tipo *Camembert*

o *Brie* (*Penicillium camembertii*, *Geotrichum candidum*) o in quella di formaggi erborinati tipo Gorgonzola e *Roquefort* (*Penicillium roqueforti*).

Altri batteri servono a produrre occhiature nell'*Emmenthal* e nel *Gruyère* (*Propionibacterium shermani*), oppure a dare l'aspetto della crosta lavata color giallo-arancione nei formaggi *Munster* e *Beaufort* (*Brevibacterium linens*).

La ricerca ha portato ad introdurre nella fabbricazione di alcuni formaggi anche dei lieviti, che colonizzano l'esterno delle forme, favorendo la maturazione (*Debaromyces*, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces*). Oggi si usano anche batteri lattici non-*starter*, che, moltiplicandosi attivamente, abbreviano la fase di stagionatura e conferiscono un sapore più intenso (*Lactobacillus*, *Pediococcus*).

A causa di germi saprofiti presenti nel latte crudo o in seguito a errori di lavorazione del formaggio, si possono manifestare alterazioni, caratterizzate dalla comparsa di sapore amaro e rancidità (*Pseudomonas*), o dalla insorgenza di rigonfiamenti precoci dovuti a insufficiente acidificazione e a sviluppo di *Klebsiella aerogenes* o di coliformi. I rigonfiamenti più temuti sono però quelli tardivi, provocati da clostridi termodurici *(Clostridium tyrobutyricum).* Le spore dei clostridi, portate nel latte dagli insilati, riescono a sopravvivere alla pastorizzazione e, vegetando, producono gas e acido butirrico. Le alterazioni superficiali della crosta sono invece spesso causate dallo sviluppo di muffe (*Penicillium*, *Aspergillus*, *Cladosporium*, *Alternaria*).

I microrganismi patogeni che possono trovarsi nei formaggi (soprattutto in quelli a pasta molle) sono rappresentati da *Staphylococcus aureus*, da alcuni ceppi di *Escherichia coli* enteroemorragici (come quelli appartenenti al gruppo O157:H7), da *Salmonella*, da *Listeria monocytogenes*.

Burro

La panna riscaldata viene inoculata con una miscela acidificante di *Streptococcus cremoris, Streptococcus lactis, Leuconostoc cremoris.* Albergano nel burro i germi di affioramento della panna di latte (ottenuta per affioramento oppure dopo centrifugazione), tra i quali enterobatteri, muffe, lieviti.

Gelati

Contengono normalmente in proporzioni prevalenti la flora lattica del latte pasteurizzato, col quale è formata la base. Il gelato non confezionato può essere talvolta inquinato da coliformi, *Salmonella, Staphylococcus aureus e Listeria monocytogenes.* I batteri giungono sul prodotto per contaminazione secondaria, attraverso le mani o la saliva del personale che li manipola. La situazione microbiologica è di solito migliore nei gelati di produzione industriale rispetto a quelli artigianali.

Latte in polvere per la prima infanzia

Ottenuto da latte bovino di qualità, deve ovviamente contenere un numero estremamente basso di contaminanti.

UOVA E OVOPRODOTTI

Le **uova** possono essere contaminate soprattutto a livello del guscio, dove la carica batterica, rappresentata prevalentemente da Gram-positivi (*Staphylococcus* spp. e *Bacillus* spp.) e da Gram-negativi di origine enterica, può raggiungere valori compresi tra 10^2 e 10^7 per cm^2.

Tra i batteri Gram-negativi, si possono accidentalmente rinvenire le salmonelle. Internamente, e solo in caso di trasmissione verticale dall'ovaio, le uova da consumo possono contenere *Pseudomonas* ed *Enterobacteriaceae*, tra cui *Salmonella gallinarum, Salmonella enteritidis* e pochi altri sierotipi. Nel caso delle salmonelle, tuttavia, diverse statistiche hanno evidenziato come questa via di trasmissione comporti una prevalenza di contaminazione scarsa e una concentrazione di salmonelle all'interno delle uova costantemente esigua. La prevalenza negli allevamenti considerati infetti da *Salmonella enteritidis* sarebbe, nel periodo di deposizione, solamente di 1 uovo su 15.000.

Il problema delle tossinfezioni da *Salmonella* riferibili al consumo di uova deriva soprattutto dalla cattiva abitudine di non conservare le uova a temperature di refrigerazione. Nella maggior parte delle tessinfezioni salmonellari, comunque, sono coinvolti soprattutto i **prodotti derivati** dalle uova (creme crude, salse, maionese, tiramisù), i quali possono contenere un elevato numero di salmonelle in seguito al mancato rispetto delle buone pratiche di preparazione e di conservazione degli alimenti.

Il deterioramento delle uova può dipendere dal passaggio di germi dalla superficie esterna del guscio all'interno dell'uovo, per sbalzi termici in presenza di livelli elevati di umidità ambientale, o per la presenza di screpolature e microfessure del guscio prodottesi durante le fasi di raccolta o di trasporto. L'assottigliamento della cuticola esterna, che svolge un'azione di protezione del guscio, per cause di selezione genetica delle razze ovaiole o per squilibri alimentari (carenze di sali minerali e vitamine), sembra costituire un fattore determinante di questo fenomeno. Possono entrare in questo modo microrganismi che riescono a vincere anche le ulteriori difese interne dell'uovo (membrana e lisozima dell'albume), come, ad esempio, *Pseudomonas putida* (che dà fluorescenza dell'albume), *Pseudomonas fluorescens* (che impartisce una colorazione rosa alle componenti interne delle uova), *Proteus vulgaris* e *Aeromonas* (che anneriscono il tuorlo).

Gli **ovoprodotti** (misto d'uovo, tuorlo, albume) possono aumentare il rischio di contaminazione da salmonelle provenienti dalla sgusciatura meccanica, se non vengono sottoposti a pasteurizzazione (+65° C per 2,5-3 minuti) e a successiva conservazione in frigorifero.

PRODOTTI DI PASTICCERIA

In questa gamma di prodotti, vengono a sommarsi i germi normalmente rinvenibili nel latte e quelli reperibili nelle uova. Per nostra fortuna, la maggior parte dei prodotti di pasticceria subisce una fase di cottura in forno che elimina ogni problema di contaminazione microbica. Tuttavia, l'inquinamento di origine umana (basterà ricordare gli stafilococchi) può pregiudicare la salubrità delle preparazioni crude (ad esempio, del tiramisù), o la sterilità dei prodotti cotti (creme), che, per il loro elevato contenuto proteico, costituiscono un ottimo terreno di crescita per i germi.

MIELE

È stata studiata la contaminazione da spore di *Clostridium botulinum*, a causa di episodi di botulismo infantile insorti dopo consumo di miele adoperato al posto dello zucchero. Il miele, inoltre, può essere spesso contaminato da *Bacillus cereus*.

PASTE ALIMENTARI

I germi più frequentemente presenti in questa tipologia di prodotti sono rappresentati da lattobacilli, da stafilococchi, da clostridi e da salmonelle. Essendo sottoposti a una notevole manipolazione, le paste alimentari possono raccogliere molte specie batteriche, anche dannose, sia dal punto di vista merceologico che sanitario.

ACQUA POTABILE

Generalmente, nelle acque destinate al consumo umano si possono incontrare solo alcuni germi saprofiti, provenienti dal terreno e presenti in numero modesto, a meno che la falda acquifera non sia inquinata da scarichi contenenti materiale organico.

L'acqua, prima dell'avvento degli attuali sistemi di potabilizzazione mediante clorazione, è stata sovente veicolo di patogeni in più occasioni. Ormai storiche sono le epidemie da tifo e colera. Meno clamorosi e non troppo lontani nel tempo sono alcuni casi sostenuti da *Aeromonas hydrophila* e da ceppi di *Escherichia coli* enteropatogeni. Paradossalmente, alcune specie patogene abitualmente localizzate in altre matrici, come *Burkholderia pseudomallei* e *Burkholderia cepacia*, fanno la loro comparsa nelle acque.

ACQUE MINERALI E ALTRE BEVANDE

Non si trovano nelle statistiche grossi episodi di malattie infettive veicolate da **acque minerali**. La diffusione di **bevande pasteurizzate**, inoltre, ha notevolmente variato la situazione commerciale in questo settore. Attualmente, i prodotti termicamente trattati e confezionati in *tetrapack* o in altri contenitori rigidi rappresentano la migliore soluzione dal punto di vista igienico. In questo contesto, l'incidenza di germi è modesta.

Il caso più rilevante in questo settore merceologico è rappresentato dall'alterazione dei succhi di frutta in seguito a sviluppo di lieviti appartenenti al genere *Saccharomyces*, che sono in grado di far fermentare le bevande a bassa acidità con formazione di gas.

VEGETALI E FRUTTA

Le fonti d'inquinamento dei prodotti vegetali e della frutta sono essenzialmente rappresentate dal terriccio, dall'aria, dagli insetti e dalle deiezioni animali veicolate da concimi organici. Le condizioni di sviluppo dei batteri sulle **verdure** sono favorite dall'alto contenuto di acqua (A_w 0,98-0,99), dal *p*H spostato verso una debole acidità (i valori del *p*H possono variare da 3,8 della cipolla a 7,3 del mais) e dal potenziale di ossido-riduzione elevato. La carica batterica totale delle verdure è molto variabile e comunque non è difficile trovare 10^6 germi per grammo nell'insalata, 10^7 nei cavoli, 10^{10} nel sedano. Sono predominanti i lattobacilli (*Leuconostoc* e streptococchi), gli stafilococchi coagulasi-positivi, alcuni enterobatteri di origine fecale, clostridi (*C. perfringens* e *C. botulinum*), bacilli (*B. cereus*).

Nella **frutta**, al contrario, il *p*H raggiunge spesso valori inferiori a 4,6 (con alcune eccezioni in cocomero, banana, fico) e, di conseguenza, la flora microbica è di tipo prettamente acidofilo (lattobacilli, muffe, lieviti).

Nella putrefazione delle verdure, compaiono *Erwinia carotovora* (marciume molle e marciume nero delle patate), *Xantomonas campestris* (marciume nero del cavolo), *Phytophtora*

infestans (peronospora delle patate), *Fusarium solani* (marciume secco delle patate), *Pseudomonas cichorii* (batteriosi della lattuga), *Rhizopus stolonifer* (marciume di patate e pomodori), *Geotrichum candidum* (marciume di pomodori).

Nella frutta, i fenomeni putrefattivi sono sostenuti da muffe (*Botrytis cinerea,* muffa grigia dell'uva e delle fragole; *Gleosporium album,* marciume ad occhio di pernice dei frutti con semi; *Monilia,* putrefazione delle prugne, pesche, ciliegie; *Penicillium,* marciume verde o azzurro degli agrumi, ticchiolatura delle mele e delle pere; *Phytophtora,* peronospora delle fragole; *Aspergillus,* muffa nera dell'uva; *Rhizopus,* marciume delle fragole; *Geotrichum candidum*, marciume degli agrumi).

I germi patogeni non rappresentano fortunatamente un grosso pericolo per il consumatore di prodotti orticoli e di frutta, nonostante che salmonelle e listerie siano state ripetutamente trovate nell'insalata, nei cavoli e in altri vegetali. Questa evenienza è strettamente connessa alle necessità di coltivazione, in quanto le colture possono essere irrigate e concimate con acque inquinate. Per questo rimane quanto mai valida la raccomandazione di lavare bene la frutta e la verdura che non vengono cotte.

SEMICONSERVE

Alcuni vegetali (crauti, cetrioli, olive, ecc) si prestano a essere conservati in salamoie costituite da acqua e cloruro di sodio in proporzione variabile dal 5 all'8%. La fermentazione lattica, che avviene ad opera di *Pediococcus*, *Leuconostoc, Lactobacillus*, abbassa il *p*H a meno di 4,0 in 3-4 settimane. La flora iniziale, rappresentata per lo più da Gram-negativi aerobi, da muffe e da lieviti, viene inibita, permettendo la conservazione del prodotto per mesi a temperatura ambiente.

Altri vegetali (peperoni, melanzane, ecc), tradizionalmente messi sott'olio, possono dare luogo a intossicazioni da *Clostridium botulinum*, a causa della permanenza di terriccio inquinato.

CONSERVE

Si intendono quelle sottoposte a sterilizzazione. Come è noto, gli unici pericoli stanno nella cattiva chiusura dei recipienti (che porta a rapido degrado) e nella sopravvivenza di spore di *Clostridium botulinum*, con o senza formazione di gas (bombaggio delle scatole).

PRODOTTI DELLA IV GAMMA

Si tratta di **ortaggi freschi e di frutta** pronti per il consumo confezionati in buste sigillate o in vaschette chiuse con film plastico. Questi prodotti non hanno subìto trattamenti particolari, al di fuori di eventuale pelatura, lavaggio, sezionatura, disinfezione.

I microrganismi che si ritrovano in questi prodotti sono generalmente rappresentati da Gram-negativi (*Pseudomonas*, *Xantomonas*, *Enterobacter*, *Erwinia*), da lattococchi (*Leuconostoc*), da lieviti (*Candida*,*Cryptococcus*, *Rhodotorula*, *Trichosporon*, *Pichia*).

Un'efficace riduzione della contaminazione batterica può essere ottenuta con il confezionamento in atmosfera modificata, l'aggiunta di sostanze antiossidanti, l'impiego di batteri lattici in funzione di probiotici e con il rispetto della catena del freddo.

I potenziali patogeni più frequentemente reperibili in questa categoria di prodotti sono rappresentati da *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila.*

CAUSE DI MODIFICAZIONE DELLA FLORA BATTERICA E DI DETERIORAMENTO DEGLI ALIMENTI

Le conseguenze sfavorevoli dei microrganismi sugli alimenti dipendono non solo dalla qualità delle specie microbiche presenti, ma, circostanza di gran lunga più importante, dalle loro ***proporzioni quantitative***. Le popolazioni microbiche, inoltre, non sono statiche e possono cambiare sia qualitativamente che quantitativamente durante la produzione, lo stoccaggio e la commercializzazione dei prodotti alimentari.

Ciascun microrganismo produce poi un impatto diverso sulla composizione chimica dell'ecosistema, secondo la propria attività biochimica e, soprattutto, la concentrazione raggiunta dalla popolazione cui esso appartiene. Sfortunatamente, la maggior parte degli studi orientati alla definizione dell'ecologia microbica in campo alimentare elude la conoscenza quantitativa delle specie microbiche rilevabili in un particolare momento storico della vita di un dato alimento e si limita, piuttosto, a descrivere solamente le condizioni di isolamento e di identificazione di qualche specie microbica particolare (ad esempio, *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157:H7).

Nella progressione dei fenomeni di deterioramento, gli alimenti perdono colore, aspetto, consistenza, profumo e sapore. Il deterioramento può essere di natura enzimatica, cioè chimica, o microbiologica. I batteri contribuiscono in maniera determinante al deterioramento degli alimenti sui quali riescono a proliferare, in funzione di alcune condizioni di ordine chimico-fisico, quali la composizione chimica dell'alimento, il *p*H, l'A_w, il potenziale di ossido-riduzione, la temperatura di conservazione.

DETERIORAMENTO CONDIZIONATO DALLA COMPOSIZIONE DELL'ALIMENTO

Diverse specie batteriche (come *Bacillus, Pseudomonas, Enterococcus, Clostridium, Proteus*) demoliscono le proteine, specialmente se a basso peso molecolare. Questa demolizione può avvenire per decarbossilazione, con formazione di ammine biogene alteranti l'odore, o per deaminazione ossidativa, con formazione di ammoniaca e acidi organici.

I miceti (funghi, lieviti) idrolizzano i grassi trigliceridi mediante l'azione di lipasi, con formazione di acido butirrico e comparsa di fenomeni di irrancidimento (sapore rancido e odori estranei).

Alcuni batteri (lattobacilli, *Erwinia, Leuconostoc, Clostridium butyrricum*) demoliscono gli zuccheri con formazione di CO_2, etanolo e acido lattico. Da ciò derivano variazioni del colore, dell'odore e della consistenza degli alimenti. Nei vegetali, la demolizione della pectina costituisce la causa della formazione del cosiddetto marciume molle.

Nel caso degli alimenti di origine animale, i microrganismi di contaminazione esterna provengono per lo più dalla rottura dell'intestino durante la macellazione, o da un'insufficiente igiene nel corso delle successive fasi di lavorazione. L'ambiente di trasformazione sporco o invaso da insetti e deiezioni di animali peggiora ulteriormente la situazione.

DETERIORAMENTO CONDIZIONATO DAL *p*H

Le diverse tipologie di alimenti sono caratterizzate dal presentare livelli di acidità molto variabili. Esistono infatti alimenti alcalini con *p*H maggiore di 7 (come l'albume d'uovo, che ha un *p*H di 9,6), alimenti neutri con *p*H pari a 6,5-7 (come il latte), alimenti debolmente acidi

con valori di *p*H 5,3-6,5 (come le carni, il pesce, il pane, la verdura), alimenti acidi caratterizzati da *p*H di 3,7-4,5 (come pomodori, *yogurt*, maionese, frutta) e alimenti fortemente acidi con valori di *p*H inferiore a 3,7 (come i limoni, che presentano valori di *p*H di 2,2-2,4).

I batteri sopportano generalmente *p*H compresi fra 4 e 9. Fanno eccezione i batteri lattici (*Lactobacillus*), acetici (*Acetobacter*), i lieviti (*Saccharomyces*), i funghi (*Penicillium*, *Aspergillus*), che tollerano *p*H inferiori a 4 (fino a 1,6).

DETERIORAMENTO CONDIZIONATO DALL'A_w

L'acqua che si trova legata a numerosi componenti dell'alimento (sale, zuccheri, proteine) non è disponibile per lo sviluppo dei microrganismi. Aumentando la concentrazione di sostanze capaci di catturare l'acqua, diminuisce la tensione di vapore dell'acqua sopra l'alimento. Questa rappresenta l'acqua libera (A_w), ossia la frazione di acqua non legata e utilizzabile dai batteri. La misura dell'A_w viene espressa da un numero compreso tra 0 e 1 (tensione di vapore dell'acqua pura). Il valore minimo di A_w per la sopravvivenza di molti batteri è pari a 0,96. Per i lieviti, esso è di 0,87 e, per le muffe, di 0,80.

Sottraendo acqua (mediante essiccamento, affumicatura, surgelamento, aggiunta di sale, di zucchero, di albumina, di grassi, di lattosio), lo sviluppo dei batteri viene progressivamente inibito. Alcuni germi (come *Pseudomonas*) sono particolarmente sensibili alla diminuzione dell'A_w e riescono a sopravvivere solo negli alimenti più ricchi d'acqua libera, come carne, pesce, uova. Altri germi (come *Halococcus*, *Staphylococcus*, muffe e lieviti) si adattano a condizioni di ridotta A_w e vengono perciò detti microrganismi xerotolleranti (oppure alotolleranti o osmotolleranti).

Gli alimenti caratterizzati da A_w superiore a 0,95 vengono considerati facilmente alterabili. Vi appartengono carni, uova, pesce. Quelli con valori di A_w compresi tra 0,91 e 0,95 vengono ritenuti moderatamente alterabili. Comprendono, ad esempio, *wurstel* e carni salmistrate. Vi possono crescere cocchi Gram-positivi, stafilococchi, lieviti e muffe. Gli alimenti che presentano livelli di A_w inferiori a 0,90 sono ritenuti praticamente inalterabili. Appartengono a questo gruppo i salami stagionati, il pesce secco salato, i succhi di frutta concentrati, oltre a farina, riso, frutta secca, carne secca, latte e uova in polvere, patatine fritte.

DETERIORAMENTO CONDIZIONATO DAL POTENZIALE OSSIDO-RIDUTTIVO

Ogni alimento è caratterizzato da un proprio potenziale ossido-riduttivo (*Eh*), in funzione della composizione chimica specifica. Nella carne, nel formaggio, nelle conserve in scatola, *Eh* si aggira intorno a valori di -150/-200 mV. Nella frutta e nella verdura, al contrario, *Eh* raggiunge valori di +300/+400 mV. Ne consegue che i batteri aerobi e i funghi, esigendo livelli di *Eh* elevati, attaccano prevalentemente i vegetali. Al contrario, i batteri anaerobi facoltativi o, ancor più, gli anaerobi stretti, che tollerano livelli di *Eh* bassi (fino a -300 mV), attaccano prevalentemente i prodotti carnei.

DETERIORAMENTO CONDIZIONATO DALLA TEMPERATURA

Da un certo numero di Autori, i batteri sono stati suddivisi, sulla base della loro temperatura ottimale di sviluppo, in tre o quattro gruppi, come indicato nella tabella che segue. All'interno di ogni gruppo, si trovano alcuni generi preminenti per capacità nel deteriorare i cibi.

Classificazione dei microrganismi in base alla loro temperatura ottimale di crescita

Denominazione del gruppo di germi in base alla temperatura	*Intervallo delle temperature di crescita ottimali in °C*
Psicrofili	15 - 20
Mesofili	25 - 40
Termofili	45 - 60
Termodurici	> 62,5

Per portare un esempio di degrado biologico, di seguito vengono riportati alcuni fra i principali effetti che i batteri saprofiti, elencati in ordine di frequenza, svolgono sulle carni.

Frequenza del microrganismo	**Genere / Famiglia**	**Tipo di metabolismo**	**Attività sulle carni**
Dominante	*Pseudomonas*	Aerobio	Putrefazione-lipolisi
	Acinetobacter	Aerobio	Putrefazione
	Micrococcaceae	Aerobio facoltativo	Lipolisi
	Enterobacteriaceae	Aerobio facoltativo	Putrefazione-inverdimento
	Flavobacterium	Aerobio	Putrefazione
	Microbacterium	Aerobio facoltativo	Inverdimento-ferm. lattica
	Lactobacillaceae	Aerobio facoltativo	Inverdimento-ferm. lattica
Frequente	*Bacillus*	Aerobio facoltativo	Indeterminato
	Alcaligenes	Aerobio	Proteolisi
	Streptococcus	Aerobio	Fermentazione lattica
	Aeromonas	Aerobio facoltativo	Putrefazione
	Corynebacterium	Aerobio facoltativo	Indeterminato
	Arthrobacter	Aerobio	Indeterminato
	Clostridium	Anaerobio	Inverdimento-putrefazione
Raro	*Chromobacterium*	Aerobio facoltativo	Indeterminato
	Alteromonas	Aerobio facoltativo	Putrefazione-inverdimento
	Pediococcus	Aerobio	Inverdimento-ferm. lattica
	Leuconostoc	Aerobio	Fermentazione lattica
	Kurthia	Aerobio	Putrefazione

BIBLIOGRAFIA CONSULTATA

Ayres J.C., The relationship of organisms of the genus *Pseudomonas* to the spoilage of meat, poultry and eggs, J appl. Bact. 1960, *23*, 471

Barnes E.M. *e Coll*., Psycrophilic spoilage bacteria of poultry, J appl. Bact. 1968, *31*, 97

Becker H. *e Coll*., *Bacillus cereus* in infant foods and dried milk products, Int J Food Microbiol. 1994, *23*, 1-15

Bersani C. *e Coll*., Ricerca preliminare sulla presenza di *Lactobacillus carnis* e *Lactobacillus divergens* negli insaccati crudi stagionati, Ind. Alim. 1988, *27*, 1091

Beutling D., Vorkommen von *Campylobacter* in Lebensmitteln, Arch. Lebens. 1999, *49*, 1-24

Biosca E.G. *e Coll*., Toxic and enzymatic activities of *Vibrio vulnificus* biotype 2 with respect to host specificity, Appl. Environm. Microbiol. 1996, *62*, 2331-2337

Blake R. *e Coll*., Diseases of humans (other than cholera) caused by Vibrios, Ann. Rev. Microbiol. 1980, *34*, 341

Braatz R., Taxonomic der Pseudomoaden aus milch, Milchwissensch. 1975, 30, 603

Borch E. *e Coll*., Bacterial spoilage of meat and cured meat products, J Food Microbiol. 1996, *33*, 103-120
Borch E. *e Coll*., Hazard identification in swine slaughter with respect to foodborne bacteria, Int J Food Microbiol. 1996, *33*, 9-25
Cabassi E. *e Coll*., *Vibrio parahaemolyticus* aetiological agent of food poisoning, Folia Vet. Latina 1976, *6*, 335
Calicchia M.L. *e Coll*., Selective enumeration of *Bifidobacterium bifidum*, *Enterococcus faecium* and streptomycin-resistant *Lactobacillus acidophilus* from a mixed probiotic product, J Food Protect. 1993, *56*, 954-957
Cantoni C. *e Coll*., Frequenza del *Bacillus cereus* negli alimenti, Ind. Alim. 1987, *26*, 641
Cantoni C. *e Coll*., Germi lattici e alterazioni dei prodotti cotti di salumeria, Ind. Alim. 1988, *27*, 445-447
Cantoni C., Le tossinfezioni alimentari da *Campylobacter*, Obiettivi Vet. 1994, *12*, 27
Cantoni C. *e Coll*., Nuova alterazione superficiale della cotenna dei prosciutti freschi: la chiazzatura blu, Ind. Alim. 2001, *40*, 1226-1228
Cantoni C., Cenni sulla flora batterica del pesce, Arch. Vet. It. 2003, *54*, 37
Cefarchia C. *e Coll*., Flora fungina di alcuni tipi di formaggio, Ind. Alim. 1994, *33*, 651
Chan K.F. *e Coll*., Survival of clinical and poultry derived isolates of *Campylobacter jejuni* at a low temperature (4 °C), Appl. Environm. Microbiol. 2001, *67*, 4186-4191
Comi G. *e Coll*., Lieviti e carni, Ind. Alim. 1985, *24*, 683
Comi G. *e Coll*., Physiologishe Characterisierung und Entwicklung von Laktobazillen, Fleischwirtsch. 1993, *73*, 1312
Cox N.A. *e Coll*., The presence of *Yersinia enterocolitica* and other *Yersinia* species on the carcasses of market broilers, Poultry Sci. 1990, *69*, 482-485
Dalgaard P., Qualitative and quantitative characterisation of spoilage bacteria from packed fish, Int J Food Microbiol. 1995, *26*, 319-333
D'Aubert S. *e Coll*., Ricerche sui lattobacilli negli insaccati, Arch. Vet. It. 1973, *24*, 57
Di Noto A.M. *e Coll*., Analisi statistica degli esami batteriologici effettuati su campioni di carni bovine fresche, Ind. Alim. 1990, *29*, 865-870
Dragoni I. *e Coll*., L'ammuffimento rosso superficiale e profondo del burro, Il latte 1993, *13*, 920
Dufrenne J. *e Coll*., Characteristics of some psychrotrophic *Bacillus cereus* isolates, Int J Food Microbiol. 1995, *27*, 175-183
Eisel W.G. *e Coll*., A survey of microbial levels for incoming raw beef, environmental sources and round beef in a red meat processing plant, Food Microbiol. 1997, *14*, 273-282
El-Rahman A. *e Coll*., Significance of occurrence of mould and yeast in frozen round beef, Arch. Lebens. 1993, *44*, 105-128
Ercolini C. *e Coll*., Qualità microbiologica e tenore della microflora specifica in campioni di yogurt del commercio, Ind. Alim. 1996, *35*, 797-800
Eyles M. *e Coll*., The effect of modified atmospheres on the growth of psychrotrophic Pseudomonads on a surface in a model system, Int J Food Microbiol. 1993, *20*, 97-107
Feldhusen F., The role of seafood in bacterial foodborne diseases, Microbes and Infection 2000, *2*, 1651-1660
Filtenberg O. *e Coll*., Moulds in food spoilage, Int J Food Microbiol. 1996, *33*, 85-102
Finali F. *e Coll*., Sopravvivenza di *Campylobacter* in preparati a base di carne (*hamburger*), Ind Alim 1996, *35*, 916-922
Geilhausen B. *e Coll*., *Campylobacter* and *Salmonella* contaminating fresh chicken meat, Zbl Bakt 1996, *284*, 241
Geisen R. *e Coll*., Genetically modified starter and protective cultures, Int J Food Microbiol. 1996, *30*, 315-324

Gerdemann M., *Campylobacter jejuni* strains. The importance of food hygiene for the production of poultry, Fleischwirtsch. 1996, *76*, 1
Gillespie J.A. *e Coll*., Milkborne general outbreaks of infectious intestinal disease, England and Wales, 1992-2000, Epidemiol Infect. 2003, *130*, 461-468
Gobat P. *e Coll*., Distribution of mesophilic *Aeromonas* species in raw meat and ready-to-eat fish and meat products in Switzerland, Int J Food Microbiol. 1993, *20*, 117-120
Goepfert J.M. *e Coll*., *Bacillus cereus*: food poisoning organism. A review, J Milk Food Technol. 1972, *35*, 213
Graham H. *e Coll*., The occurrence and growth of yeasts in dairy products, Int J Food Microbiol. 1987, *4*, 145-155
Gram L. *e Coll*., Microbiological spoilage of fish and fish products, Int J Food Microbiol. 1996, *33*, 121-137
Gustavsson P. *e Coll*., Contamination of beef carcasses by psychrotrophic *Pseudomonas* and *Enterobacteriaceae* at different stages along the processing line, Int J Food Microbiol. 1993, *20*, 67-83
Hammes W. *e Coll*., Mikrobiologische Untersuchung der auf den deutschen Markt vorhandenen Starkerkulturpräparate fur die Rohwurstbereitung, Fleischwirtsch. 1985, *65*, 629
Hammes W. *e Coll*., Trhe potential of lactic acid bacteria for the production of safe and wholesome food, Zbl Lebens Unters Forsch 1994, *198*, 193-201
Hanna M.O. *e Coll*., Characteristics of psychrotrophic, Gram-positive, catalase-positive, pleomorphic coccoid rods from vacuum-packaged wholesale cuts of beef, J Food Protect. 1977, *40*, 94
Hefnawy Y. *e Coll*., Occurrence of *Bacillus cereus* in selected meat products, Fleischwirtsch. 1984, *64*, 1371
How H. *e Coll*., Pasteurization of intact shell eggs, Food Microbiol. 1996, *13*, 93-101
Huis J.H., Microbial and biochemical spoilage of foods: an overview, Int J Food Microbiol. 1996, *33*, 1-18
Ingram M. *e Coll*., Changes caused by microbes in spoilage of meats, J Appl Bact. 1971, *34*, 21
Jackson S.G., *Bacillus cereus*, J of AOAC 1991, *74*, 704
Jones F.T. *e Coll*., A survey of *Campylobacter jejuni* contamination in modern broiler production and processing systems, J Food Protect. 1991, *54*, 259-262
Jos H.J, Microbial and biochemical spoilage of foods: a review, Int J Food Microbiol. 1996, *33*, 1-18
Kampelmacher E.H. *e Coll*., A survey on the occurrence of *Vibrio* on fish and shellfish marketed in
Kessel A.S. *e Coll*., General outbreaks of infections intestinal disease linked with poultry, England and Wales, 1992-1999, Commun Dis Publ. Hlth 2001, *3*, 171-177
Kirov S.M., The public health significance of *Aeromonas spp*. in foods, Int J Food Microbiol. 1993, *20*, 179-198
Klippen K., Egg production and processing, Dairy, Food and Environmental Sanitation 1990, *10*, 266
Kristansen K.K., Enteropatogene *Vibrio*, Nord Vet Med. 1973, *25*, 420
Lee J.S., What seafood processors should know about *Vibrio parahaemolyticus*, J Milk Food Technol. 1973, *36*, 405
Leroi F. *e Coll*., Study of the microbial ecology of cold-smoked salmon during storage at 8 °C, Int J Food Microbiol. 1998, *39*, 111-121
Lienau J. *e Coll*., *Campylobacter spp*. beim Geflügel, Fleischwirtsch. 2003, *83*, 86-87
Liepe H., Einsatz einer neuen Laktobazillen-starterkultur fÜr die Rohwurst-technologie, Fleischwirtsch. 1985, *65*, 1246

Little C.L. *e Coll*., Growth and survival of *Yersinia enterocolitica*, *Salmonella* and *Bacillus cereus* in Brie stored at 4,8 and 20 °C, Int J Food Microbiol. 1994, *24*, 137-145
Lodi R. *e Coll*., I batteri lattici: un parametro di qualità per i formaggi freschi, Ind del latte 1994, *30*, 3
Lucore L.A. *e Coll*., Internal and external bacterial counts from shell of eggs washed in a commercial type processor at various wash-water temperatures, J Food Protect. 1997, *60*, 1324-1328
Moore J.E. *e Coll*., Characterisation of fluorochinolone-resistant *Campylobacter* species isolated from human beings and chickens, Vet Rec. 2002, *150*, 518-520
National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods, *Campylobacter jejuni/coli*, J Food Protect. 1994, *57*, 1101-1121
Nickerson R. *e Coll*., *Vibrio parahaemolyticus*: a review, J Milk Food Technol. 1971, *34*, 447
Notermans S. *e Coll*., A risk assessment study of *Bacillus cereus* present in pasteurized milk, Food Microbiol. 1997, *14*, 143-151
Pichner R., Aktuelles aus der internationaler Fleischforschung, Fleiscwirtsch. 2002*, 7*, 82-84
Rahkio M. *e Coll*., Microbiological contamination of carcasses related to hygiene practice and facilities on slaughterhouses, Acta Vet. Scand. 1996, *37*, 219-228
Reed G.H., Foodborne illness. Part 4. *Bacillus cereus* gastroenteritis, Dairy Food Environm Sanitat. 1994, *14*, 87
Reed G.H., Foodborne illness. Part 6. Vibrios. Dairy food Environm. Sanitat. 1994, *14*, 201-211
Reuter G., Vorkommen und Bedeutung von psychrotrophen Microrganismen im Fleisch, Arch Lebens. 1972, *23*, 272
Rondinini G., *Aeromonas* e *Plesiomonas*: patologie di origine alimentare, Igiene Alimenti 2003, *1*, 30-31
Rosenberg F.A., The microbiology of bottled water, Clin Microbiol Newsl. 2003, *25*, 41-44
Rosenquist H. *e Coll*., Quantitative risk assessment of human campylobacteriosis associated with thermophilic *Campylobacter* species in chickens, Int J Food Microbiol. 2003, *83*, 87-103
Sakazaki R. *e Coll*., Studies on the enteropathogenic facultatively halophilic bacteria, *Vibrio parahaemolyticus*, Jap. J Med Sci Biol. 1963, *16*, 161
Sarais I. *e Coll*., The behavior of yeast population in stracchino cheese packaged under various conditions, J Food Protect. 1996, *59*, 541-544
Shah N.P. *e Coll*., Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in commercial yogurt durino refrigerated storage, Int Dairy J 1995, *5*, 515-521
Shewan J.M. *e Coll*., The *Pseudomonas* and *Achromobacter* groups of bacteria in the spoilage of marine white fish, J appl. Bact. 1960, *23*, 463
Shillinger U. *e Coll*., Milchsauerbakterien-flora auf vakuumverpackten Fleisch und ihr Einfluss auf die Haltbarkeit, Fleischwirtsch. 1986, *66*, 1515
Schillinger U. *e Coll*, Identification of lactobacilli from meat and meat products, Food Microbiol. 1987, *4*, 199
Schillinger U., Isolation and identification of lactobacilli from novel-type probiotic and mild yoghurts and their stability during refrigerated storage, Int J Food Microbiol. 1999, *47*, 79-87
Stella S. *e Coll*., Alterazione mefitica di bresaole, Ind Alim. 2001, *40*, 619
Stringer M.F., *Campylobacter*: a European perspective, Dairy Food Environm Sanit. 1994, *14*, 325-329
Sutherland A.D. *e Coll*., Seasonal occurrence of psychrotrophic *Bacillus* species in raw milk and studies on the interactions with mesophilic *Bacillus sp*., Int J Food Microbiol. 1994, *21*, 279-292

Swerdlow D.L. *e Coll*., *Vibrio cholerae* non-O1. The eigth pandemie?, Lancet 1993, *342*, 383
Vallone L. *e Coll*., *Scopulariopsis brumptii* e ammuffimento nero di insaccati crudi stagionati, Ind Alim. 1995, *34*, 985
Velasquez L. *e Coll*., Prevalence of *Yersinia enterocolitica* in hake (*Merlucius hubbsi*) fillets, J Food Protect. 1996, *59*, 781-783
Ventura C. *e Coll*., *Aeromonas* ed alimenti: rischi sanitari e modalità di controllo, Ind Alim. 1998, *37*, 982
Vinderola C.G. *e Coll*., Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products, Int Dairy J 2000, *10*, 271-275
Wadström T. e Coll., *Aeromonas* and *Plesiomonas* as food and waterborne pathogens, Int J Food Microbiol. 1991, *12*, 303-312
White D.G. *e Coll*., Antimicrobial resistance of foodborne pathogens, Microbes and Infection 2002, *4*, 405-412

ALCUNI DATI ORIENTATIVI SULLE CARICHE MICROBICHE IN PRODOTTI ALIMENTARI E MANGIMI

Diversi Autori di vari paesi hanno riportato nei loro lavori i seguenti dati, raccolti nel corso di verifiche sullo stato igienico-sanitario degli alimenti. Detti valori sono stati considerati normale conseguenza delle pratiche di lavorazione comunemente adottate. Essi rappresentano, pertanto, un riferimento da tener presente per verificare le condizioni di produzione, tenendo conto, però, che si possono avere sensibili scostamenti, frutto di differenti realtà ambientali.

Attenzione! Questi valori non sono dei **limiti di accettabilità**, che hanno, viceversa, una valenza legale nei paesi in cui sono stati adottati dalle Autorità Sanitarie e la cui trattazione, per l'Italia, è inserita nel capitolo 8, al quale si rimanda.

I valori delle cariche batteriche riportati nelle pagine che seguono sono espressi come numero di germi (ufc) per grammo di alimento, salvo quando diversamente specificato.
I numeri ricavati da valori espressi come logaritmi sono stati arrotondati

1. Carni crude refrigerate

Prodotto alimentare	Paese	Carica batterica totale	Coliformi	Stafilococchi coagulasi+	Salmonelle	Streptococchi fecali (enterococchi)	Clostridi solfito-riduttori	Altre specie	Riferimento bibliografico
Muscolo bovino	USA	25.000-10.000.000							1
Muscolo bovino	USA		200						2
Muscolo bovino	Canada			1.000					3
Carne di vitello e di suino	Danimarca	100.000		100		300			4
Carne di bovino	Danimarca*	1.000.000		100		300			5
Fegato di bovino e di vitello	Danimarca*	50.000		100		1000			6
Lonza suino	Danimarca*	100.000		100		300			6
Muscolo in profondità	Francia*	100	0 in 1 g		Negativo		0	Negativo	7
Superfici di carcasse	Francia*	100.000 in 1g o cm^2	1 in 1 g o cm^2	0 in 0,1 g o 10 in 1 cm^2	Negativo in 25 g o cm^2				8

2. Carni cotte

Prodotto alimentare	Paese	Carica batterica totale	Coliformi	Stafilococchi coagulasi+	Salmonelle	Streptococchi fecali (enterococchi)	Clostridi solfito-riduttori	Altre specie	Riferimento bibliografico
Carne di bovino	Danimarca*	50.000		100		100			9
Salsicce	Inghilterra	10.000							10
Carni pressate	Inghilterra		0 in 0,1 g						11
Prosciutto in scatola	Inghilterra	10	0 in 1 g (*E. coli*)			0	0 in 1 g (*Clostr. perfringens*)	10 (spore)	12
Prosciutto in scatola	USA	10.000					0	0 (Gram-) 0 (funghi)	13
Carne di bovino	USA	10 - 10.000	0 in 0,1 g		Negativo	0 in 1 g			14

3. Carni congelate

Prodotto alimentare	Paese	Carica batterica totale	Coliformi	Stafilococchi coagulasi+	Salmonelle	Streptococchi fecali (enterococchi)	Clostridi solfito-riduttori	Altre specie	Riferimento bibliografico
Carne secca	Germania	500.000		100	0 in 25 g		100 (*Clostr. perfringens*)	1.000 (*B. cereus*)	15

4. Salumi non cotti

Prodotto alimentare	Paese	Carica batterica totale	Anaerobi (clostdridi)	Stafilococchi coagulasi+	Salmonelle	Streptococchi fecali (enterococchi)	Batteri fecali e patogeni	Altre specie	Riferimento bibliografico
Insaccati	Germania	100.000	20	0 in 0,01 g		0 in 0,01 g			16
Insaccati	Ex-Jugoslavia*	100.000	0 in 0,1 g	0 in 0,1 g	0 in 20 g	0 in 0,1 g	0 in 0,1 g (coliformi e *Proteus*)		17
Insaccati	Danimarca*	5.000.000		100		5.000			18
Insaccati	Francia*			0					19
Insaccati	Inghilterra	10.000.000		100	0 in 25 g		100.000		20

5. Salumi cotti

Prodotto alimentare	Paese	Carica batterica totale	Anaerobi (clostdridi)	Stafilococchi coagulasi+	Salmonelle	Streptococchi fecali (enterococchi)	Batteri fecali e patogeni	Altre specie	Riferimento bibliografico
Wurstel	Svezia	1.000.000	100				100 coliformi	1.000 inclusi bacilli	21
Wurstel	USA	10.000	0 in 1 g assente *Cl. perfringens*			0	0 in 0,1 g coliformi assente *E. coli*	10 spore	22
Wurstel	(FAO)	100.000	0 in 0,01 g	0 in 10^{-5} g		0 in 10^{-5} g	0 in 0,01 g coliformi	0 in 10^{-5} g *B. cereus*	23
Wurstel	Ex-Jugoslavia*	10.000	0 in 0,1 g	0 in 0,1 g	0 in 20 g	0 in 0,1 g	0 in 0,1 g coliformi e *Proteus*		24
Wurstel	Belgio	100.000	100.000				0		25
Wurstel	Francia*	10.000	0 in 0,1 g	0	0 in 10 g		0 *E. coli*		26
Wurstel	Finlandia	100.000-1.000.000	10.000-100.000				0 in 0,01 g coliformi	1.000-10.000 emolitici	27
Wurstel	Ungheria	10.000-100.000	10.000-100.000			0	0	0 Gram-negativi	28
Wurstel	Germania	100.000	20	0	0	0		0 Gram-negativi	29

6. Prodotti della pesca refrigerati non cotti

Prodotto alimentare	Paese	Carica batterica totale mesofila	Coliformi	Stafilococchi coagulasi+	Salmonelle	Streptococchi fecali (enterococchi)	*Clostridium perfringens*	Altre specie	Riferimento bibliografico
Pesce	USA	100.000	100	100					30
Pesce	USA	1.000.000	1.000	1.000					31
Pesci, crostacei e acqua di provenienza	USA*	50.000-1.000.000	700-1.600	100		1.000			32
Pesce	USA*	100.000	100						33

7. Prodotti della pesca congelati non cotti

Prodotto alimentare	Paese	Carica batterica totale mesofila	Coliformi	Stafilococchi coagulasi+	Salmonelle	Streptococchi fecali (enterococchi)	*Clostridium perfringens*	Altre specie	Riferimento bibliografico
Pesce	USA	100.000							34
Pesce	Inghilterra	1.000.000		100	0 in 25 g		100	1.000 (*B. cereus*)	35

8. Prodotti della pesca congelati cotti

Prodotto alimentare	Paese	Carica batterica totale mesofila	Coliformi	Stafilococchi coagulasi+	Salmonelle	Streptococchi fecali (enterococchi)	*Clostridium perfringens*	Altre specie	Riferimento bibliografico
Pesce	USA	100.000	20	100					36

9. Polli (cariche superficiali)

Prodotto alimentare	Paese	Carica batterica totale mesofila	Coliformi	Stafilococchi coagulasi+	Salmonelle	Streptococchi fecali (enterococchi)	*Clostridium perfringens*	Altre specie	Riferimento bibliografico
Polli interi	USA	500.000/cm^2							37
Polli interi	USA	100.000/cm^2	100/cm^2						38
Polli interi	Irlanda del Nord	15.000/cm^2	60/cm^2	5/cm^2	0/cm^2	600/cm^2			39

10. Uova

Prodotto alimentare	Paese	Carica batterica totale mesofila	Coliformi	Stafilococchi coagulasi+	Salmonelle	Streptococchi fecali (enterococchi)	*Clostridium perfringens*	Altre specie	Riferimento bibliografico
Tuorli congelati	Francia		<20% campioni con *E. coli*		0 in 5 g				40
Tuorli congelati	USA	200.000 - 10.000.000							41
Tuorli congelati	Canada*	200.000 - 10.000.000							42

11. Prodotti di gastronomia

Prodotto alimentare	Paese	Carica batterica totale mesofila	Coliformi	Stafilococchi coagulasi+	Salmonelle	Streptococchi fecali (enterococchi)	*Clostridium perfringens*	Altre specie	Riferimento bibliografico
Piatti crudi congelati	Ungheria*	10.000.000	10.000	100	0	1.000	100	30.000 lieviti 1000 muffe 1 *E. coli*	43
Precotti congelati	Ungheria	100.000	0	0	0	0	100	0 Gram-negativi	44
Piatti vari	Italia			10	0 in 25 g			10 *E. coli*	45

12. Semiconserve

Prodotto alimentare	Paese	Carica batterica totale mesofila	Coliformi	Stafilococchi coagulasi+	Salmonelle	Streptococchi fecali (enterococchi)	*Clostridium perfringens*	Altre specie	Riferimento bibliografico
Preparazioni varie	Ungheria*	10.000	0	0	0	0	100	0 enterobatteri, *Pseudomonas*, *Achromobacter*	46

13. Conserve

Prodotto alimentare	Paese	Carica batterica totale mesofila	Coliformi	Stafilococchi coagulasi+	Salmonelle	Streptococchi fecali (enterococchi)	*Clostridium perfringens*	Altre specie	Riferimento bibliografico
Preparazioni varie	Ungheria*	0 - 1.000			0		0		47
Preparazioni varie	Italia	10 dopo 30 gg a +30 °C					10 (dopo 30 gg a +30 °C)	Tossine assenti	48
Preparazioni varie	Belgio	100.000							49
Minestre disidratate	Olanda	100.000	100	100	0 in 50 g		100		50

14. Latte e derivati del latte

Prodotto alimentare	Paese	Carica batterica totale mesofila	Coliformi	Stafilococchi coagulasi+	Salmonelle	Streptococchi fecali (enterococchi)	*Clostridium perfringens*	Altre specie	Riferimento bibliografico
Latte pasteurizzato	USA	20.000	10						51
Latte in polvere	USA	30.000 - 100.000							52

15. Dessert

Prodotto alimentare	Paese	Carica batterica totale mesofila	Coliformi	Stafilococchi coagulasi+	Salmonelle	Streptococchi fecali (enterococchi)	*Clostridium perfringens*	Altre specie	Riferimento bibliografico
Torta con crema e cioccolato	USA	500-2.400.000	0-3200						53
Torta con crema e cocco	USA	4.000-330.000	30-800						54
Torta con crema e limone	USA	5.000-11.000	100-1.100						55
Torta con crema e banane	USA	4.500	0-7						56
Frutta secca	USA	1.000-200.000							57

16. Vegetali

Prodotto alimentare	Paese	Carica batterica totale mesofila	Coliformi	Stafilococchi coagulasi+	Salmonelle	Streptococchi fecali (enterococchi)	*Clostridium perfringens*	Altre specie	Riferimento bibliografico
Fagioli bianchi	USA	130.000-350.000	10-30						58
Fagiolini	USA	16.000-300.000	10-30						59
Purea di patate	USA	800.000	700						60
Patate soffiate	USA	13.000	250						61
Piselli	USA	85.000-140.000	20-2.000			30-2.000		35.000-60.000 lattobacilli	62
Granoturco	USA		45-350			20-2.500		650.000 lattobacilli	63
Crauti	USA	11.000.000						250.000 muffe e lieviti 10.000.000 lattobacilli	64
Farina di frumento	USA	20.000-4.900.000							65
Patatine fritte	USA	100-20.000							66

17 Mangimi

Prodotto alimentare	Paese	Carica batterica totale mesofila	Coliformi	Stafilococchi coagulasi+	Salmonelle	Streptococchi fecali (enterococchi)	*Clostridium perfringens*	Altre specie	Riferimento bibliografico
Farine per polli e suini, esclusa polvere di latte	Francia	1.000.000						60.000	67
Farina di latte per vitelli	Francia							600	68
Farine di origine animale in genere	Francia							600	69
Pannelli di arachidi, soia e altri di origine vegetale	Francia							6.000	70
Mangimi semplici di origine vegetale e foraggi	Francia							60.000	71

NOTA
I dati contraddistinti in tabella da * sono stati assunti nel rispettivo paese come *standard* ufficiale di riferimento.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI RELATIVI AI DATI RIPORTATI IN TABELLA

Riferimento	*Autori*	*Pubblicazione*
1	Elliott-Michener	Appl. Microbiol. 1961, 9, 452
2	Tobey	Maine Agr. Exp. Bull. 1949
3	Duitschaever	J Milk Food Techn. 1973, 36, 375
4	Quist	Medlemebl. Danske Dyrlaegeforent 1973, 56, 45
5	Quist	Medlemebl. Danske Dyrlaegeforent 1973, 56, 45
6	Quist	Medlemebl. Danske Dyrlaegeforent 1973, 56, 45
7	-	Inf. Techn. Serv. Vet. 1974, 45, 98
8	-	Inf. Techn. Serv. Vet. 1974, 45, 98
9	Quist	Medlemebl. Danske Dyrlaegeforent 1973, 56, 45
10	Heller	J Roy. Soc. Inst. 1952, 72, 396
11	Heller	J Roy. Soc. Inst. 1952, 72, 396
12	Goldenberg	Ann. Inst. Pasteur 1955, 7, 240
13	-	Com. Fish. Abst. 1960, 13, 17
14	Elliott-Michener	Appl. Microbiol. 1961, 9, 452
15	Habermann	Arch. Lebens. 1967, 15, 169
16	Kabuczu	Fleischwirtsch. 1972, 52, 497
17	Kendereski	Schl. Vieh. Zeit. 1968, 68, 277
18	Quist	Medlem.Danske Dyrl. 1973, 56, 45

19	-	Rec. Med. Vet. 1971, 147, 725
20	Goldenberg	Roy. Soc. Health 1954, 4, 195
21	Brag-Kampe	Fleischwirtsch. 1964, 44, 760
22	Frazier	Food Microbiol. 1967
23	Jepsen	Agric. Studies n. 34, 420
24	Kendereski	Schl. Vieh. Zeit. 1968, 68, 277
25	Mossel	Wiener Tier. Woch. 1956, 43, 321
26	-	Cit. Da Franksen, 1969
27	Pohja	Fleischwirtsch. 1964, 44, 760
28	Takacs	Fleischwirtsch. 1969, 49, 193
29	Franksen	Fleischwirtsch. 1969, 49, 1339
30	Surkiewicz	Appl. Microbiol. 1968, 16, 147
31	Surkiewicz	Appl. Microbiol. 1967, 15, 1
32	Elliott-Michener	Appl. Microbiol. 1961, 9, 452
33	NY City Tol. Standard	Publ. Hlth. Rep. 1960, 75, 815
34	Kakikian	Frosted Food Field 1960, 30, 50
35	Hall	Manual of method for the microbiological examination of foods, 1975
36	Thatcher	J appl. Bact. 1963, 26, 268
37	Nickerson	Cit. Da Elliott-Michener 1961
38	Geister	J Milk Technol. 1967, 30, 67
39	Patterson	J Food Technol. 1971, 6, 63
40	Min. Agricult.	Decr. Min. 27.11.1974
41	Elliott-Michener	Appl. Microbiol. 1961, 9, 452
42	Elliott-Michener	Appl. Microbiol. 1961, 9, 452
43	Takacs	Fleischwirtsch. 1969, 49, 193
44	Elliott-Michener	Appl. Microbiol. 1961, 9, 452
45	Takacs	Fleischwirtch. 1969, 49, 193
46	Takacs	Fleischwirtch. 1969, 49, 193
47	Takacs	Fleischwirtch. 1969, 49, 193
48	L.P.I.P.	Protocolli interni per la valutazione delle cariche microbiche, 1980
49	Mossel	Arch. Lebens. 1959, 10, 224
50	Skovgaard	Microbiol. Dried Foods, Utrecht, 1969
51	US Health Public Service	Cit. da Modern Food Microbiol., USA, 1970
52	US Health Public Service	Cit. da Modern Food Microbiol., USA, 1970
53	Surkiewicz	Cit. da Modern Food Microbiology, USA, 1970
54	Surkiewicz	Cit. da Modern Food Microbiology, USA, 1970
55	Surkiewicz	Cit. da Modern Food Microbiology, USA, 1970
56	Surkiewicz	Cit. da Modern Food Microbiology, USA, 1970
57	Jay	Cit. da Modern Food Microbiology, USA, 1970
58	Huber	Cit. da Modern Food Microbiology, USA, 1970
59	Huber	Cit. da Modern Food Microbiology, USA, 1970
60	Huber	Cit. da Modern Food Microbiology, USA, 1970
61	Huber	Cit. da Modern Food Microbiology, USA, 1970
62	Splittstoesser	Cit. da Modern Food Microbiology, USA, 1970
63	Splittstoesser	Cit. da Modern Food Microbiology, USA, 1970
64	Jay	Cit. da Modern Food Microbiology, USA, 1970
65	Weiser	Cit. da Modern Food Microbiology, USA, 1970

66	Surkiewicz	Cit. da Modern Food Microbiology, USA, 1970
67	Lafond-Grellety	Alim. Anim. 1973, 17, 39
68	Lafond-Grellety	Alim. Anim. 1973, 17, 39
69	Lafond-Grellety	Ind. Alim. An. 1973, 5, 17
70	Lafond-Grellety	Ind. Alim. An. 1973, 5, 17
71	Lafond-Grellety	Ind. Alim. An. 1973, 5, 17

MICRORGANISMI PATOGENI E LORO DISTRIBUZIONE PREFERENZIALE NEGLI ALIMENTI

Alcune definizioni

L'ampliamento delle conoscenze scientifiche ha ridimensionato l'uso dei termini *infezione*, *intossicazione*, *tossinfezione*, per cui, oggi, si preferisce parlare, in senso lato, di "malattie di origine alimentare" (*foodborne diseases*).

Secondo le attuali tendenze, nello studio delle malattie trasmesse con gli alimenti viene comunemente accettata la seguente terminologia:

Malattia di origine alimentare

- qualsiasi malattia causata o trasmessa da alimenti. Può trattarsi indifferentemente di agenti chimici o biologici.

Intossicazione alimentare

- malattia prodotta dall'ingestione di una tossina preformata. Le intossicazioni alimentari sono manifestazioni patologiche che si determinano in seguito al consumo di alimenti contenenti tossine prodotte da microrganismi, che si sono moltiplicati sull'alimento precedentemente al consumo. Perché si manifesti l'intossicazione, pertanto, non obbligatoriamente ci deve essere il microrganismo, bensì è indispensabile la presenza della sua tossina. Sono esempi di intossicazione le malattie provocate dalle tossine di *Clostridium botulinum* e di *Staphylococcus aureus.*

Tossinfezione alimentare

- malattia determinata dal consumo di alimenti contenenti sia tossine che batteri. In questo caso, la tossicità è data sia dalle tossine preformate, sia da quelle rappresentate dalle cellule vive ingerite con l'alimento. Sono esempi di tossinfezioni quelle causate da *Bacillus cereus e da Salmonella.*

Infezione alimentare

- malattia causata dall'ingestione di microrganismi vivi che, successivamente, si moltiplicano e invadono l'ospite. L'infezione da *Listeria monocytognes* ne è un esempio.

Forme allergiche

- assunzione di uno specifico composto che scatena una risposta immunitaria.

Le malattie di origine alimentare

Gli alimenti possono provocare malattie quando contengono le seguenti sostanze in quantità sufficienti a determinare un quadro clinico:

- farmaci o stimolatori di crescita presenti nella carne e nei suoi derivati
- pesticidi, metalli pesanti, idrocarburi clorurati presenti nelle piante o negli animali
- conservanti non consentiti (come antibiotici, sodio azide ecc)
- detergenti e disinfettanti
- tossine animali e vegetali
- parassiti
- microrganismi (batteri, funghi, virus)

Fonti di contaminazione

Possono esistere fonti di contaminazione primaria, come la contaminazione degli animali infetti, e di contaminazione secondaria, principalmente rappresentate da feci umane o animali, da mucose, capelli e ferite infette, da terriccio, polvere (come avviene per i germi del botulismo).

Capacità dei microrganismi di provocare malattia

I microrganismi possono mantenere le propria concentrazione nell'alimento, moltiplicarsi, produrre tossine, attaccarsi alle cellule dell'ospite (adesività), diffondere nei tessuti (invasività).

Le **infezioni alimentari** sono provocate da microrganismi invasivi che raggiungono le cellule sensibili dell'ospite attraverso cibi inquinati (come il latte crudo o l'acqua). Tra questi germi si ricordano *Mycobacterium tuberculosis, Brucella, Listeria monocytogenes.*

I germi invasivi provocano infiammazioni localizzate oppure infezioni sistemiche generalizzate, che comportano la diffusione per via ematica, febbre e formazione di anticorpi.

Le **intossicazioni alimentari** sono provocate da tossine esterne al microrganismo (esotossine) che agiscono indipendentemente dalla presenza del germe (esempi tipici *Clostridium perfringens, Clostridium botulinum).*

Le **tossinfezioni alimentari** prevedono la presenza del germe e della sua tossina, come avviene per i batteri Gram-negativi (ad esempio, le salmonelle) che possiedono endotossine di origine polisaccaridica e lipidica. Dopo la morte della cellula batterica, le endotossine vengono liberate e la loro azione provoca diarrea, febbre, ipotensione e altri disturbi.

I batteri Gram-positivi (come *Staphylococcus aureus* o *Clostridium botulinum*) producono delle esotossine che si localizzano nell'intestino o nel sistema nervoso. Alcune esotossine sono relativamente resistenti al calore.

Perché si manifesti la malattia o l'intossicazione, è necessario il concorso di una serie di condizioni a ciò favorevoli, relative al potere patogeno del microrganismo e alla conseguente virulenza, alla carica microbica, alla reazione difensiva dell'ospite, alle condizioni esterne.

- il **potere patogeno** è il complesso delle caratteristiche che rendono un microrganismo potenzialmente in grado di provocare malattia. La misura del potere patogeno si definisce come **virulenza**.
- la **dose** infettante è la quantità minima di un microrganismo in grado di causare la malattia (per la salmonella, si ritiene che occorrano più di 100 cellule, per *Bacillus cereus* 10.000, per *Clostridium perfringens* un milione).
- le **reazioni difensive** dell'ospite sono costituite da mucose, succo gastrico, flora intestinale, sistema immunitario. I fattori predisponenti comprendono l'età (bambini e anziani sono gli individui più a rischio), le malattie intercorrenti, la denutrizione, i trattamenti farmacologici, le variazioni climatiche. Alcuni microrganismi saprofiti possono diventare patogeni occasionalmente, come per esempio, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter*.
- le **condizioni esterne** riguardano la tendenza alla concentrazione delle produzioni alimentari, l'espansione della ristorazione collettiva, l'incremento delle attività legate al turismo. Le cause principali delle malattie di origine alimentare sono però legate alla cottura insufficiente dei cibi, al loro mancato mantenimento a temperatura adeguata una volta cotti, cioè in frigorifero sotto i +4°C o in scaldavivande sopra i +65°C, alla scarsa igiene nelle cucine con conseguenti contaminazioni crociate tra alimenti crudi inquinati e cibi cotti pronti per il consumo.

Alcune misure preventive suggerite contro le forme predette

Gli Autori sono concordi nel riassumere i consigli restringendo a quattro i momenti da controllare:

- la conduzione della produzione con criteri d'igiene, sia che si tratti di allevamento di animali da carne o da latte, sia delle colture di prodotti vegetali
- le contaminazioni crociate nel percorso della trasformazione o della raccolta
- il trattamento termico (cottura, pasteurizzazione, sterilizzazione) per i prodotti da bonificare
- la conservazione dell'alimento pronto per essere servito a temperature basse (refrigerazione, congelamento) o, al contrario, elevate (sopra i +65°C).

BIBLIOGRAFIA CONSULTATA

Cevenini R., Microbiologia clinica, Piccin, Padova, 2002
Javetz, Melnick, Adelberg's, Microbiologia medica, 21° Ed. italiana, Piccin, Padova, 2001
Murray P.R., Rosenthal K.S., Kabayashi G.S., Pfaller M.A., Microbiologia, 2° Ed. italiana, EdiSes, Napoli, 2003
Poli G., Cocilovo A., Microbiologia e immunologia veterinaria, UTET, Torino, 1996

PRINCIPALI AGENTI EZIOLOGICI DI MALATTIE INFETTIVE LEGATE AD ALIMENTI

Batteri patogeni

Salmonella spp.
Clostridium botulinum
Staphylococcus aureus
Campylobacter jejuni e *coli*
Yersinia enterocolitica
Yersinia pseudotuberculosis
Listeria monocytogenes
Vibrio cholerae O1
Vibrio cholerae non-O1
Vibrio parahaemolyticus
Altri vibrioni alofili correlati
Vibrio vulnificus
Clostridium perfringens
Bacillus cereus
Aeromonas hydrophila e altre spp.
Plesiomonas shigelloides
Shigella spp.
Streptococcus
Vari germi enterici patogeni occasionali

Gruppo degli Escherichia Coli Enterovirulenti (EEC)

Escherichia coli - enterotossigeni (ETEC)
Escherichia coli - enteropatogeni (EPEC)
Escherichia coli O157:H7 enteroemorragici (EHEC)
Escherichia coli - enteroinvasivi (EIEC)

Protozoi e altri parassiti

Cyclospora cayetanensis
Anisakis sp. e vermi correlati
Diphyllobothrium spp.
Nanophyetus spp.
Eustrongylides sp.
Acanthamoeba e altre amebe
Ascaris lumbricoides
Trichuris trichiura
Giardia lamblia
Entamoeba histolytica
Cryptosporidium parvum

Virus

Epatite A virus
Epatite E virus
Rotavirus
Norwalk virus (gruppo)
Altri agenti virali (*Polio-, Echo- Coxsachie-, Corona-, Astro-* e *Parvovirus*)

Tossine naturali

Ciguatera
Tossine dei molluschi (PSP, DSP, NSP, ASP)
Veleni da sgombridi
Tetrodotossine (Pesce palla)
Tossine fungine
Aflatossine
Alcaloidi pirrolizidine
Fitoemoagglutinine (*Red kidney bean poisoning*)
Tossine del miele

Altri agenti patogeni

Prioni (BSE)

Alcune patologie, a causa della loro frequenza e diffusione in ogni parte del mondo, meritano qualche approfondimento. Da uno studio di Rayan *e Coll*. (1996), effetuato in Inghilterra per conto del Public Health Laboratory Service (PHLS), risulterebbe che la distribuzione dei focolai di malattie batteriche veicolate da alimenti mostra la sua massima incidenza negli esercizi pubblici (37%), contro il 17% riscontrabile nelle case private.

Sempre dagli stessi Autori viene esposta una classifica di frequenza degli agenti causali di malattia nell'arco di un anno. Essa mette al primo posto le salmonelle (77% dei focolai), mentre molto distanziati si trovano, nell'ordine, i virus (5%), *Clostridium perfringens* (4%), *Bacillus cerus* (2%), *Campylobacter* ed *Escherichia coli* (1%).

Nella breve trattazione che segue, sono state escluse le malattie a eziologia parassitaria e virale, per le quali si rimanda, rispettivamente, al testo di Rondanelli *e Coll.* (2006) e alla rassegna di Scipioni *e Coll*. (2000) e di Lopman *e Coll*. (2003).

Non va dimenticato che lo studio di un gruppo ristretto di malattie enteriche a trasmissione oro-fecale (qui di seguito affrontato per primo) ha contribuito in maniera massiccia a costruire le fondamenta della moderna microbiologia intesa come scienza.

TOSSINFEZIONE DA *SALMONELLA*

Le salmonelle hanno un *optimum* di crescita di +37°C, si riproducono al di sopra di +7°C, non sopravvivono alla pasteurizzazione. Sono microrganismi praticamente ubiquitari e veicolati da animali e vegetali, tra cui primeggiano il pollame, i suini e i bovini (in particolare i vitelli).

Nessun tipo di alimento può essere considerato indenne da salmonelle. Un tipo di ciclo di diffusione molto accreditato inizia dai mangimi contaminati, prosegue negli allevamenti, arriva nei macelli. Qui avviene la contaminazione superficiale delle carni in seguito a rottura dell'intestino durante le operazioni di eviscerazione e, nei volatili, anche in concomitanza con la spennatura.

Altre fonti di contaminazione sono costituite dai molluschi, dalle verdure irrigate con liquami, dalle uova e dai suoi derivati (creme crude, maionese, gelati), dagli insaccati non stagionati (salsicce). Elementi comuni sono quasi sempre la mancata cottura, la contaminazione crudo-cotto, la conservazione a temperatura inadeguata.

La gastroenterite da salmonelle si manifesta, dopo 24-48 ore d'incubazione, con diarrea e febbre e si comporta da tossinfezione, poiché i germi producono un'enterotossina termolabile. Sono possibili complicazioni, come infezioni generalizzate negli individui a rischio (bambini e anziani). L'eliminazione delle salmonelle attraverso le feci o le urine può durare per alcune settimane, dando luogo al fenomeno del "portatore", rischioso per la diffusione del contagio.

Attualmente, il peso della salmonellosi non risiede nella gravità della malattia, ma nell'insorgenza di ceppi resistenti agli antibiotici (quindi più difficili da curare), come già avvenuto in Europa per i sierotipi *S. enteritidis* PT4 e *S. typhimurium* DT 104.

Un caso a parte è rappresentato dalla *Salmonella typhi* che provoca il tifo addominale, per l'insorgenza del quale bastano poche cellule infettanti (100-1000). La fonte di contagio è costituita dall'uomo. Il periodo di incubazione arriva a due settimane, mentre il quadro clinico, sempre grave, è caratterizzato da febbre a 40°C e interessamento del fegato e della milza. Nel tifo, si formano anticorpi circolanti e lo stato di portatore può durare anni o tutta la vita.

Negli altri casi, la salmonellosi è solitamente un'infezione localizzata all'intestino e non provoca immunizzazione. La diagnosi si consegue attraverso esami di laboratorio su feci, tamponi, alimenti.

TOSSINFEZIONE DA *SHIGELLA*

Le shigelle sono germi Gram-negativi, patogeni solo per l'uomo. Sono immobili, lattosio negativi, simili alle salmonelle per esigenze colturali e metodi d'indagine in laboratorio. In Europa, sono presenti le specie *S. sonnei* e *S. flexneri*. Altrove, sono prevalenti *S. boydii e S. dysenteriae. S. sonnei* è patogena in fase liscia (S) e può mutare rapidamente nella fase rugosa (R) non patogena. La fonte di contagio delle shigelle è costituita dalle feci umane e la trasmissione avviene per passaggio tra uomo e uomo, anche attraverso oggetti, stoviglie, cibi contaminati o attraverso le mosche. La via d'ingresso è costituita dalla bocca, mentre il luogo principale dove questi microrganismi si moltiplicano è rappresentato dall'intestino crasso.

Il periodo di incubazione della malattia varia da 2 a 7 giorni. Le shigelle provocano una forma gastroenterica, il cui sintomo principale è dato dalla diarrea. Talvolta, per azione del-

l'endotossina batterica e di una esotossina, possono comparire delle complicazioni, rappresentate, prevalentemente, da ulcerazioni della mucosa intestinale e da peritonite.

La risposta immunitaria nei confronti delle shigelle è scarsa e la diagnosi si basa sull'esecuzione di indagini di laboratorio, in particolare sull'isolamento delle shigelle dalle feci.

MALATTIE DA *ESCHERICHIA COLI*

Escherichia coli è un germe Gram-negativo commensale dell'intestino, che può diventare patogeno e provocare malattie, anche gravi, in soggetti immuno-compromessi. La classificazione dei ceppi di *E. coli* in gruppi è ancora incompleta e contraddittoria. Alcune patologie sostenute da questo microrganismo sono elencate di seguito.

Diarrea dei viaggiatori

Si tratta di una patologia che si trasmette attraverso acqua, verdure o altri alimenti contaminati da feci. I ceppi microbici coinvolti, detti enterotossici (ETEC), sono comuni all'uomo e agli animali giovani (vitelli, suinetti) e possiedono la capacità di fissarsi sulla mucosa dell'intestino tenue per il tramite di fimbrie o pili (proprietà adesiva), riuscendo così a penetrare nelle cellule della mucosa (proprietà invasiva). Producono due tossine (termostabile ST e tremolabile LT), che stimolano l'enzima adenilciclasi con conseguente perdita di liquidi dalla mucosa intestinale e diarrea.

Infezioni da E. coli *enteroemorragici*

Si tratta di particolari sierotipi, detti EHEC, tra i quali figura *E. coli* O157:H7, isolati da casi di colite emorragica e di sindrome emolitico-uremica (HUS). La loro trasmissione è spesso collegata al consumo di carni, latte e altri alimenti.

Infezioni da E. coli *enteroaggregativi* (O126)

Questo particolare sierotipo di *E. coli*, assieme ad altri definiti come EAEC, possiede la prerogativa di aderire, *in vitro,* alle cellule Hep-2 e di essere svelato con la PCR mediante un *primer* specifico per un plasmide che governa la proprietà aggregativa. In Israele, è stato isolato, nel corso di uno specifico studio, da almeno 17 bambini di età compresa fra 1 settimana e 21 mesi, ricoverati con diarrea che si protraeva per almeno 5 giorni. La sintomatologia diarroica si accompagnava a febbre alta (38,7 - 40 °C) e, in alcuni casi, ad altre patologie concomitanti, tra cui malassorbimento, tonsillite, otite, infezioni del tratto urinario, meningite.

Esistono altri sierotipi patogeni di *E. coli* che vengono classificati nel gruppo degli enteroaggregativi (EAEC) e che corrispondono, sierologicamente, ai sierotipi O111:H21, O125, O44:H18, O?:H10. Si ritiene che i ceppi enteroaggregativi rappresentino circa il 6% dei ceppi diarrogenici di *E. coli* e che il sierotipo O126:H27 sia, tra tutti, il più frequente.

TOSSINFEZIONI DA *YERSINIA ENTEROCOLITICA*

Yersinia enterocolitica è un germe psicrofilo (può sviluppare a temperatura di frigorifero) e proviene dalle feci dell'uomo e degli animali. E' un batterio Gram-negativo simile alle *Enterobacteriaceae*, invasivo, capace di produrre un'enterotossina. Ne esistono diversi sierotipi e solo alcuni sono riconosciuti patogeni (O3 e O9 in Europa).

Il periodo di incubazione della malattia sostenuta da *Y. enterocolitica* e i sintomi relativi sono molto simili a quelli della salmonellosi. Una delle possibili complcazioni dell'infezione è rappresentata dall'appendicite.

TOSSINFEZIONI DA *VIBRIO CHOLERAE*

Vibrio cholerae è un bacillo Gram-negativo, mobile, che sviluppa bene a *p*H alcalino (8,5-9,0), caratterizzato dalla presenza dell'antigene somatico O1. Si conoscono, tuttavia, altri sierotipi patogeni, tra cui il ceppo O136. Dal punto di vista biochimico, *V. cholerae* O1 è simile a *Vibrio cholerae* El Tor (un altro biotipo) e si classifica in tre sottobiotipi *(Inaba, Ogawa e Hikojima*), agglutinabili mediante altrettanti sieri diagnostici.

L'*habitat* caretteristico è costituito dalle feci dei soggetti ammalati o dei portatori. Le vie di contagio principali sono rappresentate dall'acqua e dalle verdure lavate con acque infette, come pure dai molluschi allevati in acque contaminate

V. cholerae infetta l'ospite per via orale, aderisce alla mucosa dell'intestino tenue ed è in grado di elaborare un'enterotossina termolabile, simile a quella prodotta delle shigelle o da *E. coli.* Il periodo di incubazione della malattia è di 2-5 giorni e il quadro clinico caratteristico è rappresentato da un'enterite acuta, con diarrea acquosa che può portare a collasso ipovolemico letale. La malattia è endemica in Asia (soprattutto in India e in Bangladesh) e in Africa, mentre è divenuta ormai rara in Europa.

TOSSINFEZIONI DA VIBRIONI ALOFILI

I vibrioni alofili possiedono un *optimum* di crescita che si situa al di sopra di 15 °C. La loro diffusione all'uomo è legata, principalmente, al consumo di prodotti della pesca mangiati crudi o poco cotti (questa usanza alimentare è diffusa soprattutto in Asia e, in particolare, in Giappone). Provocano una malattia caratterizzata da vomito e diarrea, che compare dopo un'incubazione variabile tra 2 e 48 ore.

I microrganismi responsabili di queste forme morbose sono rappresentati, principalmente, da *Vibrio parahaemolyticus, Vibrio fluvialis, Vibrio alginolyticus*.

TOSSINFEZIONI DA *AEROMONAS* E *PLESIOMONAS*

L'*habitat* preferenziale di questi microrganismi Gram-negativi è rappresentato dalll'acqua e le tossinfezioni da essi sostenute sono soprattutto legate al consumo di prodotti ittici nei mesi caldi. *Aeromonas hydrophila* elabora una tossina simile a quella prodotta dal vibrione del colera, che può rendersi responsabile di diarrea. Il microrganismo, inoltre, può causare infezioni ospedaliere per contaminazione di ambienti e di apparecchiature. *Plesiomonas shigelloides* provoca gastroenterite.

TOSSINFEZIONI DA *CAMPYLOBACTER JEJUNI* E *C. COLI*

SI tratta di bacilli Gram-negativi curvi, microaerofili (richiedono il 5-10% di CO_2 per sviluppare). Il loro *habitat* preferenziale è costituito dall'intestino degli animali, da cui, per scarsa igiene, possono raggiungere gli alimenti, attraverso contaminazione delle carni o di altre materie prime. Possono sopravvivere anche a temperatura di frigorifero, senza moltiplicarsi. La malattia sostenuta dai campilobatteri è caratterizzata da un'infiammazione dell'ileo e del colon.

I campilobatteri producono due tossine, una citotossina ed un'enterotossina. Quest'ultima, come nel colera, si lega alle cellule della mucosa intestinale e, attivando l'adenilciclasi, pro-

voca forti diarree, anche ematiche, dopo un periodo di incubazione di 1-7 giorni. E' possibile anche la comparsa di febbre alta, vomito, colica e passaggio dei microrganismi nei linfonodi meseraici, con sviluppo di appendicite, adenite, meningite, infezioni delle vie urinarie.

In base a satistiche inglesi, il principale responsabile di malattie infettive a localizzazione intestinale sarebbe *Campylobacter jejuni*. Poca enfasi, invece, viene assegnata a un'altra specie, C*ampylobacter coli*, che occuperebbe il secondo posto in classifica per numero di soggetti colpiti. Per questo patogeno umano, si calcola che, nell'anno 2000, ci siano state 12.000 persone affette da disturbi che si sono rivolte al medico, 1.000 ricoveri ospedalieri, 4.000 giornate di ospedalizzazione e 11 decessi. Si suppone che la trasmissione di *C. coli* sia simile a quella del più conosciuto *C. jejuni*, ma, in realtà, mancano studi epidemiologici che spieghino le effettive modalità dell'infezione.

INTOSSICAZIONE DA *CLOSTRIDIUM BOTULINUM*

Clostridium botulinum è un bacillo Gram-positivo anaerobio obbligato, il cui habitat principale è rappresentato dal terreno. Forma spore ovali sub-terminali, in grado di resistere a 90 °C per 5 minuti, a valori di *p*H di 4,5 e a una A_w di 0,95. *C. botulinum* elabora tossine differenziabili sierologicamente nei tipi A-G. Nella forma vegetativa, si moltiplica a partire da +10 °C.

Le spore germinano in anaerobiosi (come nelle conserve chiuse) o in condizioni di scarso ossigeno (interno di carni o in alimenti inquinati da germi che consumano l'ossigeno), formando tossina, se la temperatura è adeguata (*optimum* a +30°C).

Gli alimenti spesso responsabili di casi di botulismo sono rappresentati da:

- conserve vegetali leggermente acide (*p*H >4,5) preparate in casa (fagioli, melanzane, peperoni), riscaldate a non oltre 100 °C, contaminate da terra (spore) e conservate fuori dal frigorifero
- salsicce casalinghe cotte (sanguinaccio, salsiccia di fegato), preparate con sangue e cotenne inquinate e non trattate sufficientemente con nitrito di sodio
- alimenti sotto sale (prosciutto crudo), con diffusione troppo lenta del sale durante la salagione
- pesci marinati o fermentati (con spore e scarsa o troppo lenta acidificazione).

Le tossine sono proteine inattivabili dall'ebollizione (a 70-80 °C, tuttavia, le tossine resistono fino a 30'), capaci di bloccare l'acetilcolina nel sistema nervoso periferico, impedendo la trasmissione degli impulsi nervosi. L'incubazione della malattia è di 12-36 ore (raramente da 4 ore a 4 giorni). I sintomi principali sono rappresentati da nausea, vomito, disturbi gastroenterici, diplopia, fotofobia, essiccamento delle mucose, blocco della salivazione, paralisi respiratoria e polmonite.

INTOSSICAZIONE DA *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*

Clostridium perfringens è un microrganismo Gram-positivo anaerobio che vive nelle feci dell'uomo (fino a 10.000 germi/g) e degli animali e nel terreno. Forma spore che germinano a temperatura ambiente o dopo riscaldamento moderato (*shock* termico), come avviene nei cibi preparati, lasciati fuori dal frigorifero e poi riscaldati.

Le cellule vegetative nate dalla germinazione delle spore raggiungono l'intestino con il cibo inquinato, si moltiplicano a livello di mucosa e formano nuove spore. Nel corso della sporulazione, si producono enterotossine di natura proteica sierologicamente differenziate nei tipi A-D.

La malattia ha un'incubazione variabile da 8 a 20 ore e si presenta con con diarrea e dolori addominali. La diagnosi consiste nella ricerca quantitativa di *C. perfringens* nelle feci o nell'alimento e risulta significativa se la concentrazione del microrganismo risulta maggiore di 1 milione di germi/grammo.

TOSSINFEZIONE DA *BACILLUS CEREUS*

Bacillus cereus è un germe Gram-positivo aerobio a forma di grosso bastoncino, che forma spore molto resistenti al calore. Sviluppa tra +10 e +48°C, con *optimum* intorno a +30°C. Il suo *habitat* è rappresentato dal terreno. Gli alimenti più frequentemente inquinati, e come tali possibili fonti di tossinfezioni, sono rappresentati dai vegetali ricchi di amido (come il riso, le verdure, le spezie), specialmente quando si tratta di preparazioni alimentari già cotte e lasciate raffreddare a temperatura ambiente e sottoposte, in seguito, a un secondo riscaldamento, che facilita la sporulazione.

Perché si produca la tossinfezione, occorrono concentrazioni di 10^5-10^6 germi per grammo di alimento. Il periodo di incubazione è di 8-16 ore e la sintomatologia può essere dominata da due manifestazioni distinte, la diarrea o il vomito, a seconda della presenza della tossina diarroica oppure di quella emetica. In quest'ultimo caso, l'incubazione può essere estremamente breve (anche solo di mezz'ora e fino a 6 ore).

INTOSSICAZIONE DA *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Staphylococcus aureus si presenta come un cocco sferico Gram-positivo, immobile, che cresce fra +6,5 e +46°C, con *optimum* attorno a +37°C. In laboratorio, nelle brodocolture, esso appare, al microscopio, in forma di caratteristici ammassi a grappolo. È un germe piogeno, che si rende responsabile, solitamente, di infiammazioni locali non gravi (foruncoli e ascessi). Talvolta, tuttavia, può provocare infezioni post-operatorie e infezioni generalizzate. Produce esotossine di natura proteica, classificate, sierologicamente, da A a E, dotate di una notevole resistenza al calore (un'ora a 100°C). *S. aureus* riesce a produrre tossina da +10°C fino a +45°C, in ambienti con *p*H fino a 4,8, oppure con valori di A_w ridotti fino a 0,86. La massima produzione di tossina si ottiene a una temperatura di sviluppo di circa +37°C e in un mezzo con *p*H pari a 6-7.

Lo stafilococco può inquinare gli alimenti partendo, generalmente, da mani sporche, dal naso, dalla saliva, da ferite e suppurazioni. È rara una contaminazione da latte mastitico. Gli alimenti che risultano più frequentemente inquinati sono quelli molto ricchi di proteine e zuccheri, ad esempio contenenti uova, creme, salse, ripieni, formaggio. Altri alimenti sovente chiamati in causa sono rappresentati dai pesci e dagli insaccati (prosciutto cotto, insaccati misti), in quanto caratterizzati da un alto contenuto d'acqua.

L'incubazione della malattia è di 1-6 ore e i sintomi caratteristici sono rappresentati da nausea, vomito, diarrea. La diagnosi si avvale del conteggio di *Staphylococcus aureus* nell'alimento (significativo quando supera valori di 10^6 per grammo), seguito da prove indirette di patogenicità (*test* della coagulasi con plasma di coniglio, della DNA-si e della termonucleasi).

Si ricorda, tuttavia, che assume un valore indiscutibile per la diagnosi solamente la dimostrazione della presenza di tossina preformata nel campione di alimento, effettuabile con *test* immunoenzimatici tipo ELISA o *Reverse Passive Latex Agglutination*, direttamente su estratti del campione alimentare.

INFEZIONI DA *LISTERIA MONOCYTOGENES*

Listeria monocytogenes è un microrganismo largamente distribuito in natura (dall'Artico ai Tropici), isolato da acque, liquami, suolo, vegetazione, feci animali. È un bastoncino Gram-positivo, aerobio, mobile a 20-25°C, resistente a *p*H compresi tra 4,8 e 9 e in grado di crescere a livelli di A_w superiori a 0,93. Il microrganismo viene inattivato dai comuni disinfettanti e da diversi antibiotici, quali ampicillina e tetraciclina.

Il periodo di incubazione della malattia che esso sostiene varia da 1 a 4 settimane. La malattia può manifestarsi con aborto nella donna gravida, meningite nel neonato e negli anziani, forme gravi e talora mortali nelle persone più debilitate o già colpite da altre patologie.

Dal 1950, si è sospettato un collegamento della listeriosi con gli alimenti e, da allora, sono stati studiati con maggiore attenzione casi d'infezione veicolati da latte crudo, derivati del latte non pasteurizzato (gelati, formaggi erborinati), vegetali e carni consumati crudi. I focolai finora descritti sono relativamente pochi e colpiscono un numero basso di individui (inferiore a 1 per milione d'abitanti in Europa), ma spesso con forme gravi ed elevata mortalità. In numerosi paesi europei, le disposizioni di legge tollerano determinati livelli di contaminazione da *L. monocytogenes* negli alimenti.

INFEZIONI DA *BRUCELLA*

Le brucelle sono cocco-bacilli Gram-negativi, immobili, aerobi o microaerofili. Sono patogeni molto importanti per gli animali domestici, in particolare per il bovino (*B. abortus*), per gli ovi-caprini (*B. melitensis*) e per il maiale (*B. suis*). Possono interessare l'uomo attraverso il latte non pasteurizzato o i formaggi prodotti con latte di stalla non pasteurizzato (pecorino, caprino). L'incubazione della malattia è di 1-3 settimane.

L'infezione da *B. melitensis* si presenta come una grave forma tifoide, con febbre alta che persiste a lungo (febbre maltese), mentre *B. abortus* provoca attacchi febbrili di breve durata (febbre ondulante), che si ripetono, se non trattati, per mesi o per anni.

La diagnosi è sierologica nel paziente e batteriologica nell'alimento. Per la diagnosi nel latte, è usato il *Ring Test.*

INTOSSICAZIONI ALIMENTARI PROVOCATE DA TOSSINE DIVERSE

Si ricordano le malattie provocate da **micotossine** (aflatossine e ocratossine prodotte da Aspergilli nelle arachidi e nei cereali; alcaloidi della segale cornuta prodotte da *Claviceps purpurea*, agente eziologico del cosiddetto "fuoco di S. Antonio" o ergotismo; patulina prodotta da Aspergilli e Penicilli nella frutta; zearalenone prodotto da *Fusarium* nei cereali). Le tossine prodotte da funghi o miceti (dette micotossine) sono pericolose perché resistono alla pasteurizzazione. Per distruggerle, è necessario ricorrere all'autoclavatura a 120 °C o all'estrazione con soda caustica, come avviene nel procedimento di raffinazione degli olii alimentari da semi.

Le aflatossine possono provocare degenerazione epatica ed effetti teratogeni (malformazioni e morte del feto) e cancerogeni. La patulina può dare disturbi intestinali ed emorragie. L'ocratossina è responsabile di enteriti, necrosi, effetti teratogeni. Lo zearalenone ha azione estrogena sugli animali e può provocare, nell'uomo, indebolimento del sistema emopoietico.

Altre sostanze ad azione tossica legate ai batteri (come E*nterobacteriaceae, Bacillus*, *Clostridium, Pseudomonas, Streptococcus*) sono le **ammine biogene,** cataboliti tossici prodotti

per decarbossilazione degli aminoacidi. I prodotti tossici sono principalmente l'istamina e la tirosina.

L'intossicazione da ammine biogene presenta un'incubazione molto breve (30'-1 ora) e si manifesta con cefalea, vomito, dolori addominali, disturbi circolatori, arrossamento della cute. Spesso, la causa è riconducibile al deterioramento batterico dei cibi ricchi di aminoacidi istidina (come avviene nel tonno e negli sgombri), oppure di aminoacidi del formaggio e degli insaccati crudi stagionati a lungo.

La diagnosi (dosaggio delle micotossine e delle ammine biogene come istamina e tirosina) avviene esclusivamente con metodi chimici.

BIBLIOGRAFIA CONSULTATA

Altekruse S.F. *e Coll*., Consumer knowledge of foodborne microbial hazards and food-handling practices, J. Food Protect. 1996, *59*, 287-294

Lopman B.A. *e Coll*., Viral gastroenteritis outbreaks in Europe, 1995-2000, Emerging Inf. Dis. 2003, *9*, 90-96

Mossel D.A.A. *e Coll*., Identification, assessment and management of food-related microbiological hazards: historical, fundamental and physico-social essentiels, Int. J. Food micr. 1998, *39*, 19-51

Rondanelli E.G., Felice G., Minoli L., Vademecum di malattie infettive, Selecta Medica, Pavia, 2006

Ryan M.J. *e Coll*., Risk factors for outbreaks of intestinal disease linked to domestic catering, PHLS 1996, *6*, 179-183

Scipioni A. *e Coll*., La contamination de l'eau et des aliments par les virus pathogènes pour l'homme, Ann. Med. Vet. 2000, *144*, 207-221

Vivares C.P., Dinoflagellates et biotoxines dans les coquillages, Inf. Tech. Ser. Vet. 1993, 114, 249-263

DIAGNOSI PRESUNTIVA DI MALATTIA DI ORIGINE ALIMENTARE

Non sempre i campioni prelevati in occasione di episodi di malattia di origine alimentare giungono al laboratorio corredati da adeguate informazioni anamnestiche, tali da orientare il ricercatore sulla scelta delle analisi da iniziare. L'esperienza ha dimostrato che la notizia più utile a questo proposito è rappresentata dal *tempo intercorso* tra il pasto e la comparsa di sintomi clinici caratteristici. Sulla base di questa indicazione, diventa possibile passare in rassegna gli *agenti patogeni* capaci di scatenare la malattia entro quei tempi d'incubazione e con quei segni clinici. Infine, è opportuno considerare gli *alimenti consumati* da tutte le persone colpite per vedere se si tratta di veicoli sospettabili.

La tabella che segue può aiutare il laboratorista a orientarsi per restringere il più possibile il ventaglio delle analisi microbiologiche da eseguire, tenuto conto che, spesso, il campione non è abbondante e le prove, se numerose, possono diventare impegnative per tempi e costi.

Tempo medio di insorgenza dei sintomi	***Sintomatologia predominante***	***Organismi, tossine e sostanze associate***
Sintomatologia iniziale o prevalente a carico del tratto gastro-intestinale superiore (nausea, vomito)		
1-6 h (media 2-4)	Nausea, vomito, conati, diarrea, dolori addominali, prostrazione	*Staphylococcus aureus* e sue enterotossine
8-16 h (media 2-4)	Vomito, crampi addominali, diarrea, nausea	*Bacillus cereus*
6-24 h	Nausea, vomito, diarrea, sete, dilazione delle pupille, collasso, coma	Funghi della specie *Amanita*
Bocca secca e sintomi respiratori		
12-72 h	Bocca secca, febbre, nausea, vomito, rinorrea, talvolta raucedine	*Streptococcus pyogenes*
2-5 giorni	Bocca e naso infiammati, essudato grigiastro diffuso, febbre, raffreddore, secchezza delle fauci, malessere, difficoltà nel deglutire, edema dei linfonodi cervicali	*Corynebacterium diphtheriae*
Sintomatologia iniziale o prevalente a carico del tratto intestinale inferiore (crampi addominali, diarrea)		
2-36 h (media 6-12)	Crampi addominali, diarrea (anche con desquamazione se associata a *Clostridium. perfringens*), talvolta nausea e vomito	*Clostridium perfringens, Bacillus cereus, Streptococcus faecalis* e *faecium*
12-74 h (media 18-36)	Crampi addominali, diarrea, vomito, febbre, brividi, malessere, nausea, eventuale emicrania. Possibile diarrea mucosa o sanguinolenta, lesioni cutanee se da *Vibrio vulnificus*. *Yersinia enterocolitica* assomiglia a raffreddore e attacco d'appendicite	*Salmonella* spp. e *Salmonella arizonae*, *Shigella*, *Escherichia coli* enteropatogeni, altre *Enterobacteriaceae*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Aeromonas hydrophila*, *Plesiomonas shigelloides*, *Campylobacter jejuni*, *Vibrio cholerae* (O1 e non-O1) *Vibrio vulnificus*, *Vibrio fluvialis*

Tempo medio di insorgenza dei sintomi	*Sintomatologia predominante*	*Organismi, tossine e sostanze associate*
3-5 giorni	Diarrea, febbre, vomito dolori addominali, sintomi respiratori	*Virus* enterici
1-6 settimane	Diarrea mucosa (feci grasse), dolori addominali, perdita di peso	*Giardia lamblia*
Da 1 a più settimane	Dolori addominali, diarrea, costipazione, emicrania, sonnolenza, ulcere in maniera variabile e spesso asintomatica	*Entamoeba histolytica*
3-6 mesi	Nervosismo, insonnia, rifiuto del cibo, anoressia, perdita di peso, dolori addominali, talvolta gastroenterite	*Taenia saginata, Taenia solium*
Sintomi neurologici (disturbi della vista, vertigini, formicolio, paralisi)		
Meno di 1 h	Sintomi gastrointestinali e neurologici	Tossine da molluschi
	Eccessiva salivazione, perspirazione, gastroenterite, polso irregolare, pupille ristrette, respiro asmatico	Funghi del tipo *Muscaria*
	Formicolio e torpore, vertigini, pallore, emorragia gastrica, desquamazione della cute, sguardo fisso, perdita dei riflessi, spasmi, paralisi	Tossina da tetrodontidi (tetrodotossina)
1-6 h	Formicolio e torpore, gastroenterite, vertigini, bocca secca, dolori muscolari, pupille dilatate, ambliopia, paralisi	Tossina ciguatera
Da 2 h a 6 gg., (più spesso 12-36 h)	Vertigini, diplopia o ambliopia, perdita dei riflessi alla luce, difficoltà nel deglutire, parlare e respirare, bocca secca, debolezza, paralisi respiratoria	*Clostridium botulinum* e sue neurotossine
Sintomi allergici (rossore al viso e prurito)		
Meno di 1 h	Mal di testa, vertigini, nausea, vomito, gusto pungente, gola secca, gonfiore del viso e vampate, dolori di stomaco, prurito	Istamina da moltiplicazione batterica generica, ad esempio nel pesce (tonno, sgombri, ecc)
Sintomi da infezione generalizzata (febbre, brividi, malessere, prostrazione, dolori, ingrossamento dei linfonodi)		
4-28 giorni (media 9)	Gastroenterite, febbre, edema oculare, perspirazione, dolori muscolari, brividi, prostrazione, respirazione faticosa	*Trichinella spiralis*
7-28 giorni (media 14)	Malessere, emicrania, febbre, tosse, nausea, vomito, costipazione, dolori addominali, brividi, macchie rosse, feci sanguinolente	*Salmonella typhi*
10-13 giorni	Febbre, mal di testa, mialgia, tosse	*Toxoplasma gondii*

Tempo medio di insorgenza dei sintomi	*Sintomatologia predominante*	*Organismi, tossine e sostanze associate*
10-50 giorni. (media 25-30)	Febbre, malessere, stanchezza, anoressia, nausea, dolori addominali, ittero	Agenti eziologici non ben identificati, probabilmente virali
Periodo variabile a seconda della specifica malattia	Febbre, brividi, mal di testa, dolori articolari, prostrazione, malessere, linfonodi ingrossati e altri sintomi specifici delle varie malattie	*Bacillus anthracis, Brucella melitensis, Brucella abortus, Brucella suis, Coxiella burnetii, Francisella tularensis, Listeria monocytogenes, Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium* spp., *Pasteurella multocida, Streptobacillus moniliformis, Campylobacter jejuni, Leptospira* spp.
Sintomi gastrointestinali e/o neurologici (tossine da molluschi)		
Da 0,5 a 2 h	Formicolio, bruciore, torpore, sonnolenza, linguaggio incoerente, paralisi respiratoria	*Paralytic Shellfish Poisoning* (PSP) (saxitoxina)
Da 2-5 minuti fino a 3-4 h	Sensazione alternata di caldo e freddo, formicolio; intorpidimento delle labbra, lingua e bocca; dolori muscolari, vertigini, diarrea, vomito	*Neurotoxic Shellfish Poisoning* (NSP) (brevetossine)
Da 30 minuti fino a 2-3 h	Nausea, vomito, diarrea, dolori addominali, brividi, febbre	*Diarrhoetic Shellfish Poisoning* (DSP) (*dinophysis* tossina, acido okadaico, pectenotossina, yessotossina)
Da 24 h (gastrointestinali) a 48 h (neurologici)	Vomito, diarrea, dolori addominali, stato confusionale, perdita della memoria, disorientamento, attacco apoplettico, coma	*Amnesic Shellfish Poisoning* (ASP) (acido domoico)

RICERCHE BATTERIOLOGICHE NEI CASI DI INTOSSICAZIONE O TOSSINFEZIONE ALIMENTARE

Campionamento adeguato alle possibili cause e analisi mirate

Dalle statistiche si può evincere che gli episodi più frequenti di malattie veicolate da alimenti possono essere ricondotti a un numero ristretto di agenti causali. Pertanto, anche le analisi di laboratorio si riducono spesso alle stesse ricerche (divenute classiche) condotte sia su campioni clinici (rappresentati soprattutto da feci e da tamponi rettali dei pazienti e, spesso, anche del personale addetto alle cucine) che su campioni di alimenti (residui di pasto e cibi della stessa provenienza di quelli consumati).

La tabella seguente, desunta da Rondanelli *e Coll*. (2006) e modificata, traccia un riassunto delle situazioni più frequenti.

Agente	Alimento più frequente	Incubazione (ore)	Tossine	Sintomatologia	Durata giorni	Campioni per analisi
Bacillus cereus	Pasta o riso riscaldati, crema	2 (1-16)	Emetica termostabile	Vomito, crampi addominali, diarrea	0,4 (0,2-0,5)	Vomito, feci, cibo
Bacillus cereus	Polpette, carne bollita, pollo arrosto	9 (6-14)	Diarroica termostabile	Vomito, crampi addominali, diarrea	1 (1-2)	Feci o tampone rettale, cibo
Cl. perfringens	Carne bovina, tacchino, pollo	12 (8-22)	Termostabile	Diarrea, crampi addominali, rari nausea, vomito, febbre	1 (0,3-3)	Feci o tampone rettale, cibo
Vibrio parahaemolyticus	Prodotti della pesca mangiati crudi	12 (2-48)	?	Diarrea raramente ematica, crampi addominali, nausea, vomito	3 (2-10)	Vomito, feci, cibo
Staphylococcus aureus	Prosciutto, carni suine, carne in scatola, dolci con crema	3 (1-6)	Termostabile	Vomito, nausea, crampi addominali, febbre	1 (0,3-1,5)	Feci del paziente e del personale di cucina
Yersinia enterocolitica	Cioccolato, latte crudo, carne suina	72 (2-194)	?	Febbre, dolori addominali, diarrea, vomito, faringite, artrite, adenite mesenterica, rash cutaneo	7 (2-30)	Feci
Listeria monocytogenes	Latte, formaggi, vegetali crudi, salsicce	?	?	Diarrea, nausea, vomito, dolori addominali, febbre	?	Feci o tampone rettale
Campylobacter jejuni e *coli*	Latte, pollame, contatto con animali	48 (24-240)	?	Diarrea ematica, dolori addominali, mialgia, febbre, nausea, vomito	7 (2-30)	Feci o tampone rettale
E. coli (ceppi enteropatogeni EPEC, ETEC)	Insalata, carni bovine	24 (8-44)	Termostabile (ST) e termolabile (LT)	Diarrea, dolori addominali, febbre, nausea, mialgia	3 (1-4)	Feci o tampone rettale

Agente	Alimento più frequente	Incubazione (ore)	Tossine	Sintomatologia	Durata giorni	Campioni per analisi
E. coli (ceppi enteroemorragici EHEC)	Insalate, carni bovine	24 (8-44)	Citotossine VT1 e VT2	Diarrea ematica, dolori addominali, febbre, sindrome emolitico-uremica	3 (1-4)	Feci o tampone rettale da pazienti e personale di cucina
Salmonella	Uova, carni, pollame, salsicce	24 (5-72)	Endotossine termolabili	Diarrea, dolori addominali, nausea, vomito, febbre	3 (0,5-14)	Feci o tampone rettale da pazienti e personale di cucina, cibi
Shigella	Latte, insalata, patate, pollo, tacchino, pesce	24 (7-168)	Endotossine termolabili	Dolori addominali, febbre, diarrea ematica, nausea, vomito	3 (0,5-14)	Feci o tampone rettale, cibi

Possibilità di ricercare microrganismi patogeni e relative tossine nelle feci dei pazienti e negli alimenti sospettati

Nei casi di intossicazione e di tossinfezione alimentare, è possibile, con il metodo colturale, allestire ricerche mirate verso i più noti agenti eziologici. Inoltre, la messa a punto di *kit* diagnostici ha permesso a molti laboratori di procedere, almeno in alcuni casi, alla ricerca delle tossine batteriche. La dimostrazione delle tossine rappresenta la forma più completa e convincente nella diagnosi delle malattie trasmesse con gli alimenti.

La tabella seguente elenca alcune scelte che il laboratorista con maggior frequenza è chiamato a compiere nel momento in cui devono essere avviate le ricerche batteriologiche nei casi di intossicazione e tossinfezione alimentare. La tabella è desunta dai "Metodi raccomandati per analisi microbiologiche correlate a malattie trasmesse dagli alimenti", Regione Lombardia - Direzione Generale della Sanità - Servizio Prevenzione Sanitaria - Servizio Sanitario, Milano, ottobre 1998.

AGENTE EZIOLOGICO	FECI		ALIMENTO	
	Ricerca tossina	*Ricerca microrganismo*	*Ricerca tossina*	*Ricerca microrganismo*
Aeromonas spp.	-	*Sì*	-	*Sì*
Bacillus cereus (sindrome diarroica)	-	*Sì*	*Sì*	*Sì*
Bacillus cereus (sindrome emetica)	-	*Sì*	*	*Sì*
Campylobacter jejuni e coli	-	*Sì*	*Si*	*Sì*
Clostridium perfringens	*Sì*	*Sì*	-	*Sì*
E. coli O157 : H7 (ceppi enteroemorragici EHEC)	-	*Sì*	-	*Sì*
E. coli EPEC, ETEC, EIEC	-	*Sì*	-	*Sì*
Salmonella	-	*Sì*	-	*Sì*
Shigella	-	*Sì*	-	*Sì*
Staphylococcus aureus	-	*Sì*	*Sì*	*Sì*
Vibrio cholerae	*	*Sì*	-	*Sì*
Vibrio parahaemolyticus	-	*Sì*	-	*Sì*
Yersinia enterocolitica	-	*Sì*	-	*Sì*

* = non eseguibile *in vitro* con metodi di *routine*.

ALCUNE OSSERVAZIONI SUI LIMITI DELLE ATTUALI METODOLOGIE ANALITICHE

Nonostante le molte novità presentate negli ultimi anni nel campo delle analisi, l'esame batteriologico dei cibi continua a seguire un protocollo tacitamente accettato e generalizzato. Per meglio comprendere questa affermazione, si ricordano qui alcuni esempi di tecniche fra le più accreditate entrate nella *routine*, anche grazie a una certa standardizzazione dei metodi, favorita, in parte, dall'applicazione cogente dei cosiddetti "metodi ufficiali".

La carica batterica totale mesofila aerobia (CBT) viene determinata seminando diluizioni decimali del campione, opportunamente omogeneizzato in diluente sterile isotonico, su piastre di Standard Agar. Questo procedimento vale, ad esempio, per l'analisi delle carni in genere e per il giudizio microbiologico di potabilità dell'acqua. Procedure analoghe vengono messe in atto nel conteggio di determinati batteri. Si tratta, sostanzialmente, di scegliere e utilizzare i terreni selettivi e/o differenziali opportuni. Con poche, semplici variazioni, si eseguono alcune conte batteriche in piastra. Per esempio, la determinazione degli anaerobi solfito-riduttori viene eseguita su terreno TSC. Quella dei coliformi prevede l'uso del terreno VRBA. Per quella di *Staphylococcus aureus*, viene utilizzato il terreno Baird-Parker. Quella degli enterobatteri si effettua su terreno VRBG. Per quella dei batteri lattici, si impiegano i terreni MRS e M17 agar.

Ci sono poi ricerche quantitative che prevedono la semina di diluizioni del campione in terreno liquido, come avviene per la ricerca dei coliformi fecali o di *Escherichia coli*, effettuate con il metodo del Numero Più Probabile (*Most Probable Number*, MPN).

Il metodo della filtrazione del campione su membrana (da coltivare adagiata sulla superficie di un opportuno terreno selettivo) viene adottata, invece, per la conta di coliformi e degli streptococchi di origine fecale.

Parecchie altre ricerche non sono quantitative, anche se iniziano con la pesata del campione. Salmonelle, vibrioni, *Campylobacter*, *Yersinia enterocolitica* condividono, nei rispettivi metodi di ricerca, un denominatore comune: il percorso pre-arricchimento-arricchimento-piastratura su terreni selettivi.

Ognuno dei metodi d'analisi sopra ricordati cela qualche inconveniente. Alcune limitazioni vengono qui di seguito puntualizzate.

Nella ***macerazione del campione*** durante l'omogeneizzazione, le cellule microbiche incontrano un ambiente chimico molto differente da quello di provenienza. Questa nuova condizione ambientale potrebbe avere un effetto inibitorio o risultare, addirittura, tossica per alcune specie, soprattutto muffe e lieviti, conducendo, di conseguenza, a una sottostima della composizione ecologica del prodotto esaminato. Le maggiori responsabilità ricadono su *p*H e temperatura del diluente usato, sul danno meccanico da omogeneizzazione, sulla lisi batterica da ritardata semina sui terreni.

Le ***diluizioni dell'omogenato*** dovrebbero facilitare la dispersione delle cellule batteriche senza colpirne la vitalità. A parte la composizione del diluente e il tempo che intercorre tra diluizioni e semina del campione, altri fattori potrebbero avere effetto sulla sopravvivenza delle cellule. Tra questi, lo stadio del ciclo riproduttivo cellulare, la presenza di ioni metallici e di alcaloidi liberati da spezie, lo *stress* da *p*H e da temperatura. In definitiva, le diluizioni non sono ecologicamente innocue, come molto spesso si è indotti a ritenere.

Le colture di ***pre-arricchimento*** **e** ***arricchimento***, ampiamente usate nelle analisi per incrementare la popolazione cellulare e la rilevabilità delle specie minoritarie, non sono prive di inconvenienti. Malauguratamente, la cinetica dell'accrescimento in questi terreni è condizionata da molte variabili (interferenza del campione sulla qualità del brodo, competizione

saprofitaria, azione litica dei batteriofagi).

Può avvenire che i terreni non riescano ad amplificare la presenza di un solo germe in 25 grammi di campione fino alle concentrazioni desiderate di $10^5/10^6$ cellule/ml entro i tempi previsti. Ciò comporta il fallimento dei metodi di rivelazione, tipo ELISA o PCR. Si ottengono risultati falsamente negativi, le cui conseguenze ricadono sulla gestione della sicurezza alimentare.

Le ricerche sugli ***anaerobi obbligati***, componente significativa della microflora di molti alimenti e bevande, non danno risultati attendibili se non viene rispettata una rigorosa metodologia anaerobia, senza la quale è possibile che tale microflora sfugga nel corso degli esami.

Molti ecosistemi naturali albergano popolazioni microbiche che eccedono grandemente quelle misurate. Viene stimato che sui terreni batteriologici agarizzati si isoli, da certe matrici, specialmente se si tratta di prodotti freschi (carni, vegetali) o fermentati complessi (formaggi stagionati, insaccati), solo una parte delle loro popolazioni microbiche effettive. Secondo alcuni Autori, in casi estremi la quota rivelabile potrebbe ridursi anche a valori del 10%. Questa anomalia sarebbe spiegata da due eventi: la presenza di ***specie nuove sconosciute***, non coltivabili con i metodi esistenti, e, secondariamente, la presenza di specie conosciute, metabolicamente attive ma in uno *stato non coltivabile.* Queste ultime specie non crescono nemmeno sui terreni privi di agenti selettivi, a differenza dei germi stressati, che, avendo subìto danni *sub*-letali, sono recuperabili con particolari metodi di rivitalizzazione.

Il fenomeno dei ***germi vitali ma non coltivabili*** (VNC) è stato sperimentalmente riprodotto *in vitro* su alcuni patogeni (*Salmonella*, *Campylobacter*, *Vibrio*), mediante trattamenti con basse temperature o limitazione delle sostanze nutritive messe a disposizione. Queste condizioni, sfavorevoli per la vitalità dei germi, sono riscontrabili in natura nelle acque o sulla superficie dei vegetali. Un esempio recente di organismi VNC è offerto da *Helicobacter pylori*. Si tratta di un patogeno opportunista, il cui principale serbatoio d'infezione è rappresentato dall'acqua, responsabile di importanti patologie gastroenteriche umane (ulcera gastrica e linfoma di MALT). Questo microrganismo può cambiare addirittura morfologia, passando da un aspetto bastoncellare a uno coccoide. Inoltre, esso sfugge totalmente alla coltivabilità *in vitro.*

Le forme VNC sono state scoperte con l'avvento della biologia molecolare. Le tecniche innovative (*Polymerase Chain Reaction* o PCR e sonde marcate con sostanze fluorescenti), tuttavia, non hanno quasi avuto applicazione nello studio della microbiologia degli ecosistemi alimentari.

BIBLIOGRAFIA CONSULTATA

Balows A. e *Coll*., Manual of Clinical Microbiology, 5th ed., ASM, Washington, USA, 1991

B.U.R.L. Bollettino Ufficiale Regione Lombardia, suppl. straord. al n° 10 del 07.03.97

Carter G. R. e *Coll*., Diagnostic Procedures in Veterinary Microbiology and Mycology, 5th ed., Academic Press, San Diego, CA, USA, 1990

De Felip G., Igiene e Microbiologia alimentare, SEF, Milano, 1991

Duffy G., Kilbride B., Sheridan J.J.,. Blair I.S., Mc Dowell D.A., A membrane-immunofluorescent-viability staining technique for the detection of *Salmonella* spp. from fresh and processed meat samples, Journal of Applied Microbiology 2000, 89, 587-594

FDA Food and Drug Administration, Bacteriological Analytical Manual, 8th ed., AOAC, Gathersburg, USA,1995

Hochberg A.M. e *Coll*., Sensitivity and specificity of the Bax for screening *Listeria monocytogenes* assay: validation and independent laboratory study, Journal of AOAC International 2001, 84, 1087-1089

ICMFS Microrganisms in Foods 1-2, 2nd edition, Toronto University. Press, Toronto, Canada, 1978

Jay M. Modern Food Microbiology, Van Nostrand, New York, USA, 1970
Kramer J, Cantoni C., Alimenti Microbiologia e igiene, OEMF, Milano, 1990
Murray P. R. e *Coll*., Manual of Clinical Microbiology, 6th ed., ASM, Washington, USA, 1995
Murray P.R. e *Coll*., Microbiologia, 2a. ed. italiana, EdiSes, Napoli, 2003
Reed G. H. Dairy, Food and Environmental Sanitation, *13*, 642, 706, 1993
Reed G. H. Dairy, Food and Environmental Sanitation, *14*, 16-17, 87, 161-162, 210-211, 268-269, 329-330, 482-483, 536, 591, 1994
Rondanelli E.G., Filice G., Minoli E., Vademecum di malattie infettive, Selecta medica, Pavia, 2006
Schalch B., Trautsch M., Kau P., Stolle A., Einsatz eines neuen Schnelltest zur Untersuchung der Oberflachenreinheit, Archiv fur Lebensmittelhygiene 2003, *54*, 49-72
Scheu P., Gasch A., Berghof K., Rapid detection of *Listeria monocytogenes* by PCR-ELISA, Letters in Applied Microbiology 1999, *29*, 416 - 420
Shapton D. A. *et al*. Safe processing of Foods, Butterworth-Heinemann, Oxford, England, 1991.
Sharf J. M. Recommended Methods for the Microbiological Examination of Foods, APHA, New York, USA, 1966
Shazberg G., Wolk M., Schmidt H., Sechter I., Gottesmann G., Miron D., Enteroaggregative *Escherichia coli* Serotype O126:H27, Israel, Emerging Infectious Diseases 2003*, 9*, 1170-1173
Tam C. C., O'Brien S.J., Adak G.K., Meakins S.M., Frost J.A., *Campylobacter coli*: an important foodborne pathogen, Journal of Infection 2003, *47*, 28-32
Tiecco G., Microbiologia degli alimenti di origine animale, Edagricole, Bologna,1987
Vanderzant D. e *Coll.*, Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods, APHA, New York, USA, 1992

CAP. 2

Gestione dei campioni per le analisi microbiologiche

CENNI STORICI SULLE PRINCIPALI DISPOSIZIONI LEGISLATIVE IN ITALIA

Relativamente al prelievo dei campioni, la legislazione italiana riporta alcune indicazioni di ordine generale nei seguenti documenti:

***Legge 30 aprile 1962 n° 283**, articolo 3:*

Le ispezioni ed i prelievi di campioni, di cui all'articolo1, sono effettuati da personale sanitario o tecnico appositamente incaricato, dipendente dall'autorità sanitaria provinciale o comunale.

***D.P.R. 26 marzo 1980 n° 327**, articolo 13:*

I campioni da sottoporre ad analisi microbiologiche, parassitologiche e ad altri particolari controlli ed accertamenti, che per la loro natura ed il loro scopo esigano speciali modalità di prelevamento, debbono essere prelevati dal personale tecnico appositamente incaricato dall' autorità sanitaria di cui all'art. 3 del presente regolamento.

***D.L.vo 3 marzo 1993 n° 123**:*

Introduce il concetto di *alimenti deperibili* e le modalità operative per la destinazione dei campioni, che possono essere analizzati *in unica istanza* oppure sottostare a *ripetizione delle analisi nello stesso laboratorio* sempre con le garanzie della difesa.

***D.M. 16 dicembre 1993**:*

"*Individuazione delle sostanze deteriorabili alle quali si applica il regime di controlli microbiologici ufficiali*":

Articolo 1

1. Ai fini degli accertamenti analitici di cui all'art.4 comma 1 del decreto legislativo 3 marzo 1993, n. 123, per prodotti alimentari deteriorabili si intendono:
   a) i prodotti alimentari preconfezionati, destinati come tali al consumatore, il cui periodo di vita commerciale, inferiore a 90 giorni, risulti dalla data di scadenza indicata in etichetta con la dicitura "da consumarsi entro" ai sensi dell'art. 10, comma 2, del decreto legislativo 27 gennaio 1992, n. 109.
   b) i prodotti a base di carne che non abbiano subito un trattamento completo e presentino pertanto le seguenti caratteristiche fisico-chimiche:

1) A_w superiore a 0,95 e *p*H superiore a 5,2 oppure
2) A_w superiore a 0,91 oppure
3) *p*H uguale o superiore a 4,5.

c) i prodotti alimentari sfusi e quelli posti in involucro protettivo destinati alla vendita previo frazionamento ai sensi dell'art. 1 comma 3 del decreto legislativo 27 gennaio 1992 n. 109, non sottoposti a congelazione o a trattamenti atti a determinare la conservazione allo stato sfuso per periodi superiori a tre mesi (quali sterilizzazione, disidratazione, affumicatura, aggiunta di soluti e/o di conservativi antimicrobici, altri trattamenti di pari effetto) costituiti in tutto o in parte da:
1) latte, ivi compreso quello parzialmente concentrato;
2) derivati del latte quali crema di latte, formaggi freschi spalmabili, formaggi freschi a pasta filata preincartati di cui all'art. 1 comma 2 del decreto legge 11 aprile 1986, n. 98, convertito nella legge 11 giugno 1986, n. 252, modificato dall'art 23 del decreto legislativo 27 gennaio 1992, n. 109, latticini freschi, formaggi molli senza crosta, formaggi molli con crosta con stagionatura non superiore a 60 giorni, formaggi erborinati;
3) carni fresche e preparazioni gastronomiche fresche a base di carni fresche;
4) prodotti della pesca freschi, nonchè alimenti compositi freschi e preparazioni gastronomiche fresche a base di prodotti della pesca;
5) prodotti d'uovo, freschi o pastorizzati, nonché alimenti compositi e di pasticceria e preparazioni gastronomiche a base di prodotti d'uovo;
6) prodotti ortofrutticoli freschi, refrigerati e non;
7) paste fresche con ripieno destinate a essere vendute allo stato sfuso ai sensi dell'art. 16, comma 2, lettera c, del decreto legislativo 27 gennaio 1992, n. 109.

2. Qualora sorgano dubbi sulla deteriorabilità di qualche prodotto fra quelli di cui al comma 1, lettera c, l'accertamento della stessa viene fatto in laboratorio, tenendo conto che sono considerati non deteriorabili gli alimenti non preconfezionati nè sottoposti a trattamento conservativo idoneo ad ottenere una conservazione per periodi non inferiori a tre mesi che presentino:
a) pH uguale o inferiore a 4,5 e/o
b) A_w uguale o inferiore a 0,85.
3. I campioni dei prodotti alimentari deteriorabili di cui al comma 1 vanno mantenuti, dal momento del prelievo al momento in cui viene iniziata l'analisi, a una temperatura, ove non diversamente previsto da norme vigenti, non superiore a +4 °C e non inferiore a 0 °C. I prodotti alimentari congelati vanno mantenuti a -15 °C e quelli surgelati a -18 °C.
4. Il trasporto dei campioni deve essere effettuato sin dal momento del prelievo in contenitori atti a garantire il mantenimento della temperatura entro i valori indicati al comma 3.

Articolo 2

1. Per i prodotti alimentari deteriorabili di cui all'art. 1, comma 1, non essendo possibile effettuare l'analisi di revisione secondo le modalità di cui all' art. 1 della legge 30 aprile 1962, n. 283, il campione prelevato ai fini del controllo microbiologico va ripartito dalla persona incaricata del prelievo in quattro aliquote, ciascuna delle quali in quantità congrua per l'espletamento delle analisi da effettuare. Una delle quattro aliquote, conservate con l'osservanza delle prescrizioni previste all'art. 1, comma 3, viene consegnata dal prelevatore al detentore del prdotto alimentare unitamente al verbale di prelevamento, mentre le altre tre aliquote vengono consegnate ai laboratori competenti per territorio per l'effettuazione, su una prima aliquota, degli accertamenti analitici e per la ripetizione, su una seconda aliquota, delle analisi, limitatamente ai parametri eventualmente risultati non conformi. L'ultima aliquota, infine, resta di riserva presso il laboratorio per un'eventuale perizia ordinata dall'autorità giudiziaria.

2. Per i prodotti alimentari di cui all'art. 1, per i quali l'accertamento della deteriorabilità viene effettuata in laboratorio e per i quali, in caso di conferma del carattere di deteriorabilità, non sarebbe possibile effettuare l'analisi di revisione secondo le modalità di cui all'art. 1 della legge 30 aprile 1962 n. 283, il campione prelevato viene ripartito dalla persona incaricata del prelievo in cinque aliquote, ciascuna delle quali in quantità congrua per l'espletamento delle analisi da effettuare; una delle cinque aliquote, conservata con l'osservanza delle prescrizioni previste all'art. 1, comma 3, viene consegnata dal prelevatore al detentore del prodotto alimentare unitamente al verbale di prelevamento, nel quale va precisato che potrebbe trattarsi di alimento deteriorabile, mentre le altre quattro aliquote vengono consegnate al laboratorio dell'unità sanitaria locale competente per territorio per l'accertamento, in via preliminare, su un'aliquota, della deteriorabilità mediante misurazione della concentrazione idrogenionica (*p*H) e dell'acqua libera (A_w).
   Delle tre restanti aliquote, una viene utilizzata per gli accertamenti analitici, una per la ripetizione delle analisi limitatamente ai parametri eventualmente risultati non conformi e l'ultima resta di riserva presso il laboratorio per un'eventuale perizia ordinata dall'autorità giudiziaria.

I NUOVI ORIENTAMENTI INTRODOTTI DALLA RECENTE NORMATIVA EUROPEA

Un cambiamento sostanziale nella pianificazione dei controlli microbiologici nell'intera Comunità Europea nasce all'inizio del 2006 con l'entrata in vigore del Regolamento comunitario n° 2073/2005. Questo documento rivoluziona i criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari, anche se dimostra una grande flessibilità e una certa continuità con il passato. Un esempio di collegamento con le normative precedenti è l'affermazione che **non vengono esclusi i controlli ufficiali**.

7. A norma del regolamento (CE) n. 882/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 29 aprile 2004, relativo ai controlli ufficiali intesi a verificare la conformità alla normativa in materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali (1), gli Stati membri provvedono a che siano eseguiti periodicamente controlli ufficiali, in base ad una valutazione dei rischi e con frequenza appropriata; tali controlli devono essere eseguiti in fasi opportune della produzione, della trasformazione e della distribuzione degli alimenti, per garantire che gli operatori del settore rispettino i criteri stabiliti dal presente regolamento.

Tuttavia **il compito delle analisi sui prodotti alimentari viene trasferito, in larga misura, alle aziende produttrici, nel quadro delle attività di autocontrollo**:

6 (...) gli operatori del settore alimentare sono tenuti a rispettare i criteri microbiologici; a questo scopo, attraverso il prelievo di campioni, essi devono procedere a controlli per accertare il rispetto dei valori fissati per i criteri, eseguire analisi e prendere provvedimenti correttivi, conformemente alla legislazione in materia di prodotti alimentari e alle istruzioni dell' autorità competente.

Le modalità operative inerenti al **prelievo dei campioni e alla frequenza delle analisi**, salvo alcuni casi regolamentati, sono **lasciate in gran parte all'iniziativa delle ditte produttrici**:

23. Gli operatori del settore alimentare devono decidere autonomamente con quale frequenza debbano essere eseguite le operazioni di campionamento e di analisi nel quadro delle procedure HACCP e di altre procedure di controllo dell'igiene. Tuttavia, in taluni casi può essere necessario armonizzare a livello comunitario la frequenza dei campionamenti, in particolare per garantire in tutta la Comunità lo stesso livello di controllo.

Le analisi previste dal Regolamento sono indirizzate a coprire **due fasi delle filiere alimentari** prescelte:

- i **prodotti finiti**, da esaminare secondo **criteri di sicurezza alimentare**;
- le fasi di **lavorazione**, da esaminare secondo **criteri di igiene del processo.**

Le tabelle relative alle ricerche da effettuare nelle due fasi, al numero di unità campionarie da analizzare (n), ai limiti di accettabilità (m ed M) e alle tolleranze ammesse (c) sono riportate integralmente in questo manuale, assieme al testo del Regolamento, nel Capitolo 8, dedicato alla normativa riguardante gli alimenti dal punto di vista microbiologico in Italia.

Nelle tabelle che seguono, vengono elencate le ricerche batteriologiche fondamentali previste dal Regolamento n° 2073/2005 aggiornato dal Regolamento n° 1441 del 5 dicembre 2007.

Alimento	Ricerche in fase di produzione	Ricerche su prodotto finito
Carcasse di bovini, equini, suini, ovi-caprini	Carica batterica, enterobatteri, *Salmonella*	
Carcasse di polli e tacchini	*Salmonella*	
Carni macinate e separate meccanicamente	Carica batterica, *E. coli*	*Salmonella*
Prodotti a base di carne	*E. coli*	*Salmonella*
Gelatina e collagene		*Salmonella*
Pesci con elevato contenuto d'istamina (tonni, sgombri, ecc)		Istamina
Molluschi bivalvi, tunicati, echinodermi, gasteropodi vivi		*Salmonella, E. coli*
Crostacei e molluschi cotti	*E. coli*, stafilococchi coagulasi+	*Salmonella*
Latte e derivati liquidi del latte pastorizzati	Enterobatteri	
Latte in polvere e siero di latte in polvere	Enterobatteri, stafilococchi coagulasi+	*Salmonella*, tossina stafilococcica
Formaggi da latte crudo	Stafilococchi coagulasi+	*Salmonella*, tossina stafilococcica
Formaggi da latte pastorizzato o riscaldato, freschi o stagionati	Stafilococchi coagulasi+	Tossina stafilococcica
Burro e panna da latte non pastorizzato	*E. coli*	*Salmonella*
Gelati	Enterobatteri	*Salmonella*
Alimenti per l'infanzia e dietetici in polvere	Enterobatteri *B. cereus*	*Salmonella*, *Listeria monocytogenes, Enterobacter sakazakii*
Prodotti contenenti uova crude o non pastorizzate		*Salmonella*
Prodotti a base d'uovo	Enterobatteri	
Frutta e verdura pre-tagliata	*E. coli*	*Salmonella*
Semi germogliati		*Salmonella*
Succhi di frutta non pastorizzati	*E. coli*	*Salmonella*
Alimenti in generale		*Listeria monocytogenes*

NOTA - Con il termine "campioni", utilizzato nelle due tabelle che seguono, si intendono le *unità campionarie*. Generalmente si tratta di almeno 5 unità, da esaminare singolarmente.

Alimento	Controlli in fase di produzione	Valori accettabili
Carcasse di bovini, equini, ovi-caprini	Carica batterica	*5.000-100.000/cm² (media giornaliera)*
	Enterobatteri	*50-500/cm² (media giornaliera)*
	Salmonella	*massimo 2 positivi su 50 campioni*
Carcasse di suini	Carica batterica	*10.000-100.000 /cm² (media giornaliera)*
	Enterobatteri	*100-1.000/cm² (media giornaliera)*
	Salmonella	*massimo 5 positivi su 50 campioni*
Carcasse di polli e tacchini	*Salmonella*	*massimo 7 positivi su 50 campioni da 25 g di pelle del collo*
Carni macinate e carni separate meccanicamente	Carica batterica	*500.000/g e fino a 5.000.000/g in 2 campioni su 5 esaminati*
	E. coli	*50/g e fino a 500/g in 2 campioni su 5 esaminati*
Prodotti a base di carne	*E. coli*	*500/g e fino a 5.000/g in 2 campioni su 5 esaminati*
Crostacei e molluschi cotti	*E. coli*	*1/g e fino a 10/g in 2 campioni su 5 esaminati*
	Stafilococchi coagulasi+	*100/g e fino a 1.000/g in 2 campioni su 5 esaminati*
Latte e derivati liquidi pastorizzati	Enterobatteri	*<1/ml e fino a 5/ml in 2 campioni su 5 esaminati*
Latte in polvere e siero di latte in polvere	Enterobatteri	*10/g su 5 campioni*
	Stafilococchi coagulasi+	*10/g e fino a 100/g in 2 campioni su 5 esaminati*
Formaggi da latte crudo	Stafilococchi coagulasi+	*10.000/g e fino a 100.000/g in 2 campioni su 5 esaminati*
Formaggi da latte pastorizzato o riscaldato, formaggi stagionati	*Stafilococchi coagulasi+*	*100/g e fino a 1.000/g in 2 campioni su 5 esaminati*
Formaggi molli (= formaggi freschi)	Stafilococchi coagulasi+	*10/g e fino a 100/g in 2 campioni su 5 esaminati*
Burro e panna da latte non pastorizzato	*E. coli*	*10/g e fino a 100/g in 2 campioni su 5 esaminati*
Gelati	Enterobatteri	*10/g e fino a 100/g in 2 campioni su 5 esaminati*
Alimenti per l'infanzia e dietetici in polvere	Enterobatteri	*Assenti in 10 campioni da 10 g*
	B. cereus	*50/g e fino a 500/g in 1 campione su 5 esaminati*

Alimento	Controlli in fase di produzione	Valori accettabili
Dietetici in polvere	Enterobatteri	*Assenti in 5 campioni da 10 g*
Prodotti a base di uova	Enterobatteri	*10/g e fino a 100/g in 2 campioni su 5 esaminati*
Frutta e verdura pre-tagliata Semi germogliati	*E. coli*	*100/g e fino a 1.000/g in 2 campioni su 5 esaminati*
Succhi di frutta non pastorizzati	*E. coli*	*100/g e fino a 1.000/g in 2 campioni su 5 esaminati*

Alimento	Ricerche sul prodotto finito	Valori accettabili
Carne macinata e preparazioni a base di carne da consumare crude Gelatina e collagene	*Salmonella*	Assente in 5 campioni da 25 g
Carne macinata, preparazioni a base di carne, prodotti a base di carne di pollame da consumare cotti Carni separate meccanicamente	*Salmonella*	Assente in 5 campioni da 10 g (dal 2010 in 5 campioni da 25 g)
Pesci con elevato contenuto d'istamina (tonni, sgombri, ecc)	Istamina (metodo HPLC)	100 mg/kg e fino a 200 mg/kg in 2 campioni su 9 esaminati
Se trattati in salamoia	Istamina (metodo HPLC)	200 mg/kg e fino a 400 mg/kg in 2 campioni su 9 esaminati
Molluschi bivalvi, tunicati, echinodermi, gasteropodi vivi	*Salmonella* *E. coli (*metodo *MPN)*	Assente in 5 campioni da 25 g 230/100 g di carne e liquido intravalvare
Crostacei e molluschi cotti	*Salmonella*	Assente in 5 campioni da 25 g
Burro e panna da latte non pastorizzato	*Salmonella*	Assente in 5 campioni da 25 g
Latte in polvere e siero di latte in polvere	*Salmonella* Enterotossine stafilococciche	Assente in 5 campioni da 25 g Non rilevabili in 5 campioni da 25 g
Gelati	*Salmonella*	Assente in 5 campioni da 25 g
Formaggi	Enterotossine stafilococciche	Non rilevabili in 5 campioni da 25 g
Formaggi da latte crudo	*Salmonella* Enterotossine stafilococciche	Assente in 5 campioni da 25 g Non rilevabili in 5 campioni da 25 g
Alimenti per l'infanzia e dietetici in polvere	*Listeria monocytogenes* *Salmonella* *Enterobacter sakazakii*	Assente in 10 campioni da 25 g Assente in 30 campioni da 25 g Assente in 30 campioni da 10 g

Alimento	Ricerche sul prodotto finito	Valori accettabili
Prodotti contenenti uova **crude o non pastorizzate**	*Salmonella*	Assente in 5 campioni da 25 g
Frutta e verdura pre-tagliata Semi germogliati Succhi di frutta **non pastorizzati**	*Salmonella*	*Assente in 5 campioni da 25 g*
Alimenti in generale **favorevoli alla crescita** di *Listeria monocytogenes* - ancora in stabilimento - già in commercio	 *Listeria monocytogenes* *Listeria monocytogenes*	 *Assente in 5 campioni da 25 g* *100/g in 5 campioni*
Alimenti in generale **sfavorevoli alla crescita** di *Listeria monocytogenes*	*Listeria monocytogenes*	*100/g in 5 campioni*

Il Regolamento 2073/2005 impone, per alcuni tipi di produzioni alimentari, una **frequenza minima obbligatoria dei campionamenti** qui di seguito riportata. È da tenere presente che sono previste **alcune riduzioni sulla frequenza dei campionamenti, in caso di risultati soddisfacenti:**

Campionamento batteriologico nei macelli e nei luoghi di produzione di carne macinata e di preparazioni a base di carne

Norme di campionamento per le carcasse di bovini, suini, ovini, caprini ed equini

I metodi di campionamento distruttivo e non distruttivo, la scelta dei siti di prelievo dei campioni e le regole per la loro conservazione e il trasporto sono indicati nella norma ISO 17604.

In ogni sessione di campionamento, sono prelevate casualmente cinque carcasse. I siti nei quali sono prelevati i campioni sono scelti tenendo conto della tecnica di macellazione utilizzata in ciascun impianto.

Quando si procede al campionamento per il conteggio delle Enterobatteriacee e per il conteggio di colonie aerobiche, i prelievi sono effettuati in quattro siti di ogni carcassa. Si prelevano, con il metodo distruttivo, quattro campioni di tessuto, per una superficie totale di 20 cm^2. Qualora a questo scopo sia utilizzato il metodo non distruttivo, l'area della superficie da campionare equivale ad almeno 100 cm^2 (50 cm^2 per le carcasse di piccoli ruminanti) per sito di campionamento.

Per il prelievo di campioni finalizzati alla ricerca di *Salmonella*, si utilizza un metodo di prelievo con spugna abrasiva. L'area campione corrisponde ad almeno 100 cm^2 per sito selezionato.

Quando i campioni sono prelevati sulle carcasse da diversi siti, prima di essere esaminati devono essere aggregati.

Norme di campionamento per le carcasse di pollame

Per le analisi volte alla ricerca di *Salmonella*, in ogni sessione di campionamento devono essere prelevate casualmente almeno 15 carcasse dopo il raffreddamento. Da ciascuna carcassa, si prelevano campioni di pelle del collo del peso di circa 10 g. In ogni occasione, i campioni di pelle del collo prelevati da tre carcasse sono aggregati prima di essere esaminati, in modo da formare 5 campioni finali di 25 g.

Linee guida sul campionarnento

Linee guida più dettagliate sul campionamento delle carcasse, in particolare per quanto riguarda i siti di campionamento, possono essere incluse nei manuali di corretta prassi operativa di cui all'articolo 7 del regolamento (CE) n. 852/2004.

Frequenze di campionamento per le carcasse, la carne macinata, le preparazioni a base di carne e le carni separate meccanicamente

Gli operatori del settore alimentare dei macelli o degli stabilimenti che producono carne macinata, preparazioni a base di carne o carni separate meccanicamente prelevano campioni per l'analisi microbiologica almeno una volta alla settimana. Il giorno di campionamento deve variare da una settimana all'altra, affinché sia coperto ogni giorno della settimana.

Per quanto riguarda il campionamento di carne macinata e preparazioni a base di carne per le analisi destinate alla ricerca di *E. coli* e al conteggio delle colonie aerobiche e il campionamento delle carcasse per le analisi destinate alla ricerca di enterobatteriacee e al conteggio delle colonie aerobiche, la frequenza può essere ridotta a una volta ogni due settimane, qualora si ottengano risultati soddisfacenti per sei settimane consecutive.

Nel caso del campionamento di carne macinata, preparazioni a base di carne e carcasse per la ricerca di *Salmonella*, la frequenza può essere ridotta a una volta ogni due settimane, qualora si ottengano risultati soddisfacenti per 30 settimane consecutive. La frequenza di campionamento per la ricerca di *Salmonella* può inoltre essere ridotta se vi è un programma di controllo nazionale o regionale nei confronti di questo patogeno e se tale programma prevede prove che sostituiscano il campionamento suddetto. La frequenza di campionamento può essere ulteriormente ridotta se il programma di controllo nazionale o regionale della salmonella dimostra che la prevalenza di *Salmonella* è bassa negli animali acquistati dal macello.

Tuttavia, se l'analisi dei rischi lo giustifica e, di conseguenza, l'autorità competente lo autorizza, i macelli di piccole dimensioni e gli stabilimenti nei quali si producono carne macinata e preparazioni a base di carne in piccole quantità possono essere esentati da queste frequenze di campionamento.

Sui **metodi analitici**, il Regolamento si esprime indicando come metodi di referenza quelli ISO. Tuttavia, viene lasciata agli operatori del settore alimentare **libertà decisionale sulla scelta dei metodi**, purché questi ultimi forniscano risultati equivalenti:

24. I risultati delle analisi dipendono dal metodo analitico utilizzato; pertanto occorre associare ad ogni criterio microbiologico un metodo di riferimento specifico. Tuttavia, gli operatori del settore alimentare devono avere la possibilità di usare metodi d'analisi diversi dai metodi di riferimento, in particolare quelli più rapidi, a condizione che tramite tali metodi alternativi si ottengano risultati equivalenti. È inoltre necessario definire un piano di campionamento per ciascun criterio, al fine di garantire un'attuazione armonizzata, autorizzando tuttavia l'uso di altri sistemi di campionamento e analisi, compreso il ricorso ad organismi indicatori alternativi, a condizione che essi forniscano garanzie equivalenti in merito alla sicurezza alimentare.

All'Autorità Sanitaria compete la **supervisione sulla corretta attuazione di tutte le operazioni delegate alle ditte produttrici** e l'eventuale decisione di **procedere autonomamente ad altri accertamenti analitici**:

Art. 1 (...) L'autorità competente verifica il rispetto delle norme e dei criteri di cui al presente regolamento conformemente al regolamento (CE) n. 882/2004, senza pregiudizio del suo diritto di procedere a ulteriori campionamenti ed analisi per la rilevazione e la misura della presenza di altri microrganismi, delle loro tossine o dei loro metaboliti, o come verifica dei processi, per i prodotti alimentari sospetti, o nel contesto dell'analisi del rischio.

CAP. 3

Analisi batteriologiche su alimenti

PREPARAZIONE DEL CAMPIONE PER LE ANALISI

MATERIALE RICHIESTO

- *Frigorifero a 0/+2 °C*
- *Congelatore a -18 °C*
- *Bacinelle sterili*
- *Guanti monouso e guanti sterili*
- *Pinze, forbici, cucchiai, coltelli, apriscatole sterili*
- *Omogeneizzatore tipo Stomacher*
- *Sacchetti sterili per omogeneizzatore con e senza filtro*
- *Bilancia tecnica*
- *Cappa a flusso laminare*
- *Pipette graduate sterili monouso*
- *Soluzione diluente sterile*
- *Provette sterili*
- *Propipetta*
- *Termometro*
- *Bunsen*
- *Contenitore per rifiuti*
- *Alcool denaturato o altro idoneo disinfettante*
- *Soluzione acquosa sterile al 10 % di Tween 80 o altro tensioattivo non tossico*

PROCEDURA CONSIGLIATA

Prima di iniziare un'analisi, è necessario preparare tutto il materiale occorrente (inclusi i terreni batteriologici) e prevedere l'allontanamento dei rifiuti (carta, imballaggi, residui di campioni, ecc) secondo le norme specificate in appendice.

1. Controllare l'aspetto del campione (è buona norma prender nota di eventuali caratteristiche anomale). Si consiglia di misurare la temperatura del campione al momento della consegna al laboratorio.
2. Conservare i campioni alla temperatura prescritta (in frigorifero a 0/+2 °C o in congelatore a -18 °C) dal momento dell'arrivo in laboratorio fino all'inizio dell'analisi.
3. L'analisi dovrà iniziare il più presto possibile. Si ricorda che, per i molluschi eduli lamellibranchi, il D.M. 31/07/1995, con opportuno provvedimento, autorizzava il con-

gelamento immediato del campione per bloccare la moltiplicazione batterica.

4. Se il campione è congelato, scongelarlo nel contenitore originale in frigorifero a 0/+2 °C per un periodo massimo di 18 ore. Esaminare il campione non appena le condizioni di scongelamento consentono il prelievo.
5. Se la natura e le dimensioni del campione lo consentono, si può scongelare il campione a temperatura ambiente per 1-2 ore. È importante non superare in nessun caso i 45 °C per più di 15 minuti.
6. Se il campione congelato può essere facilmente sminuzzato (gelati, ecc), si può procedere al prelievo anche senza attendere lo scongelamento.
7. La quantità minima di materiale consigliata per costituire un campione non deve, di norma, essere inferiore a 150 grammi.
8. Effettuare l'apertura del campione e le succesive operazioni analitiche in laboratori in cui vengano messi in pratica tutti gli accorgimenti necessari per evitare contaminazioni secondarie (spostamenti d'aria conseguenti a porte o finestre aperte, transito di persone).
9. Disinfettare sempre preventivamente la superficie del banco di lavoro.
10. Usare tutti gli accorgimenti (sterilità dei materiali, disinfezione della superficie esterna del contenitore del campione, guanti, bacinelle sterili) per evitare la contaminazione accidentale dei campioni durante le analisi.
11. In particolare, si raccomanda di effettuare sotto cappa a flusso laminare l'apertura di confezioni di campioni di prodotti pasteurizzati, sterilizzati o per i quali esistano limiti di carica batterica totale.
12. Usare i guanti sterili monouso per aprire i prodotti confezionati.
13. Dare la precedenza, negli esami, ai prodotti meno contaminati (cotti) o più soggetti a contaminazione (alimenti da consumarsi tal quali).
14. Il prelievo di alimenti finalizzato alla determinazione delle cariche microbiche si effettua, salvo particolari disposizioni, contemporaneamente in superficie e in profondità, escludendo la superficie (se non commestibile) e prelevando preferibilmente una quantità pari, ove possibile, a 50 grammi di materiale.
15. Per le carni sotto pelle (come pollame, pesci, ecc), la rilevazione delle cariche si esegue in profondità dalla massa muscolare, previa asportazione della pelle e bruciatura della superficie.
16. Per i formaggi a crosta non edibile, è necessario bruciare la superficie esterna e tagliare per prelevare a cuore.
17. Il prelievo da alimenti finalizzato alla rilevazione di patogeni e di sostanze inibenti si esegue dalla parte commestibile del prodotto.
18. Per gli alimenti ad alto contenuto in grassi, è possibile aggiungere, prima dell'omogeneizzazione, 6 ml di soluzione acquosa sterile al 10% di Tween 80 (o altro tensioattivo non tossico) per ogni 100 ml di sospensione.
19. Pesare con bilancia tecnica la massa di materiale prelevato, trasferendo la porzione asportata dal campione in un sacchetto sterile da omogeneizzatore con filtro (per le cariche batteriche) o senza filtro (per le altre ricerche), posizionato aperto sulla bilancia all'ultimo momento prima del prelievo. Utilizzare per le operazioni di pesatura pinze e forbici o cucchiai sterili.
20. Per un'eventuale ripetizione del prelievo, conservare la parte del campione rimasta in frigorifero a 0/+2 °C (se si tratta di uova, insaccati cotti o stagionati, formaggi stagionati) o in congelatore a -18 °C (in tutti gli altri casi).

RICERCHE BATTERIOLOGICHE PIÙ INDICATE PER LE VARIE CATEGORIE DI ALIMENTI

Le ricerche batteriologiche previste dal Regolamento n° 2073/2005 della Comunità Europea sono ristrette attorno ad alcuni parametri che, come si può desumere dal testo riprodotto integralmente nel Capitolo 8, dovrebbero assolvere al duplice compito di verificare, rispettivamente, l'alimento finito (attraverso i criteri di sicurezza alimentare) e il processo produttivo del medesimo (attraverso i criteri di valutazione dell'igiene di processo).

Il legislatore europeo ha però previsto che sia l'Autorità Sanitaria sia il fabbricante possano compiere altri accertamenti per completare i giudizi, rispettivamente, di salubrità dell'alimento e di igiene della produzione. Pertanto, sulla scorta delle informazioni esposte nel capitolo 1 circa gli effetti che i microrganismi provocano negli alimenti all'origine e durante il loro ciclo di vita, è possibile redigere un prospetto abbastanza completo delle ricerche di laboratorio che hanno una certa utilità ai fini dell'emissione dei giudizi predetti.

Compete all'esperienza del laboratorista, sulla base delle informazioni ricevute e, soprattutto, delle finalità del lavoro da compiere, scegliere quali analisi effettuare fra quelle sottoelencate.

MATERIALE	RICERCHE CONSIGLIATE	RIF.
1. CARNI FRESCHE (refrigerate o congelate)		
Muscolo (da mezzene, quarti, tagli anatomici)	CBT, *Salmonella,* sostanze inibenti	***(1)***
2. CARNI MACINATE		
Carni macinate	CBT, stafilococchi coagulasi +, *E. coli, Salmonella*	***(2)***
Prodotti a base di carne (*hamburger*, svizzere, ecc)	*E. coli*, stafilococchi coagulasi +, *Salmonella*	
3. POLLAME		***(4)***
Pollame (intero o in parti)	CBT, *Salmonella,* sostanze inibenti	***(3)***
4. SELVAGGINA		
Soggetti interi sotto pelle o parti staccate	CBT, *Salmonella, Listeria monocytogenes, S. aureus,* clostridi solfito-riduttori	
5. CARNI PREPARATE (salumi o insaccati)		
Freschi (salsiccia, cotechino, zampone, ecc)	Stafilococchi coagulasi +, *E. coli,* clostridi solfito-riduttori, *Salmonella, Listeria monocytogenes*	
Stagionati (prosciutto crudo, coppa, salame, *speck*, ecc)	Stafilococchi coagulasi +, *E. coli,* lattobacilli, micrococchi, *Salmonella, Listeria monocytogenes*	
Cotti (mortadella, cotechino precotto, zampone precotto, *wurstel* , ecc)	CBT, stafilococchi coagulasi +, *E. coli,* clostridi solfito-riduttori, lattobacilli, *Salmonella, Listeria monocytogenes*	
6. PESCE FRESCO (refrigerato o congelato)		***(3)***
Pesce intero sotto pelle	CBT	
Tranci, filetti, porzioni commerciali (compresi affumicati)	CBT, stafilococchi coagulasi+, *E. coli, Salmonella, Listeria monocytogenes*	

MATERIALE	RICERCHE CONSIGLIATE	RIF.
7. MOLLUSCHI E CROSTACEI		***(3)***
Freschi	*E. coli, Salmonella, Vibrio cholerae O1, Vibrio parahaemolyticus*	
Cotti	CBT, stafilococchi coagulasi +, *E. coli, Salmonella*	
8. LATTE E DERIVATI		***(5)***
Latte pasteurizzato e panna pasteurizzata	CBT, coliformi, *Salmonella, Listeria monocytogenes*	
Latte sterilizzato e UHT	CBT	
Burro	Coliformi, *Salmonella, Listeria monocytogenes*	***(9)***
Gelati	Coliformi, *S. aureus, Salmonella, Listeria monocytogenes*	
Formaggi	*E. coli, S. aureus,* coliformi, *Salmonella, Listeria monocytogenes*	
Latte in polvere	Coliformi, *Salmonella*	***(9)***
Yogurt	Lattobacilli	
9. PASTE ALIMENTARI	CBT, coliformi, *E. coli, Salmonella, S. aureus, Cl. perfringens*	***(6)***
10. UOVA E DERIVATI		***(7)***
Uova da consumo	*Salmonella*	
Prodotti d'uovo	CBT, stafilococchi coagulasi +, *Enterobacteriaceae, Salmonella*	
11. PREPARAZIONI GASTRONOMICHE		***(1)***
Crude (spiedini, arrotolati)	vedi carni macinate (prodotti a base di carne)	
Pasteurizzate, cotte, precotte (piatti pronti, da riscaldare prima del consumo o da consumare tal quali)	CBT, stafilococchi coagulasi +, *E. coli, B. cereus, Salmonella, Listeria monocytogenes,* clostridi solfito-riduttori	
12. VEGETALI E FRUTTA	CBT, miceti, *Listeria monocytogenes*	
13. PRODOTTI DELLA IV GAMMA	*Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila*	
14. PRODOTTI STERILIZZATI E CONSERVE	CBT aerobia, CBT anaerobia, spore aerobie, spore anaerobie	***(8)***
15. MIELE	*Cl. botulinum,* anaerobi sporulati	
16. ACQUA POTABILE	CBT, coliformi, enterococchi, spore di anaerobi solfito-riduttori	
17. ACQUE MINERALI	*Pseudomonas aeruginosa, Aeromonas hydrophila,* enterococchi, spore di anaerobi solfito-riduttori, *Salmonella*	
18. BEVANDE PASTEURIZZATE	*Saccharomyces*	
19. SEMICONSERVE	*S. aureus, Cl. perfringens, Cl. botulinum, Salmonella,* miceti	
20. PRODOTTI DI PASTICCERIA	CBT, enterobatteri, *S. aureus, Salmonella, Cl. perfringens, B. cereus. Listeria monocytogenes,* miceti	

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI ELENCATI IN TABELLA

(1) Piano Alimenti Regione Lombardia
(2) DPR 03/08/98, n. 309
(3) ICMSF Microrganisms in food 2. Sampling for microbiological analysis; principles and specific, 2nd edition, University of Toronto Press, Toronto, Canada, 1986
(4) Norme HACCP, Regione Emilia-Romagna, 1993
(5) DPR 14/01/97, n. 54
(6) Circolare Ministero della Sanità 03/08/85, n. 32
(7) DL.vo 04/02/93, n. 65
(8) Schweiz Lebensmittelbuch, Zweiter Band, Ringbuch V, Kapitel 56, Mikrobiologie, 1988, 8100/1-8100/3
(9) Regolamento CEE 14/06/96, n. 1080/96

BIBLIOGRAFIA CONSULTATA

FDA - BACTERIOLOGICAL ANALYTICAL MANUAL, 6th edition, AOAC, Arlington, USA, 1984, 101-105
ICMSF - MICRORGANISMS IN FOODS 1. Their significance and methods of enumeration, 2nd edition, University of Toronto Press, Toronto, Canada, 1988, 106-11????

CAP. 4

Prove tipicamente qualitative

SALMONELLA

Definizione

Bastoncini Gram-negativi, generalmente mobili (con l'eccezione di *S. gallinarum*), anaerobi facoltativi, prevalentemente lattosio-negativi, H_2S positivi e indolo-negativi, classificati in circa 2.000 sierotipi (schema di Kauffmann-White) sulla base di antigeni somatici O e flagellari H.

Scheda sintetica

Attività patogena	*agente eziologico di tossinfezioni*
Alimenti responsabili	*molluschi, prodotti carnei, latticini, ovoprodotti, vegetali, insalate, cereali, altri alimenti proteici*
Temperatura di moltiplicazione	*da 5,2 a 46 °C con optimum a 35-43 °C*
pH ***di sviluppo***	*3,8-9,5 con optimum 7-7,5*
Attività dell'acqua (Aw) richiesta	*>0,94*
Fattori d'inibizione	*comuni disinfettanti, cottura*
Dose infettante	*molto variabile (da poche cellule a 10^6 cellule)*
Tossine prodotte	*endotossine*
Sito di moltiplicazione	*mucosa intestinale*
Incubazione della malattia	*12-24 h*
Sintomi	*diarrea, febbre, dolori addominali, talvolta vomito*
Indagini di laboratorio	*ricerca del microrganismo nell'alimento sospetto e nelle feci dell'ammalato*

Alcuni cenni storici

I substrati adoperati inizialmente per isolare le salmonelle, come l'Agar di Endo e il Drigalski-Conradi, difettavano in sensibilità e specificità. Progressi sostanziali si sono registrati con l'avvento di protocolli d'analisi complessi, articolati su più terreni liquidi in successione. Questi comprendevano brodi di pre-arricchimento, utilizzati per rivitalizzare i germi stressati (Brodo lattosato, Brodo mannitolo), e brodi di arricchimento con funzioni selettive (Dack, 1955; Bulling *e Coll*., 1966; Gundstrup *e Coll*., 1969; Mossel *e Coll*., 1972; Bailey *e Coll*., 1981). Tra questi ultimi, si considerano di importanza storica il Brodo tetrationato (Muller-

Kauffmann, Preuss), il Brodo selenito (con o senza cistina e verde brillante), il Brodo di Rappaport-Vassiliadis (RV).

Si è visto che le salmonelle hanno un tempo di generazione più corto dei loro competitori, per cui è importante un pre-arricchimento di breve durata. Inoltre, la quantità dell'inoculo nei terreni deve essere generosa, rispettando, ad esempio, un rapporto di 1:10 (Jameson, 1963).

Ciascun terreno d'arricchimento è stato oggetto di cambiamenti nella formulazione, per assicurare una maggiore selettività e superare l'inconveniente della tossicità verso alcuni sierotipi di salmonella (Fagerberger *e Coll*., 1956; Rappaport *e Coll*., 1956; Vassiliadis *e Coll*., 1977), una ragione che ha portato all'uso contemporaneo di più arricchimenti (Guinée *e Coll*., 1962; Greenfield *e Coll*., 1964; Busse, 1995). Inoltre, per aumentare la specificità, si è deciso di elevare, in alcuni casi, la temperatura d'incubazione a 42-43 °C (Malo *e Coll*., 1970; Hammack *e Coll*., 1999).

Nuovi terreni di arricchimento si sono aggiunti in tempi più recenti. Reissbrodt *e Coll*. (1996), per esempio, consigliano di supplementare i terreni liquidi con ferrioxamina E. Shalch *e Coll*. (1997) suggeriscono di seminare 100 µl di pre-arricchimento in piastre di terreno d'arricchimento RV reso semisolido (MRSV), da incubare a +42 °C per 16-20 ore. Zhao *e Coll*. (2001) propongono un brodo di pre-arricchimento comune alla ricerca di *Salmonella*, *Listeria* ed *E. coli* O157.

I terreni selettivi in piastra hanno subìto maggiori cambiamenti. Sono andati in disuso l'Agar al sofito di bismuto (Cook, 1952), il Desossicolato Citrato Agar e l'SS Agar (PHLS, 1966). Continuano a essere usati l'Hektoen Enteric Agar (King *e Coll*., 1968), il Brillant Green Agar (Walker, 1981) e, in diagnostica veterinaria, il terreno di Gassner (Mayer *e Coll*., 1975). I substrati solidi selettivi di più recente nascita sono il Lysine Mannitol Glicerol Agar (Cox, 1993), il Rambach Agar (Weber *e Coll*., 1994), l'XLD e l'XLT_4 (Mioni *e Coll*., 1995), l' EF-18 Agar (Warburton *e Coll*., 1994) e l'SM ID (Devoto *e Coll*., 1995).

In alternativa all'esame colturale tradizionale, sono state messe in pratica, con vario successo, quasi tutte le tecnologie innovative elencate nel Capitolo 9. Anche altri procedimenti diagnostici, che non si possono classificare fra gli innovativi, sono usciti dalla creatività dei Ricercatori. Ad esempio, è sorta l'identificazione con i batteriofagi (lisotipia) dagli studi di Stellmacher (1957), Bulling (1960), Fey (1961), Castro *e Coll*. (1992) ed è nato il Mucap® Test.

La metodiche che hanno catturato maggiormente il favore dei laboratoristi sono state l'immunofluorescenza (Catsaras *e Coll*., 1972; Insalata *e Coll*., 1973; Smyser *e Coll*., 1973; Munson *e Coll*., 1976; Thomason, 1981), l'impedenza (Pless *e Coll*., 1994), l'ELISA (Cantoni, 1994) e la *Polymerase Chain Reaction* (PCR) (Fach *e Coll*., 1999). Gran parte del successo di questi due ultimi *test* è dovuta alla disponibilità di *kit* reperibili in commercio (Ibrahim *e Coll*., 1985; Blais *e Coll*., 1993; Hanai *e Coll*., 1997). A questo proposito, Bailey *e Coll*. (2003), con un sistema PCR commerciale, hanno analizzato per *Salmonella* campioni di varia natura seminati in brodo di arricchimento, rappresentato da acqua peptonata tamponata incubata a +35 °C per una notte. Il *test*, che richiede circa 4 ore, si chiama BAX® PCR System e rivela fino a una cellula per grammo di carne o per millilitro di lavaggio delle carcasse di polli industrialmente macellati.

Il metodo proposto

- Campione + terreno di pre-arricchimento
- Omogeneizzazione e incubazione a 37 °C x 18-24 ore
- Arricchimento in brodo selettivo (incubazione a 37 / 42 °C x 24 ore)
- Piastratura su terreno solido selettivo e differenziale (incubazione a 37 °C x 24 ore)
- Trapianto di colonie sospette in Kligler Iron Agar (incubazione a 37 °C x 24 ore)

- Prova di agglutinazione rapida con siero polivalente
- Identificazione biochimica e sierologica

Materiale richiesto

- Sacchetti sterili per Stomacher richiudibili
- Pipette graduate sterili monouso
- Terreno di pre-arricchimento (Brodo Lattosato o Acqua Peptonata Tamponata)
- Provette di terreno d'arricchimento (Brodo Selenito-Cistina, Brodo Rappaport-Vassiliadis)
- Provette di terreno Kligler Iron Agar
- Piastre Petri di terreno Hektoen Enteric Agar o di analogo terreno solido differenziale
- Antisiero polivalente *Salmonella*
- Materiale per l' esecuzione dei *test* biochimici necessari per l' identificazione di *Salmonella*

Esecuzione

Trasferire nel sacchetto richiudibile da Stomacher un'aliquota del campione in esame. Aggiungere quindi il terreno di pre-arricchimento, in rapporto 1/9 con il campione (ad esempio, 25 grammi del campione più 225 ml di pre-arricchimento).

Omogeneizzare accuratamente in Stomacher per 1-2 minuti. Porre quindi il sacchetto a incubare a 37 °C per 18-24 ore.

Al termine del periodo d'incubazione, trasferire 1 ml di brodo di pre-arricchimento in una provetta contenente 10 ml di brodo Selenito-Cistina e 0,1 ml di pre-arricchimento in una provetta contenente 10 ml di brodo Rappaport-Vassiliadis.

Incubare il brodo Selenito-Cistina a 37 °C per 24 ore e il brodo Rappaport-Vassiliadis a 42 °C per 24 ore.

Al termine del periodo d'incubazione, trasferire un'ansata di brodo di arricchimento su una piastra di Hektoen Enteric Agar o di altro terreno solido e differenziale, per ottenere la crescita di colonie isolate.

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

Trapiantare una o più colonie sospette (colonie incolori, generalmente con centro nero su Hektoen) in altrettante provette di Kligler Iron Agar. Incubare le provette di Kligler a 37 °C per 24 ore.

Selezionare le colonie trapiantate in base alle caratteristiche di crescita sul Kligler (fondo giallo generalmente con annerimento da produzione di H_2S e con formazione di gas, *slant* rosso) e all'esito di un'agglutinazione rapida su vetrino, utilizzando un siero polivalente anti-*Salmonella.*

Completare l'identificazione sulla base dell'esito di appropriati *test* biochimici.

Sottoporre il ceppo di *Salmonella* isolato a un'eventuale tipizzazione sierologica con antisieri O e H.

Nota

Nel caso del latte, la FIL-IDF consiglia di seminare, in doppio, 25 ml di campione direttamente in 225 ml di terreno di ricchimento, non ritenendo necessario il pre-arricchimento.

Per la ricerca di Salmonella con tamponi superficiali, si rimanda al Capitolo 7 - Controlli microbiologici su acqua, aria, superfici

Caratteristiche biochimiche utili per la differenziazione dei principali generi della famiglia *Enterobacteriaceae* (comportamento prevalente)

	Indolo	Urea	Lisina decarbossilasi	H_2S	Lattosio
Escherichia coli	+	-	d[1]	-	+
Edwardsiella	+	-	+	+	-
Salmonella	-	-	+	+	-
Citrobacter	-	d[1]	-	+	d[1]
Klebsiella	-	+	+	-	+
Enterobacter	d[1]	d[1]	+	-	d[1]
Serratia	-	d[1]	+	-	-
Proteus	d[1]	+	-	d[1]	-
Providencia	+	-	-	-	-

[1] d = risultato variabile

Nota applicativa

È consigliabile, in caso di isolamento di *Salmonelle* con metodo qualitativo, procedere ad una quantificazione del germe, usando il metodo MPN (vedi Capitolo 5° - Ricerca delle Salmonelle con MPN).

Pertanto, al momento del prelievo di 25 grammi di campione per l'analisi qualitativa, è opportuno prelevare altri 10 grammi di alimento, da congelare in un sacchetto sterile richiudibile. Questo secondo prelievo va scongelato a temperatura ambiente immediatamente prima dell'eventuale ripetizione quantitativa dell'analisi.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

Bailey J.S. *e Coll*., Efficiency of selenite cystine and TT enrichment broths for the detection of *Salmonella*, J. appl. Bact. 1981, *51*, 409

Bailey J.S. *e Coll*., Detection of *Salmonella* from chickens rinses and chicken hot dogs with the automated BAX PCR System, J. Food Protect. 2003, *66*, 2138-2140

Blais B.W. *e Coll*., Use of inexpensive O antisera as the detecting antibodies for *Salmonella* antigens in the polymyxin-cloth enzyme immunoassay, Int. J. Food Micr. 1993, *20*, 149-158

Bulling E., Die Bakteriophagen Differenzierung von *Salmonella typhimurium*, Berl. Münch. Tierarztl Wchschr. 1960, *4*, 69

Bulling E. *e Coll*., Arricchimenti per la diagnosi di *Salmonella*, Berl. Münch. Tierarztl. Wschr. 1966, *79*, 246

Busse M., Media for *Salmonella*, Int. J. Food Micr. 1995, *26*, 117-131

Cantoni C., Alla ricerca della *Salmonella*, Obiettivi Vet. 1994, *9*, 65

Castro D. *e Coll*., Development and application of a new scheme of phages for typing and differentiating *Salmonella* strains from different sources, J. Clin. Microbiol. 1992, *30*, 1418-1423

Catsaras M. *e Coll*., Recherche des salmonellae par immunofluorescence, Ann. Rech. Vet. 1972, *3*, 665

Cook G., Comparazione di due modifiche dell'Agar al solfito di bismuto per l'isolamento della *S. typhi* e *S. typhimurium*, J. Path. Bact. 1952, *64*, 559

Cox J.M., Lysine-Mannitol-Glycerol Agar, a medium for the isolation of *Salmonella spp*., including *S. typhi* and atypical strains, Appl. Env. Microbiol. 1993, *59*, 2602

Dack G.M., Importanza del pre-arricchimento per incoraggiare lo sviluppo delle salmonelle prima dell'arricchimento selettivo, Symp. on Methodology for *Salmonella* in Food, Bact. Rev. 1955, *19*, 275

Devoto G.L. *e Coll*., Utilizzo del terreno SM ID per l'isolamento delle salmonelle, Boll. Microbiol. Indagini di Laboratorio News 1995, *1*, 29

DIVISION OF MICROBIOLOGY - CENTER FOR FOOD SAFETY AND APPLIED NUTRITION - U.S. FDA. Bacteriological analytical manual. 6th edition, Association of Official Analytical Chemists, Arlington, 1984, 7.01-7.10 e supplemento settembre 1987, 7b.01-7b.08

Fach P. *e Coll*., Evaluation of a Polymerase Chain Reaction based test for detecting *Salmonella spp*. in food samples: Probelia Salmonella spp., J. Food Protect. 1999, *62*, 1387-1393

Fagerberg D.J. *e Coll*., Enrichment and plating methodology for *Salmonella* detection in food. A review, J. Milk Food Technol. 1976, *39*, 628

Fay H., Erfahrungen mit dem polyvalenten *Salmonella* Phag O-1, Röntgen und Laboratoriums Praxis 1961, 14, 154

FIL-IDF. Milk and milk products - Detection of *Salmonella*. Standard 93 A, 1985

Greenfield J. *e Coll*., Isolation of *Salmonella* and *Arizona* using enrichment media incubated at 35 and 43 °C, Avian Dis. 1969, *13*, 864

Guinée P.A. *e Coll*., Influenza dei metodi d'arricchimento per l'isolamento delle salmonelle, Antonie Van Leeuwenhoek 1962, *28*, 417

Gundstrup A.S.P. *e Coll*., *Salmonella* antagonists and *Salmonella* enrichment media, Health Lab. Sci. 1969, *6*, 221

Hammack T.S. *e Coll*., Relative effectiveness of selenite cystine broth, tetrathionate broth and Rappaport-Vassiliadis medium for the recovery of *Salmonella spp*. from foods with a low microbial load, J. Food Protect. 1999, *62*, 16-21

Hanai K. *e Coll*., Comparison of commercially available kits with standard methods for detection of *Salmonella* strains in foods, Appl. Environm. Microbiol. 1997, *63*, 775-778

Ibrahim G. *e Coll*., Detection of salmonellae using accelerated methods (review), Int. J. Food Micr. 1985, *2*, 259-272

ICMSF, Microrganisms in Food 1. Their significance and methods of enumeration. 2nd edition, University of Toronto Press, Toronto, 1988, 160-172

Insalata N.F. *e Coll*., Direct fluorescent antibody technique for the icrobiological examination of food and environmental swab samples for salmonellae, Appl. Micr. 1973, *26*, 268

Jameson J., Isolation of *Salmonella*, J. appl. Bact. 1963, *26*, 112

King S. *e Coll*., A new plating medium for the isolation of enteric pathogens (I-II), Appl. Micr. 1968, *16*, 577

Malo R. *e Coll*., Evaluation de quatre milieux d'enrichissment pour la mise en évidence des salmonelles aviaires, Can. J. Comp. Med. 1970, *34*, 111

Manafi M. *e Coll*., Comparison of three rapid screening methods for *Salmonella spp*.: Mucap test, micro screen latex test and Rambach agar, Letters in Appl. Micr. 1992, *14*, 163

Mayer H. *e Coll*., Untersuchungen über die Brauchbarkeit verschiedener Metachromgelb-Präparate für den Metachromgelb-Wasserblau-Laktose Agar nach Gassner, Zbl. Bakt. Hyg. 1.Abt. Orig. A 230, 1975

Mioni R. *e Coll*., Ricerca della *Salmonella* in campioni alimentari: confronto tra i vari terreni selettivi, Ind. Alim. 1995, *34*, 1158

Mossel D.A.A. *e Coll*., Les défaillances dans certains cas des milieux d'isolement des *Enterobacteriaceae* des aliments et des médicaments secs, Alimenta 1972, *11*, 29

Munson T.E. *e Coll*., Evaluation of an automated fluorescent antibody procedure for detection of *Salmonella* in foods and feeds, Appl. Environm. Microbiol. 1976, *31*, 514

PHLS, Public Health Laboratory Service, Routine control of Mac Conkey Agar and Deoxycholate Citrate Agar, Monthly Bull. 1968, *25*, 289
Pless P. *e Coll*., Rapid detection of salmonellae by means of a new impedance-splitting method, J. Food Protect. 1994, *57*, 369-376
Rappaport F. *e Coll*., A new enrichment medium for certain salmonellae, J. Clin. Path. 1956, *9*, 261
Reissbrodt R. *e Coll*., Ferrioxamine E – supplemented pre-enrichment and enrichment media improve various isolation methods for *Salmonella*, Int. J. Food Micr. 1996, *29*, 81-91
Shalch B. *e Coll*., Nachweis von Salmonellen mittels MSRV-Medium, Fleischwirtsch. 1997, 77, 344-347
Smyser C.F. *e Coll*., Fluorescent antibody methods for detecting salmonellae in animal by-products, Avian Dis. 1973, 17, 99
Stellmacher W., Zur Diagnostik von Salmonellabakterien, Monatshefte Vet. Med. 1957, 12, 349
Thomason B.M., Current status of immunofluorescent methodology for salmonellae, J. Food Protect. 1981, 44, 381
Vassiliadis P. *e Coll*., Isolement de salmonelles à partir de saucisses de porc en utilisant un nuoveau procédé d'enrichissement (R10/43 °), Rec. Med. Vet. 1977, 153, 489
Takàcs J., L'isolamento delle salmonelle causa di infezioni paratifoidi dai terreni d'arricchimento, Fourth Symposium of WAVFH, 1965, 167
Walker A.P., A note on the inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* by a modification of Brillant Green Agar for improved *Salmonella* isolation, J. appl. Bact. 1981, 51, 405
Warburton D.W. *e Coll*., A comparison of six different plating media used in the isolation of *Salmonella*, Int. J. Food Micr. 1994, 22, 277-289
Weber A. *e Coll*., Zum Nachweis von Salmonellen mittels Rambach Agar, Berl. Münch. Tierarztl. Wchschr. 1994, 107, 43
Zhao T. *e Coll*., Evaluation of universal pre-enrichment broth for growth of heat-injuried pathogens, J. Food Protect. 2001, 64, 1751-1755

SHIGELLA

Definizione

Bastoncini Gram-negativi, immobili, anaerobi facoltativi, colturalmente simili alle *Salmonelle*, lattosio-negativi e H_2S negativi, riconducibili a quattro specie: *sonnei, flexneri, boydii, dysenteriae.*

Scheda sintetica

Attività patogena	*agente eziologico di tossinfezioni*
Alimenti responsabili	*insalate miste, crostacei, molluschi*
Temperatura di moltiplicazione	*da 7 a 46 °C con optimum a 37 °C*
pH ***di sviluppo***	*5-8 con optimum 7*
Attività dell'acqua (Aw) richiesta	*>0,94*
Fattori d'inibizione	*comuni disinfettanti, cottura*
Dose infettante	*poche cellule*
Tossine prodotte	*tossina termolabile*
Sito di moltiplicazione	*mucosa intestinale*
Incubazione della malattia	*1-3 giorni*
Sintomi	*diarrea, feci con sangue, febbre, vomito, dolori addominali*
Indagini di laboratorio	*microrganismo nell'alimento sospetto e nelle feci dell'ammalato*

Il metodo proposto

- Campione + terreno di arricchimento (Selenito-Cistina)
- Omogeneizzazione e incubazione a 37 °C x 18-24 ore
- Piastratura su terreni solidi selettivi e differenziali (Hektoen Enteric Agar e Mac Conkey Agar, incubazione a 37 °C x 24 ore)
- Trapianto di colonie sospette in Kligler Iron Agar (incubazione a 37 °C x 24 ore)
- Identificazione biochimica

Materiale richiesto

- Sacchetti sterili per Stomacher richiudibili
- Pipette graduate sterili monouso
- Terreno di arricchimento Brodo Selenito-Cistina
- Provette di terreno Kligler Iron Agar
- Piastre Petri di terreno Hektoen Enteric Agar e di Mac Conkey Agar
- Materiale per l'esecuzione dei *test* biochimici necessari per l'identificazione di *Shigella*

Esecuzione

Trasferire nel sacchetto richiudibile da Stomacher un'aliquota del campione in esame. Aggiungere, quindi, brodo d'arricchimento Selenito-Cistina, avendo cura di rispettare il rapporto 1/9 campione/brodo (per esempio, 25 grammi di campione più 225 ml di brodo Selenito-Cistina).

Omogeneizzare accuratamente in Stomacher per 1-2 minuti.

Porre il sacchetto richiuso a incubare a 37 °C per 18-24 ore.

Trasferire, in doppio, un'ansata di coltura di arricchimento su una piastra di Hektoen Enteric Agar e su una piastra di Mac Conkey Agar, in modo da ottenere la crescita di colonie isolate.

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

Trapiantare una o più colonie sospette (incolori su Hektoen Enteric Agar e su Mac Conkey Agar) in altrettante provette di Kligler Iron Agar, da incubare a 37 °C per 24 ore.

Interpretazione

Identificare le colonie in base alle loro caratteristiche di crescita su Kligler (fondo giallo, *slant* rosso) e all'esito di appropriati *test* biochimici predisposti.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

DIVISION OF MICROBIOLOGY - CENTER FOR FOOD SAFETY AND APPLIED NUTRITION - U.S. FDA. Bacteriological Analytical Manual, 6th edition, Association of Official Analytical Chemists, Arlington, 1984, 9.01-9.05

ICMSF. Microrganisms in Food 1. Their significance and methods of enumeration. 2nd edition, University of Toronto Press, Toronto, 1988, 173-179

SCHWEITZ. LEBENSMITTELBUCH. Zeiter Band - Ringbuch V. Kapitel 56 "Mikrobiologie", 1988, 7.10/1-7.10/6

LISTERIA MONOCYTOGENES - RICERCA QUALITATIVA

Definizione

Bastoncini o cocco-bacilli Gram-positivi tendenti a decolorarsi, simili ai Corynebatteri, non sporigeni, mobili a temperatura ambiente, aerobi facoltativi.

Scheda sintetica

Attività patogena	*causa infezioni neonatali del SNC, meningoencefaliti nell'adulto, aborti*
Alimenti responsabili	*latte crudo o in polvere, formaggi a pasta molle o erborinati, gelati, carni crude, vegetali*
Temperatura di moltiplicazione	*da 1 a 45 °C con optimum a 30-37 °C*
pH ***di sviluppo***	*4,8-9,0 con optimum 6-7*
Attività dell'acqua (Aw) richiesta	*> 0,93*
Fattori d'inibizione	*NaCl >7%, comuni disinfettanti*
Dose infettante	*$>10^3$*
Tossine prodotte	*emolisine*
Sito di moltiplicazione	*sistema nervoso, apparato riproduttore*
Incubazione della malattia	*da alcuni giorni a 2-3 mesi*
Sintomi	*sintomatologia di tipo influenzale con febbre e diarrea*
Indagini di laboratorio	*microrganismo nell' alimento sospetto e nelle feci oppure organi, anticorpi nel siero*

Alcuni cenni storici

Riconoscere *Listeria monocytogenes* su terreni semplici, ad esempio Agar sangue, è apparso subito difficile, per cui si sono resi indispensabili terreni specializzati.

McBride *e Coll*. (1960) mettono a punto un terreno selettivo per l'isolamento di *Listeria monocytogenes* da popolazioni batteriche miste. Ma la lettura delle piastre con luce incidente per riconoscere le colonie dall'aspetto iridescente non soddisfa i Ricercatori, che sentono l'esigenza di un arricchimento capace di recuperare (e far moltiplicare) anche poche cellule stressate. Nasce l'idea di sfruttare la tolleranza di questo microrganismo alle basse temperature, incubando le brodocolture in frigorifero fino a 2 mesi, con trapianti a intervalli settimanali su piastre non selettive (Doyle *e Coll*., 1986, per i campioni fecali e biologici; Slade *e Coll*, 1988, per l'analisi del latte crudo).

Tuttavia, i tempi di risposta non adeguati alla diagnostica fanno abbandonare ben presto l'arricchimento "a freddo", dando spazio ai supplementi antibiotici da aggiungere sia ai brodi d'arricchimento che ai terreni solidi (Vernozy-Rozand *e Coll*., 2001).

Così, Doyle *e Coll*. (1986) creano, per la diagnostica umana, il brodo d'arricchimento SEP contenente acriflavina, polimixina e acido nalidixico.

Altri terreni liquidi si affermano poi nei laboratori di diagnostica alimentare. Tra questi il Listeria Enrichment Broth (LEB), sperimentato, tra gli altri, da Genigeorgis *e Coll*. (1989) per le carni di pollo seguendo un protocollo analogo a quello sopra descritto.

Fraser *e Coll*. (1988) presentano un brodo d'arricchimento che, grazie all'aggiunta di esculina, vira al marrone inoculato con campioni sospetti. Questo brodo viene usato anche da Pritchard *e Coll*. (1995) nei controlli in caseificio.

Bush *e Coll*. (1992) sviluppano un arricchimento che dovrebbe rivitalizzare le cellule delle Listerie stressate dal calore.

Stan Bailey *e Coll*. (1992) prospettano un brodo di pre-arricchimento universale per l'isolamento simultaneo di *Salmonella* e di *Listeria* da alimenti.

Warburton *e Coll*. (1992) cercano la condizione ottimale per ritrovare anche basse concentrazioni di Listerie scarsamente vitali e prospettano la superiorità di un pre-arricchimento seguito da un arricchimento nello stesso brodo.

Soncini *e Coll*. (1993) adoperano, per analizzare il latte bovino, il PALCAM Selective Enrichment Broth a +30 °C per 24 ore, con trapianto di 1 ml in 9 ml dello stesso terreno.

Negli Stati Uniti, le principali organizzazioni governative (FDA e USDA) si preoccupano di diffondere linee-guida per il controllo delle produzioni alimentari più a rischio per *Listeria*, stabilendo anche dei protocolli di analisi ritenuti più appropriati nell'esame di latte e di carni (Yu *e Coll*., 1991). Questi metodi, che suggeriscono un arricchimento unico di 48 ore oppure due arricchimenti di 24 ore ciascuno, seguiti da trapianto su almeno un terreno selettivo, non presentano differenze di resa sostanziali, come spiegato dalle prove comparative di Warburton *e Coll*. (1991), Hayes *e Coll*. (1992), Lund *e Coll*. (1992).

I tentativi di perfezionamento dei brodi d'arrichimento continuano con la proposta del LITMA di Baumgart *e Coll*. (1994), col terreno di Johansson *e Coll.* (1995) privato delle sostanze tossiche cicloeximide e acriflavina e con la modifica al LEB di Patel *e Coll*. (1995) che include la catalasi ad effetto anti-*stress*.

Certamente, l'introduzione sul mercato di due terreni selettivi molto validi (Oxford Agar e Palcam Agar) ha facilitato grandemente la diagnosi di *Listeria*, gettando le basi per un protocollo universalmente accettato (Curtis *e Coll*., 1989; Poysky *e Coll*., 1993; Cantoni *e Coll*., 2000).

Non mancano tentativi per trovare formulazioni sempre più selettive a favore delle listerie in genere e differenziali nei confronti della specie *monocytogenes* che, tuttavia, non hanno avuto molto seguito. Si ricordano i seguenti terreni: Vogel-Johnson Agar (Buchanan *e Coll*., 1987); LCA (Lachica, 1990); EHA (Cox *e Coll*., 1991); ASLM (Al-Zoreky *e Coll*., 1990).

I substrati cromogenici e fluorogenici di più recente introduzione (Restaino *e Coll*., 1999) contenenti un X-glucoside, facilitando il riconoscimento delle colonie di *Listeria monocytogenes*, grazie alla presenza di una glucosidasi, hanno portato nuovi sensibili miglioramenti. Si ricordano l'Agar Listeria di Agosti e Ottaviani (1997), più conosciuto come ALOA® (Biolife, descritto da Flamigni *e Coll*., 1999), il Rapid L-Mono® (Sanofi-Pasteur, descritto da Polivka, 201) e il terreno LMPM (descritto da Lionberg *e Coll*., 2003). Su ALOA, le colonie di *Listeria monocytogenes* crescono azzurre, circondate da un alone opaco, conseguenza dell'attività fosfolipasica del microrganismo. Su Rapid L-Mono, sono blu (a differenza delle altre listerie, che crescono colorate in giallo), mentre su LMPM appaiono color turchese.

Anche la biochimica ha fatto progressi importanti per migliorare l'identificazione di *Listeria monocytogenes*. Si ricordano gli studi di Rocourt *e Coll*. (1983) con la prova dell' alfa-metil-D-mannoside, positiva in *Listeria monocytogenes*, di Siragusa *e Coll*. (1993) sulla validità del *test* di fermentazione dell'alfa-metil-D-mannopiranoside per distinguere le specie *monocytogenes* e *seeligeri* e di Ermolaeva *e Coll*. (2003) sull'induzione dell'attività lecitinasica con il charcoal.

In alternativa all'esame colturale tradizionale, hanno trovato applicazioni pratiche anche altre tecnologie, per le quali si rimanda al Capitolo 9 sui metodi innovativi. Due fra queste tecniche hanno permesso la realizzazione di numerose ricerche, soprattutto perché hanno trovato applicazione in *kit* commerciali. Si tratta dei *test* immunoenzimatici (ELISA), adottati, oltre che da altri Autori, da Norrung *e Coll*. (1991) e da Cantoni *e Coll.* (1994 e 1998), e dei *test* di amplificazione del DNA, più noti come PCR (Bobbitt *e Coll*., 1992; Scheu *e Coll*., 1999; Becker *e Coll*., 2002).

Il metodo proposto

- Campione + brodo di arricchimento LEB
- Omogeneizzazione e incubazione a 30 °c x 24 ore
- Secondo arricchimento in LEB
- Incubazione a 30 °C x 24 ore
- Piastratura su terreno solido selettivo e differenziale (Oxford Agar oppure ALOA)
- Incubazione a 37 °C x 24-48 ore
- Trapianto di colonie sospette in TSA + 0,6% di estratto di lievito (incubazione a 37 °C x 24 ore)
- Identificazione di *Listeria monocytogenes*

Materiale richiesto

- Sacchetti sterili per Stomacher richiudibili
- Pipette graduate sterili monouso
- Brodo di arricchimento Listeria Enrichment Broth (LEB)
- Piastre Petri di terreno Oxford Agar addizionato con supplemento Oxford
- Provette di terreno Trypticase Soy Broth (TSB) addizionato di estratto di lievito allo 0,6%
- Provette di terreno Trypticase Soy Agar (TSA) preparato con TSB, agar-agar per batteriologia 1,5%, estratto di lievito 0,6%
- Materiale per l'esecuzione di prove biochimiche e sierologiche (antisiero O tipo 1 *Listeria*, antisiero O tipo 4 *Listeria*) utili ai fini dell'identificazione di *Listeria monocytogenes*

Esecuzione

Trasferire nel sacchetto richiudibile da Stomacher un'aliquota del campione in esame. Aggiungere quindi Listeria Enrichment Broth (LEB), avendo cura di rispettare il rapporto 1/9 campione / brodo (per esempio, 25 grammi del campione più 225 ml di LEB).

Omogeneizzare accuratamente in Stomacher per 1-2 minuti.

Porre il sacchetto richiuso a incubare a 30 °C per 24 ore (primo arricchimento).

Al termine del periodo d' incubazione, trasferire 0,1 ml di coltura di primo arricchimento in una provetta contenente 10 ml di LEB (secondo arricchimento sullo stesso tipo di terreno).

Porre la provetta di LEB a incubare a 30 °C per 24 ore.

Trasferire, in doppio, un'ansata di coltura di secondo arricchimento su due piastre di Oxford Agar, oppure su una piastra di ALOA, in modo da ottenere la crescita di colonie isolate.

Incubare le piastre capovolte a 37 °C per 24-48 ore.

Per la ricerca di Listeria monocytogenes con tamponi superficiali si rimanda al Capitolo 7 - Controlli microbiologici su acqua, aria, superfici.

Interpretazione

Considerare sospette le colonie scure che appaiono circondate da un alone nerastro-bruno, rotonde, piatte, a superficie liscia e lucida, con centro concavo più scuro, leggermente infossate nel terreno (a 24 ore le colonie possono presentarsi puntiformi, del diametro inferiore a 0,5 mm, per cui è raccomandabile continuare l' incubazione per altre 24 ore).

Trapiantare una o più colonie sospette in altrettante provette di TSB + 0,6% di estratto di lievito (per l'esecuzione del *test* dell'emolisi in sospensione o per infissione) e in provette di TSA + 0,6% di estratto di lievito (per le prove biochimiche e sierologiche).

Incubare a 37 °C per 24 ore.

A partire dalle colture cresciute su TSB e TSA, procedere all'identificazione di *L. monocytogenes* basandosi sulle seguenti prove:

- morfologia al microscopio, dopo striscio su vetrino e colorazione di Gram (bastoncini gram-positivi).
- catalasi (+), da allestire **dopo aver effettuato** tutte le prove da seminare con il TSB. La prova consiste nell'aggiungere al TSB 0,5 ml di acqua ossigenata al 3 % e nell'osservare, in caso di esito positivo, la formazione immediata di bolle di gas alla superficie del brodo.
- emolisi (+) allestita con uno dei seguenti metodi :
  - infissione con l' ago su più punti in una piastra di Agar sangue, da incubare a 37 °C e leggere dopo 24 ore;
  - sospensione, realizzata aggiungendo a 50 microlitri di brodocoltura in TSB 100 microlitri di sospensione allo 0,25 % in soluzione sterile di Alsever di globuli rossi lavati di pecora. La lettura dell'emolisi è possibile dopo 2 ore d' incubazione in termostato a 37 °C.
- CAMP *test*, eseguito con *Staphylococcus aureus* (+) e con *Rhodococcus equi* (-) da incubare a 37 °C per 24-48 ore (alcuni ceppi possono essere *R. equi* +).
- *test* di fermentazione del ramnosio (+) e dello xilosio (-) da incubare a 37 °C per 24 ore.
- eventuali altre prove biochimiche, impiegando appropriati *test* predisposti.
- mobilità (+) da incubare a temperatura ambiente per 48-72 ore.
- agglutinazioni rapide su vetrino con antisieri O del tipo 1 e 4.

Caratteristiche biochimiche utili per la differenziazione delle principali specie del genere *Listeria* (comportamento prevalente)

	β-emolisi	CAMP *test* (*S. aureus*)	CAMP *test* (*R. equi*)	Mannite	α-metil-D-mannoside	Ramnosio	Xilosio
L. gray	-	-	-	+	n.d.[1]	-	-
L. innocua	-	-	-	-	+	d[2]	-
L. ivanovii	+	-	+	-	-	-	+
L. monocytogenes	+	+	-	-	+	+	-
L. murrayi	-	-	-	+	n.d.[1]	d[2]	-
L. seeligeri	+	+	-	-	-	-	+
L. welshimeri	-	-	-	-	+	d[2]	+

[1] n.d. = non determinato

[2] d = risultato variabile

Nota applicativa 1

Il *test* di patogenicità su topo è da considerare opzionale, avendo perso nel tempo l'importanza diagnostica inizialmente attribuita, non da ultimo a causa delle difficoltà di applicazione. Si esegue inoculando, per via intraperitoneale, 5 topi (da 20 grammi circa di peso ciascuno) con 0,1 ml di una sospensione in soluzione fisiologica dello stipite di *Listeria* in esame. La sospensione viene allestita a partire da una brodocoltura di 18-24 ore cresciuta in TSB + 0,6% di estratto di lievito, centrifugata a 3.000 rpm per 30 minuti e risospesa in 1 ml di soluzione fisiologica sterile. L'osservazione dei soggetti inoculati va protratta per 5 giorni. Dai soggetti che soccombono, si procede al reisolamento delle listerie dalla milza e dal cervello.

Il *test* su topo è stato descritto da Farber *e Coll*. (1987) a proposito della sorveglianza sui formaggi molli e semi-duri per la presenza di *Listeria monocytogenes.* Anche Mainou-Fowler

e Coll. (1988) si sono espressi favorevolmente sulla sensibilità e specificità della prova biologica, asserendo che *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* (ritenute listerie patogene) hanno, nei riguardi del topo, una dose letale (LD_{50}) molto bassa, a differenza di *L. innocua*, *L. welshimeri* e *L. seeligeri*.

Esistono alternative alla prova biologica su topo per accertare la patogenicità di listerie isolate da alimenti. Steinmeyer *e Coll*. (1987) hanno usato l'inoculazione di brodocolture del ceppo in esame sulla membrana corion-allantoidea di uova embrionate di pollo di 10 giorni. Il ceppo di listeria da provare veniva diluito in soluzione di Ringer, fino a ottenere una concentrazione di 100-30.000 germi per uovo. Con i ceppi patogeni si assisteva a mortalità dell'embrione entro 72 ore.

Heil *e Coll*. (1990) descrivono invece la prova su colture cellulari. Una brodocoltura del ceppo di listeria, realizzata in Trypticase Soy Broth (TSB) incubato sotto agitazione a +37 °C per 24 ore, viene centrifugata a 9500 rpm per 20 minuti e, successivamente, il soprastante filtrato su membrana da 0,2 micrometri. Dal filtrato, 0,1 ml vengono inoculati in 1 ml di sospensione di cellule VERO, previamente incubate in piastre *microtiter* da 24 pozzetti a +37 °C per 24 ore, con il 2% di anidride carbonica. *L. monocytogenes* e *L. ivanovii* mostrano effetto citotossico entro 48 ore, mentre le altre listerie non provocano effetti apprezzabili sulla linea cellulare.

Nota applicativa 2

In caso di isolamento di *L. monocytogenes* con l'analisi qualitativa su 25 grammi, per poter allestire un conteggio del germe, prelevare, contemporaneamente ai 25 grammi sopra citati, altri 10 grammi di alimento, da congelare entro un sacchetto da Stomacher sterile richiudibile. Questo secondo prelievo viene fatto scongelare a temperatura ambiente immediatamente prima dell'eventuale ripetizione qualitativa dell'analisi.

La descrizione delle metodiche quantitative relative alla *Listeria monocytogenes* è riportata nel Capitolo 5 - Prove tipicamente quantitative.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

Al-Zoreky N. e *Coll*., Higly selective medium for isolation of *Listeria monocytogenes* from food, Appl. Environm. Miicrobiol. 1990, 56, 3154

Becker B. e *Coll*., Application of a simple PCR assay for the rapid detection of *Listeria monocytogenes* in minced meat, Arch. Lebens. 2002, 53, 73-96

Baumgart J. e *Coll*., *Listeria monocytogenes* in Hackfleisch, Fleischwirtsch. 1994, 74, 647-648

Bobbitt J.A. e *Coll*., Confirmation of *Listeria monocytogenes* using a commercially available nucleic acid probe, Food Microbiol. 1992, 9, 311-317

Buchanan R.L. e *Coll*., Improved plating media for simplified quantitative detection of *Listeria monocytogenes* in foods, Food Microbiol. 1987, 4, 269

Bush S. e *Coll*., Development of a repair enrichment broth for resuscitation of health-injuried *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua*, Appl. Environm. Microbiol. 1992, 58, 14-20

Cantoni C. e *Coll*., Sulla determinazione immunoenzimatica delle listerie, Ind. Alim. 1994, 33, 841

Cantoni C. e *Coll.*, Identificazione di *Listeria monocytogenes* con un nuovo sandwich ELISA *test*, Ind. Alim. 1998, 37, 176

Cantoni C. e *Coll*., Impiego di un terreno semisolido per l'isolamento di *Listeria* spp., Ind. Alim. 2000, 39, 716

Capita R. e *Coll*., Comparison of the efficacy of different techniques, culture media and sources of blood in determining the hemolytic activity of *Listeria* spp., Can. J. Microbiol. 2001, 47, 653-661

Curtis G.D.W. e *Coll*., A selective differential medium for the isolation of *Listeria monocytogenes*, Letters in Appl. Microbiol. 1989, 8, 85

Cox L.J. e *Coll*., Enhanced hemolysis agar (EHA). An improved selective and differential medium for isolation of *Listeria monocytogenes*, Food Microbiol. 1991, 8, 37-49

DIVISION OF MICROBIOLOGY - CENTER FOR FOOD SAFETY AND APPLIED NUTRITION - U.S. FDA. Bacteriological analytical manual. 6th edition, Association of Official Analytical Chemists, Arlington, 1984, Supplemento settembre 1987, 29.01-29.12

Doyle M.P. e *Coll*., Selective enrichment procedure for isolation of *Listeria monocytogenes* from fecal and biological specimens, Appl. Environm. Microbiol. 1986, 51, 1127-1129

Ermolaeva S. e *Coll*., A simple method for the differentiation of *Listeria monocytogenes* based on induction of lecitinase activity by charcoal, Int. J. Food Micr. 2003, 82, 87-94

Farber J.M. e *Coll*., Surveillance of soft and semi-soft cheeses for the presence of *Listeria* spp., Int. J. Food Micr. 1987, 5, 157

Flamigni L. e *Coll*., Conteggio rapido di *Listeria monocytogenes* per inclusione in terreno selettivo e differenziale (ALOA), Ind. Alim. 1989, 38, 127

Fraser J.A. e *Coll*., Rapid detection of *Listeria* spp. in food and environmental samples by esculin hydrolysis, J. Food Protect. 1988, 51, 762

Genigeorgis C. e *Coll*., Prevalence of *Listeria* spp. in poultry meat at the supermarket and slaughterhouse level, J. Food Protect. 1989, 52, 618-624

Hayes P.S. e *Coll*., Comparison of three selective enrichment methods for the isolation of *Listeria monocytogenes* from naturally contaminated foods, J. Food Protect. 1992, 55, 952-959

Heil G. e *Coll*., Zum Nachweis der Pathogenität von Listerien mittels permanenter Zell-linie als alternative fur den Tierversuch, J. Vet. Med. 1990, 37, 707

Johansson T.M.L. e *Coll*., A less hazardous enrichment broth for *Listeria* without cycloheximide and acriflavine, J. Food Protect. 1995, 58, 1263

Lachica R.V., Selective plating medium for quantitative recovery of food-borne *Listeria monocytogenes*, Appl. Environm. Microbiol. 1990, 56, 167-169

Lionberg W. e *Coll*., *Listeria monocytogenes* incidence and distribution on a selective/ differential plating medium in *Listeria*-positive environmental samples from ready-to-eat food facilities Food Protect. Trends 2003, 23, 554-557

Lund A.M. e *Coll*., Comparison of methods for isolation of *Listeria* from raw milk, J. Food Protect. 1992, 54, 602-606

Mainou-Fowler T. e *Coll*., Virulence of *Listeria* spp.: course of infection in resistant and susceptible mice, J. Med. Microbiol. 1988, 27, 131

Mc Bride M. e *Coll*., A selective method for the isolation of *Listeria monocytogenes* from mixed bacterial populations, J. Lab. Clin. Med. 1960, 6, 153

Mc Clain D., Lee W.H., Development of USDA-FSIS method for isolation of *Listeria monocytogenes* from raw meat and poultry. J. Assoc. Off. Anal. Chem., 1988, 71(3), 660-664

Norrung B. e *Coll*., Evaluation of an ELISA test for detection of *Listeria* spp., J. Food Protect. 1991, 54, 752-755

Ottaviani F., Ottaviani M., Agosti M., Esperienza su un agar selettivo e differenziale per *Listeria monocytogenes,* Ind. Alim. 1997, 36, 1-3

OXOID MANUAL. 6th edition , 1990, 2.132-2.133

Patel J.R. e *Coll*., Evaluation of enrichment broths for their ability to recover heat-injuried *Listeria monocytogenes*, J. appl. Bact. 1995, 78, 366-372

Polivka C., Identification of *Listeria* with a new chromogenic medium Rapid L-Mono® (Sanofi), Arch. Lebens. 2001, 52, 22-23

Poysky F.T. e *Coll*., Selective and differential medium for isolation of *Listeria monocytogenes* from foods, J. Food Protect. 1993, 56, 326-329

Pritchard T.J. e *Coll*., Comparison of the incidence of *Listeria* on equipment versus environmental sites within dairy processing plants, Int. J. Food Micr. 1995, 26, 375-384

Restaino L. e *Coll*., Isolation and detection of *Listeria monocytogenes* using fluorogenic and chromogenic substrates for phosphatidyl-inositol specific phospholipase C, J. Food protect. 1999, 62, 244-251

Rocourt J. e *Coll*., Differentiation biochimique des groupes genomiques de *Listeria monocytogenes* (*sensu lato*), Ann. Microbiol. Inst. Pasteur 1983, 134 A, 66-71

Scheu P. e *Coll*., Rapid detection of *Listeria monocytogenes* by PCR-ELISA, Letters in Appl. Micr. 1999, 29, 416-420

SCHWEITZ. LEBENSMITTELBUCH, Zweiter Band - Ringbuch V. Kapitel 56 "Mikrobiologie", 1988, 7.25/1-7.25/6

Siragusa G.R. e *Coll*., Isolation of *Listeria* spp. from feces of feedlot cattle, J. Food Protect. 1993, 56, 102

Soncini G. e *Coll*., Indagine sulla presenza di *Listeria monocytogenes* in latte vaccino crudo, Il latte 1993

Stan Bailey J. e *Coll*., Universal pre-enrichment broth for the simultaneous detection of *Salmonella* and *Listeria* in foods, J. Food Protect. 1992, 55, 256-259

Steinmeyer S. e *Coll*., Zum Nachweis der Pathogenität von aus Lebensmitteln isolierten Listerien am bebrüteten Huhnerei, Arch. Lebens. 1987, 38, 93

Vernozy-Rozand C. e *Coll*., Les méthodes de détection de *Listeria* dans l'aliment, Bull. GTV 2001, 11, 41-44

Warburton D.W. e *Coll*., A comparative study of the FDA and USDA methods for the detection of *Listeria monocytgenes* in foods, Int. J. Food Micr. 1991, 13, 105

Warburton D.W. e *Coll*., Comparison of methods for optimum detection of stressed and low levels of *Listeria monocytogenes*, Food Microbiol. 1992, 9, 127-145

Yu L.S.L. e *Coll*., Evaluation of FDA and USDA precedures for enumerating *Listeria monocytogenes* in ground beef, Food Microbiol. 1991, *8*, 69-74

VIBRIONI

Definizione

Bastoncini Gram-negativi ripiegati a virgola, mobili, anaerobi facoltativi, in grado di resistere a valori elevati di *p*H. *V. cholerae* è antigenicamente differenziabile in due biotipi *(comma, El-Tor)* e in tre sotto-biotipi *(Inaba, Ogawa, Hikojima). V. parahaemolyticus* si presenta come un bastoncino Gram-negativo, mobile, anaerobio facoltativo, alofilo. I cosiddetti "Vibrioni correlati" comprendono numerose specie alofile, patogene facoltative, tra cui *V. vulnificus, V. alginolyticus, V. metschnikovii, V. fluvialis.*

1. *VIBRIO CHOLERAE* O1 E O139

Scheda sintetica

Attività patogena	*agente eziologico di tossinfezioni*
Alimenti responsabili	*prodotti ittici consumati crudi, verdure crude*
Temperatura di moltiplicazione	*da 10 a 43 °C con optimum a 37 °C*
pH ***di sviluppo***	*5-9,6 con optimum a 7,6*
Attività dell'acqua (Aw) richiesta	*> 0,97*
Fattori d'inibizione	*comuni disinfettanti, ebollizione*
Dose infettante	*1,5 x 10^5-7 x 10^6*
Tossine prodotte	*tossina termolabile*
Sito di moltiplicazione	*mucosa intestinale*
Incubazione della malattia	*1-3 giorni*
Sintomi	*diarrea acquosa, vomito, disidratazione*
Indagini di laboratorio	*microrganismo nell'alimento sospetto e nelle feci dell'ammalato*

Il metodo proposto

- Campione + Acqua Peptonata Alcalina
- Omogeneizzazione e incubazione a 37 °C x 6 ore
- Secondo arricchimento (incubazione a 37 °C x 18-24 ore)
- Piastratura del primo arricchimento su TCBS agar (incubazione a 37 °C x 18-24 ore)
- Piastratura del secondo arricchimento su TCBS agar (incubazione a 37 °C x 18-24 ore)
- Trapianto di colonie sospette in Kligler (incubazione a 37 °C x 24 ore)
- Agglutinazione rapida su vetrino con siero anti-*Vibrio cholerae* O1 e O139
- In caso di positività, semina delle prove biochimiche di identificazione per *Vibrio cholerae*

Materiale richiesto

- Sacchetti sterili per Stomacher richiudibili
- Pipette graduate sterili monouso
- Acqua Peptonata Alcalina sterile
- Piastre Petri di terreno TCBS agar
- Provette di terreno Kligler Iron Agar
- Antisieri *Vibrio cholerae* O1 e O139
- Materiale per l'esecuzione di prove biochimiche utili ai fini dell'identificazione di *V. cholerae*

Esecuzione

Trasferire nel sacchetto richiudibile un'aliquota del campione in esame. Aggiungere, quindi, Acqua Peptonata Alcalina (APA), avendo cura di rispettare il rapporto 1/9 tra campione e terreno (per esempio, 25 grammi del campione più 225 ml di Acqua Peptonata Alcalina).

Omogeneizzare accuratamente in Stomacher per 1-2 minuti.

Porre il sacchetto richiuso a incubare a 37 °C per 6 ore (primo arricchimento).

Al termine del periodo d'incubazione, trasferire, in doppio, un'ansata di coltura su due piastre di TCBS Agar e, contemporaneamente, trasferire 1 ml di coltura di primo arricchimento in 10 ml di Acqua Peptonata Alcalina (secondo arricchimento).

Incubare le piastre capovolte e la provetta del secondo arricchimento a 37 °C per 18-24 ore.

Piastrare il secondo arricchimento su due piastre di TCBS Agar, da incubare a 37 °C per 18-24 ore.

Interpretazione

Identificare come colonie sospette di *V. cholerae* quelle che su TCBS si presentano con un diametro di 2-3 mm, lisce, leggermente appiattite, con centro opaco e periferia translucida, di colore giallo e tendenti a diventare verdi dopo prolungata incubazione.

Trapiantare una o più colonie sospette in provette di Kligler Iron Agar, da incubare a 37 °C per 24 ore. Le colture di *V. cholerae* si presentano sul Kligler con fondo giallo e *slant* rosso.

Saggiare le colture cresciute in Kligler mediante agglutinazione rapida su vetrino con antisiero *Vibrio cholerae O1* e O139.

I ceppi che non agglutinano con gli antisieri indicati sono da considerare *V. cholerae NAG,* di incerto potere patogeno. Il risultato della prova è pertanto da ritenersi negativo.

In caso di agglutinazione positiva, confermare la presenza di *V. cholerae* mediante appropriate prove biochimiche.

Per una più accurata caratterizzazione dei ceppi isolati, è raccomandabile, inoltre, eseguire un *test* sulla produzione di tossina (vedi dimostrazione delle tossine batteriche).

Si ritiene opportuno far notare che, in casi di sospetto colera, assume un significato preminente la dimostrazione del germe nelle feci di individui con sintomatologia diarroica o a rischio di contagio per provenienza.

Lesmana *e Coll*. (1997) ribadiscono la validità del terreno TCBS Agar, seminato direttamente con il campione di feci in caso di forme cliniche acute, oppure con la coltura di arricchimento in acqua peptonata alcalina negli altri casi. Secondo questi Autori, la doppia piastratura (dopo 6 e 24 ore) andrebbe mantenuta solo se si ricercano i vibrioni NAG.

Tutti i ceppi ritenuti probabili patogeni e i ceppi isolati comunque da casi dubbi o correlabili a episodi sospetti devono essere inviati per ulteriori accertamenti e conferme al CENTRO NAZIONALE DI REFERENZA (Istituto Superiore di Sanità - Roma). È infatti possibile che, in natura, si trovino ceppi appartenenti a sierogruppi diversi da O1 e O139 e tuttavia dotati dei caratteri di virulenza propri di *Vibrio cholerae.* Nandy *e Coll*. (1995) hanno evidenziato alcune somiglianze fra questi ceppi e il gruppo O139.

Mukhopadhyay *e Coll*. (1995) hanno diagnosticato 36 diversi sierotipi O collegabili a episodi di colera. Tra questi, oltre a O1 e O139, figurano i sierotipi O22 e O155.

2. *VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS* E VIBRIONI CORRELATI

Scheda sintetica (Vibrio parahaemolyticus)

Attività patogena	*agente eziologico di tossinfezioni*
Alimenti responsabili	*prodotti ittici consumati crudi, verdure*
Temperatura di moltiplicazione	*da 12,8 a 43 °C, con optimum a 37 °C*
pH *di sviluppo*	*da 4,5 a 11 - optimum 7,5*
Attività dell'acqua (Aw) richiesta	*> 0,94*
Fattori d'inibizione	*NaCl >8%, temperatura <5°C*
Dose infettante	*10.000 germi*
Tossine prodotte	*endotossine*
Sito di moltiplicazione	*mucosa intestinale*
Incubazione della malattia	*12-24 h*
Sintomi	*diarrea, febbre, dolori addominali, talvolta vomito*
Indagini di laboratorio	*microrganismo nell'alimento sospetto e nelle feci dell'ammalato*

Alcuni cenni storici

Il terreno TCBS Agar costituisce, fino a oggi, il miglior compromesso fra i vari terreni selettivi messi a punto per la ricerca dei vibrioni. Alcune conferme autorevoli sulla validità di questo terreno provengono dalle esperienze dei seguenti Ricercatori:

- Sakazaki *e Coll*. (1979), che hanno usato il terreno TCBS per la conta del *V. parahaemolyticus*, confrontandolo con il metodo MPN in Salt-Polymixin-Broth, riscontrando una buona sensibilità, quando sono presenti concentrazioni di almeno 10 germi per grammo di campione;
- Karunasagar *e Coll*. (1986), che hanno sostenuto la possibilità di contare le colonie di *V. parahaemolyticus* su TCBS dopo semina diretta del campione sulle piastre;
- Donovan *e Coll*. (1995), che hanno impiegato il TCBS nella ricerca dei vibrioni isolabili da alimenti e da campioni ambientali;
- Ottaviani *e Coll*. (1995), che, usando il TCBS, hanno riscontrato il *Vibrio alginolyticus* presente nel 90% dei prodotti ittici freschi e nel 36% di quelli congelati;
- Avanza *e Coll*.(1996), che, per la dimostrazione di *Vibrio vulnificus*, hanno messo a punto un metodo specifico, definendo il diluente da usare (acqua 1% peptonata addizionata con il 3% di NaCl) e le prove biochimiche necessarie per l'identificazione di specie (lisina decarbossilasi, cellobiosio, salicina);
- Alam *e Coll*. (2001), che raccomandano, prima della piastratura sul TCBS Agar, una fase di resuscitazione delle cellule stressate di *Vibrio parahaemolyticus*, seminando il campione in esame su piastre di Agar Nutritivo a *p*H 7.0 contenente il 3% di NaCl.

Altre indicazioni si trovano in pubblicazioni meno recenti ma altrettanto interessanti, come quelle di Kourani (1983), Sloan *e Coll*. (1992) e Dodin *e Coll*. (1992), a cura dell'Institut Pasteur di Parigi.

Si trovano anche tecniche alternative alla piastratura su TCBS Agar. Ann Ma-Lin *e Coll*. (1980) hanno provato alcuni terreni liquidi di arricchimento (Glucose Salt Teepol Broth o GST; Horie Arabinose Ethylviolet Broth o HAE), supplementati con sali di magnesio e di ferro per migliorare le prestazioni del metodo MPN. La coltura su tre provette per ogni diluizione del campione, a +35 °C per 22 ore, era seguita da piastratura su TCBS.

Hagen *e Coll*. (1994), per la ricerca dl *V. parahaemolyticus* e di *V. vulnificus* da alimenti di origine marina, hanno adoperato il metodo MPN in provette di Acqua Peptonata Alcalina,

incubate a +35 °C per 16 ore, con successivi trapianti su CPC Agar (contenente cellobiosio-polimixina-colistina e incubato a +40 °C per 18-24 ore). Questo terreno è stato adoperato anche da Massad *e Coll*. (1987) per la ricerca di *Vibrio cholerae* e da Sun *e Coll*. (1995) per la ricerca nelle ostriche di *Vibrio vulnificus*, che cresce con colonie gialle, piatte, con centro giallo scuro.

L'elevata frequenza dei casi di tossinfezione da vibrioni marini in Giappone, conseguente all'abitudine di consumare pesce crudo, comune anche in altri paesi asiatici, ha spinto i Ricercatori a sperimentare tecniche d'analisi rapide.

De Paola *e Coll*. (1988) hanno messo a confronto quattro tecniche di conteggio di *V. parahaemolyticus*, riscontrando la superiorità del metodo di filtrazione del campione su membrana (*MF method*).

Vila *e Coll*. (1992) hanno inventato un *test* dell'ossidasi "*one-minute*" da eseguire in micrometodo per verificare le colonie gialle su TCBS Agar.

Un *test* al lattice per l'identificazione rapida del *Vibrio parahaemolyticus* dalle piastre è stato provato da Chang *e Coll*. (1994).

Alsina *e Coll*. (1994) sono gli Autori di una chiave diagnostica di tipo biochimico, divenuta un riferimento internazionale per l'identificazione rapida dei vibrioni isolabili dall'ambiente.

Chen *e Coll*. (1995) hanno invece fatto ricorso a un *test* immunoenzimatico, poi reso reperibile anche in Europa, idoneo per la dimostrazione diretta del germe nel campione o per l'identificazione dopo isolamento in coltura.

Venkateswarau *e Coll*. (1996) hanno equiparato ai metodi convenzionali un nuovo *test* in fluorescenza.

Yi-Cheng Su *e Coll*. (2005) hanno valutato un nuovo substrato selettivo che appartiene alla categoria dei terreni cromogenici. Si tratta del Bio-Chrome Vibrio Medium, prodotto da Biomedix (Pomona, CA, USA), sul quale *V. parahaemolyticus* cresce con colonie porpora, mentre altri vibrioni (*vulnificus, mimicus, cholerae*) si presentano con colonie blu-verde.

Il metodo proposto

- Campione + Aqua Peptonata Alcalina Salata (APAS)
- Omogeneizzazione e incubazione a 37 °C x 18-24 ore
- Piastratura su TCBS agar (incubazione a 37 °C x 18-24 ore)
- Trapianto di colonie sospette in Kligler salato (incubazione a 37 °C x 24 ore)
- Semina delle prove biochimiche necessarie per l'identificazione di *Vibrio parahaemolyticus* e di altri vibrioni

Materiale richiesto

- Sacchetti sterili per Stomacher richiudibili
- Pipette graduate sterili monouso
- Soluzione diluente sterile APAS (Acqua Peptonata Alcalina Salata)
- Piastre Petri di terreno TCBS agar
- Provette di terreno Kligler Iron Agar salato (addizionato con 3% di NaCl)
- Materiale per l'esecuzione di prove biochimiche necessarie per l'identificazione di *V. parahaemolyticus* e dei vibrioni correlati

Esecuzione

Trasferire nel sacchetto richiudibile un'aliquota del campione in esame. Aggiungere, quindi, Acqua Peptonata Alcalina Salata (APAS), avendo cura di rispettare il rapporto 1/9 tra campione e terreno (per esempio, 25 grammi del campione più 225 ml di Acqua Peptonata Alcalina Salata).

Omogeneizzare accuratamente in Stomacher per 1-2 minuti.

Porre il sacchetto richiuso a incubare a 37 °C per 18-24 ore.

Al termine del periodo d'incubazione, trasferire, in doppio, un'ansata di coltura su due piastre di TCBS Agar, in modo da ottenere lo sviluppo di colonie isolate.

Incubare le piastre capovolte a 37 °C per 18-24 ore.

Interpretazione

In via presuntiva, identificare le colonie sviluppatesi sul TCBS Agar secondo lo schema seguente:

- *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*: colonie tonde, con diametro di 2-3 mm e centro verde o blu;
- *V. alginolyticus, V. fluvialis, V. metschnikovii*: colonie di dimensioni maggiori o di colore giallo;
- *Coliformi, Proteus, Enterococchi*: se presenti, le loro colonie appaiono piccole e translucide.

Trapiantare una o più colonie sospette in altrettante provette di Kligler Iron Agar salato e rilevare, dopo incubazione a 37 °C per 24 ore, le seguenti caratteristiche di crescita:

- *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*: *slant* alcalino; fondo acido; H_2S (-); gas (-).
- *V. alginolyticus, V. fluvialis, V. metschnikovii*: *slant* acido; fondo acido; gas (-).

Confermare l'identificazione mediante esecuzione di appropriati *test* biochimici predisposti.

Prove biochimiche per Vibrio

1. Da una sospensione in soluzione fisiologica, seminare le seguenti prove principali: Saccarosio - Arabinosio - Mannite - ONPG - VP - ADH - LDC - ODC - Gelatina - Urea.
2. Con la stessa sospensione, seminare anche le seguenti prove complementari:
   - Cellobiosio (in Brodo per carboidrati + NaCl 3%).
   - Lattosio (in Brodo per carboidrati + NaCl 3%).
   - Crescita a 42 °C (in TSB + 2% NaCl).
   - Crescita in NaCl (TSB + NaCl alle concentrazioni dello 0% - 3% - 6% - 8% - 10%).
   - Sensibilità all'O/129 alle concentrazioni di 10 µg e 150 µg (su piastra TSA +2 NaCl o su Mueller-Hinton Agar)*.
3. Dalla patina batterica creciuta su Kligler, seminare:
   - O/F del glucosio (+ 3% NaCl).
   - Mobilità (TSA + 3% NaCl).
   - Mac Conkey Agar (+ 3% NaCl).
   - Ossidasi (prova rapida su carta).

Incubare tutte le prove a 37 °C per 24-48 ore.

* Preparazione dei dischetti (diametro 6 mm) di O/129: imbibire ciascun dischetto con 10 microlitri di una soluzione ottenuta mescolando 5 mg di pteridina con 0,33 ml di diossano e sterilizzata per filtrazione su membrana da 0,22 µm.

Caratteristiche biochimiche utili per la differenziazione delle principali specie del genere *Vibrio* (comportamento prevalente)

	NaCl 0%	NaCl 3%	NaCl 8%	Crescita 42 °C	TCBS[1]	Saccarosio	Cellobiosio	Lattosio	Arabinosio
V. alginolyticus	-	+	+	+	G	+	-	-	-
V. anguillarum	-	+	-	-	G	+	+	-	d[2]
V. carchariae	-	+	+	n.d.[3]	G	+	+	-	-
V. cholerae	+	+	-	+	G	+	-	-	-
V. cincinnatiensis	-	+	-	-	G	+	+	-	+
V. damsela	-	+	-	-	V	-	+	-	-
V. fluvialis	-	+	d[2]	d[2]	G	+	+	-	+
V. furnissii	-	+	+	-	G	+	-	-	+
V. harveyi	-	+	d[2]	d[2]	G/V	d[2]	n.d.	d[2]	-
V. metschnikovii	-	+	d[2]	d[2]	G	+	-	-	-
V. mimicus	+	+	-	+	V	-	-	-	-
V. parahaemolyticus	-	+	+	+	V	-	d[2]	-	+
V. vulnificus	-	+	-	+	V	-	+	+	-
A. hydrophila	+	+	-	d[2]	G	d	+	d[2]	d[2]
P. shigelloides	+	+	-	+	V	-	-	-	-

	Mannitolo	ONPG	VP	Arginina	Lisina	Ornitina	O/129 10 µg	O/129 150 µg	Gelatina	Urea
V. alginolyticus	+	-	+	-	+	+	R	S	+	-
V. anguillarum	+	+	+	+	-	-	S	S	+	-
V. carchariae	+	-	-	-	+	+	R	S	+	+
V. cholerae	+	+	d[2]	-	+	+	S	S	+	-
V. cincinnatiensis	-	+	+	-	+	-	R	S	-	-
V. damsela	-	-	+	+	d[2]	-	S	S	-	+
V. fluvialis	+	+	-	+	-	-	R	S	+	-
V. furnissii	+	+	-	+	-	-	R	S	+	-
V. harveyi	+	d[2]	-	-	+	+	R	S	+	d[2]
V. metschnikovii	+	+	+	+	+	-	S	S	+	-
V. mimicus	+	+	-	-	+	+	S	S	+	-
V. parahaemolyticus	+	-	-	-	+	+	R	S	+	d[2]
V. vulnificus	d[2]	+	-	-	+	+	S	S	+	-
A. hydrophila	+	+	+	+	d	-	R	R	+	-
P. shigelloides	-	-	-	+	+	+	S	S	-	-

[1] G = colonie gialle. V = colonie verdi

[2] d = risultato variabile

[3] n.d. = dato non disponibile

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

Alam M.J. *e Coll*., Analysis of seawaters for the recovery of culturale *Vibrio parahaemolyticus* and some other vibrios, Microbiol. Immunol. 2001, *45*, 393-397

Alsina M. *e Coll*., A set of keys for biochemical identification of environmental *Vibrio* species, J. appl. Micr. 1994, *76*, 79-85

Ann Ma.Lin C.T. *e Coll*., Recovery of chill-stressed *V. parahaemolyticus* from oysters with enrichment broths supplemented with magnesium and iron salts, Appl. Environm. Microbiol. 1980, *39*, 179

Azanza P.V. *e Coll*., Effect of diluents on the enumeration of *Vibrio vulnificus*, Int. J. Food Micr. 1996, *30*, 385-390

Chang T.C. *e Coll*., Development of a latex agglutination test for the rapid identification of *Vibrio parahaemolyticus*, J. Food Protect. 1994, *57*, 31

Chen C.H. *e Coll*., An enzyme-linked-immunosorbent-assay for the rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus*, J. Food Protect. 1995, *58*, 873-878

De Paola A. *e Coll*., Evaluation of four methods for enumeration of *Vibrio parahaemolyticus*, Appl. Environm. Microbiol. 1988, *54*, 617

DIVISION OF MICROBIOLOGY - CENTER FOR FOOD SAFETY AND APPLIED NUTRITION - U.S. FDA. Bacteriological analytical manual. 6th edition, Association of Official Analytical Chemists, Arlington, 1984, 12.01-13.12 e Supplemento settembre 1987, 12.01-12.10

Dodin A. *e Coll*., Methodes de laboratoire pour le diagnostic de *Vibrio* cholerique et des autres vibrions, Institut Pasteur ed., Paris, 1992

Donovan T.J. *e Coll*., Culture media for the isolation and enumeration of pathogenic *Vibrio* species in foods and environmental samples, Int. J. Food Micr. 1995, *26*, 77-91

Hagen C.J. *e Coll*., Enumeration of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio vulnificus* in various seafoods with two enrichment broths, J. Food Protect. 1994, *57*, 403-409

Hall L.P. A manual of methods for the bacteriological examination of frozen froods, 2nd edition, Chipping Campden, Gloucestershire, 1975, 35

Karunasagar I. *e Coll*., Evaluation of methods for enumeration of *Vibrio parahaemolyticus* from seafood, Appl. Environm. Microbiol. 1986, *52*, 583

Kitagawa T. *e Coll*., Detection and quantitative assessment of a *Vibrio cholerae* O1 species in several foods by a novel enzyme immunoassay, Microbiol. Immunol. 1992, *36*, 13-20

Kourany M., Medium for isolation and differentiation of *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio alginolyticus*, Appl. Environm. Microbiol. 1983, *45*, 310

Lesmana M. *e Coll*., Comparison of direct-plating and enrichment methods for isolation of *Vibrio cholerae* from diarrea patients, J. Clin. Microbiol. 1997, *35*, 1856-1858

Massad G. *e Coll*., New selective and differential medium for *Vibrio cholerae* and *Vibrio vulnificus*, Appl. Environm, Micr. 1987, *53*, 2262

Mukhopadhyay A.K. *e Coll*., Distribution and virulence of *Vibrio cholerae* belonging to serogroups other than O1 and O139. A nationwide survey, Epidemiol. Infect. 1995, *114*, 65

Nandy R.K. *e Coll*., A comparative study of the properties of *Vibrio cholerae* O139, O1 and other non-O1 strains, J. Med. Microbiol. 1995, *42*, 251-257

Ottaviani D. *e Coll*., Ricerca di *Vibrio spp*. da alimenti ittici freschi e congelati, Ind. Alim. 1995, *34*, 709

Sakazaki R. *e Coll*., Enumeration of, and hygienic standard of, food safety far, *Vibrio parahaemolyticus*, Arch. Lebens. 1979, 30, 103

Sloan E.M. *e Coll*., Comparison of five selective enrichment broths and two selective agars for recovery of *Vibrio vulnificus* from oysters, J. Food Protect. 1992, *55*, 356

Sun J. *e Coll*., Value of cellobiose - polymixin B - colistin - agar for isolation of *Vibrio vulnificus* from oysters, J. Food Protect. 1995, *58*, 439-440

Venkateswaran K. *e Coll*., Comparison of a fluorogenic assay with a conventional method for rapid detection of *Vibrio parahaemolyticus* in seafoods, Appl. Environm. Microbiol. 1996, *62*, 3516-3520

Vila J. *e Coll*., A one-minute oxidase test to detect *Vibrio* strains isolated from cultures on thiosulphate-citrate-bile-salts-sucrose (TCBS) medium, J. appl. Bact. 1992, *72*, 490-492

Yi-Chang Su *e Coll*., Selectivity and specificity of a chromogenic medium for detecting *Vibrio parahaemolyticus*, J. Food Protect. 2005, *68*, 1454-1456

CAMPYLOBACTER JEJUNI E COLI

Definizione

Bastoncini Gram-negativi, ricurvi, di piccole dimensioni, mobili, microaerofili (5-10% CO_2).

Scheda Sintetica

Attività patogena	*agente eziologico di tossinfezioni*
Alimenti responsabili	*latte crudo, carni poco cotte, acqua, mitili*
Temperatura di moltiplicazione	*da 30 a 45 °C con optimum a 42-43 °C*
pH ***di sviluppo***	*5,3-9,5 - optimum da 6 a 8*
Attività dell'acqua (Aw) richiesta	*> 0,98*
Fattori d'inibizione	*NaCl >2%, temperatura <30 °C, ossigeno*
Dose infettante	*500 germi (tra le più basse)*
Tossine prodotte	*citotossina*
Sito di moltiplicazione	*mucosa intestinale*
Incubazione della malattia	*3-5 giorni*
Sintomi	*febbre, diarrea persistente, feci acquose e maleodoranti con sangue*
Indagini di laboratorio	*microrganismo nell'alimento sospetto e nelle feci dell'ammalato*

Alcuni cenni storici

Prima di arrivare all'attuale metodica d'isolamento, sono state proposte, dopo il 1990, soluzioni diversificate per coltivare nel modo più agevole il genere *Campylobacter*. Gli Autori storicamente più importanti sono stati Butzler, Preston e Skirrow. Ai loro nomi sono legati altrettanti terreni di coltura divenuti classici in tutto il mondo. Ma alcuni altri Ricercatori hanno contribuito ad affinare la tecnica.

Panebianco *e Coll*. (1991), in un'indagine nei prodotti carnei congelati, hanno seminato i campioni in un arricchimento composto da brodo triptosio, sangue equino defibrinato al 5% e da un supplemento di crescita. Dopo 24 ore a +42 °C in microaerofilia, il brodo di arricchimento veniva trapiantato su piastre di terreno selettivo preparate e incubate secondo Skirrow. L'identificazione delle colonie richiedeva il seguente gruppo di prove: catalasi, ossidasi, ippurato, sensibilità ad alcuni antibiotici (acido nalidixico, cefalotina, metronidazolo), resistenza a verde brillante, selenito e trifeniltetrazolio cloruro, crescita a +25 e +42 °C e a +37 °C su Agar sangue in aerobiosi.

Holler (1991), per isolare il genere *Campylobacter* da campioni ambientali, ha provato tre arricchimenti (Preston Broth, CCD Broth e CAR Broth) con successiva piastratura su terreno selettivo preparato secondo Preston.

Peterz (1991), nel corso di un'indagine su alimenti, ha usato il terreno in piastra di Preston, associato per la prima volta a un Agar privo di sangue contenente carbone e, quindi, di colore nero, sul quale *Campylobacter jejuni* sviluppa con colonie bianche. Questo terreno è stato poi commercializzato con il nome di Campylobacter Blood-free Selective Medium.

Scotter *e Coll*.(1993) hanno messo a confronto il metodo ISO con un protocollo nuovo che fonde insieme quelli di Panebianco e di Peterz.

Manzano *e Coll*. (1994) hanno sostenuto la validità della semina su piastre di due terreni selettivi (Blaser-Wang e Campylosel®) per valutare quantitativamente la carica di *Campylo-*

bacter nel pollame del commercio.

Ancora per l'analisi sull'igiene di macellazione dei polli, si sono espressi favorevolmente alla conta diretta su piastra Patterson (1995) e Mead *e Coll*. (1995), i quali hanno adottato i terreni secondo Preston e secondo Skirrow, incubati per 48 ore a +42 °C in microaerofilia (5% di CO_2).

Baumgartner *e Coll*. (1995), studiando la contaminazione da *Campylobacter* nel fegato di pollo e le sue conseguenze sanitarie, hanno invece optato per la tecnica MPN, seminando, per ogni diluizione del campione, tre provette di Brodo d'arricchimento secondo Preston, da confermare, dopo incubazione a +42 °C per 48 ore, mediante trapianti su terreno selettivo.

Aspinall *e Coll*. (1996) hanno affrontato la tecnica della filtrazione del campione su membrana, da seminare su CAT Selective Agar. La composizione di questo nuovo terreno selettivo comprende la base secondo Bolton, supplementata con gli antibiotici teicoplanin e amphotericin.

Loewenherz-Luning *e Coll*. (1996) hanno descritto nei dettagli la loro tecnica, che prevede la semina di 25 grammi del campione in 100 ml di Brodo secondo Preston, incubato a +42 °C per 24 ore in microaerofilia. Dopo trapianto di 0,1 ml su Preston Agar, da incubare come sopra, le colonie tipiche venivano confermate, dal punto di vista della morfologia batterica, con il microscopio a contrasto di fase e con alcuni altri *test* (crescita in microaerofilia a +25 e a +42 °C, crescita in aerobiosi a +37 °C, ossidasi, catalasi, produzione di H_2S, idrolisi dell'ippurato, sensibilità ad acido nalidixico e cefalotina).

Line (2001) ha sviluppato un altro agar selettivo per l'isolamento e il conteggio di *Campylobacter spp*., supplementato con tre o cinque antibiotici e usabile anche senza l'aggiunta di sangue.

Savill *e Coll*. (2001), per quantificare la presenza di questo germe nell'acqua delle piscine e nell'acqua da bere, hanno unito il metodo MPN con la tecnica *Polymerase Chain Reaction* (PCR), volta a confermare la presenza di *Campylobacter*.

Il metodo proposto

- Campione + Campylobacter Enrichment Broth (CEB)
- Omogeneizzazione e incubazione a 43 °C x 48 ore +10% di CO_2
- Piastratura su Skirrow Agar e su Campylobacter Blood Free Medium (incubazione a 43 °C x 48 ore + 10% CO_2)
- Identificazione biochimica e sierologica di *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*

Materiale richiesto

- Sacchetti sterili per Stomacher richiudibili
- Pipette graduate sterili monouso
- Terreno di arricchimento Campylobacter Enrichment Broth (CEB), addizionato di Campylobacter Growth Supplement e di Supplemento Skirrow
- Piastre Petri di terreno Skirrow Agar agar, preparato con Blood agar base n. 2, sangue laccato di cavallo, supplemento Skirrow, Campylobacter Growth Supplement
- Piastre Petri di terreno Campylobacter Blood Free Medium, addizionato con Supplemento Cefoperazone
- *Kit* di agglutinazione rapida al lattice su vetrino
- Reagenti per l'esecuzione del *test* di idrolisi dell' ippurato (acido ippurico e ninidrina)
- Dischetti per antibiogramma contenenti acido nalidixico e cefalotina
- Sistema generatore di gas (6% O_2 + 10% CO_2) o buste per microaerofilia, qualora non fosse disponibile un termostato a CO_2

Esecuzione

Trasferire nel sacchetto richiudubile un'aliquota del campione in esame. Aggiungere, quindi, Campylobacter Enrichment Broth (CEB), avendo cura di rispettare il rapporto 1/9 campione/brodo (per esempio, 25 grammi del campione più 225 ml di CEB).

Omogeneizzare accuratamente in Stomacher per 1-2 minuti.

Porre il sacchetto richiuso a incubare a 43 °C per 48 ore in atmosfera contenente il 10% di CO_2 (arricchimento).

Al termine del periodo d'incubazione, trasferire, in doppio, un'ansata di coltura d'arricchimento su due piastre di Skirrow Agar e su due di Campylobacter Blood Free Medium.

Incubare le piastre capovolte a 43 °C per 48 ore in atmosfera arricchita con il 10% di CO_2 (in apposito termostato, oppure in giare con sistema generatore di gas, oppure in buste per microaerofilia).

Interpretazione

In via presuntiva, identificare come colonie di *Campylobacter* quelle che appaiono, su Skirrow Agar, di colore rossastro e, su Campylobacter Blood Free Medium, di colore bianco.

Confermare l'identificazione mediante l'esecuzione, su una o più colonie sospette, di un *test* di agglutinazione rapida al lattice su vetrino e, ulteriormente, in base all'esito delle seguenti prove, che, a eccezione del *test* dell'ippurato, sortiscono uguali risultati sia nel caso di *Campylobacter jejuni* che in quello di *Campylobacter coli*:

- morfologia e colorazione di Gram (piccoli bacilli ricurvi gram-negativi);
- catalasi (+) allestita su vetrino, stemperando una colonia isolata in una goccia di H_2O_2 al 3%;
- sensibilità all'acido nalidixico, allestita trasferendo, sulla superficie di una piastra di Skirrow Agar (o, in alternativa, di Agar siero) seminata con una sospensione in CEB di una colonia sospetta, un dischetto per antibiogramma contenente acido nalidixico e rilevando, dopo incubazione a 43 °C per 24 ore (con il 10% di CO_2), la comparsa di un alone d'inibizione;
- resistenza alla cefalotina, allestita in maniera analoga alla prova precedente e rilevando, dopo incubazione a 43 °C per 24 ore (con il 10% di CO_2), l'assenza d'inibizione attorno al dischetto;
- idrolisi dell'ippurato, allestita stemperando una colonia sospetta in una provetta contenente 0,5 ml di soluzione acquosa all'1% di acido ippurico (sterilizzata per filtrazione) e valutando, dopo incubazione a 37 °C per 2 ore e successiva aggiunta di 4 gocce di ninidrina al 4%, lo sviluppo, entro 10 minuti, di colore blu porpora (*Campylobacter jejuni* è ippurato+, mentre *Campylobacter coli* è ippurato-);
- eventuali altre prove biochimiche, impiegando appropriati *test* predisposti.

L'identificazione di *Campylobacter* può anche essere ottenuta ricorrendo a un *test* immunoenzimatico (EIA), sull'esempio di quello di seguito illustrato (ProSpect, Alexon-Trend), che si svolge attraverso i seguenti passaggi:

1. Trapianto del ceppo isolato in brodo GN Hajna, da incubare a +35 °C per 18-24 ore.
2. Semina di quattro gocce di brodocoltura in un pozzetto del *kit*. Altri due pozzetti ricevono le stesse quantità, rispettivamente, dei controlli positivo e negativo.
3. Incubazione per un'ora a temperatura ambiente, coprendo con un foglio adesivo i pozzetti.
4. Lavaggio per tre volte con tampone e aggiunta di quattro gocce di enzima-coniugato (200 µl).
5. Incubazione per 30 minuti a temperatura ambiente.

6. Lavaggio per cinque volte con tampone e aggiunta di 4 gocce di substrato (200 µl).
7. Incubazione a temperatura ambiente per 10 minuti.
8. Aggiunta di una goccia di stop (50 µl).
9. Lettura dopo 10 minuti. Positivo = viraggio al giallo. Con lettura allo spettrofotometro a 450 nm il positivo è superiore a 0.130 O.D.

Con questo *kit* la ricerca di *Campylobacter jejuni* e *coli* può essere eseguita anche direttamente su campioni pre-diluiti (ad esempio, sulle feci), con lettura del positivo a partire da 0.170 O.D.

Allan L. Truant (2002) nomina altri due *test* alternativi al precedente:

- RIM Immuno *Campylobacter* Microplate Assay (Remel), che consente anche la ricerca diretta dalle feci;
- AccuProbe *Campylobacter* (Gen-Probe), che mette in pratica la metodologia dei *probes* specifici per il DNA dei *Campylobacter jejuni, jejuni var. doylei, coli, laridis e hyointestinalis.*

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

Aspinall S.T. *e Coll*., A comparison of a new Campylobacter selective medium (CAT) with membrane filtration for the isolation of thermophilic Campylobacters including *Campylobacter upsaliensis*, J. appl. Bact. 1996, *80*, 645

Baumgarner A. *e Coll*., *Campylobacter* contaminations of poultry liver. Consequences for food handlers and consumers, Arch. Lebens. 1995, *46*, 1-24

DIVISION OF MICROBIOLOGY - CENTER FOR FOOD SAFETY AND APPLIED NUTRITION - U.S. FDA. Bacteriological Analytical Manual, 6th edition, Association of Official Analytical Chemists, Arlington, 1984, 10.01-10.08

Holler C., A note on the comparative efficacy of three selective media for isolation of *Campylobacter* species from environmental samples, Zbl. Hyg. 1991, *192*, 116-123

Line J.L., Development of a selective differential agar for isolation and enumeration of *Campylobacter spp*., J. Food Protect. 2001, *64*, 1711-1715

Loewenherz-Luning *e Coll*., Untersuchungen zum Vorkommen von *Campylobacter jejuni* in verschiedenen Lebensmitteln tierischen Ursprungs, Fleischwirtsch. 1996, *76*, 958-961

Manzano M. *e Coll*., *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* in pollame del commercio, Arch. Vet. It. 1994, *45*, 19

Mead G.C. *e Coll*., Effect of changes in processing to improve hygiene control on contamination of poultry carcasses with *Campylobacter*, Epidemiol. Infect. 1995, *115*, 495-500

Panebianco A. *e Coll*., Indagine sulla presenza di *Campylobacter* in prodotti carnei congelati, Ind. Alim. 1991, *30*, 733

Patterson M.T., Sensitivity of *Campylobacter spp*. to irradiation in poultry meat, Letters in Appl. Micr. 1995, *20*, 338-340

Peterz M., Comparison of Preston Agar and a Blood-free Selective Medium for detection of *Campylobacter jejuni* in food, J. Assoc. Off. Anal. Chem. 1991, *74*, 651

Savill M.G. *e Coll*., Enumeration of *Campylobacter* in New Zealand recreational and drinking waters, J. appl. Micr. 2001, *91*, 38-46

SCHWEITZ. LEBENSMITTELBUCH. Zweiter Band - Ringbuch V. Kapitel 56 "Mikrobiologie", 1988, 7.19/1-7.19/3

Scotter S.L. *e Coll*., Methods for the detection of thermotolerant Campylobacters in foods: results on an inter-laboratory study, J. appl. Bact. 1993, *74*, 155-163

Truant A.L., Manual of commercial methods in clinical microbiology, ASM, Washington, USA, 2002

YERSINIA ENTEROCOLITICA

Definizione

Bastoncini Gram-negativi, mobili, anaerobi facoltativi, psicrofili, con caratteristiche colturali simili alle *Enterobacteriaceae.*

Scheda sintetica

Attività patogena	*agente eziologico di tossinfezioni*
Alimenti responsabili	*latte, formaggi, carni, derivati da uova, prodotti ittici*
Temperatura di moltiplicazione	*da 1 a 42 °C con optimum a 28-29 °C*
pH ***di sviluppo***	*4,2-9,0 - optimum da 7 a 8*
Attività dell'acqua (Aw) richiesta	*> 0,98*
Fattori d'inibizione	*NaCl >7%*
Dose infettante	*1 x 10^8*
Tossine prodotte	*endotossine*
Sito di moltiplicazione	*mucosa intestinale*
Incubazione della malattia	*24-36 h*
Sintomi	*dolori addominali, febbre, cefalea, diarrea, vomito*
Indagini di laboratorio	*microrganismo nell'alimento sospetto e nelle feci dell'ammalato*

Alcuni cenni storici

In letteratura si trovano alcuni esempi di ricerca quantitativa di *Yersinia enterocolitica* negli alimenti effettuata con il metodo del conteggio delle colonie su piastre di terreni selettivi. Kleemann *e Coll*. (1993) hanno analizzato insaccati freschi con il terreno Desossicolato Citrato Lattosio Saccarosio (DCLS). Aytac *e Coll*. (1994) hanno sperimentato la sopravvivenza di *Yersinia* e *Aeromonas* nello *yogurt*, incubando le semine dirette delle diluizioni su CIN Agar a +27 °C per 24-48 ore.

Numerosi Autori, tuttavia, sostengono nei loro lavori la superiorità di metodi di tipo qualitativo. In un primo gruppo di metodiche, l'arricchimento, chiamato "a freddo", viene incubato a bassa temperatura per tempi relativamente lunghi.

Aldova *e Coll*. (1990) hanno tenuto l'arricchimento (PBS) a +4 °C per 30 giorni, trapiantando su CIN Agar a metà e alla fine dell'incubazione in frigorifero. Dagli stessi Autori proviene un secondo metodo, denominato dello "*shock* freddo", dove il campione viene inizialmente posto a -20 °C per 18 ore e, quindi, seminato in brodo selenito. Quest'ultimo viene incubato a +4 °C per 30 giorni, effettuando trapianti su CIN Agar a metà e alla fine dell'incubazione in frigorifero

Greenwod (1993) ha differenziato le temperature d'incubazione dell'arricchimento (tris-buffer 1% peptone water, *p*H 8.0) a seconda del tipo di campione, scegliendo 7 giorni a +9 °C per il latte e 14 giorni a +21 °C per altri alimenti in generale.

Pacini *e Coll*. (1993) si dichiarano favorevoli a una semina immediata del campione su CIN Agar e all'incubazione dell'arricchimento (Buffered Peptone Water) a +4 °C per 3 settimane, con trapianti settimanali sullo stesso terreno solido selettivo.

Bosi *e Coll*. (1995) per l'esame degli insaccati hanno proceduto incubando l'arricchimento (PBS) a +28 °C per 48 ore e poi a +4 °C per 21 giorni, con due piastrature su CIN Agar allo scadere dei due periodi.

Altri Ricercatori si sono orientati verso temperature prossime a quella ambiente, come De Boer (1994) in occasione di ricerche sui polli, condotte arricchendo 1 ml di omogenato in 10 ml di Brodo ITC incubato a +24 °C per 2 giorn. Un altro esempio è fornito da Karib *e Coll*. (1994) nel corso di controlli su suini, effettuati con modalità analoghe e incubando per 3 giorni.

In un secondo gruppo di metodiche, al termine dell'arricchimento si esegue un trattamento con soluzione alcalina, come spiegato da Pritchard *e Coll*. (1995), che si sono occupati di ricerche nei caseifici, oppure da Jiang *e Coll*. (2000). Questo metodo prevede la semina del campione in brodo di arricchimento (rispettando il rapporto di 1:10), costituito da PBS a *p*H 7,6 addizionato di sorbitolo all'1% e di sali biliari allo 0,15%. Dopo incubazione per 24 ore a +25 °C, 0,5 ml di coltura di arricchimento vengono trattati per 15 secondi con 4,5 ml di una soluzione allo 0,5% di NaCl contenente lo 0,5% di KOH. Segue la piastratura su CIN Agar, da incubare a +32 °C per 24 ore. Le colonie sospette, trapiantate in Kligler, vengono identificate biochimicamente. Non sono state osservate differenze significative rispetto al metodo "a freddo", caratterizzato da un arricchimento per 3 settimane a +4 °C.

Esistono anche metodi più elaborati, messi in atto per fare ricerche, ad esempio, sulle carni suine. Nesbakken *e Coll*. (1991) hanno paragonato un *test* d'ibridazione del DNA con una procedura tradizionale, che prevede un prearricchimento (PBS più sorbitolo e sali biliari) a temperatura ambiente per tre giorni, seguito da trapianto su CIN Agar. Il pre-arricchimento termina dopo 8 giorni a +4 °C con un trapianto in arricchimento (Brodo Rappaport a elevato contenuto di magnesio). Questa fase occupa 4 giorni a temperatura ambiente e finisce con una seconda piastratura su CIN Agar.

Bhaduri *e Coll*. (1997) diluivano il campione in Trypticase Soy Broth più estratto di lievito e sali biliari (mTSB) incubando per 24 ore a +12 °C. Il brodo d'arricchimento veniva quindi antibiotato con l'aggiunta sterile di Irgasan e incubato ulteriormente fino a 48 ore, quindi piastrato su Mac Conkey e CIN Agar.

Il metodo proposto

- Campione + Brodo Rappaport modificato
- Omogeneizzazione e incubazione a temperatura ambiente per 48 ore
- Piastratura su CIN Agar (incubazione a 30 °C per 24-48 ore)
- Trapianto di colonie sospette in Kligler Iron Agar (incubazione a 30 °C per 24 ore)
- Identificazione biochimica di *Yersinia enterocolitica*

Materiale richiesto

- Sacchetti sterili per Stomacher richiudibili
- Pipette graduate sterili monouso
- Terreno di arricchimento Brodo Rappaport-Vassiliadis modificato con l'aggiunta di supplemento Carbenicillina 2,5 mg/l
- Piastre Petri di Yersinia Selective Agar (CIN Agar), addizionato con supplemento Yersinia
- Provette di terreno Kligler Iron Agar
- Materiale per l'esecuzione di *test* biochimici necessari per l'identificazione di *Yersinia enterocolitica.*

Esecuzione

Trasferire nel sacchetto richiudibile un'aliquota del campione in esame. Aggiungere, quindi, Brodo Rappaport-Vassiliadis modificato, avendo cura di rispettare il rapporto 1/9 campione/brodo (per esempio, 25 grammi del campione più 225 ml di Brodo Rappaport-Vassiliadis modificato).

Omogeneizzare accuratamente in Stomacher per 1-2 minuti.

Porre il sacchetto richiuso a incubare a temperatura ambiente (20-25 °C) per 48 ore (arricchimento).

Al termine del periodo d'incubazione, trasferire, in doppio, un'ansata di coltura di arricchimento su due piastre di Yersinia Selective Agar (CIN Agar).

Incubare le piastre capovolte a 30 °C per 24-48 ore.

Interpretazione

In via presuntiva, identificare come colonie di *Y. enterocolitica* quelle che mostrano centro rosa scuro e periferia trasparente.

Confermare l'identificazione mediante trapianto di una o più colonie su altrettante provette di Kligler Iron Agar (da incubare a 30 °C per 24 ore) e successiva esecuzione di appropriati *test* biochimici predisposti.

Tutti i *test* biochimici vanno eseguiti a +30 °C.

Caratteristiche biochimiche utili per la differenziazione delle principali specie del genere *Yersinia* (comportamento prevalente)

	Mobilità	Urea	Ramnosio	Cellobiosio
Y. pestis	-	-	-	-
Y. pseudotuberculosis	+ (25 °C)	+	+	-
Y. enterocolitica	+ (25 °C)	+	-	+

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

Aldova E. *e Coll.*, Comparative study of culture method to detect *Yersinia enterocolitica* serogroup O3 on swine tongues, Zbl. Bakt. 1990, 272, 306-312

Aytac S.A. *e Coll.*, Survey of the growth and survival of *Yersinia enterocolitica* and *Aeromonas hydrophila* in yogurt, Milchwissensch. 1994, 49, 322-325

Bhaduri S. *e Coll.*, Use of a single procedure for selective enrichment, isolation and identification of plasmid-bearing virulent *Yersinia enterocolitica* of various serotypes from pork sausages, Appl. Environm. Microbiol. 1997, 63, 1657-1660

Bosi E. *e Coll.*, The isolation of *Yersinia* species from retailed sausages containing venison, New Zealand Vet. J. 1995, 13, 1995

Chiesa C., Melis R., Guiyoule A. Ricerca ed identificazione dei batteri del genere *Yersinia*, Ann. Sclavo, 1981, 23, 301-313

De Boer E., Vorkommen von *Yersinia*-Arten in Geflügelprodukten, Fleischwirtsch. 1994, 74, 329-330

Greenwod M.H., Comparison of enrichment at 9 °C and 21 °C for recovery of *Yersinia* species from food and milk, Food Micr. 1993, 10, 23-30

Karib H. *e Coll.*, Comparative study of enrichment procedures to detect *Yersinia enterocolitica* serogroup O:3 on swine tongues, MAN 1994, 12, 243-249

Kleemann J. *e Coll.*, Verhalten von *Yersinia enterocolitica* in frischen Röhwursten, Fleischwirtsch. 1993, 73, 783

Jiang C. *e Coll.*, Enrichment procedures and plating media for isolation of *Yersinia enterocolitica*, Journal of Food Protection 2000, 63, 1483-1486

Nesbakken T. *e Coll.*, Comparative study of a DNA hybridization method and two isolation procedures for detection of *Yersinia enterocolitica* O:3 in naturally contaminated pork products, Appl. Environm. Microbiol. 1991, 57, 389-394

OXOID MANUAL, 6th edition, 1990, 2.234-2.235
Pacini R. *e Coll*., Osservazioni sulla contaminazione microbica degli alimenti nell'area livornese: isolamenti di *Yersinia enterocolitica*, Ind. Alim. 1993, 32, 1216
Pritchard T.J. *e Coll*., Environmental surveillance of dairy processing plants for the presence of *Yersinia* species, J. Food Protect. 1995, 58, 395-397

BRUCELLA

Definizione

Cocco-bacilli Gram-negativi di piccole dimensioni, immobili, aerobi o microaerofili *(B. abortus)*, catalasi e ossidasi-positivi, differenziabili in più specie *(B. melitensis, B. abortus, B. suis, B. canis, B. neotomae, B. ovis).*

Scheda sintetica

Attività patogena	*causa la febbre maltese (Br. melitensis) e il morbo di Bang (Br. abortus)*
Alimenti responsabili	*latte crudo, formaggi non pasteurizzati, carni crude*
Temperatura di moltiplicazione	*10-40 °C - optimum 37 °C*
pH ***di sviluppo***	*6,6-7,4*
Attività dell'acqua (Aw) richiesta	*> 0,96*
Fattori d'inibizione	*comuni disinfettanti, pasteurizzazione*
Dose infettante	*non determinata*
Tossine prodotte	*endotossine*
Sito di moltiplicazione	*cellule del reticolo endoplasmatico*
Incubazione della malattia	*3-4 settimane*
Sintomi	*febbre, anoressia, splenomegalia*
Indagini di laboratorio	*Ring Test nel latte, esame colturale e prova biologica da alimenti vari, sierodiagnosi nei malati*

Alcuni cenni storici

Considerata la difficoltà di isolare le Brucelle sui terreni batteriolgici e i rischi connessi alla coltura, sono state cercate soluzioni diagnostiche alternative. Per dimostrare la presenza di anticorpi specifici nel latte, è valido il *Ring Test*, che consiste nel mescolare 1 ml del campione con 0,03 ml di antigene *Brucella* colorato con tetrazolio. Dopo un'ora a +37 °C, si forma, in caso di campione positivo, un anello rosso in superficie.

Alton-Jones (1967) descrive la prova biologica su cavia inoculata sottocute con un estratto del campione. Questo *test*, basato sull'innalzamento del titolo anticorpale nel siero e sulle lesioni riscontrabili all'esame anatomo-patologico dopo 6 settimane, è sconsigliabile per l'uso di animali da esperimento.

Tantillo *e Coll*. (2001) spiegano il funzionamento di un *test* di amplificazione del DNA genomico (metodo PCR) per la dimostrazione diretta delle Brucelle nel latte e nel formaggio.

Bonfoh *e Coll*. (2002) ricorrono ad una prova indiretta immuno-enzimatica (metodo ELISA) per ricercare gli anticorpi specifici per Brucella nello *yogurt*.

Il metodo proposto

- Allestimento omogenato
- Semina su Brucella Agar (incubazione a 37 °C per 10 giorni con 10% di CO_2)
- Trapianto di colonie sospette in Potato Infusion Agar o in BHI Agar + siero (incubazione a 37 °C per 48 ore con il 10% di CO_2)
- Identificazione di *Brucella spp*.

Materiale richiesto

- Sacchetti sterili per Stomacher con filtro
- Pipette graduate sterili monouso
- Piastre Petri di terreno Brucella Agar, addizionato con supplemento Brucella
- Provette di Potato Infusion Agar o, in alternativa, di Brain Hearth Infusion Agar + siero, preparato con Brain Hearth Infusion Broth (BHI) addizionato con agar-agar per batteriologia 1,5% e con siero equino al 5%
- Antisieri monospecifici per *test* di agglutinazione rapida su vetrino: antisiero *B. abortus*, antisiero *B. melitensis*
- Sistema generatore di gas (6% O_2, 10% CO_2) o buste per microaerofilia (richiesti qualora non fosse disponibile un termostato a CO_2)

Esecuzione

Preparare un omogenato del campione in esame, procedendo secondo le modalità riportate a proposito della conta batterica totale mesofila.

Trasferire, in doppio, un'ansata di omogenato su due piastre di terreno Brucella agar, in modo da ottenere la crescita di colonie isolate.

Incubare le piastre capovolte a 37 °C in atmosfera arricchita con il 10% di CO_2, prolungando fino a 10 giorni il periodo d'incubazione e controllando giornalmente l'eventuale sviluppo di colonie.

Interpretazione

Considerare sospette le colonie che appaiono tonde, convesse, a margini regolari, con diametro di circa 1-2 mm.

Trapiantare una o più colonie sospette in altrettante provette di Potato Infusion Agar o di Brain Hearth Infusion Agar più siero.

Incubare a 37 °C per 48 ore in atmosfera arricchita con il 10% di CO_2 (in giare fino a 10 piastre con il sistema generatore di gas, oppure in buste per microaerofilia).

Controllare al microscopio la morfologia batterica mediante colorazione di Gram.

Procedere ulteriormente all'identificazione mediante *test* di agglutinazione rapida su vetrino con sieri specifici anti-*B. abortus e B. melitensis.*

Confermare l'identificazione in base alle prove biochimiche riportate da Carter (1990).

Caratteristiche biochimiche utili per la differenziazione delle principali specie del genere *Brucella* (comportamento prevalente)

	Urea	Ossidasi	Esigenza CO_2	H_2S
B. melitensis	+	+	-	-
B. abortus	+	+	+ (d)[1]	+ (d)[1]
B. suis	+	+	-	+ (d)[1]
B. canis	+	+	-	-
B. ovis	-	-	-	-
B. neotomae	+	+	-	+

[1] d = risultato variabile

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

Alton G.G.-Jones L.M., Laboratory techniques in brucellosis, WHO, Genève, 1967

Bonfoch B. *e Coll*., Use of an indirect enzyme immunoassay for detection of antibody to *Brucella abortus* in fermented cow milk, Milchwissenschaft 2002, *57*, 374-376

Carter G. R.- Cole J.R., Jr. *Diagnostic Procedures in Vetrinary Bacteriology and Mycology,* 5th eedition, 1990

DIFCO MANUAL, 10th edition, 1984, 174-181

Nicoletti P., *Brucella* in Carter (1990)

OXOID MANUAL, 6th edition, 1990, 2.61-2.63

Tantillo G. *e Coll*., Polymerase Chain reaction for the direct detection of *Brucella spp*. in milk and cheese, J. Food Protect. 2001, *64*, 164-167

ESCHERICHIA COLI O157:H7

Definizione

Bastoncini Gram-negativi, mobili, anaerobi facoltativi, sorbitolo-negativi e MUG-negativi, con temperatura preferenziale di crescita a 37 °C (e non a 44 °C).

Scheda sintetica

Attività patogena	*causa colite emorragica e sindrome emolitico-uremica*
Alimenti responsabili	*carne cruda o poco cotta, verdure crude contaminate, latte crudo*
Temperatura di moltiplicazione	*da 8 a 45 °C con optimum a 37 °C*
pH *di sviluppo*	*4,4-9,0 - optimum da 6 a 7*
Attività dell'acqua (Aw) richiesta	*> 0,95*
Fattori d'inibizione	*NaCl >7%*
Dose infettante	*10-100 germi*
Tossine prodotte	*verotossine*
Sito di moltiplicazione	*colon*
Incubazione della malattia	*3-5 giorni*
Sintomi	*dolori addominali, febbre, diarrea sanguinolenta*
Indagini di laboratorio	*microrganismo nell'alimento sospetto e nelle feci dell'ammalato*

Alcuni cenni storici

I lavori pubblicati da Weber *e Coll*. (1997), da Karmali *e Coll*. (1999) e da Jenkins *e Coll*. (2002) sul problema dei ceppi di *Escherichia coli* enteroemorragici (EHEC) hanno messo in luce che numerosi sierotipi, diversi da O157:H7, sono capaci di provocare, al pari di questo, gli stessi effetti nell'uomo e negli animali. Pertanto, la ricerca mirata esclusivamente all'isolamento di *E. coli* O157:H7 ha perso molto del suo significato.

Il problema del riconoscimento dei ceppi di *E. coli* enteropatogeni è destinato a dilatarsi ulteriormente, dopo le osservazioni di Wilson *e Coll*. (2001) e di Shazberg *e Coll*. (2003). Entrambi questi Autori hanno isolato, rispettivamente, in Inghilterra e in Israele da infezioni intestinali nell'uomo alcuni ceppi di *E. coli* enteroaggregativi. Tra questi, figura il sierotipo O126:H27, che appare particolarmente virulento.

Per questi motivi, in attesa che venga completamente ridefinita la posizione dei sierotipi di *Escherichia coli* sotto il profilo patogenetico ed epidemiologico, si ritiene consigliabile puntare maggiormente l'attenzione sulla ricerca delle tossine nelle feci o in filtrati di colture (Weber *e Coll*., 1997).

Escherichia coli O157 è divenuto oggetto d'interesse per numerosi Autori, che si sono cimentati nell'elaborare metodiche di ricerca innovative. Le case produttrici di reagenti, nello stesso tempo, hanno messo in commercio parecchi terreni e *kit* diagnostici che si discostano da quelli entrati nell'uso corrente.

Nuovi nomi (o sigle) di terreni, apparsi dopo la scoperta di *Escherichia coli* O157:H7, sono ormai entrati nella pratica microbiologica. Tra essi si ricordano:

- i terreni cromogenici e fluorogenici, già menzionati per la ricerca quantitativa dei coliformi e di *Escherichia coli*, utilizzati da Manafi (1996) e da Restaino *e Coll*. (1999) per la diagnostica veterinaria nei bovini;

- Il Mac Conkey Sorbitol Agar, adoperato da D'Aubert *e Coll*. (1995) per la ricerca di *Escherichia coli* O157:H7 in alimenti di origine animale e da Rice *e Coll*. (1996);
- il Phenol Red Sorbitol Agar (PRSA) addizionato con 0,005% di MUG, usato da Ahmed *e Coll*. (1995) per il recupero di *E. coli* O157 stressati a seguito di trattamenti termici;
- il Mac Conkey Agar + cefixime 50 mg/l e potassio tellurito 2,5 mg/l, impiegato da Bennett *e Coll*. (1995) per l'analisi di carne trita bovina, da Weagant *e Coll*.(1995) e da Fujisawa *e Coll*. (2000) per l'esame di verdure;
- il terreno EHEC Selective Agar (SD-39), sperimentato da Erickson *e Coll*. (1995) per la ricerca nella maionese e in altri prodotti a basso *p*H;
- il terreno Enteroemolisin Agar Vancomycin (EAV), introdotto da Pozzi *e Coll*. (1996) per la dimostrazione di *E. coli* enteroemorragici veicolati da insaccati crudi;
- il Lactose Monensin Glucuronate Agar (LMG), adottato da Fallace *e Coll*. (1996) per la diagnostica clinica veterinaria sui bovini da latte.

Calicchia *e Coll*. (1994) hanno proposto il conteggio di *E. coli* enteroemorragici senza pre-arricchimento del campione, seminando direttamente 1 ml delle diluizioni decimali dell'omogenato in speciali piastre Petrifilm® HEC (3M). Il conteggio su questo particolare tipo di substrato era possibile per concentrazioni microbiche comprese fra 10 e 40.000 germi per grammo.

Il sistema Petrifilm® è stato utilizzato anche da Heuvelink *e Coll*. (1997), che hanno ricercato *E. coli* O157 nelle carni, diluendo il campione in E. coli Broth più novobiocina. Dopo incubazione per 6 ore a +37 °C, venivano eseguite semine di 0,1 ml delle varie diluizioni su Petrifilm® HEC, da incubare a +37 °C per 18-24 ore.

Altre esperienze con il sistema Petrifilm® sono state fatte da Johnson *e Coll*. (1995) in casi di tossinfezione alimentare e da Woody *e Coll*. (1998) nell'esame di carne trita fresca o congelata.

Un certo numero di Autori, tra i quali Baumgartner *e Coll*., 1995; Borie *e Coll*., 1997; Venkateswaran *e Coll*., 1996; Heckotter *e Coll*., 1997, ha sperimentato, con buoni risultati, il metodo della separazione immuno-magnetica, descritto nel capitolo 9 che si occupa dei metodi non tradizionali. Per dare un'anticipazione sulla natura tecnica di questo metodo, si riassume qui il percorso seguito da Hevvelink *e Coll*. (1997). Questi Autori hanno pubblicato una valutazione dei terreni e dei *kit* per la ricerca e l'isolamento di *E. coli* O157 da carne trita bovina e descrivono il loro lavoro in quattro fasi:

1. arricchimento del campione in brodo mEC più novobiocina a +37 °C per 6 ore con agitazione della coltura a 100 rpm;
2. separazione immuno-magnetica dei microrganismi con il *kit* Dynabeads® anti-*E. coli* O157;
3. piastratura delle cellule così concentrate su terreno CT-SMAC (Mac Conkey - Sorbitolo - Cefixime - Tellurito);
4. effettuazione, sulle colonie isolate, del *test* Verotox F®, per stabilire se si tratta di germi che producono le verotossine VT1 e/o VT2.

Attualmente, sono disponibili numerosi *test* commerciali per la diagnosi di *Escherichia coli* O157:H7, attraverso la dimostrazione dell'antigene o delle tossine elaborate da questo microrganismo. Allan L. Truant (2002) cita sei prodotti, che possono essere impiegati partendo direttamente dalle feci, oppure, indirettamente, da colture di arricchimento seminate con campioni clinici:

- Premier EHEC e Premier E. coli O157 (Meridian), *test* immunoenzimatici che rivelano le Shiga tossine VT1 e VT2 da filtrati di feci o da brodocolture;
- ImmunoCard STAT! E. coli O157 Plus (Meridian), per la dimostrazione dell'antigene O157 direttamente dai campioni o da colture in brodo di Mac Conkey, oppure da colonie sviluppate su piastre di Sorbitol Mac Conkey Agar;
- E. coli O157 Antigen Detection Kit (LMD), per l'esame diretto delle feci;

- ProSpect Shiga Toxin *E. coli* (STEC), un *test* immuno-enzimatico della Alexon-Trend che rileva le tossine Sxt1 e Sxt2 (comuni a Shigelle ed *E. coli* enteropatogeni) dalle feci o da terreni d'arricchimento;
- RIM Immuno Shiga Toxin *E. coli* (STEC), un *test* diretto immunologico della Remel, simile al precedente;
- Reveal *E. coli* (Neogen), un anticorpo specifico per *E. coli* O157:H7 marcato con oro colloidale, che produce una linea di concentrazione dell'oro marcatore leggibile entro una finestra del *kit*.

Nuove prospettive si sono aperte nella ricerca microbiologica con l'avvento delle sonde molecolari per il DNA. Hochberg *e Coll*. (2000) illustrano in un loro lavoro la sensibilità e la specificità di un *kit* completo, denominato BAX® (Qualicon), valido per il riconoscimento di *E. coli* O157:H7 nella carne trita bovina.

Il metodo proposto

- Campione + TSB-novobiocina 20 mg/l
- Omogeneizzazione e incubazione a 37 °C x 24 ore
- Piastratura su Sorbitol Mac Conkey Agar (incubazione a 37 °C x 18-24 ore)
- Trapianto di colonie sospette in TSA + 0,6% di estratto di lievito (incubazione a 37 °C x 24 ore)
- Agglutinazione con siero anti-*E.coli O157:H7*

Materiale richiesto

- Sacchetti sterili per Stomacher richiudibili
- Terreno Trypticase Soy Broth (TSB) + novobiocina 20 mg/l
- Piastre di terreno Sorbitol Mac Conkey Agar
- Pipette graduate sterili monouso da 1 ml
- Spatole a L sterili per batteriologia
- Provette di terreno Trypticase Soy Agar + 0,6% di estratto di lievito
- Siero agglutinante anti-*E.coli* O157:H7

Esecuzione

Trasferire nel sacchetto richiudibile un'aliquota del campione in esame. Aggiungere, quindi, Trypticase Soy Broth (TSB) + novobiocina 20 mg/l, avendo cura di rispettare il rapporto 1/9 campione/brodo (per esempio, 25 grammi del campione più 225 ml di Trypticase Soy Broth (TSB) + novobiocina 20 mg/l).

Omogeneizzare accuratamente in Stomacher per 1-2 minuti e incubare il sacchetto chiuso in termostato a 37 °C per 24 ore.

Trasferire 0,1 ml di coltura di arricchimento su una piastra di Sorbitol Mac Conkey Agar e distribuire l'inoculo su tutta la superficie del terreno con l'aiuto di una spatola sterile.

Incubare la piastra capovolta a 37 °C per 18-24 ore.

Interpretazione

Considerare sospette le colonie che si presentano incolori (sorbitolo-negative). Trapiantare una o due delle colonie tipiche in altrettante provette di Trypticase Soy Agar (TSA) + 0,6% di estratto di lievito.

Incubare le provette a 37°C per 24 ore.

Effettuare una selezione delle colture isolate mediante agglutinazione rapida su vetrino con un siero agglutinante anti-*E.coli* O157:H7.

Metodo di ricerca alternativo

In alternativa al metodo esposto sopra, la ricerca di ceppi di *E. coli* potenzialmente verotossici (comprendenti il sierotipo O157:H7) può essere effettuata con la tecnica di filtrazione su membrana, di seguito descritta:

- Si preparano, sterilizzate in autoclave a 121 °C per 15 minuti, delle membrane per filtrazione da 0,2 µm in polietersulfone, aventi un diametro corrispondente a quello di una piastra Petri. Per ogni esame, si predispongono le membrane sulla superficie asciutta di quattro piastre Petri contenenti terreno Trypticase Soy Agar (TSA).
- A partire da un omogenato allestito diluendo il campione in esame in soluzione di Ringer in proporzione 1:10, si seminano due piastre Petri con un inoculo di 0,5 ml e le restanti due piastre con un inoculo di 0,1 ml, distribuendo gli inoculi sull'intera superficie delle membrane, servendosi di spatole sterili.
- Dopo incubazione delle piastre capovolte per 4 h a 37 °C (allo scopo di rivitalizzare le cellule batteriche stressate), servendosi di una pinza sterile si trasferiscono le membrane su quattro nuove piastre asciutte di Sorbitol Mac Conkey Agar, che vengono quindi incubate capovolte per 18-24 h a 37 °C.
- Le colonie prodotte da *E. coli* sorbitolo-negativi (tra cui il sierotipo O157:H7) si presentano gialle, rotonde, lisce, a margini netti, con diametro di 2-3 mm. Al contrario, le colonie dei ceppi sorbitolo-positivi appaiono rosse e di diametro maggiore. Il conteggio (espresso come UFC per grammo o ml di campione) avviene facendo la somma delle colonie gialle sulle due piastre seminate con 0,5 ml (oppure calcolando la media delle colonie sulle due piastre seminate con 0,1 ml) e moltiplicando il risultato, rispettivamente, per 10 o per 100. Le diluizioni consigliate sono, il più delle volte, sufficienti per l'analisi di *routine* degli alimenti e consentono di contare da 1 a 30 colonie (pari a 10-3000 UFC per grammo o ml di campione).
- Da alcune colonie sospette gialle, si allestiscono dei trapianti in provette di Kligler, che vengono incubate a 37 °C per 18-24 ore. Nell'evenienza di piastre Petri con elevato numero di colonie rosse, o in tutti i casi in cui esista un sospetto fondato, è raccomandabile estendere il trapianto anche ad alcune colonie rosse (colonie non tipiche).
- Si selezionano i ceppi isolati mediante prove biochimiche per *Enterobacteriaceae.*
- Si saggiano i ceppi risultati *E. coli* con un antisiero agglutinante il sierotipo O157:H7. Allan L. Truant (2002) cita quattro fra i reagenti disponibili: *E. coli* O157 Latex test (Oxoid), *E. coli* Stat (Novamed), RIM *E. coli* O157:H7 (Remel) e Latex O157 reagent (Pro-Lab).
- Uno o più ceppi biochimicamente identificati come *E. coli* (ma non necessariamente positivi all'agglutinazione con un siero anti O157:H7) vengono esaminati per la capacità di produrre verotossine *in vitro* con un *test* su cellule VERO, oppure con micrometodi appositamente predisposti.
- Il controllo di qualità si allestisce seminando due piastre di TSA + membrana con 0,1 ml ciascuna di latte contaminato artificialmente (inoculo contenente 100 UFC/ml di *E. coli O157:H7* ed *E. coli* sorbitolo-positivi in rapporto 1:1) e procedendo come sopra.

Un tipo di *test* su cellule VERO collegabile alla metodica sopra esposta, descritto da Palumbo e *Coll*., viene qui di seguito riportato:

- partendo dalle colture in Kligler, si trapianta in brodo BHI, da incubare a 37 °C per 24 h e, quindi, si centrifuga a 3000 rpm per 10 minuti. Il soprastante viene fatto passare su filtro-siringa da 0,2 µm e il filtrato usato per il *test* (con eventuale congelamento in caso di analisi non immediata).
- In una piastra *microtiter* da 96 pozzetti, vengono dispensati 100 µl per pozzetto di una sospensione di cellule VERO alla concentrazione di 10^5-10^6/ml, con successiva incubazione a 37 °C per 18-24 h (+5% di CO_2).

- I campioni vengono seminati in quantità pari a 100 µl nella prima colonna di ciascuna fila e, quindi, diluiti al raddoppio mediante passaggi da sinistra verso destra con una micropipetta.
- Dopo incubazione per 72 h a 37 °C (+ 5% CO_2), si procede alla lettura della piastra, al fine di rilevare la presenza dell'effetto citopatico. Si considera positivo il campione che produce la lisi di almeno il 50% delle cellule. Il titolo della tossina è pari al reciproco della più alta diluizione che dà effetto citopatico.

È possibile anche procedere al riconoscimento dei ceppi produttori di verotossine usando dei *kit* commerciali, sul tipo del VTEC-Screen® (Denka Seiken). Si coltivano i ceppi da testare su un terreno solido (Mac Conkey Agar, Sorbitol Mac Conkey Agar, Agar sangue, ecc), incubato a 37 °C per una notte. Da ogni ceppo, si semina un'ansata in un pozzetto di una piastra *microtiter* con fondo a U, nella quale sono stati previamente dispensati 50 microlitri della soluzione di polimixina inclusa nel *kit*. La piastra, chiusa con un foglio adesivo, viene agitata a 100 oscillazioni al minuto per 30 minuti, collocando l'agitatore in termostato a 37 °C. Al termine, essa viene centrifugata a 500 g per 15 minuti. Successivamente, per ogni ceppo, si trasferiscono, in doppio, 25 microlitri di soprastante in una piastra *microtiter* con fondo a V. In un pozzetto si aggiungono 25 microlitri di lattice sensibilizzato e nell'altro 25 microlitri di lattice di controllo. Questa seconda piastra, chiusa con un foglio adesivo, viene tenuta al buio a temperatura ambiente per 2 ore, quindi centrifugata a 500 g per 15 minuti e, infine, lasciata riposare per un'ora a temperatura ambiente, inclinata di circa 45°. I pozzetti di controllo (e quelli da leggere come negativi) appaiono sedimentati, mentre quelli da interpretare come positivi rimangono intatti.

Un altro prodotto è il Verotox-F Assay®, che consiste in una micropiastra nella quale si esegue un'agglutinazione al lattice. Questo *test* è capace di rivelare e caratterizzare, su filtrati di colture o da feci, le verotossine VT1 e VT2, con una sensibilità che arriva fino a 1-2 ng/ml, come descritto da Karmali *e Coll*. (1999) e da Thoms (1999).

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

Ahmed N.M. *e Coll*., Evaluation of various media for recovery of thermally injuried *Escherichia coli* O157:H7, J. Food Protect. 1995, *58*, 357-360

Baumgartner A. *e Coll*., Detection of verotoxin-producing *Escherichia coli* in minced beeef and raw hamburgers: comparison of polymerase chain reaction (PCR) and immunomagnetic beads, Arch. Lebens. 1995, *46*, 125-148

Bennett A.R. *e Coll*., Evaluation of methods for the isolation and detection of *Escherichia coli* O157 in minced beef, Letters in Appl. Micr. 1995, *20*, 375-379

Borie C.F. *e Coll*., Detection and characterization of enterohaemorragic *Escherichia coli* in slaughtered cattle, J. Vet. Med. 1997, *44*, 273-279

Bettelheim K.A., Development of a rapid method for the detection of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC), Letters in Applied Microbiology 2001, *33*, 31-35

Buchanan R.L., Food Microbiol., 1995, *12*, 421-424

Calicchia M. *e Coll*., Direct enumeration of *Escherichia coli* O157:H7 from Petrifilm test kit HEC without sample pre-enrichment, J. Food Protect. 1994, *57*, 859-864

D'Aubert S. *e Coll*., Ricerca di *E. coli* O157:H7 in alimenti di origine animale, Arch. Vet. 1995, *46*, 67

Erickson J.P. *e Coll*., An assessment of *Escherichia coli* O157:H7 contamination risks in commercial mayonnaise from pasteurised eggs and environmental sources, and behavior in low-pH dressing, J. Food Protect. 1996, *58*, 1059-1064

Fallace J.S. *e Coll*., The use of selective and differential agars in the isolation of *E. coli* O157

from dairy herds, J. appl. Bact. 1996, *81*, 663-668
Fujisawa T. *e Coll*., Modification of Sorbitol Mac Conkey Medium containing cefixime and tellurite for isolation of *Escherichia coli* O157:H7 from radish sprouts, Appl. Environm. Microbiol. 2000, *66*, 3117-3118
Heckotter S. *e Coll*., Detection of *Escherichia coli* serogroup O157 in foods by immunomagnetic separation (IMS), Arch. Lebens. 1997, *48*, 73-96
Heuvelink A.E. *e Coll*., Evaluation of media and test kits for the detection and isolation of *Escherichia coli* O157 from minced beef, J Food Protect. 1997, *60*, 817-824
Heuvelink A.E. *e Coll*., Occurrence of *Escherichia coli* O157 and other verocytotoxin-producing *E. coli* in retail raw meats in the Netherlands, J. Food Protect. 1997, *59*, 1267-1272
Hochberg A.M. *e Coll*., Sensitivity and specificity of the test kit BAX® for screening *E. coli* O157: H7 in ground beef: independent collaborative study, J. AOAC International 2000, *83*, 1249
Karmali M.A. e Coll., J.Clin.Microbiol., 1999, *37*, 396-399
Jenkins C. *e Coll*., Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) other than serogroup O157 from scottish cattle, Vet. Rec. 2002, *151*, 58-60
Johnson J.L. *e Coll*., Methods used for detection and recovery of *Escherichia coli* O157:H7 associated with a food-borne disease outbreak, J. Food Protect. 1995, *58*, 597-603
Manafi M., Fluorogenic and chromogenic enzyme substrates in culture media and identification tests, Int. J. Food Micr. 1996, *31*, 46-58
Mc Carty J. *e Coll*., An Improved Direct Plate Method for the Enumeration of Stressed *Escherichia coli O157:H7* from Food. J. Food Protect., 1998, *61*, 1093-1097
Palumbo S.A. *e Coll*., Minimum and Maximun Temperature for Growth and Verotoxin Production by Hemorrhagic Strains *Escherichia coli.* J. Food Protect., 1995, *58*, 352-356
Pozzi W. *e Coll*., Uberleben und Nachweis von enterohamorragischen *Escherichia coli* in streichfahiger Rohwurst, Fleischwirtsch. 1996, 76, 1300-1311
Restaino L. *e Coll*., A chromogenic medium for isolating *Escherichia coli* O157:H7 from beef, Letters in Appl. Micr. 1999, *29*, 26-30
Rice E.W. *e Coll*., Detection of *Escherichia coli* O157:H7 in water from coliform enrichment cultures, Letters in Appl. Micr. 1996, *23*, 179-182
Shazberg G. *e Coll*., Enteroaggregative *Escherichia coli* serotype O126:H27, Israel, Emerging Inf. Dis. 2003, *9*, 1170-1173
Thoms B., Nachweis von verotoxinbildenden *Escherichia coli* in Rehfleisch, Arch. Lebens. 1999, *50*, 69-72
Truant A.L., Manual of commercial methods in clinical microbiology, ASM, Washington, USA, 2002
Varnam A.H. *e Coll*., Foodborn Pathogens, Manson ed., London, England, 1996
Venkateswaran K. *e Coll*., Comparison of commercially available kits with standard methods for the detection of coliforms and *Escherichia coli* in foods, Appl. Environm. Microbiol., 1996, *62*, 2236-2242
Vernozy-Rozand C. *e Coll*., Rev. Med. 1997, *148* , 169-178
Weagant S.D. *e Coll*., An improved rapid technique for isolation of *Escherichia coli* O157: H7 from foods, J. Food Protect. 1995, *58*, 7-12
Weber A. *e Coll*., Uber die derzeitigen Probleme zum Aufinden von Infektionsquelle und Infektionskettenbeim enterohamorragischen *E. coli* (EHEC), Berl. Munch. Tierarztl. Wochenschr. 1997, *110*, 211-213
Wilson A. *e Coll*., Characterisation of strains of enteroaggregative *Escherichia coli* isolated during the infectious intestinal disease study in England, Europ. J. Epidemiol. 2001, *17*, 1125-1130
Woody J.M. *e Coll*., Comparison of the Difco EZ-coli rapid detection system and Petrifilm test kit HEC for detection of *Escherichia coli* O157:H7 in fresh and frozen ground beef, J. Food Protect. 1998, *61*, 110-112

CLOSTRIDIUM BOTULINUM

Definizione

Bacilli Gram-positivi sporigeni, anaerobi obbligati, ubiquitari, produttori potenziali di sette diversi tipi di tossine, che vengono inattivate dall'ebollizione. La distruzione delle spore richiede temperature più elevate.

Scheda sintetica

Attività patogena	Agente eziologico di intossicazioni
Alimenti responsabili	Conserve vegetali preparate artigianalmente, latticini, miele
Temperatura di moltiplicazione	>+3 °C
pH ***di sviluppo***	>4,6
Attività dell' acqua (Aw) richiesta	>0,93
Fattori d'inibizione	Sodio nitrito, sale, acidificazione, riscaldamento (minimo +60 °C per 5 minuti), ebollizione o autoclavatura
Dose infettante	Molto variabile
Tossine prodotte	Sei tipi (da A a G), con maggior frequenza A (la più pericolosa), B, E
Sito di moltiplicazione	Alimenti a bassa acidità conservati sotto vuoto e temperatura superiore a +3 °C
Incubazione della malattia	12-72 ore
Sintomi	Vomito, diarrea, assenza di febbre, manifestazioni neurologiche (diplopia, difficoltà respiratorie), secchezza delle mucose, paralisi, morte per paralisi dei muscoli respiratori
Indagini di laboratorio	Ricerca del microrganismo in alcuni tipi di alimento (miele), ricerca della tossina nelle feci, siero, vomito del malato, nei residui del pasto o nell'alimento sospettato

Il metodo proposto

L'isolamento in coltura di *Cl. botulinum* è possibile, seguendo il metodo descritto per i germi sporigeni anaerobi solfito-riduttori, al quale si rimanda.

Tra gli alimenti, il materiale che meglio si presta all'esame colturale è il miele, ritenuto in letteratura responsabile di numerosi casi di botulismo infantile, al di sotto dei 12 mesi d'età (Midura *e Coll*., 1979). Alcuni Autori hanno ottenuto buoni risultati seminando il miele in terreni liquidi, dopo diluizione 1:10 del campione in soluzione fisiologica sterile e filtrazione su Seitz. Flemming (1980) ha usato il Cooked Meat Medium (CMM), mentre Hartgen (1980) ha impiegato il Brodo fegato.

Indicazioni significative dall'esame colturale di campioni clinici sarebbero possibili solo con le feci, in quanto, negli episodi di botulismo, il germe è presente in forte concentrazione nel materiale fecale. Glasby *e Coll*. (1985) hanno seminato le feci, diluite 1:10 in soluzione fisiologica, su piastre di Egg Yolk Agar, realizzando un conteggio delle cellule di *Cl. botulinum*. In tutti gli altri casi, gli Autori sono concordi nell'affermare che l'unica prova convincente per una corretta diagnosi di botulismo resta la dimostrazione della tossina (Reed,1994), con uno dei metodi elencati nel capitolo sulla ricerca delle tossine.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

Flemming R., Untersuchungen von Bienenhonig auf *Clostridium botulinum*-sporen, Arch. Lebens. 1980, *31*, 153

Glasby C. *e Coll*., Isolation and enumeration of *Cl. botulinum* by direct inoculation on Egg Yolk Agar and *Clostridium botulinum* isolation media, J. Clin. Microbiol. 1985, *21*, 264

Hartgen H., Untersuchungen von Honigproben auf Botulismustoxin, Arch. Lebens. 1980, *31*, 153

Midura T.F. *e Coll*., Isolation of *Clostridium botulinum* from honey, J. Clin. Microbiol. 1979, *9*, 282

Reed G.H., *Clostridium botulinum* – Foodborne illness (part 7), Dairy, Food and Environm.

CAP. 5

Prove tipicamente quantitative

CONTA BATTERICA TOTALE

Definizione

La conta batterica totale (o carica batterica totale, CBT) è una stima teorica del numero complessivo di microrganismi vivi presenti in un campione. Si basa sul presupposto che una cellula batterica, posta su un terreno solido, formi una sola colonia evidenziabile. Il numero di germi è detto anche numero di "unità formanti colonia" (UFC).

Sulla base dell'intervallo di temperatura ottimale per lo sviluppo, i microrganismi si suddividono in *mesofili* (25-40 °C), *psicrofili* (15-20 °C), *termofili* (45-60 °C).

Limitatamente al settore lattiero-caseario, nella classificazione sono da aggiungere i batteri *termodurici.*

Alcuni cenni storici

Il tema della carica batterica totale è stato oggetto di molta attenzione da parte dei microbiologi, che, sollecitati dall'industria, si sono prodigati per trovare metodi capaci di fornire risultati in breve tempo. Si rimanda al capitolo sui **metodi non tradizionali** per vedere che un discreto numero di *test*, spesso assistiti da apparecchiature automatizzate, è riservato a questo tipo di determinazione. Per altre informazioni, si rimanda anche al capitolo sull'**igiene dell'ambiente e delle superfici**.

Qui di seguito vengono invece citati alcuni Autori che hanno contribuito a trovare metodi non propriamente di natura batteriologica per la determnazione della carica batterica totale. Jay *e Coll*. (1979) e ancora Jay (1981) hanno impiegato il Limulus Test per stimare il grado d'inquinamento batterico nella carne trita non congelata.

Bomar (1985) ha stabilito un rapporto fra numero di batteri (raccolti mediante lavaggio sulla superficie delle carcasse animali, centrifugati e seminati in brodo glucosio/nitrati) e velocità di riduzione dei nitrati (entro 2 ore).

Smith *e Coll*. (1985) hanno contato i batteri aerobi mesofili sulla carne trita bovina con l'aiuto del Petrifilm® SM Plate.

Rao *e Coll*. (1986) per valutare la qualità microbiologica della carne hanno sospeso il campione in un terreno liquido, aggiungendo latte magro sterile e soluzione acquosa allo 0,5% di resazurina. Il brodo, incubato a +37 °C, veniva letto ogni 15 minuti per riconoscere la riduzione da blu a rosa della resazurina, sapendo che 1,5 x 10^6 germi provocano riduzione in 90 minuti.

Betts *e Coll*. (1989) hanno visto che è possible colorare i batteri con trifenil-tetrazolio cloruro, quando sono posti in sospensione e poi raccolti su una membrana filtrante.

Kroll *e Coll*. (1989) hanno stimato il grado di contaminazione batterica negli alimenti, misurando l'attività catalasica con un elettrodo sensibile all'ossigeno.

Buchrieser *e Coll*. (1993) hanno approntato un metodo diretto di conteggio dei germi nel latte usando gli antibiotici per aumentare le dimensioni (e quindi la visibilità) delle cellule batteriche al microscopio.

Siragusa *e Coll*. (2000) hanno monitorato la contaminazione microbica su carni bovine con un *test* molto rapido (10 minuti) che esige un'attrezzatura ridotta (un termostato a +37 °C), fondato su una reazione colorata prodotta dal *Limulus* (LAL-*test*).

Il metodo proposto

- Allestimento omogenato
- Esecuzione di diluizioni decimali
- Semina su Plate Count Agar (PCA)
- Incubazione
- Conteggio delle colonie

1. CONTA BATTERICA TOTALE MESOFILA

1.1 Metodo della conta standard in piastra (*Pour Plate Method*)

Materiale richiesto

- Sacchetti sterili con filtro per Stomacher
- Provettoni sterili
- Soluzione diluente sterile di Ringer 1/4 concentrata, oppure soluzione fisiologica peptonata sterile (sodio cloruro 0,85% + peptone 0,1%)
- Pipette graduate sterili monouso
- Piastre di Petri sterili diametro cm 9
- Terreno Plate Count Agar (PCA) sterilizzato e mantenuto fuso alla temperatura di 44-46 °C

Esecuzione

Le operazioni di pesata del campione e di aggiunta del diluente possono essere fatte direttamente sulla bilancia tecnica, lavorando sterilmente.

Preparare una sospensione iniziale del campione in esame nel sacchetto da Stomacher con filtro, aggiungendo il diluente nel rapporto P/V da 1:1 a 1:10 (a seconda della natura e della quantità del materiale a disposizione). Se possibile, prelevare dal campione 50 grammi di materiale e aggiungere 100 grammi (100 ml) di diluente. In questo modo, si realizza una sospensione 1:3 del prodotto in esame.

Omogeneizzare accuratamente in omogeneizzatore tipo Stomacher per 1-2 minuti.

Nel caso di prodotti liquidi (omogenei) sufficientemente fluidi e presunti a bassa contaminazione, la sospensione iniziale può essere tralasciata. Altrimenti si consiglia di comportarsi come per i prodotti solidi.

Dall'omogenato iniziale, eseguire diluizioni decimali (1+9 ml) secondo necessità, usando come diluente la soluzione di Ringer sterile 1/4 concentrata oppure la soluzione fisiologica peptonata sterile.

Trasferire, in doppio, dall'omogenato e da ogni successiva diluizione, 1 ml di materiale in ciascuna piastra Petri.

Entro 20 minuti dall'allestimento delle diluizioni, versare nelle piastre Petri 15 ml di ter-

reno PCA fuso e raffreddato in bagnomaria alla temperatura di 44-46 °C.

Prima che il terreno solidifichi, ruotare e inclinare più volte le piastre, al fine di permettere un'adeguata dispersione dell'inoculo.

Dopo solidificazione del terreno, incubare le piastre capovolte a 37 °C per 48 ore, oppure a 30 °C per 72 ore.

Nell'analisi di campioni molto contaminati, può risultare utile ricoprire il terreno seminato con un secondo strato dello stesso terreno (strato chiamato "overlay"). In pratica, dopo la solidificazione del terreno (che avviene in 15-30 minuti a temperatura ambiente), si versa sterilmente nelle piastre un quantitativo di 5-6 ml per piastra del medesimo terreno, appositamente preparato a parte e mantenuto fuso in bagnomaria termostatato a 44-46 °C. Il terreno da preparare per l'overlay è, in volume, all'incirca pari alla metà del terreno destinato alle piastre.

Nota

La tecnica della semina in profondità trova applicazione anche per la determinazione della CBT in campioni di acque e acque minerali, integrando le modalità sopra descritte con gli opportuni adeguamenti alle specifiche prescrizioni di incubazione (differenti combinazioni tempo/temperatura riportate nel Capitolo 7 e nel Capitolo 8).

Si ricorda che, per la carica batterica totale mesofila nel latte (pasteurizzato, sterilizzato o UHT), si ottengono risultati superiori seminando il campione in un terreno che contiene latte nella sua composizione, il Milk Plate Count Agar (Donato *e Coll*., 1994).

Interpretazione

Prendere in considerazione la diluizione del campione che, seminata sulle piastre, abbia dato luogo alla crescita di colonie in numero compreso fra 30 e 300.

Calcolare la carica batterica totale mesofila per unità di misura del campione in esame mediante l'espressione:

$$\text{CBT/g (ml, cm}^2\text{)} = \frac{C}{D_1 \times D_2 \times V}$$

dove:
C = media del numero di colonie contate nelle due piastre
D_1 = diluizione introdotta nella preparazione dell'omogenato
D_2 = diluizione decimale dell'omogenato
V = volume dell'inoculo nelle piastre (1 ml)

Esempio 1

Numero colonie contate nelle due piastre alla diluizione 10^{-3}: 54 e 48.
Sospensione iniziale allestita con 50 g (o 50 ml) di campione e 100 g (o 100 ml) di diluente.
Volume di inoculo: 1 ml.
I dati da considerare sono:
C = (54+48)/2=102/2=51
D_1 = 50/(50+100)=50/150=1/3
$D_2 = 10^{-3}$
V =1 ml

Sostituendoli nell'espressione, si ottiene il seguente risultato:

$$CBT/g\ (ml) = \frac{51}{1/3 \times 10^{-3} \times 1} = 51 \times 3 \times 10^{3} \times 1 = 153 \times 10^{3} = 1{,}53 \times 10^{5}$$

Esempio 2

Numero colonie contate sulle due piastre alla diluizione 10^{-5}: 87 e 93.
Sospensione iniziale allestita con 20 g (o 20 ml) di campione e 100 g (o 100 ml) di diluente.
Volume di inoculo: 1 ml.
I dati da considerare sono:
C =(87+93)/2=180/2=90
D_1 =20/(20+100)=20/120=1/6
$D_2=10^{-5}$
V =1 ml
Sostituendoli nell'espressione, si ottiene il seguente risultato:

$$CBT/g\ (ml) = \frac{90}{1/6 \times 10^{-5} \times 1} = 90 \times 6 \times 10^{5} = 5{,}4 \times 10^{7}$$

Esempio 3

Numero colonie contate sulle due piastre alla diluizione 10^{-1}: 167 e 175
Sospensione iniziale allestita con 40 cm^2 di cute di pollame e 100 ml di diluente.
Volume di inoculo = 1 ml.
I dati da considerare sono:
C =(167+175)/2=342/2=171
D_1 =40/100=2/5
$D_2=10^{-1}$
V =1 ml
Sostituendoli nell'espressione, si ottiene il seguente risultato:

$$CBT/cm^2 = \frac{171}{2/5 \times 10^{-1} \times 1} = 171 \times 5/2 \times 10 = 171 \times 2{,}5 \times 10 = 4275$$

Esempio 4

Campione liquido omogeneo, a bassa contaminazione, che, seminato tal quale senza diluizione iniziale, ha prodotto sulle piastre, rispettivamente, 54 e 60 colonie.
Sospensione iniziale: non eseguita.
Volume di inoculo: 1 ml.
I dati da considerare sono:
C =(54+60)/2=114/2=57
D_1=1
D_2=1
V = 1 ml
Sostituendoli nell'espressione, si ottiene il seguente risultato:

$$\text{CBT/ml} = \frac{57}{1 \times 1 \times 1} = 57$$

1.2 Metodo della semina in superficie (*Surface Spread Plate*)

Materiale richiesto

- Sacchetti sterili con filtro per Stomacher
- Provettoni sterili
- Soluzione diluente sterile di Ringer 1/4 concentrata, oppure soluzione fisiologica peptonata sterile (sodio cloruro 0,85% + peptone 0,1%)
- Pipette graduate sterili monouso
- Piastre Petri di terreno Plate Count Agar (PCA)
- Spatole a L sterili per batteriologia

Esecuzione

Seguendo le indicazioni riportate per il metodo *Pour Plate*, preparare la sospensione iniziale del campione in esame e le diluizioni decimali ritenute necessarie.

Dall'omogenato e da ogni successiva diluizione, trasferire, in doppio, 0,1 ml su piastre di terreno PCA.

Distribuire l'inoculo sull'intera superficie dell'agar con una spatola sterile monouso, diversa per ogni diluizione allestita.

Per gli alimenti presunti a bassa contaminazione (ad esempio, alimenti trattati termicamente), è consigliabile seminare, in doppio, 1 ml di omogenato, da ripartire almeno su due piastre Petri (0,5 + 0,5 ml). Le successive diluizioni, in questi casi, possono essere tralasciate, limitandosi alla semina, in doppio, di altre due piastre con 0,1 ml di omogenato.

Lasciare asciugare le piastre a temperatura ambiente per circa 30 minuti e porle, quindi, a incubare, capovolte, a 37 °C per 48 ore, oppure a 30 °C per 72 ore.

Interpretazione

Prendere in considerazione la diluizione del campione che, seminata sulle piastre, abbia dato luogo alla crescita di colonie in numero compreso fra 30 e 300.

Per le piastre seminate, rispettivamente, con 1 e 0,1 ml, è consentito contare anche meno di 30 colonie per piastra.

Calcolare la carica batterica totale mesofila per unità di misura del campione in esame mediante l' espressione:

$$\text{CBT/g (ml, cm}^2) = \frac{C}{D_1 \times D_2 \times V}$$

dove:

C = media del numero di colonie contate nelle due piastre

D_1 = diluizione introdotta nella preparazione dell'omogenato

D_2 = diluizione decimale dell'omogenato

V = volume dell'inoculo nelle piastre (in ml)

1.3 Metodo *Drop Plate* (Micrometodo)

Materiale richiesto

- Sacchetti sterili con filtro per Stomacher
- Piastra *microtiter* sterile monouso a 96 pozzetti con fondo a 'V'
- Micropipette a volume variabile (0-20 e 20-200 microlitri)
- Puntali per micropipette sterili monouso
- Soluzione diluente sterile di Ringer 1/4 concentrata, oppure soluzione fisiologica peptonata sterile (sodio cloruro 0,85% + peptone 0,1%)
- Piastre Petri di terreno Plate Count Agar (PCA)

Esecuzione

Preparare una sospensione del campione in esame, come per il metodo *Pour Plate*.

Dall'omogenato, eseguire le diluizioni decimali richieste seguendo la tecnica della microdiluizione in piastra *microtiter*: la prima diluizione di ottiene aggiungendo a 180 µl di Ringer 1/4 concentrato 20 µl di omogenato; le ulteriori diluizioni si allestiscono trasferendo, in successione, 20 µl della diluizione precedente in 180 µl di Ringer 1/4 concentrato.

Iniziare la microdiluizione distribuendo nei pozzetti il diluente (Ringer 1/4 concentrato), utilizzando la micropipetta da 200 µl. I passaggi dalla diluizione che precede a quella successiva vengono eseguiti con la micropipetta da 20 µl, cambiando ogni volta il puntale.

Miscelare il contenuto dei pozzetti prima di procedere alla diluizione successiva, usando la micropipetta da 200 µl, aspirando e scaricando per 4-5 volte e cambiando sempre i puntali.

Suddividere le piastre di terreno PCA in 4 settori uguali, in modo da poter disporre di un settore di piastra per l'omogenato e per ognuna delle diluizioni successive effettuate.

Trasferire, in doppio, 20 µl dell'omogenato e di ciascuna diluizione sul corrispondente settore di piastra.

Lasciare asciugare le piastre a temperatura ambiente per circa 30 minuti.

Porre le piastre - **non capovolte** - in termostato a incubare a 37 °C per 24-48 ore, oppure a 30 °C fino a 72 ore (con letture quotidiane).

Nel caso di alimenti presunti a bassa contaminazione (ad esempio, alimenti trattati termicamente), è consigliabile integrare il metodo *Drop Plate* con il metodo *Surface Spread Plate*, seminando, in doppio, dall'omogenato 1 ml (da ripartire su almeno due piastre) e 0,1 ml.

Interpretazione

Prendere in considerazione la diluizione del campione che, seminata sulle piastre, abbia dato luogo alla crescita di colonie non superiore a 20.

Calcolare la carica batterica totale mesofila per unità di misura del campione in esame mediante l'espressione:

$$\text{CBT/g (ml, cm}^2\text{)} = \frac{C}{D_1 \times D_2 \times V}$$

dove:

C = media del numero di colonie contate nelle due semine del settore di piastra

D_1 = diluizione introdotta nella preparazione dell'omogenato

D_2 = diluizione decimale dell'omogenato

V = volume dell'inoculo seminato sul settore di piastra (20 µl)

Esempio 1

Numero di colonie contate nelle due semine del settore di piastra corrispondente alla diluizione 10^{-1}: 10 e 14.
Sospensione iniziale allestita con 50 g (o 50 ml) di campione e 100 g (o 100 ml) di diluente.
Volume di inoculo: 20 µl.
I dati da considerare sono:
C = (10+14)/2=24/2=12
D_1 = 50/(50+100)=50/150=1/3
$D_2 = 10^{-1}$
V =20 µl
Sostituendoli nell'espressione, si ottiene il seguente risultato:

$$\text{CBT/g (ml)} = \frac{12}{1/3 \times 10^{-1} \times 1/50} = 12 \times 3 \times 10^{1} \times 50 = 18.000$$

Nota applicativa

La tecnica del "micrometodo" descritta (ideata da Fung *e Coll*. nel 1969 e poi modificata da Kramer nel 1977) è stata rielaborata più volte da differenti Autori.

La versione più recente proviene da Kim e Fung (2005), che propongono ancora una microdiluizione in piastre, ma a 24 pozzetti, entro i quali si fanno passaggi di 30 µl contro 270 µl di diluente. Si usa un'unica pipetta multicanale per fare le diluizioni e anche per la miscelazione entro i pozzetti, che avviene aspirando e scaricando 2-3 volte, senza cambiare i puntali.

Le diluizioni vengono poi seminate, in blocco, su un'unica piastra di terreno agarizzato di 15 cm di diametro, prelevando contemporaneamente il liquido dai pozzetti con un supporto sterile fornito di "tulipani".

Le gocce da 25 µl deposte sulla piastra consentono, dopo incubazione, la crescita di microcolonie entro un diametro di 0,5 cm, che vengono considerate contabili se presenti in numero compreso tra 5 e 50.

2. CONTA BATTERICA TOTALE PSICROFILA

I microrganismi psicrofili, pur avendo una temperatura ottimale di sviluppo compresa tra +15 e +20 °C, sono ancora in grado di crescere a temperature inferiori a +5 °C. Essi hanno importanza per la degradazione degli alimenti conservati in frigorifero.

Per approfondire l'argomento dei germi psicrofili e del loro effetto sugli alimenti, si consiglia di prendere visione della rassegna pubblicata in un numero speciale (1972, n° 23) della rivista Archiv für Lebensmittelhygiene, del lavoro di Ottaviani *e Coll*. (1994) per il settore del latte e del lavoro di Berry *e Coll*. (1997) per le carni. Da questi lavori, e da altri, emergono anche indicazioni sui terreni specifici per conteggiare separatamente i batteri psicrofili. Per esempio, Flint (1994) riporta di aver sviluppato un terreno selettivo per *Acinetobacter*.

Va tuttavia ricordato che alcune specie batteriche, considerate potenzialmente patogene e annoverate comunemente fra i microrganismi mesofili, sono in grado di sopravvivere e di moltiplicarsi anche a basse temperature, assumendo, pertanto, il ruolo di psicrofili.

Erickson *e Coll*. (1992) descrivono il comportamento, nelle uova pasteurizzate in commercio, dei seguenti "patogeni psicrotrofi": *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*,

Aeromonas hydrophila. Questi batteri non si limitano a colonizzare gli alimenti di origine animale, ma crescono anche sui prodotti dell'agricoltura, come si trova descritto da Szabo *e Coll*. (2000), che parlano delle verdure inquinate da patogeni psicrotrofi, tra cui, appunto, *Listeria* e *Yersinia enterocolitica*.

La conta batterica totale psicrofila è del tutto analoga a quella mesofila, differendo da quest'ultima solamente per quanto riguarda l'incubazione delle piastre, eseguita a +5 °C per 10 giorni, in contenitore chiuso per prevenire l'essicamento del terreno.

3. CONTA BATTERICA TOTALE TERMOFILA

In tutto analoga alla conta batterica totale mesofila, ma con incubazione delle piastre a +55 °C per 48 ore, in contenitore chiuso (contenente, come fonte d'umidità, cotone idrofilo imbevuto di acqua distillata sterile per prevenire l'essicamento del terreno).

4. CONTA DEI BATTERI TERMODURICI

Nel settore lattiero-caseario il termine "batteri termodurici" si riferisce a quei microrganismi (principalmente bacilli e clostridi) capaci di sopravvivere alla temperatura di pasteurizzazione, ma che non crescono, *in vitro*, alla temperatura di pasteurizzazione.

L'analisi si esegue in maniera del tutto analoga alla conta batterica totale mesofila, ma sottoponendo l'omogenato, prima dell'allestimento delle diluizioni e della succassiva semina nelle piastre, a una procedura di pasteurizzazione in laboratorio (riscaldamento in bagnomaria a +62,8 °C per 30 minuti).

5. CONTA DEI BATTERI ALOFILI

Si possono contare separatamente i cocchi sale-tolleranti, che predominano, ad esempio, negli insaccati destinati a stagionatura, e i batteri alofili obbligati, frequenti nel pesce, nelle verdure e in altri cibi conservati sotto sale.

Il conteggio dei cocchi sale-tolleranti segue la tecnica generale dei conteggi su piastra, sia con il metodo standard "*Pour Plate*", sia con la semina sulla superficie delle piastre di terreno agarizzato ("*Surface Spread Plate*"). Il terreno da usare, consigliato da Sharf (1966), è il Caseinate Agar, da incubare per 3 giorni a +32 °C. Le colonie attese sono ellittiche, di medio diametro, a margine netto, color bianco-grigio oppure giallo/arancio pallido. Tendono a "filare" e assumono un aspetto lenticolare se cresciute nello spessore del terreno. Si confondono con le colonie dei lieviti, dai quali possono essere distinte solo mediante allestimento di un preparato colorato da leggere al microscopio.

Il conteggio dei batteri alofili obbligati viene consigliato, sempre da Sharf (1966), con il metodo MPN, cioè seminando tre diluizioni del campione in altrettanti gruppi di tre provette ciascuno. Il terreno liquido è il brodo fegato più sale, sul quale, dopo la semina, va steso uno strato di paraffina fusa sterile, che poi solidifica. L'incubazione delle provette avviene a +32°C per 7 giorni, al termine dei quali si considerano positive, ai fini del calcolo del numero più probabile, solo quelle che presentano produzione di gas (testimoniata dall'innalzamento dello strato di paraffina) e assenza di odore.

Le formule di questi terreni specifici per alofili sono riportate in Appendice.

6. CONTA DEI BATTERI LIPOLITICI

I germi lipolitici formano un gruppo eterogeneo, composto da micrococchi, stafilococchi, clostridi, flavobatteri e Pseudomonadacee. Sono accumunati dalla proprietà di demolire gli acidi grassi. Sono conteggiabili su terreno Tributyrin Agar, dove le colonie, dopo incubazione per 72 ore a +37 °C, appaiono circondate da un alone trasparente, che contrasta con l'aspetto torbido del terreno.

Nota - Ulteriori ricerche: scomposizione della CBT

Nel caso di campioni di carni con carica batterica totale mesofila superiore a 10 milioni di germi/grammo, si consiglia di eseguire una serie di strisci, partendo da colonie su PCA morfologicamente diverse e prendendo in considerazione fino a un massimo di 5 colonie. Colorare con Gram ed esaminare al microscopio.

Scegliere quali terreni seminare tra MRS Agar, M 17 Agar, STAA, MSA, Sabouraud Dextrose Agar, VRBG Agar, GSPA (vedi tabella seguente). Le diluizioni e le semine possono essere fatte in micrometodo. I risultati ottenuti possono dare utili indicazioni circa le cause della carica batterica elevata.

Tabella indicativa per la scomposizione della CBT nelle carni

esame microscopico	ricerca da effettuare	terreno da seminare	diluizioni consigliate	condizioni di incubazione
bastoncini Gram +	lattobacilli	MRS Agar	ND/10^{-4}	37°C x 72 ore (10% CO_2)
		M 17 Agar	ND/10^{-4}	37°C x 48 ore
bastoncini Gram +	*Brochothrix thermosphacta*	STAA	ND/10^{-4}	20°C x 48 ore
cocchi Gram +	micrococchi	MSA	ND/10^{-4}	37°C x 48 ore
cocchi Gram +	lieviti	Sabouraud Dextrose Agar	ND/10^{-4}	20°C x 5 gg
bastoncini Gram -	*Enterobacteriaceae*	VRBG Agar	ND/10^{-4}	37°C x 24 ore
bastoncini Gram -	*Pseudomonas Aeromonas*	GSPA	ND/10^{-4}	20°C x 72 ore

Legenda
MRS = Mann, Rogosa, Shape Agar
STAA = Streptomycin Thallium Acetate Agar
GSPA = Glucose Starch Penicillin Agar
VRBG = Violet Red Bile Glucose Agar
MSA = Mannitol Salt Agar
ND = non diluito

Nota importante

La tecnica della conta batterica totale, cambiando terreno, può essere applicata, senza particolari variazioni, alla ricerca quantitativa di molte specie di microrganismi. Pertanto, nei successivi capitoli, le fasi iniziali relative all'omogeneizzazione e alla preparazione delle diluizioni, non vengono più descritte in dettaglio.

Si fa presente, inoltre, che, nell'esposizione delle tecniche di valutazione della carica batterica, non è stata presa in considerazione la metodica del numero più probabile (*Most Probable Number* o MPN). Le modalità di esecuzione di questa tecnica, ritenuta troppo indaginosa, sono riportate in quasi tutti i testi di microbiologia degli alimenti e in numerosi lavori consultabili.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

Amtliche Sammlung von Untersuchungverfahren nach Paragraph 35 LMBG Untersuchung von Lebensmitteln. Bestimmung der aeroben Keimzahl bei 30 °C in Fleisch und Fleischerzeugnissen Tropfplatten-Verfahren 1984. L 06.00-19

Berg C. *e Coll*., Zur Streuung der mesophilen aeroben Gesamtkeimzahl in gross zerkleinerten Fleischerzeugnissen. Mettwurst, Hackfleisch und Hamburger, Fleischwirt. 1996, *76*, 644

Berry E.D. *e Coll*., Cold temperature adaptation and growth of microorganisms, J. Food Protect. 1997, *60*, 1583-1594

Betts R.P. *e Coll*., Rapid enumeration of viable micro-organisms by staining and direct microscopy, Letters in Appl. Micr. 1989, *9*, 199-202

Bomar M.T., Rapid method for the determination of bacterial surface contamination in carcasses, Alimenta 1985, *3*, 55

Buchrieser C. *e Coll*., An improved direct viable count for the enumeration of bacteria in milk, Int. J. Food Micr. 1993, *20*, 227-236

Division of Microbiology - Center for Food Safety and Applied Nutrition - U.S. FDA. Bacteriological Analytical Manual, 6th Edition Association of Official Analytical Chemists, Arlington, USA, 1984, 401-410

Donato R. *e Coll*. Confronto fra i terreni Plate Count Agar e Milk Plate Count Agar nella valutazione della carica batterica totale del latte pasteurizzato, Il Latte 1994, *6*, 609

Erickson J.P. *e Coll*., Behavior of psychrotropic pathogens *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica* and *Aeromonas hydrophila* in commercial pasteurised eggs held at 2,6 and 12,8 °C, J. Food Protect. 1992, *55*, 8

Flint S.H., Development of a selective medium for *Acinetobacter*, Int. Dairy J. 1994, *4*, 183

Fung D.Y.C., LaGrange W.S., Microtiter method for enumerating viable bacteria in milk, J. Milk Food Technol. 1969, *32*, 44-46

Hayes P.R. Food microbiology and hygiene, Elsevier Applied Science Publisher, London, 1985, 144-146 e 156-157

Kang D.H. *e Coll*., Agar underlayed method for recovery of subletally heat-injuried bacteria, Appl. Environm. Microbiol. 1999, *65*, 5334-5337

Kim S., Fung D.Y.C., Modified microtiter count method for viable cell counts from pure cultures and food model samples, Food Microbiol. 2005, 22, 595-599

Kramer J., A rapid microdilution technique for counting viable bacteria in food, Labor. Pract. 1977, *2*, 675-677

Kroll R.G. *e Coll*., An oxygen electrode-based assay of catalane activity as a rapid method for estimating the bacterial content of foods, J. appl. Bact. 1989, *66*, 209

ICMSF Microrganisms in Food 1. Their significance and methods of enumeration, 2nd edition, University of Toronto Press, Toronto, 1988, 112-124

Jay J. *e Coll*., Comparison of homogenizing, shaking and blending on the recovery of microorganisms and endotoxins from fresh and frozen ground beef as assessed by plate counts and the Limulus Amebocyte Lisate Test, Appl. Environm. Microbiol. 1979, *38*, 879-884

Jay J., Rapid estimation of microbial numbers in fresh ground beef by use of the Limulus test, J. Food Protect. 1981, *44*, 275-288

Jay J., Modern food microbiology, Van Nostrand Reinhold Company, New York, 1970, 272-287

Niemela S.I., A semi-empirical precision control criterion for duplicate microbial colony counts, Letters in Appl. Micr. 1996, *22*, 315-319

Ottaviani F. *e Coll*., Germi psicrofili e termofili del latte; importanza nella valutazione della

salubrità e conservabilità, Il latte 1994, *33*, 951
Rao D.N. *e Coll*., Rapid dye reduction tests for the determination of microbiological quality of meat, J. Food Technol. 1986, *21*, 151
Richardson G.H., Standard methods for the examination of dairy products, 15th edition, American Public Health Association, Washington, USA, 190-191 e 194-197
Siragusa G.R. *e Coll*., Monitoring the microbial contamination of beef carcasses tissue with a rapid chromogenic *Limulus* Amebocyte Lysate endpoint assay, Letters in Appl. Micr. 2000, *31*, 178-183
Smith L.B. *e Coll*., Comparison of a dry medium culture plate (Petrifilm SM Plate) method to the aerobic plate count method for enumeration of mesophilic aerobic colony-forming units in fresh ground beef, J. Food Protect. 1985, *48*, 1044-1045
Stecchini M.L. *e Coll*., Relazioni tra le proprietà di struttura del mezzo e la crescita microbica, Ind. Alim. 1995, *34*, 1295
Szabo E.A. *e Coll*., Survey for psychrotrophic bacterial pathogens in minimally processed lettuce, Letters in Appl. Micr. 2000, *30*, 456-460

ENTEROBACTERIACEAE

Definizione

Batteri Gram-negativi bastoncellari, aerobi-anaerobi facoltativi, non sporigeni, ossidasi-negativi, che crescono in presenza di sali biliari e fermentano il glucosio.

Il metodo proposto

- Allestimento omogenato
- Esecuzione di diluizioni decimali
- Semina su Violet Red Bile Glucose Agar (VRBG)
- Incubazione a 37 °C x 24 ore
- Conteggio delle colonie sospette
- Conferma mediante trapianto di colonie sospette su Kligler Iron Agar (incubazione a 37 °C x 24 ore)
- Prove biochimiche di conferma

Materiale richiesto

- Come per la CBT mesofila, ad eccezione di piastre Petri di terreno Violet Red Bile Glucose Agar (VRBG)
- Provette di terreno Kligler Iron Agar
- Dischetti per *test* dell'ossidasi
- Reagente per *test* dell'ossidasi

Esecuzione

Eseguire una conta in piastra, applicando uno dei metodi di semina descritti per la conta batterica totale e utilizzando come terreno colturale il VRBG.

Porre le piastre a incubare a 37 °C per 24 ore (capovolte, tranne che per il *Drop Plate Method*).

Interpretazione

Identificare come colonie di *Enterobacteriaceae* quelle che si presentano di colore rosso scuro, con diametro di 1-2 mm e circondate da un alone di colore rossastro o rosa.

Come conferma dell'identificazione, trapiantare almeno due colonie tipiche su altrettante provette di Kligler Iron Agar (da incubare a 37 °C per 24 ore), per evidenziare la fermentazione (positiva) del glucosio, testimoniata dal viraggio al giallo del fondo della provetta.

Da tali trapianti, inoltre, eseguire il *test* dell'ossidasi su dischetto, trasportando su un dischetto di carta bibula imbevuto di reattivo per l'ossidasi alcune ansate di patina batterica. Il *test* (negativo nel caso delle *Enterobacteriaceae*) si basa sul viraggio di colore al viola del dischetto entro 1-2 minuti.

Approntare, infine, un preparato microscopico da colorare con metodo di Gram (risultato atteso: bastoncini Gram-negativi).

Calcolare il numero di *Enterobacteriaceae* per unità di misura del campione in esame in maniera analoga alla conta batterica totale mesofila.

Enterobacteriaceae
Colonie rosse, di diametro 1-2 mm, con alone rosso su VRBG
Kligler con fondo giallo (glucosio +)
Ossidasi -
Bastoncini Gram -

Nota

Nel caso degli alimenti per l'infanzia, è stata introdotta nella Comunità Europea la ricerca specifica di *Enterobacter sakazakii*, che fa parte delle *Enterobacteriaceae*. La dimostrazione quantitativa di questo germe può essere eseguita con lo stesso metodo qui descritto, proseguendo con il trapianto in Kligler Iron Agar di un numero proporzionalmente rappresentativo di colonie rosse dalle piastre di VRBG. Solo le colture che crescono con un pigmento giallo della patina e che fanno virare al giallo sia lo *slant* che il fondo della provetta, con formazione di gas e assenza di idrogeno solforato, devono essere ritenute sopette e confermate mediante identificazione biochimica con un *kit* diagnostico per enterobatteri.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

Hayes P.R. Food microbiology and hygiene. Elsevier Applied Science Publisher, London, 1985, 151-152

ICMSF Microrganisms in food 1. Their significance and methods of enumeration. 2nd edition, University of Toronto Press, Toronto, 1986, 140-141

Oblinger J.L., Kennedy J.E., Langston D.M. Microflora recovered from foods on Violet Red Bile Agar with and without glucose and incubated at different temperatures, J. Food. Protect. 1982, 45 (10), 948- 952

OXOID MANUAL, 6th edition, 1990, 2.224-2.225

SCHWEIZ. LEBENSMITTELBUCH. Zweiter Band - Rigbuch V. Kapitel 56 "Mikrobiologie", 1988, 7.06/1-7.06/3.

COLIFORMI

Definizione

Per coliformi, si intende un vasto gruppo di germi Gram-negativi, bastoncellari, aerobi-anaerobi facoltativi, asporigeni, capaci di fermentare il lattosio con produzione di acido e di gas entro 48 ore a +37 °C. A questo gruppo appartengono i generi: *Citrobacter, Enterobacter, Erwinia, Escherichia, Hafnia, Klebsiella, Serratia.*

I coliformi vengono inoltre suddivisi in coliformi propriamente detti (o coliformi totali) e in coliformi fecali. Quest'ultimi sono una parte dei coliformi totali, di cui mantengono le prerogative, con in più la capacità di sviluppare e di fermentare il lattosio (con produzione di acido e gas) a 44 ± 0,5 °C.

Escherichia coli, trattato a parte, possiede le caratteristiche dei coliformi fecali e, in più, ha la capacità di produrre indolo dal triptofano in 24 ore alla temperatura di 44 ± 0,5 °C.

Alcuni cenni storici

Si ricorda che, per la numerazione dei coliformi, è stata usata per molto tempo (e continua a essere adottata nella legislazione) la tecnica dell'MPN (*Most Probable Number* o numero più probabile). Questa metodica ricorre anche per la ricerca quantitativa di *Escherichia coli*.

Una modifica relativamente recente è stata proposta da Mosso *e Coll*. (1991). Essi hanno confermato la semina delle diluizioni del campione in provette di Brodo Bile Verde Brillante provviste di campana di Durham, da incubare a +32 °C per 48 ore. Successivamente, le provette positive per sviluppo di gas vengono piastrate su VRBA + MUG, da incubare a +37 °C per 24 ore. In questo modo, si possono contare come *E. coli* le colonie fluorescenti e come coliformi le rimanenti altre colonie rosse circondate da una zona rossastra.

La questione dei coliformi fecali: problematiche per la loro determinazione

Recenti ricerche hanno contribuito a dimostrare che la distinzione tra coliformi e coliformi fecali è tutt'altro che semplice. Sarebbero da ritenere verosimilmente coliformi fecali, per comprovata provenienza intestinale, solo i seguenti microrganismi: *Escherichia coli, Enterobacter cloacae, Enterobacter aerogenes, Citrobacter freundii, Klebsiella pneumoniae.*

Purtroppo, i terreni attualmente impiegati per selezionare i coliformi fecali (che si basano sulla fermentazione del lattosio a 44 °C con sviluppo di gas) non sono sufficientemente selettivi. Di conseguenza, sarebbe necessario procedere, per una corretta distinzione dei coliformi fecali, all'identificazione biochimica delle singole colonie isolate. Questa procedura diviene in pratica irrealizzabile, per il gran numero di colonie da saggiare separatamente. **Si ritiene pertanto consigliabile sostituire la ricerca dei coliformi fecali con quella di *Escherichia coli*, essendo questo microrganismo meglio definibile con i metodi a disposizione e più strettamente indicativo di contaminazione di origine fecale. Per questo motivo, la metodica qui presentata fa riferimento esclusivamente alla ricerca dei coliformi propriamente detti (coliformi totali) e non prende in considerazione quella dei coliformi fecali.**

Per la ricerca dei coliformi fecali nelle acque, si rimanda alle istruzioni riportate nel Capitolo 7 - Controlli su ambienti di lavorazione alimenti - Esame dell'acqua.

Il metodo proposto

- Allestimento omogenato
- Esecuzione di diluizioni decimali
- Semina su Violet Red Bile Agar (VRBA)
- Incubazione a 37 °C x 24 ore
- Identificazione presuntiva e conteggio delle colonie di coliformi
- Conferma mediante trapianto di colonie sospette su Kligler Iron Agar (incubazione a 37 °C x 24 ore)
- Prove biochimiche di conferma

Materiale richiesto

- Come per la CBT mesofila, ad eccezione di piastre Petri di terreno Violet Red Bile Agar (VRBA)
- Provette di terreno Kligler Iron Agar
- Materiale per l'esecuzione di *test* biochimici necessari per l'identificazione dei coliformi.

Esecuzione

Eseguire il conteggio in piastra applicando uno dei metodi di semina descritti per la carica batterica totale e utilizzando come terreno colturale il Violet Red Bile Agar (VRBA).

Porre le piastre a incubare a 37 °C per 24 ore (capovolte, tranne che per il *Drop Plate Method*).

Interpretazione

Identificare come colonie di coliformi quelle che appaiono di colore rosso scuro, di diametro di almeno 0,5 mm e circondate da zone rossastre o rosa.

Confermare l'identificazione mediante il trapianto di almeno due colonie tipiche su altrettante provette di Kligler Iron Agar (da incubare a 37 °C per 24 ore) e successiva esecuzione di appropriati *test* biochimici predisposti. Tra questi *test*, si ricorda la produzione di gas in terreno brodo bile verde brillante (in provetta con campana di Durham), seminato a partire dal Kligler e incubato a 30°C per 24 ore.

Calcolare il numero di coliformi per unità di misura del campione in esame in maniera analoga alla conta batterica totale mesofila.

Coliformi

Colonie rosse, di diametro superiore a 0,5 mm, circondate da alone rosso su VRBA

Prove biochimiche di conferma favorevoli (formazione di gas in brodo bile verde brillante a 30 °C per 24 ore).

Impiego dei terreni cromogenici

Si tratta di terreni selettivi formati da una sostanza cromogena e da una base, che promuove la crescita del germe desiderato, facendo sviluppare, al contempo, un enzima caratteristico di valore diagnostico. Una discussione approfondita su questi substrati di nuova generazione è contenuta nel lavoro di Mioni *e Coll*. (1997), al quale si rimanda.

Le colonie formate da germi che possiedono l'enzima caratteristico si colorano in maniera differenziale e non perdono il colore per alcuni giorni. È possibile con un'unica piastra di terreno contenente più cromogeni evidenziare specie differenti all'interno di una popolazione mista (Frampton *e Coll*., 1993).

Uno di questi terreni innovativi, preso come esempio della categoria, è il Chromocult Coliform Agar® (Merck), che contiene due substrati, l'X-glucuronide e il Salmon-GAL. Su questo terreno, *Escherichia coli* agisce mediante gli enzimi glucuronidasi e beta-galattosidasi, sviluppando con colonie di colore blu. I coliformi in generale, attraverso la beta-galattosidasi, crescono con colonie blu-viola. Gli altri Gram-negativi sviluppano, eventualmente, con colonie incolori o turchese. Nella composizione di questo terreno entra il triptofano, per cui è possibile un'ulteriore identificazione di *Escherichia coli* attraverso la prova dell'indolo, aggiungendo sopra le colonie sospette il reattivo di Kovacs.

Applicando il principio dei terreni cromogenici, è stato proposto un metodo che permette di riconoscere in giornata i campioni d'acqua con più di 100 coliformi fecali per 100 ml. Può sostituire il sistema tradizionale in provette, fondato sulla fermentazione del lattosio con formazione di gas. Si basa sulla produzione di un composto fluorescente in un terreno liquido contenente metil-umbelliferone-B-D-galattoside, operata dell'enzima beta-galattosidasi, posseduto dai coliformi fecali. Dopo incubazione a +44 °C, uno strumento provvede a valutare l'incremento del livello di fluorescenza e a confrontarlo con una curva *standard*.

Impiego dei terreni fluorogenici

Si tratta di terreni che, al posto del colore, usano la fluorescenza per mettere in evidenza le colonie sospette. La lettura di questi terreni si esegue al buio con una lampada di Wood a luce ultravioletta (366 nm). I meccanismi biochimici che stanno alla base di questi terreni, detti fluorogenici, sono molto simili ai precedenti. Oltre ai terreni noti sotto la denominazione comune di Fluorocult® (Merck), si sono diffusi altri substrati, soprattutto per germi enterici, dotati di caratteristiche affini (Geissler *e Coll*., 2000).

Caratteristiche biochimiche utili per la differenziazione dei principali generi della famiglia *Enterobacteriaceae* (comportamento prevalente)

	Indolo	Urea	Lisina decarbossilasi	H_2S	Lattosio
Escherichia coli	+	-	d[1]	-	+
Edwardsiella	+	-	+	+	-
Salmonella	-	-	+	+	-
Citrobacter	-	d[1]	-	+	d[1]
Klebsiella	-	+	+	-	+
Enterobacter	d[1]	d[1]	+	-	d[1]
Serratia	-	d[1]	+	-	-
Proteus	d[1]	+	-	d[1]	-
Providencia	+	-	-	-	-

[1] d = risultato variabile

Nota

La ricerca dei coliformi nelle acque e nelle acque minerali, da eseguire sulle quantità prescritte, si effettua mediante filtrazione del campione su membrana di acetato di cellulosa (porosità 0,45 mmicron) e successiva coltivazione della membrana su piastra di m-ENDO Agar (vedi Capitolo 7).

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

DIFCO MANUAL 10th edition, 1964, 1052-1054

Frampton E.W. *e Coll*., Methods for *Escherichia coli* identification in foods, water and clinical samples based on beta-glucuronidase detection, J. appl. Bact. 1993, *74*, 223

Geissler K. *e Coll*., Quantitative determination of total coliforms and *Escherichia coli* in marine waters with chromogenic and fluorogenic media, J. appl. Micr. 2000, *88*, 280-285

Hall L.P. A manual of methods for the bacteriological examination of frozen foods. 2nd edition, Chipping Campden, Gloucestershire, 1975, 23-25

ICMSF Microrganisms in foods 1. Their significance and methods of enumeration. 2nd edition, University of Toronto Press, Toronto, 1988, 125-139

Matushek M.G. *e Coll*., Comparison of various plating procedures for the detection and enumeration of coliforms in ice creams and ice milk, J. Food Protect. 1992, *55*, 113-115

Mioni R. *e Coll*., Confronto fra terreni selettivi e differenziali. Determinazione contemporanea in piastra di *Escherichia coli* e coliformi in alimenti di origine animale, Ind. Alim. 1997, *36*, 1014

Monti A. *e Coll*., Arch. Vet. It., 1995, 46, 206-221

Mosso C. *e Coll*., Modifica alla metodica per la ricerca ed enumerazione di coliformi totali ed *E. coli* negli alimenti, Ind. Alim. 1991, *30*, 989

Oblinger J.L., Kennedy J.E. Jr., Langston D.M. Microflora recovered from foods on Violet Red Bile Agar with and without glucose and incubated at different temperatures, J. Food Protect. 1982, 45, (10), 948-952

OXOID MANUAL, 6th edition, 1990, 2.223-2.224

Richards G.P. Comparative study of methods for the enumeration of total and fecal coliforms in the easter oyster, *Crassostrea virginica*. Appl Env. Microbiol, 1978, 36 (6), 975-978

ESCHERICHIA COLI

Definizione

Bastoncini Gram-negativi, aerobi-anaerobi facoltativi, che sviluppano bene su terreni di coltura incubati a +37 e a +44 °C. È un microrganismo mobile, lattosio-positivo e indolo-positivo, patogeno opportunista, considerato un indicatore di contaminazione fecale nell'acqua e negli alimenti. Nella specie *Escherichia coli*, sono compresi ceppi enteroinvasivi (EIEC) ed enterotossici (ETEC), capaci di produrre tossine termostabili e termolabili.

Alcuni cenni storici

Il conteggio dei coliformi e, in particolare, di *Escherichia coli* è stato affrontato da parecchi anni e da più parti, seguendo un metodo diverso da quello qui descritto, che è basato sull'utilizzo di piastre di terreno solido. L'alternativa consiste nella tecnica del numero più probabile (*Most Probable Number*, MPN), con semina in provette di terreno liquido. Nelle provette, a gruppi di tre o cinque a seconda della variante tecnica proposta, vengono seminate almeno tre diluizioni scalari del campione, opportunamente sospeso e omogeneizzato in soluzione diluente. Il confronto fra il numero delle provette che, direttamente o indirettamente, rivelano qualche variazione dopo incubazione e apposite tabelle interpretative compilate su basi statistiche, permette di predire il numero di microrganismi presenti per grammo o ml.

Il metodo MPN si basa su osservazioni statistiche e, pertanto, dovrebbe sempre essere corredato dall'indicazione di un intervallo fiduciale entro il quale, col 95% di probabilità, si colloca il numero di germi indicato in tabella. Esso è stato esteso anche alla determinazione quantitativa di altre specie batteriche (oltre a *E. coli*), tra cui enterococchi, *Salmonella*, *Listeria*, soprattutto nei metodi cosiddetti "normati" o "ufficiali". Il vantaggio del metodo MPN, rispetto all'uso del conteggio in piastra, sta nella maggior sensibilità, dovuta alla coltura in terreno liquido, dove si lasciano recuperare cellule batteriche stressate o presenti in numero ridotto. Secondo qualche Autore, tuttavia, questo vantaggio non sarebbe molto marcato. Garcia *e Coll*. (1995) affermano, infatti, che, nel conteggio di coliformi fecali ed *E. coli* in prodotti della pesca, i risultati della numerazione su terreno solido non differiscono dalla stima dell'MPN seminato a tre o cinque provette per diluizione.

Blood *e Coll*. (1995), in una monografia sui terreni adatti per contare enterobatteri, coliformi ed *Escherichia coli,* sostengono la validità di un terreno in piastra (VRBA+MUG), seminato in superficie, per la numerazione dei coliformi (a +37 °C) e dei coliformi fecali (a +44,5 °C). Questa tecnica offrirebbe risultati uguali al metodo MPN e al metodo della filtrazione su membrana.

Lo svantaggio principale del metodo MPN consiste nella laboriosità dell'allestimento, che esige molte provette per un solo campione e, spesso, comporta la necessità di procedere a conferme mediante trapianti su piastre (Bredie *e Coll*., 1992).

Per ovviare all'inconveniente e mantenere i vantaggi del metodo MPN, sono state recentemente predisposte delle piastre *microtiter* a 96 pozzetti (Microplate MUG/EC® Biokar), contenenti un terreno liquido che permette di evidenziare l'attività enzimatica della beta-D-glucuronidasi sul MUG, ritenuta un affidabile indicatore per la ricerca di *Escherichia coli*. I pozzetti vengono inoculati con micropipetta a 8 canali con più diluizioni del campione. Il conteggio è reso possibile dalla comparsa di fluorescenza nei pozzetti positivi, leggendo la piastra sotto luce di Wood a 366 nm, dopo incubazione a +44 °C per 36 ore e dal confronto dei risultati con una tabella.

Qualche Ricercatore ha intrapreso vie del tutto differenti dal metodo MPN, ritenendo che

i tempi analitici non fossero compatibili con le esigenze dell'industria.

Chang *e Coll*. (2003) hanno trovato che la concentrazione dei coliformi nel latte di massa è inversamente proporzionale al tempo di fermentazione del lattosio. La reazione, che si manifesta con viraggio al giallo, avviene a +37 °C in provette contenenti Brodo porpora addizionato con alginato di calcio entro tempi abbreviati di 12-14 ore rispetto alla conta su terreno solido VRBA.

Il metodo proposto

- Allestimento omogenato
- Esecuzione di diluizioni decimali
- Semina su Violet Red Bile Agar (VRBA) + MUG
- Incubazione a 44,5 °C x 24 ore
- Identificazione presuntiva e conteggio delle colonie di *E. coli*
- Conferma mediante trapianto di colonie sospette su Kligler Iron Agar (incubazione a 37 °C x 24 ore)
- Prove biochimiche di conferma

Materiale richiesto

- Come per la CBT mesofila, ad eccezione di piastre Petri di terreno Violet Red Bile Agar (VRBA) + MUG
- Provette di terreno Kligler Iron Agar
- Materiale per l'esecuzione di *test* biochimici necessari per l'identificazione di *Escherichia coli*.

Esecuzione

Eseguire il conteggio in piastra applicando uno dei metodi di semina descritti per la carica batterica totale e utilizzando come terreno colturale il VRBA + MUG.

Porre le piastre a incubare a 44,5 °C per 24 ore (capovolte, tranne che per il *Drop Plate Method*).

Interpretazione

Le colonie sospette di *E. coli* appaiono, su VRBA + MUG, di colore rosso, circondate da un alone rossastro e del diametro di 1-2 mm. Quando osservate sotto una luce ultravioletta (luce di Wood a 366 nanometri), le probabili colonie di *E. coli* appaiono avvolte da un alone di fluorescenza.

Si contano le colonie rosse che si presentano fluorescenti sotto la luce di Wood e si procede alla conferma dell'identificazione mediante trapianto di almeno due colonie su Kligler Iron Agar.

Dopo incubazione delle provette di Kligler a 37 °C per 24 ore, si utilizzano appropriati *test* biochimici predisposti per verificare l'effettiva appartenenza alla specie *E. coli.*

Calcolare il numero di *E. coli* per unità di misura del campione in esame in modo analogo alla conta batterica totale mesofila.

Nel caso in cui non tutte le colonie saggiate risultino ascrivibili alla specie *E. coli*, si applica, al numero totale delle colonie inizialmente contate come sospette, una detrazione percentuale corrispondente alla proporzione delle colonie confermate rispetto a quelle saggiate (esempio: colonie sospette 36; trapiantate 3; confermate biochimicamente 2 su 3 (66%); da considerare *E. coli*: 66% di 36, ossia 24).

E. coli

Colonie rosse, con alone rosso di diametro 1-2 mm su VRBA + MUG dopo 24 ore di incubazione a 44,5 °C.

Fluorescenza delle colonie in luce di Wood.

Prove biochimiche di conferma favorevoli.

Caratteristiche biochimiche utili per la differenziazione dei principali generi della famiglia *Enterobacteriaceae* (comportamento prevalente)

	Indolo	Urea	Lisina decarbossilasi	H_2S	Lattosio
Escherichia coli	+	-	d[1]	-	+
Edwardsiella	+	-	+	+	-
Salmonella	-	-	+	+	-
Citrobacter	-	d[1]	-	+	d[1]
Klebsiella	-	+	+	-	+
Enterobacter	d[1]	d[1]	+	-	d[1]
Serratia	-	d[1]	+	-	-
Proteus	d[1]	+	-	d[1]	-
Providencia	+	-	-	-	-

[1] d = risultato variabile

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

Anglès D'Auriac M.B., Hildegarde R., Shaw T., Strevag R., Hermansen L.F., Berg J.D., Field evaluation of a semiautomated method for rapid and simple analysis of recreational water microbiological quality, Applied and Environmental Microbiology 2000, *66*, 4401–4407

Blood R.M. *e Coll*., Media for "total" *Enterobacteriaceae*, coliforms and *Escherichia coli*, Int. J. Food Micr. 1995, *26*, 93-115

Bredie W.P.L. *e Coll*., Evaluation of the MPN, Anderson Baird-Parker, Petrifilm® *E. coli* and Fluorocult ECD method for enumeration of *E. coli* in foods of animal origin, Int. J. Food Microbiol. 1992, *16*, 197-208

Chang S.S. *e Coll*., A new alginate-based rapid method for determining coliforms in milk, J. Food Protect. 2003, *66*, 2146-2150

Garcia G.R. *e Coll*., Comparison of a rapid plate count and MPN methods for enumeration of fecal coliforms and *Escherichia coli* in soft-shell clams, J. Food Protect. 1995, *58*, 1197-1200

Geissler K. *e Coll*., Quantitative determination of total coliforms and *Escherichia coli* in marine waters with chromogenic and fluorogenic media, J. Appl. Micr. 2000, *88*, 280-285

Hahn G. Fluoressenzoptischer Nachweis von *Escherichia coli* aus Weichkase, Milchwissenschaft, 1987, 42, (7), 434-438

ISO 9308-3, 1998. Water quality – Detection and enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria in surface and waste water – Part 3 : Miniaturised method (Most Probable Number) by inoculation in liquid medium.

Mossel D.A.A., Van Der Zee H., Hardon A.P., Van Netten P. The enumeration of thermotrophic types amongst the Enterobacteriaceae colonizing perishable foods J.appl Bacteriol., 1986, 60 , 289 - 295

Oblinger J.L., Kennedy J.E. Jr., Langston D.M. Microflora recovered from foods on Violet Red Bile Agar with and without glucose and incubated at different temperatures, J.Food Prot., 1982, 45, (10), 948-952

Trepeta R.W., Edberg S.C. Methylumbelliferil - beta - D- glucuronide based medium for rapid isolation and identification of *Escherichia coli* J.Clin. Microbiol. 1984, 19, (2), 172-174

Villari P. *e Coll*., An evaluation of the use of 4-methyl-umbelliferil-beta-D-glucuronide (MUG) in different solid media for the detection and enumeration of *Escherichia coli* in foods, Letters in Appl. Micr. 1997, *24*, 286-290

STREPTOCOCCHI FECALI

Definizione

Cocchi Gram-positivi, non sporigeni, tendenti a disporsi in catene e a decolorarsi, anaerobi aerotolleranti. Sono di origine intestinale (vedi anche NOTA APPLICATIVA a fine capitolo), e per questo chiamati anche **Enterococchi**. Appartengono al gruppo sierologico D degli Streptococchi. Le specie principali sono rappresentate da *S. faecalis* e *S. faecium*. La classificazione esatta di questi germi rimane tuttora controversa. L'identificazione a livello di specie è aumentata d'importanza con la comparsa dei ceppi vancomicina-resistenti, trovati anche negli alimenti (Knijff *e Coll.*, 2002).

Oggi si tende a includere gli enterococchi fra i germi patogeni emergenti, in quanto capaci di sviluppare nell'uomo malattie anche gravi, precedentemente poco indagate. Inoltre, ad essi viene riconosciuto il primato nella trasmissione ad altri microrganismi della multiresistenza agli antibiotici, attraverso scambi di materiale genetico (Murray, 1990).

Alcuni cenni storici

I tentativi per mettere a punto un terreno selettivo efficace per gli enterococchi sono stati, a giudicare dalla letteratura, decisamente molto numerosi. Per citarne solo alcuni, si ricordano le pubblicazioni di Peterz *e Coll*. (1993), che hanno provato il terreno di Slanetz e Bartley's incubato a +44 °C per 48 ore, e di Rhodes *e Coll*. (1997), che hanno fatto ricorso a un metodo di filtrazione su membrana e semina su mE.

Numerose sono state anche le prove comparative su terreni disponibili in commercio, fatte, tra gli altri Autori, da Devriese *e Coll*. (1995) e da Figueras *e Coll*. (1996). Questi ultimi Ricercatori, nel corso di una valutazione critica del terreno selettivo M-Enterococcus Medium, hanno evidenziato che, purtroppo, solo il 47% delle colonie sospette apparteneva a streptococchi fecali, mentre le molte colonie puntiformi e di colore rosso-scuro si rivelavano stafilococchi. Da qui la loro conclusione che un terreno per gli streptococchi fecali si può considerare specifico se almeno il 90% delle colonie appartiene al gruppo microbico atteso, con non più del 10% di colonie atipiche.

Attualmente si trovano in commercio terreni che permettono il riconoscimento presuntivo degli enterococchi mediante una colorazione tipica delle colonie, in seguito a reazione tra un substrato cromogeno e un enzima caratteristico. In questo caso, l'enzima beta-glucosidasi si combina con il substrato X-glu (beta-D-glucopiranoside), provocando la colorazione blu delle colonie di enterococchi.

Sono in commercio anche terreni liquidi che mostrano viraggi di colore blu in presenza di enterococchi e che risultano indicati per la tecnica MPN, ad esempio come *screening* nell'analisi delle acque.

Il metodo proposto

- Allestimento omogenato
- Esecuzione di diluizioni decimali
- Semina su Kanamycin Aesculin Azide Agar
- Incubazione a 37 °C x 24 ore
- Identificazione presuntiva e conteggio delle colonie di streptococchi fecali
- Conferma mediante trapianto di colonie sospette BHI Broth (incubazione a 37 °C x 24 ore)
- Prove biochimiche di conferma

Materiale richiesto

- Come per la CBT mesofila, ad eccezione di piastre Petri di terreno Kanamycin Aesculin Azide Agar
- Provette di terreno Brain Heart Infusion Broth (BHI)
- H_2O_2 al 3% per *test* della catalasi
- Materiale per l'esecuzione di *test* biochimici necessari per l'identificazione di specie degli streptococchi fecali

Esecuzione

Eseguire il conteggio in piastra applicando uno dei metodi di semina descritti per la carica batterica totale e utilizzando come terreno colturale il Kanamycin Aesculin Azide agar.

Porre le piastre a incubare a 37 °C per 24 ore (capovolte, tranne che per il *Drop Plate Method*).

Interpretazione

Le colonie di streptococchi fecali appaiono tonde, bianco-grigiastre, con diametro di circa 2 mm, circondate da un alone bruno-nerastro di almeno 1 cm di diametro.

Confermare l'identificazione mediante trapianto di una o più colonie sospette in altrettante provette di brodo BHI incubato a 37 °C per 18-24 ore e successiva esecuzione delle seguenti prove:

- esame microscopico (morfologia dopo colorazioe di Gram: cocchi Gram-positivi).
- catalasi (-), allestita mescolando 0,5 ml di acqua ossigenata al 3% con 3 ml circa di brodocoltura in BHI di 18-24 ore.
- crescita a 44-46 °C, rilevata in brodo BHI dopo 48 ore.
- crescita in BHI addizionato di NaCl 6,5%, rilevata dopo incubazione a 37 °C per 72 ore.

In alternativa (o in parallelo) alle prove suddette, confermare l'identificazione mediante allestimento di appropriati *test* biochimici predisposti.

Mentre per gli streptococchi di interesse umano (beta-emolitici dei gruppi A e B di Lancefield) sono stati approntati numerosi *test* rapidi miniaturizzati, altrettanto non è stato fatto per gli enterococchi. Fra i sistemi commerciali di identificazione basati sulla biochimica, Allan L. Truant (2002) sostiene la validità del Crystal Gram-Positive ID System (BBL) e del Vitek GPI Card.

Calcolare il numero di streptococchi fecali per unità di misura del campione in esame in maniera analoga alla conta batterica totale mesofila.

Nota

La ricerca degli streptococchi fecali nelle acque e nelle acque minerali, da eseguire sulle quantità prescritte, si effettua mediante filtrazione del campione su membrana di acetato di cellulosa (porosità 0,45 µm) e successiva coltivazione della membrana su piastra di terreno KF-Streptococcus Agar (vedi Capitolo 7 - Controlli su ambienti di lavorazione alimenti - Analisi dell'acqua).

Nota applicativa

Esistono alimenti (come i derivati del latte) che contengono normalmente streptococchi con proprietà biochimiche simili a quelle degli streptococchi fecali. Altri alimenti (come alcuni prodotti a base di carne) vengono addizionati intenzionalmente con streptococchi che si possono confondere con quelli fecali.

Addirittura in alcuni formaggi italiani, per ottenere una più rapida acidificazione del latte e per conferire aroma, vengo addizionati ceppi di *E. faecalis* ed *E. fecium* (Gatti *e Coll*., 1994).

Esiste quindi il rischio di conteggi sbagliati. Di conseguenza, la ricerca degli streptococchi fecali andrebbe limitata a pochi casi, nei quali non si presenta questo problema. Questa ricerca era originariamente dedicata all'esame dell'acqua potabile.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

Devriese L.A. *e Coll*., Identification of *Enterococcus* species isolated from foods of animal origin, Int. J. Food Micr. 1995, *26*, 187-197

Figueras M.J. *e Coll*., A fast method for the confirmation of fecal Streptococci from M-Enterococcus Medium, Appl. Environm. Microbiol. 1996, *62*, 2177-2178

Gatti M. *e Coll*., Enterococchi nei formaggi italiani: attività biochimiche e significato tecnologico, L'industria del latte 1994, *30*, 11

Knijff E. *e Coll*., Diffusione di enterococchi vancomicina-resistenti in prodotti carnei, Ind. Alim. 2002, *41*, 158-161

ICMSF Microrganisms in food 1. Their significance and methods of enumeration. 2nd edition, University of Toronto Press, Toronto, 1988, 144-148

Murray B., The life and times of the *Enterococcus*, Clin. Micr. Tev. 1990, *3*, 46-65

OXOID MANUAL, 6th edition, 1990, 2.118-2.119

Peterz M. *e Coll*., Comparative evaluation of two methods of enumerating enterococci in foods: collaborative study, Int. J. Food Micr. 1993, *18*, 211-221

Rhodes M.W. *e Coll*., Enumeration of *Enterococcus sp*. using a modified mE - method, J. Appl. Micr. 1997, *83*, 120-126

Truant A.L., Manual of commercial methods in clinical microbiology, ASM, Washington, USA, 2002

LATTOBACILLI

Definizione

Gram-positivi non sporigeni, anaerobi aerotolleranti, catalasi e ossidasi negativi, a forma di bastoncino anche molto allungato *(Lactobacillus)* o di cocco *(Streptococcus, Pediococcus, Aerococcus, Leuconostoc)*.

Sono chiamati lattici *omofermentanti* quelli che producono 2 moli di acido lattico da tutti gli zuccheri, facendo abbassare quindi notevolmente il *p*H. Si chiamano, invece, *eterofermentanti* i batteri lattici che riducono il fruttosio a mannitolo e CO_2, acido lattico e acido acetico.

I germi selezionati per funzionare da *starter* nelle produzioni alimentari sono molti di più dei ben noti lattobacilli. Nella preparazione delle carni conservate, ad esempio, Hammes *e Coll*. (1994) elencano le seguenti specie:

Batteri:	*Lactobacillus plantarum, sakei, curvatus* *Pediococcus acidilactici, pentosaceus* *Lactococcus lactis* *Micrococcus varians* *Staphylococcus carnosus, xylosus* *Streptomyces griseus* *Aeromonas*
Lieviti:	*Debaromyces hansenii* *Candida famata*
Funghi:	*Penicillium chrysogenum, nalgiovense*

Nota

Con la denominazione di lattobacilli, si intendono sia i bastoncini Gram-positivi (appartenenti, prevalentemente, al genere *Lactobacillus* e comunemente indicati come "lattobacilli") sia i cocchi Gram-positivi (riferibili, prevalentemente, al genere *Streptococcus* e comunemente indicati come "lattococchi").

La presente metodica è indicata per il conteggio cumulativo dei cosiddetti "batteri lattici" e contemporaneamente per il conteggio separato dei "lattobacilli" e dei "lattococchi". Per questa ragione, vengono impiegati simultaneamente due terreni.

Alcuni cenni storici

Trattandosi di un insieme di più generi, i batteriologi hanno speso molte energie per trovare un metodo colturale che fosse il più possibile semplificato e, al tempo stesso, polivalente. Nonostante gli sforzi intrapresi, sembra che non sia stato possibile trovare un compromesso del tutto soddisfacente, in grado di superare l'uso combinato dei terreni MRS e M17 (Reuter, 1985; FIL-IDF, 1987; Bianchi Salvadori *e Coll*., 1995). È tuttavia doveroso ricordare il lavoro di alcuni Autori, selezionati fra i moltissimi che si sono impegnati in questo compito.

Cantoni *e Coll*. (1988), per studiare le alterazioni dei prodotti cotti di salumeria, hanno fatto ricorso al terreno HDD, contenente fruttosio. Questo terreno consente, attraverso la rilevazione del cambiamento di *p*H, di differenziare fra lattobacilli eterofermentanti, che crescono formando colonie bianche, e lattobacilli omofermentanti, che sviluppano con colonie blu. Tra le specie eterofermentanti, causa di fenomeni alterativi di rigonfiamento, gli Autori citati hanno individuato con questo terreno, ad esempio, i lattobacilli *brevis* e *bifermentans*.

Kneifel *e Coll*. (1993) si sono dedicati alla ricerca quantitativa di *Lactobacillus acidophilus* nello *yogurt* e nei prodotti similari, per la quale hanno sperimentato un terreno solido contenente X-glucosidasi.

Shah *e Coll*. (1995), per accertare la sopravvivenza dei germi nello *yogurt*, hanno contato *Lactobacillus acidophilus* su Maltose MRS Agar e *Bifidobacterium bifidum* su Agar NNLP, supplementato con neomicina, acido nalidixico e paromomicina e incubato in anaerobiosi a +37 °C per 72 ore.

Lankaputhra *e Coll*. (1996) hanno ripetuto le stesse ricerche, utilizzando però un terreno agarizzato contenente salicina allo 0,5%.

Anche Shah (1997) si è interessato di bifidobatteri nel latte fermentato, compilando una rassegna sintetica nella quale vengono posti in evidenza i terreni cromogeni, che incorporano la X-alfa-galattosidasi, attaccata dai bifidobatteri.

Camaschella *e Coll*. (1998) sono tornati all'uso del terreno HDD per contare i batteri lattici termofili e i bifidobatteri. Dopo 3 giorni d'incubazione a +37 °C in anaerobiosi, era possibile stimare i germi lattici vivi nello *yogurt*, differenziando le colonie di *Lactobacillus bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium bifidum*.

Ingham (1999), per l'analisi del latte in polvere, ha modificato due terreni già esistenti e ha conteggiato agevolmente i lattobacilli su mLBS Agar (simile all'MRS Agar), incontrando invece qualche difficoltà con il terreno mBIM (contenente iodoacetato) nella differenziazione dei bifidobatteri.

Aldighieri *e Coll*. (1999), valutando un terreno di coltura per batteri lattici a partire da matrici rappresentate da integratori alimentari, hanno scelto la tecnica di semina in superficie su piastre di HDD Agar.

Asperger *e Coll*. (1999) hanno dato la preferenza per la numerazione dei batteri lattici e dei bifidobatteri nello *yogurt* a un nuovo terreno, l'Oxyrase Anaerobic Agar.

Sull' identificazione dei ceppi si trovano lavori che spaziano dall'uso delle prove biochimiche di fermentazione dei carboidrati (Rogosa, 1959) all'amplificazione del DNA genomico (tecnica PCR), descritta in un protocollo specifico per batteri lattici ed enterococchi da Coccconcelli *e Coll*. (1995).

Il metodo proposto

- Allestimento omogenato
- Esecuzione di diluizioni decimali
- Semina su MRS Agar e M17 Agar
- Incubazione: MRS a 37 °C + 10% di CO_2 x 72 ore; M17 a 37 °C per 48 ore
- Identificazione e conteggio delle colonie di lattobacilli

Materiale richiesto

- Come per la CBT mesofila, ad eccezione di piastre Petri di terreno MRS Agar e di terreno M17 Agar
- Sistema generatore di gas (6% O_2 - 10% CO_2) o buste per microaerofilia, qualora non si disponesse di un termostato a CO_2

Esecuzione

Lattobacilli mesofili

Eseguire il conteggio in piastra applicando uno dei metodi di semina descritti per la carica batterica totale e utilizzando i terreni colturali MRS ed M17.

Porre le piastre di MRS Agar a incubare a 37 °C più 10% CO_2 per 72 ore e quelle di M17 Agar a 37 °C per 48 ore

Tutte le piastre vanno incubate capovolte, tranne che quando seminate seguendo il *Drop Plate Method*.

Lattobacilli termofili

Per la conta dei lattobacilli **termofili** (come nel caso dell'analisi dello *yogurt),* incubare le piastre di MRS Agar a 42°C per 2-3 giorni in atmosfera arricchita con il 10% di CO_2 e le piastre di M17 Agar a 37 °C per 48 ore.

È possibile allestire anche una conta dei ***Lattobacilli psicrofili***, incubando le piastre a 25 °C per 3 giorni in atmosfera arricchita con il 10% di CO_2

Interpretazione

Terreno MRS

Si devono prendere in considerazione le colonie che sviluppano con un diametro di almeno 0,5-1 mm, provviste di margini regolari o frastagliati, che si presentano opache, incolori o biancastre e che possiedono una consistenza omogenea o leggermente granulare. Le colonie con queste caratteristiche devono essere contate come probabili lattobacilli (bastoncini Gram-positivi).

Terreno M17

Sono da prendere in considerazione le colonie piccole, con diametro di 0,2-0,5 mm, biancastre e a margine netto. Queste colonie sono da contare come probabili lattococchi (cocchi Gram-positivi).

La conferma della natura delle colonie potrà essere ottenuta mediante striscio da colorare con Gram su due o più colonie e con la prova della catalasi (da allestire su vetrino). I batteri lattici in genere sono catalasi-negativi.

Nota

È da tenere presente che su entrambi i terreni possono sviluppare contemporaneamente i lattobacilli e i lattococchi, anche se su MRS solitamente prevalgono i bacilli e su M17 prevalgono i cocchi.

I due generi batterici possono essere agevolmente differenziati sulla base delle dimensioni delle colonie (vedi sopra) e, successivamente, ricorrendo all'esame microscopico di strisci colorati con Gram.

Il conteggio dei lattobacilli viene espresso abitualmente con un unico numero, ottenuto sommando le colonie formate da bastoncini Gram-positivi (rilevate su MRS) e le colonie formate da cocchi Gram-positivi (rilevate su M17).

Per lo *yogurt*, è consuetudine esprimere nel risultato la somma (bastoncini più cocchi) equivalente ai "batteri lattici" e specificare, quindi, separatamente il numero dei bastoncini Gram-positivi (lattobacilli, come il *Lactobacillus bulgaricus*) e il numero dei cocchi Gram-positivi (lattococchi, come lo *Streptococcus thermophilus*).

Per il conteggio del *Bifidobacterium bifidum* nello *yogurt,* è necessario ricorrere a un terreno selettivo specifico (Bifidobacterium Medium, BFM), le cui piastre vengono seminate in superficie, in doppio, con 0,01 ml di ciascuna diluizione decimale del campione e incubate in anaerobiosi a 37 °C per 48 ore. I bifidobatteri crescono con colonie di due tipi (piccole e grandi), aventi comunque diametro superiore a 0,5 mm, mentre i lattobacilli e gli enterococchi formano colonie di diametro nettamente inferiore.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

Aldighieri R. *e Coll*., Valutazione di un terreno di coltura per l'identificazione e la conta dei batteri lattici in integratori alimentari e *yogurt*, Ind. Alim. 1999, *38*, 1290

Asperger H. *e Coll*., A comparison study between Oxyrase anaerobic agar plates and conventional anaerobic method for the enumeration of lactic acid and bifidobacteria from fermented milk, Milchwissensch. 1999, *54*, 613-616

Bianchi Salvadori B. *e Coll*., Rapid enzymatic method for biotyping and control of lactic acid bacteria used in production of yogurt and some cheeses, Int. J. Food Micr. 1995, *27*, 253-261

Camaschella P. *e Coll*., Method for differentiated enumeration of mixed cultures of thermophilic lactic acid bacteria and bifidobacteria by using only one culture medium, Le lait 1998, *78*, 46

Cantoni C. *e Coll*., Germi lattici e alterazioni dei prodotti cotti di salumeria, Ind. Alim. 1988, *27*, 445-447

Cocconcelli P.S.*e Coll*., Development of RAPD protocol for typing of strains of lactic acid bacteria and enterococci, Letters in Appl. Micr. 1995, *21*, 376-379

DIAGNOSTIC PASTEUR MANUAL. Microbiology-Immunology. 3rd edition, 1991, 49-50

Hammes W.P. *e Coll*., Starters in the processing of meat products, Meat Sci. 1994, *36*, 155-168

IDF, Masophilic starter cultures. Enumeration of citrate fermenting acid bacteria. Colony count technique at 25 °C, 1987, n° 180

Ingham S., Use of modified Lactobacillus selective medium and Bifidobacterium iodoacetate medium for differntial enumeration of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium spp*. In powdered nutritional products, J. Food Protect. 1999, *62*, 77-80

Kneifel W. *e Coll*., An X-glu based agar medium for the selective enumeration of *Lactobacillus acidophilus* in yogurth-related milk products, Int. Dairy J. 1993, *3*, 277

Lankaputhra W.E.V. *e Coll*., A simple method for selective enumeration of *Lactobacillus acidophilus* in yogurt seupplemented with *L. acidophilus* and *Bifidobacterium spp*., Milchwissensch. 1996, *51*, 446-450

Nobra Y., Blanch A.R. A new selective medium for *Bifidobacterium spp.* (1999) Appl. Environm. Microbiol., *65,* 5173-5176

OXOID MANUAL 8th edition, 1990, 2.185-2.186

Reuter G., Elective and selective media for lactic acid bacteria, Int. J. Food Micr. 1985, *2*, 55-68

Richardson G.H. Standard methods for the examination of dairy products, 15th edition, APHA, Washington, USA, 1985

Rogosa M., An approach to the classification of the lactobacilli, J. appl. Bact. 1959, *22*, 329-340

Shah N.P. *e Coll*., Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in commercial yogurt during refrigerated storage, Int. Dairy J. 1995, *5*, 515-521

Shah N.P., Isolation and enumeration of bifidobacteria in fermented milk products: a review, Milchwissensch. 1997, *52*, 72

Tiecco G. Microbiologia degli alimenti di origine animale, 5a. ed., Edagricole, Bologna, 1992

STAFILOCOCCHI COAGULASI-POSITIVI

Definizione

Cocchi Gram-positivi, immobili, raggruppati in corte catene, anaerobi facoltativi, produttori di pigmento giallo in coltura dopo alcuni giorni a temperatura ambiente. Sono catalasi-positivi, ossidasi-negativi, emolitici, forniti di particolari enzimi (tra cui la coagulasi e la termonucleasi), sensibili alla lisostafina e al furazolidone, resistenti al lisozima e alla bacitracina, con metabolismo ossido-fermentativo sul glucosio, mannitolo-positivi.

Scheda sintetica

Attività patogena	*responsabili di intossicazioni*
Alimenti responsabili	*prodotti di gastronomia e di pasticceria, prodotti pronti per il consumo e conservati non refrigerati*
Temperatura di moltiplicazione	*da 7 a 65 °C con optimum a 20-40 °C*
pH ***di sviluppo***	*4,0- 9,0 con optimum 6,8-7,2*
Attività dell'acqua (Aw) richiesta	*> 0,85*
Fattori d'inibizione	*comuni disinfettanti*
Dose infettante	*tossina preformata nell'alimento*
Tossine prodotte	*diverse*
Sito di moltiplicazione	*naso-faringe, pelle*
Incubazione della malattia	*1-6 h*
Sintomi	*nausea, vomito, crampi addominali, ipotermia*
Indagini di laboratorio	*conteggio del microrganismo nell'alimento sospetto e ricerca delle tossine preformate*

Nota

L'eventuale dimostrazione della presenza del microrganismo nell'alimento (anche a cariche relativamente elevate) non è motivo sufficiente per considerarlo pericoloso. L'unico metodo altamente significativo in caso di intossicazione è la dimostrazione della tossina preformata nell'alimento sospetto.

Alcuni cenni storici

La ricerca esclusivamente mirata agli stafilococchi aurei capaci di coagulare il plasma è giustificata dalle esperienze di numerosi Autori, che hanno dimostrato un'elevata correlazione fra questa proprietà e la produzione di tossine (Chang *e Coll*., 1996; Cantoni, 1997).

Diverse altre proprietà biochimiche degli stafilococchi sono state messe in relazione con l'enteropatogenicità. Ad esempio, il possesso di particolari enzimi (lecitinasi, DNA-asi, termonucleasi) riveste notevole rilevanza dal punto di vista diagnostico, anche se, trattandosi comunque di *test* indiretti di patogenicità, presentano alcune limitazioni.

A dimostrazione del fatto che i *test* indiretti non sono in grado di discriminare sempre gli stafilococchi patogeni da quelli innocui, vengono di seguito citati come esempi i lavori di alcuni Autori:

- Vernozy-Rozand *e Coll*. (1996) hanno rilevato la capacità di produrre enterotossina esibita da alcuni stafilococchi coagulasi-negativi isolati da latte di capra e da formaggi.
- Matos *e Coll*. (1995) sulla parziale capacità degli stafilococchi isolati da bovini a mostrare *in vitro* l'attività lecitinasica (18,5% dei ceppi).

Il metodo proposto

- Allestimento omogenato
- Esecuzione di diluizioni decimali
- Semina su Baird-Parker Agar
- Incubazione a 37 °C x 48 ore
- Identificazione presuntiva e conteggio delle colonie sospette di stafilococchi coagulasi-positivi
- Conferma mediante trapianto di colonie sospette in BHI Broth (incubazione a 37 °C x 24 ore)
- Colorazione di Gram
- *Test* della coagulasi
- Eventuali prove biochimiche

Materiale richiesto

- Come per la CBT mesofila, a eccezione di piastre Petri di terreno Baird-Parker Agar
- Provette di terreno Brain Heart Infusion Broth
- Plasma di coniglio con EDTA per *test* della coagulasi
- Provette sterili 10 x 120 mm
- Materiale per l'esecuzione di *test* biochimici necessari per l'identificazione di specie degli stafilococchi.

Esecuzione

Eseguire il conteggio in piastra, applicando uno dei metodi descritti per la carica batterica totale e utilizzando come terreno colturale il Baird Parker Agar.

Porre le piastre a incubare a 37 °C per 48 ore (capovolte, tranne che per il *Drop Plate Method*).

Interpretazione

Identificare come colonie di *S. aureus* quelle che si presentano di colore nero, con diametro di 1-1,5 mm, a superficie liscia e lucente, con margini regolari e che appaiono circondte da un alone chiaro.

Confermare l'identificazione mediante trapianto di un numero significativo di colonie sospette in brodo BHI (incubazione a 37° C per 24 ore) e successiva colorazione di Gram.

Dai trapianti positivi, eseguire il *test* della coagulasi, per il quale si fa riferimento alla metodica FDA: 0,5 ml di plasma di coniglio con EDTA + 0,2-0,3 ml di brodocoltura di 24 ore in BHI; dopo incubazione a +37 °C per 4-6 ore, l'esito positivo è testimoniato dalla formazione di un coagulo stabile e completo.

Applicando la modifica di Chang *e Coll*. (1996), al tempo di lettura della prova (4 ore invece delle 6 previste dal protocollo FDA) sono possibili esiti in giornata con una sensibilità pari al 97,7%.

In alternativa alla prova della coagulasi legata, è stato raccomandato il *test* della termonucleasi (o DNA-asi termostabile), illustrato da Rosec *e Coll*., 1997. Le colonie sospette vengono trapiantate in brodo BHI, da incubare a +37 °C per 24 ore. Dopo riscaldamento in bagnomaria a 100 °C per 15 minuti, 0,1 ml di brodocoltura vengono trasferiti su un dischetto sterile di carta bibula di diametro 12,5 mm. Il dischetto, assieme a un opportuno controllo positivo, va collocato, con una pinza sterile, sulla superficie di una piastra di Toluidin Blue Agar. Se il ceppo possiede l'enzima termonucleasi, dopo incubazione a +37 °C per 8 ore, oppure a +55 °C per 4 ore, il terreno attorno al dischetto vira dall'azzurro-blu al rosa-fucsia.

In confronto alla coagulasi, la sensibilità di questo metodo sarebbe del 99,5% e la specificità dell'86,4% (Chang *e Coll*., 1995). Parallelamente si può completare l'identificazione mediante allestimento di appropriati *test* biochimici.

L'identificazione delle colonie di *S. aureus* può essere fatta, in alternativa alle prove biochimiche, con un'agglutinazione rapida su vetrino che riveli la presenza della coagulasi libera (*clumping factor*). I *test* disponibili appartengono, attualmente, a tre generazioni, caratterizzate dai seguenti meccanismi di funzionamento (Chang *e Coll*., 1995):

- il *clumping factor* agglutina globuli rossi di pecora sensibilizzati con fibrinogeno (esempio, Staphyslide® bio-Merieux);
- il *clumping factor* e la proteina A dello *S. aureus* agglutinano, rispettivamente, il fibrinogeno e le immunoglobuline G adesi su particelle di lattice (esempio, Pastorex® Sanofi);
- oltre a fibrinogeno e immunoglobuline anti-proteina A, le particelle di lattice trasportano anticorpi monoclonali specifici per l'antigene capsulare 18 di *S. aureus*. Questi anticorpi sono efficaci anche nei riguardi di ceppi meticillina-resistenti (Croize *e Coll*., 1993), che, di solito, non rispondono ai primi due meccanismi (esempio, Staphaureus Plus® Remel, Slidex Staph Kit® bio-Merieux).

Calcolare il numero di stafilococchi coagulasi-positivi per unità di misura del campione in maniera analoga alla conta batterica totale mesofila.

Caratteristiche biochimiche utili per la differenziazione delle principali specie del genere *Staphylococcus* e per l'identificazione del genere *Micrococcus* (comportamento prevalente)

	Catalasi	Riduzione nitrati	O/F *test* glucosio	Emolisi	Coagulasi	Mannite
S. aureus	+	+	F	+	+	+
S. epidermidis	+	+	F	-	-	-
Micrococcus spp.	+	d[1]	O (-)	-	-	d[1]

[1] d = risultato variabile

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

Cantoni C., Comportamento e identificazione di stafilococchi coagulasi positivi da alimenti ed altri substrati, Ind. Alim. 1997, 36, 363

Croize J. *e Coll*., Improved identification of *Staphylococcus aureus* using a new agglutination test. Results of an international study, APMIS 1993, 101, 487-491

Chang T.C. *e Coll*., Evaluation of coagulase activity and protein A production for the identification of *Staphylococcus aureus*, J. Food Protect. 1995, 58, 858-862

Chang T.C. *e Coll*., Modification of the conventional procedure for the test of Staphylococcal coagulase, J. Food Protect. 1996, 59, 197-198

DIVISION OF MICROBIOLOGY - CENTER FOR FOOD SAFETY AND APPLIED NUTRITION - U.S. FDA. Bacteriological Analytical Manual, 6th edition, Association of Official Analytical Chemists, Arlington, 1984, 14.01-14.05

ICMSF. Microrganisms in Food 1. Their significance and methods of enumeration. 2nd edition, University of Toronto Press, Toronto, 1988, 218-228

Matos J.E.S. *e Coll*., Lecithinase reaction of *Staphylococcus aureus* strains of different origin on Baird-Parker medium, Letters in Appl. Micr. 1995, *21*, 334-335

Personne P.M. *e Coll*., Comparative performance of six agglutination kits assessed by using typical and atypical strains of *Staphylococcus aureus*, J. Clin. Microbiol. 1997, *35*, 1138-1140

Rosec J.P. *e Coll.*, Enterotoxin production by Staphylococci isolated from foods in France, Int. J. Food Protect. 1997, *35*, 213-221
Vernozy-Rozand C. *e Coll.*, Enterotoxin production by coagulase-negative Staphylococci isolated from goat milk and cheese, Int. J. Food Micr. 1996, *30*, 271-280

MICROCOCCHI

Definizione

Cocchi Gram-positivi, immobili, aerobi, catalasi e ossidasi positivi, indolo-negativi, alotolleranti (10-15% NaCl), resistenti alla lisostafina e al furazolidone, sensibili al lisozima e alla bacitracina, con metabolismo ossidativo sul glucosio.

Questi microrganismi hanno una temperatura ottimale di sviluppo intorno ai 25-30 °C, non sono patogeni, possono causare (se presenti in elevato numero) alterazioni su carni e insaccati (viscosità superficiale).

Alcuni cenni storici

La nona edizione del *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* riporta, in ambito alimentare, i generi *Micrococcus*, *Leuconostoc* e *Pediococcus*, reperibili soprattutto nel latte, nelle carni, nei dolci.

Leuconostoc è un cocco Gram-positivo, sferico o allungato. È anaerobio facoltativo, non sporigeno, immobile e nei terreni senza saccarosio cresce lentamente. E' negativo per catalasi, nitrati, indolo, arginina, emolisi. Non è patogeno e può essere quantificato per conteggio su MSE Agar (terreno di Mayeux). Dopo incubazione per 4 giorni a temperatura ambiente, le colonie di *L. dextranicum* appaiono mucose e gelatinose, con diametro di 1-5 mm, mentre quelle di *L. citrovorum* e *L. kefir* sono incolori e più piccole (0,5-2 mm).

Pediococcus è un cocco Gram-positivo sferico disposto a gruppi di quattro (tetradi). Anaerobio facoltativo, immobile, catalasi-negativo, fermenta il glucosio senza gas. Cresce fra +25 e +40 °C e non è patogeno. Non esistono terreni selettivi particolari.

Il metodo proposto

- Allestimento omogenato
- Esecuzione di diluizioni decimali
- Semina su Mannitol Salt Agar
- Incubazione a 37 °C x 36 ore, oppure a 32 °C per 3 giorni
- Identificazione e conteggio delle colonie di micrococchi

Materiale richiesto

Come per la conta batterica totale mesofila, ad eccezione di piastre Petri di terreno Mannitol Salt Agar.

Esecuzione

Eseguire un conteggio in piastra applicando uno dei metodi di semina descritti per la carica batterica totale e utilizzando come terreno colturale il Mannitol Salt Agar.

Porre le piastre a incubare a 37 °C per 36 ore o a 32 °C per 3 giorni (capovolte, tranne che per il *Drop Plate Method*).

Interpretazione

Identificare come colonie di micrococchi quelle che si presentano con diametro di 1-2 mm e che appaiono circondate da un alone rossastro o rosa.

Calcolare il numero di micrococchi per unità di misura del campione in esame in maniera analoga alla carica batterica totale mesofila.

Caratteristiche biochimiche utili per l'identificazione del genere *Micrococcus* e per la differenziazione delle principali specie del genere *Staphylococcus* (comportamento prevalente)

	Catalasi	Riduzione nitrati	O/F *test* glucosio	Emolisi	Coagulasi	Mannite
S. aureus	+	+	F	+	+	+
S. epidermidis	+	+	F	-	-	-
Micrococcus spp.	+	d[1]	O (-)	-	-	d[1]

[1] d = risultato variabile

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

Comi G., Citterio B., Manzano M., Cantoni C., De Bertoldi M., Evaluation and characterisation of Micrococcaceae strains in Italian dry fermened sausages, *Fleischwirtschaft,* 1992, 72, 1679-1683

Hayes, P.R., Food Microbiology and hygiene, Elsevier Applied Science Publishers, London, 1985, 157-158

ANAEROBI SOLFITO-RIDUTTORI (SPORE)

Definizione

Bacilli Gram-negativi, anaerobi sporigeni, capaci di ridurre i solfiti a solfuri con sviluppo di pigmento nero. Sono batteri patogeni facoltativi, spesso responsabili di alterazioni putrefattive. Il genere principale è rappresentato da *Clostridium.*

Alcuni cenni storici

È noto che la dimostrazione degli anaerobi sporulati presenta un grado di difficoltà superiore alla determinazione delle più comuni specie aerobie, sia per la natura intrinseca dei germi, quasi sempre strettamente associati a streptococchi e altre specie saprofite, che per l'insufficiente specificità dei terreni di coltura disponibili. I Ricercatori hanno cercato di ovviare a questi inconvenienti proponendo via via nuove formulazioni di terreni colturali e cercando di applicare agli anaerobi alcuni metodi innovativi già sperimentati con successo sulla flora aerobia.

La gamma di terreni disponibili era già di notevoli proporzioni quando Eisgruber *e Coll*., nel 1991, pubblicarono una panoramica sui prodotti in commercio. Essi proposero, al contempo, una nuova formula nel Sulphite-Cycloserine-Agar (SCA), adatta per la ricerca dei clostridi mesofili solfito-riduttori soprattutto nelle carni e nei prodotti di carne.

Già nel 1969, in Germania era stato introdotto da Levetzow un brodo d'arricchimento molto interessante, denominato Sulphite-Azid-Thioglicolate (SAT). Questo terreno in provetta, adottato nella metodica ufficiale tedesca per la ricerca dei clostridi nell'esame batteriologico delle carni degli animali macellati d'urgenza (BU), veniva seminato direttamente con un frammento di muscolo e, dopo incubazione per una notte a +37 °C, se erano presenti germi solfito-riduttori si colorava di nero.

Fra i contributi scientifici più interessanti, si ricorda la metodica di Weenk *e Coll*. (1995), che hanno messo a punto un terreno, chiamato DCA, contenente solfito, sul quale vengono seminati i campioni dopo pasteurizzazione a +80 °C per 10 minuti. Le colonie tipiche, che si presentano di colore nero, possono essere confermate, secondo questi Autori, con tre prove:

- mancata crescita in aerobiosi;
- sensibilità al metronidazolo;
- osservazione al microscopio delle spore, dopo trapianto su un terreno che facilita la sporulazione, lo Schaedler Agar arricchito di ioni manganese e incubato per 7 giorni a +30 °C.

Broda *e Coll*. (1996) hanno riproposto un terreno selettivo in piastra per il conteggio degli anaerobi psicrofili, cioè tolleranti il freddo. Si tratta del Reinforced Clostridial Medium (RCM), che è servito a questi Autori per studiare l'alterazione chiamata "*blown pack*", possibile nelle carni rosse congelate sotto vuoto e nei mangimi per cani confezionati sotto film plastico impermeabile ai gas.

Dromigny *e Coll*. (1997) hanno invece formulato un terreno liquido per anaerobi denominato FTM, da impiegare con le apparecchiature per la misurazione della conduttanza.

Lodi *e Coll*. (1997) descrivono la ricerca degli sporigeni nel latte di massa con il metodo di Weizirl, consistente nella semina di tre diluizioni del campione in un brodo. Le provette, dopo pasteurizzazione a +80 °C, vengono incubate in anaerobiosi grazie a uno strato di paraffina posto sopra la coltura. Dal numero di provette che mostrano sviluppo di gas, si risale alla quantità di sporigeni anaerobi col metodo MPN (*Most Probable Number*).

Il metodo proposto

- Allestimento omogenato
- Pasteurizzazione a 80 °C per 10 minuti
- Esecuzione di diluizioni decimali
- Semina su TSC Agar
- Incubazione a 37 °C x 48 ore (in anaerobiosi)
- Identificazione presuntiva e conteggio delle colonie di anaerobi solfito-riduttori
- Conferma mediante trapianto di colonie sospette in Brodo tioglicolato senza indicatore e glucosio (incubazione a 37 °C x 24 ore)
- Prove biochimiche di conferma

Materiale richiesto

- Come per la CBT mesofila, a eccezione di piastre Petri di terreno TSC agar (contenente cicloserina e privo di emulsione di tuorlo d'uovo)
- Dovrà inoltre essere prevista una sufficiente quantità di terreno (da mantenere fuso alla temperatura di circa 50 °C), necessario per la copertura delle piastre seminate *(overlay).*
- Sistemi generatori di gas per anaerobiosi (giara fino a 10 piastre, oppure buste fino a 2 piastre).
- Provette di terreno Brodo tioglicolato senza indicatore e senza glucosio
- Materiale per l'esecuzione di *test* biochimici necessari per l'identificazione di specie degli anaerobi solfito-ridutori.

Esecuzione

Riscaldare in bagnomaria a 80 °C per 10 minuti l'estratto del campione omogeneizzato.

Al termine della pasteurizzazione, raffreddare rapidamente sotto acqua corrente la provetta contenente l'estratto.

Seminare le opportune diluizioni nelle piastre di TSC agar con il metodo Pour Plate o Surface Spread Plate e ricoprire le piastre con 7 ml circa di terreno TSC mantenuto fuso a circa 50 °C in bagnomaria *(overlay).*

Dopo solidificazione dello strato superficiale del terreno, porre le piastre capovolte a incubare in anaerobiosi a 37 °C per 48 ore.

Interpretazione

Identificare come colonie di anaerobi solfito-riduttori quelle che appaiono di colore nero, di diametro di 3-7 mm, a margini regolari

Confermare l'identificazioe mediante il trapianto di una o più colonie in altrettante provette di terreno Brodo tioglicolato senza indicatore e senza glucosio, da incubare a 37 °C per 24 ore.

Eseguire una colorazione di Gram, seguita dall'esecuzione di appropriati *test* biochimici.

Calcolare il numero degli anaerobi solfito-riduttori (spore) per unità di misura del campione in esame in maniera analoga alla conta batterica totale mesofila.

Caratteristiche biochimiche utili per la differenziazione delle principali specie del genere *Clostridium* (comportamento prevalente)

	Nitrati	Indolo	Glucosio	Maltosio	Lattosio	Salicina	Saccarosio
Cl. perfringens	-	+	+	+	+	d[1]	+
Cl. septicum	+	-	+	+	+	+	-
Cl. feseri	+	-	+	+	+	+	+
Cl. novyi A	-	-	+	+	-	-	-
Cl. novyi B	+	-	+	d[1]	-	-	-
Cl. hemolyticum	-	+	+	-	-	-	-
Cl. sordellii	-	+	+	+	-	-	-
Cl. bifermentans	-	+	+	+	-	+	-
Cl. botulinum	-	+	+	+	-	d[1]	d[1]
Cl. tetani	-	+	-	-	-	-	-
Cl. sporogenes	-	-		+	-	d[1]	d[1]
Cl. histolyticum	-	-	-	-	-	-	-

[1] d = risultato variabile

Nota

La ricerca delle spore di anaerobi solfito-riduttori (o Clostridi solfito-riduttori) nelle acque e nelle acque minerali, da eseguire sulle quantità prescritte dalla normativa vigente (riportata nel Capitolo 8 - Norme i cui prodotti non sono contemplati dal Regolamento (CE) 2073/2005), si effettua mediante la tecnica illustrata nel Capitolo 7 - Controlli sugli ambienti di lavorazione degli alimenti - Esame dell'acqua.

Nota applicativa

Questa metodica consente di numerare le forme sporulate degli anaerobi solfito-riduttori, prevalentemente rappresentate da clostridi, mentre non affronta il conteggio delle forme vegetative, che vengono eliminate con il trattamento termico.

Poiché negli alimenti è spesso prevalente la flora inquinante, sarebbe difficoltoso, senza il trattamento di pasteurizzazione, individuare i clostridi. Per questo, si preferisce comunque il riscaldamento a 80 °C per 10 minuti (Weenk *e Coll*., 1995; Broda *e Coll*., 1996).

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

Broda D.M. *e Coll*., Psychrotrophic *Clostridium spp*. associated with "blown pack" spoilage of chilled vacuum-packed red meats and dog rolls in gas-impermeable plastic casings, Int. J. Food Micr. 1996, *29*, 235

Dromigny E. *e Coll*., New media for detection and counting of *Clostridia* in foods, Letters in Appl. Micr. 1997, *24*, 19-22

DIVISION OF MICROBIOLOGY - CENTER FOR FOOD SAFETY AND APPLIED NUTRITION - U.S. FDA, Bacteriological analytical manual. 6th edition, Association of Official Analytical Chemists, Arlington, 1984, 17.01-17.10

Eisgruber H. *e Coll*., SCA – ein Selektivnahrmedium zum Nachweis mesophiler sulphitreduzierenden Clostridien in Lebensmitteln, speziell fur Fleisch und Fleischerzeugnissen, Arch. Lebens. 1991, *42*, 101-132

ICMSF, Microrganisms in foods 1. Their significance and methods of enumeration, 2nd edition, University of Toronto Press, Toronto, 1988, 264-273
Levetzow R., Uber die Notwendigkeit den Nachweis der Clostridien im Rahmen der BU neu zu regeln, Schlacht Viehof Zeitung 1969, *7*, 264
Lodi R. *e Coll*., Determinazione del contenuto di anaerobi sporigeni in latte e prodotti del settore caseario, Il latte 1997, *22*, 196-205
Weenk G.H. *e Coll*., Modified methods for the enumeration of spores of mesophilic *Clostridium* species in dried foods, Int. J. Food Micr. 1995, *27*, 185-200

CLOSTRIDIUM PERFRINGENS

Definizione

Bastoncini Gram-positivi, anaerobi sporigeni capsulati, immobili, emolitici (doppia emolisi su Agar sangue). Le spore, sub-terminali, sono raramente visibili, mentre, spesso, sono riconoscibili le estremità squadrate dei bacilli.

Per la particolare natura dell'intossicazione da *C. perfringens*, viene adottata la procedura sotto riportata, che prevede la ricerca nel campione sia delle cellule vegetative che delle spore.

Scheda sintetica

Attività patogena	*responsabile di intossicazioni*
Alimenti responsabili	*carni, roast-beef, arrosti arrotolati, verdure, spezie, cibi disidratati, salse, preparazioni gastronomiche*
Temperatura di moltiplicazione	*da 15 a 50 °C con optimum a 43-47 °C*
pH ***di sviluppo***	*5,0-9,0 con optimum 7,2*
Attività dell'acqua (Aw) richiesta	*> 0,93*
Fattori d'inibizione	*comuni disinfettanti, cottura adeguata*
Dose infettante	*10^8 forme vegetative*
Tossine prodotte	*diverse*
Sito di moltiplicazione	*intestino tenue*
Incubazione della malattia	*12-24 h*
Sintomi	*diarrea, dolori addominali*
Indagini di laboratorio	*microrganismo nell'alimento sospetto e nelle feci dell'ammalato, ricerca tossina nelle feci*

Nota

Secondo Eisgruber (1996), la diagnosi di laboratorio conferma l'avvenuta intossicazione da *Clostridium perfringens* se:

- l'alimento sospettato contiene più di 100.000 clostridi per grammo;
- nelle feci dell'ammalato si trovano più di 1.000.000 di clostridi dello stesso sierotipo;
- i ceppi isolati da alimento e dalle feci vengono sierotipizzati e coincidono;
- la maggior parte dei ceppi isolati dalle feci ed esaminati appartengono allo stesso sierotipo.

Alcuni cenni storici

Come per gli altri anaerobi solfito-riduttori, anche per *Clostridium perfringens* i Batteriologi hanno cercato soluzioni migliorative riguardanti l'isolamento, il conteggio e l'identificazione del germe. Alcuni lavori sull'argomento sono molto interessanti e risalgono al periodo 1970-1990.

Bisicchia e Donisi (1979) si sono impegnati in campo umano nell'identificazione degli anaerobi, tra cui *C. perfingens*, consapevoli delle difficoltà incontrate nel riconoscimento delle specie, sia con i metodi in provetta, allora predominanti, che con micrometodi da poco sorti.

Adams *e Coll*. (1980) hanno trovato superiore il conteggio in piastra rispetto alla conta in brodo col metodo MPN.

Mead (1985) ha pubblicato una rassegna dei terreni per clostridi, giudicando migliori, alla fine, quelli seminati in profondità e, in particolare, quelli in cui si sovrappone un secondo

strato di terreno (*overlay*).

Barnes (1985) ha migliorato la resa dei terreni solidi facendoli asciugare, prima delle semine, in cappa a flusso laminare verticale per 45 minuti.

Eisgruber *e Coll*. (1987) hanno definitivamente messo ordine nelle tecniche per l'identificazione biochimica dei clostridi.

Baumgart *e Coll*. (1990) seminavano le diluizioni del campione su piastre di vari terreni selettivi per clostridi (PSP, TSC, SCA), addizionate con saccarosio e fenolftaleina difosfato. Dopo incubazione a +44 °C, il riconoscimento presuntivo delle colonie attribuibili a *C. perfringens* avveniva posizionando sotto al coperchio un dischetto di carta imbevuto con NaOH, che provocava il viraggio al rosso delle colonie positive alla fosfatasi alcalina.

Schalch *e Coll*.(1995) hanno ritenuto, invece, molto valida per l'identificazione di *C. perfringens* la reazione della fosfatasi acida.

Brunner *e Coll*. (1996) adottavano una tecnica d'anaerobiosi singolare, versando il campione, miscelato con il terreno fuso Solfito-Azide-Cicloserina, in un coperchio di piastra Petri. Prima della solidificazione, facevano aderire il fondo della stessa piastra alla superficie del terreno seminato, creando così la premessa all'incubazione in un comune termostato a +37 °C per 48 ore.

Decaudin *e Coll*. (1996) e anche Shih *e Coll*. (1996), sapendo che, raramente, *C. perfringens* mostra le spore, hanno riscaldato a +75 °C le colture in Brodo Tioglicolato e seminato il terreno di Duncan e Strong, favorente la sporulazione *in vitro*.

Nel 2000 Eisgruber *e Coll*. hanno comparato quattro fra i metodi di *routine* più usati in Europa per la ricerca di *C. perfringens* negli alimenti e segnalato pregi e difetti di ciascuno.

Sfruttando l'esperienza sui terreni cromogenici e fluorogenici di recente introduzione, alcuni Autori (Adckock *e Coll*., 2001) hanno proposto un metodo alternativo per l'identificazione rapida di *Clostridium perfringens*, basato sul possesso di due enzimi. Si tratta della fosfatasi acida (MUP), che metabolizza il 4-metil-umbelliferil-fosfato, producendo il 4-metil-umbelliferone, fluorescente in luce ultravioletta, e della β-galattosidasi, che trasforma l'ONPG in ortonitrofenolo giallo. In pratica, si prendono in considerazione alcune colonie nere sospette, sviluppate dopo 24 ore in anaerobiosi a +37 °C su Tryptose Sulphite Cycloserine Agar (TSC), che vengono trasferite singolarmente in provette contenenti 100 microlitri di reagente MUP/ONPG. Dopo aggiunta di olio di vaselina sterile, le provette, incubate a +37 °C per 4 ore, vengono considerate positive se c'è fluorescenza (MUP+) e viraggio al giallo (ONPG+). Il reagente MUP/ONPG, che contiene (in grammi/litro) ammonio solfato 5 g, sodio cloruro 5 g, tampone HEPES sale sodico 5,3 g, tampone HEPES acido organico 6,9 g, ONPG 1 g, MUP 0,15 g, acqua distillata 1 l, viene sterilizzato per filtrazione ed è conservabile in congelatore per 3 mesi. La sensibilità del *test* è del 99,3%, la specificità del 93,3%. Questo *test* elimina la *sub*-coltura su Agar sangue e le successive reazioni biochimiche (tutte positive nel caso di *C. perfringens*) di riduzione dei nitrati, mobilità, fermentazione del lattosio, liquefazione della gelatina. Poiché l'analisi occupa 24 + 4 ore, il risparmio sui tempi di diagnosi equivale a circa 48 ore. La metodica è applicabile anche alla ricerca delle spore di *C. perfringens* nelle acque mediante filtrazione del campione (pre-trattato a +70 °C per 20 minuti per eliminare le forme vegetative) e incubazione della membrana su TSC. Come è noto, la ricerca delle spore costituisce un metodo indiretto molto vantaggioso per verificare nelle acque la presenza eventuale di virus, *Giardia* e *Cryptosporidium.*

Il metodo proposto

- Allestimento omogenato
- Suddivisione in due aliquote
- Pasteurizzazione di un'aliquota a 80 °C per 10 minuti

- Esecuzione di diluizioni decimali da entrambe le aliquote
- Semina su TSC agar + emulsione di tuorlo d'uovo
- Incubazione a 37 °C x 48 ore (in anaerobiosi)
- Identificazione presuntiva e conteggio delle colonie sospette
- Conferma mediante trapianto in Brodo tioglicolato senza indicatore e senza glucosio oppure in CMM (incubazione a 37 °C x 24 ore)
- Prove biochimiche di conferma

Materiale richiesto

- Come per la CBT mesofila, a eccezione di piastre Petri di terreno TSC agar, contenente cicloserina e addizionato con l'8% di emulsione di tuorlo d'uovo al 50%
- Dovrà inoltre essere prevista una sufficiente quantità di terreno TSC privo di emulsione di tuorlo d'uovo, da mantenere fuso alla temperatura di circa 50 °C, necessario per la copertura delle piastre seminate *(overlay).*
- Sistemi generatori di gas per anaerobiosi (giara fino a 10 piastre, oppure buste fino a 2 piastre).
- Provette di terreno Brodo tioglicolato senza indicatore e senza glucosio, oppure provette di brodo CMM
- Provette di terreno Litmus Milk
- Piastre di agar sangue, preparate con sangue di montone defibrinato al 5%
- Materiale per l'esecuzione di *test* biochimici necessari per l'identificazione di *Clostridium perfringens*

Esecuzione

Dopo preparazione dell'omogenato, dispensarne due aliquote equivalenti in altrettante provette.

La prima provetta è destinata al conteggio delle forme vegetative di *C. perfringens* e, pertanto, non deve essere sottoposta a trattamento termico.

La seconda provetta è destinata al conteggio delle spore e va riscaldata in bagnomaria a 80 °C x 10 minuti e, quindi, prontamente raffreddata sotto acqua corrente.

Dopo l'allestimento delle diluizioni decimali da entrambe le provette (non riscaldata e riscaldata), si esegue una conta batterica in piastra, applicando il metodo Pour Plate oppure Surface Spread Plate e utilizzando il terreno TSC contenente cicloserina + 8% di emulsione di tuorlo d'uovo.

Prima dell'incubazione, ricoprire la superficie delle piastre seminate con 7 ml circa di terreno TSC contenente cicloserina (ma senza emulsione di tuorlo d'uovo) mantenuto fuso in bagnomaria a circa 50 °C.

Dopo solidificazione dello strato superficiale di terreno, incubare le piastre capovolte a 37 °C per 48 ore in anaerobiosi.

Interpretazione

Identificare come probabili colonie di *C. perfringens* quelle che appaiono di colore nero, con diametro di 3-7 mm, a margini regolari e circondate da un alone chiaro, provocato dall'azione dell'enzima lecitinasi sull'uovo contenuto nel terreno.

Confermare l'identificazione presuntiva mediante trapianto di una o più colonie sospette in altrettante provette di terreno Brodo tioglicolato senza indicatore e senza glucosio, oppure in provette di brodo CMM.

Dalle provette, incubate in termostato a 37 °C per 24 ore, allestire degli strisci da colorare

con Gram e trapiantare su Agar sangue (per il *test Reverse CAMP*) e in provette di Litmus Milk, da incubare a 37 °C per 24-48 ore, osservando l'eventuale comparsa della fermentazione tempestosa del latte.

Ulteriori prove biochimiche di conferma possono essere seminate a partire dalle provette di Brodo tioglicolato senza indicatore e senza glucosio.

Calcolare separatamente il numero di forme vegetative e il numero di spore di *C. perfringens* per unità di misura del campione in esame in maniera analoga alla conta batterica totale mesofila.

Caratteristiche biochimiche utili per la differenziazione delle principali specie del genere *Clostridium* (comportamento prevalente)

	Nitrati	Indolo	Glucosio	Maltosio	Lattosio	Salicina	Saccarosio
C. perfringens	-	+	+	+	+	d[1]	+
C. septicum	+	-	+	+	+	+	-
C. feseri	+	-	+	+	+	+	+
C. novyi A	-	-	+	+	-	-	-
C. novyi B	+	-	+	d[1]	-	-	-
C. hemolyticum	-	+	+	-	-	-	-
C. sordellii	-	+	+	+	-	-	-
C. bifermentans	-	+	+	+	-	+	-
C. botulinum	-	+	+	+	-	d[1]	d[1]
C. tetani	-	+	-	-	-	-	-
C. sporogenes	-	-		+	-	d[1]	d[1]
C. histolyticum	-	-	-	-	-	-	-

[1] d = risultato variabile

Allestimento del test Reverse CAMP

Seminare lungo il diametro di una piastra di Agar sangue un'ansata di brodocoltura di *Streptococcus agalactiae* (sviluppato a 37 °C x 24 ore). Perpendicolarmente, strisciare, alla distanza di circa 2-3 mm, un'ansata da ciascuna delle brodocolture in esame.

Sulla stessa piastra di Agar sangue possono trovare posto fino a 5 strisci di brodocolture sospette, più un ceppo di controllo positivo di *C. perfringens.*

Incubare la piastra di Agar sangue capovolta in anaerobiosi a 37 °C per 24 ore. Incubazioni prolungate possono dare luogo a falsi risultati positivi.

In caso positivo, tra la crescita di *S. agalactiae* e quella del sospetto *C. perfringens* si forma una zona di emolisi chiara e completa a forma di punta di freccia rovesciata.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

Adams B.W. *e Coll.*, Comparison of media and methods for counting *C. perfringens* in poultry meat and further processed products, J. Hyug. Camb. 1980, *84*, 151

Adcock P.W., Saint C.P., Rapid confirmation of *Clostridium perfringens* by using chromogenic and fluorogenic substrates, Applied and Environmental Microbiology 2001, *67*, 4382-4384

Barnes E.M., Isolation methods for anaerobes in foods, Int. J. Food Micr. 1985, *2*, 81

Baumgart J *e Coll.*, Schneller und direkter Nachweis von *Clostridium perfringens*, Fleischwirtsch. 1990, *70*, 1010

Bentler W., Fleischwirtsch. 1981, *61*, 1686-1688
Bisicchia R. *e Coll*., Identificazione dei batteri anaerobi: confronto fra macrometodi e micrometodi, Biologi Italiani 1979, *9*, 21
Brunner B. *e Coll*., Uberprufung des Deckelgussverfahrens als Methode zur Isolierung von *Clostridium perfringens* aus Lebensmitteln, Arch. Lebens. 1996, *47*, 129-152
Decaudin M. *e Coll*., A comparative study on the conditions of growth and sporulation of three strains of *Clostridium perfringens* type A, Can. J. Microbiol. 1996, *42*, 298-304
DIVISION OF MICROBIOLOGY - CENTER FOR FOOD SAFETY AND APPLIED NUTRITION - U.S. FDA Bacteriological analytical manual. 6th edition, Association of Official Analytical Chemists, Arlington, 1984, 17.01-17.10
Eisgruber H. *e Coll*., Einsatzmoglischkeiten einfacher und zeitsparender Verhfahren zur orientierenden Identifizierung wichtiger Clostridien-species aus Lebensmitteln, Arch. Lebens. 1987, *38*, 121
Eisgruber H., Zur Lebensmittelhygienischen Bedeutung von *Clostridium perfringens*, Arch. Lebens. 1996, *47*, 69
Eisgruber H. *e Coll*., Comparison of four routine methods for the confirmation of *Clostridium perfringens* in food, Int. J. Food Micr. 2000, *57*, 135-140
Mead G.C., Selective and differential media for *Clostridium perfringens*, Int. J. Food Micr. 1985, *2*, 89
Mpamugo O. *e Coll*., Enterotoxigenic *Clostridium perfringens* as a cause of sporadic cases of diarrhoea, J. Med. Microbiol. 1995, 43, 442-445
Shih N.J. *e Coll*., Sporulation promoting ability of *Clostridium perfringens* culture fluids, Appl. Environm. Microbiol. 1996, *62*, 1441-1443
Schalch B. *e Coll*., Einsatz der Impedanz-Splitting-Methode zum quantitativen Nachweis von *Clostridium perfringens* in Hackfleisch, Fleischwirtsch. 1995, *75*, 1018

BACILLUS CEREUS

Definizione

Bastoncini Gram-positivi di notevoli dimensioni (3-5 µm), con spore ovali centrali o subterminali, mobili, aerobi o anaerobi facoltativi. In coltura, si può confondere con altri bacilli (ad esempio, *B. anthracis*).

Scheda sintetica

Attività patogena	*causa una sindrome emetica e una sindrome diarroica*
Alimenti responsabili	*alimenti precotti, non refrigerati e riscaldati inadeguatamente*
Temperatura di moltiplicazione	*da 4 a 50 °C con optimum a 28-35° C*
pH ***di sviluppo***	*4,3-9,3 con optimum 5*
Attività dell'acqua (Aw) richiesta	*> 0,91*
Fattori d'inibizione	*comuni disinfettanti, cottura adeguata*
Dose infettante	*ritenuta tra 10^4 e 10^7*
Tossine prodotte	*emetica preformata nell'alimento e diarroica prodotta nell'intestino tenue*
Sito di moltiplicazione	*mucosa intestinale*
Incubazione della malattia	*12-24 h*
Sintomi	*vomito, diarrea, dolori addominali*
Indagini di laboratorio	*conta del microrganismo nell'alimento sospetto e delle spore nelle feci dell' ammalato*

Nota

Nelle intossicazioni da tossina emetica si possono trovare nelle feci cariche fino a 10^9 spore di *B. cereus* per grammo, mentre nei casi di tossina diarroica si possono trovare nelle feci cariche modeste.

Alcuni cenni storici

La messa a punto di terreni selettivi adatti all'isolamento dei bacilli aerobi Gram-positivi ha creato non poche difficoltà. Si conoscono più terreni selettivi, oltre al terreno di Mossel. Tra gli altri, Meira *e Coll*. (1995) hanno studiato un nuovo terreno chiamato VRM, da incubare a +33 °C per 18-24 ore, sul quale *Bacillus cereus* cresce con colonie di 3-6 mm di diametro, giallastre e con un centro di colore più intenso, circondate da un alone rosa pallido di precipitato, dovuto all'azione sulla lecitina.

Anche l'identificazione dei bacilli ha fatto nascere parecchi schemi (Encinas *e Coll*., 1996; Von Graevenitz *e Coll*., 1996; Pecoraro *e Coll*., 2002).

Jackson e *Coll*. (1995) si sono occupati della differenziazione fra *B. cereus* e *B thuringiensis*, proponendo la colorazione dei cristalli parasporali.

Fermanian *e Coll*. (2000) hanno cercato di migliorare la prova dell'emolisi, seminando i ceppi su Agar sangue di pecora contenente 1-2 mM di EDTA e l'8% di siero bovino e leggendo la reazione dopo incubazione a +27 °C per 4 ore.

Per il riconoscimento di *B. anthracis*, Phillips *e Coll*. (1989) si sono affidati all'immunofluorescenza e al metodo ELISA. Sastry *e Coll*. (2003) hanno preferito il metodo ELISA, mentre Cheum *e Coll*. (2001) hanno fatto ricorso alla PCR, applicata a ceppi di bacilli carbonchiosi coltivati su Bacillus Cereus Agar.

Il metodo proposto

- Allestimento omogenato
- Esecuzione di diluizioni decimali
- Semina su Cereus Selective Agar
- Incubazione a 30 °C x 18-24 ore
- Identificazione e conteggio presuntivo delle colonie di *Bacillus cereus*
- Esecuzione di *test* biochimici di conferma

Materiale richiesto

- Come per la CBT mesofila, a eccezione di piastre Petri di terreno Cereus Selective Agar addizionato con Egg Yolk Emulsion e con supplemento *Bacillus cereus*
- Materiale per l'esecuzione di *test* biochimici necessari per l'identificazione di *Bacillus cereus*

Esecuzione

Eseguire una conta in piastra applicando uno dei metodi di semina descritti per la carica batterica totale e utilizzando come terreno colturale il Cereus Selective Agar.

Incubare le piastre capovolte a 30 °C per 18-24 ore.

Nota

Qualora si volessero contare le spore di *B. cereus*, sottoporre l'omogenato del campione in esame a trattamento termico a 70 °C per 15 minuti.

Interpretazione

Identificare come colonie di *B. cereus* quelle di colore rossastro-viola e circondate da un'ampia zona di precipitato.

Calcolare il numero di *B. cereus* per unità di misura del campione in esame in maniera analoga alla conta batterica totale mesofila.

Per confermare che le colonie dall'aspetto tipico sul terreno appartengano a *B. cereus*, eseguire le seguenti prove di identificazione:

- striscio su vetrino e colorazione di Gram (bacilli Gram-positivi)
- riduzione dei nitrati (+)
- *test* VP (+)
- fermentazione del glucosio (+)
- emolisi su Agar sangue (+)
- mobilità (+)
- sensibilità alla penicillina 10 U.I. (-)
- colorazione dei granuli lipidici (+)
- colorazione dei cristalli parasporali (-)

Colorazione dei granuli lipidici

Preparare degli strisci su vetrino, partendo dal centro di alcune colonie sospette incubate per 1 giorno, oppure dalla periferia di alcune colonie sospette incubate 2 giorni.

Asciugare a temperatura ambiente e fissare alla fiamma.

Posizionare i vetrini su un supporto in modo che vengano scaldati dal vapore dell'acqua bollente sottostante.

Coprire i vetrini con verde malachite per 2 minuti, continuando il riscaldamento (soluzione acquosa al 5% di verde malachite).

Lavare con acqua e asciugare con carta assorbente.

Coprire lo striscio con Sudan nero B per 15 minuti (soluzione di Sudan nero B allo 0,3%** in alcool etilico 70%*).

Lavare con xilolo per 5 secondi e asciugare con carta assorbente.

Coprire lo striscio con safranina per 20 secondi.

Lavare con acqua e asciugare con carta assorbente.

Le cellule vegetative di *B. cereus* sono generalmente della lunghezza di 4-5 µm e della larghezza di 1-1,5 µm. Si presentano con estremità squadrate, spore verdi in posizione centrale o para-centrale, granuli lipidici neri e citoplasma rosso.

*Soluzione di alcool etilico al 70%

Alcool etilico al 95% ml 100, acqua distillata ml 35,7.

**Soluzione di Sudan nero B

Scaldare fino all'ebollizione 100 ml di alcool al 70% e aggiungere 1 grammo di Sudan nero B.

Porre la soluzione in termostato a 37 °C per 3 giorni.

Prelevare per la colorazione la parte soprastante.

Colorazione dei cristalli parasporali

Preparare degli strisci su vetrino, partendo da colture pure, realizzate trapiantando delle colonie sospette su *slant* di agar nutritivo, incubato a 37 °C per 24 ore e, quindi, a temperatura ambiente per 3 giorni.

Ricoprire il vetrino con metanolo e attendere 30 secondi.

Versare il metanolo e lasciare asciugare all'aria il vetrino.

Colorare con fucsina basica allo 0,5% o con fucsina acida di Ziehl.

Scaldare il vetrino con la fiamma fino allo sviluppo di vapori. Ripetere l'operazione dopo 1-2 minuti.

Attendere 30 secondi, lavare con acqua e asciugare con carta assorbente.

I cristalli parasporali si presentano di forma tetragonale e di colore scuro, con dimensioni leggermente inferiori a quelle delle spore. Sono presenti in numero elevato nelle colture di *B. thuringensis,* mentre sono assenti nelle colture di *B. cereus* e degli altri membri del gruppo (*B. mycoides, B. anthracis).*

Caratteristiche biochimiche utili per la differenziazione delle principali specie del genere *Bacillus* (comportamento prevalente)

	Riduzione nitrati	Glucosio	Mannite	VP
B. anthracis	+	+	-	+
B. subtilis	+	+	+	+
B. cereus var. mycoides	+	+	-	+
B. megaterium	-	+	+	-
B. stearothermophilus	+	+	-	-
B. licheniformis	+	+	+	+
B. lentus	-	-	-	-
B. firmus	+	-	-	-
B. coagulans	d[1]	+	d[1]	d[1]
B. pumilus	-	+	+	+

[1] d = risultato variabile

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

Cheum H.I. *e Coll*., A simple and sensitive detection system for *Bacillus anthracis* in meat and tissue, J. appl. Micr. 2001, *91*, 421-426

DIVISION OF MICROBIOLOGY - CENTER FOR FOOD SAFETY AND APPLIED NUTRITION - U.S. FDA Bacteriological Analytical Manual. 6th edition. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, 1984, 16.01-16.08

Encinas J.P. *e Coll*., Evaluation of different systems for the identification of *Bacillus* strains isolated from spanish fermented sausages, Meat Sci. 1996, *42*, 127-131

Fermanian C. *e Coll*., Improved in vitro detection of hemolysin BL from *Bacillus cereus*, Int. J. Food Micr. 2000, *57*, 1-8

Holbrook R. *e Coll*., An improved selective and diagnostic medium for the isolation and enumeration of *Bacillus cereus* in foods, Can. J. Microb. 1980, *26*, 753

ICMSF. Microrganisms in Food 1. Their significance and methods of enumeration. University of Toronto Press, Toronto, 1988, 274-275

ISO 7032. Microbiology - General guidance for enumeration of *B.cereus* - Colony count technique at 30 °C, 1987

Jackson R. *e Coll*., Rapid screening test for enterotoxin-producing *Bacillus cereus*, J. Clin. Microbiol. 1995, 31, 972

Meira F.J. *e Coll*., A new formula for an alternative culture medium, without antibiotics, for isolation and presumptive quantification of *Bacillus cereus* in foods, J. Food Protect. 1995, *58*, 235-238

Pecoraro S. *e Coll*., Rapid identification of closely related probiotic *Bacillus cereus* strains and differentiation from wild type bacilli, Arch. Lebens. 2002, *53*, 49-72

Phillips A.P. *e Coll*., Identification of *B. anthracis* by polyclonal antibodies against extracted vegetative cell antigens, J. appl. Bact. 1989, *66*, 419

Sastry K.S.R. *e Coll*., Identification of *Bacillus anthracis* by a simple protective antigen-specific mAb dot-ELISA, J. Med. Micr. 2003, *52*, 47-49

Von Graevenitz A. *e Coll*., An identification scheme for rapidly and aerobically growing Gram-positive rods, Zbl. Bakt. 1996, *284*, 246-254

PSEUDOMONAS AERUGINOSA

Definizione

Bastoncini Gram-negativi, mobili, aerobi, catalasi e ossidasi positivi, produttori di pigmento verde. La loro temperatura di sviluppo ottimale è pari a +37 °C, con intervallo compreso tra +4 e +43 °C.

Alcuni cenni storici

Pseudomonas aeruginosa è un patogeno occasionale (causa vomito, diarrea, sepsi), assai temuto nelle infezioni ospedaliere (Lyczac *e Coll*., 2000). Si tratta di un microrganismo che sempre più frequentemente presenta il fenomeno della multiresistenza agli antibiotici (Paul *e Coll*., 1977), legata, almeno in parte, alla sua abilità a sopravvivere nei *biofilm* sottoposti a limitata disponibilità di ossigeno (Borriello *e Coll*., 2004).

Nel settore alimentare, *P. aeruginosa* è notoriamente un germe responsabile di alterazioni, assieme ad altre specie dello stesso genere *Pseudomonas,* genericamente denominati psicrofili, in quanto capaci di tollerare le basse temperature (Sierra *e Coll*., 1995). Le specie principali sono *P. fluorescens* e *P. putida*.

La conta delle Pseudomonadacee, in generale, può essere fatta su GSPA (vedi scomposizione della carica batterica totale) o su uno dei vari terreni specifici per *Pseudomonas* (tipo Pseudomonas Agar), da incubare a temperatura ambiente per 72 ore.

Altri terreni sono entrati nell'uso corrente per la determinazione quantitativa di *P. aeruginosa* nelle acque.

Carlson *e Coll*. (1962) hanno usato la tecnica MPN, consistente nella semina in provette di terreno liquido di diluizioni decimali del campione. Gli stessi Autori descrivono anche il metodo della filtrazione dell'acqua su una membrana da incubare adagiata sulla superficie di un terreno solido in piastra.

Place *e Coll*. (1996) hanno sviluppato un terreno solido, chiamato Pseudomonas Agar, addizionato con supplemento CFC (PCFC), che fornirebbe risultati migliori rispetto al metodo MPN in terreno liquido (Modified King's A Broth).

Per rivelare le specie di *Pseudomonas* (tra cui *P. aeruginosa*) che provocano alterazioni del latte e dei prodotti caseari, Flint *e Coll*. (1996) hanno proposto l'uso del GSP Agar, reso selettivo dal supplemento Irgasan.

Il metodo proposto

- Allestimento omogenato
- Esecuzione di diluizioni decimali
- Semina su Cetrimide Agar
- Incubazione a 42 °C x 48 ore
- Identificazione presuntiva e conteggio delle colonie di *Pseudomonas aeruginosa*
- Trapianto di colonie sospette in Kligler Iron Agar (incubazione a 37 °C per 24 ore)
- Esecuzione di *test* biochimici di conferma

Materiale richiesto

- Come per la CBT mesofila, a eccezione di piastre Petri di terreno Cetrimide Agar addizionato con glicerolo 1%
- Provette di terreno Kligler Iron Agar

- Materiale per l'esecuzione di prove biochimiche necessarie per l'identificazione di *Pseudomonas aeruginosa.*

Esecuzione

Eseguire una conta in piastra applicando uno dei metodi di semina descritti per la carica batterica totale e utilizzando come terreno colturale il Cetrimide Agar.

Incubare le piastre capovolte a 42 °C per 48 ore.

Nota

La ricerca di *Pseudomonas aeruginosa* nelle acque minerali, da eseguirsi su 250 ml, si effetua mediante filtrazione del campione su membrana di acetato di cellulosa (porosità 0,45 mmicron) e successiva coltivazione della membrana su piastra di Cetrimide Agar con le stesse modalità.

Interpretazione

Identificare le colonie di *P. aeruginosa* in base alla produzione di pigmento blu-verde e alla comparsa di un alone di fluorescenza visibile sotto luce ultravioletta (luce di Wood a 366 nm).

Confermare l'identificazione mediante trapianto di una o più colonie su altrettante provette di Kligler Iron Agar (da incubare a 37 °C per 24 ore) e successiva applicazione di appropriati *test* biochimici predisposti.

Ampie informazioni sulla scelta di prove biochimiche utili per differenziare il genere *Pseudomonas* da alimenti sono contenute nel pregevole lavoro di Kielwein (1971).

Calcolare il numero di *P. aeruginosa* per unità di misura del campione in esame in maniera analoga alla conta batterica totale mesofila.

Caratteristiche biochimiche e di crescita utili per la differenziazione delle principali specie del genere *Pseudomonas* (comportamento prevalente)

	Arginina diidrolasi	Crescita a +4 °C	Crescita a +41 °C	Inosite
Pseudomonas aeruginosa	+	-	+	-
Pseudomonas cepacia	-	-	d[1]	+
Pseudomonas fluorescens	+	+	-	+
Pseudomonas putida	+	+	-	-

[1] d = risultato variabile

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

Borriello G. *e Coll*., Oxygen limitation contributes to antibiotic tolerance of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms, Antim. Agents Chemoter. 2004, *48*, 2659-2664

Carlson L.A. *e Coll*., Factors influencing detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* by Most Probable Number and membrane filtration techniques, Appl. Micr. 1975, *30*, 935

Flint S. *e Coll*., A modified selective medium for the detection of *Pseudomonas* species that cause spoilage of milk and dairy products, Int. Dairy J. 1996, *6*, 223-230

Kielwein G., Die Isolierung und Differenzierung von Pseudomonaden aus Lebensmitteln, Arch. Lebens. 1971, *22*, 29

Lyczac J.B. *e Coll*., Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lesson from a versatile opportunist, Microbes and Infections 2000, *2*, 1051-1060
MERCK, Microbiology Manual, E.Merck, Darmsatdt, 1991, 168-169
Paul S. *e Coll*., Multiple antibiotic resistance (MAR) index and its reversion in *Pseudomonas aeruginosa*, Letters in Appl. Micr. 1977, *24*, 169-171
Place B.M. *e Coll*., Development of an external quality assurance scheme for the detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* from water and comparison of results using Modified King's A Broth and a commercial agar, J. appl. Bact. 1996, *80*, 682
Sierra M. *e Coll*., Species of psychrotrophic bacteria on freshly dressed lamb carcasses, Arch. Lebens. 1995, *46*, 1-24

AEROMONAS HYDROPHILA

Definizione

Bastoncini Gram-negativi, mobili, aerobi-anaerobi facoltativi, psicrofili, ossidasi negativi, patogeni opportunisti.

Scheda sintetica

Attività patogena	*agente eziologico di tossinfezioni*
Alimenti responsabili	*acqua, insalate, carni, prodotti ittici, gelati, creme, torte alla crema, piatti freddi, lumache, rane*
Temperatura di moltiplicazione	*da 4 a 42 °C, con optimum a 28 °C*
pH ***di sviluppo***	*4,5-8,8 con optimum da 6,5 a 7,2*
Attività dell'acqua (Aw) richiesta	*> 0,94*
Fattori d'inibizione	*NaCl >5 %*
Dose infettante	*non determinata*
Tossine prodotte	*esotossine ed endotossine*
Sito di moltiplicazione	*mucosa intestinale*
Incubazione della malattia	*12-72 h*
Sintomi	*diarrea, gastroenterite*
Indagini di laboratorio	*microrganismo nell' alimento sospetto e nelle feci dell'ammalato*

Alcuni cenni storici

Esiste in letteratura una cospicua mole di lavori tesi a sperimentare un metodo colturale efficiente per isolare *Aeromonas spp*. (e anche *Plesiomonas spp*.), partendo da terreni e reagenti di uso generale in batteriologia. Rogol *e Coll*. (1979) hanno tentato la strada del terreno reso selettivo da un antibiotico, l'ampicillina, aggiungendo un tensioattivo, il Pril®, e lo xilosio. Da allora, l'ampicillina è diventata il supplemento d'elezione per isolare *Aeromonas*, come dimostrato da Robinson *e Coll*. (1984), che aggiungevano 10 mg/l di questo antibiotico all'Agar sangue.

Palumbo *e Coll*. (1985), al Phenol Red Agar Base, addizionavano, invece, amido e ampicillina, ottenendo un nuovo terreno, chiamato SA (Starch+Ampicillin), che incubavano a +28 °C per 24 ore. Bagnando le piastre con 5 ml di Lugol, le colonie di *Aeromonas*, amilasi positive, venivano rese più evidenti, assumendo un colore giallo-miele con un alone chiaro circostante.

Per l'acqua potabile, Havelaar *e Coll*. (1987) sottoponevano i campioni a filtrazione su membrane, che venivano poi fatte aderire alla superficie del terreno colturale.

Barnhart *e Coll*. (1989) hanno esaminato nei macelli avicoli le acque di lavaggio con un metodo analogo al precedente.

Per ricercare *Aeromonas hydrophila* nelle carni trite, Hänninen *e Coll*. (1993) praticavano la semina diretta su Ampicillin Dextrin Agar. Essi ricorrevano invece, nel caso dei polli eviscerati, al lavaggio delle carcasse con acqua 0,1% peptonata. Da qui, procedevano con un arricchimento a +30 °C per 24 ore in TSB antibiotato con ampicillina a 30 mcg/ml, cui faceva seguito la piastratura su Ampicillin Dextrin Agar.

Gobat *e Coll*. (1995), per la ricerca su pesce e carne, si limitavano a un'analisi qualitativa,

per la quale seminavano i campioni in Alkaline Peptone Water a pH 8.7, prima di tentare l'isolamento su Aeromonas Medium.

Tsai *e Coll*. (1996) descrivono dettagliatamente le modalità d'uso di tre terreni (Starch Ampicillin Agar, Aeromonas Agar, Blood Ampicillin Agar) e le prove biochimiche, ritenute più idonee, per le analisi su prodotti della pesca.

Confronti fra più terreni selettivi diversi sono stati fatti da Von Graevenitz *e Coll*. (1983) in diagnostica umana, Chetti *e Coll.* (1993), Jeppesen (1995), Tsai *e Coll*. (1996). Il terreno preferito dalla maggior parte dei Ricercatori rimane l'Ampicillin Dextrin Agar (equivalente all'attuale Aeromonas Medium). Fra i suoi sostenitori si possono citare:

- Knockel (1989), che, per la ricerca su campioni ambientali, ha paragonato l'Ampicillin Dextrin Agar con tre differenti terreni;
- Ribas *e Coll*. (1991), che l'ha utilizzato per l'identificazione e la quantificazione di *Aeromonas* nell'acqua;
- Handfield *e Coll*. (1996) per l'analisi dell'acqua potabile, mettendo in parallelo nove terreni diversi;
- Singh (1997), che, per le carni, ha confrontato questo terreno con il GSPA e con l'Aeromonas Medium secondo Rayan;
- Ravazzolo *e Coll*. (1998), che, per isolare il germe dall'acqua e valutarne poi la tossicità, hanno aggiunto alla composizione del terreno stesso l'agente vibriostatico O/129.

Alcune osservazioni critiche sulla validità dei terreni antibiotati arrivano, tuttavia, da Gavriel *e Coll*. (1995). Essi hanno paragonato l'Ampicillin Dextrin Agar (ADA), il Glutamate Starch Penicillin Agar (GSPA) e lo Starch Glutamate Ampicillin Penicillin Agar (SGAP). Cinque specie di *Aeromonas* (*hydrophila*, *caviae*, *sobria*, *veronii*, *schubertii*), saggiate a +30 °C per 48 ore facendo riferimento al TSA, non superavano, sui terreni selettivi, la quota di recupero del 58% e alcune specie non crescevano nemmeno su tutti i terreni.

Probabilmente per ovviare a simili difetti, già avvertiti in precedenza, alcuni Autori hanno preso un'altra direzione per dimostrare *Aeromonas hydrophila* negli alimenti. Tra questi, Merino *e Coll*. (1993) hanno pubblicato un lavoro fondato su un *test* immuno-enzimatico (tecnica ELISA).

Il metodo proposto

- Allestimento omogenato
- Esecuzione di diluizioni decimali
- Semina su Aeromonas Agar
- Incubazione delle piastre di Aeromonas Agar a 37 °C x 24 ore
- Incubazione dell'omogenato a 28 °C per 18-24 ore
- Semina su Aeromonas Agar
- Incubazione delle piastre di Aeromonas Agar a 37 °C x 24 ore
- Trapianto di colonie sospette in Kligler Iron Agar (incubazione a 37 °C per 24 ore)
- Esecuzione di test biochimici di conferma

Materiale richiesto

- Come per la CBT mesofila, a eccezione di soluzione diluente Acqua Peptonata Alcalina e di piastre Petri di terreno Aeromonas Agar addizionato con Supplemento Aeromonas
- Provette di terreno Kligler Iron Agar
- Dischetti per *test* dell'ossidasi
- Materiale per l'esecuzione di prove biochimiche necessarie per l'identificazione di *Aeromonas hydrophila.*

Esecuzione

Preparare una sospensione iniziale del campione in esame nel sacchetto da Stomacher con filtro, con aggiunta di Acqua Peptonata Alcalina in rapporto P/V di 1:10 e omogeneizzare accuratamente in Stomacher per 1-2 minuti.

Eseguire una conta in piastra applicando il metodo di semina Surface Spread Plate e utilizzando come terreno colturale l'Aeromonas Agar.

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

Incubare il sacchetto da Stomacher con l'omogenato a 28 °C per 18-24 ore.

Al termine dell'incubazione dell'omogenato, trasferire, in doppio, 0,1 ml di omogenato su due piastre di Aeromonas Agar, da incubare a 37 °C per 24 ore.

Nota

La ricerca di *Aeromonas hydrophila* nelle acque si effettua mediante filtrazione del campione su membrana di acetato di cellulosa (porosità 0,45 µm) e successiva coltivazione della medesima su piastra di Aeromonas Agar con le modalità indicate sopra.

Interpretazione

Identificare come colonie di *Aeromonas hydrophila* quelle che appaiono opache, di colore verde, con centro verde scuro, con diametro di 0,5-1,5 mm.

Come conferma dell'identificazione, trapiantare una o più colonie tipiche su altrettante provette di Kligler Iron Agar (da incubare a 37 °C per 24 ore). Da questi trapianti, procedere a un *test* dell'ossidasi su dischetto (-), approntare un preparato microscopico da colorare con il metodo di Gram (bastoncini Gram-negativi) ed eseguire appropriati *test* biochimici predisposti.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

Barnhart H.M. *e Coll*., Recovery of *Aeromonas hydrophila* from carcasses and processing water in a broiler processing operation, J. Food Protect. 1989, *52*, 646-649

Chetti L. *e Coll*., Isolation of *Aeromonas spp*. from chickens and comparison of four selective media, MAN 1993, *11*, 349

Gavriel A. *e Coll*., Assessment of media used for selective isolation of *Aeromonas spp*., Letters in Appl. Micr. 1995, *21*, 313-315

ICMSF. Microrganisms in Food 1. Their significance and methods of enumeration. 2nd edition, University of Toronto Press, Toronto, 1988, 157-159

Gobat P.F., Jemmi T., Distribution of mesophilic *Aeromonas* species in raw and ready-to-eat fish and meat product in Switzerland. Int J. Food Microbiol , 1993, 20, 117-120

Gobat P.F. *e Coll*., Comparison of seven selective media for the isolation of mesophilic *Aeromonas* species in fish and meat, Int. J. Food Micr. 1995, *24*, 375-384

Handfield M. *e Coll*., Differential media for quantitative recovery of waterborne *Aeromonas hydrophila*, Appl. Environm. Microbiol. 1996, *62*, 3544-3547

Hänninen M.L., Occurrence of *Aeromonas spp*. in samples of ground meat and chicken, Int. J. Food Micr. 1993, *18*, 339

Havelaar A.H. *e Coll*., Ampicillin-dextrin-agar medium for the enumeration of *Aeromonas* species in water by membrane filtration, J. appl. Bact. 1987, *62*, 279-287

Knochel S., The suitability of four media for enumerating *Aeromonas spp*. from environmental samples, Letters in Appl. Micr. 1989, *9*, 67

Jeppesen C., Media for *Aeromonas spp*., *Plesiomonas shigelloides* and *Pseudomonas spp*. fron food and environment, Int. J. Food Micr. 1995, *26*, 25-41
Merino S. *e Coll*., Detection of *Aeromonas hydrophila* in food with an enzyme-linked-immunosorbent-assay, J. appl. Bact. 1993, *74*, 149
OXOID MANUAL, 6th edition
Palumbo S.A. *e Coll*., Starch Ampicillin Agar for the quantitative detection of *Aeromonas hydrophila*, Appl. Environm. Microbiol. 1985, *50*, 1027-1030
Ravazzolo E. *e Coll*., Metodi di identificazione e di valutazione della tossicità di *Aeromonas spp*. isolate dall'acqua, Boll. Microb. Indagini Lab. 1998, *4*, 11
Ribas F. *e Coll*., Comparison of different media for the identification and quantification of *Aeromonas spp*. In water, Antonie van Leeuwenhoek 1991, *59*, 225
Robinson J. *e Coll*., Media for isolation of *Aeromonas spp*. from faeces, J. Med. Microbiol. 1984, *18*, 405
Rogol M. *e Coll*., Pril-xylose-ampicillin-agar, a new selective medium for the isolation of *Aeromonas hydrophila*, J. Med. Microbiol. 1979, *12*, 229
Singh U., Isolation and identification of *Aeromonas spp*. from ground meats in eastern Canada, J. Food Protect. 1997, *60*, 125-130
Tsai G.J. *e Coll*., Incidence and toxigenicity of *Aeromonas hydrophila* in seafood, Int. J. Food Micr. 1996, *31*, 121-131
Von Graevenitz A. *e Coll*., Evaluation of differential and selective media for isolation of *Aeromonas* and *Plesiomonas spp*. from human feces, J. Clin. Microbiol. 1983, *17*, 16

BROCHOTHRIX THERMOSPHACTA

Definizione

Bastoncini Gram-positivi, non sporigeni, anaerobi facoltativi, psicrofili, non patogeni. Sono responsabili di fenomeni degradativi delle carni e di prodotti derivati, che compaiono quando prevalgono condizioni favorenti lo sviluppo di questi microrganismi, tali da consentire loro di raggiungere elevate concentrazioni (Prieto *e Coll*., 1994).

Tra gli alimenti maggiormente esposti alla proliferazione di questo microrganismo, si trovano le carni confezionate sotto vuoto o in atmosfera modificata sotto *film* plastico e conservate refrigerate, come spiegato da Cantoni *e Coll*. (2000).

Per maggiori notizie riguardanti *Brochothrix thermosphacta,* si può consultare l'ampia rassegna su condizioni di moltiplicazione, percentuali d'isolamento da varie fonti, terreni e prove d'identificazione, pubblicata da Ludwig *e Coll.* (1994).

Il metodo proposto

- Allestimento omogenato
- Esecuzione di diluizioni decimali
- Semina su STA Agar
- Incubazione a 20-25 °C x 48 ore
- Identificazione presuntiva e conteggio delle colonie di *Brochothrix thermosphacta*
- Conferma mediante trapianto di colonie sospette in provette di terreno TSA + 0,6% di estratto di lievito (incubazione a 20-25 °C x 48 ore)
- Esecuzione di prove biochimiche

Materiale richiesto

- Come per la CBT mesofila, a eccezione di piastre Petri di terreno STA Agar
- Provette di terreno TSA (preparato con TSB + agar 1,5% + estratto di lievito 0,6%)
- H_2O_2 al 3% per *test* della catalasi
- Dischetti per *test* dell'ossidasi
- Materiale per l'esecuzione di prove biochimiche utili per l'identificazione di *Brochothrix thermosphacta*

Esecuzione

Eseguire una conta in piastra, applicando uno dei metodi di semina descritti per la conta batterica totale e utilizzando come terreno colturale l'STA Agar.

Incubare le piastre capovolte a temperatura ambiente (20-25 °C) per 48 ore.

Interpretazione

Brochothrix thermosphacta sviluppa, su STA Agar, con colonie biancastre, translucide, tonde, convesse, a margini regolari.

Confermare l'identificazione mediante trapianto di una o più colonie sospette in altrettante provette di TSA + 0,6% di estratto di lievito, da incubare a 20-25 °C per 48 ore, con successiva esecuzione delle seguenti prove:

- morfologia e colorazione di Gram (bastoncini Gram +)
- catalasi (+) allestita su vetrino, stemperando un'ansata di patina colturale in una goccia di acqua ossigenata al 3%

- ossidasi (-) eseguita su dischetto
- assenza di crescita a 37 °C, rilevata dopo trapianto su TSA + 0,6% di estratto di lievito e incubazione per 48 ore
- emolisi (-) rilevata dopo piastratura su Agar sangue e incubazione a 20-25 °C per 48 ore
- *test* di fermentazione del glucosio (+)
- *test* di produzione dell'H_2S (-)
- *test* di Voges-Proskauer o VP (+)

Calcolare il numero di *B. thermosphacta* per unità di misura del campione in esame in maniera analoga alla conta batterica totale mesofila.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

Cantoni C. *e Coll*., *Brochothrix thermosphacta* nella carne e prodotti derivati, Ind. Alim. 2000, *39*, 976

Ludwig S. *e Coll*., Untersuchungen zum Vorkommen von *Brochothrix thermosphacta*, Arch. Lebens. 1994, *45*, 121-144

Peterz M., Evaluation of methods for enumeration of *Brochothrix thermosphacta* in foods. J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int., 1992, 75 (2), 303-306

Prieto M. *e Coll*., Evolution of B*rochothrix* and other nonsporing Gram-positive rods during chilled storage of lamb carcasses, Arch. Lebens. 1994, *45*, 73-96

LISTERIA MONOCYTOGENES
Metodi quantitativi (MPN e conteggio in piastra)

Definizione

Si rimanda al Capitolo 4, *Listeria monocytogenes* - Ricerca qualitativa.

Alcuni cenni storici

Diversi Autori si sono espressi a favore della tecnica di conteggio in terreno liquido (MPN). Tra questi:

- Comi *e Coll*. (1990), che hanno trovato questo metodo superiore al conteggio in piastre di Oxford Agar o PALCAM Agar quando la contaminazione è bassa, cioè inferiore a 100 listerie per grammo, mentre vale il giudizio opposto se i microrganismi sono più di 100-200 per grammo;
- Moore *e Coll*. (1993) nell'analisi del misto d'uovo;
- Yu *e Coll*. (1993), che hanno impiegato il sistema a cinque provette per la conta su prodotti a base di carne;
- Trau *e Coll*. (1996) per il latte e i derivati.

Hanno pubblicato ricerche adottando il conteggio delle listerie su piastra i seguenti Autori:

- Jemmi (1990), che ha valutato il grado di contaminazione in Svizzera di carne e pesce con i terreni Oxford e PALCAM Agar;
- Cantoni *e Coll*. (1992), che hanno utilizzato la semplice semina di 0,2 ml di omogenato (10 grammi di alimento + 40 ml di soluzione fisiologica peptonata) su cinque piastre di PALCAM Agar;
- Garayazabal *e Coll*. (1992) per gli insilati, mediante semina di 0,1 ml, da una diluizione 1:10 del campione, su PALCAM, Oxford e LPM Agar;
- Paranjpye *e Coll*. (1992), che hanno apprezzato l'Oxford Agar nelle contaminazioni con concentrazioni di listerie superiori a 100 microrganismi per grammo;
- Sheridan *e Coll*. (1994), che hanno modificato la tecnica per adeguarla ai prodotti carnei e ittici congelati, seminando due piastre di Trypticase Soy Agar con 1 ml e altre due piastre con 0,1 ml. Dopo un soggiorno a +30 °C per 5 ore, il terreno veniva ricoperto con un *overlay* di 3-5 ml di Oxford Agar e l'incubazione continuata per altre 48 ore.
- Curtis *e Coll*. (1995), che hanno redatto una rassegna sull'argomento;
- Heisick *e Coll*. (1995), che dalle diluizioni decimali del campione in tampone fosfato seminavano 1 ml in 3 piastre di LEA. Su questo particolare terreno selettivo, contenente Columbia Agar Base, litio cloruro, MUG, sangue defibrinato, antibiotici e sfingomielinasi, le colonie di *L. monocytogenes,* dopo 48 ore a +35 °C, appaiono fluorescenti.

1. METODO MPN (*Most Probable Number*, Numero più Probabile)

- Allestimento omogenato
- Esecuzione di diluizioni decimali
- Semina in Brodo d'arricchimento (Fraser oppure LEB) secondo lo schema a 3 provette
- Incubazione a 37 °C x 24 ore
- Piastratura su Oxford Agar, Palcam Agar o ALOA (incubazione a 37 °C x 24-48 ore)
- Trapianto di colonie sospette di *Listeria monocytogenes* in TSA + 0,6% di estratto di lievito (incubazione a 37 °C x 24 ore)

- Conferma dell'identificazione mediante esecuzione di prove biochimiche
- Conteggio mediante applicazione della tabella MPN

1.1. Metodo MPN secondo l'Ordinanza Ministeriale 7 dicembre 1993

Materiale richiesto

- Sacchetti sterili per Stomacher con filtro
- Provettoni sterili
- Pipette graduate sterili monouso
- Brodo d'arricchimento Listeria Enrichment Broth (LEB)
- Piastre Petri di terreno Oxford agar, addizionato con supplemento Oxford (in alternativa è possibile utilizzare il terreno PALCAM agar, addizionato con supplemento PALCAM)
- Terreni, reagenti e materiali necessari per l'identificazione di *Listeria monocytogenes*, come riportato nella metodica per la ricerca qualitativa

Esecuzione

Trasferire nel sacchetto da Stomacher con filtro 10 grammi del campione in esame e aggiungere 90 ml di LEB.

Omogeneizzare accuratamente in Stomacher per qualche minuto.

Eseguire due successive diluizioni decimali dell'omogenato (10^{-1} e 10^{-2}) in LEB.

Seminare 9 provette contenenti 10 ml di LEB ciascuna, secondo il seguente schema:

- tre provette con 1 ml ciascuna dell'omogenato (corrispondente a 0,1 g di campione)
- tre provette con 1 ml ciascuna della diluizione 10^{-1} (corrispondente a 0,01 g di campione)
- tre provette con 1 ml ciascuna della diluizione 10^{-2} (corrispondente a 0,001 g di campione).

Incubare tutte le provette a 37 °C per 24 ore.

Interpretazione

Dopo incubazione, seminare tutte le provette di LEB su piastre di terreno Oxford agar o PALCAM agar, in modo da ottenere la crescita di colonie isolate.

Incubare le piastre capovolte a 30 °C per 48.

In via presuntiva, identificare le colonie di *L. monocytogenes* in base alle loro caratteristiche di crescita su Oxford agar o su PALCAM agar.

Confermare l'identificazione mediante trapianto di un numero significativo di colonie sospette su altrettante provette di TSA addizionato con lo 0,6% di estratto di lievito e successiva esecuzione delle prove indicate nella metodica per la ricerca qualitativa di *L. monocytogenes.*

Calcolare il numero di *L. monocytogenes* per unità di misura del campione in esame applicando la seguente tabella MPN (valida per quantità di campione di 0,1 / 0,01 / 0,001 grammi seminati nelle tre diluizioni).

Tabella MPN per ricerca quantitativa di L. monocytogenes secondo JEMMI (1990) con metodo a tre provette *(da U.S. Bacteriological Analytical Manual, 6th edition, 1984).*

PROVETTE POSITIVE	MPN/g	PROVETTE POSITIVE	MPN/g
0-0-0	<3	2-3-0	---
0-0-1	3	3-0-0	23
0-1-0	3	3-0-1	39
0-2-0	---	3-0-2	64
1-0-0	4	3-1-0	43
1-0-1	7	3-1-1	75
1-1-0	7	3-1-2	120
1-1-1	11	3-2-0	93
1-2-0	11	3-2-1	150
2-0-0	9	3-2-2	210
2-0-1	14	3-3-0	240
2-1-0	15	3-3-1	460
2-1-1	20	3-3-2	1100
2-2-0	21	3-3-3	>1100
2-2-1	28		

2. METODO DELLA PIASTRATURA DIRETTA (sensibilità inferiore a 100 cellule/g)

- Allestimento omogenato
- Esecuzione di diluizioni decimali
- Semina su Oxford Agar o Palcam Agar
- Incubazione a 37 °C x 24-48 ore
- Identificazione presuntiva e conteggio delle colonie di *Listeria monocytogenes*
- Conferma mediante trapianto di colonie sospette in provette di terreno TSA + 0,6% di estratto di lievito (incubazione a 37 °C x 24 ore)
- Esecuzione di prove biochimiche

Materiale richiesto

Come per il metodo MPN, ma con soluzione di Ringer sterile 1/4 concentrata o soluzione fisiologica peptonata sterile (sodio cloruro 0,85% + peptone 0,1%) al posto del LEB

Esecuzione

Preparare un omogenato del campione in esame in maniera analoga al metodo MPN, ma utilizzando soluzione di Ringer sterile 1/4 concentrata o soluzione fisiologica peptonata sterile come diluente.

Eseguire un conteggio in piastra applicando il metodo di semina Surface Spread Plate e utilizzando come terreno l'Oxford Agar o il PALCAM Agar oppure ALOA.

Incubare le piastre capovolte a 37 °C per 48 ore.

Interpretazione

In via presuntiva, identificare le colonie di *L. monocytogenes* in base alle loro caratteristiche di crescita su Oxford Agar o su PALCAM Agar oppure ALOA.

Confermare l'identificazione mediante trapianto di una o più colonie sospette su altrettante

provette di TSA addizionato dello 0,6% di estratto di lievito e successiva esecuzione delle prove biochimiche indicate a proposito della ricerca qualitativa della *L. monocytogenes.*

Calcolare il numero di *L. monocytogenes* per unità di misura del campione in esame in maniera analoga alla conta batterica totale, secondo il metodo Surface Spread Plate.

Nota applicativa

Data la diffusione ubiquitaria di Listeria monocytogenes e l'esistenza di limiti di tolleranza in determinate categorie di alimenti, si consiglia di effettuare sempre la ricerca quantitativa in tutti i casi in cui ne è stata dimostrata la presenza col metodo qualitativo su 25 grammi (vedi Capitolo 4), utilizzando un sotto-campione da 10 grammi, appositamente congelato al momento del prelievo per l'avvio della prima analisi qualitativa e scongelato a temperatura ambiente immediatamente prima dell'analisi quantitativa.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

Per la tecnica MPN

BEKANNTMACHUNGEN DES BGA. Empfehlungen des Bundesgesundheitsamtes zum Nachweis und zur Bewertung von *Listeria monocytogenes* in Lebensmitteln, Bundesgesundheitsblatt, 1991, 34 (5), 227-229

Comi G. *e Coll*., Conta di *Listeria spp*. in alimenti mediante metodo diretto e metodo MPN, Ind. Alim. 1990, *29*, 985

Moore J. *e Coll*., Detection and incidence of *Listeria* species in blended raw egg, J. Food Protect. 1993, *56*, 652-654

Trau T. *e Coll*., Evaluation of a selective enrichment Most Probable Number enumeration method for viable *Listeria spp*. in dairy products, J. Food Protect. 1996, *59*, 928-931

Yu L. *e Coll*., Five-tube Most Probable Number method using the Fung-Yu tube for enumeration of *Listeria monocytogenes* in restructured meat products during refrigerated storage, Int. J. Food Micr. 1993, *18*, 97-106

Per la conta diretta su piastra

Cantoni C. *e Coll*., Conteggio di *Listeria spp*. in alcuni alimenti, Ind. Alim. 1992, *31*, 115

Curtis G.D.W. *e Coll*., Culture media and methods for the isolation of *Listeria monocytogenes*, Int. J. Food Micr. 1995, *26*, 1-13

Garayazabal J.F. *e Coll*., A direct plating medium for monitoring the contamination of *Listeria monocytogenes* in silage, J. Vet. Med. 1992, *39B*, 513-518

Heisick J.E. *e Coll*., Enumeration of viable *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* in foods, J. Food Protect. 1995, *58*, 733

Jemmi T., Stand der Kentnisse uber Listerien bei Fleisch-und Fischprodukten, Mitt. Gebiete Lebens. Hyg., 1990, 81, 144–157

Paranjpye R.N. *e Coll*., Comparison of selective direct plating media for enumeration and recovery of *L. monocytogenes*, J. Food Protect. 1992, *55*, 905-909

Sheridan J.J. *e Coll*., The occurrence and initial number of *Listeria* in irish meat and fish products and the recovery of injuried cells from frozen products, Int. J. Food Micr. 1994, *22*, 105-113

Slade P.J. *e Coll*., Enumeration of *Listeria monocytogenes* in milk, Appl. Micr. 1988*, 6*, 121

SALMONELLA
METODO QUANTITATIVO (MPN)

Definizione

Si rimanda al capitolo 4, Salmonella - Ricerca qualitativa.

Nota

L'esecuzione di questa analisi è consigliabile tutte le volte che si isola una Salmonella con il metodo qualitativo.

Il metodo proposto

- Allestimento omogenato
- Esecuzione di diluizioni decimali
- Semina in Brodo di pre-aricchimento (incubazione a 37 °C x 18-24 ore)
- Trapianto in Brodo selenito (incubazione a 37 °C x 18-24 ore) e in Brodo di Rappaport (incubazione a 42 °C per 18-24 ore)
- Piastratura dei brodi di arricchimento su piastre di Hektoen Enteric Agar (incubazione a 37 °C x 24 ore)
- Trapianto di colonie sospette in Kligler Iron Agar (incubazione a 37 °C x 24 ore)
- Selezione dei trapianti e prova di agglutinazione con siero polivalente anti-*salmonella*
- Conferma dell'identificazione mediante esecuzione di prove biochimiche
- Determinazione delle colture positive in pre-arricchimento e conteggio mediante applicazione delle tabelle MPN

Materiale richiesto

- Sacchetti richiudibili sterili per Stomacher
- Provettoni sterili
- Pipette graduate sterili monouso
- Brodo di pre-arricchimento Acqua peptonata tamponata a doppia concentrazione (2x) distribuita in provettoni a 10 ml (per ogni campione sono necessari 9 provettoni)
- Provette di arricchimento Brodo selenito cistina (9 provette) e Brodo Rappaport-Vassiliadis (9 provette)
- Provette di terreno Kligler Iron Agar
- Piastre Petri di terreno Hektoen Enteric Agar (18 piastre)
- Antisiero polivalente *Salmonella*
- Materiale necessario per l'esecuzione dei *test* biochimici utili per l'identificazione di *Salmonella*

Esecuzione

Pesare entro un sacchetto da Stomacher richiudibile 10 grammi del campione e aggiungere 90 ml di diluente (soluzione di Ringer 1/4 concentrata).

Omogeneizzare in Stomacher per 1-2 minuti.

Allestire, dall'omogenato, le diluizioni decimali 10^{-1} e 10^{-2} in soluzione di Ringer 1/4 concentrata (10 + 90 ml).

Dalla sospensione iniziale del campione e dalle diluizioni decimali 10^{-1} e 10^{-2}, seminare 10 ml in provettoni contenenti ciascuno 10 ml di pre-arricchimento (Acqua peptonata tamponata 2x).

Incubare il pre-arricchimento a 37 °C x 18-24 ore.

Trapiantare, da ciascun pre-arricchimento, 1 ml in Brodo selenito e 0,1 ml in brodo Rappaport-Vassiliadis.

Incubare gli arricchimenti a 37 °C (brodo selenito) e a 42 °C (brodo Rappaport) per 18-24 ore.

Piastrare ciascuna provetta di terreno di arricchimento su una piastra di Hektoen Enteric Agar.

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

Per tutte le fasi successive (trapianto delle colonie sospette in provette di Kligler Iron Agar, selezione dei trapianti, identificazione biochimica e sierologica delle colture ottenute), procedere con le modalità operative descritte nel capitolo relativo alla ricerca qualitativa delle *Salmonelle.*

Dalle piastre contenenti colonie di *Salmonella,* determinare il numero delle corrispondenti provette di pre-arricchimento da considerare positive.

Calcolare il numero presuntivo di *Salmonella* per grammo di campione utilizzando la tabella dell'MPN valevole per semine di quantità di campione corrispondenti a grammi 1 / 0,1 / 0,01 (vedi Appendice).

Un'esemplificazione del calcolo per stabilire la concentrazione di Salmonelle per grammo di campione con il metodo MPN a 3 provette è riportata qui di seguito:

Provette di pre-arricchimento positive

Sospensione iniziale (contenente 1 grammo di campione/ml) **2** su 3 seminate
Diluizione 10^{-1} (contenente 0,1 grammi di campione/ml) **1** su 3 seminate
Diluizione 10^{-2} (contenente 0,01 grammi di campione/ml) **0** su 3 seminate

Confrontando sulla tabella MPN, ai numeri **2-1-0** corrispondono 1,5 salmonelle per grammo di campione.

Nell'espressione del risultato, va indicato che, con il metodo MPN, il campione contiene 1,5 salmonelle per grammo.

È importante sottolineare che la tabella dell'MPN mostra che, con il 95% di probabilità, il campione poteva contenere da un minimo di 0,4 ad un massimo di 4,4 salmonelle per grammo.

Nota applicativa

I metodi di conteggio su piastra per le *Salmonelle* non sono sufficientemente sensibili, a causa dell'effetto inibente dei terreni selettivi direttamente seminati con diluizioni del campione.

Data la relativa complessità del metodo di conteggio delle *Salmonelle* con la tecnica dell'MPN, si consiglia di prelevare, all'inizio della ricerca qualitativa svolta su 25 grammi, un'aliquota supplementare da 10 grammi di campione, destinata a un'eventuale determinazione quantitativa, da allestire *successivamente* all'esito positivo della prova qualitativa.

La realizzazione di un *kit* per agevolare l'esecuzione del metodo MPN in forma miniaturizzata è stata descritta da Humbert *e Coll*. (1997).

Il campione da 10 grammi per la ricerca quantitativa, raccolto entro un sacchetto richiudibile sterile da Stomacher, va conservato in congelatore a -20 °C e scongelato a temperatura ambiente immediatamente prima dell'analisi.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

Dickson J.S., J. Food Protect. 1989, *52*, 388-391

Humbert F.S. *e Coll*., Miniaturized Most Probable Number and enrichment serology technique for the enumeration of *Salmonella spp*. on poultry carcasses, J. Food Protect. 1997, *60*, 1306-1311

Siems H. *e Coll*., Einsatz der Most Probable Number Technik zum quantitativen Salmonellen-Nachweis, Fleischwirtsch. 1981, *61*, 1741

MICETI (MUFFE E LIEVITI)

Definizione

MUFFE: organismi pluricellulari formati da un insieme di ife (micelio), aerobi e facoltativamente anaerobi. Si colorano in viola col Gram (Gram-positivi).

Si riproducono attraverso spore contenute, nelle forme sessuate, in aschi o basidi e, nelle forme asessuate, in sporangi o conidiofori (caratteri utili per il riconoscimento).

Comprendono specie patogene e specie apatogene che degradano gli alimenti. Possono produrre tossine (aflatossine o micotossine).

Tra i generi a maggior diffusione negli alimenti, si possono citare *Mucor, Rhizopus, Aspergillus, Penicillium.*

LIEVITI: organismi unicellulari, aerobi facoltativamente anaerobi, generalmente rotondeggianti. Si riproducono per gemmazione e si colorano in viola col Gram (Gram-positivi).

Resistono a condizioni estreme di temperatura, *p*H, A_w, concentrazione di NaCl. Alcune specie sono patogene.

Tra i generi più diffusi negli alimenti, si ricordano *Saccharomyces, Torulopsis, Geotrichum, Cryptococcus, Candida*.

Alcuni cenni storici

I Ricercatori hanno incontrato alcune grosse difficoltà per trovare un terreno batteriologico che permettesse di isolare, contemporaneamente, muffe e lieviti, allontanando i batteri dotati di caratteristiche di crescita similari (Corry, 1982; Jarvis *e Coll*., 1983).

Dal 1985 sono entrati in circolazione nuovi terreni, resi selettivi dal supplemento antibiotico. Seiler (1985) ha ottenuto buoni risultati con l'Oxytetracyclin Glucose Yeast Extract Agar (OGYE).

Beuchat (1993) per il conteggio dei lieviti patogeni ha lavorato con quattro terreni: OGYE, Dicloran Rosa Bengala Cloramfenicolo Agar, Rosa Bengala Cloramfenicolo Agar, Triptone Glucosio Estratto di lievito Cloramfenicolo Agar.

Anche Weidenbörner *e Coll*. (1995) e Anderson (1995) hanno adottato per le muffe il Dicloran Rosa Bengala Cloramfenicolo Agar.

Non sono mancati i tentativi per sostituire i terreni di coltura con altri metodi di riconoscimento delle muffe direttamente negli alimenti. Notermans *e Coll*. (1986) hanno proposto un *test* ELISA, mentre Warnock (1971) ha preferito ricorrere all'immunofluorescenza per individuare il micelio delle muffe in campioni di orzo. Nel 1993, Deak ha passato in rassegna le tecniche semplificate per identificare i lieviti patogeni.

Il metodo proposto

- Allestimento omogenato
- Esecuzione di diluizioni decimali
- Semina su OGYE Agar
- Incubazione a temperatura ambiente (20-25 °C) x 5 giorni
- Identificazione e conteggio delle colonie di miceti

Materiale richiesto

Come per la conta batterica totale mesofila, a eccezione di piastre Petri di terreno OGYE Agar, addizionato con Supplemento OGYE.

Esecuzione

Eseguire un conteggio in piastra applicando il metodo di semina Surface Spread Plate su terreno OGYE Agar.

Incubare le piastre capovolte a temperatura ambiente (20-25 °C) per 5 giorni.

Leggere le piastre a partire dal terzo giorno, a causa della possibilità di sviluppo di muffe invasive.

Interpretazione

Identificare le colonie di miceti (muffe + lieviti) e calcolare il numero di miceti per unità di misura del campione in esame in maniera analoga alla conta batterica totale mesofila.

È consigliabile effettuare il conteggio dei miceti valutando *separatamente* il numero delle muffe e dei lieviti.

Il risultato può essere espresso come: (x + y) numero di miceti, di cui (x) muffe e (y) lieviti.

Le muffe sviluppano, generalmente, con colonie tipiche, formate da filamenti (ife) che conferiscono l'aspetto caratteristico (margine irregolare, superficie cotonosa, colore per lo più bianco o verdastro o nero).

I lieviti sviluppano, per lo più, con colonie simili a quelle dei batteri (rotode, a margine netto, superficie liscia, lucente oppure opaca, di colore bianco o variabile).

Poiché sul terreno OGYE Agar possono sviluppare anche alcune specie batteriche, è opportuno accertare la natura delle colonie dei presunti lieviti con esami microscopici di conferma. A tale scopo, allestire strisci su vetrino, da colorare con Gram (+) o con colorazioni specifiche per miceti (ad esempio, colorazione con blu cotone-lattofenolo).

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

Anderson S.J., Compositional changes in surface mycoflora during ripening of naturally fermented sausages, J. Food Protect. 1995, *58*, 426-429

Beuchat L.R., Selective media for detecting and enumerating foodborne yeasts, Int. J. Food Micr. 1993, *19*, 1

Corry J.E.L., Assessment of the selectivity and productivity of media used in analytical mycology, Arch. Lebens. 1982, *33*, 160

Deak T., Simplified techniques for identifying foodborne yeasts, Int. J. Food Micr. 1993, *19*, 15

DIVISION OF MICROBIOLOGY - CENTER FOR FOOD SAFETY AND APPLIED NUTRITION - U.S. FDA. Bacteriological Analytical Manual. 6th edition. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, 1984, 19.01-19.06

ICMSF. Microrganisms in Food 1. Their significance and methods of enumeration. 2nd edition, University of Toronto Press, Toronto, 1988, 157-159

Jarvis B. *e Coll*., Observations on the enumeration of moulds in food and feedstuffs, J appl. Bact. 1983, *55*, 325

Mourad S. *e Coll*., Patogenicity of *Candida*, J. Bact. 1961, *81*, 550

Notermans S. *e Coll*., Detection of mold in food by enzyme-linked-immunosorbent assay, J. Food Protect. 1986, *49*, 786

Seiler D.A.L., Monitoring mycological media, Int. J. Food Micr. 1985, *2*, 123

Warnock D.W., Assay of fungal mycelium in grains of barley, including the use of the fluorescent antibody technique for individual fungal species, J. gen. Micr. 1971, *67*, 197

Weidenbörner M. *e Coll*., Mold spectra of various foods in relation to plating medium, J. Food Protect. 1995, *58*, 661-665

CAP. 6

Ricerca delle tossine batteriche

DIMOSTRAZIONE DELLE TOSSINE BATTERICHE

Elenco (incompleto) dei *test* disponibili in commercio utilizzabili per la diagnosi di laboratorio delle più comuni tossine prodotte da batteri e legate a malattie di origine alimentare

Microrganismo produttore di tossina	Tossina da ricercare	Possibilità di ricerca da:		Metodi tra i quali si trovano esempi descritti	Alcuni altri metodi disponibili
		feci	alimento		
Bacillus cereus (sindrome diarroica)	diarroica	-	Alimento e ceppo isolato	ELISA *(Tecra)*	RPLA *(Oxoid)*
Clostridium botulinum	tutte			ELISA (*Elcatec)*	Prova biologica
E. coli verotossici (O157:H7 e altri)	VT1 e VT2	Ceppo isolato	Ceppo isolato	ELISA *(Tecra)*	Coltura cellulare
	VT1 e VT2	feci	Brodo-colture	Premier EHEC (*Meridian*)	EH *E. coli* O157:H7 *(Binax)*
	Stx1 e Stx2	feci	Brodo-colture	RIM Immuno Shiga Toxin *E. coli* (STEC) (*Remel*)	ProSpecT Shiga Toxin *E. coli* (STEC) (*Alexon-Trend*)
E. coli enteropatogeni (EPEC e ETEC)	ST LT	Ceppo isolato	Ceppo isolato	EIA *(Oxoid)* CoA *(Pharmacia)*	ELISA
E. coli e batteri Gram-negativi	endo-tossine	-	Alimento	LAL *(Cape Cod)*	
Shigella	LT			ELISA *(Meridian)*	Verotest *(Microcard)*
Staphylococcus aureus	A,B,C,D	-	Alimento e ceppo isolato	RPLA *(Oxoid)*	ELISA *(Tecra, R-Biopharm, Transia, BioMerieux)*
Vibrio cholerae	CT	Ceppo isolato	-	RPLA *(Oxoid)*	

EIA = *enzyme immunoassay* – ELISA = *enzyme linked immunosorbent assay* – RPLA = *reverse passive latex agglutination* – CoA = *co-agglutination test*

RICERCA DELLA TOSSINA ST DI *ESCHERICHIA COLI*

Ricerca con test EIA

Procedura riferita, come esempio, al *kit* ST-EIA della *Oxoid*, indicato per la ricerca della tossina termostabile da ceppi batterici isolati.

1. Togliere il *film* di chiusura dai pozzetti necessari e montarli sulla piastra di sostegno. Per una prova singola sono necessari un pozzetto per l'esame del campione più tre pozzetti per i controlli (positivo, negativo, terreno).
2. Vuotare il contenuto dei pozzetti.
3. Lavare con tampone (*buffer*, prediluito 1:10 con acqua distillata) l'interno dei pozzetti, usando una pipetta Pasteur. Non asciugare.
4. Introdurre nei pozzetti:
   - 200 µl di controllo negativo nel pozzetto C-
   - 200 µl di controllo positivo nel pozzetto C+
   - 200 µl di terreno nel pozzetto CT (controllo terreno)
   - 200 µl di materiale in esame nel pozzetto riservato al *campione*
5. Aggiungere in tutti i pozzetti 10 µl di coniugato enzima-anticorpo (soluzione preparata diluendo 0,1 ml di reagente con 1 ml di diluente per coniugato).
6. Mescolare agitando delicatamente. Coprire con coperchio.
7. Incubare a temperatura ambiente per 90 minuti.
8. Aspirare il contenuto dei pozzetti usando pipette diverse.
9. Aggiungere 200 µl di tampone (*buffer*) in tutti i pozzetti. Mescolare per 30 secondi. Vuotare.

Ripetere il lavaggio per 4 volte, invertendo ogni volta i pozzetti su carta assorbente.

10. Aggiungere 100 µl di soluzione-substrato in tutti i pozzetti (soluzione preparata aggiungendo ml 4 di B ad una fiala A). Coprire con coperchio ed incubare a temperatura ambiente per 30 minuti.
11. Aggiungere 100 µl di soluzione *stop*.
12. Leggere la piastra allo spettrofotometro a 490 nm e applicare ai valori di densità ottica (OD) ottenuti la formula seguente:
    OD del *campione*
    (OD C-) - (OD C+)
13. Considerare il risultato della formula e concludere:
    - positivo il *test* con risultato inferiore o uguale a 0,2
    - negativo il *test* con risultato superiore a 0,2

RICERCA DELLA TOSSINA LT DI *ESCHERICHIA COLI*

Ricerca con test CoA

Procedura riferita, come esempio, al *kit* della *Pharmacia*, indicato per la ricerca della tossina termolabile da ceppi batterici isolati.

- Trasferire da una piastra di Mac Conkey Agar almeno sei colonie diverse, strisciandole con l'ansa su Mueller-Hinton Agar oppure Casamino Agar con il metodo degli "spicchi", in modo che una sola piastra di questi terreni contenga sei trapianti.
- Incubare a +37 °C per una notte.
- Da Mueller-Hinton Agar, raccogliere un'ansata piena dalla crescita di tre "spicchi" e risospendere in 100 µl di soluzione di polimixina, ripetendo la stessa operazione dagli al-

tri tre "spicchi".
- Da Casamino Agar raccogliere un'ansata da ciascuno degli "spicchi" e riunire in 200 µl di soluzione di polimixina.
- Incubare le provette in bagnomaria a +37 °C per 30 minuti.
- Aggiungere 10 µl di soluzione di Triton X-100 (qualora si fosse adoperato il terreno Mueller-Hinton), oppure 200 µl (nel caso in cui fosse stato usato il terreno Casamino Agar).
- Incubare in bagnomaria a +37 °C per 20 minuti.
- Centrifugare a 3000 rpm per 10 minuti.
- Mescolare 25 µl del supernatante con una goccia di reagente LT su un vetrino.
- Leggere l'agglutinazione entro due minuti.
- È necessario allestire sempre un controllo positivo (LT+) e uno negativo (LT-).

Terreni e soluzioni necessari

Soluzione di Polimixina
Sciogliere 50 mg di polimixina B solfato in 25 ml di soluzione fisiologica sterile.
Soluzione di Triton X-100
Diluire 1 ml di Triton X-100 in 100 ml di acqua distillata sterile.
Composizione del terreno Casamino Agar
Casamino acids 2 g, estratto di lievito 0,6 g, sodio cloruro 0,25 g, potassio fosfato bibasico 0,871 g, glucosio 0,25 g, *trace salts* 0,1g, acqua distillata 100 ml.

La miscela di *trace salts* contiene: magnesio solfato 5 g, manganese cloruro 0,5 g, ferro cloruro ico 0,5 g, acqua distillata 100 ml.

Questa miscela va autoclavata a 115 °C per 25 minuti e, dopo raffreddamento a circa 50 °C, addizionata con lincomicina, in modo da raggiungere una concentrazione finale di antibiotico pari a 50 mg per ml di terreno.

RICERCA DELLE VEROTOSSINE (SHIGA TOSSINE) DI *ESCHERICHIA COLI*

Oltre ai *test* citati a completamento della ricerca quantitativa di *Escherichia coli* O157:H7 (e di altri sierotipi affini, in quanto produttori di verotossine), si ricorda che esiste anche un *test* immuno-enzimatico che non identifica specificatamente le tossine VT1 e VT2, ma che consente di determinare in modo generico la presenza di verotossine o Shiga tossine prodotte da ceppi di *Escherichia coli* che non necessariamente si dimostrano enteroemorragici.

Questo *test*, che può essere impiegato a partire da campioni fecali o da filtrati di colture di ceppi batterici previamente isolati e da saggiare, si basa sul meccanismo dell'agglutinazione al lattice in micrometodo su piastra. La sensibilità dichiarata risulta pari a 1-2 ng di tossina per ml. Karmali *e Coll*. (1999) descrivono l'impiego di questo *kit*, denominato Verotox-F Assay®.

RICERCA DELLE TOSSINE PRODOTTE DA *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Attualmente, sono conosciuti sette tipi di enterotossine prodotte da *Staphylococcus aureus*, indicate con le lettere da A ad H. Secondo Notermans *e Coll*. (1995), la dose minima per causare intossicazione nell'uomo sarebbe di 0,5-5 µg di tossina.

I *kit* per questo tipo di ricerca sono particolarmente numerosi, tanto che sono state redatte delle vere rassegne sintetiche sui metodi a disposizione. Una pubblicazione ricca di informazioni sulle prospettive correnti circa la rivelazione delle enterotossine stafilococciche è quella di Su *e Coll*. (1997).

L'argomento delle tossine stafilococciche negli alimenti (e della loro dimostrazione) è stato giudicato un campo interessante di ricerca da molti anni.

Bersani *e Coll*. (1991) avevano segnalato la possibilità di trovare stafilococchi coagulasi-negativi (CNS) negli insaccati crudi, sul cui ruolo nell'insorgenza di intossicazioni rimaneva da indagare.

Anche secondo Bennett (1996) sembra che non solo i ceppi coagulasi+ siano produttori di tossina. *Staphylococcus intermedius* è stato trovato in intossicazioni da burro e da margarina ed è coagulasi-negativo. Questo Ricercatore aggiunge che le colonie tipiche isolabili su Baird-Parker sono formate, nell'89% dei casi, da ceppi enterotossigeni, i quali sono coagulasi-positivi 92 volte su 100. Per cercare di ovviare all'inconveniente dei ceppi coagulasi-negativi potenzialmente enterotossici, Bennett suggerisce di ricorrere al *test* della DNA-asi termostabile, fermo restando che il criterio più valido resta la dimostrazione della tossina nell'alimento con metodi sierologici.

Mosso *e Coll*. (1991) hanno pubblicato un confronto di diversi metodi, ricordando alcune nozioni di base importanti. Secondo questi Autori, occorrerebbero almeno 10^6 stafilococchi aurei per produrre, in 100 grammi di alimento, 100 mg di tossina, sempre che la temperatura del cibo si trovi fra +10 e +45 °C, il *p*H sia compreso fra 5 e 9, l'acqua libera (A_w) rimanga compresa tra 0,86 e 0,99 e la concentrazione di NaCl sia compresa fra lo 0 e il 10%. Infine, le tossine verrebbero distrutte dopo riscaldamento per 30 minuti a +60 °C, mentre, dopo 10 minuti a +120 °C, diminuirebbero la loro attività di un logaritmo.

Nel 1996 Pereira ha ribadito l'utilità della ricerca delle enterotossine stafilococciche, rendendo noto di aver contato in un caso di intossicazione da formaggio contaminato circa 300 milioni di stafilococchi coagulasi+ e termonucleasi+, ma con aspetto atipico su Baird-Parker. Le colonie, infatti, erano nere, piccole, senza alone lecitinasico e mucoidi. Le prove per la dimostrazione delle tossine davano risultato negativo con la tecnica dell'agglutinazione inversa passiva al lattice (RPLA), ma erano positive per enterotossina tipo H con un *test* ELISA.

L'evoluzione delle metodiche è stata in questo settore continua e ha apportato miglioramenti apprezzabili dal punto di vista strettamente operativo. Meyrand *e Coll*. (2000) hanno trovato che, nei prodotti lattiero-caseari, si ottengono risultati migliori quando, preparando l'estratto da saggiare, si precipitano le proteine con acido tricloroacetico.

L'importanza della ricerca delle tossine da stafilococco negli alimenti sospetti, a completamento delle analisi quantitative, delle conferme biochimiche e sierologiche, è stata ribadita anche da Soriano *e Coll*. (2002).

Ricerca con test RPLA

Procedura riferita, come esempio, al *kit* SET-RPLA della *Oxoid* , indicato per la ricerca delle tossine direttamente negli alimenti.

1. Sospendere 50 g di alimento sospetto in 50 ml di soluzione fisiologica sterile fredda.
2. Omogeneizzare con Stomacher.
3. Centrifugare l'omogenato a 3000 rpm per 20 minuti.
4. Filtrare parte del soprastante su un filtro a siringa da 0,45 µm, in modo da ricavare circa 5 ml di filtrato.
5. Riservare a ogni campione una piastra *microtiter* da 96 pozzetti con fondo a V, più una piastra destinata ai controlli.
6. Distribuire il diluente a 25 µl in tutte le piastre, riempiendo 5 file da 8 pozzetti per ciascuna fila.
7. Nella piastra riservata all'esame, introdurre 25 µl del campione nei pozzetti della prima colonna.
8. Nella piastra riservata ai controlli, introdurre 25 µl di ciascun controllo (formato dalle

tossine A, B, C, D) nei rispettivi pozzetti della prima colonna.

9. Con una micropipetta dotata di puntali sterili (differenti per ogni piastra), procedere alle diluizioni, trasferendo 25 µl da sinistra verso destra. Fermarsi alla penultima colonna a destra e gettare gli ultimi 25 µl. In tutti i pozzetti si trovano ora 25 µl e, nell'ottava colonna, c'è solo diluente.
10. Nella piastra riservata all'esame aggiungere, a 25 µl per pozzetto, i sieri antitossici, uno per ogni fila. Nella piastra riservata ai controlli aggiungere, su ogni fila, il siero antitossico corrispondete.
11. La quinta fila di tutte le piastre è destinata al controllo del lattice, che va distribuito a 25 µl per pozzetto.
12. Mescolare agitando delicatamente, coprire con un coperchio e incubare le piastre a temperatura ambiente per 24 ore. Per evitare l'essiccamento, collocare le piastre entro un contenitore ermetico, fornito di una fonte d'umidità (un batuffolo di cotone imbevuto d'acqua distillata).
13. Leggere le agglutinazioni fila per fila. Il campione, per essere positivo, deve sempre agglutinare a diluizioni superiori rispetto a quanto osservato nel controllo del lattice (quinta fila).

Ricerca con test ELISA

Il regolamento CE 1441/2007 per alcuni prodotti lattiero-caseari adotta la concentrazione del campione mediante dialisi, seguita dal *kit* Transia Plate SET (BioControl), come riportato da Gohier *e Coll.* (*www.affsa.fr*).

RICERCA DELLE TOSSINE PRODOTTE DA *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*

Attualmente, si conoscono 12 tipi di tossine, contraddistinti da lettere. Il tipo A è il più frequente in Europa. Due ampie rassegne sull'argomento sono state redatte da Granum (1990) e da Hatheway (1990).

I primi metodi per la dimostrazione in laboratorio delle tossine da *C. perfringens* si basavano su prove biologiche in animali da esperimento. Successivamente, i ricercatori sono passati all'infezione di colture *in vitro* di cellule Vero (Gingliano *e Coll*., 1983; Markovic *e Coll*., 1993; Borrmann *e Coll*., 1995).

Contemporaneamente, sono stati sperimentati con successo altri metodi più pratici, come l'immunodiffusione in agar-gel (Gingliano *e Coll*., 1983), l'ELISA e la *Reverse Passive Latex Agglutination* o RPLA, validi per la dimostrazione delle enterotossine nelle feci e negli alimenti (Mpamugo *e Coll*., 1995).

Ricerca con test RPLA

Procedura riferita, come esempio, al *kit* PET-RPLA della *Oxoid*, indicato per la ricerca delle tossine direttamente nelle feci o in colture batteriche isolate da feci o da alimenti.

Preparazione del campione

- Feci: un volume di feci + un volume di PBS a +4 °C. Omogeneizzare. Centrifugare a 3000 rpm per 20 minuti. Filtrare su membrana sterilizzante (0,25 o 0,45 µm). Usare il filtrato.
- Coltura isolata sviluppata in brodo CMM: Inattivare a +75 °C per 20 minuti. Trapiantare in brodo di Duncan e incubare a +37 °C per 24 ore. Centrifugare a 3000 rpm per 20 minuti. Filtrare su membrana sterilizzante (0,25 o 0,45 µm). Usare il filtrato.

Esecuzione del test

Distribuire 25 µl di diluente in due file di 8 pozzetti entro una piastra *microtiter*, saltando il pozzetto di testa.

Introdurre 25 µl del campione nel primo e nel secondo pozzetto di ciascuna fila.

Allestire le diluizioni trasferendo, da sinistra verso destra, 25 µl. Fermarsi al penultimo pozzetto ed eliminare gli ultimi 25 µl. L'ultimo pozzetto a destra contiene solo diluente.

Aggiungere a tutti i pozzetti della prima fila 25 µl di anti-tossina.

Aggiungere a tutti i pozzetti della seconda fila 25 µl di lattice di controllo.

Controlli

Ripetere, su altre due file di pozzetti, quanto è stato fatto in precedenza, con la differenza di introdurre, al posto del campione, un controllo positivo (enterotossina nota seguita da anti-tossina) e un controllo negativo (enterotossina nota seguita da lattice di controllo).

Incubazione

Mescolare delicatamente il contenuto della piastra mediante agitazione. Coprire con un coperchio e riporre in un contenitore a tenuta fornito di una sorgente d'umidità (un batuffolo di cotone bagnato con acqua distillata). Incubare a temperatura ambiente per 24 ore.

Lettura

L'agglutinazione delle particelle di lattice deve essere interpretata come risultato positivo solo se avviene a diluizione più elevata rispetto al *test* eseguito con il lattice di controllo e se i controlli positivo e negativo sono esatti.

RICERCA DELLE TOSSINE PRODOTTE DA *CLOSTRIDIUM BOTULINUM*

Per una conoscenza più approfondita sull'argomento, è consigliabile leggere la rassegna di Middlebrook *e Coll*. (1995) sull'immunodiagnosi e l'immunoterapia delle neurotossine da tetano e botulino. Secondo Notermans *e Coll*. (1995) la tossina di *C. botulinum* è una delle più potenti sostanze nocive conosciute, essendo sufficienti 0,5-5 ng per provocare la sindrome tossica nell'uomo.

Data la complessità della ricerca e la necessità di disporre di reagenti selezionati, è preferibile che questa analisi venga eseguita da laboratori specializzati. Per conoscenza, si ricordano alcune metodiche riportate in letteratura.

Takahashi *e Coll*. (1990) hanno descritto la ricerca di bassi livelli di tossina di *C. botulinum* con la prova biologica su topo, spiegando il metodo di titolazione della tossina stessa sugli animali da esperimento. Secondo questi Autori, la prova biologica su topo rivela 1 LD_{50} con l'inoculazione i.p. e 0,1 LD_{50} con l'inoculazione i.m., risultando più sensibile dei metodi eseguibili *in vitro*, tra cui ELISA, RPLA e RIA.

La tendenza ad abbandonare le prove biologiche ha spinto i Ricercatori a trovare metodi alternativi, che oggi hanno raggiunto un grado elevato di sensibilità e di specificità.

Henning *e Coll*. (1991) hanno descritto l'impiego di un *test* immuno-enzimatico (ELISA) per la dimostrazione *in vitro* delle tossine A e B.

Potter *e Coll*., (1993) hanno saggiato, su campioni di alimenti infettati, il funzionamento di un *test* in ELISA per la ricerca delle tossine A, B ed E.

Made *e Coll*. (2000) hanno adottato con successo la *Polymerase Chain Reaction* (PCR) per la ricerca dei frammenti di DNA di *C. botulinum* responsabili della produzione di tossina nel miele, descrivendo in dettaglio questa metodica.

RICERCA DELLE TOSSINE PRODOTTE DA *VIBRIO CHOLERAE*

Il comportamento anomalo di alcuni ceppi di *Vibrio cholerae* nei *test* biochimici e la comparsa di vibrioni non-O1 dotati di caratteristiche particolari hanno reso più complessa l'identificazione di questo patogeno. Sono significative, a questo proposito, alcune citazioni.

Ross (1965) descrive alcune caratteristiche di vibrioni non immediatamente inquadrabili negli schemi classici, che, sebbene non riconducibili al colera, sono stati isolati da casi di diarrea nell'uomo.

Rennels *e Coll*. (1980) esprimono le loro raccomandazioni per l'isolamento di *V. cholerae* nei laboratori clinici, basandole sulle differenze che si possono riscontrare usando terreni selettivi e non selettivi, oppure piastrando direttamente i campioni piuttosto che dopo averli sottoposti ad arricchimento.

Nath *e Coll*. (1992) danno notizia di ceppi di *V. cholerae* anomali, in quanto resistenti all'agente vibriostatico O/129.

Singh *e Coll*. (1996) negano la responsabilità dell'emolisina nell'attività enterotossica di *V. cholerae* e affermano che la maggioranza dei ceppi non-O1 è emolitica. Ancora, questi Autori asseriscono che ceppi di *V. cholerae* non-O1 isolati dall'ambiente formano tre nuovi tipi di tossine.

Infine, Calia (1996) definisce il *Vibrio cholerae* O139 un patogeno emergente.

Per questi motivi si ritiene vantaggioso, quando si isola un ceppo sospetto di *V. cholerae*, affiancare alle prove biochimiche la verifica della produzione di tossina *in vitro*.

Ricerca con test RPLA

Procedura riferita, come esempio, al *kit* VET-RPLA della *Oxoid*, indicato per la ricerca delle tossine in colture di *Vibrio cholerae* isolate da feci o da alimenti.

Nota

Date le correlazioni esistenti fra tossina CT prodotta da *Vibrio cholerae* e tossina LT formata da *Escherichia coli*, questa metodica può essere impiegata, con gli stessi reagenti, per la ricerca di quest'ultima tossina. In questo caso, è consigliabile far sviluppare il ceppo di *E. coli* da saggiare in un terreno contenente polimixina, ad esempio il brodo di Mundell.

Preparazione del campione

Coltura isolata sviluppata in acqua peptonata a *p*H 8,4 dopo incubazione a +37 °C per 24 ore. Centrifugare a 3000 rpm per 20 minuti. Filtrare su membrana sterilizzante (0,25 o 0,45 µm). Usare il filtrato.

Esecuzione del test

Distribuire 25 µl di diluente in due file di 8 pozzetti entro una piastra *microtiter*, saltando il pozzetto di testa.

Introdurre 25 µl del campione nel primo e nel secondo pozzetto di ciascuna fila.

Allestire le diluizioni trasferendo, da sinistra verso destra, 25 µl. Fermarsi al penultimo pozzetto ed eliminare gli ultimi 25 µl. L'ultimo pozzetto a destra contiene solo diluente.

Aggiungere a tutti i pozzetti della prima fila 25 µl di anti-tossina.

Aggiungere a tutti i pozzetti della seconda fila 25 µl di lattice di controllo.

Controlli

Ripetere, su altre due file di pozzetti, quanto è stato fatto in precedenza, con la differenza di introdurre, al posto del campione, un controllo positivo (enterotossina nota seguita da antitossina) e un controllo negativo (enterotossina nota seguita da lattice di controllo).

Incubazione

Mescolare delicatamente il contenuto della piastra mediante agitazione. Coprire con un coperchio e riporre in un contenitore a tenuta fornito di una sorgente d'umidità (un batuffolo di cotone bagnato con acqua distillata). Incubare a temperatura ambiente per 24 ore.

Lettura

L'agglutinazione delle particelle di lattice deve essere interpretata come risultato positivo solo se ciò avviene a diluizione più elevata rispetto al *test* eseguito con il lattice di controllo e se i controlli positivo e negativo sono esatti.

RICERCA DELLE TOSSINE PRODOTTE DA *BACILLUS CEREUS*

Al momento, l'analisi è effettuabile, nei comuni laboratori, sulla sola tossina diarroica, mentre è nota l'esistenza di un secondo tipo di tossina prodotta da *B. cereus* ad azione emetica (Granum, 1994). La ricerca, secondo quanto riportato da più parti, viene eseguita partendo da brodocolture in BHI del ceppo isolato con uno dei due metodi prevalenti, come pubblicato da Rusul *e Coll*. (1995) e da Odumeru *e Coll*. (1997). Questi Autori hanno adoperato l'immunodiffusione e l'agglutinazione passiva inversa al lattice, adottando, per le loro esperienze, rispettivamente, il *kit* VIA® Tecra e il *kit* BCET-RPLA® Oxoid.

Altri Ricercatori hanno dato la preferenza alla prova su colture cellulari, scegliendo la linea Mc Coy, che offrirebbe, rispetto ai *kit*, una maggiore specificità (Buchanan *e Coll*., 1992; Jackson, 1993). Jackson *e Coll*. (1995), tuttavia, non sono dello stesso parere, avendo osservato effetto citopatico sia con *B. cereus* che con *B. thuringiensis.*

RICERCA DELLE ENDOTOSSINE DI GERMI GRAM-NEGATIVI

Ricerca con LAL-test

La procedura descritta è riferita alle modalità d'uso contenute nel *kit* fornito da *Cape Cod* (USA).

Preparazione del campione per il test

Omogeneizzare 50 grammi di alimento in 100 ml di acqua distillata.

Riscaldare in bagnomaria per un'ora a +80 °C.

Prelevare la sola fase acquosa e centrifugarla a 5000 rpm per 30 minuti.

Prelevare 5 ml del soprastante e aggiustarne il *p*H fra 6,5 e 7,5 con 0,05 ml di NaOH 1 N. Questo è il campione da esaminare.

Prova qualitativa

Trasferire 0.5 ml di campione nella provetta del LAL-*test* destinata all'esame. Allestire i controlli negativo e positivo forniti nel *kit*. Incubare per un'ora a +37 °C in bagnomaria.

In caso positivo, si ottiene la formazione di un coagulo nel campione e nel controllo positivo.

Prova quantitativa. Calcolo del contenuto di tossina nell'alimento

Ripetere la prova allestendo, in acqua distillata, diluizioni decimali del campione (solitamente sono sufficienti le diluizioni 1:10, 1:100, 1:1000) e seminando, da ogni diluizione, quattro provette di LAL-*test*. Ripetere l'incubazione.

Calcolare il contenuto di tossina nel campione moltiplicando la sensibilità del lisato per il reciproco della media delle due ultime diluizioni positive. La quantità di tossina nell'alimento si ottiene, invece, moltiplicando ulteriormente per la diluizione iniziale del campione.

Esempio:

Sensibilità del lisato impiegato (dichiarata nel *test*) = 0,060 U.E./ml			
Diluizioni	1:10	1:100	1:1000
Provette positive	4 su 4	**3** su 4	**1** su 4
Media **31**/1000 : 4 = 0,00775			
Reciproco della media: 1/0,00775 = 129,03			
Calcolo tossina/ml di omogenato: 0,060 x 129,03 = 7,74 U.E./ml			
Calcolo tossina/g di alimento: 7,74 x 100 (ml diluente) : 50 (grammi pesati) = 15,48 U.E.			

Nota

Il LAL-*test* è stato adoperato anche come metodo rapido per valutare il grado generico di contaminazione di alcuni tipi di alimenti. Jay *e Coll*. (1979) hanno trovato corrispondenza, in carni bovine trite fresche o congelate, fra carica batterica totale e quantità di tossine da Gram-negativi.

ALTRE TOSSINE LEGATE A BATTERI: LE BIOTOSSINE MARINE

Questo argomento interessa la tossicologia, la batteriologia e la biologia marina. Ha grossi risvolti economici, perché quando si verifica un episodio clinico del genere, l'universo dei prodotti ittici subisce drammatici contraccolpi. Difatti, con l'eccezione dell'avvelenamento sgombrotossico, si tratta di malattie gravi, che non possono essere curate.

Il consumo di alimenti di origine marina è in aumento. Il pesce e i molluschi sono considerati cibi sani e vanno di moda nelle diete di tutto il mondo. Non si dice, però, che possono contenere tossine, grossolanamente divisibili in due categorie, quelle prodotte da **batteri** (avvelenamento sgombrotossico, avvelenamento da pesce palla) e quelle originate da **alghe tossiche**. Le alghe, a loro volta, interagiscono, in maniera non ancora del tutto chiarita, con i batteri, che, in definitiva, sembrano essere i veri "*killer*" della situazione.

Tutte queste tossine hanno in comune il fatto che non sono riconoscibili a tavola e che resistono ai normali procedimenti di cottura. L'unico mezzo di difesa per l'uomo è la prevenzione, praticabile attraverso l'informazione diretta ai consumatori. Non va trascurato che l'espansione del turismo consente oggi a numerose persone di raggiungere località esotiche, dove è possibile trovare, assieme ai climi tropicali dei mari, abitudini alimentari non sempre prive di rischi.

In tempi recenti, la fioritura di alghe marine che producono tossine è aumentata per frequenza, intensità e distribuzione geografica. I biologi specialisti hanno scritto che questo fenomeno è conseguenza dell'inquinamento dei mari, dell'espansione delle acquacolture, dell'eutrofizzazione legata all'aumento della temperatura, della dispersione di cisti algali con le imbarcazioni. In realtà, non esistono moltissime certezze in materia. I maggiori progressi si sono registrati, negli ultimi dieci anni, nell'identificazione della composizione chimica delle tossine stesse e nella messa a punto di metodi d'indagine di laboratorio per aiutare la

diagnostica a rivelare gli agenti eziologici.

L'Autore di queste pagine, Moira M. Brett, del Laboratorio Centrale di Sanità Pubblica di Colindale, a Londra, ha cercato di fare il punto sul problema delle intossicazioni da prodotti del mare, con una pubblicazione molto valida, apparsa su *Current Opinion in Infectious Diseases* nel 2003 (vol. 16, pagg. 461-465).

Avvelenamento sgombrotossico

Deriva da pesci della famiglia degli Sgombridi (tonno, merluzzo, bonito, sardine, acciughe, aringhe, sarde). È il tipo di avvelenamento da pesce più frequente. I sintomi sono rapidi, quasi istantanei, rappresentati da arrossamento del viso, del dorso e della parte superiore del corpo, da diarrea, da vampate di calore, da svenimento, da mal di testa, da vomito. Possono presentarsi anche nausea, bruciore in bocca con sapore metallico, dolori addominali, vertigini, palpitazioni, salivazione. La maggior parte delle intossicazioni si risolve entro 24 ore, ma i casi più gravi esigono il ricovero immediato e trattamenti con anti-istaminici. Infatti, il principale agente responsabile è l'istamina, prodotta da batteri (soprattutto Gram-negativi, ma anche Gram-positivi di origine ambientale) per azione enzimatica sull'istidina, un aminoacido naturalmente presente nel muscolo di alcuni pesci. La produzione di istamina è catalizzata dagli enzimi liberati dai batteri deterioranti (*spoilage bacteria*) e avviene a temperature di almeno +4 °C. L'inquinamento batterico è conseguenza di errori di lavorazione del pesce crudo o di contaminazioni accidentali dopo che il prodotto è stato messo in scatola.

Sindromi tossiche associate con tossine algali marine

Esistono più di 5000 specie di alghe e tra queste 40 producono potenti tossine. Pochi sanno che le alghe formano cisti che restano dormienti per anni e che esplodono in particolari condizioni ambientali. Una cisti può liberare 6000-8000 cellule algali figlie in una settimana. I molluschi bivalvi possono incamerare circa 3 grammi di alghe al giorno. Le alghe raggiungono la catena alimentare che nutre l'uomo attraverso gasteropodi, crostacei e alcuni pesci. I molluschi necessitano di meno di 24 ore per diventare tossici per l'uomo e, sebbene possano essere detossificati, il procedimento di depurazione richiede da settimane a mesi.

Avvelenamento da molluschi di tipo amnesico

L'*amnesic shellfish poisoning* (ASP) è nota dal 1987 (Canada, 100 persone interessate, di cui 14 colpite in forma grave, e 3 decessi). L'insorgenza dei sintomi è precoce, entro le 24-48 ore, e comprende vertigini, mal di testa, confusione, perdita della memoria a breve, difficoltà respiratorie, coma. La perdita della memoria può essere permanente.

Si tratta di tossine idrosolubili, il cui principale componente è l'acido domoico, prodotto da diatomee e dinoflagellati. Viene assorbito lentamente dalla mucosa intestinale ed essendo un potente inibitore dei recettori del glutammato, aumenta la permeabilità al calcio, che termina con la morte delle cellule. Le lesioni interessano l'ippocampo, l'amigdala e le vie limbiche, da cui deriva l'effetto amnesico.

L'acido domoico viene assorbito da molluschi, granchi, pesci vari (acciughe, sardine, merluzzi, pesce bandiera, alalonga, crostacei planctonici vari denominati in inglese "*krill*"). Oltre all'uomo, colpisce cormorani, pellicani e gabbiani.

Avvelenamento da azaspiracidi

Si tratta di intossicazioni a localizzazione gastro-intestinale riconosciute dopo il 1995 in Olanda, Francia, Italia, Inghilterra e causate da consumo di mitili irlandesi contaminati. Il mollusco più ricco sembra essere il *Protoperidinium* nei mari del Nord Europa. I sintomi so-

no nausea, vomito, diarrea profusa, crampi allo stomaco, con insorgenza di 6-18 ore e durata fino a 5 giorni.

Gli azaspiracidi sono distribuiti nel corpo dei molluschi e resistono fino a 8 mesi. Sono strutturalmente diversi dalle altre tossine algali. L'azapiracid-1 è un nonapoptoico con molti bersagli cellulari. Nell'uomo, riduce la concentrazione dei linfociti F, non colpisce il potenziale di membrana, modifica lo scambio del calcio dentro e fuori le cellule. Da esperimenti condotti sul topo, gli azaspiracidi provocano necrosi della lamina propria del piccolo intestino, del timo e della milza e alterazioni dei grassi nel fegato. Effetti cronici sono la polmonite interstiziale e il tumore al polmone.

Avvelenamento alimentare da molluschi di tipo diarroico

Noto come *diarrhoetic shellfish poisoning* (DSP), si manifesta con sintomi gastro-intestinali (diarrea, nausea, vomito, crampi addominali) e insorge entro 30 minuti (e fino a qualche ora) dall'ingestione di molluschi. Esistono quattro gruppi di tossine DSP: acido okadaico, dinophysis-tossine, pectenotossine, yessotossine. Le prime due sono potenti proteine che inibiscono le fosfatasi PP1 e PP2A, cosicché aumentano la fosforilazione di numerose proteine intracellulari, diventando efficaci promotori di tumori. Le yessotossine e le pectenotossine non causano diarrea, ma sono epatotossiche, soprattutto per via intraperitoneale, meno per via orale.

Le tossine DSP sono presenti in tutto il mondo nelle cozze, nelle ostriche, nei granchi.

Avvelenamento alimentare da molluschi di tipo neurotossico

La *neurotoxic shellfish poisoning* (NSP) è molto simile alla malattia conosciuta come "Ciguatera", ma meno severa e con sintomi gastro-intestinali e neurotossici. Inoltre, può essere acquisita non solo per ingestione, ma anche per inalazione di *aerosol* durante la fioritura delle alghe. Ha rapida insorgenza (1-3 ore) e dà insensibilità in bocca e alle estremità, vomito, dolori addominali, diarrea. Nei casi gravi, provoca anche tachicardia, accorciamento del respiro e convulsioni.

Le tossine NSP sono liposolubili. Si tratta di brevetossine prodotte dai dinoflagellati lungo le coste dei mari caldi, dove provocano una grande mortalità nei pesci e dove avviene l'accumulo nei molluschi. Agiscono attraverso i canali del sodio sui centri nervosi, mediate dal rilascio di aminoacidi eccitatori.

Avvelenamento alimentare da molluschi di tipo paralizzante

La *paralytic shellfish poisoning* (PSP) è una malattia mortale che si manifesta da 15 minuti a 10 ore (in genere entro le due ore) dall'ingestione di molluschi (cozze, ostriche, pettini e orecchie di mare), crostacei (compresi gamberi e aragoste), gasteropodi, che contengono la saxitossina, una proteina idrosolubile in grado di bloccare i canali del sodio nei nervi e nei muscoli. I sintomi includono paralisi dei muscoli attorno alla bocca, con estensione alla faccia e al collo, tremore alle dita, mal di testa, febbre, nausea, vomito e diarrea. La morte è dovuta ad arresto respiratorio e avviene, per lo più, entro le 24 ore. E' un'intossicazione estesa a tutto il mondo.

***Avvelenamento da* ciguatera**

La sua scoperta risale ai primi viaggi esplorativi nelle Americhe, quando i naviganti sperimentarono disturbi sensoriali simili al dolore che si prova in seguito a uno *shock* elettrico. Altri sintomi sono rappresentati da diarrea, vomito, dolore muscolare. Il tempo medio d'insorgenza è di 6 ore, variabile da pochi minuti fino a 30 ore. La mortalità è bassa, ma i postumi a carico del sistema nervoso possono persistere per mesi o anni.

Le ciguatera-tossine sono sostanze prodotte da alghe nelle barriere coralline, dove vengono inghiottite e concentrate da pesci (barracuda, pesce pappagallo, cefali ed altre specie dei mari caldi). Si tratta di potenti neurotossine di 23 differenti tipi, simili alle brevetossine, che si legano al sito 5 dei canali del sodio, aumentando il flusso intracellulare di questo ione.

Un'altra tossina del gruppo è la maitotossina, che agisce sul calcio ed è dotata di potente effetto emolitico, ictiotossico e citotossico.

ALTRE TOSSINE

Si conoscono anche tossine chiamate "a rapida azione", dal loro comportamento sul topo inoculato per via intraperitoneale. I prorocentrolidi e le pinnatossine, contenute nel bivalvo *Pinna pectinata* del Giappone, sono attivatori dei canali del calcio. Simili a queste tossine sono gli spirolidi e le gymnodimine.

Curiosamente, alcune tossine algali hanno dimostrato anche effetti farmacologici utili per l'uomo. Per esempio, gli anfidinolidi e i caribenolidi sono stati impiegati come potenti agenti citotossici anti-tumorali, le zooxantellotossine come vasocostrittori, mentre l'acido gambierdico e la gonodiomina sono validi agenti nelle infezioni da funghi.

DIAGNOSI DI LABORATORIO DELLE TOSSINE MARINE

I metodi chimici dovrebbero diventare la tecnica d'elezione. Per l'istamina oggi vale l'HPLC e la derivazione post-colonna. Si ricorda che il laboratorio batteriologico può validamente intervenire, in queste circostanze, ricercando la carica batterica totale, che risulterà molto elevata nel prodotto ittico sospettato, sia prima che dopo il confezionamento.

Le altre tossine sono rivelabili attraverso la prova biologica su topo, inoculato per via intraperitoneale. Tuttavia, per evitare di usare animali da esperimento, sono stati studiati metodi alternativi. La cromatografia liquida, abbinata alla spettrometria di massa, è stata adoperata per cercare DSP, NSP, PSP e la gymnodimina.

L'acido domoico può essere rivelato con cromatografia liquida, in ultravioletto e spettrometria di massa. Esistono in commercio anche dei metodi rapidi, che sfruttano anticorpi monoclonali in ELISA per la DSP. Infine, stanno per diffondersi metodi innovativi promettenti, ma ancora allo studio, tipo quaiaside per il gruppo delle tossine PSP.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

Bennett R.W., Atypical toxigenic *Staphylococcus* and non-*Staphylococcus aureus* species on the orizon - An update, J. Food Protect. 1996, *59*, 1123-1126

Borrmann E. *e Coll*., Nachweis von *Clostridium perfringens* toxinen auf Zellkulturen, Berl. Munch. Tierarztl. Wschr.1995, *108*, 466-470

Bersani C. *e Coll*., Osservazione sugli stafilococchi coagulasi negativi (CNS) presenti negli insaccati crudi, Ind. Alim. 1991, *30*, 12

Buchanan R.L. *e Coll*., Evaluation of the Oxoid BCET-RPLA *kit* for the detection of *Bacillus cereus* diarrhaeae enterotoxin as compared to cell culture citotoxicity, J. Food Protect. 1992, *55*, 440-443

Calia K.E., *Vibrio cholerae* O139: an emerging pathogen, Clin. Micr. 1996, *18*, 3

Ferris M. *e Coll*., Method for isolation and purification of *Cyanobacteria*, Appl. Environm. Microbiol. 1991, *57*, 1448

Gingliano L.G. *e Coll*., Detection of *Clostridium perfringens* enterotoxin by tissue culture and double gel diffusion methods, J. Med. Microbiol. 1983, *16*, 233
Granum P.E., *Clostridium perfringens* toxins involved in food poisoning, Int. J. Food Microbiol. 1990, *10*, 101-112
Granum P.E., *Bacillus cereus* and its toxins, J. appl. Bact. 1994, *76*, Symp. Suppl., 615-665
Hanning K. *e Coll*., Schnellnachweis der *Clostridium botulinum* Toxine A und B mittels Enzym-Immuno-Assay (ELISA), Arch. Lebens. 1991, *42*, 49
Hatheway C.L., Toxigenic Clostridia, Clin. Microbiol. Rev. 1990, *3*, 66-98
Jackson S.G., Rapid screening test for enterotoxin-producing *Bacillus cereus*, J. Clin. Microbiol. 1993, *31*, 972
Jackson S.G. *e Coll*., *Bacillus cereus* and *Bacillus thuringiensis* isolated in a gastroenteritis outbreak investigation, Letters in Appl. Micr. 1995*, 21*, 103-105
Jay J. *e Coll*., Comparison of homogenizing, shaking and blending on the recovery of microorganisms and endotoxins from fresh and frozen round beef as assessed by plate count and the Lymulus Amebocyte Lisate Test, Appl. Environm. Microbiol. 1979, *38*, 879-884
Made D. *e Coll*., Nachweis von *Clostridium botulinum* in Honig durch Polymerase-Ketten-reaktion, Arch. Lebens. 2000, *51*, 57-80
Markovic L. *e Coll*., In vitro effect of *Clostridium perfringens* enterotoxin on Vero cells and in vivo effects on animals, Acta Veterinaria 1993, *43*, 191-198
Meyrand A. *e Coll*., Comparaison d'une nouvelle technique d'extraction-concentration des enterotoxines staphylococciques par rapport à la méthode de référence dans les produits laitieres, Rev. Med. Vet. 2000, *151*, 205-211
Middlebrook J.L. *e Coll*., Immunodiagnosis and immunotherapy of tetanus and botulinum neurotoxins, Current Topics in Microbiology and Immunology 1995, *195*, 89-115
Mosso C. *e Coll*., Confronto di diversi metodi per la determinazione delle enterotossine stafilococciche negli alimenti, Ind. Alim. 1991, *30*, 544
Mpamugo O. *e Coll*., Enterotoxigenic *Clostridium perfringens* as a cause of sporadic cases of diarrhoea, J. Med. Microbiol. 1995, 43, 442-445
Nath G. *e Coll*., Emergence of *Vibrio cholerae* O1 resistant to vibriostatic agent O/129, Lancet 1992, *340*, 366
Notermans S. *e Coll*., The HACCP concept: specification of criteria using quantitative risk assessment, Food Microbiol. 1995, *12*, 81-90
Odumeru J.A. *e Coll*., Detection of *Bacillus cereus* diarrheal enterotoxin in raw and pasteurised milk, J. Food Protect. 1997, *60*, 1391-1393
Pereira M.L., Enterotoxin H in staphylococcal food poisoning, J. Food Protect. 1996, *59*, 559-561
Potter M.D. *e Coll*., An ELISA for detection of botulinal toxin types A, B and E in inoculated food samples, J. Food Protect. 1993, *56*, 856-861
Rennels M.B. *e Coll*., Selective vs. Non-selective media and direct plating vs. enrichment technique in isolation of *V. cholerae* : recommendations for clinical laboratories, J. Inf. Dis. 1980, *142*, 328
Ross O., Characteristics of non-cholera Vibrios isolated from cases of human diarrhoea, Bull. Org. Mond. San. 1965, *32*, 627
Rusul G. *e Coll*., Prevalence of *Bacillus cereus* in selected foods and detection of enterotoxin using TECRA-VIA and BCET-RPLA, Int. J. Food Micr. 1995, *25*, 131-139
Singh D.V. *e Coll*., Production of three new cholera toxin by environmental isolates of *Vibrio cholerae* non- O1, J. Med. Microbiol. 1996, *45*, 31-34
Singh D.V. *e Coll*., Haemolysin produced by *Vibrio cholerae* non-O1 is not enterotoxic, J. Med. Microbiol. 1996, *45*, 35-39

Soriano J.M. *e Coll*., Incidence of enterotoxigenic staphylococci and their toxins in foods, J. Food Protect. 2002, *65*, 857-860
Su Y.C. *e Coll*., Current perspectives on detection of staphylococcal enterotoxins, J. Food Protect. 1997, *60*, 195-202
Takahashi M. *e Coll*., Assay in mice for low levels of *Clostridium botulinum* toxin, Int. J. Food Micr. 1990, *11*, 271-278

CAP. 7

Controllo microbiologico di produzione nelle aziende alimentari

DETERMINAZIONE DEL pH E DELL'ATTIVITA' DELL'ACQUA

MISURAZIONE DEL pH DEGLI ALIMENTI

Il controllo del *p*H può dare utili indicazioni sulla possibile proliferazione batterica nell'alimento in esame. Normalmente, la maggior parte degli alimenti non trattati ha un *p*H debolmente acido (carne 5,4-5,8; pesce 5,7-6,6; latte 6,8-7,0), mentre *yogurt,* verdure e frutta hanno *p*H acidi (da 3,7 a 4,5).

Per molti batteri, il valore di *p*H minimo a cui si verifica la crescita è intorno a 4,5 e quello massimo intorno a 8,5. Fanno eccezione i batteri lattici, che prediligono *p*H compresi tra 4,3 e 7,2.

In caso di proliferazione batterica, il *p*H dell'alimento tende a modificarsi, assumendo valori acidi per fermentazione dei carboidrati e, successivamente, valori alcalini per azione dei batteri sulle proteine, con formazione di ammine.

Non sono considerati deperibili gli alimenti con *p*H inferiore a 4,5.

Materiale occorrente

- *p*H-metro
- Soluzioni tampone per la calibratura dello strumento a *p*H 4 e a *p*H 7.
- Acqua distillata.

Preparazione del campione

- Alimenti liquidi o omogenei densi: mescolare accuratamente servendosi, eventualmente, di un omogeneizzatore o di una spatola.
- Alimenti pastosi o solidi: omogeneizzare accuratamente, se necessario aggiungendo acqua distillata (fino a un massimo del 10-20%).
- Alimenti composti: omogeneizzare separatamente ciascun componente e procedere come al punto precedente.
- Alimenti sott'olio: eliminare la componente oleosa e omogeneizzare la parte solida operando come al punto precedente.

Nota

Gli alimenti solidi omogenei (come la carne, oppure il formaggio) possono essere misurati direttamente per infissione dell'elettrodo nel prodotto. È necessario disporre dell'elettrodo specifico.

Determinazione

- Calibrare l'apparecchio, opportunamente pre-riscaldato, utilizzando una delle due soluzioni tampone di riferimento (e, precisamente, quella con valore più vicino al *p*H dell'alimento da misurare).
- Portare l'alimento a temperatura ambiente (20-25 °C).
- Effettuare una sola misurazione per gli alimenti liquidi o densi omogenei e tre misurazioni per tutti gli altri (calcolando poi la media aritmetica).
- Annotare il risultato con una sola cifra decimale, indicando la temperatura di misurazione.
- Lavare con acqua distillata[1] l'elettrodo e mantenerlo immerso in tampone a *p*H 7.

MISURAZIONE DELL'ATTVITÀ DELL'ACQUA (A_W) NEGLI ALIMENTI

Com'è noto, i microrganismi necessitano di acqua effettivamente a disposizione (detta "acqua libera") per moltiplicarsi. L'acqua di un determinato prodotto viene quantitativamente espressa come "attività dell'acqua" (A_w) di quel prodotto e tale parametro ha un valore compreso tra 0 e 1. All'acqua pura viene assegnato un valore di A_w pari a 1.

Prodotti che contengono sostanze che legano l'acqua (ad esempio sali o zuccheri) hanno valori di A_w tanto più bassi quanto più elevata è la concentrazione di tali sostanze leganti. Ulteriori abbassamenti dell'A_w si possono ottenere mediante trattamenti fisici (surgelamento, affumicatura).

La maggior parte dei microrganismi cresce fino ad A_w di 0,92, mentre i lieviti sopportano valori di A_w fino a 0,87 e le muffe fino a 0,80. I germi cosiddetti "alofili" o "alotolleranti" arrivano a crescere fino ad A_w di 0,60.

Alimenti con A_w basse (inferiori a 0,90) sono praticamente inalterabili (salami stagionati, formaggi duri stagionati, pesce secco salato, frutta secca, marmellate, latte in polvere). Le prescrizioni di legge considerano non deteriorabili gli alimenti con A_w inferiore a 0,85.

Materiale occorrente

- Analizzatore per A_w
- Soluzione *standard* per la calibratura dell'apparecchio

Preparazione del campione

Portare il campione a una temperatura compresa tra i 20 ed i 25 °C.

Tagliare il campione in piccoli frammenti, in quantità da poter riempire il porta-campioni dell'analizzatore (solitamente sono sufficienti circa 5 grammi).

Determinazione

Calibrare l'apparecchio con la soluzione apposita, seguendo le istruzioni fornite dalla casa costruttrice dello strumento (è consigliabile verificare settimanalmente la corretta calibratura).

Introdurre il campione nel porta-campioni e chiudere.

Attendere circa 1 ora prima di procedere alla lettura.

Il valore dell'A_w è influenzato dalla temperatura del campione, in quanto aumenta di 0,002 per ogni grado tra 20 e 25 °C e diminuisce di 0,002 sotto i 20 °C (fino a +15 °C).

[1] *Utilizzare acqua distillata di recente produzione, al fine di evitare che abbia assorbito anidride carbonica dall'aria, mantenendola in recipienti di plastica (per evitare l'assorbimento di ioni dal vetro).*

SOSTANZE INIBENTI

Definizione

Sostanze naturali (acidi organici, lisozima, enzimi vegetali, ecc) o artificiali (disinfettanti, antibiotici, chemioterapici, ecc) capaci di impedire la crescita dei batteri.

L'analisi per via microbiologica si avvale di particolari ceppi batterici (detti "germi-*test*") sui quali saggiare l'effetto inibente, attraverso la valutazione di aloni d'inibizione prodotti su determinati terreni agarizzati.

Avvertenza

Questa ricerca serve a dimostrare principalmente i residui di farmaci (per lo più antibiotici e chemioterapici) negli alimenti. Si tratta di sostanze impiegate in medicina veterinaria a scopo terapeutico o in zootecnia a scopo auxinico (promotori della crescita). Essa non rientra nelle analisi microbiologiche propriamente dette, ma spesso in campo alimentare le affianca per i seguenti motivi:

- la presenza di sostanze inibenti è comunque indesiderabile, a causa degli effetti nocivi a breve o lungo termine sulla salute;
- i residui di farmaci antibatterici possono invalidare l'esito delle analisi microbiologiche, mascherando la presenza di germi, anche patogeni, che non crescono più sui terreni.

Le sostanze inibenti possono essere ricercate con metodi chimici, immunoenzimatici e microbiologici. Questi ultimi sono in genere molto sensibili e meno costosi degli altri, per cui vengono preferiti soprattutto in fase di *screening* iniziale sui campioni.

Molti metodi sono stati tentati per elevare ad un livello ottimale la ricerca dei residui nelle carni. Nei *test* di natura microbiologica, le variabili da sondare erano, essenzialmente, il tipo di terreno e la qualità del germe-*test*.

Gudding (1976) ha usato il terreno Mueller-Hinton Agar con bromocresolporpora assieme a tre microrganismi: *Micrococcus luteus*, *Bacillus stearothermophilus* e *Bacillus megaterium*.

Nouws (1981) ha mantenuto il *Bacillus subtilis* BGA, ma lo ha utilizzato in associazione con un Agar a *p*H 7.

Singer *e Coll*. (1985), per risolvere la scarsa sensibilità al cloramfenicolo dei metodi microbiologici, hanno impiegato la *Sarcina lutea*.

Roth *e Coll*. (1986), per la dimostrazione dei residui di ossitetraciclina nel miele, hanno scelto il terreno Agar n° 8 (Difco) e il *Bacillus cereus*.

Dornheim *e Coll*. (1986) hanno proposto il terreno Iso-Sensitest Agar a *p*H 7,2 con incluso il trimethoprim in concentrazione pari a 0,05 µg/ml e in combinazione con il *Bacillus licheniformis* ceppo 71.

Plakas *e Coll*. (1991), per la determinazione dei residui di ampicillina nel pesce, hanno adottato il *Bacillus stearothermophilus*.

Hildebrandt *e Coll*. (1986), per rilevare i sulfamidici, hanno addizionato al terreno Standard II Agar lo 0,1% di potassio fosfato monobasico.

Aureli *e Coll*. (1996), per il riconoscimento precoce di alcune molecole, hanno provato ad aggiungere alla miscela agar+germi (*Bacillus subtilis* oppure *Bacillus stearothermophilus*) le seguenti sostanze: PAB (per i sulfamidici), cisteina (per streptomicina), penicillinasi (per le penicilline), cefalosporinasi (per le cefalosporine).

Ferrini *e Coll*. (1997) hanno usato un *test* a piastre multiple per la dimostrazione e l'identificazione presuntiva nelle carni di beta-lattamici, sulfamidici, streptomicina e tetraciclina.

Buick *e Coll*. (2000) hanno presentato una prova in piastra *microtiter*. I pozzetti ricevono

un terreno al trimethoprim supplementato con p-nitrofenil-beta-D-glucopiranoside in cui il campione reagisce verso le spore di *Bacillus subtilis* per 4,5 ore a +37 °C, prima di poter leggere l'eventuale effetto inibitorio con uno spettrofotometro.

Nel novero di altri metodi, sorti con lo scopo di sostituire o di integrare la via microbiologica, si ricordano brevemente l'elettroforesi (Koenen-Dierick *e Coll*., 1987), i *test* radioimmunologici (Hebel, 1975), la cromatografia (Kruzik *e Coll*., 1990), i *test* immuno-enzimatici (Nouws *e Coll*., 1987; Singh *e Coll*., 1989; Lang *e Coll*., 1992; Martelbauer, 1992).

In conseguenza del grande numero di campioni da esaminare e della necessità di operare il più vicino possibile alla raccolta, il problema della ricerca dei residui di antibiotici nel latte è stato affrontato ricorrendo a metodi rapidi reperibili in commercio. Prove comparative, che hanno dato esiti soddisfacenti con tutti i prodotti saggiati, sono state fatte da Senyk *e Coll*. (1990) sui *test* più diffusi in tutto il mondo (Delvotest P, Charm II, Penzyme Farm, Penzyme Lab III, Angenics Spot Test).

Alcuni cenni storici

I due metodi qui illustrati traggono origine da esperienze maturate in Germania da una serie di Autori, fra i quali i più rappresentativi sono, rispettivamente, sulle carni Gisske *e Coll*. (1970), Levetzov (1971 e 1974) e sul latte Kraack *e Coll*. (1967) e Terplan *e Coll*. (1969 e 1973).

I lavori scientifici sulle carni, in particolare quelle ottenute da animali abbattuti d'urgenza (BU), hanno generato un metodo divenuto norma di legge (AB.A, 1974) definito *Allgemeiner Hemmstoffentest,* poi entrato nel novero delle analisi eseguite di *routine* nella RFD (Gemmer, 1975). Questo metodo, originalmente basato sull'uso del *B. subtilis* BGA e di due terreni a *p*H 6 e *p*H 8, è stato poi preso ad esempio per creare delle varianti dotate di maggior sensibilità verso le sostanze più difficili da dimostrare, come il cloramfenicolo e i sulfamidici.

Bogaerts *e Coll*. (1980) ed Ebrecht (1982) hanno ristretto i terreni a uno solo, a *p*H 7,2, includendo nella composizione il trimethoprim, che fa aumentare fino a 100 volte la sensibilità del *test* ai sulfamidici.

Zavanella *e Coll*. (1980 e 1985) hanno aggiunto glucosio, cloruro di sodio e potassio fosfato monobasico al terreno base contenente trimethoprim e *B. subtilis* BGA. Inoltre, hanno suggerito di introdurre nelle piastre una membrana da dialisi per distinguere le sostanze inibenti aspecifiche naturali (vedi particolari al metodo proposto n° 1).

Schramm *e Coll*. (1994) in Olanda hanno variato il metodo, orientandolo all'esame del rene (organo filtrante spia di trattamenti pregressi) e portando a tre le piastre (*Niederländischen Nierentest*).

Ellerbroek (1998) ha confermato, all'interno dello stesso metodo olandese, la validità della piastra a *p*H 7,2 preparata con Standard Agar II (Merck) per la rilevazione dei sulfamidici.

Complessivamente, poche sono state, invece, le modifiche apportate al metodo per i residui nel latte, che, peraltro, ha aperto la strada alla realizzazione di molti *kit* diagnostici nati in tempi successivi (Vilim *e Coll*., 1979).

1. METODO CON *BACILLUS SUBTILIS*

(per carni e altri prodotti alimentari, ad eccezione del latte e derivati)

- Piastra Petri di terreno per sostanze inibenti
- Aggiunta di un frammento del campione
- Incubazione a 37 °C x 18-24 ore
- Osservazione di eventuale alone d'inibizione
- Ripetizione della prova in piastra con membrana da dialisi

Materiale richiesto

- Piastre Petri sterili monouso.
- Terreno Nutrient Agar addizionato di glucosio allo 0,4%, di sodio cloruro all'1%, di potassio fosfato monobasico allo 0,1% e, dopo autoclavatura, di trimethoprim 0,05 µg/ml.
- Soluzione sterile di trimethoprim (1 mg/ml in etanolo) diluita 1/200 in acqua distillata.
- Sospensione di spore di *Bacillus subtilis* (BGA) con concentrazione pari a 10^6 spore/ml.
- Dischetti di controllo con diametro 6 mm contenenti, rispettivamente, penicillina 10 U.I., streptomicina 10 µg, sulfadiazina 0,25 mg (dischetti per antibiogramma).
- Piastre Petri con membrana da dialisi.

Esecuzione

Preparare le piastre di Petri di terreno per sostanze inibenti, aggiungendo al terreno Nutrient Agar i seguenti ingredienti: glucosio 0,4%, sodio cloruro 1%, potassio fosfato monobasico 0,1%. Dopo autoclavatura e raffreddamento a circa 50 °C, aggiungere una soluzione di trimethoprim all'1% (concentrazione finale del trimethoprim nel terreno 0,05 µg/ml) e una sospensione di spore di *Bacillus subtilis* (BGA) (concentrazione finale pari a 10^4 spore/ml).

Controllare ed eventualmente aggiustare il *p*H finale del terreno a 7,2.

Trasferire, in doppio, due frammenti del campione in esame su una piastra di terreno per sostanze inibenti.

Incubare la piastra non capovolta a 37 °C per 18-24 ore.

Controllo di qualità

Per ogni partita di terreno destinato alla ricerca delle sostanze inibenti, allestire un controllo di qualità, determinando la sensibilità del *B. subtilis* BGA verso penicillina, streptomicina e sulfadiazina e verificando che i relativi aloni di inibizione attorno ai dischetti di controllo seminati abbiano un diametro minimo, rispettivamente, di 38-42 mm, 22-25 mm, 44-47 mm.

Interpretazione

Osservare l'eventuale presenza di un alone d'inibizione attorno al frammento del campione e considerare positivi gli aloni d'inibizione con spessore uguale o superiore a 2 mm.

Qualora l'esito fosse positivo, ripetere la prova utilizzando una piastra Petri con membrana da dialisi.

La comparsa di inibizione su entrambi i lati della membrana da dialisi conferma *il sospetto di positività alle sostanze inibenti per via microbiologica* (attraverso la membrana da dialisi, infatti, passano solamente le sostanze a basso peso molecolare, come gli antibiotici).

Nota importante

I risultati sospetti positivi per sostanze inibenti, vista la possibilità di falsi positivi dovuti a sostanze a basso peso molecolare diverse dagli antibiotici (ad esempio, l'acido lattico, disinfettanti, ecc), che determinano la formazione di aloni di inibizione e attraversano la membrana da dialisi, vanno confermati con metodi chimici.

Le analisi chimiche *quantitative* sono inoltre necessarie in tutti i casi di positività sospetta con il metodo microbiologico, dato che la legge vigente prevede delle soglie di tolleranza per determinati antibiotici in specifici organi animali.

2. METODO CON *BACILLUS STEAROTHERMOPHILUS VAR. CALIDOLACTIS* *(per latte e derivati del latte)*

- Piastra Petri di terreno Antibiotic agar *p*H 6,6
- Aggiunta di un dischetto imbibito con il campione
- Incubazione a 60 °C x 3 ore
- Osservazione di eventuale alone d'inibizione

Materiale richiesto

- Dischetti di cellulosa con diametro 13 mm.
- Dischetti di controllo contenenti penicillina (10 U.I.) , streptomicina (10 µg), gentamicina (10 µg).
- Piastre Petri di terreno Antibiotic Agar *p*H 6,6 inoculato con spore di *B. stearothermophilus var. calidolactis*, in modo da ottenere una concentrazione finale di circa 10^6 spore/ml di terreno.

Esecuzione

Porre due dischetti in una piastra di Petri vuota sterile.

Imbibire entrambi i dischetti con 0,1 ml del materiale liquido in esame (latte, oppure campione omogeneizzato mediante diluizione 1/3 in acqua distillata sterile o in soluzione di Ringer 1/4 concentrata sterile).

Dopo aver allontanato l'eccesso di liquido, deporre i dischetti sulla superficie di una piastra di Antibiotic Agar a *p*H 6,6, esercitando una leggera pressione per garantire un buon contatto tra agar e dischetto.

Trasferire, su ciascuna piastra utilizzata, un dischetto di controllo positivo contenente penicillina.

Incubare le piastre non capovolte a 60 °C per circa 3 ore.

Controllo di qualità

Per ogni partita di terreno preparata, allestire un controllo di qualità, determinando la sensibilità di *B. stearothermophilus var. calidolactis* verso penicillina, streptomicina, gentamicina e verificando che i relativi aloni d'inibizione abbiano un diametro minimo, rispettivamente, di 36-42 mm, 16-18 mm, 15-19 mm.

Interpretazione

L' eventuale presenza di un'alone d'inibizione attorno al dischetto è indicativa di un potere antibatterico residuo nel campione in esame.

Nota importante

I campioni risultati sospetti positivi per sostanze inibenti mediante il metodo microbiologico devono essere confermati con metodi chimici quantitativi, per le ragioni già esposte a proposito delle analisi con *B. subtilis* BGA.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

AB.A, Rückstandsuntersuchung. Norme di legge nella RFD sui controlli per antibiotici, estrogeni e tireostatici in carni destinate all'esportazione, Zeitschr. Lebens. Unters. 1974, *155*, 8

Aureli P. *e Coll*., Presumptive identification of sulphonamides and antibiotic residues in milk by microbial inhibitor test, Food Control 1996, *7*, 165

Bogaerts R. *e Coll*., A standardized method for the detection of residues of antibacterial substances in fresh meat, Fleischwirtsch. 1980, *60*, 672

Buick R.K., A microtitre plate assay for the detection of antibiotics in porcine urine, Analyst 2000, *125*, 395-396

Bulletin IDF n. 258/1991, Section 1. Detection of inhibitors

Division of Microbiology - Center for Food Safety and Applied Nutrition - U.S. FDA - Bacteriological Analytical Manual, 6th edition, Association of Official Analytical Chemists, Arlington, 1984, 22.01-22.07

Dornheim O. *e Coll*., Untersuchungen zum biologischen Sulphonamid-nachweis. II. Uberprufung von Teststamm-Nährboden Kombinationen an biologischem Material, Fleischwirtsch. 1986, *66*, 1169

Ebrecht A., Verbesserung des Hemmstofftest durch Zusatz von Trimethoprim zum nachweis von Sulfonamiden, Arch. Lebens. 1982, *33*, 109

Ellerbroek L., Närbodeneinflüsse auf die Nachweisempfindlischkeit von *Bacillus subtilis* BGA gegenüber Sulfonamiden in Dreiplattentest (DPT) gem. VwVFIHG, Arch. Lebens. 1998, *40*, 27

Ferrini A.M. *e Coll*., The combined plates microbial assay (CPMA) technique for the detection and presumptive identification of beta-lactam, sulfonamide, streptomycin and tetracycline residues in meat, Arch. Lebens. 1997, *48*, 121-144

Gemmer H., Erste Erfahrungen mit den in der AB.A zum Fleischbeschaugesetz vorgeschriebenen Untersuchungsverfahren zur Rückstandsanalytik, Arch. Lebens. 1975, *26*, 52

Gisske W. *e Coll*., Allgemeiner Hemmstoffnachweis bei normal geschlachteten, tauglich beurteilten Kalbern, Schweinen und Rindern, Arch. Lebens. 1970, *21*, 25

Gudding R., An improved bacteriological method for the detection of sulphonamide residues in food, Acta Vet. Scand. 1976, *17*, 458-464

Hebel R.D., Radioimmunoassay: Metodik und Einsatzmöglichkeit in der Lebensmitteluntersuchun- gen, Fleiscwirtsch. 1975, *6*, 812

Hildebrandt G. *e Coll*., Untersuchungen zum biologischen Sulphonamid-nachweis. I. Auswahl einer geeigneten Teststamm-Nährboden Kombination, Fleischwirtsch. 1986, *66*, 1039

Koenen-Dierick K. *e Coll*., Screening method for identifiyng antibiotic residues in slaughter animals, Arch. Lebens. 1987, *38*, 128

Kraack J. *e Coll*., Brillantschwartz-Reduktiontest mit *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* zum nachweis von Hemmstoffen in der Milch, Milchwissenschaft 1967, *22*, 669

Kruzick P. *e Coll*., Uber den Nachweis und die Bestimmung antibiotisch wirksamer Substanzen in Lebensmitteln tierischen Herkunft: Sulfonamide, Nitrofurane, Nicarbazin, Tetracycline, Tylosin und Chloramphenicol, Wiener Tier. Monat. 1990, *77*, 141-146

Lang B. *e Coll*., Ein enzymimmunologischer Nachweis von Tetracyclinen in Milch, Arch. Lebens. 1992, *43*, 73-96

Levetzov R., Untersuchungen auf Hemmstoffe im Rahmen der bakteriologischen Fleischuntersuchung (BU), Bundesgesundheitsblatt 1971, *14*, 211

Levetzov R. *e Coll*., Zur Rückstandsuntersuchung im Rahmen der amtliscen Fleischuntersuchung, Schlacht Viehof Zeitung 1974, *74*, 329

Martelbauer E., Enzimimmunoassays in der Rückstands-analytik Entwicklung und Characterisierung, Arch. Lebens. 1992, *43*, 25-48
Nouws J.F.M., Tolerance and detection of antimicrobial residues in slaughtered animals, Arch. Lebens. 1981, *32*, 97
Nouws J.F.M. *e Coll*., Monitoring slaughtered animals for chloramphenicol residues by an immunoassay test kit, Arch. Lebens. 1987, *38*, 9
Plakas S.M. *e Coll*., *Bacillus stearothermophilus* disk assay for determining ampicillin residues in fish muscle, J. AOAC 1991, *74*, 910
Roth l.A. *e Coll*., Use of a disk assay system to detect oxytetracycline residues in honey, J. Food Protect. 1986, *49*, 436-441
Schramm G. *e Coll*., Mikrobiologischer Hemmstoffnachweis in Fleisch. 2. Experimenteller Vergleich des neuen Niederländischen Nierentest mit dem Dreiplattentest, Fleischwirtsch. 1994, *74*, 649-652
Senyk G. *e Coll*., Comparison of rapid test used to detect antibiotic residues in milk, J. Food Protect. 1990, *53*, 158-164
Singer C.J. *e Coll*., Microbiological assay for chloramphenicol residues, J. AOAC 1985, *68*, 1037
Singh P. *e Coll*., Enzime immunoassay for screening of sulfamethazine in swine, J. Agriculture and Food Chemistry 1989, *37*, 109
Terplan G. *e Coll*., Der Nachweis von Hemmstoffen in der Milch mit *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* im Agardiffusiontest und TTC-Schnelltest, Arch. Lebens. 1969, *20*, 279
Terplan G. *e Coll*., Zur Abgrenzung unspezifischer Hemmungen von *B. stearothermophilus* var. *calidolactis* beim Nachweis von Hemmstoffen in Lebensmitteln tierischen Ursprungs (vorläufige Mitteilung), Arch. Lebens. 1973, *24*, 90
Vilim A.B. *e Coll*., Microbiological determination of penicillin G, ampicillin and cloxacillin residues in milk, J. AOAC 1979, *62*, 1247
Zavanella M. *e Coll*., Differenziazione di sostanze inibenti specifiche ed aspecifiche in alimenti di origine animale, Arch. Vet. It. 1980, *31*, 157-161
Zavanella M., Aureli P., Improved microbiological method in chemioantibiotic residues detection test for meat products, 9th International Symposium of World Association of Veterinary Food Hygienists (WAVFH) , Budapest, 26-30 agosto 1985

STERILITÀ DELLE CONSERVE IN SCATOLA

Il metodo proposto

- Campione minimo composto da sei scatole
- Su tre scatole, determinazione immediata della CBT mesofila aerobia e della CBT mesofila anaerobia
- Incubazione delle altre tre scatole a 37 °C x 14 giorni (se con pH <4,5), oppure a 37 °C x 21 giorni (se con pH >4,5)
- Al termine dell'incubazione, nuova determinazione della CBT mesofila aerobia e della CBT mesofila anaerobia
- Confronto tra i conteggi effettuati prima e dopo l'incubazione delle scatole
- Esito sfavorevole se il conteggio dopo incubazione risulta 100 volte superiore al conteggio iniziale

Materiale richiesto

Come per la conta batterica totale. Per la determinazione della carica anaerobia mesofila, si utilizza, al posto del terreno Plate Count Agar, il BHI Agar, preparato con Brain Hearth Infusion (BHI) più agar-agar per batteriologia all'1,5 %. E' richiesta, inoltre, la disponibilità di sistemi generatori di gas per anaerobiosi e di contenitori per anaerobiosi (giara fino a 10 piastre, buste fino a due piastre).

Esecuzione

L'esame completo può essere espletato solamente se il campione da analizzare è composto da almeno sei scatole. Tre scatole vengono aperte subito e il loro contenuto esaminato per la determinazione della CBT mesofila aerobia e anaerobia.

A tal fine, dopo accurata pulizia e sterilizzazione della superficie esterna (è sconsigliata la flambatura con il *bunsen*, specialmente se dovessero esserci segni di bombaggio) e successiva apertura delle tre scatole, realizzata mediante apriscatole sterile e operando sotto cappa a flusso laminare, si procede secondo quanto descritto a proposito della conta batterica totale mesofila, avendo cura di prelevare, da ognuna di esse, una quantità approssimativamente uguale di contenuto.

Nel caso della CBT anaerobia, si seguono i metodi di semina Pour Plate o Surface Spread Plate, impiegando come terreno colturale il BHI Agar. Dopo la semina, la superficie delle piastre dovrà essere ricoperta con uno strato del medesimo terreno e le piastre andranno poi incubate, capovolte, a 30 °C per 3 giorni, in condizioni di anaerobiosi.

Le rimanenti tre scatole devono essere sottoposte a un periodo d'incubazione, variabile a seconda del tipo di prodotto:

- prodotti acidi (*p*H <4,5): 37 °C per 14 giorni.
- prodotti non acidi (*p*H >4,5): 37 °C per 21 giorni.

Al termine di tale periodo, le scatole vanno aperte e il loro contenuto esaminato per la determinazione della CBT mesofila aerobia e anaerobia, in maniera del tutto analoga a quanto sopra indicato.

Interpretazione

Il rilievo di una differenza superiore a due potenze decimali tra i conteggi effettuati prima e dopo il periodo d'incubazione delle scatole è indicativo di un'insufficiente procedura di sterilizzazione.

Nota applicativa

Si ricorda che, per un esame più completo, da effettuarsi comunque in caso di sospetta contaminazione o di alterazione delle confezioni, è consigliabile procedere anche al conteggio delle ***spore aerobie e anaerobie***, eseguibile trattando l'omogenato per 1 ora a temperatura ambiente con alcool etilico assoluto (sterilizzato per filtrazione), nel rapporto di 1/1 omogenato/alcool. Seguono, quindi, l'allestimento delle diluizioni decimali e la semina in piastra, secondo quanto già riportato per la conta mesofila aerobia e anaerobia, tenendo conto, nell'interpretazione dei risultati, della diluizione al raddoppio realizzata con l'aggiunta dell'alcool.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

SCHWEITZ. LEBENSMITTELBUCH. Zweiter Band - Ringbuch V . Kapitel 56 "Mikrobiologie", 1988, 8.100/1-8.100/3

CONTROLLI SU AMBIENTI DI LAVORAZIONE DEGLI ALIMENTI

Analisi quantitative

Sono applicabili all'esame dell'aria ambiente, dell'acqua e delle superfici di lavorazione (sia durante le fasi di lavorazione, che prima dell'inizio delle lavorazioni)

1. ESAME DELL'ARIA AMBIENTE

Nell'ambiente da monitorare, si dispongono, opportunamente posizionate, coppie di piastre Petri contenenti, rispettivamente, i terreni Plate Count Agar (PCA) per la carica batterica totale e Sabouraud Dextrose Agar per i miceti. I coperchi delle piastre vengono spostati lateralmente, in modo da lasciare scoperta la superficie dei terreni, per un periodo di 20 minuti. Durante la campionatura dell'aria, bisogna evitare di transitare nel locale.

Trascorso il tempo previsto, le piastre vengono richiuse. Le piastre di PCA vengono incubate a 30 °C per 72 ore, mentre quelle di Sabouraud Dextrose Agar vengono poste a temperatura ambiente (20 -25 °C) per 5 giorni. La media delle colonie calcolata su tutte le piastre contenenti lo stesso terreno, rapportata al volume dell'ambiente esaminato, permette di determinare la quantità di microrganismi per metro cubo d'aria.

Interpretazione

È consigliabile fare alcune stime, con frequenza stagionale, nelle condizioni migliori di operatività dell'azienda. I valori raccolti permetteranno di costruire uno "*standard*" interno, da adoperare come termine di paragone per le analisi successive. Sarà in questo modo possibile rilevare scostamenti dalla linea ideale dello "*standard*" e, di conseguenza, accertate le cause dell'inconveniente, mettere in pratica le opportune azioni correttive.

La contaminazione microbica normalmente reperibile in uno stabilimento può raggiungere i 1.000 germi per metro cubo nei reparti di lavorazione e i 10.000 germi per metro cubo nei magazzini.

2. ESAME DELL'ACQUA

I criteri di valutazione di potabilità dell'acqua sono stati variati con il D.L. 2 febbraio 2001 n. 31 (si vedano le normative riportate nel Capitolo 8). Rispetto alle precedenti norme, qui descritte, questo decreto legge, che recepisce una direttiva comunitaria, prevede un minor numero di analisi per le acque non confezionate. Si è ritenuto utile, almeno in questo caso, non dimenticare le vecchie regole, considerato che per anni esse hanno contribuito a fornire un ampio e significativo criterio di valutazione microbiologica ai fini del giudizio (più severo) sulla potabilità.

Materiale richiesto

- Piastre Petri sterili di 9 cm di diametro
- Terreno PCA fuso
- Filtri con membrana da 0,45 µm
- Piastra Petri di terreno m-ENDO Agar
- Piastra Petri di terreno m-FC Agar

- Piastra Petri di terreno KF-Streptococcus Agar
- Provettoni sterili
- Terreno SFP fuso

Esecuzione

Carica batterica a 37 e 22 °C

Il campione viene seminato a 1 ml in 6 piastre Petri vuote con diametro di 9 cm.

Si aggiunge il terreno Plate Count Agar (PCA), autoclavato e mantenuto fuso a 50 °C in bagnomaria, in ragione di 15 ml per piastra.

Dopo solidificazione a temperatura ambiente, 3 piastre vengono incubate, capovolte, a 37 °C per 48 ore e le altre 3 piastre vengono incubate a 22 °C per 72 ore.

Si contano le colonie su ciascun gruppo di 3 piastre e si calcola la media.

Coliformi totali, coliformi fecali, streptococchi fecali

Per ciascuna ricerca, vengono versati, in appositi contenitori, 100 ml di acqua, che vengono poi filtrati per aspirazione attraverso membrane da 0,45 µm. Ciascuna membrana viene prelevata con una pinza sterile e deposta sulla superficie dei terreni specifici preparati in piastre Petri, come sotto riportato.

RICERCA	TERRENO	INCUBAZIONE	COLONIE
Coliformi totali	m-ENDO Agar	37 °C x 24 ore	rosse
Coliformi fecali	m-FC Agar	44 °C x 24 ore	blu
Streptococchi fecali	KF- Streptococcus Agar	37 °C x 24 ore	rosse

Spore di clostridi solfito-riduttori

Vengono ripartiti 100 ml di acqua in 10 provettoni vuoti. Dopo pasteurizzazione in bagnomaria a 80 °C per 10 minuti, a ogni provettone vengono aggiunti 20 ml di terreno SFP autoclavato e raffreddato a 50 °C. I provettoni con il terreno solidificato vengono incubati in termostato a 37 °C per 48 ore. Si contano, quindi, le colonie nere di diametro superiore a 3 mm che sviluppano in profondità.

Interpretazione

L'acqua, per essere potabile dal punto di vista microbiologico, deve soddisfare ai seguenti requisiti determinati mediante analisi:

PARAMETRI FONDAMENTALI	LIMITI DI ACCETTABILITA'
Carica batterica a 37 °C	10 colonie/ml
Carica batterica a 22 °C	100 colonie/ml
Coliformi totali, coliformi fecali, streptococchi fecali	0/100 ml
Spore di clostridi solfito-riduttori	0/100 ml

Nota

Per giudicare un'acqua "potabile", non sono sufficienti le analisi microbiologiche, ma vanno eseguiti anche gli accertamenti fisici e chimici del caso.

3. ESAME DELLE SUPERFICI DI LAVORAZIONE

Superfici esaminate durante la lavorazione

Per ogni punto prescelto per l'esame, si consiglia di delimitare, mediante maschera sterile, una superficie piana e asciutta, di area nota (ad esempio, 10 cm x 10 cm, oppure 5 cm x 5 cm).

Su questa superficie, strofinare un ***tampone sterile***, inumidito, prima dell'uso, con una piccola quantità di soluzione diluente sterile (ad esempio soluzione di Ringer 1/4 concentrata o soluzione fisiologica peptonata), oppure bagnato con il terreno di trasporto allegato al tampone stesso.

Trasportare le provette contenenti i tamponi in laboratorio in condizioni di refrigerazione (massimo + 4 °C).

Per l'analisi, trasferire il tampone in una provetta contenente un volume noto di diluente (per esempio, 5 ml) e agitare accuratamente per mandare in sospensione i germi adesi.

Da questa sospensione iniziale, inoculare due piastre Petri di terreno agarizzato con volumi di 0,5 ml e altre due piastre con volumi di 0,1 ml. Distribuire gli inoculi su tutta la superficie del terreno con l'aiuto di una spatola sterile.

Se si presumono contaminazioni elevate, allestire dalla sospensione iniziale le opportune diluizioni decimali in soluzione di Ringer 1/4 concentrata, da seminare su piastre Petri con gli opportuni terreni.

Il numero di microrganismi rilevati viene espresso per centimetro quadrato, moltiplicando il numero delle colonie contate per il reciproco della diluizione letta, per il reciproco del volume seminato sulle piastre e per il volume, in millilitri, della soluzione diluente iniziale e dividendo poi il risultato per l'area, in centimetri quadrati, della superficie esaminata.

Interpretazione

La valutazione della carica microbica durante la lavorazione in una determinata azienda va confrontata con dati precedenti di quella stessa realtà (ottenuti nelle condizioni ottimali) presi come riferimento.

Alcuni dati orientativi sono riportati da più parti, come, ad esempio, dalle indicazioni pubblicate su Produrre Bene e Igienicamente (2005):

Valori-guida di carica microbica totale (in u.f.c. a +37 °C) per superfici analizzate durante la lavorazione degli alimenti. I valori sono espressi come numero di germi per cm²

Pavimenti	Pareti	Recipienti	Piani di lavoro	Giudizio
<25	<15	<15	<5	Buono
26-50	16-25	16-25	6-15	Accettabile
>50	>25	>25	>15	Insufficiente

Superfici esaminate prima dell'inizio delle lavorazioni

Il controllo dello stato igienico delle superfici *lavate e sanitizzate* può essere valutato anche con il sistema delle *piastre a contatto*, consistente nel far aderire per pochi secondi al piano da esaminare una piastra Petri riempita completamente con un terreno agarizzato, che raccoglie per impronta la distribuzione delle cellule batteriche presenti sulla superficie stessa e che mostra sul fondo una quadrettatura a maglie da 1 cm. La piastra a contatto *standard* ha una superficie di 24 cm^2.

Dopo incubazione a 37 °C per 48 ore, sulle piastre sarà possibile contare direttamente, sulla base del numero delle colonie batteriche sviluppate, la quantità di germi mediamente presenti in 1 cm^2, oppure il numero complessivo di colonie visibili sulla piastra a contatto.

Interpretazione

I trattamenti di pulizia e sanitizzazione possono essere considerati soddisfacenti quando si riscontra lo sviluppo, sull'intera piastra a contatto *standard* da 24 cm^2, di un numero di colonie inferiore a 10.

Numerosi sistemi miniaturizzati sono stati introdotti per facilitare il rilevamento di contaminazioni microbiche superficiali. Un sistema diffuso da tempo impiega fogli rettangolari sui quali si trova adeso uno strato di terreno, protetto da un *film* plastico trasparente. Il metodo, noto come Petrifilm® (3M), permette di rilevare, per contatto, la distribuzione dei germi su una superficie umida sulla quale il sistema venga fatto aderire e quindi incubato assieme a una fonte d'umidità. Le colonie batteriche, sviluppate sul terreno e coperte dal *film* protettivo quadrettato, possono essere contate e rapportate all'area campionata.

Tra i metodi commerciali più recenti si cita quello descritto da Schlach *e Coll*. (2003) nel suo lavoro pubblicato su Archiv für Lebensmittelhygiene. Si tratta di un nuovo *kit* che permette di valutare, attraverso una reazione rapida colorata su striscia di carta, il grado di pulizia (e quindi di igiene) delle superfici più svariate. Il metodo si basa sulla quantificazione di NAD, NADH, NADP e NADPH e viene commercializzato da Merck col nome di HY-RISE™ Colour Hygiene Test Strip.

Nel Capitolo 9 si riferisce, inoltre, sull'uso di un'apparecchiatura (luminometro) che permette di correlare la produzione di luce sviluppata nel corso di una reazione biochimica con la quantità di germi presenti sulla superficie esaminata (metodo della bioluminescenza).

Nota

La ricerca più frequente riguarda la determinazione della CBT mesofila su superfici lavate e sanitizzate, esaminate prima dell'inizio giornaliero delle lavorazioni. In questo caso, il terreno d'elezione è rappresentato dal Plate Count Agar, seminato con il metodo Surface Spread Plate.

ANALISI QUALITATIVE

Tali ricerche si eseguono per determinazioni di presenza/assenza di patogeni. Sono indipendenti dall'area della superficie esaminata e si effettuano impiegando tamponi (ad esempio, tamponi con terreno di trasporto senza carbone). Si ricorda che ogni tampone consente di effettuare una sola ricerca.

I tamponi, trasportati refrigerati (massimo +4 °C) in laboratorio, devono essere immediatamente trasferiti in brodi d'arricchimento.

Per la ricerca di *Salmonella*, è consigliabile l'incubazione dei tamponi in Brodo selenito cistina a 37 °C per 48 ore. Per la ricerca di *Listeria monocytogenes*, l'incubazione si effettua in LEB a 30 °C per 48 ore. In entrambi i casi, all'arricchimento segue la semina su piastre di terreni selettivi, secondo le modalità consuete per gli alimenti.

Nota

Le analisi qualitative possono essere fatte in qualsiasi fase delle lavorazioni e sono utili soprattutto nei casi di tossinfezione, per controllare lo stato igienico degli ambienti nei quali gli alimenti sospetti sono stati preparati o conservati. Esse, inoltre, costituiscono l'unico sistema di ricerca dei patogeni nelle situazioni in cui l'alimento, per varie ragioni, non può essere esaminato.

CONTROLLI ESEGUIBILI SULLA SUPERFICIE DEI PRODOTTI
(con particolare riguardo ai prodotti di origine animale)

Strettamente collegati ai precedenti tipi di controllo, sono da considerare le valutazioni che si possono attuare sulla superficie degli alimenti in vari momenti della produzione o della distribuzione. Le differenze fra i metodi descritti in letteratura sono essenzialmente a livello del prelievo dei campioni.

Esistono due tipi di metodi: distruttivo (con distacco di pezzi dalla superficie del prodotto) e non distruttivo (con ricorso ad artifici per rimuovere e catturare i germi presenti in superficie).

Goresline *e Coll*. (1959) per il pollame suggeriscono di staccare, con l'aiuto di pinze tiralingua e forbici sterili, due aree circolari di pelle da 5 cm^2 ciascuna, sul petto e sotto l'ala. I pezzi vengono estratti per un'ora a +4°C in 100 ml di soluzione fisiologica sterile e la sospensione viene diluita e seminata su piastre per i vari tipi di conteggio (carica batterica totale, coliformi ecc.).

Coretti (1966) e Davidson (1978) teorizzano il distacco di porzioni di pelle da carcasse bovine, in parallelo con il taglio di pezzi di carne, e specificano numero e posizione dei campioni.

Biss *e Coll.* (1996) ritagliano dalle carcasse di agnello dei pezzi di 5 cm^2, sui quali contano la carica batterica totale (incubazione a +30 °C per 48 ore) e l'*Escherichia coli*, con l'ausilio del Petrifilm® coli (incubazione a +37 °C per 24 ore).

Fravalo *e Coll*. (2001) prelevano, dalle carcasse suine, campioni di pelle di 1 cm^2, sui quali applicano anticorpi fluorescenti diretti contro *Salmonella* e *Listeria*. La reazione risulta ben visibile al microscopio, mentre i risultati diventano scarsi se la lettura viene fatta con una telecamera collegata a un *computer*.

Gunderson *e Coll*. (1945) prelevano i germi presenti in superficie mediante un semplice tubo sterile d'acciaio del diametro interno di 2 cm, pressato sulla superficie in esame, entro il quale si pipettano, e poi si recuperano, 10 ml di soluzione fisiologica sterile destinati alle semine.

Silliker *e Coll*. (1975) introducono l'uso di spugne di cellulosa sterili da strofinare sulla superficie delle carni.

Lasta *e Coll.* (1992) spiegano come evitare di inquinare la spugna durante il prelievo, trattenendola con un sacchetto rivoltato sulla mano. L'aggiunta di 200 ml di acqua 0,1% peptonata nel sacchetto permette poi di recuperare i batteri e allestire i conteggi.

Leistner (1979) descrive l'uso di una particolare pistola che spruzza, e poi raccoglie, una quantità di soluzione fisiologica destinata a intorbidarsi proporzionalmente all'inquinamento della superficie esaminata.

Nyström (1980) invita fare i prelievi sui suini con tamponi bagnati, strisciati poi direttamente sulle piastre dei terreni batteriologici.

Nortjé *e Coll*. (1981) premono sulla superficie delle carcasse bovine un rotolo di terreno agarizzato a forma di salsiccia. Mediante tagli perpendicolari nel blocco, realizzano più prelievi che vanno a finire in altrettante piastre di Petri vuote da incubare.

Bülte *e Coll.* (1982) prendono dei vetrini portaoggetti con adeso uno strato di terreno ("*Dip-slides*"), da premere sulla superficie della carcassa animale. Ogni vetrino, immerso per 60 secondi in 40 ml di soluzione fisiologica peptonata, dà luogo a una sospensione pronta per le analisi.

Dorsa *e Coll*. (1997) su carcasse bovine hanno trovato efficace il prelievo fatto con il metodo della spugna per cercare *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium* e altri germi aerobi.

Ripamonti *e Coll*. (2002) hanno infine messo a confronto il metodo di prelievo mediante

tampone e mediante spugne (*sponge*), nella valutazione dello stato igienico delle superfici di lavorazione nel settore delle carni, fornendo utili consigli sulla scelta del primo o del secondo metodo in rapporto ai siti da esaminare.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

Betts R.P. *e Coll*., Rapid enumeration of viable micro-organisms by staining and direct microscopy, Letters in Appl. Micr. 1989, *9*, 199-202

Biss M.E. *e Coll*., Effect of pre-slaughter washing of lambs on the microbiological and visible contamination of the carcasses, Vet. Rec. 1996, *138*, 52-86

Bomar M.T., Rapid method for the determination of bacterial surface contamination in carcasses, Alimenta 1985, *3*, 55

Bülte M. *e Coll*., Die Einsatzfähigkeit von Eintauchobjekttragern "Dip-slide" zur Ermittlung des Oberflachenkeimgehaltes auf Schlachttierkörpern, Arch. Lebens. 1982, *33*, 1-32

Coretti K., Uber den Wert einiger bakteriologischer Methoden zur Ermittlung der Betriebshygiene in Fleischwarenbetrieben, Fleischwirt. 1966, *46*, 139

Davidson C.M. *e Coll*., Methods for sampling beef carcasses, Appl. Environm. Microbiol. 1978, *35*, 811-812

Deberghes P. *e Coll*., Amelioration de l'efficacité du prélevement de surfaces par utilisation d'eponges, MAN 1995, *13*, 409-412

Dorsa W.J. *e Coll*., Efficacy of using a sponge sampling method to recover low lewels of *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium* and aerobic bacteria from beef carcasses surface tissue, Food Microbiol. 1997, *14*, 63-69

FIL-IDF Usine laitiere - Conditions sanitaires. Directives generales pour les methodes de controle et d'echantillonage. Standard 121 A, 1987

Fravalo P. *e Coll*., Feasibility of fluorescent detection of pathogens on pork carcasses, Berl. Münch. Tierarztl. Wchschr. 2001, *114*, 393-396

Goresline H.E. *e Coll*., Approximation of surface areas of cut-up chicken and use in microbiological analysis, Food Technol. 1959, *13*, 241-243

Gunderson M.F. *e Coll*., "Spot-plates" for plant sanitation, U.S. Egg and Poultry Magazin 1945, *51*, 21-22, citato da Sharf (1966)

Kramer J. e Cantoni C., Alimenti - Microbiologia e igiene. OEMF, Milano, 1990, 254-255

Kroll R.G. *e Coll*., An oxygen electrode-based assay of catalane activity as a rapid method for estimating the bacterial content of foods, J. appl. Bact. 1989, *66*, 209

Lasta J.A. *e Coll*., Bacterial count from bovine carcasses as an indicator of hygiene at slaughtering places: a proposal for sampling, J. Food Protect. 1992, *54*, 271-278

Leistner L., Messung und Beeinflussung des Oberflächenkeimgehaltes von Schlachttierkorpern, International WAVFH Congress, Garmisch, Deutschland, 14. 9. 1979

Nortjé G.L. *e Coll*., Microbiology of beef carcass surfaces, J. Food Protect. 1981, *44*, 355

Nyström P.O., Quantification of bacteria in operation wounds. An experimental investigation with swab sampling in pigs, Acta Path. Micr. Scand. 1980, *88*, 71

Patterson J.T., Microbiological assessment of surfaces. J. Food Technol., 1971, *6*, 63-72

Produrre Bene e Igienicamente (2005) www.internationalpbi.it

Rao D.N. *e Coll*., Rapid dye reduction tests for the determination of microbiological quality of meat, J. Food Technol. 1986, *21*, 151

Ripamonti B. *e Coll*., Confronto fra I metodi di prelievo mediante tampone e mediante sponge nella valutazione dello stato igienico delle superfici di lavorazione nel settore delle carni, Ing. Alim. 2002, *18*, 19-24

Sharf J.M., Recommended methods for the microbiological examination of foods, 2nd ed.,

American Public Health Association, APHA, New York, USA, 1966
Sharpe A.N. e Coll., Efficient nondestructive sampler for carcasses and other surfaces, J. Food Protect. 1996, *59*, 757-763
Silliker H.J. *e Coll.*, A cellulose sponge sampling technique for surfaces, J. Milk Food Technol. 1975, *38*, 504
Smith L.B. *e Coll.*, Comparison of a dry medium culture plate (Petrifilm SM Plate) method to the aerobic plate count method for enumeration of mesophilic aerobic colony-forming units in fresh ground beef, J. Food Protect. 1985, *48*, 1044-1045

LA QUALITÀ "MICROBIOLOGICA"

Sulla valutazione dei rischi alimentari ha influito molto il progresso industriale, spinto da un crescente grado di consapevolezza e da nuove esigenze dei consumatori. Si è vista un'evoluzione sul tipo di preoccupazione che ha dominato il mondo dell'alimentazione negli ultimi quarant'anni, come sinteticamente vuole esprimere la seguente tabella:

Periodo storico delle produzioni alimentari	Parametro da massimizzare relativo ai prodotti alimentari	*Slogan* dominante circa gli obiettivi aziendali da raggiungere	Strategie aziendali propugnate per ottenere i massimi risultati economici
Anni '60 (anni della crescita indiscriminata)	Qualità organolettica, cioè appetibilità del cibo	Vendere a tutti i costi	Incremento delle vendite uguale a incremento del profitto
Anni '70 (anni del recupero della credibilità)	Qualità nutrizionale	Il fattore nutritivo fa vendere (*nutrition sells*)	Attenzione alla qualità nutrizionale
Anni '80 (anni del recupero della responsabilità)	Sicurezza degli alimenti	Sicurezza alimentare a tutti i costi	Sicurezza uguale a maggior profitto
Anni '90 (anni del recupero della razionalità)	Sicurezza equivale a qualità	Garantire la sicurezza per offrire qualità	Qualità totale significa profitto

È nota l'esistenza di un insieme di requisiti che determinano la *prestazione* di un prodotto alimentare. Tra questi, si citano:

- requisiti di qualità *tecnologica e commerciale*, sul tipo della differenziazione del prodotto (non assomiglia a nessun altro), innovazione (è il primo del genere a comparire sul mercato), costo, comodità (ad esempio, i surgelati), funzionalità (ad esempio, la confezione in *tetrapack*), la stabilità (ad esempio, la microfiltrazione del latte);
- requisiti di qualità *biologica*, che condensano le proprietà sensoriali, nutrizionali, di conservabilità e di sicurezza.

La sicurezza si distingue da tutti gli altri requisiti, poiché deve essere garantita incondizionatamente. Mentre, per un certo alimento, si può mettere in commercio una scala di prodotti a differente prezzo, la sicurezza non può essere frazionata a segmenti e riservata alla fascia di prezzo superiore. Si è visto poi che, spesso, a un minor contenuto di germi (sinonimo di sicurezza) si accompagna una vita commerciale più lunga. Questo aspetto viene molto apprezzato dal produttore.

Cosa significa sicurezza alimentare

Vuol dire minimizzare il rischio di contaminazione da agenti chimici e biologici. Le principali contaminazioni chimiche provengono dalla dispersione sulle coltivazioni e nelle acque di:

- metalli pesanti (mercurio, cromo, cadmio, piombo);
- composti organo-clorurati o fosforati (come i detersivi);
- pesticidi (insetticidi, antiparassitari, diserbanti);
- farmaci (antibiotici e promotori della crescita utilizzati in zootecnia).

Un'altra importante fonte di contaminazione chimica è legata alla cessione di sostanze tossiche dagli imballaggi dei prodotti alimentari.

Le contaminazioni biologiche derivano da sostanze tossiche naturali (ad esempio, le biotossine algali), parassiti, batteri e miceti (con le relative tossine), virus.

Risulta evidente che le contaminazioni si accertano solo con controlli di laboratorio chi-

mici e microbiologici, mentre la loro prevenzione è affidata ad altre misure importantissime (secondo certi Autori più dei controlli!), tra cui la purezza delle materie prime, l'igiene delle lavorazioni, la cottura, la conservazione a basse temperature.

Quest'ultima misura è fondamentale per contrastare la moltiplicazione dei germi (Durand, 1996). L'azione delle basse temperature è utile anche se ci sono dei patogeni, purché questi siano in numero ridotto, in quanto viene loro impedito il raggiungimento di concentrazioni pericolose, oppure viene bloccata la formazione di tossine.

Da una ricerca di Gill (1996), si vede che *Escherichia coli* è in grado di moltiplicarsi già a +8 °C e che la sua velocità di replicazione diventa trascurabile solo se la temperatura media rimane inferiore a +4 °C.

La temperatura idonea per conservare i prodotti deperibili (come la carne cruda) dovrebbe quindi essere mantenuta sotto i +4 °C, in modo da prevenire la crescita dei patogeni enterici. Sembra tuttavia che questa temperatura non possa essere assicurata dappertutto, ad esempio negli espositori esistenti nei punti vendita.

Si rammenta, con la seguente tabella, che si conoscono temperature di sicurezza specifiche per varie categorie di alimenti (Gould, 1996).

Temperature indicate (in °C) per la conservazione dei principali tipi di alimenti

TIPO DI ALIMENTO	REFRIGERATO	CONGELATO	SURGELATO
Carni:		-12	-18
- rosse	+7		
- bianche	+4		
- macinate	+2		
- frattaglie	+3		
Pesce e prodotti della pesca	Temperatura di fusione del ghiaccio	-18	-18
Molluschi bivalvi	+6	-18	-18
Uova e derivati	+4	-12	-18
Latte e derivati:			
- latte pasteurizzato	+4		
- latte fermentato	+4		
- panna	+4		
- gelati con frutta		-10	
- gelati senza frutta		-15	
Paste alimentari fresche:			
- senza ripieno	+4	-18	
- con ripieno	+10		
Prodotti di gastronomia	+4	-18	
Alimenti deperibili in genere	+4	-18	
Altri prodotti normalmente conservati:			
- congelati		-10	
- surgelati			-18

Le contaminazioni microbiche

In ordine di frequenza, al primo posto nelle contaminazioni si trovano i batteri (Dreesen *e Coll*., 1996). Le differenze climatiche e le tradizioni agiscono in modo che ogni paese subisca i propri tipi di inquinamento. Oggi, però, queste differenze hanno perso molto del loro peso, perché si sa che qualsiasi tipo di cibo può arrivare dovunque, come esemplificato dalla diffusione in Europa di piatti esotici, tipo *sushi* e molti altri (Schroeder *e Coll*., 2003).

In Europa, le conseguenze sanitarie arrecate dai contaminanti microbici sono ancora in larga percentuale legate a salmonelle, stafilococchi, *Clostridium perfringens.* Più raramente,

si teme la presenza di *Bacillus cereus* e di *Clostridium botulinum*.

L'ondata emozionale suscitata da *Listeria monocytogenes* sembra ormai superata, perché scarseggiano gli episodi epidemici. Compaiono invece nelle statistiche mediche altri patogeni (detti emergenti), tra cui *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila* ed *Escherichia coli* enteroemorragici (tipo O157:H7). Non deve meravigliare il fatto che per alcuni di questi germi non si conosca ancora tutto. La microbiologia alimentare è scienza relativamente giovane, essendo nata, di fatto, solo negli anni '70.

Certamente, gli alimenti di origine animale sono insidiati maggiormente dalle contaminazioni batteriche, mentre, per i vegetali, il problema è più spesso di ordine chimico. Tuttavia, è interessante far notare che anche i vegetali sono coinvolti in episodi di malattie intestinali nell'uomo, come spiega la seguente tabella (da Mossel *e Coll*., 1997).

Esempi di prodotti di origine vegetale alla base di focolai di infezioni intestinali nell'uomo

PRODOTTI	PRINCIPALI PATOGENI TRASMESSI
Succo di mela	*E. coli* O 157:H7, *Cryptosporidium parvum*
Melone	*E. coli* O 157:H7, *Salmonella poona*
Cioccolato	*Salmonella eastbourne*, *napoli*, *nima*, *typhimurium*
Noce di cocco	*Salmonella typhi*, *paratyphi B* e numerosi altri sierotipi
Frutti molli	*Cryptosporidium parvum*, virus A dell'epatite
Arachidi	Vari sierotipi esotici di *Salmonella*
Insalata	*Listeria monocytogenes*, *Shigella sonnei*
Farina di soia	*Salmonella tennessee*
Spezie	*Salmonella oranienburg*, *weltevreden*
Pomodori	*Salmonella javana*, *montevideo*
Germogli vegetali	*Bacillus cereus*, *Salmonella saint-paul*
Cocomero	*Salmonella javana*, *Shigella sonnei*

Una statistica esemplifica le percentuali di rischio da batteri patogeni come segue: carni 45%, cereali 9%, latte 5%, frutta 3%, uova 0,5%.

Anche se la cottura elimina il rischio di trasmissione delle malattie con gli alimenti, rimane il pericolo delle contaminazioni crociate da negligenze in cucina. Classico è l'esempio dei germi che dalla superficie delle carni crude vanno a inquinare, attraverso le mani, i cibi da servire non cotti (salse, maionese, insalata). Da qui, si comprende la necessità di istituire, nella ristorazione collettiva, controlli preventivi d'igiene.

Tabella di Sinell sui caratteri di patogenicità della microflora alimentare

Patogeni obbligati

Bacillus anthracis, Mycobacterium, Brucella, Listeria, Coxiella, Salmonella e altri agenti di zoonosi, come *Yersinia enterocolitica, Escherichia coli* enteropatogeni (EPEC), *Shigella, Campylobacter jejuni, Vibrio cholerae, Clostridium botulinum*

Germi di rischio

Staphylococcus aureus (enterotossico), *Bacillus cereus, Clostridium perfringens,* Miceti tossigeni

Germi non patogeni (indicatori)

E. coli, *Enterobacteriaceae*, *Enterococcus faecalis*, carica batterica totale

Il controllo di qualità aziendale

Non è concepibile un qualsiasi tipo di controllo totale sulle partite prodotte, in quanto il numero di campioni da sottoporre ad analisi, per avere qualche certezza, sarebbe enorme. La tabella seguente illustra meglio questa difficoltà:

Probabilità di individuare con le analisi almeno un campione anomalo

Campioni anomali che si trovano all'interno del lotto (in percentuale)	Quanti campioni sono da analizzare per trovare almeno un campione anomalo con probabilità del		
	80%	85%	90%
5	45	59	90
10	22	29	44
20	15	19	29
50	4	5	7
80	2	2	3
99	1	1	1

È invece possibile, con un numero di *test* ragionevolmente ridotto, stabilire se una linea di produzione è idonea per lavorare igienicamente. Il procedimento è abbastanza semplice e, contrariamente a quanto si potrebbe credere, è svincolato da *standard* microbiologici universali.

Come meglio spiegato da Sperber (1991), l'attenzione deve essere concentrata su ***quella*** specifica azienda nella quale vengono adoperati ***determinati ingredienti*** ed esiste un certo tipo di ***processo produttivo***. Si devono individuare i momenti della lavorazione (punti critici) che possono nascondere pericoli di inquinamento. Esaminando, in stagioni diverse, più campioni dello stesso prodotto durante l'attraversamento di questi punti critici, ricorrendo a poche analisi scelte opportunamente, si raccolgono dei dati. Essi non devono discostarsi molto da un profilo teorico ideale, che il laboratorista avrà in precedenza costruito per quel tipo di lavorazione, mettendo insieme le informazioni scientifiche e le migliori *performances* raggiungibili (ad esempio, assenza di patogeni, carica batterica totale bassa). Oggetto delle campionature può essere l'alimento preparato in quella sede, oppure un indicatore indiretto di qualità microbiologica, ad esempio una superficie che entra sempre in contatto con il prodotto (Salo *e Coll*., 2000).

Stabilito che la linea funziona al meglio dal punto di vista igienico e che i metodi d'analisi sono stati ben selezionati, il numero dei controlli durante l'anno potrà essere ridotto a verifiche saltuarie, esaminando, ad esempio, alcuni campioni presi a caso nei punti critici e dal prodotto finito.

Per esempio, per tenere sotto controllo le alterazioni dei prosciutti crudi dovute a inquinamento batterico, Papa (1994) sostiene che si possono conteggiare le *Enterobacteriaceae* su terreno VRBA. Questi germi, che crescono fino a 200.000 per grammo nei prosciutti di 5-7 mesi, sono viceversa assenti a fine stagionatura.

Non è indispensabile che gli accertamenti siano di natura microbiologica nel senso classico del termine. Si porta ad esempio il controllo della produzione dei *würstel* proposto da Troeger (1989) in Germania. Questo Autore sostiene che, per i salumi cotti, bisogna controllare la qualità microbiologica delle materie prime e che i controlli si possono fare con metodi rapidi, assumendo i seguenti valori di riferimento per gli ingredienti allo stato crudo:

*a) p*H (maggiore di 5,8);

b) conducibilità elettrica con un conduttimetro (EC_{24} inferiore a 7,8);

c) perdita dielettrica con un voltmetro (MS_{24} maggiore di 7,0).

Il significato dei piani di campionamento

Attualmente, i batteri vengono diagnosticati:
- sulla base della loro presenza o assenza, come avviene per i germi patogeni obbligati o germi di rischio);
- sulla base del numero di cellule, come avviene, ad esempio, per i batteri indicatori.

In entrambi i casi, nei cosiddetti "piani di campionamento" viene deciso (Stecchini *e Coll*., 1994):
- il numero di campioni sui quali fare l'analisi, detti **unità campionarie** (simbolo = *n*);
- il numero di unità campionarie sulle quali si può esprimere una **tolleranza** (simbolo = *c*).

Se si ricerca un patogeno (ad esempio, le salmonelle), il numero di unità campionarie *n* sarà piuttosto consistente (frequentemente si analizzano 10 campioni) e la tolleranza sarà zero (*c* = 0), perché si applica il criterio assoluto della presenza o assenza.

Se, invece, il conteggio dei germi ha un significato (carica totale, coli, enterococchi, enterobatteri), il numero di unità campionarie è, in genere, meno consistente (spesso si ha *n* = 5) e il risultato dell'analisi va confrontato con:
- un livello al di sotto del quale l'alimento è accettato (valore ***m***);
- un livello al di sopra del quale l'alimento non è più accettabile (valore ***M***);
- una **fascia di tolleranza** nella quale l'alimento è ancora accettabile se c campioni mostrano un risultato che cade nell'intervallo compreso fra *m* ed *M*.

Il rapporto fra *M* e *m* può variare da 3 a 100, con una media di 10. Il rapporto fra *c* e *n* può essere di 0,2 (una tolleranza su cinque campioni).

Altre nozioni su questo argomento si trovano nel Capitolo 8, dove è riportato il Regolamento della Comunità Europea n° 2073/2005 del 15 novembre 2005, entrato in vigore a decorrere dal 1° gennaio 2006.

Autocontrollo, HACCP e impiego del laboratorio per realizzare un programma a garanzia dell'igiene delle produzioni alimentari

L'attività dell'autocontrollo applicata agli alimenti è stata regolamentata in Europa dalle direttive CEE 93/43 e 96/3/CE, recepite in Italia con D.L. 26.5.1997 n. 155. L'autocontrollo è, in sostanza, **un programma** messo in atto per garantire la **sicurezza** nella produzione e nella distribuzione dei beni. Come tutti i programmi, si manifesta sotto forma di un piano d'azione (Barile, 1996).

Già prima del 1950, in Gran Bretagna erano sorte delle linee-guida *(good manufacturing practices* o GMP*)* per migliorare la qualità delle produzioni sotto vari punti di vista, compresa l'igiene. Dopo il 1950, si è cominciato a parlare di analisi dei rischi e di controllo dei punti critici. Questi argomenti erano legati al sorgere delle prime centrali nucleari. Poi le stesse idee sono state esetse alle **filiere** (serie di passaggi nella creazione di beni di consumo), comprese quelle alimentari, e si è cominciato a parlare di **analisi dei rischi e controllo dei punti critici** (o **HACCP)** nella produzione (*Hazard analysis and critical control points*).

In passato, le eventuali azioni volte a mantenere un certo *standard* qualitativo nella produzione nascevano da regole dettate dall'esperienza, tramandate verbalmente e affidate all'iniziativa personale del datore di lavoro, che le faceva applicare in maniera "artigianale". Con l'avvento dell'HACCP, si assiste alla "codifica" delle regole, per cui qualsiasi programma di autocontrollo diventa un documento ufficiale, che deve possedere i seguenti sei requisiti (Notermans *e Coll*., 1994):

1. deve essere scritto
2. deve essere aggiornato
3. deve essere spiegato a tutto il personale dell'azienda
4. deve contenere una mappa dei rischi e dei rimedi per contrastarli
5. deve riportare gli incidenti avvenuti e le correzioni fatte affinché gli inconvenienti non si ripetano

6. deve dare la priorità all'addestramento del personale

Inoltre, per guidare l'istituzione del sistema qualità e sorvegliarne l'applicazione, entra nello stabilimento una figura nuova, **l'assicuratore della qualità** (*quality assurance* o QA), che dipende dalla direzione tecnica. Compete a questo specialista la definizione dei **punti critici** di una produzione (ad esempio, il procedimento di pasteurizzazione) e la stesura per iscritto del percorso compiuto dall'alimento (si chiama **diagramma di flusso**), con tutti i dettagli su ciò che ruota attorno a quel prodotto (la struttura dei locali, le macchine, la disinfezione delle attrezzature, ecc) (Cantoni *e Coll*., 2001).

Il QA tiene nota di una gran quantità di informazioni: ad esempio, da dove proviene la materia prima, se esiste una bonifica termica, come avviene la pulizia dei locali, quali sono le temperature d'esercizio delle celle frigorifere, a quali malattie va soggetto il personale, se parte della produzione è affidata a terzi, quali sono i controlli di laboratorio effettuati, ecc).

Per avere un esempio completo di quanto sopra accennato, si rimanda alla pubblicazione di Comi *e Coll*. (1995), che illustra i criteri generali per l'impostazione del controllo e il ruolo del laboratorio di analisi nel contesto dell'autocontrollo.

Per questi motivi, si dice che l'HACCP è un contenitore molto ampio di azioni mirate al corretto funzionamento della catena produttiva. Si ritiene che, tenendo sotto controllo la "catena di montaggio" dell'alimento, non sia più necessario campionare un numero impressionante di pezzi prodotti, poiché essi, date le premesse, *devono* nascere necessariamente privi di difetti, cioè con il pregio della **qualità**.

Si ricorda che oggi tutti i laboratori che fanno analisi sugli alimenti (annessi e non alle industrie) devono essere **accreditati**, cioè possedere una serie di requisiti che ne garantiscano il funzionamento secondo un elevato *standard* qualitativo per ottenere **risultati analitici attendibili**. Questa norma è stata introdotta in Italia in prima istanza con la legge n. 526 del 1999 e poi confermata dall'accordo Stato-Regioni del 17 giugno 2004. In pratica, tale accordo prevede che tutti i laboratori di analisi degli alimenti, osservando la norma UNI CEI EN ISO/IEC 17025, devono ottenere l'accreditamento da un **organismo di accreditamento** (in Italia il SINAL) ed essere ufficialmente iscritti in un **elenco regionale**.

I requisiti minimi richiesti al laboratorio di analisi vengono specificati dal SINAL e consistono, in sostanza, nel possedere una direzione e personale di adeguata esperienza e competenza, utilizzare ambienti e apparecchiature idonei per l'effettuazione delle prove previste, adottare metodi e procedure di prova adeguati e dettagliatamente descritti.

La direzione del laboratorio deve salvaguardare la qualità del lavoro d'analisi, cioè assicurare che le apparecchiature siano tarate, identificate e usate in modo appropriato, che i campioni da analizzare vengano correttamente catalogati e immagazzinati, che i risultati siano registrati, che i rapporti di prova (cioè i certificati d'analisi) si presentino scritti in modo completo e conservati dalla direzione per un certo numero d'anni.

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

Barile G., Ottimizzazione dei flussi di lavorazione per la refezione scolastica. Proposta di applicazione del sistema HACCP, Ind. Alim. 1996, *35*, 783-787

Borch E. *e Coll*., Bacterial spoilage of meat and cured meat products, Int. J. Food Micr. 1996, *33*, 103-120

Borch E. *e Coll*., Hazard identification in swine slaughter with respect to foodborne bacteria, Int. J. Food Micr. 1996, *33*, 9-25

Cantoni C. *e Coll*., Linee guida per la crezione di un modello di procedure operative di base per la sanificazione in un macello industriale, Arch. Vet. It. 2001, *52*, 45

Comi G. *e Coll*., Criteri generali per l'impostazione del controllo e ruolo del laboratorio di analisi nel contesto dell'autocontrollo, Ind. Alim. 1995, *4*, 1
Di Noto A.M. *e Coll*., Analisi statistica degli esami batteriologici effettuati su campioni di carni bovine fresche, Ind. Alim. 1990, *29*, 865-870
Dreesen D.W., Effectiveness of microbiologic criteria for the safety of foods of animal origin, JAVMA 1996, *209*, 2052
Durand M.P., Les indicateurs temps-temperature (ITT) dans la surveillance de la châine du froid dans les aliments frais, Bull. Soc. Vet. Prat. de France 1996, *80*, 405-410
Duratti G. *e Coll*., Igiene della lavorazione del prosciutto San Daniele: controlli microbiologici su materia prima, attrezzature e ambientali, Ing. Alim. 1994, *3*, 15
Eisel W.G. *e Coll*., A survey of microbial levels for incoming raw beef, environmental sources and ground beef in a red meat processing plant, Food Micr. 1997, *14*, 273-282
Gill C.O., Cold storage temperature fluctuations and predicting microbial growth, J. Food Protect. 1996, suppl., 43-47
Gould G.W., Methods for preservation and extension of shelf life, Int. J. Food Micr. 1996, *33*, 51-64
Molina I. *e Coll*., Study of the microbial flora in dry-cured ham, Fleischwirtsch. 1989, *69*, 1708
Notermans S. *e Coll*., The HACCP concept: identification of potentially hazardous micro-organisms, Food Microbiol. 1994, *11*, 203-214
Notermans S. *e Coll*., The HACCP concept: specification of criteria using quantitative risk assessment, Food Microbiol. 1995, *12*, 81-90
Notermans S. *e Coll*., Identification of critical control points in the HACCP system with a quantitative effect on the safety of food products, Food Microbiol. 1995, *12*, 93-98
Papa F., Causa e prevenzione delle alterazioni batteriche dei prosciutti crudi, Ind. Alim. 1994, *33*, 636
Papa F. *e Coll*., Confezionamento del prosciutto cotto affettato. Effetti dell'atmosfera modificata e sottovuoto, Ind. Alim. 1995, *34*, 241-243
Pichner R., Aktuelles aus der internationaler Fleischforschung, Fleischwirtsch. 2002, *7*, 82-84
Rahkio M. *e Coll*., Microbial contamination of carcasses related to hygiene practice and facilities on slaughtering lines, Acta Vet. Scand. 1996, *37*, 219-228
Salo A. *e Coll*., Validation of the microbiological methods Hygicult Dipslide, Control Plate and swabbing in surface hygiene control: a Nordic collaborative study, J. AOAC 2000, *83*, 1357
Schroeder G. *e Coll*., Lebensmittelhygienische Untersuchungen von Sushi-erzeugnissen und anderen Ausgansprodukten, Arch. Lebens. 2003, *54*, 25-48
Sperber W., Use of the HACCP system to assure food safety, J. AOAC 1991, *74*, 433
Stecchini M.L. *e Coll*., Applicazione dell'analisi dei pericoli e dei punti critici di controllo (HACCP), Ind. Alim. 1994, *33*, 825
Taylor M.R., FDA's plans for food safety and HACCP. Institutionalizing a philosophy of prevention, Dairy, Food and Environm. Sanitat. 1994, *14*, 256-258
Troeger K., Selecting raw materials for kochwürst and coocked cured products, Fleischwirtsch. 1989, *69*, 1703
Turco R. *e Coll*., Applicazione dell'analisi dei rischi nella filiera carnea di un salumificio, Ind. Alim. 1996, *35*, 778-782

CAP. 8

Normativa sugli alimenti dal punto di vista microbiologico

REGOLAMENTO (CE) 2073/2005
(modificato dal Regolamento n° 1441 del 5.12.2007)

In questo capitolo vengono citate normative tra loro decisamente poco omogenee, partorite in periodi storici differenti e figlie di differenti filosofie di intendere l'attività di controllo degli alimenti.

Il Regolamento (CE) n° 2073/2005 del 15 novembre 2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari, pubblicato sulla Gazzetta Ufficiale dell'Unione europea del 22.12.2005 e qui di seguito integralmente riportato, rappresenta l'elemento di novità assoluta nel ambito del controllo microbiologico degli alimenti e, con tutta probabilità, negli anni a venire costituirà il riferimento legislativo fondamentale nel campo della sicurezza microbiologica degli alimenti. Questo documento fissa solo criteri rilevanti e necessari per la protezione della salute del consumatore, basati sulla valutazione del rischio. Esso, inoltre, garantisce una valutazione più omogenea dei prodotti nell'ambito del mercato unico, ridimensionando il peso che taluni parametri, di scarsa o irrilevante valenza sanitaria, hanno avuto fino a oggi nelle determinazioni delle autorità sanitarie. Infine, per la prima volta, il Regolamento (CE) 2073/2005 stabilisce criteri di sicurezza anche per gli alimenti di origine vegetale e specifica in maniera esplicita i metodi con cui verificare la conformità degli alimenti.

Per le matrici alimentari considerate dal Regolamento (CE) 2073/2005 (allegato A capitoli 1 e 2), sia per i prodotti nazionali che per quelli provenienti da Paesi comunitari o extracomunitari, deve essere sempre applicato quanto previsto dal Regolamento stesso, tenendo tuttavia presente che i criteri di igiene non sono applicabili ai prodotti provenienti da altri Paesi, in quanto questi sono relativi a controlli del processo di produzione.

Per tutti gli altri pericoli biologici non elencati nell'annesso I del Regolamento e/o non associati a una determinata tipologia di prodotto, alla luce anche di quanto previsto dall'art. 14 del Regolamento 178/02, nessuna contestazione può essere sollevata ai prodotti importati, a meno di non dimostrare la sussistenza di una condizione di rischio grave e immediato (per esempio, il riscontro di enterotossine stafilococciche o di tossine di *B. cereus*), tenuto conto delle condizioni d'uso normali dell'alimento da parte del consumatore e delle informazioni messe a disposizione del consumatore, comprese quelle riportate sull'etichetta sul modo di evitare specifici effetti nocivi per la salute.

L'emanazione del nuovo Regolamento comunitario 2073/05 ha rischiato di creare una certa confusione e incertezza nell'applicazione dei criteri microbiologici, in quanto il mancato recepimento della Direttiva 2004/41/CE ha mantenuto in vigore tutti i criteri microbiologici previsti dalle direttive "verticali" non configgenti con quelli del Regolamento 2073/05.

Questa situazione paradossale è stata scongiurata con la pubblicazione in Gazzetta ufficiale

il 6/11/2007 del **Decreto legislativo n° 193 "Attuazione della Direttiva 2004/41/CE relativa ai controlli in materia di sicurezza alimentare e applicazione dei regolamenti comunitari nel medesimo settore"** approvato dal consiglio dei ministri del 22 ottobre 2007.

Il Decreto L.vo n° 193 ha abrogato, con effetto dal 1° gennaio 2006, diversi provvedimenti in materia di controlli ufficiali relativi ai principali settori merceologici (carni e prodotti a base di carne, latte, ovoprodotti, molluschi e prodotti della pesca ecc.) che non erano più in linea con la nuova *food policy* contenuta nei regolamenti sull'igiene (reg. **852**, **853**, **854** e **882** del 2004 e il reg. **2073/2005**).

Tale decreto ha avuto il merito di chiarire, in parte, un quadro normativo nazionale che, con l'entrata in vigore dei regolamenti comunitari citati contenenti i precetti, ma non le **sanzioni**, aveva posto difficoltà nella definizione delle norme nazionali applicabili come pure delle sanzioni vigenti.

Con l'entrata in vigore di questo nuovo decreto, pertanto, si riordina un settore normativo ad altissima densità di fonti legislative eliminando dalla legislazione vigente i decreti legislativi di recepimento delle direttive verticali.

Con il nuovo decreto gli Operatori del settore alimentare (OSA) che non applicano un piano di autocontrollo basato sul sistema HACCP in maniera razionale e corretta con le opportune misure correttive da applicare in caso di deviazioni rispetto alla norma, rischiano seri interventi restrittivi e sanzionatori da parte dell'autorità competente anche in assenza di qualsivoglia prescrizione preventiva.

È stato inoltre recentemente pubblicato il Regolamento (CE) n° 1441/2007 del 5 dicembre 2007 che modifica il Regolamento (CE) n° 2073/2005 sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari, entrato in vigore il 27/12/2007.

Il nuovo Regolamento modifica alcuni interventi in alimenti per lattanti e alimenti dietetici in polvere, eliminando l'automatica ricerca di *Salmonella spp*. in presenza di enterobatteri e consigliando ai singoli impianti produttivi lo studio della correlazione tra enterobatteriacee ed *Enterobacter sakazakii*; inoltre introduce la ricerca di *Salmonella* ed enterobatteriacee negli alimenti di proseguimento.

Sempre negli alimenti disidratati il nuovo Regolamento introduce la ricerca quantitativa delle spore di *Bacillus cereus* in quanto potenziali pericoli per i consumatori dopo reidratazione del prodotto in acqua tiepida.

Viene rivisto inoltre il metodo di riferimento analitico per la ricerca di enterotossine stafilococciche in taluni formaggi, nel latte in polvere e nel siero di latte in polvere.

Infine, nelle norme di campionamento di carcasse di bovini, suini, ovini ecc. per la ricerca di *Salmonella spp*. dice che è opportuno selezionare le aree a più alta probabilità di contaminazione e aumentare l'area totale del campione.

Nella seconda parte del capitolo, viene citato un gruppo di norme emanate prima del Regolamento 2073/2005. All'interno di queste disposizioni, sono contenuti alcuni limiti di accettabilità microbica che non sono in conflitto con quanto stabilito dal Regolamento (CE) 2073/2005.

22.12.2005 IT Gazzetta ufficiale dell'Unione europea L 338/1

I

(Atti per i quali la pubblicazione è una condizione di applicabilità)

REGOLAMENTO (CE) n. 2073/2005 DELLA COMMISSIONE

del 15 novembre 2005

sui criteri microbiologici applicabili ai prodotti alimentari

(Testo rilevante ai fini del SEE)

LA COMMISSIONE DELLE COMUNITÀ EUROPEE,

visto il trattato che istituisce la Comunità europea,

visto il regolamento (CE) n. 852/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 29 aprile 2004, sull'igiene dei prodotti alimentari ([1]), in particolare l'articolo 4, paragrafo 4, e l'articolo 12,

considerando quanto segue:

(1) Un elevato livello di protezione della salute pubblica è uno degli obiettivi fondamentali della legislazione alimentare, come stabilito nel regolamento (CE) n. 178/2002 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 28 gennaio 2002, che stabilisce i principi e i requisiti generali della legislazione alimentare, istituisce l'Autorità europea per la sicurezza alimentare e fissa procedure nel campo della sicurezza alimentare ([2]). I rischi microbiologici dei prodotti alimentari costituiscono una delle principali fonti di malattie umane causate dagli alimenti.

(2) I prodotti alimentari non devono contenere microrganismi, né loro tossine o metaboliti, in quantità tali da rappresentare un rischio inaccettabile per la salute umana.

(3) Il regolamento (CE) n. 178/2002 stabilisce requisiti generali di sicurezza dei prodotti alimentari, in base ai quali i prodotti a rischio non possono essere immessi sul mercato. Gli operatori del settore alimentare hanno l'obbligo di ritirare dal mercato gli alimenti a rischio. Al fine di contribuire alla protezione della salute pubblica ed evitare interpretazioni divergenti è opportuno fissare criteri armonizzati di sicurezza relativi all'accettabilità dei prodotti alimentari, in particolare per quanto riguarda la presenza di determinati microrganismi patogeni.

(4) I criteri microbiologici indicano inoltre come orientarsi nello stabilire l'accettabilità di un prodotto alimentare e dei relativi processi di lavorazione, manipolazione e distribuzione. L'applicazione dei criteri microbiologici deve costituire parte integrante dell'attuazione delle procedure HACCP e di altre misure di controllo dell'igiene.

(5) La sicurezza dei prodotti alimentari è garantita principalmente da misure di prevenzione, quali la messa in atto di pratiche corrette in materia di igiene e di procedure basate sui principi dell'analisi dei rischi e dei punti critici di controllo (procedure HACCP). I criteri microbiologici possono essere applicati per la validazione e la verifica di procedure HACCP e di altre misure di controllo dell'igiene; è pertanto opportuno fissare criteri microbiologici che definiscano l'accettabilità dei processi nonché criteri microbiologici di sicurezza dei prodotti alimentari che fissino una soglia oltre la quale un alimento sia da considerarsi contaminato in modo inaccettabile dai microrganismi cui tali criteri si riferiscono.

(6) A norma dell'articolo 4 del regolamento (CE) n. 852/2004, gli operatori del settore alimentare sono tenuti a rispettare i criteri microbiologici; a questo scopo, attraverso il prelievo di campioni, essi devono procedere a controlli per accertare il rispetto dei valori fissati per i criteri, eseguire analisi e prendere provvedimenti correttivi, conformemente alla legislazione in materia di prodotti alimentari e alle istruzioni dell'autorità competente. È pertanto opportuno stabilire misure di attuazione relative ai metodi analitici, compresi, ove necessario, l'incertezza di misura, il piano di campionamento, i limiti microbiologici, il numero di unità analitiche che devono risultare conformi a tali limiti. È inoltre opportuno stabilire misure di attuazione riguardanti i prodotti alimentari ai quali si applica il criterio, i punti della catena alimentare ai quali si applica il criterio, nonché le azioni da intraprendere nei casi in cui il criterio non sia soddisfatto. Le misure che gli operatori del settore alimentare devono adottare per garantire la conformità ai criteri che definiscono l'accettabilità di un processo possono comprendere, tra l'altro, controlli delle materie prime, dell'igiene, della temperatura e della conservabilità del prodotto.

([1]) GU L 139 del 30.4.2004, pag. 1; versione rettificata: GU L 226 del 25.6.2004, pag. 3.

([2]) GU L 31 dell'1.2.2002, pag. 1. Regolamento modificato dal regolamento (CE) n. 1642/2003 (GU L 245 del 29.9.2003, pag. 4).

(7) A norma del regolamento (CE) n. 882/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 29 aprile 2004, relativo ai controlli ufficiali intesi a verificare la conformità alla normativa in materia di mangimi e di alimenti e alle norme sulla salute e sul benessere degli animali ([1]), gli Stati membri provvedono a che siano eseguiti periodicamente controlli ufficiali, in base ad una valutazione dei rischi e con frequenza appropriata; tali controlli devono essere eseguiti in fasi opportune della produzione, della trasformazione e della distribuzione degli alimenti, per garantire che gli operatori del settore rispettino i criteri stabiliti dal presente regolamento.

(8) La comunicazione della Commissione sulla strategia comunitaria per la definizione dei criteri microbiologici relativi ai prodotti alimentari ([2]) descrive la strategia impiegata per fissare e rivedere tali criteri nella legislazione comunitaria, nonché i principi che ne guidano la definizione e l'applicazione. Tale strategia deve essere applicata quando sono stabiliti criteri microbiologici.

(9) Il comitato scientifico per le misure veterinarie in relazione con la salute pubblica (CSMVSP) ha emesso il 23 settembre 1999 un parere sulla valutazione dei criteri microbiologici per i prodotti alimentari d'origine animale destinati al consumo umano, in cui ha sottolineato l'importanza di fondare i criteri microbiologici sulla valutazione ufficiale dei rischi e su principi approvati a livello internazionale e ha raccomandato che i criteri microbiologici siano pertinenti ed efficaci ai fini della protezione della salute dei consumatori. Il CSMVSP ha proposto, nell'attesa di analisi ufficiali dei rischi, taluni criteri riveduti come misure provvisorie.

(10) Il CSMVSP ha emesso allo stesso tempo un parere separato sulla *Listeria monocytogenes,* in cui ha raccomandato di stabilire come obiettivo una concentrazione di *Listeria monocytogenes* negli alimenti inferiore a 100 ufc/g. Il comitato scientifico per l'alimentazione si è dichiarato d'accordo con queste raccomandazioni nel parere del 22 giugno 2000.

(11) Il 19 e 20 settembre 2001 il CSMVSP ha adottato un parere sul *Vibrio vulnificus* e sul *Vibrio parahaemolyticus*, concludendo che dai dati scientifici al momento a disposizione non si rilevava la necessità di fissare criteri specifici per il *Vibrio vulnificus* e il *Vibrio parahaemolyticus* patogeni nel pesce e nei frutti di mare, pur raccomandando l'istituzione di codici di condotta per garantire l'applicazione di buone prassi igieniche.

(12) Il 30 e 31 gennaio 2002 il CSMVSP ha emesso un parere sui virus Norwalk-simili (NLV, Norovirus), concludendo che gli indicatori fecali convenzionali non sono affidabili per dimostrare la presenza o l'assenza di NLV e che non è una pratica sicura basarsi sulla rimozione degli indicatori batterici fecali per determinare i tempi di depurazione dei frutti di mare. Il comitato ha raccomandato inoltre l'utilizzo di *E. coli* piuttosto che dei coliformi fecali, quando si utilizzano indicatori batterici per rilevare la contaminazione fecale nelle zone di raccolta dei frutti di mare.

(13) Il 27 febbraio 2002 il comitato scientifico per l'alimentazione ha adottato un parere sulle specifiche per le gelatine ai fini della tutela della salute del consumatore, concludendo che i criteri microbiologici di cui all'allegato II, capitolo 4, della direttiva 92/118/CEE del Consiglio, del 17 dicembre 1992, che stabilisce le condizioni sanitarie e di polizia sanitaria per gli scambi e le importazioni nella Comunità di prodotti non soggetti, per quanto riguarda tali condizioni, alle normative comunitarie specifiche di cui all'allegato A, capitolo I, della direttiva 89/662/CEE e, per quanto riguarda i patogeni, alla direttiva 90/425/CEE ([3]), sono eccessivi ai fini della tutela della salute del consumatore e che sarebbe sufficiente un criterio microbiologico obbligatorio per la sola salmonella.

(14) Il CSMVSP ha emesso il 21 e 22 gennaio 2003 un parere sulla presenza di *E. coli* produttori di verocitossine (VTEC) negli alimenti, nel quale reputa poco probabile che l'applicazione a VTEC O157 di una norma microbiologica per prodotti finali produca una riduzione significativa dei rischi connessi per i consumatori. Tuttavia, la definizione di linee guida microbiologiche intese a ridurre la contaminazione fecale lungo la catena alimentare può contribuire a ridurre i rischi per la salute pubblica, compresi quelli associati ai VTEC. Il CSMVSP ha individuato le seguenti categorie alimentari per le quali i VTEC rappresentano un pericolo per la salute pubblica: la carne di manzo cruda o poco cotta ed eventualmente la carne di altri ruminanti, la carne macinata, la carne di manzo fermentata e i prodotti derivati, il latte crudo e i prodotti a base di latte crudo, i prodotti freschi, in particolare i semi germogliati e i succhi di frutta e di ortaggi non pastorizzati.

(15) Il 26 e 27 marzo 2003 il CSMVSP ha adottato un parere sulle enterotossine stafilococciche nei prodotti lattiero-caseari, in particolare nei formaggi, raccomandando di rivedere i criteri applicabili agli stafilococchi coagulasi-positivi nei formaggi, nel latte crudo destinato alla trasformazione e nel latte in polvere e di definire criteri relativi alle enterotossine stafilococciche per i formaggi e il latte in polvere.

([1]) GU L 165 del 30.4.2004, pag. 1; versione rettificata: GU L 191 del 28.5.2004, pag. 1.

([2]) SANCO/1252/2001 — Discussion paper on strategy for setting microbiological criteria for foodstuffs in Community legislation, pag 34.

([3]) GU L 62 del 15.3.1993, pag. 49. Direttiva modificata da ultimo dal regolamento (CE) n. 445/2004 della Commissione (GU L 72 dell'11.3.2004, pag. 60).

(16) Il 14 e 15 aprile 2003 il CSMVSP ha adottato un parere sulle salmonelle nei prodotti alimentari. Secondo tale parere, tra le categorie alimentari che possono rappresentare un rischio elevato per la salute pubblica vi sono la carne cruda e taluni prodotti destinati ad essere consumati crudi, i prodotti crudi e poco cotti a base di carne di pollame, le uova e i prodotti contenenti uova crude, il latte non pastorizzato e taluni prodotti derivati. Anche i semi germogliati e i succhi di frutta non pastorizzati possono presentare rischi. Il comitato ha raccomandato che la decisione concernente la necessità di definire criteri microbiologici sia presa sulla base della sua capacità di tutelare i consumatori e della sua attuabilità.

(17) Il 9 settembre 2004 il gruppo di esperti scientifici sui rischi biologici dell'Autorità europea per la sicurezza alimentare (AESA) ha formulato un parere sui rischi microbiologici degli alimenti per lattanti e degli alimenti di proseguimento, concludendo che *Salmonella* e *Enterobacter sakazakii* sono i microrganismi che costituiscono motivo di maggiore preoccupazione per quanto riguarda gli alimenti per lattanti, gli alimenti di proseguimento e gli alimenti a fini medici speciali. La presenza di questi agenti patogeni rappresenta un rischio considerevole se le condizioni dopo la ricostituzione dell'alimento ne permettono la moltiplicazione. Le enterobatteriacee, più spesso presenti, possono essere utilizzate come indicatore di rischio. Il controllo e la rilevazione delle enterobatteriacee sono raccomandati dall'AESA sia nel processo di produzione che nel prodotto finito. Tuttavia, oltre alle specie patogene, la famiglia delle enterobatteriacee comprende anche specie ambientali, spesso presenti nel ciclo di produzione degli alimenti ma innocue dal punto di vista sanitario. La famiglia delle enterobatteriacee può pertanto essere utilizzata per i controlli di routine; in caso di presenza, si dovrà procedere al controllo della presenza di patogeni specifici.

(18) Non sono ancora stati definiti orientamenti internazionali per quanto riguarda i criteri microbiologici per molti prodotti alimentari. Tuttavia, per la definizione dei criteri microbiologici la Commissione ha seguito gli orientamenti del Codex alimentarius «Principi per la determinazione e l'applicazione dei criteri microbiologici per gli alimenti CAC/GL 21 — 1997» nonché il parere del CSMVSP e del comitato scientifico, tenendo conto delle attuali specifiche del Codex relative ai prodotti a base di latte in polvere, agli alimenti per i neonati e l'infanzia e al criterio dell'istamina per taluni pesci e prodotti ittici. L'adozione di criteri comunitari, e quindi la definizione di criteri microbiologici armonizzati per gli alimenti in sostituzione dei criteri nazionali, andrebbe a vantaggio degli scambi commerciali.

(19) È opportuno rivedere i criteri microbiologici stabiliti per talune categorie di prodotti alimentari di origine animale nelle direttive abrogate dalla direttiva 2004/41/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, del 21 aprile 2004, che abroga alcune direttive recanti norme sull'igiene dei prodotti alimentari e le disposizioni sanitarie per la produzione e la commercializzazione di determinati prodotti di origine animale destinati al consumo umano e che modifica le direttive 89/662/CEE e 92/118/CEE del Consiglio e la decisione 95/408/CE del Consiglio ([1]), e, alla luce dei pareri scientifici, fissare in certi casi nuovi criteri.

(20) I criteri microbiologici fissati dalla decisione 93/51/CEE della Commissione, del 15 dicembre 1992, relativa alle norme microbiologiche per la produzione di crostacei e molluschi cotti ([2]), sono incorporati nel presente regolamento; è quindi opportuno abrogare la decisione suddetta. Poiché la decisione 2001/471/CE della Commissione, dell'8 giugno 2001, che fissa le norme per i controlli regolari delle condizioni igieniche generali, svolti dagli operatori negli stabilimenti conformemente alla direttiva 64/433/CEE sulle condizioni sanitarie per la produzione e l'immissione sul mercato di carni fresche e alla direttiva 71/118/CEE relativa a problemi sanitari in materia di produzione e immissione sul mercato di carni fresche di volatili da cortile ([3]), è abrogata a decorrere dal 1º gennaio 2006, è opportuno incorporare nel presente regolamento i criteri microbiologici definiti per le carcasse.

(21) Il produttore o il fabbricante di un prodotto alimentare è tenuto a decidere se il prodotto è pronto ad essere consumato tale e quale, senza doverlo cuocere o sottoporre ad altri processi per garantirne la sicurezza e il rispetto dei criteri microbiologici. In base all'articolo 3 della direttiva 2000/13/CE del Parlamento europeo e del Consiglio, del 20 marzo 2000, relativa al ravvicinamento delle legislazioni degli Stati membri concernenti l'etichettatura e la presentazione dei prodotti alimentari, nonché la relativa pubblicità ([4]), le istruzioni per l'uso di un prodotto alimentare devono obbligatoriamente essere riportate sull'etichetta quando la loro omissione non consenta all'acquirente di fare un uso appropriato del prodotto alimentare. Gli operatori del settore alimentare devono tenere conto di tali istruzioni al momento di decidere la frequenza dei controlli volti a verificare la conformità ai criteri microbiologici.

(22) Il prelievo di campioni sul luogo di produzione e lavorazione dell'industria alimentare è uno strumento utile per individuare e prevenire la presenza di microrganismi patogeni nei prodotti alimentari.

(23) Gli operatori del settore alimentare devono decidere autonomamente con quale frequenza debbano essere eseguite le operazioni di campionamento e di analisi nel quadro delle procedure HACCP e di altre procedure di controllo dell'igiene. Tuttavia, in taluni casi può essere necessario armonizzare a livello comunitario la frequenza dei campionamenti, in particolare per garantire in tutta la Comunità lo stesso livello di controllo.

([1]) GU L 157 del 30.4.2004, pag. 33; versione rettificata: GU L 195 del 2.6.2004, pag. 12.

([2]) GU L 13 del 21.1.1993, pag. 11.

([3]) GU L 165 del 21.6.2001, pag. 48. Decisione modificata dalla decisione 2004/379/CE (GU L 144 del 30.4.2004, pag. 1).

([4]) GU L 109 del 6.5.2000, pag. 29. Direttiva modificata da ultimo dalla direttiva 2003/89/CE (GU L 308 del 25.11.2003, pag. 15).

(24) I risultati delle analisi dipendono dal metodo analitico utilizzato; pertanto occorre associare ad ogni criterio microbiologico un metodo di riferimento specifico. Tuttavia, gli operatori del settore alimentare devono avere la possibilità di usare metodi d'analisi diversi dai metodi di riferimento, in particolare quelli più rapidi, a condizione che tramite tali metodi alternativi si ottengano risultati equivalenti. È inoltre necessario definire un piano di campionamento per ciascun criterio, al fine di garantire un'attuazione armonizzata, autorizzando tuttavia l'uso di altri sistemi di campionamento e analisi, compreso il ricorso ad organismi indicatori alternativi, a condizione che essi forniscano garanzie equivalenti in merito alla sicurezza alimentare.

(25) È opportuno analizzare l'andamento dei risultati delle analisi, poiché può rivelare sviluppi indesiderati dei processi di lavorazione e quindi consentire all'operatore del settore alimentare di prendere gli opportuni provvedimenti correttivi in tempo utile.

(26) I criteri microbiologici fissati nel presente regolamento devono poter essere riveduti e modificati, se necessario, per tenere conto dell'evoluzione nei settori della sicurezza alimentare e della microbiologia degli alimenti, ossia dei progressi scientifici, tecnologici e metodologici, dei cambiamenti nei livelli di prevalenza e contaminazione e nella percentuale di consumatori sensibili, nonché degli eventuali risultati che emergono dalla valutazione dei rischi.

(27) In particolare, è opportuno che i criteri per i virus patogeni nei molluschi bivalvi vivi siano fissati quando i metodi d'analisi sono stati sufficientemente messi a punto. È necessario sviluppare metodi affidabili anche per altri rischi microbiologici, ad esempio *Vibrio parahaemolyticus*.

(28) È dimostrato che l'attuazione di programmi di controllo può contribuire in modo sostanziale a ridurre la prevalenza della salmonella negli animali da allevamento e nei prodotti da essi derivati. Il regolamento (CE) n. 2160/2003 del Parlamento europeo e del Consiglio, del 17 novembre 2003, sul controllo della salmonella e di altri agenti zoonotici specifici presenti negli alimenti ([1]), ha il fine di garantire che vengano prese misure adeguate ed efficaci per contrastare la salmonella nelle fasi rilevanti della catena alimentare. I criteri per la carne e i prodotti a base di carne devono tenere conto del miglioramento della situazione previsto per quanto riguarda la salmonella a livello di produzione primaria.

(29) Nel caso di taluni criteri di sicurezza alimentare è opportuno concedere agli Stati membri una deroga transitoria, per consentire loro di applicare criteri meno rigorosi, a condizione che i prodotti alimentari interessati siano commercializzati solo sul mercato nazionale. Gli Stati membri interessati devono comunicare alla Commissione e agli altri Stati membri i casi ai quali si applica la deroga transitoria.

(30) Le disposizioni previste dal presente regolamento sono conformi al parere del comitato permanente per la catena alimentare e per la salute degli animali,

HA ADOTTATO IL PRESENTE REGOLAMENTO:

Articolo 1

Oggetto e campo d'applicazione

Il presente regolamento stabilisce i criteri microbiologici per taluni microrganismi e le norme di attuazione che gli operatori del settore alimentare devono rispettare nell'applicazione delle misure di igiene generali e specifiche di cui all'articolo 4 del regolamento (CE) n. 852/2004. L'autorità competente verifica il rispetto delle norme e dei criteri di cui al presente regolamento conformemente al regolamento (CE) n. 882/2004, senza pregiudizio del suo diritto di procedere a ulteriori campionamenti ed analisi per la rilevazione e la misura della presenza di altri microrganismi, delle loro tossine o dei loro metaboliti, o come verifica dei processi, per i prodotti alimentari sospetti, o nel contesto dell'analisi del rischio.

Il presente regolamento si applica senza pregiudizio di altre norme specifiche relative al controllo dei microrganismi stabilite dalla legislazione comunitaria e in particolare degli standard sanitari per i prodotti alimentari stabiliti dal regolamento (CE) n. 853/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio ([2]), delle norme sui parassiti fissate dal regolamento (CE) n. 854/2004 del Parlamento europeo e del Consiglio ([3]) e dei criteri microbiologici di cui alla direttiva 80/777/CEE del Consiglio ([4]).

Articolo 2

Definizioni

Ai fini del presente regolamento s'intende per:

a) «microrganismi», i batteri, i virus, i lieviti, le muffe, le alghe, i protozoi parassiti, gli elminti parassiti microscopici, le loro tossine e i loro metaboliti;

b) «criterio microbiologico», un criterio che definisce l'accettabilità di un prodotto, di una partita di prodotti alimentari o di un processo, in base all'assenza, alla presenza o al numero di microrganismi e/o in base alla quantità delle relative tossine/metaboliti, per unità di massa, volume, area o partita;

([1]) GU L 325 del 12.12.2003, pag. 1.

([2]) GU L 139 del 30.4.2004, pag. 55; versione rettificata: GU L 226 del 25.6.2004, pag. 22.

([3]) GU L 139 del 30.4.2004, pag. 206; versione rettificata: GU L 226 del 25.6.2004, pag. 83.

([4]) GU L 229 del 30.8.1980, pag. 1.

c) «criterio di sicurezza alimentare», un criterio che definisce l'accettabilità di un prodotto o di una partita di prodotti alimentari, applicabile ai prodotti immessi sul mercato;

d) «criterio di igiene del processo», un criterio che definisce il funzionamento accettabile del processo di produzione. Questo criterio, che non si applica ai prodotti immessi sul mercato, fissa un valore indicativo di contaminazione al di sopra del quale sono necessarie misure correttive volte a mantenere l'igiene del processo di produzione in ottemperanza alla legislazione in materia di prodotti alimentari;

e) «partita», un gruppo o una serie di prodotti identificabili ottenuti mediante un determinato processo in circostanze praticamente identiche e prodotti in un luogo determinato entro un periodo di produzione definito;

f) «conservabilità», il periodo che corrisponde al periodo che precede il termine minimo di conservazione o la data di scadenza, come definiti rispettivamente agli articoli 9 e 10 della direttiva 2000/13/CE;

g) «alimenti pronti», i prodotti alimentari destinati dal produttore o dal fabbricante al consumo umano diretto, senza che sia necessaria la cottura o altro trattamento per eliminare o ridurre a un livello accettabile i microrganismi presenti;

h) «alimenti per lattanti», i prodotti alimentari destinati specificamente ai lattanti, come definiti dalla direttiva 91/321/CEE della Commissione ([1]);

i) «alimenti destinati a fini medici speciali», gli alimenti dietetici destinati a fini medici speciali, come definiti dalla direttiva 1999/21/CE della Commissione ([2]);

j) «campione», una serie composta di una o più unità o una porzione di materia selezionate tramite modi diversi in una popolazione o in una quantità significativa di materia e destinate a fornire informazioni su una determinata caratteristica della popolazione o della materia oggetto di studio e a costituire la base su cui fondare una decisione relativa alla popolazione o alla materia in questione o al processo che le ha prodotte;

k) «campione rappresentativo», un campione nel quale sono mantenute le caratteristiche della partita dalla quale è prelevato, in particolare nel caso di un campionamento casuale semplice, dove ciascun componente o aliquota della partita ha la stessa probabilità di figurare nel campione;

l) «conformità ai criteri microbiologici», l'ottenimento di risultati soddisfacenti o accettabili di cui all'allegato I nei controlli volti ad accertare la conformità ai valori fissati per i criteri mediante il prelievo di campioni, l'effettuazione di analisi e l'attuazione di misure correttive, conformemente alla legislazione in materia di prodotti alimentari e alle istruzioni dell'autorità competente.

([1]) GU L 175 del 4.7.1991, pag. 35.

([2]) GU L 91 del 7.4.1999, pag. 29.

Articolo 3

Prescrizioni generali

1. Gli operatori del settore alimentare provvedono a che i prodotti alimentari siano conformi ai relativi criteri microbiologici fissati nell'allegato I del presente regolamento. A tal fine, gli operatori del settore alimentare adottano provvedimenti, in ogni fase della produzione, della lavorazione e della distribuzione, inclusa la vendita al dettaglio, nell'ambito delle loro procedure HACCP e delle loro prassi corrette in materia d'igiene, per garantire che:

a) la fornitura, la manipolazione e la lavorazione delle materie prime e dei prodotti alimentari che dipendono dal loro controllo si effettuino nel rispetto dei criteri di igiene del processo;

b) i criteri di sicurezza alimentare applicabili per l'intera durata del periodo di conservabilità dei prodotti possano essere rispettati a condizioni ragionevolmente prevedibili di distribuzione, conservazione e uso.

2. Se necessario, gli operatori del settore alimentare responsabili della fabbricazione del prodotto effettuano studi, in conformità all'allegato II, per verificare se i criteri sono rispettati per l'intera durata del periodo di conservabilità. In particolare ciò si applica agli alimenti pronti che costituiscono terreno favorevole alla crescita di *Listeria monocytogenes* e che possono costituire un rischio per la salute pubblica in quanto mezzo di diffusione di tale batterio.

Gli operatori del settore alimentare possono condurre gli studi suddetti in collaborazione tra loro.

Linee guida per la realizzazione di tali studi possono essere incluse nei manuali di buona prassi igienica di cui all'articolo 7 del regolamento (CE) n. 852/2004.

Articolo 4

Prove per verificare il rispetto dei criteri

1. Gli operatori del settore alimentare effettuano nei modi appropriati analisi per verificare il rispetto dei criteri microbiologici di cui all'allegato I quando convalidano o controllano il corretto funzionamento delle loro procedure basate sui principi HACCP e sulla corretta prassi igienica.

2. Gli operatori del settore alimentare stabiliscono la frequenza con la quale effettuare i campionamenti, salvo quando l'allegato I indica una frequenza specifica, nel qual caso la frequenza minima di campionamento è quella indicata nell'allegato I. Essi prendono questa decisione nel contesto delle loro procedure basate sui principi HACCP e sulla corretta prassi igienica, tenendo conto delle istruzioni per l'uso del

prodotto alimentare in questione.

La frequenza del campionamento può essere adattata alla natura e alle dimensioni dell'impresa purché ciò non comprometta la sicurezza dei prodotti.

Articolo 5

Norme specifiche per le analisi e il campionamento

1. I metodi di analisi e i piani e metodi di campionamento di cui all'allegato I sono applicati come metodi di riferimento.

2. Se necessario per verificare il rispetto dei criteri, sono prelevati campioni dalle aree e dalle attrezzature in cui avviene la lavorazione degli alimenti, impiegando come metodo di riferimento la norma ISO 18593.

Gli operatori del settore alimentare che producono alimenti pronti, i quali possono sviluppare *Listeria monocytogenes* e presentare pertanto un rischio per la salute pubblica, procedono nell'ambito del loro piano di campionamento al prelievo di campioni dalle aree di lavorazione e dalle attrezzature per la ricerca di *Listeria monocytogenes*.

Gli operatori del settore alimentare che producono alimenti in polvere per lattanti o alimenti in polvere destinati a fini medici speciali per bambini di età inferiore ai sei mesi che possono comportare un rischio da *Enterobacter sakazakii* tengono sotto sorveglianza nell'ambito del loro piano di campionamento le aree di lavorazione e le attrezzature per accertare che non siano contaminate da enterobatteriacee.

3. Il numero di unità campionarie da considerare nei piani di campionamento di cui all'allegato I può essere ridotto se l'operatore può documentare l'applicazione di procedure efficaci basate sui principi HACCP.

4. Quando lo scopo delle prove è di valutare in modo specifico l'accettabilità di una determinata partita di prodotti alimentari o di un processo, la condizione minima richiesta è il rispetto dei piani di campionamento di cui all'allegato I.

5. Gli operatori del settore alimentare possono ricorrere ad altre procedure di campionamento e di prova, a condizione di dimostrare, con soddisfazione dell'autorità competente, che tali procedure forniscono garanzie almeno equivalenti. Tali procedure possono includere l'uso di siti di campionamento alternativi e di analisi degli andamenti.

Le analisi per la rilevazione della presenza di altri microrganismi e la verifica del rispetto dei relativi limiti microbiologici nonché i test di analiti diversi da quelli microbiologici sono autorizzati solo per i criteri di igiene del processo.

L'impiego di metodi d'analisi alternativi è accettabile quando tali metodi sono validati in base al metodo di riferimento di cui all'allegato I e se è utilizzato un metodo proprietario certificato da una terza parte in base al protocollo definito nella norma EN/ISO 16140 o ad altri protocolli analoghi accettati a livello internazionale.

Qualora l'operatore del settore alimentare intenda applicare metodi analitici diversi da quelli validati e certificati come indicato al terzo comma, tali metodi sono validati in base a protocolli riconosciuti a livello internazionale e il loro impiego è autorizzato dall'autorità competente.

Articolo 6

Prescrizioni relative all'etichettatura

1. Qualora i requisiti relativi alla *Salmonella* nella carne macinata, nelle preparazioni a base di carne e nei prodotti a base di carne destinati ad essere consumati cotti siano soddisfatti per tutte le specie di cui all'allegato I, il produttore appone sulle partite di tali prodotti immesse sul mercato un'etichetta per informare il consumatore che il prodotto deve essere sottoposto ad accurata cottura prima del consumo.

2. A decorrere dal 1º gennaio 2010 l'etichettatura di cui al paragrafo 1 non è più richiesta per la carne macinata, le preparazioni a base di carne e i prodotti a base di carne di pollame.

Articolo 7

Risultati insoddisfacenti

1. Qualora i risultati delle prove destinate a verificare il rispetto dei criteri di cui all'allegato I siano insoddisfacenti, gli operatori del settore alimentare adottano i provvedimenti di cui ai paragrafi 2, 3 e 4 del presente articolo e le altre misure correttive definite nelle loro procedure HACCP nonché ogni altra azione necessaria per proteggere la salute del consumatore.

Essi adottano inoltre misure per accertare la causa dei risultati insoddisfacenti, onde evitare il riverificarsi della contaminazione microbiologica inaccettabile. Tali misure possono includere modifiche delle procedure HACCP o di altre misure di controllo dell'igiene dei prodotti alimentari in vigore.

2. Qualora i risultati delle prove destinate a verificare il rispetto dei criteri di cui all'allegato I, capitolo I, siano insoddisfacenti, il prodotto o la partita di prodotti alimentari sono ritirati o richiamati conformemente all'articolo 19 del regolamento (CE) n. 178/2002. Tuttavia, i prodotti immessi sul mercato, ma non al livello della vendita al dettaglio, che non soddisfano i criteri di sicurezza alimentare possono essere sottoposti ad ulteriore trasformazione mediante un trattamento che elimini il rischio in questione; tale trattamento può essere effettuato solo da operatori del settore alimentare diversi dai venditori al dettaglio.

L'operatore del settore alimentare può utilizzare la partita per scopi diversi da quelli per i quali essa era originariamente prevista, purché tale uso non comporti un rischio per la salute umana o animale, sia stato deciso nell'ambito delle procedure basate sui principi HACCP e sulla corretta prassi igienica e sia autorizzato dall'autorità competente.

3. Una partita di carni separate meccanicamente prodotte con le tecniche di cui all'allegato III, sezione V, capitolo III, paragrafo 3, del regolamento (CE) n. 853/2004, che dia risultati insoddisfacenti in relazione al criterio stabilito per la *Salmonella* può essere utilizzata nella catena alimentare solo per produrre prodotti a base di carne sottoposti a trattamento termico in stabilimenti riconosciuti, a norma del regolamento (CE) n. 853/2004.

4. Nel caso di risultati insoddisfacenti in relazione ai criteri di igiene del processo, sono adottati i provvedimenti di cui al capitolo 2 dell'allegato I.

Articolo 8

Deroga transitoria

1. A norma dell'articolo 12 del regolamento (CE) n. 852/2004 è concessa una deroga transitoria fino al 31 dicembre 2009 al più tardi per quanto riguarda il rispetto del valore di cui all'allegato I del presente regolamento relativo alla *Salmonella* nella carne macinata, nelle preparazioni a base di carne e nei prodotti a base di carne da consumare cotti immessi sul mercato nazionale di uno Stato membro.

2. Gli Stati membri che si avvalgono di tale possibilità ne informano la Commissione e gli altri Stati membri. Lo Stato membro:

a) garantisce che siano attuate misure adeguate, comprese l'etichettatura e una marchiatura speciale, che non possa essere confusa con la marchiatura di identificazione prevista nell'allegato II, sezione I, del regolamento (CE) n. 853/2004, affinché la deroga si applichi solo ai prodotti interessati quando vengono immessi sul mercato nazionale e i prodotti destinati al commercio intracomunitario siano conformi ai criteri di cui all'allegato I;

b) dispone che sui prodotti ai quali si applica tale deroga transitoria sia apposta un'etichetta indicante chiaramente che il prodotto deve essere sottoposto ad accurata cottura prima del consumo;

c) s'impegna, quando effettua le prove relative al criterio riguardante la *Salmonella* a norma dell'articolo 4, a considerare il risultato accettabile per quanto riguarda tale deroga transitoria, solo se risulti positivo non più di un campione su cinque.

Articolo 9

Analisi degli andamenti

Gli operatori del settore alimentare analizzano gli andamenti dei risultati delle prove. Qualora essi osservino una tendenza verso risultati insoddisfacenti, adottano sollecitamente provvedimenti adeguati per porre rimedio alla situazione e prevenire l'insorgere di rischi microbiologici.

Articolo 10

Riesame

Il presente regolamento è riesaminato tenendo conto dei progressi della scienza, della tecnologia e della metodologia, dell'emergenza di microrganismi patogeni nei prodotti alimentari e delle informazioni ottenute in base alla valutazione dei rischi. In particolare, i criteri e le condizioni concernenti la presenza di salmonella nelle carcasse di bovini, ovini, caprini, equini, suini e pollame sono riesaminati alla luce dei cambiamenti osservati nella prevalenza di salmonella.

Articolo 11

Abrogazione

La decisione 93/51/CEE è abrogata.

Articolo 12

Il presente regolamento entra in vigore il ventesimo giorno successivo alla pubblicazione nella *Gazzetta ufficiale dell' Unione europea*.

Esso si applica a decorrere dal 1º gennaio 2006.

Il presente regolamento è obbligatorio in tutti i suoi elementi e direttamente applicabile in ciascuno degli Stati membri.

Fatto a Bruxelles, il 15 novembre 2005.

Per la Commissione
Markos KYPRIANOU
Membro della Commissione

ALLEGATO I

CRITERI MICROBIOLOGICI APPLICABILI AI PRODOTTI ALIMENTARI

Capitolo 1. Criteri di sicurezza alimentare 9

Capitolo 2. Criteri di igiene del processo 15

2.1. Carne e prodotti derivati 15

2.2. Latte e prodotti lattiero-caseari 18

2.3. Prodotti a base di uova 21

2.4. Prodotti della pesca 22

2.5. Ortaggi, frutta e prodotti derivati 23

Capitolo 3. Norme per il campionamento e la preparazione dei campioni da analizzare 24

3.1. Norme generali per il campionamento e la preparazione dei campioni da analizzare 24

3.2. Campionamento batteriologico nei macelli e nei luoghi di produzione di carne macinata e preparazioni a base di carne 24

Capitolo 1. Criteri di sicurezza alimentare

Categoria alimentare	Microrganismi/loro tossine, metaboliti	Piano di campionamento (1)		Limiti (2)		Metodo d'analisi di riferimento (3)	Fase a cui si applica il criterio
		n	c	m	M		
1.1 Alimenti pronti per lattanti e alimenti pronti a fini medici speciali (4)	*Listeria monocytogenes*	10	0	Assente in 25 g		EN/ISO 11290-1	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
1.2 Alimenti pronti che costituiscono terreno favorevole alla crescita di *L. monocytogenes*, diversi da quelli destinati ai lattanti e a fini medici speciali	*Listeria monocytogenes*	5	0	100 ufc/g (5)		EN/ISO 11290-2 (6)	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
		5	0	Assente in 25 g (7)		EN/ISO 11290-1	Prima che gli alimenti non siano più sotto il controllo diretto dell'operatore del settore alimentare che li produce
1.3 Alimenti pronti che non costituiscono terreno favorevole alla crescita di *L. monocytogenes*, diversi da quelli destinati ai lattanti e a fini medici speciali (4) (8)	*Listeria monocytogenes*	5	0	100 ufc/g		EN/ISO 11290-2 (6)	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
1.4 Carne macinata e preparazioni a base di carne destinate ad essere consumate crude	*Salmonella*	5	0	Assente in 25 g		EN/ISO 6579	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
1.5 Carne macinata e preparazioni a base di carne di pollame destinate ad essere consumate cotte	*Salmonella*	5	0	Dall'1.1.2006 Assente in 10 g Dall'1.1.2010 Assente in 25 g		EN/ISO 6579	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
1.6 Carne macinata e preparazioni a base di carne di animali diversi dal pollame destinate ad essere consumate cotte	*Salmonella*	5	0	Assente in 10 g		EN/ISO 6579	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
1.7 Carni separate meccanicamente (CSM) (9)	*Salmonella*	5	0	Assente in 10 g		EN/ISO 6579	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
1.8 Prodotti a base di carne destinati ad essere consumati crudi, esclusi i prodotti per i quali il procedimento di lavorazione o la composizone del prodotto eliminano il rischio di salmonella	*Salmonella*	5	0	Assente in 25 g		EN/ISO 6579	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità

Categoria alimentare	Microrganismi/loro tossine, metaboliti	Piano di campionamento (1)		Limiti (2)		Metodo d'analisi di riferimento (3)	Fase a cui si applica il criterio
		n	c	m	M		
1.9 Prodotti a base di carne di pollame destinati ad essere consumati cotti	*Salmonella*	5	0	Dall'1.1.2006 Assente in 10 g Dall'1.1.2010 Assente in 25 g		EN/ISO 6579	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
1.10 Gelatina e collagene	*Salmonella*	5	0	Assente in 25 g		EN/ISO 6579	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
1.11 Formaggi, burro e panna ottenuti da latte crudo o da latte sottoposto a trattamento termico a temperatura più bassa della pastorizzazione (10)	*Salmonella*	5	0	Assente in 25 g		EN/ISO 6579	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
1.12 Latte in polvere e siero di latte in polvere (10)	*Salmonella*	5	0	Assente in 25 g		EN/ISO 6579	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
1.13 Gelati (11), esclusi i prodotti per i quali il procedimento di lavorazione o la composizone del prodotto eliminano il rischio di salmonella	*Salmonella*	5	0	Assente in 25 g		EN/ISO 6579	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
1.14 Prodotti a base di uova, esclusi i prodotti per i quali il procedimento di lavorazione o la composizione del prodotto eliminano il rischio di salmonella	*Salmonella*	5	0	Assente in 25 g		EN/ISO 6579	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
1.15 Alimenti pronti contenenti uova crude, esclusi i prodotti per i quali il procedimento di lavorazione o la composizione del prodotto eliminano il rischio di salmonella	*Salmonella*	5	0	Assente in 25 g o ml		EN/ISO 6579	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
1.16 Crostacei e molluschi cotti	*Salmonella*	5	0	Assente in 25 g		EN/ISO 6579	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
1.17 Molluschi bivalvi vivi ed echinodermi, tunicati e gasteropodi vivi	*Salmonella*	5	0	Assente in 25 g		EN/ISO 6579	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità

Categoria alimentare	Microrganismi/loro tossine, metaboliti	Piano di campionamento (1)		Limiti (2)		Metodo d'analisi di riferimento (3)	Fase a cui si applica il criterio
		n	c	m	M		
1.18 Semi germogliati (pronti al consumo) (12)	*Salmonella*	5	0	Assente in 25 g		EN/ISO 6579	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
1.19 Frutta e ortaggi pretagliati (pronti al consumo)	*Salmonella*	5	0	Assente in 25 g		EN/ISO 6579	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
1.20 Succhi di frutta e di ortaggi non pastorizzati (pronti al consumo)	*Salmonella*	5	0	Assente in 25 g		EN/ISO 6579	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
1.21 Formaggi, latte in polvere e siero di latte in polvere, come indicati nei criteri relativi agli stafilococchi coagulasi-positivi nel capitolo 2, punto 2, del presente allegato	Enterotossine stafilococciche	5	0	Non rilevabili in 25g		Metodo europeo di screening del LCR per il latte (13)	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
1.22 Alimenti in polvere per lattanti e alimenti dietetici in polvere a fini medici speciali destinati ai bambini di età inferiore ai 6 mesi, come indicati nel criterio relativo alle enterobatteriacee nel capitolo 2, punto 2, del presente allegato	*Salmonella*	30	0	Assente in 25 g		EN/ISO 6579	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
1.23 Alimenti in polvere per lattanti e alimenti dietetici in polvere a fini medici speciali destinati ai bambini di età inferiore ai 6 mesi, come indicati nel criterio relativo alle enterobatteriacee nel capitolo 2, punto 2, del presente allegato	*Enterobacter sakazakii*	30	0	Assente in 10 g		ISO/DTS 22964	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
1.24 Molluschi bivalvi vivi ed echinodermi, tunicati e gasteropodi vivi	*E. coli* (14)	1 (15)	0	230 MPN/100 g di carne e liquido intravalvare		ISO TS 16649-3	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità
1.25 Prodotti della pesca ottenuti da specie ittiche associate con un tenore elevato di istidina (16)	Istamina	9 (17)	2	100 mg/kg	200 mg/kg	HPLC (18)	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità

Categoria alimentare	Microrganismi/loro tossine, metaboliti	Piano di campionamento ([1])		Limiti ([2])		Metodo d'analisi di riferimento ([3])	Fase a cui si applica il criterio
		n	c	m	M		
1.26 Prodotti della pesca che hanno subito un trattamento di maturazione enzimatica in salamoia, ottenuti da specie ittiche associate con un tenore elevato di istidina ([16])	Istamina	9	2	200 mg/kg	400 mg/kg	HPLC ([18])	Prodotti immessi sul mercato durante il loro periodo di conservabilità

([1]) n = numero di unità che costituiscono il campione; c = numero di unità campionarie i cui valori sono superiori a m o si situano tra m e M.

([2]) Per i punti 1.1-1.24 m = M.

([3]) Si applica l'ultima edizione della norma.

([4]) Prove regolari relative a questo criterio sono in circostanze normali prive di utilità per i seguenti alimenti pronti:
- alimenti che sono stati sottoposti a trattamento termico o ad altra trasformazione avente come effetto l'eliminazione di *L. monocytogenes*, quando non è possibile una ricontaminazione dopo tali trattamenti (ad esempio, i prodotti sottoposti a trattamento termico al momento del confezionamento finale),
- frutta e ortaggi freschi, non tagliati e non trasformati, tranne i semi germogliati,
- pane, biscotti e prodotti analoghi,
- acqua, bibite, birra, sidro, vino, bevande spiritose e prodotti analoghi imbottigliati o confezionati,
- zucchero, miele e dolciumi, compresi i prodotti a base di cacao e cioccolato,
- molluschi bivalvi vivi.

([5]) Questo criterio si applica se il produttore è in grado di dimostrare, con soddisfazione dell'autorità competente, che il prodotto non supererà il limite di 100 ufc/g durante il periodo di conservabilità. L'operatore può fissare durante il processo limiti intermedi sufficientemente bassi da garantire che il limite di 100 ufc/g non sia superato al termine del periodo di conservabilità.

([6]) 1 ml di inoculo viene posto su una piastra di Petri di 140 mm di diametro o su tre piastre di Petri di 90 mm di diametro.

([7]) Questo criterio si applica ai prodotti prima che non siano più sotto il controllo diretto dell'operatore del settore alimentare che li produce, se questi non è in grado di dimostrare, con soddisfazione dell'autorità competente, che il prodotto non supererà il limite di 100 ufc/g durante il periodo di conservabilità.

([8]) I prodotti con pH ≤ 4,4 o $a_w \leq 0,92$, i prodotti con pH ≤ 5,0 e $a_w \leq 0,94$, i prodotti con un periodo di conservabilità inferiore a 5 giorni sono automaticamente considerati appartenenti a questa categoria. Anche altri tipi di prodotti possono appartenere a questa categoria, purché vi sia una giustificazione scientifica.

([9]) Questo criterio si applica alle carni separate meccanicamente (CSM) prodotte con le tecniche di cui all'allegato III, sezione V, capitolo III, paragrafo 3, del regolamento (CE) n. 853/2004 che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale.

([10]) Esclusi i prodotti per i quali il fabbricante può dimostrare, con soddisfazione dell'autorità competente, che grazie al tempo di maturazione e all'a_w del prodotto, non vi è rischio di salmonella.

([11]) Solo gelati contenenti ingredienti a base di latte.

([12]) Prova preliminare effettuata sulla partita di semi prima dell'inizio del processo di germinazione o campionamento da eseguire nella fase in cui è considerata più elevata la probabilità di rilevare la presenza di *Salmonella*.

([13]) Riferimento: Hennekinne et al., J. AOAC Internat. Vol. 86, n. 2, 2003.

([14]) *E. coli* è qui utilizzato come indicatore di contaminazione fecale.

([15]) Campione aggregato costituito da almeno 10 animali.

([16]) In particolare le specie delle famiglie: *Scombridae, Clupeidae, Engraulidae, Coryfenidae, Pomatomidae, Scombresosidae*.

([17]) I singoli campioni possono essere prelevati presso dettaglianti. In tal caso non vale il principio di cui all'articolo 14, paragrafo 6, del regolamento (CE) n. 178/2002, secondo cui si presume che l'intera partita sia a rischio.

([18]) Riferimenti: 1. Malle P., Valle M., Bouquelet S., «Assay of biogenic amines involved in fish decomposition». J. AOAC Internat. 1996, 79, 43-49;
2. Duflos G., Dervin C., Malle P., Bouquelet S., «Relevance of matrix effect in determination of biogenic amines in plaice (*Pleuronectes platessa*) and whiting (*Merlangus merlangus*». J. AOAC Internat. 1999, 82, 1097-1101.

Interpretazione dei risultati delle prove

I limiti indicati si riferiscono a ogni unità campionaria sottoposta a prova, esclusi i molluschi bivalvi vivi e gli echinodermi, i tunicati e i gasteropodi vivi in relazione alla prova *E. coli*, per i quali il limite si riferisce a un campione aggregato.

I risultati delle prove dimostrano la qualità microbiologica della partita esaminata [1].

L. monocytogenes in alimenti pronti destinati ai lattanti e a fini medici speciali:

— soddisfacente, se tutti i valori osservati indicano l'assenza del batterio,

— insoddisfacente, se si rileva la presenza del batterio in una delle unità campionarie.

L. monocytogenes in alimenti pronti che costituiscono terreno favorevole alla crescita di *L. monocytogenes* prima che gli alimenti non siano più sotto il controllo diretto dell'operatore del settore alimentare che li produce se questi non è in grado di dimostrare che il prodotto non supererà il limite di 100 ufc/g durante il periodo di conservabilità:

— soddisfacente, se tutti i valori osservati indicano l'assenza del batterio,

— insoddisfacente, se si rileva la presenza del batterio in una delle unità campionarie.

L. monocytogenes in altri alimenti pronti ed *E. coli* nei molluschi bivalvi vivi:

— soddisfacente, se tutti i valori osservati sono pari o inferiori al valore limite,

— insoddisfacente, se uno dei valori è superiore al valore limite.

Salmonella in varie categorie di alimenti:

— soddisfacente, se tutti i valori osservati indicano l'assenza del batterio,

— insoddisfacente, se si rileva la presenza del batterio in una delle unità campionarie.

[1] I risultati delle prove possono essere utilizzati anche per dimostrare l'efficacia della procedura HACCP o di corretta igiene del processo.

Enterotossine stafilococciche in prodotti lattiero-caseari:

— soddisfacente, se in tutte le unità campionarie non si rileva la presenza di enterotossine,

— insoddisfacente, se se rileva la presenza di enterotossine in una delle unità campionarie.

Enterobacter sakazakii in alimenti in polvere per lattanti e alimenti dietetici in polvere a fini medici speciali destinati ai bambini di età inferiore ai 6 mesi:

— soddisfacente, se tutti i valori osservati indicano l'assenza del batterio,

— insoddisfacente, se si rileva la presenza del batterio in una delle unità campionarie.

Istamina in prodotti della pesca ottenuti da specie ittiche associate con un tenore elevato di istidina:

— soddisfacente, se:

1. il valore medio osservato è pari o inferiore a m,
2. un massimo di c/n valori osservati è compreso tra m e M,
3. non sono osservati valori superiori al limite di M,

— insoddisfacente, se il valore medio osservato è superiore a m o più di c/n valori sono compresi tra m e M o uno o più dei valori osservati sono superiori a M.

Capitolo 2. Criteri di igiene del processo

2.1. Carne e prodotti a base di carne

Categoria alimentare	Microrganismi	Piano di campionamento [1]		Limiti [2]		Metodo d'analisi di riferimento [3]	Fase a cui si applica il criterio	Azione in caso di risultati insoddisfacenti
		n	c	m	M			
2.1.1 Carcasse di bovini, ovini, caprini ed equini [4]	Conteggio delle colonie aerobiche			3,5 log ufc/cm^2 log medio giornaliero	5,0 log ufc/cm2 log medio giornaliero	ISO 4833	Carcasse dopo la macellazione, ma prima del raffreddamento	Miglioramento delle condizioni igieniche nella procedura di macellazione e revisione dei controlli del processo
	Enterobatteriacee			1,5 log ufc/cm2 log medio giornaliero	2,5 log ufc/cm2 log medio giornaliero	ISO 21528-2	Carcasse dopo la macellazione, ma prima del raffreddamento	Miglioramento delle condizioni igieniche della macellazione e revisione dei controlli del processo
2.1.2 Carcasse di suini [4]	Conteggio delle colonie aerobiche			4,0 log ufc/cm2 log medio giornaliero	5,0 log ufc/cm2 log medio giornaliero	ISO 4833	Carcasse dopo la macellazione, ma prima del raffreddamento	Miglioramento delle condizioni igieniche della macellazione e revisione dei controlli del processo
	Enterobatteriacee			2,0 log ufc/cm2 log medio giornaliero	3,0 log ufc/cm2 log medio giornaliero	ISO 21528-2	Carcasse dopo la macellazione, ma prima del raffreddamento	Miglioramento delle condizioni igieniche della macellazione e revisione dei controlli del processo
2.1.3 Carcasse di bovini, ovini, caprini e equini	*Salmonella*	50 [5]	2 [6]	Assente nell'area esaminata per carcassa		EN/ISO 6579	Carcasse dopo la macellazione, ma prima del raffreddamento	Miglioramento delle condizioni igieniche della macellazione, revisione dei controlli del processo e dell'origine degli animali
2.1.4 Carcasse di suini	*Salmonella*	50 [5]	5 [6]	Assente nell'area esaminata per carcassa		EN/ISO 6579	Carcasse dopo la macellazione, ma prima del raffreddamento	Miglioramento delle condizioni igieniche della macellazione e revisione dei controlli del processo, dell'origine degli animali e delle misure di biosicurezza nelle aziende di origine
2.1.5 Carcasse di pollame (broilers e tacchini	*Salmonella*	50 [5]	7 [6]	Assente in 25 g di un campione aggregato di pelle del collo		EN/ISO 6579	Carcasse dopo il raffreddamento	Miglioramento delle condizioni igieniche della macellazione e revisione dei controlli del processo, dell'origine degli animali e delle misure di biosicurezza nelle aziende di origine

Categoria alimentare	Microrganismi	Piano di campionamento (1)		Limiti (2)		Metodo d'analisi di riferimento (3)	Fase a cui si applica il criterio	Azione in caso di risultati insoddisfacenti
		n	c	m	M			
2.1.6 Carne macinata	Conteggio delle colonie aerobiche (7)	5	2	$5x10^5$ ufc/g	$5x10^6$ ufc/g	ISO 4833	Fine del processo di lavorazione	Miglioramento delle condizioni igieniche durante la produzione e miglioramento della scelta e/o dell'origine delle materie prime
	E. coli (8)	5	2	50 ufc/g	500 ufc/g	ISO 16649-1 o 2	Fine del processo di lavorazione	Miglioramento delle condizioni igieniche durante la produzione e miglioramento della scelta e/o dell'origine delle materie prime
2.1.7 Carni separate meccanicamente (CSM) (9)	Conteggio delle colonie aerobiche	5	2	$5x10^5$ ufc/g	$5x10^6$ ufc/g	ISO 4833	Fine del processo di lavorazione	Miglioramento delle condizioni igieniche durante la produzione e miglioramento della scelta e/o dell'origine delle materie prime
	E. coli (8)	5	2	50 ufc/g	500 ufc/g	ISO 16649-1 o 2	Fine del processo di lavorazione	Miglioramento delle condizioni igieniche durante la produzione e miglioramento della scelta e/o dell'origine delle materie prime
2.1.8 Preparazioni a base di carne	*E. coli* (8)	5	2	500 ufc/g o cm^2	5 000 ufc/g o cm^2	ISO 16649-1 o 2	Fine del processo di lavorazione	Miglioramento delle condizioni igieniche durante la produzione e miglioramento della scelta e/o dell'origine delle materie prime

(1) n = numero di unità che costituiscono il campione; c= numero di unità campionarie i cui valori si situano tra m e M.
(2) Per i punti 2.1.3-2.1.5 m = M.
(3) Si applica l'ultima edizione della norma.
(4) I limiti (m e M) si applicano unicamente ai campioni prelevati con metodo distruttivo. Il log medio giornaliero è determinato prendendo un valore log di ciascun risultato delle singole prove e calcolandone la media.
(5) I 50 campioni sono prelevati durante 10 sessioni di campionamento consecutive, in base alle norme e alla frequenza di campionamento indicati nel presente regolamento.
(6) Numero di campioni in cui si rileva la presenza di salmonella. Il valore c va adeguato in base ai progressi compiuti nel ridurre la prevalenza della salmonella. Gli Stati membri o le regioni a bassa prevalenza di salmonella possono utilizzare valori c inferiori anche prima dell'adeguamento.
(7) Questo criterio non si applica alla carne macinata prodotta al dettaglio quando la conservabilità del prodotto è inferiore a 24 ore.
(8) *E. coli* è qui utilizzato come indicatore di contaminazione fecale.
(9) Questi criteri si applicano alle carni separate meccanicamente (CSM) prodotte con le tecniche di cui all'allegato III, sezione V, capitolo III, paragrafo 3, del regolamento (CE) n. 853/2004 che stabilisce norme specifiche in materia di igiene per gli alimenti di origine animale.

Interpretazione dei risultati delle prove

I limiti indicati si riferiscono a ogni unità campionaria sottoposta a prova, escluse le carcasse, per le quali i limiti si riferiscono a campioni aggregati.

I risultati delle prove dimostrano la qualità microbiologica del processo esaminato.

Enterobatteriacee e conteggio delle colonie aerobiche nelle carcasse di bovini, ovini, caprini, equini e suini:

— soddisfacente, se il log medio giornaliero è pari o inferiore a m,

— accettabile, se il log medio giornaliero è compreso tra m e M,

— insoddisfacente, se il log medio giornaliero è superiore a M.

Salmonella nelle carcasse:

— soddisfacente, se la presenza di *Salmonella* si rileva in un numero massimo c/n di campioni,

— insoddisfacente, se la presenza di *Salmonella* si rileva in un numero di campioni superiore a c/n.

Dopo ogni sessione di campionamento, si valutano i risultati degli ultimi 10 campionamenti per ottenere il numero n di campioni.

E. coli e conteggio delle colonie aerobiche nella carne macinata e nelle preparazioni a base di carne:

— soddisfacente, se tutti i valori osservati sono pari o inferiori a m,

— accettabile, se un numero massimo di c/n valori è compreso tra m e M e i restanti valori osservati sono pari o inferiori a m,

— insoddisfacente, se uno o più valori osservati sono superiori a M o più di c/n valori sono compresi tra m e M.

2.2. Latte e prodotti lattiero-caseari

Categoria alimentare	Microrganismi	Piano di campionamento (1)		Limiti (2)		Metodo d'analisi di riferimento (3)	Fase a cui si applica il criterio	Azione in caso di risultati insoddisfacenti
		n	c	m	M			
2.2.1 Latte pastorizzato e altri prodotti lattiero-caseari liquidi pastorizzati (4)	Entero-batteriacee	5	2	< 1 ufc/ml	5 ufc/ml	ISO 21528-1	Fine del processo di lavorazione	Controllo dell'efficacia del trattamento termico e prevenzione della ricontaminazione, nonché verifica della qualità delle materie prime
2.2.2 Formaggi a base di latte o siero di latte sottoposto a trattamento termico	*E. coli* (5)	5	2	100 ufc/g	1 000 ufc/g	ISO 16649-1 o 2	Fase del processo di lavorazione in cui si prevede che il numero di *E. coli* sia il più alto (6)	Miglioramento delle condizioni igieniche durante la produzione e della scelta delle materie prime
2.2.3 Formaggi a base di latte crudo	Stafilococchi coagulasi-positivi	5	2	10^4 ufc/g	10^5 ufc/g	EN/ISO 6888-2	Fase del processo di lavorazione in cui si prevede che il numero degli stafilococchi sia il più alto	Miglioramento delle condizioni igieniche durante la produzione e della scelta delle materie prime. Se si rilevano valori > 10^5 ufc/g, la partita di formaggio deve essere sottoposta alle prove sulle enterotossine stafilococciche
2.2.4 Formaggi a base di latte sottoposto a trattamento termico a temperatura inferiore a quella della pastorizzazione (7) e formaggi stagionati a base di latte o siero di latte sottoposto a pastorizzazione o a trattamento termico a temperatura più elevata (7)	Stafilococchi coagulasi-positivi	5	2	100 ufc/g	1 000 ufc/g	EN/ISO 6888-1 o 2		
2.2.5 Formaggi a pasta molle non stagionati (formaggi freschi) a base di latte o siero di latte sottoposto a pastorizzazione o a trattamento termico a temperatura più elevata (7)	Stafilococchi coagulasi-positivi	5	2	10 ufc/g	100 ufc/g	EN/ISO 6888-1 o 2	Fine del processo di lavorazione	Miglioramento delle condizioni igieniche durante la produzione. Se si rilevano valori > 10^5 ufc/g, la partita di formaggio deve essere sottoposta alle prove sulle enterotossine stafilococciche
2.2.6 Burro e panna a base di latte crudo o di latte sottoposto a trattamento termico a temperatura inferiore a quella della pastorizzazione	*E. coli* (5)	5	2	10 ufc/g	100 ufc/g	ISO 16649-1 o 2	Fine del processo di lavorazione	Miglioramento delle condizioni igieniche durante la produzione e della scelta delle materie prime

Categoria alimentare	Microrganismi	Piano di campionamento (1)		Limiti (2)		Metodo d'analisi di riferimento (3)	Fase a cui si applica il criterio	Azione in caso di risultati insoddisfacenti
		n	c	m	M			
2.2.7 Latte in polvere e siero di latte in polvere (4)	Entero-batteriacee	5	0	10 ufc/g		ISO 21528-1	Fine del processo di lavorazione	Controllo dell'efficacia del trattamento termico e prevenzione della ricontaminazione
	Stafilococchi coagulasi-positivi	5	2	10 ufc/g	100 ufc/g	EN/ISO 6888-1 o 2	Fine del processo di lavorazione	Miglioramento delle condizioni igieniche durante la produzione. Se si rilevano valori > 10^5 ufc/g, la partita di formaggio deve essere sottoposta alle prove sulle enterotossine stafilococciche
2.2.8 Gelati (8) e dessert a base di latte congelati	Entero-batteriacee	5	2	10 ufc/g	100 ufc/g	ISO 21528-2	Fine del processo di lavorazione	Miglioramento delle condizioni igieniche durante la produzione
2.2.9 Alimenti in polvere per lattanti e alimenti dietetici in polvere a fini medici speciali destinati ai bambini di età inferiore ai 6 mesi	Entero-batteriacee	10	0	Assente in 10 g		ISO 21528-1	Fine del processo di lavorazione	Miglioramento delle condizioni igieniche durante la produzione per minimizzare la contaminazione. Se in una delle unità campionarie sono rilevate enterobatteriacee, la partita deve essere sottoposta alle prove su *E. sakazakii* e *Salmonella*

(1) n = numero di unità che costituiscono il campione; c = numero di unità campionarie i cui valori si situano tra m e M.
(2) Per il punto 2.2.7 m = M.
(3) Si applica l'ultima edizione della norma.
(4) Il criterio non si applica ai prodotti destinati ad essere ulteriormente trasformati nell'industria alimentare.
(5) *E. coli* è qui utilizzato come indicatore del livello d'igiene.
(6) Per i formaggi che non costituiscono terreno favorevole alla crescita di *E. coli*, il conteggio di *E. coli* è abitualmente massimo all'inizio del periodo di maturazione, mentre per i formaggi che costituiscono terreno favorevole alla crescita di *E. coli*, ciò si verifica abitualmente alla fine del periodo di maturazione.
(7) Esclusi i formaggi per i quali il fabbricante può dimostrare, con soddisfazione delle autorità competenti, che il prodotto non presenta un rischio per quanto concerne l'enterotossina stafilococcica.
(8) Solo gelati contenenti ingredienti a base di latte.

Interpretazione dei risultati delle prove

I limiti indicati si riferiscono a ogni unità campionaria sottoposta a prova.

I risultati delle prove dimostrano la qualità microbiologica del processo esaminato.

Enterobatteriacee in alimenti in polvere per lattanti e alimenti dietetici in polvere a fini medici speciali destinati ai bambini di età inferiore ai 6 mesi:

— soddisfacente, se tutti i valori osservati indicano l'assenza del batterio,

— insoddisfacente, se si rileva la presenza del batterio in una delle unità campionarie.

E. coli, enterobatteriacee (altre categorie alimentari) e stafilococchi coagulasi-positivi:

— soddisfacente, se tutti i valori osservati sono pari o inferiori a m,

— accettabile, se un massimo di c/n valori è compreso tra m e M e i restanti valori osservati sono pari o inferiori a m,

— insoddisfacente, se uno o più valori osservati sono superiori a M o più di c/n valori sono compresi tra m e M.

2.3. Prodotti a base di uova

Categoria alimentare	Microrganismi	Piano di campionamento (1)		Limiti		Metodo d'analisi di riferimento (2)	Fase a cui si applica il criterio	Azione in caso di risultati insoddisfacenti
		n	c	m	M			
2.3.1 Prodotti a base di uova	Enterobatteriacee	5	2	10 ufc/g o ml	100 ufc/g o ml	ISO 21528-2	Fine del processo di lavorazione	Controllo dell'efficacia del trattamento termico e prevenzione della ricontaminazione

(1) n = numero di unità che costituiscono il campione; c = numero di unità campionarie i cui valori si situano tra m e M.
(2) Si applica l'ultima edizione della norma.

Interpretazione dei risultati delle prove

I limiti indicati si riferiscono a ogni unità campionaria sottoposta a prova.

I risultati delle prove dimostrano la qualità microbiologica del processo esaminato.

Enterobatteriacee in prodotti a base di uova:

— soddisfacente, se tutti i valori osservati sono pari o inferiori a m,

— accettabile, se un massimo di c/n valori è compreso tra m e M e i restanti valori osservati sono pari o inferiori a m,

— insoddisfacente, se uno o più valori osservati sono superiori a M o più di c/n valori sono compresi tra m e M.

2.4. Prodotti della pesca

Categoria alimentare	Microrganismi	Piano di campionamento (1)		Limiti		Metodo d'analisi di riferimento (2)	Fase a cui si applica il criterio	Azione in caso di risultati insoddisfacenti
		n	c	m	M			
2.4.1 Prodotti sgusciati di crostacei e molluschi cotti	*E. coli*	5	2	1 ufc/g	10 ufc/g	ISO TS 16649-3	Fine del processo di lavorazione	Miglioramento delle condizioni igieniche durante la produzione
	Stafilococchi coagulasi-positivi	5	2	100 ufc/g	1 000 ufc/g	EN/ISO 6888-1 o 2	Fine del processo di lavorazione	Miglioramento delle condizioni igieniche durante la produzione

(1) n = numero di unità che costituiscono il campione; c = numero di unità campionarie i cui valori si situano tra m e M.
(2) Si applica l'ultima edizione della norma.

Interpretazione dei risultati delle prove

I limiti indicati si riferiscono a ogni unità campionaria sottoposta a prova.

I risultati delle prove dimostrano la qualità microbiologica del processo esaminato.

E. coli in prodotti sgusciati di crostacei e molluschi cotti:

— soddisfacente, se tutti i valori osservati sono pari o inferiori a m,

— accettabile, se un massimo di c/n valori è compreso tra m e M e i restanti valori osservati sono pari o inferiori a m,

— insoddisfacente, se uno o più valori osservati sono superiori a M o più di c/n valori sono compresi tra m e M.

Stafilococchi coagulasi-positivi nei crostacei e nei molluschi cotti:

— soddisfacente, se tutti i valori osservati sono pari o inferiori a m,

— accettabile, se un massimo di c/n valori è compreso tra m e M e i restanti valori osservati sono pari o inferiori a m,

— insoddisfacente, se uno o più valori osservati sono superiori a M o più di c/n valori sono compresi tra m e M.

2.5. Ortaggi, frutta e prodotti derivati

Categoria alimentare	Microrganismi	Piano di campionamento (1)		Limiti		Metodo d'analisi di riferimento (2)	Fase a cui si applica il criterio	Azione in caso di risultati insoddisfacenti
		n	c	m	M			
2.5.1 Frutta e ortaggi pretagliati (pronti al consumo)	*E. coli*	5	2	100 ufc/g	1 000 ufc/g	ISO 16649- 1 o 2	Processo di lavorazione	Miglioramento delle condizioni igieniche durante la produzione e della scelta delle materie prime
2.5.2 Succhi di frutta e di ortaggi non pastorizzati (pronti al consumo)	*E. coli*	5	2	100 ufc/g	1 000 ufc/g	ISO 16649- 1 o 2	Processo di lavorazione	Miglioramento delle condizioni igieniche durante la produzione e della scelta delle materie prime

(1) n = numero di unità che costituiscono il campione; c = numero di unità campionarie i cui valori si situano tra m e M.
(2) Si applica l'ultima edizione della norma.

Interpretazione dei risultati delle prove

I limiti indicati si riferiscono a ogni unità campionaria sottoposta a prova.

I risultati delle prove dimostrano la qualità microbiologica del processo esaminato.

E. coli in frutta e ortaggi pretagliati (pronti al consumo) e in succhi di frutta e ortaggi non pastorizzati (pronti al consumo):

— soddisfacente, se tutti i valori osservati sono pari o inferiori a m,

— accettabile, se un massimo di c/n valori è compreso tra m e M e i restanti valori osservati sono pari o inferiori a m,

— insoddisfacente, se uno o più valori osservati sono superiori a M o più di c/n valori sono compresi tra m e M.

Capitolo 3. Norme per il campionamento e per la preparazione dei campioni da analizzare

3.1. Norme generali per il campionamento e la preparazione dei campioni da analizzare

In assenza di norme più specifiche in materia di campionamento e di preparazione dei campioni da analizzare, si utilizzano come metodi di riferimento le norme pertinenti dell'ISO (International Organisation for Standardization) e gli orientamenti del Codex alimentarius.

3.2. Campionamento batteriologico nei macelli e nei luoghi di produzione di carne macinata e preparazioni a base di carne

Norme di campionamento per le carcasse di bovini, suini, ovini, caprini ed equini

I metodi di campionamento distruttivo e non distruttivo, la scelta dei siti di prelievo dei campioni e le regole per la loro conservazione e il trasporto sono indicati nella norma ISO 17604.

In ogni sessione di campionamento sono prelevate casualmente cinque carcasse. I siti nei quali sono prelevati i campioni sono scelti tenendo conto della tecnica di macellazione utilizzata in ciascun impianto.

Quando si procede al campionamento per la ricerca di enterobatteriacee e il conteggio di colonie aerobiche, i prelievi sono effettuati in quattro siti di ogni carcassa. Si prelevano con metodo distruttivo quattro campioni di tessuto che costituiscono un totale di 20 cm^2. Qualora a questo scopo sia utilizzato il metodo non distruttivo, l'area campione è di almeno 100 cm^2 (50 cm^2 per le carcasse di piccoli ruminanti) per sito di campionamento.

Quando si prelevano campioni per la ricerca di *Salmonella*, è utilizzato un metodo di prelievo con spugna abrasiva. L'area campione è di almeno 100 cm^2 per sito selezionato.

Quando i campioni sono prelevati sulle carcasse da diversi siti, prima di essere esaminati sono aggregati.

Norme di campionamento per le carcasse di pollame

Per le analisi per la ricerca di *Salmonella*, in ogni sessione di campionamento sono prelevate casualmente almeno 15 carcasse dopo raffreddamento. Da ciascuna carcassa sono prelevati campioni di pelle di collo del peso di circa 10 g. In ogni occasione i campioni di pelle di collo prelevati da tre carcasse sono aggregati prima di essere esaminati, in modo da formare 5 campioni finali di 25 g.

Linee guida sul campionamento

Linee guida più dettagliate sul campionamento delle carcasse, in particolare per quanto riguarda i siti di campionamento, possono essere incluse nei manuali di corretta prassi operativa di cui all'articolo 7 del regolamento (CE) n. 852/2004.

Frequenze di campionamento per le carcasse, la carne macinata, le preparazioni a base di carne e le carni separate meccanicamente

Gli operatori del settore alimentare dei macelli o degli stabilimenti che producono carne macinata, preparazioni a base di carne o carni separate meccanicamente prelevano campioni per l'analisi microbiologica almeno una volta alla settimana. Il giorno di campionamento deve variare da una settimana all'altra, affinché sia coperto ogni giorno della settimana.

Per quanto riguarda il campionamento di carne macinata e preparazioni a base di carne per le analisi destinate alla ricerca di *E. coli* e al conteggio delle colonie aerobiche e il campionamento delle carcasse per le analisi destinate alla ricerca di enterobatteriacee e al conteggio delle colonie aerobiche, la frequenza può essere ridotta a una volta ogni due settimane qualora si ottengano risultati soddisfacenti per sei settimane consecutive.

Nel caso del campionamento di carne macinata, preparazioni a base di carne e carcasse per la ricerca di *Salmonella*, la frequenza può essere ridotta a una volta ogni due settimane qualora si ottengano risultati soddisfacenti per 30 settimane consecutive. La frequenza di campionamento per la ricerca della salmonella può inoltre essere ridotta se vi è un programma di controllo nazionale o regionale della salmonella e se tale programma prevede prove che sostituiscano suddetto campionamento. La frequenza di campionamento può essere ulteriormente ridotta se il programma di controllo nazionale o regionale della salmonella dimostra che la prevalenza di salmonella è bassa negli animali acquistati dal macello.

Tuttavia, se l'analisi dei rischi lo giustifica e di conseguenza l'autorità competente lo autorizza, i macelli di piccole dimensioni e gli stabilimenti nei quali si producono carne macinata e preparazioni a base di carne in piccole quantità possono essere esentati da queste frequenze di campionamento.

ALLEGATO II

Gli studi di cui all'articolo 3, paragrafo 2, comprendono:

— prove per determinare le caratteristiche fisico-chimiche del prodotto, quali pH, a_w, contenuto salino, concentrazione di conservanti e tipo di sistema di confezionamento, tenendo conto delle condizioni di lavorazione e di conservazione, delle possibilità di contaminazione e della conservabilità prevista,

— consultazione della letteratura scientifica disponibile e dei dati di ricerca sulle caratteristiche di sviluppo e di sopravvivenza dei microrganismi in questione.

Se necessario, in base agli studi summenzionati, l'operatore del settore alimentare effettua studi ulteriori, che possono comprendere:

— modelli matematici predittivi stabiliti per il prodotto alimentare in esame, utilizzando fattori critici di sviluppo o di sopravvivenza per i microrganismi in questione presenti nel prodotto,

— prove per determinare la capacità dei microrganismi in questione, debitamente inoculati, di svilupparsi o sopravvivere nel prodotto in diverse condizioni di conservazione ragionevolmente prevedibili,

— studi per valutare lo sviluppo o la sopravvivenza dei microrganismi in questione che possono essere presenti nel prodotto durante il periodo di conservabilità, in condizioni ragionevolmente prevedibili di distribuzione, conservazione e uso.

Gli studi summenzionati tengono conto della variabilità intrinseca in funzione del prodotto, dei microrganismi in questione e delle condizioni di lavorazione e conservazione.

NORME DI LEGGE PRECEDENTI IL REGOLAMENTO (CE) 2073/2005

Nota

Viene qui riportata unicamente quella parte di norme che non è in conflitto con il Regolamento (CE) 2073/2005. Si tratta, comunque, di parametri microbiologici considerati nella letteratura scientifica recente come ***indicatori di igiene del prodotto*** e non come ***criteri di sicurezza alimentare***.

O.M. 11/10/78 "Limiti di cariche microbiche tollerabili in determinate sostanze alimentari e bevande".

– Latte in polvere per l'alimentazione della prima infanzia:

CBT aerobia	n = 5	c = 0	inferiore a 10^4 germi/ml
Coliformi	n = 5	c = 0	assenza in 1 g

Circolare Ministero della Sanità 03/08/85, n. 32 "Limiti di cariche microbiche suggeriti per paste alimentari e paste alimentari farcite".

– Paste all'uovo industriali secche:

CBT a 32 °C	n = 5 c = 2	m = 10.000/g	M = 1.000.000/g
S. aureus	n = 5 c = 2	m = 100/g	M = 1.000/g
Salmonella	n = 5 c = 0		assenza in 25 g

– Paste all'uovo artigianali fresche non confezionate:

CBT a 32 °C	n = 5 c = 2	m = 100.000/g	M = 1.000.000/g
S. aureus	n = 5 c = 2	m = 1.000/g	M = 10.000/g
Coliformi	n = 5 c = 2	m = 1.000/g	M = 10.000/g
Salmonella	n = 5 c = 0		assenza in 25 g

– Paste farcite industriali fresche confezionate:

CBT a 32 °C	n = 5 c = 1	m = 100.000/g	M = 1.000.000/g
S. aureus	n = 5 c = 1	m = 100/g	M = 500/g
C. perfringens	n = 5 c = 1	m = 100/g	M = 1.000/g
Salmonella	n = 5 c = 0		assenza in 25 g

– Paste farcite artigianali fresche non confezionate:

CBT a 32 °C	n = 5 c = 2	m = 100.000/g	M = 1.000.000/g
S. aureus	n = 5 c = 2	m = 1.000/g	M = 10.000/g
Salmonella	n = 5 c = 0		assenza in 25 g

– Paste farcite precotte surgelate:

CBT a 32 °C	n = 5 c = 2	m = 100.000/g	M = 300.000/g
E. coli	n = 5 c = 0		assenza in 1 g
S. aureus	n = 5 c = 0		inferiore a 100/g
C. perfringens	n = 5 c = 0		inferiore a 30/g
Salmonella	n = 5 c = 0		assenza in 25 g

DL 04/02/93 n. 65 "Attuazione della direttiva 89/437/CEE che definisce i criteri igienico-sanitari da osservare nelle fasi di produzione e di commercializzazione dei prodotti d'uovo destinati al consumo umano diretto o alla fabbricazione di altri prodotti alimentari".

Criteri da soddisfare dopo il trattamento negli stabilimenti.

Batteri aerobi mesofili	$M = 10^5$/g (ml)
Enterobatteri	$M = 10^2$/g (ml)
Staphylococcus aureus	assenza in 1 g (ml)
Salmonella	assenza in 25 g (ml)

M = valore massimo di batteri. Il risultato è considerato insoddisfacente se in almeno una delle unità di campionamento si rileva un valore uguale o superiore a M.

O.M. 07/12/93 "Limiti di Listeria monocytogenes in alcuni prodotti alimentari".

– Alimenti crudi non sottoposti a trattamento di riscaldamento:
n = 3 c = 2 M = 110/g m = 11/g

– Alimenti congelati o surgelati:
n = 5 c = 3 M = 110/g m = 11/g

– Alimenti precotti o pasteurizzati:
n = 5 c = 1 M = 110/g m = 11/g

D.P.R. 03/08/98, n. 309 "Regolamento recante norme di attuazione della direttiva 948/65/CE relativa ai requisiti applicabili all'immissione sul mercato di carni macinate e di preparazioni di carni.

– Carni macinate
Stafilococchi n = 5 c = 2 $M = 10^3$/g $m = 10^2$/g

– Preparazioni di carni:
Stafilococchi n = 5 c = 1 $M = 10^3$/g $m = 5 \times 10^2$/g

M = 10 m in caso di conteggio effettuato in ambiente solido; 30 m in ambiente liquido.

D.P.R. 14/01/1997, n. 54 "Regolamento recante attuazione delle direttive 92/46 e 92/47/CEE in materia di produzione e immissione sul mercato di latte e di prodotti a base di latte".

LATTE CRUDO BOVINO

– latte destinato alla produzione di latte alimentare trattato termicamente, di latte con aggiunta di fermenti, caglio, gelificato o aromatizzato e di creme, o di altri prodotti a base di latte:
tenore di germi a 30 °C (per ml) ***inferiore a 100.000****
*media geometrica su due mesi con almeno 2 prelievi al mese

– latte destinato alla pasteurizzazione (esaminato entro 36 ore dalla raccolta):
tenore di germi a 30 °C (per ml) ***inferiore a 300.000***

– latte trattato termicamente una volta e destinato a una seconda pasteurizzazione:
tenore di germi a 30 °C (per ml) ***inferiore a 100.000***

– latte destinato alla fabbricazione di prodotti "al latte crudo", il cui processo di fabbricazione non comprende alcun trattamento termico:
tenore di germi a 30 °C (per ml) ***inferiore a 100.000****
*media geometrica su due mesi con almeno 2 prelievi al mese

S. aureus (per ml)	***m = 500***	***M = 2.000***	***n = 5***	***c= 2***

LATTE BUFALINO E OVI-CAPRINO

– latte destinato alla fabbricazione di prodotti a base di latte:
tenore in germi a 30 °C (per ml) ***inferiore a 1.500.000***
– latte destinato alla fabbricazione di prodotti "al latte crudo":
tenore in germi a 30 °C (per ml) ***inferiore a 500.000***

LATTE COME ALIMENTO PRONTO DA CONSUMARE

Latte crudo di vacca confezionato

– Tenore di germi a 30 °C (per ml): ***inferiore a 50.000****
***** media geometrica su due mesi, almeno due prelievi al mese

S. aureus (per ml)	***n = 5***	***c = 2***	***m = 100***	***M = 500***
Salmonella	***n = 5***	***c = 0***	***assenza in 25 g***	

Assenza di microrganismi patogeni e tossine

Latte sterilizzato e latte UHT nello stabilimento

– Tenore di germi aerobi mesofili a 30 °C (per 0,1 ml): ***non superiore a 10***

NORME I CUI PRODOTTI NON SONO CONTEMPLATI DAL REGOLAMENTO (CE) 2073/2005

Acque

Acqua potabile: è quella che esce dal rubinetto e dalle fontanelle pubbliche. È definita come acqua destinata al consumo umano, per uso potabile, per la preparazione dei cibi, o per altri usi domestici. Non deve "contenere microrganismi e parassiti, nè altre sostanze, in quantità o concentrazioni tali da rappresentare un potenziale pericolo per la salute umana". La normativa fissa limiti batteriologici e chimico-fisici. L'acqua potabile può essere trattata (clorazione).

Acqua da tavola: è l'acqua potabile imbottigliata (spesso in boccioni) o servita in caraffe nei ristoranti. In quest'ultimo caso, deve essere indicata come "acqua potabile trattata" o "acqua potabile trattata e gassata".

Acqua di sorgente: è l'acqua potabile prelevata alla fonte della migliore falda dell'acquedotto che non può essere clorata, ma può avere gli stessi trattamenti delle acqua minerali.

Acqua minerale: "Sono considerate acque minerali naturali le acque che, avendo origine da una falda o giacimento sotterraneo, provengono da una o più sorgenti naturali o perforate e che hanno caratteristiche igieniche particolari e, eventualmente, proprietà favorevoli alla salute".

La normativa vigente stabilisce che le acque minerali naturali si distinguono dalle ordinarie acque potabili per la purezza originaria e sua conservazione, per il tenore in minerali, oligoelementi e/o altri costituenti e, eventualmente, per taluni loro effetti.

Acqua potabile

D.L.2 febbraio 2001 n° 31 in attuazione alla direttiva 98/83/CE relativa alla qualità delle acque destinate al consumo umano

PARAMETRI MICROBIOLOGICI FONDAMENTALI	LIMITI DI ACCETTABILITÀ
1. *Escherichia coli*	0 in 100 ml
2. Enterococchi	0 in 100 ml

se l'acqua viene messa in vendita in bottiglie o in contenitori:
– assenza di *Escherichia coli* in 250 ml
– assenza di enterococchi in 250 ml
– assenza di *Pseudomonas aeruginosa* in 250 ml
– carica batterica totale a 22° C inferiore a 100 colonie per ml
– carica batterica totale a 37 °C inferiore a 20 colonie per ml

Acque minerali

D. 29 dicembre 2003 "Attuazione della Direttiva 2003/40/CE relativa ai criteri di valutazione delle caratteristiche delle acque minerali naturali di cui al D.M. 12.11.1992 n. 542 e successive modificazioni

– assenza di coliformi in 250 ml (due repliche)
– assenza di streptococchi fecali in 250 ml (due repliche)
– assenza di spore di clostridi solfito-riduttori in 50 ml
– assenza di *Staphylococcus aureus* in 250 ml
– assenza di *Pseudomonas aeruginosa* in 250 ml

CAP. 9

Alcuni cenni sui metodi non tradizionali

Avvertenza

Per una più completa visione dell'argomento, si rimanda al testo pubblicato da Allan L. Truant *Manual of commercial methods in clinical microbiology* ASM, Washington, USA, 2002.

Da questo libro sono stati presi anche i nomi dei prodotti commerciali e delle relative case produttrici che figurano nei vari capitoli del presente manuale.

Come esposto in precedenza, i metodi tradizionali in batteriologia prevedono, per le ricerche su alimenti, un percorso quasi obbligatorio, che prevede una fase di arricchimento dei microrganismi, una fase di isolamento su terreni solidi e una serie di prove per l'identificazione delle colonie sospette.

Contemporaneamente all'affermarsi della plastica sterile monouso nei laboratori e alla comparsa degli anticorpi monoclonali, si è assistito alla nascita di *kit* diagnostici basati su metodi chiamati *innovativi* o *non tradizionali*, caratterizzati da abbreviati tempi di risposta, facilità di esecuzione, buona sensibilità e alta specificità. In genere, questi metodi richiedono una discreta concentrazione del microrganismo da ricercare (10^3/ml o più), per cui la loro applicazione inizia nella fase di arricchimento dei germi tradizionalmente inteso.

Tre gruppi di *kit* diagnostici sono oggetto di cenno e si riferiscono, rispettivamente, a *test* di natura fisico-chimica, immunologica e genetica. Si tratta di pochi esempi destinati a testimoniare l'esistenza di un patrimonio di mezzi diagnostici molto ampio e dinamico.

Non vengono presi in considerazione i *kit* che operano su colture batteriche già isolate.

Tenuto conto che si tratta di prodotti commerciali forniti pronti per l'uso ampiamente collaudati e controllati, al laboratorista rimane da valutare la convenienza economica del metodo innovativo in relazione alla mole di lavoro che normalmente svolge nel periodo di validità del kit.

TEST DI TIPO FISICO-CHIMICO

Filtrazione su membrana

Il principio di questo metodo è semplice e può essere esemplificato da una delle tante esperienze descritte, quella di Erdmann *e Coll*. (2002), che hanno sperimentato, per la ricerca di *Escherichia coli*, la filtrazione su membrana di campioni liquidi (lavaggi o prelievi superficiali di tessuto omogeneizzati in diluente) da carcasse di bovino e di suino, seguita da semina della membrana stessa su terreno selettivo solido m-Coli Blue.

Una variante alla tecnica di filtrazione consiste nella deposizione del campione *sopra* la membrana, che si trova già adagiata sulla superficie di un terreno solido specifico, senza che

avvenga una vera e propria filtrazione. I germi. trattenuti al di sopra della membrana, utilizzano le sostanze nutritive del terreno sottostante per osmosi attraverso i pori. Si ritiene che una sola cellula batterica dia luogo alla formazione di una colonia sopra la membrana stessa, rendendo possibile il conteggio dei germi.

Secondo Mc Carty *e Coll*. (1998), la numerazione delle cellule stressate di *Escherichia coli* O157:H7 presenti negli alimenti può essere realizzata nel seguente modo. Dall'omogenato del campione, si distribuiscono, con una spatola, 0,1 ml su una membrana da 0,45 μm, stesa su Trypticase Soy Agar (TSA) e si pone la piastra ad incubare a +37 °C per 4 ore. Successivamente, la membrana viene trasferita su Sorbitol Mac Conkey Agar (SMAC), da incubare a +37 °C per 20 ore.

Un altro esempio di questo tipo di *test* è offerto dalla metodica proposta da Duffy *e Coll*. (2000), che prevede un arricchimento del campione per 18 ore in acqua peptonata tamponata, nel quale viene immersa per 15 minuti una membrana di policarbonato, adesa a un vetrino. Le cellule di *Salmonella* che rimangono attaccate alla membrana vengono evidenziate da un anticorpo monoclonale coniugato con un colorante fluorescente (rosso Texas), seguito da una colorazione vitale (verde Sytox). Le salmonelle presentano un bordo rosso fluorescente; quelle morte mostrano, in più, il centro verde. L'intera colorazione è effettuabile con reagenti in commercio e dura circa un'ora.

Impedenza (o conduttanza)

I cambiamenti di conduttanza possono far sospettare la presenza di un determinato germe in uno specifico brodo d'arricchimento nel quale sia stato immerso il campione e due elettrodi. La misurazione in *millivolt* dell'impedenza (reciproco della conduttanza), effettuata ad intervalli di tempo con un apparecchio, viene confrontata con una curva *standard* predisposta.

Nella ricerca delle salmonelle con il sistema Malthus®, ad esempio, i campioni negativi si riconoscono in 30 ore e le analisi possono essere portate a temine con metodi classici solo sui campioni sospettati positivi. Cambiando il brodo d'arricchimento, è possibile ricercare la carica batterica totale o alcuni patogeni.

La validità di questi sistemi automatizzati, di cui esistono diversi tipi (Bactometer®, ecc), sta nella selettività del terreno d'arricchimento, che non deve interferire con la misurazione dell'impedenza.

Campanini e *Coll*. (1989) hanno proceduto al rilevamento rapido della contaminazione microbica della carne fresca (analisi della carica batterica totale e del contenuto di enterobatteri) usando il sistema Bactometer®.

Ogden (1993) ha pubblicato i risultati di uno studio sulla ricerca quantitativa dell' *E. coli* con il metodo della conduttanza, basato sulla reazione TMAO→TMA, con fermentazione dell'acido D-glucuronico, usando il sistema Malthus ® a +37 °C per la durata di 10 ore. Il metodo ha dimostrato una buona corrispondenza con il conteggio classico su piastra, nonostante siano possibili reazioni crociate con *Salmonella* e *Citrobacter*.

Nell'esperienza di Edmiston *e Coll*. (1998), un metodo rapido per contare le cellule di *E. coli* sulle carcasse dei polli inizia seminando 4,5 ml di acqua deionizzata sterile, usata per il lavaggio, in 4,5 ml di Coliform Medium 2x. La determinazione della conducibilità elettrica di questa sospensione si realizza a + 44 °C con l'apparecchio Bactometer®.

Bioluminescenza

Come tutte le cellule vive, anche i batteri contengono ATP (adenosin-tri-fosfato), protagonista di alcune importanti reazioni metaboliche. La trasformazione dell'ATP in altri composti può essere visualizzata fornendo alle cellule batteriche un substrato (luciferina), un enzima (luciferasi) e ioni magnesio. La luciferina diventa ossiluciferina in quantità proporzionale

all'ATP, con emissione di luce, misurabile da uno strumento (luminometro). Il metodo, perfezionato da alcune case (Lumetron®, ecc), ha trovato applicazione nella determinazione della carica batterica totale, in particolare nella valutazione dello stato igienico delle superfici di lavorazione nelle industrie alimentari.

TEST DI TIPO IMMUNOLOGICO

*ELISA (***Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay***)*

La tecnica, in questo caso, è rivolta alla dimostrazione di un antigene batterico specifico per il microrganismo da rivelare. La prova può essere eseguita, tra l'altro, in pozzetti di piastre *microtiter*, passando attraverso alcune fasi:

- cattura dell'antigene batterico da parte di un anticorpo specifico adeso alla parete di materia plastica
- lavaggio per allontanare il materiale non legato
- aggiunta di un secondo anticorpo (diretto verso il primo anticorpo) coniugato con un enzima
- lavaggio per allontanare l'anticorpo coniugato, se non legato
- aggiunta di un substrato che, per azione dell'enzima, si colora o diventa fluorescente, rendendo la reazione visibile.

Questa tecnica ha trovato molte applicazioni valide, sia per la ricerca di patogeni operando su colture in arricchimento, sia per la dimostrazione di tossine direttamente dall'alimento. Un esempio di applicazione è fornito dalla tecnica proposta da Doll *e Coll*. (2001) per la ricerca dei ceppi di *Escherichia coli* verotossici direttamente nell'alimento. Il campione di 25 grammi viene seminato in un primo arricchimento (TSB + novobiocina 20 mg/l), incubato a +37 °C per 18-24 ore, seguito da trapianto di 1 ml in 4 ml di un secondo arricchimento (TSB + mitomicina C 40 ng/ml) incubato a +37 °C per 6 ore. Segue l'applicazione del *kit* RIDASCREEN®, che consente di riconoscere da 10 a 100 cellule di un ceppo verotossico.

Separazione immuno-magnetica (IMS)

Si basa sull'aggiunta di microsfere metalliche, rivestite di anticorpi specifici per alcuni antigeni di superficie dei batteri. I complessi antigene-anticorpo, realizzati entro colture del campione in fase di arricchimento, possono essere concentrati con un semplice campo magnetico e separati. Successivamente, si può sottoporre il materiale raccolto a un esame microscopico, oppure alla coltivazione su terreni solidi selettivi. Questa tecnica ha trovato seguito, tra l'altro, per la ricerca di *Escherichia coli* O157:H7 da feci o da alimenti. Si citano alcuni esempi.

Vernozy-Rozand *e Coll*. (1997), per la ricerca in carne bovina tritata, seminano 25 grammi di materiale in 225 ml di brodo d'arricchimento MTSB, incubando a +42 °C per 4-6 ore. Quindi, diluiscono 1 ml di brodo in 20 ml di Beads Concentrate (Dynabeads®), addizionato con 30 ml di PBS+Tween 80. Segue la semina di 50 µl della miscela su piastre di terreni selettivi, da incubare a +37 °C per 18-24 ore. I terreni consigliati sono CT-SMAC (Mac Conkey contenente cefixime e tellurito di potassio) e CHROM-Agar *E. coli* O157. Vengono prese in considerazione solo le colonie formate da germi sorbitolo-negativi.

Le Jeune *e Coll*. (2001), per la ricerca nell'acqua, propone la semina del campione in brodo TSB da incubare a +44,5 °C, cui fa seguito l'immunoseparazione magnetica con il *kit* Dynabeads ®.

Arun *e Coll*. (2002), per la ricerca di *E. coli* O157 da *hamburger*, raccomandano di seminare 25 grammi di materiale in 225 ml di brodo d'arricchimento (Buffered Peptone Water antibiotato con vancomicina, cefixime e cefsulodina), da incubare per 6 ore a +37 °C. La

separazione immunomagnetica si realizza con il *kit* Dynabeads ®, le cui sferette vengono poi seminate su terreno selettivo Sorbitol Mac Conkey Agar, supplementato con potassio tellurito e cefixime.

Agglutinazione al lattice

Gli anticorpi specifici si trovano, in questo caso, collocati sulla superficie di particelle sferiche di lattice, che, in caso di unione con il corrispondente antigene batterico, danno luogo alla formazione di aggregati visibili senza l'ausilio di strumenti. La tecnica, nata per essere realizzata su vetrino alla stregua di una comune reazione di agglutinazione rapida, è passata poi alla versione predisposta su piastra *microtiter.*

Tra gli esempi, si riportano le tecniche adoperate sia da Bettelheim (2001) che da Chart *e Coll*. (2001), per la rivelazione di ceppi di *Escherichia coli* produttori di verotossina.

Secondo quest'ultimo Autore, i campioni possono essere rappresentati dal soprastante di una coltura tradizionale dell'alimento in brodo, oppure da un estratto di feci del malato in PBS, entrambi centrifugati e filtrati. La prova, effettuata con il *kit* VTEC-Screen® della Denka-Seiken su piastra *microtiter*, viene letta dopo 18 ore d'incubazione a temperatura ambiente. In caso positivo, il pozzetto della prova diventa torbido, mentre, in caso negativo, si ha un precipitato a forma di bottone.

TEST DI NATURA GENETICA

Si tratta di metodiche che si basano sulla ricerca specifica degli acidi nucleici mediante tecniche di ibridazione. Si utilizzano sonde a DNA o a RNA (*probes*), che riconoscono sequenze geniche specifiche del microrganismo da identificare nell'alimento. In questo modo, è possibile la ricerca di agenti patogeni non coltivabili con i metodi tradizionali. È anche possibile decidere se il microrganismo è tossigeno o patogeno, conoscendo la sequenza genica che comanda la produzione di tossine, oppure l'espressione di fattori di virulenza.

Le sonde sono generalmente ottenute con l'uso di enzimi di restrizione (endonucleasi) o per sintesi e mostrano una corta catena di basi per ibridare con massima specificità la sequenza-bersaglio. Alcune varianti tecniche usate in microbiologia alimentare sono le seguenti:

Principio del metodo	Tecnica molecolare	Varianti della tecnica fondamentale
sonde molecolari (biosonde o *probes*)	Ibridazione *in situ* Ibridazione su matrice solida Ibridazione mediante *dip-stick* DNA *fingerprinting*	*Southern blot* *Northern blot* *Dot blot*
Amplificazione molecolare	*Polymerase Chain Reaction* (PCR)	*Long-acting* PCR *Multiplex* PCR *Nested* PCR
Plasmid fingerprinting		

Sonde molecolari

Una sonda molecolare (*probe*) nasce dal clonaggio di un gene. Questo gene diventerà poi il "bersaglio" (*target*) da riconoscere, mediante ibridazione con la sonda specifica, una volta che questa è stata prodotta.

Le sonde si ottengono dal DNA batterico o virale mediante digestione con enzimi di restrizione. Il frammento del genoma, ritenuto caratteristico per quel microrganismo, viene clonato in un vettore adatto (ad esempio, un batteriofago) e introdotto in cellule batteriche

che lo moltiplicano in gran quantità durante la loro riproduzione. Da qui, recuperato, viene marcato con radioisotopi oppure enzimi coniugati con sostanze colorate o fluorescenti e usato nelle varie tecniche di ibridazione.

Ibridazione in situ

Permette di identificare la presenza di specifiche sequenze geniche nel DNA o nell'RNA di microrganismi presenti nei tessuti. La tecnica può essere applicata a sezioni di tessuti fissate in formalina e incluse in paraffina. Consente, quindi, anche studi retrospettivi o ricerche di agenti infettanti non coltivabili *in vitro*.

Ibridazione su matrice solida

Consente di identificare specifiche sequenze geniche in microrganismi presenti nei liquidi organici o in campioni (ad esempio, di alimenti) dai quali venga estratto il DNA. Rappresenta la base delle più frequenti applicazioni pratiche delle tecniche di ibridazione (*Southern blot* e *Dot blot*).

Southern blot

Il campione di DNA da riconoscere viene digerito con enzimi di restrizione e i frammenti ottenuti vengono separati per elettroforesi su *gel* di agarosio e trasferiti, quindi, su foglio di nitrocellulosa. Segue l'ibridazione con sonde diagnostiche e la lettura, mediante rivelazione con autoradiografia (nel caso di sonde radioattive) o sviluppo di colore (avidina-cromogeno, se si usano sonde biotilinate).

Northern blot

A differenza del *Southern blot*, la prova parte dall'RNA totale anziché dal DNA genomico.

Dot-blot

Il campione viene disposto direttamente su un foglio di nitrocellulosa e trattato con detergenti che liberano gli acidi nucleici. La loro eventuale reazione con una sonda marcata viene rivelata per via colorimetrica.

Dip-stick

Consiste in una reazione di ibridazione, in mezzo liquido, attraverso sonde adese a uno *stick* di plastica, da immergere nel campione e, successivamente, in una serie di reagenti. Si avvale di due sonde molecolari, una di "cattura", specifica per l'RNA del "bersaglio" (*target*) da individuare, e una di "rivelazione". La lettura avviene dopo aggiunta di un enzima e misurazione, con spettrofotometro, del colore sviluppato.

DNA fingerprinting

Il DNA estratto dal materiale in esame viene frammentato con enzimi di restrizione e fatto migrare su *gel* di agarosio. Le bande ottenute vengono ibridate con sonde molecolari (DNA-*probes*), specifiche per alcune regioni caratteristiche del genoma del microrganismo sospettato.

*Amplificazione molecolare (***Polymerase Chain Reaction*, PCR)*

Le normali tecniche di ibridazione del DNA necessitano della presenza nel campione di una quantità minima di basi per far scattare la reazione di combinazione con la sonda. La tecnica PCR consente di amplificare anche minime tracce di acidi nucleici presenti nel campione. Dopo estrazione del DNA dal materiale in esame, si separano le due eliche mediante riscaldamento (*denaturation*). Si aggiungono due oligonucleotidi specifici, che si legano a una delle due eliche nel tratto desiderato (*annealing*) e l'enzima polimerasi. Il frammento di DNA, delimitato dagli oligonucleotidi, viene amplificato (*elongation*), dando origine, dopo 20-50 cicli di riscaldamento e raffreddamento, a un numero elevatissimo di copie del DNA-bersaglio. Seguono le fasi di separazione dei prodotti di ibridazione mediante elettroforesi su *gel* di agarosio, di colorazione con bromuro di etidio e di lettura in luce ultravioletta con raffronto verso campioni noti.

Long acting PCR

Mentre una normale procedura di amplificazione genera al massimo alcune migliaia di pb (paia di basi), questa tecnica permette, con opportuni accorgimenti, di raggiungere anche 30-35 kpb.

Multiplex PCR

Utilizzando più di una coppia di oligonucleotidi, si possono amplificare due o più tratti di DNA bersaglio, costituiti, ad esempio, da diversi segmenti del genoma di un microrganismo. La reazione, più specifica rispetto a una normale PCR, permette di evitare la conferma dei risultati dell'amplificazione.

Nested PCR

Si eseguono due amplificazioni successive, adoperando, nella seconda operazione, due oligonucleotidi di lunghezza inferiore rispetto ai precedenti. Si ottiene un frammento di amplificazione di dimensioni minori, ma ancora più specifico ai fini diagnostici.

Real Time PCR

Questa tecnica consente di individuare le cellule batteriche in maniera non solo qualitativa (fornendo il solito esito positivo/negativo), ma anche quantitativa. Essa si basa sul fatto che, nella reazione della polimerasi, si accumulano, a ogni ciclo di duplicazione del DNA, quantità progressivamente crescenti di acido nucleico. Quest'ultimo, quando è bicatenario e ha raggiunto una certa concentrazione, fa diventare fluorescente un particolare colorante, il *sybrgreen*, aggiunto alla miscela di reazione. Il procedimento richiede un apparecchio automatizzato di lettura della fluorescenza (Roche®), che segnala, in tempo reale (*real time*), il numero di cicli di reazione indispensabili per ottenerla.

All'aumentare del numero di frammenti-bersaglio del DNA da duplicare, corrisponde una diminuzione dei cicli di reazione necessari per raggiungere la soglia minimale di sviluppo della fluorescenza. Con l'aiuto di curve precostituite, che mettono in relazione il numero di cicli di PCR con la quantità di DNA bersaglio, è possibile effettuare, quindi, una stima dei batteri presenti nel campione.

Oltre al colorante fluorescente, sono state studiate anche altre forme chimiche di marcatura delle sonde con speciali sostanze (sonde a ibridazione, FRET, e sonde idrolizzabili, Taqman), i cosiddetti *molecular beacons* (*peptide nucleic acids* o PNA e *minor groove binding* o MGB).

La Real time PCR, riconosciuta come tecnica altamente sensibile e specifica, è stata già impiegata in medicina umana per il riconoscimento delle cellule tumorali e in veterinaria per la diagnosi di *Salmonella* e di *Listeria* (Cattoli, 2004).

Plasmid fingerprinting

È letteralmente l'impronta digitale dei plasmidi, formati da DNA extra-cromosomiale, caratteristici per le varie specie viventi. Dalla fotografia o mappa dei plasmidi, si possono identificare i batteri senza l'uso di sonde molecolari. La tecnica prevede l'isolamento dei plasmidi, la digestione con enzimi di restrizione, la separazione dei frammenti mediante elettroforesi su *gel* di agarosio e la lettura in fluorescenza delle bande caratteristiche, da confrontare con la disposizione delle medesime appartenenti a ceppi di riferimento.

ESEMPI APPLICATIVI

Alcune applicazioni pratiche delle tecniche sopra accennate vengono qui riportate a titolo di esempio, per spiegare i passaggi essenziali necessari durante l'esecuzione dei *test*:

Sistema Gene-Probe® come esempio di Dot-blot Ibridization

Il DNA contenente la sequenza da riconoscere viene estratto dal campione per lisi cellulare e immobilizzato su foglio di nitrocellulosa. Successivamente, viene ibridato con sonde a singola elica marcate con arancio di acridina. Segue un'idrolisi alcalina per degradare la sonda DNA non ibridata e la lettura al luminometro.

Sistema Gene-Trak® come esempio di Dip-stick

Prevede l'estrazione del rRNA dai batteri in fase di arricchimento e l'uso di due sonde specifiche, dette, rispettivamente, di *cattura* e di *rivelazione.* Grazie alla prima sonda, si forma un ibrido con i batteri, che si fissa su un supporto solido. La sonda di rivelazione contiene fluoresceina. L'aggiunta al sistema campione+sonde di un substarto cromogeno e di un anticorpo anti-fluoresceina permette di leggere allo spettrofotometro la formazione di colore.

Kit diagnostici tipo BAX®, come esempi di Polymerase Chain Reaction (PCR)

La tecnica passa attraverso tre successive fasi:

1. Estrazione del DNA dai batteri dopo arricchimento tradizionale.
2. Amplificazione della sequenza di una coppia di geni (selezionati perché caratteristici) mediante aggiunta di appropriati oligonucleotidi (*primers*).
3. Ibridizzazione dei prodotti amplificati con oligonucleotidi (*probes*) coniugati con un enzima capace di far colorare un substrato.

La novità della PCR sta nella fase 2, dove intervengono i *primers*, corti segmenti di DNA complementari alle terminazioni 5' e 3' della sequenza da amplificare, e dove l'estensione dei *primers* a opera della DNA polimerasi produce due filamenti di DNA che sono copie identiche del filamento originale. A ogni ciclo, il numero di copie del DNA aumenta di 2^n, dove n è il numero dei cicli. Quindi, dopo 30 cicli si ottiene un'amplificazione del segmento specifico del DNA di circa 10^6 volte, consentendo di visualizzare alcune sequenze di nucleotidi capaci di dare informazioni utili per individuare un genere o una specie batterica.

Nel caso della ricerca della *Listeria*, si omogenizzano 25 grammi del campione in 225 ml di Half-Fraser Broth e si incuba a +30 °C per 22-24 ore. Successivamente, si trasferiscono 0,1 ml in 9,9 ml di MOPS Buffered Listeria Enrichment Broth e si incuba a +35 °C per 20-24 ore. Quindi, in una provettina contenente 200 µl di reagente di lisi, si aggiungono 5 µl del campione arricchito. La miscela viene sottoposta a estrazione del DNA mediante soggiorno in bagnomaria a secco a +55 °C per un'ora e poi a 95 °C per 20 minuti. L'amplificazione seguente del DNA avviene mettendo a contatto 50 µl del campione con una tavoletta contenente

liofilizzati i reagenti PCR e facendo avvenire la reazione nel *thermal cycler*, che in circa due ore e mezza, provoca i vari cicli di denaturazione, *annealing* ed estensione dei frammenti di DNA, ricavandone milioni di copie. Ovviamente, se la sequenza specifica del DNA della *Listeria* non è presente nel campione, l'amplificazione non ha luogo. L'analisi prosegue con un'elettroforesi di 30 minuti a 180 *volts*, nella quale 10 µl del campione, trattato come sopra, vengono caricati su un *gel* pre-colorato. Alla fine, il *gel* stesso viene fotografato sotto una luce ultravioletta e il risultato (se positivo si hanno due bande, se negativo una sola banda) viene letto per confronto con un controllo positivo incluso nel *kit*.

È possibile evidenziare la specie batterica desiderata già da una brodocoltura del campione, oppure identificare il germe esaminando un ceppo già isolato. Sfortunatamente questa tecnica non distingue le cellule batteriche morte da quelle vive.

Commenti sul futuro dei metodi non tradizionali

Alcuni dei metodi innovativi accennati si sono già imposti come *kit* commerciali nei laboratori di medicina umana e di diagnostica clinica veterinaria. Ad esempio, la ricerca di *Listeria monocytogenes* può essere affrontata con un certo numero di tecniche non tradizionali, su colture già isolate o direttamente dal campione in corso d'arricchimento, come hanno scritto gli Autori di seguito citati:

- Filtrazione su membrana (Besse *e Coll*., 2001);
- Separazione immunomagnetica (Skjerve *e Coll*., 1990);
- Impedometria con Bactometer (Phillips *e Coll*., 1989);
- Immunofluorescenza diretta (Mc Lauclin *e Coll*., 1989);
- Immunofluorescenza indiretta (Sheridan *e Coll*., 1991), sulle carni;
- Immunoenzimatica ELISA con i *kit* Tecra® e Listeria-Tek® Organon (Kerr *e Coll*.,1990, Meier *e Coll*., 1993) su carni, formaggi, mangimi da e con il *test* Vikam® (Barbuti *e Coll*., 1995);
- Tecnica molecolare PCR con i *kit* BAX®, Accu-Probe®, Gene-Trak® (Althage *e Coll*., 1992; Url *e Coll*., 1993; Hochberg *e Coll*., 2001), su latte e superfici;
- Tecnica molecolare Immunoblot (Patel *e Coll*., 1995).

Oltre ad elevata sensibilità e specificità, questi metodi presentano due vantaggi non trascurabili:

- in larga parte riducono il rischio di infezioni da colture vive in laboratorio;
- consentono la dimostrazione di microrganismi che crescono con difficoltà sui terreni batteriologici.

Grazie soprattutto a quest'ultima prerogativa, sono stati studiati germi prima scarsamente conosciuti. Fra essi figurano patogeni che possono arrivare all'uomo attraverso alimenti contaminati. Ovviamente, le ricerche su questi microrganismi sono state attivate dopo focolai di malattia nell'uomo e, pertanto, i protocolli d'indagine esistenti sono destinati per lo più all'esame di campioni clinici. Tuttavia, sulla spinta di studi epidemiologici che dimostrano il coinvolgimento dei cibi nella propagazione delle infezioni, è prevedibile in futuro un ampliamento verso la microbiologia alimentare.

Altri microrganismi, ancora scarsamente ricercati, risultano trasmissibili con gli alimenti. Fra questi, è necessario includere, in quanto patogeni, *Burkholderia cepacia*, *Burkholderia pseudomallei*, *Francisella tularensis*, *Mycobacterium spp*.

Questi batteri, che diffondono nell'ambiente per lo più attraverso l'acqua, attualmente sono fra quelli dimostrabili, in via preferenziale, con tecniche molecolari, specialmente la *Polymerase Chain Reaction* (Zanetti *e Coll*., 2000).

A sostegno delle considerazioni esposte sopra, si portano due esempi: *Legionella* ed *Helicobacter pylori*.

Il caso della Legionella

Il genere *Legionella* è formato da lunghi bastoncini Gram-negativi, asporigeni, debolmente ossidasi e catalasi positivi, divisi in circa 40 specie, ritenuti responsabili di polmoniti e di malattie sub-cliniche a localizzazione extra-polmonare. *Legionella pneumophila* è stata isolata in laboratorio su appositi terreni selettivi da tamponi, sangue, tessuti. Accanto al metodo colturale si sono poi sviluppate tecniche innovative.

Si citano esperienze favorevoli fatte con due *test* immunoenzimatici (*Binax* e *Biotest*) da alcuni Autori, che hanno analizzato campioni di urine concentrate e non concentrate (Truant, 2002).

Possibili collegamenti con la microbiologia alimentare derivano dall'*habitat* di questo germe, che diffonde preferibilmente attraverso l'acqua. Una metodica di ricerca immuno-enzimatica potrebbe essere quindi estesa utilmente, con opportuni adattamenti, all'analisi delle acque destinate al consumo umano.

Il caso dell'Helicobacter pylori

Al genere *Helicobacter* appartengono bacilli Gram-negativi spiraliformi o incurvati, asporigeni, ossidasi positivi. Nell'uomo sono stati associati all'ulcera peptica e a forme tumorali del tratto gastro-intestinale. Si tratta di un microrganismo la cui morfologia cambia da elicoidale a sferica, in relazione alla necessità di sopravvivere a condizioni estreme, capace di impiantarsi in ambienti ostili come lo stomaco dell'uomo e degli animali, mediante una strategia d'attacco singolare, cioè alzando il *p*H attraverso la produzione di urea. In laboratorio, può assumere la morfologia coccoide non coltivabile (viene definito "vivo non coltivabile, VNC").

Oggi prevale l'opinione che *H. pylori* provenga dall'acqua, unica matrice comune presso popolazioni a latitudini diverse da cui è stato isolato. Questa affermazione è avvalorata da ricerche svolte in USA e in America Meridionale, nel corso delle quali *H. pylori* è stato ripetutamente isolato da fiumi e lagune che forniscono acqua a grandi città.

Contrariamente a quanto credevano i batteriologi, questo germe vive fino a 20 giorni nelle acque ed eventualmente reagisce assumendo la forma coccoide non coltivabile. A causa della coltura negativa in laboratorio veniva ritenuto assente. L'affinamento di nuove tecniche diagnostiche, tra cui la *Polymerase Chain Reaction (PCR)* e la ricerca dell'antigene mediante *test* immunologici sul tipo dell'HpSA Premier *(Meridian),* ha esteso le possibilità di ritrovamento in campi prima inaccessibili.

Probabilmente, *H. pylori* entrerà nella categoria dei batteri cosiddetti "ubiquitari" (come è avvenuto per salmonelle e listerie) e tra gli agenti di zoonosi. Attualmente, è visto come un patogeno opportunista, principalmente adattato all'uomo e ad alcuni animali d'affezione (*pets*), tra cui il cane, il gatto, il criceto.

Anche specie d'allevamento (suini, polli) e alcuni selvatici sono risultati sensibili, sebbene da essi sia più facile isolare altre specie *(H. felis, H. heilmannii, H. salomonis,* ecc). Peraltro, trattandosi di una materia nuova, le oltre venti specie finora descritte (e ritenute diverse) potrebbero ridursi di numero. Per il momento, sembrano esclusi dalla contaminazione i bovini e le carni bovine macinate sottoposte a congelamento (*hamburger*).

Una più importante fonte di contagio sembra essere invece la pecora, dal cui latte crudo è stato isolato in Sardegna *H. pylori.* È stato addirittura ipotizzato che la pecora sia l'ospite ancestrale di questo germe e che l'uomo l'abbia "ereditato" addomesticando la pecora. Curiosamente, agli ovini si è giunti dopo aver trovato che i pastori erano quasi tutti portatori asintomatici del microrganismo.

Nota applicativa

È opportuno precisare che *Legionella* e *H. pylori* sono germi coltivabili *in vitro* anche su terreni batteriologici opportunamente formulati.

Per *Legionella,* il terreno più usato è l'Agar BCYE, contenente ioni ferro e l-cisteina, sostanze indispensabili, reso selettivo dall'aggiunta di un supplemento antibiotico. L'incubazione avviene a +37 °C fino a 7 giorni in atmosfera con il 3-5% di anidride carbonica. Le colonie, che appaiono dopo 3-5 giorni con un diametro di 1-3 mm, hanno l'aspetto del vetro smerigliato. Possono essere identificate mediante un esame microscopico in immunofluorescenza, che sfrutta anticorpi monoclonali specifici.

Per *H. pylori*, le semine vengono allestite su Columbia Blood Agar. L' incubazione dura una settimana a +37 °C in presenza di una sorgente di umidità, con il 5% di ossigeno e il 6-10% di anidride carbonica. Le colonie, di 1-2 mm di diametro, incolori, non emolitiche, che crescono in 3-5 giorni vengono controllate mediante un esame microscopico (colorazione di Gram o arancio di acridina) e confermate mediante alcune prove biochimiche dall'esito positivo (catalasi, ossidasi, ureasi).

RIFERIMENTI BIBLIOGRAFICI

Arun O. *e Coll*., Recovery of *Escherichia coli* O157 from hamburger; evaluation and comparison of direct plating and immunomagnetic separation (IMS) in combination with various enrichment procedures, Ach. Lebens. 2002, 53, 121-144

Barbuti S. *e Coll*., *Test* quantitativo per *Listeria* col nuovo metodo ELISA. Confronto con il metodo ufficiale. Ind. Alim. 1995, *34*, 115

Begue R.E. *e Coll.* Dietary risk factors associated with the transmission of *Helicobacter pylori* in Lima, Peru, Am. J. Trop. Med. Hyg. 1998, *59*, 637-640

Besse N.G. *e Coll*., Development of a membrane filtration method for enumeration of *Listeria monocytogenes* from soft cheese, Food Microbiol. 2001, *18*, 669-676

Bettelheim K.A., Development of a rapid method for the detection of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC), Latters in Appl. Micr. 2001, *33*, 31-35

Bunn J.E.G. *e Coll.,* Supplemental water in early infancy : a risk factor for *H. pylori?* Abstract of the European *Helicobacter pylori* Study Group, 10th Int. Workshop, 1997, p.A 37, Lisbon, Portugal

Campanini M. *e Coll*., Rilevamento rapido della contaminazione microbica della carne fresca con metodo impedometrico, Ind. Conserve 1989, *64*, 121

Carballo F. *e Coll.,* Untreated drinking water is a source of *H. pylori* infection, Abstract of the European *Helicobacter pylori* Study Group, 10th Int. Workshop, 1997, p.A 39, Lisbon, Portugal

Cave D.R. *e Coll.,* How is *Helicobacter pylori* transmitted? Gastroenterology, 1997, *113*, S 9-S 14

Cattoli G., Real time PCR: principi e applicazioni, Relazione presentata al Corso di Aggiornamento teorico-pratico per tecnici di laboratorio, VI Congresso S.I.Di.L.V., Abano Terme (PD), 11 novembre 2004

Chart H. *e Coll*., Evaluation of a reversed passive latex agglutination test for the detection of verocytotoxin (VT) expressed by strains of VT-producing *Escherichia coli*, Letters in Appl. Micr. 2001, 32, 370-374

Doll F. *e Coll*., Eignung des RIDASCREEN® Enzym-immunoassay zum Nachweis von Verotoxinen in Lebensmitteln, Fleischwirtsch. 2001, *81*, 97-99

Dore M.P. *e Coll*., *Helicobacter pylori* in sheep milk, Lancet 1999, *354*, 132

Edmiston A.L. *e Coll*., A rapid microbiological method for enumerating *Escherichia coli* from boiler chicken carcasses, J. Food Protect. 1998, *61*, 1355-1377
Erdmann J.J. *e Coll*., A new technique for *Escherichia coli* testing of beef and pork caracasses, J. Food Protect. 2002, 65, 192-195
Handwerker J. *e Coll.,* Detection of *Helicobacter pylori* in drinking water using polymerase chain reaction amplification, Abstract of the 9th General Meeting of the American Society for Microbiology, 1995, p.435, Washington D.C., USA
Hochberg A.M. *e Coll*., Sensitivity and specificity of the BAX® for screening *Listeria monocytogenes* assay: internal validation and independent laboratory study, J. AOAC Internat. 2001, *84*, 1087-1091
Hopkins R.J. *e Coll.,* Seroprevalence of *Helicobacter pylori* in Chile. Vegetables may serve as one route of transmission, J. Infect. Dis., 1993, *168*, 222-226
Hulten K. *e Coll.,* Presence of *Helicobacter* species DNA in Swedish water, J. Appl. Bact., 1998, *85*, 282-286
Hulten K. *e Coll., Helicobacter pylori* in the drinking water in Peru, Gastroenterology, 1996, *110*, 1031-1035
Hwang H. *e Coll.,* Diet, *Helicobacter pylori* infection, food preservation and gastric cancer risk : are there new roles for preventive factors?, Nutr. Rev., 1994, *52*, 75-82
Kerr K. *e Coll*., Incidence of *Listeria spp*. in pre-cooked chilled products as determined by culture and enzyme-linked-immunoassay (ELISA). Food Protect. 1990, *53*, 606-607
Klein P.D. *e Coll.*, Water source as risk factor for *Helicobacter pylori* infection in Peruvian children, Lancet, 1991, *337*, 1503-1506
Le Jeune J.T. *e Coll*., Methods for the isolation of water-borne *Escherichia coli* O157, Letters in Appl. Micr. 2001, *32*, 316-320
Mc Carty J. *e Coll*., An improved direct plate method for the enumeration of stressed *Escherichia coli* O157:H7 from food, J. Food Protect. 1998, 61, 1093-1097
Mc Lauclin M. *e Coll*., The rapid demonstration and presumptive identification of *Listeria monocytogenes* in food using monoclonal antibodies in a direct immunofluorescence test (DIFT), Letters in Appl. Micr. 1989, *8*, 25
Meyer R. *e Coll*., Investigation of cheese and other foodstuffs samples with the Listeria-Tek ELISA, Letters in Appl. Micr. 1993, *17*, 97-100
Murdoch D.R., Diagnosis od *Legionella* infection, Medical Microbiology 2003, *36*, 64-69
Murray P.R. *e Coll*., Microbiologia, 2a. ed. italiana, EdiSes, Napoli, 2003
Ogden I.D., A conductance assay for the detection and enumeration of *Escherichia coli*, Food Microbiol. 1993, 10, 321-327
Olsen J.E. *e Coll*., Probes and polymerase chain reaction for detection of food-borne bacterial pathogens, Int. J. Food Micr. 1995, *28*, 1-78
Patel J.R. *e Coll*., Enrichment in Fraser broth supplemented with catalane or oxyrase, combined with the microcolony immunoblot technique, for detecting heat-injuried *Listeria monocytogenes* in foods, Int. J. Food Micr. 1995, *26*, 165-176
Phillips J.D. *e Coll*., An electrical method for detecting *Listeria spp*., Letters in Appl. Micr. 1989, *9*, 129-132
Sheridan J.J. *e Coll*., Use of a microcolony technique combined with an indirect immunofluorescence test for the rapid detection of *Listeria* in raw meat, Letters in Appl. Micr. 1991, *13*, 140-144
Skjerve E. *e Coll*., Detection of *Listeria monocytogenes* in foods by immunomagnetic separation, Appl. Environm. Micr. 1990, *56*, 3478-3481
Simonetti N. *e Coll*., Elementi di tecniche microbiologiche, EMSI, Roma, 2°ed., 2001
Solnick J.V. *e Coll*., Emergence of disease *Helicobacter* species in the pathogenesis of gastric and enterohepatic diseases, Clin. Microbiol. Rev. 2001, *14*, 59-97

Stevenson T.H. *e Coll.*, Attempts to isolate *Helicobacter* from cattle and survival of *Helicobacter pylori* in beef products, J. Food Protect., 2000, *63*, 174-178

Stevenson T.H. *e Coll*., Growth of *Helicobacter pylori* in various liquid and plating media, Letters in Appl. Micr. 2000, *30*, 192-196

Truant A.L., Manual of commercial methods in clinical microbiology, ASM, Washington, USA, 2002

Url B. *e Coll*., Determination of *Listeria* in dairy and environmental samples: comparison of a cultural method and a colorimetric nucleic acid hybridisation assay, J. Food Protect. 1993, *56*, 581-584

Velasquez M. *e Coll*., Review. *Helicobacter pylori*: characteristics, pathogenicity, detection methods and mode of transmission implicating foods and water, Int. J. Food Micr. 1999, *53*, 95-104

Vernozy-Rozand C. *e Coll*., A shorter enrichment culture for the isolation of *Escherichia coli* O157: H7 from raw minced beef, Rev. Med. Vet. 1997, *148*, 879-882

APPENDICE

COMPOSIZIONE DI TERRENI, SOLUZIONI E REATTIVI

N.B. Le quantità sono espresse in grammi ove non segnalato.

TERRENI

Acqua Peptonata Tamponata (Buffered Peptone Water)
Terreno di pre-arricchimento per salmonelle
Peptone 10, sodio cloruro 5, sodio fosfato bibasico 3,5, potassio fosfato monobasico 1,5, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 7,2.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

Acqua peptonata salina alcalina
Terreno di arricchimento per vibrioni alofili
Peptone 20, sodio cloruro 30, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 8,6.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

Aeromonas Selective Agar
Terreno in piastra selettivo per Aeromonas hydrophila
Tryptone 15, peptone di soia 5, sodio cloruro 5, DNA 2, amido di mais 10, agar-agar 15, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 8,0 ± 0,2.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti. Raffreddare a circa 50 °C e aggiungere sterilmente 10 mg di ampicillina (sterilizzata per filtrazione).

Agar al gelisato
Terreno per conta microbica totale (esclusi i lattobacilli)
Gelisato al peptone di gelatina 5, agar-agar 15, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 7,0.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

Agar glicerinato
Terreno di uso generale
Peptone 10, sodio cloruro 5, estratto di carne 5, glicerina 20, destrosio 20, agar-agar 20, acqua distillata 1000 ml.

*p*H finale = 7,4.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

Agar nutritivo (Nutrient Agar)
Terreno di uso generale
Estratto di carne 3, peptone 5, agar-agar 15, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 6,8.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

Agar sangue
Terreno semplice in piastra per l'isolamento di germi aerobi e anaerobi
Infuso da cuore bovino 500, triptosio 10, sodio cloruro 5, agar-agar 15, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 6,8 ± 0,2.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti. Raffreddare fino a circa 50 °C e aggiungere sterilmente il 5% di sangue defibrinato di pecora, oppure il 2% di globuli rossi di pecora lavati.

Agar sangue II
Terreno di uso generale contenente globuli rossi lavati per migliorare l'effetto emolitico
Terreno base: peptone proteose 15, fegato digerito 2,5, estratto di lievito 5, sodio cloruro 5, agar-agar 15.
Emazie lavate: sangue defibrinato di montone o cavallo centrifugato a 900 g per 30 minuti. Eliminare il sovrastante e risospendere il sedimento in soluzione fisiologica fino al volume iniziale.
Terreno completo: terreno base 40 g, acqua distillata 1000 ml. Sterilizzare a 121 °C per 15 minuti e, dopo raffreddamento a circa 50 °C, aggiungere 70 ml di emazie lavate.

Agar sangue Columbia
Terreno di uso generale
Terreno base: peptone 23, amido 1, sodio cloruro 5, agar-agar 15, acqua distillata 1000 ml.
Terreno completo: terreno base sterilizzato a 121 °C per 15 minuti 950 ml, sangue defibrinato di montone 50 ml.
*p*H finale = 7,3.

Agar sangue esculina
Terreno differenziale in piastra per l'isolamento di Streptococcus agalactiae
Preparare come sopra indicato, ma con l'aggiunta di esculina 1 g e di ferro citrato ferrico 0,1 g.

Agar semisolido
Terreno per test della mobilità
Trypticase 10, estratto di lievito 2,5, destrosio 5, sodio fosfato bibasico 2,5, agar-agar 3, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 7,4.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

Agar siero
Terreno di uso generale
Agar nutritivo + siero equino sterile al 5%, aggiunto sterilmente dopo autoclavatura del terreno base a 121 °C per 15 minuti e raffreddamento a circa 50 °C.

Agar solfito di bismuto (BSA)
Terreno selettivo per salmonelle
Peptone 10, estratto di carne 5, glucosio 5, sodio fosfato bibasico 4, solfato ferroso 0,3, bismuto solfito 8, verde brillante 0,025, agar-agar 20, acqua distillata 1000 ml.
Sciogliere per ebollizione. Non autoclavare. Usare in giornata.
*p*H finale = 7,6.

Agar TKT
Terreno selettivo e differenziale in piastra per l'isolamento da campioni di latte degli streptococchi e degli stafilococchi agenti di mastite
Peptone 10, digerito triptico di caseina 15, sodio cloruro 5, esculina 1, ferro citrato ico 0,1, tallio acetato 0,334, cristalvioletto 1,7 ml, agar-agar 20, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 7,4 ± 0,1.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti. Raffreddare a circa 50 °C e aggiungere, sterilmente, beta-emolisina stafilococcica pre-titolata e il 5% di globuli rossi lavati di pecora.
La tossina stafilococcica viene preparata in Brodo BHI incubato a +37 °C sotto agitazione per 5-7 giorni, centrifugato e filtrato. La titolazione viene fatta inglobando in TKT il surnatante filtrato a concentrazioni crescenti (ad esempio, dal 2 al 4%) e scegliendo la concentrazione che dà la miglior reazione di CAMP dopo semina di *S. agalactiae* e incubazione a +37 °C per 24 ore.

Agar verde brillante (Brillant Green Agar, BGA)
Terreno selettivo per salmonelle
Estratto di carne 5, estratto di lievito 3, peptone proteose 10, sodio fosfato bibasico 1, sodio fosfato monobasico 0,6, lattosio 10, saccarosio 10, rosso fenolo 0,09, verde brillante 0,0047, citrato di ferro ammoniacale 0,02, agar-agar 15, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 7,0.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

ALOA (Agar Listeria sec. Ottaviani e Agosti nella formula Biolife®)
Terreno selettivo e differenziale per Listeria monocytogenes
Peptone 18, estratto di lievito 8, tryptone 8, fattori di crescita 4,2, sodio cloruro 5, sodio fosfato bibasico 2,5, litio cloruro 10, X-glucuronide 0,05, agar-agar 15, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 7,2 ± 0,2.
Risospendere 35 g di polvere in 500 ml di acqua distillata. Sciogliere in bagnomaria bollente. Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti. Raffreddare a circa 50 °C e aggiungere, sterilmente, il supplemento selettivo, contenente acido nalidixico 10 mg, ceftazidime 10 mg, cicloeximide 50 mg, polimixina B 5 mg, e il supplemento di crescita (5 ml), riscaldato a circa 50 °C.

Antibiotic Agar *p*H 6,6
Terreno semplice in piastra per la ricerca dei residui di antibiotici
Estratto di carne 1,5, estratto di lievito 3, casitone 4, peptone 6, destrosio 1, agar-agar 15, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 6,55 ± 0,05.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

Baird-Parker Agar
Terreno selettivo e differenziale in piastra per la ricerca e il conteggio di Staphylococcus aureus negli alimenti
Peptone proteose 10, estratto di carne 5, estratto di lievito 1, sodio piruvato 10, glicina 12,

litio cloruro 5, agar-agar 20, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale: 7,0 ± 0,2.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti. Raffreddare a circa 50 °C e aggiungere, sterilmente, 50 ml di emulsione sterile di tuorlo d'uovo e potassio tellurito (contenente tuorlo d'uovo sterile omogeneizzato 25 ml, soluzione fisiologica 0.85% NaCl 25 ml, potassio tellurito 100 mg).

BCYE Agar
Terreno selettivo e differenziale in piastra per Legionella
Base (quantità in g/lt): charcoal attivato 3, estratto di lievito 9, agar-agar 13.
Supplemento di crescita (quantità per 500 ml): tampone ACES 5, ferro pirofosfato 0,125, cisteina cloridrato 0,2, alfa-chetoglutarato 0,5.
Supplemento selettivo (quantità per 500 ml): glicina 1,5 g, vancomicina 0,5 mg, polimixina B 39600 U.I., cicloeximide 40 mg.
*p*H finale = 6,9 ± 0,2.
Sospendere 12,5 g di polvere in 440 ml di acqua demineralizzata. Sciogliere in acqua demineralizzata il supplemento di crescita (in 50 ml) e il supplemento selettivo (in 10 ml). Aggiungere i supplementi sterilmente al terreno base autoclavato a 121 °C per 15 minuti. e raffreddato a circa 50 °C.

BHI agar semi-solido
Terreno per prove di mobilità di uso generale
Preparare come il BHI Broth, ma addizionando agar-agar 3,5 g a 1000 ml di brodo.

BHI Agar + siero
Terreno semplice solido in provetta idoneo per la coltivazione di germi particolarmente esigenti
Preparare come il BHI agar semi-solido, aggiungendo, sterilmente, il 5% di siero equino sterilizzato a parte per filtrazione.

BHI Agar + siero + NAD
Terreno differenziale per coltivare i batteri che richiedono il fattore V del sangue (sostituito dal NAD)
BHI 41, agar-agar 15, siero equino sterile 100 ml, NAD 0,12 mg, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 7,4 ± 0,2.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti, raffreddare a circa 50 °C e aggiungere, sterilmente, il siero equino sterile (10%) e 0.1 ml di soluzione sterile di NAD (preparata a parte sciogliendo 12 mg di NAD in 10 ml di acqua distillata e sterilizzando su filtro 0,22 μm).

Brain Heart Infusion Agar (BHI Agar)
Terreno semplice in provetta o in piastra per la coltivazione di microrganismi esigenti
Infuso di cervello 200, infuso di cuore 250, peptone proteose 10, glucosio 2, sodio cloruro 5, sodio fosfato bibasico dodecaidrato 2,5, agar-agar 15, acqua demineralizzata 1000 ml.
*p*H finale = 7,4 ± 0,2.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

Brain Heart Infusion Broth (BHI)
Terreno semplice liquido adatto per la coltivazione di germi aerobi esigenti
Preparare come sopra indicato, ma senza l'aggiunta di agar-agar.

BHI + 6,5% NaCl
Terreno differenziale liquido per la differenziazione biochimica degli enterococchi
Preparare come sopra indicato, ma con l'aggiunta di sodio cloruro 60 g per litro.

Brillant Green Agar (Agar verde brillante, BGA)
Terreno selettivo e differenziale in piastra per l'isolamento delle salmonelle
Peptone proteose 10, estratto di lievito 3, sodio cloruro 5, lattosio 10, saccarosio 10, verde brillante 0,0125, rosso fenolo 0,08, agar-agar 12, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 6,8.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

Brodo bile (2%) lattosio verde brillante
Terreno selettivo per la conta dei coliformi con metodo MPN
Peptone 10, lattosio 10, bile di bue 20, verde brillante 0,0133, acqua distillata 1000 ml.
Distribuire in provette con campana di Durham.
*p*H finale = 7,4.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

Brodo fegato + sale
Terreno selettivo per germi alofili obbligati (formula da Sharf, 1966)
Fegato bovino finemente macinato 500 g, acqua distillata 1000 ml. Bollire per un'ora.
Aggiustare il *p*H a 7,0 e far bollire ancora per 10 minuti.
Filtrare su un panno di cellulosa per separare (e conservare) le particelle di fegato. Riportare il brodo a 1 lt con acqua distillata, aggiungendo peptone 10 g, potassio fosfato monobasico KH_2PO_4 1 g, sodio cloruro 150 g.
Distribuire in provette le particelle di fegato fino a 2 cm di altezza e coprirle con 10 ml di brodo.
Autoclavare a 121 °C per 20 minuti. Le provette non utilizzate subito sono da porre in bagnomaria bollente per 20 minuti.

Brodo Irgasan Ticarcillina (ITC)
Terreno d'arricchimento per Yersinia enterocolitica
Terreno base: triptone 10, estratto di lievito 1, magnesio cloruro 60, sodio cloruro 5, soluzione acquosa di verde malachite 0,2% 5 ml, acqua distillata 1000 ml.
Soluzione di ticarcillina: ticarcillina 10 mg, acqua distillata 10 ml. Sterilizzare per filtrazione.
Soluzione di irgasan: irgasan 10 mg, alcool etilico 10 ml.
Soluzione di clorato di potassio: potassio clorato 10, acqua distillata 100 ml. Sterilizzare per filtrazione.
Terreno completo: terreno base 988 ml, soluzione di ticarcillina 1 ml, soluzione di irgasan 1 ml, soluzione di clorato di potassio 10 ml.
*p*H finale = 6,9.

Brodo per fermentazione dei carboidrati
Terreno per prove biochimiche
Peptone 10, sodio cloruro 5, rosso fenolo 0,02, acqua distillata 1000 ml. Sterilizzare a 121 °C per 15 minuti. Aggiungere, a 900 ml di terreno base, 100 ml di soluzione acquosa al 10% del carboidrato da fermentare, sterilizzata per filtrazione.
*p*H finale = 6,8.

Brodo lattosato (Lactose Broth)
Terreno di pre-arricchimento per salmonelle
Estratto di carne 3, peptone 5, lattosio 5, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 6,9.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

Brodo nutritivo (Nutrient Broth)
Terreno di uso generale
Estratto di carne 3, peptone 5, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 7,2.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

Brodo Rappaport-Vassiliadis
Terreno di arricchimento per salmonelle
Peptone di soia 5, sodio cloruro 8, potassio fosfato monobasico 1,6, magnesio cloruro 40, verde malachite 0,04, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 5,2.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

Brodo selenito-cistina
Terreno di arricchimento per salmonelle
Digerito triptico di caseina 5, lattosio 4, sodio fosfato bibasico 10, selenito acido di sodio 4, l-cistina 0,01, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 7,0.
Sterilizzare per ebollizione. Non autoclavare.

Brodo tetrationato secondo Muller-Kauffmann
Terreno di arricchimento per salmonelle
Peptone 5, sali biliari 1, calcio carbonato 10, sodio tiosolfato 30, acqua distillata 1000 ml.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.
Aggiungere sterilmente 20 ml di soluzione iodo-iodurata (potassio ioduro 5, iodio resublimato 6, acqua distillata 20) e 10 ml di soluzione di verde brillante (verde brillante 0,01, acqua distillata 10 ml).

Brodo tetrationato secondo Preuss
Terreno di arricchimento per salmonelle
Digerito triptico di caseina 15, peptone 10, sodio cloruro 5, cristalvioletto 0,005, acqua distillata 1000 ml.
Aggiungere sterilmente potassio terationato 20 g.
*p*H finale = 6,8.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

Brucella Agar
Terreno selettivo in piastra per isolamento delle brucelle
Peptone 10, estratto di carne 5, glucosio 10, sodio cloruro 5, agar-agar 15, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 7,5 ± 0,2.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti. e, dopo raffreddamento a circa 50 °C, aggiungere il 5% di siero equino sterile (inattivato a 56 °C per 30 minuti) e il supplemento selettivo (cicloeximide 100 mg, bacitracina 25.000 U.I., polimixina B 6.000 U.I., violetto di etile 1:800.000).

Brucella Broth
Terreno d'arricchimento per brucelle
Triptone 10, peptone 10, glucosio 1, estratto di lievito 2, citrato di sodio 1, bisolfato di sodio 0,1, sodio cloruro 5, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 7,0.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

Buffered Peptone Water (Acqua peptonata tamponata)
Terreno di pre-arricchimento liquido per la ricerca delle salmonelle negli alimenti
Peptone 10, sodio cloruro 5, sodio fosfato bibasico 3,5, potassio fosfato monobasico 1,5, acqua demineralizzata 1000 ml.
*p*H finale = 7,2 ± 0,2.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

Butzler Agar
Terreno selettivo per Campylobacter
Terreno base: Columbia Agar.
Soluzione di antibiotici: cefoperazone 0,15, rifampicina 0,10, colistina 100.000 U.I., anfotericina 0,02, acqua distillata 100 ml.
Terreno completo: Columbia Agar sterilizzato a 121 °C per 15 minuti 940 ml, sangue lisato di cavallo sterile 50 ml, soluzione di antibiotici 10 ml.
*p*H finale = 7,3.

Campylobacter Enrichment Broth
Terreno d'arricchimento liquido per Campylobacter
Nutrient Broth 1000 ml + supplemento di crescita contenente sodio piruvato 0,25 g, sodio metabisolfito 0,25 g, solfato ferroso 0,25 g + supplemento selettivo di Skirrow contenente vancomicina 10 mg, polimixina B 2.500 U.I., trimethoprim 5 mg.
*p*H finale = 7,0 ± 0,2.
Aggiungere sterilmente i supplementi al brodo.

Campylobacter Selective Agar (Skirrow)
Terreno selettivo in piastra per l'isolamento di Campylobacter
Peptone 15, estratto di fegato 0,5, estratto di lievito 5, sodio cloruro 5, agar-agar 12, acqua distillata 1000 ml.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti, raffreddare a circa 50 °C e aggiungere 50 ml di sangue equino laccato e 10 ml di supplemento antibiotico di Skirrow (contenente vancomicina 10 mg, polimixina 2.500 U.I., trimethoprim 5 mg).

Carbohydrate Fermentation Broth
Terreno differenziale liquido per le prove biochimiche di fermentazione dei carboidrati in provetta
Peptone di caseina 5, peptone di carne 5, sodio cloruro 5, rosso fenolo 0,018, acqua distillata 950 ml.
*p*H finale = 7,4 ± 0,2.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti. Raffreddare a circa 50 °C e aggiungere sterilmente lo zucchero da testare (5 g in 50 ml di acqua distillata, sterilizzazione per filtrazione).

Caseinate agar
Terreno selettivo per cocchi sale-tolleranti (formula da Sharf, 1966)

Caseina 3, latte peptonizzato 7, bromocresolporpora 0,04, agar-agar 12, acqua distillata 1000 ml.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.
*p*H finale = 6,5.

CDC Anaerobe Blood Agar
Terreno selettivo in piastra per l'isolamento dei germi anaerobi
Digerito di caseina 15, digerito di soia 5, sodio cloruro 5, agar-agar 20, estratto di lievito 5, emina 0,005, vitamina K1 0,01, l-cistina 0,4, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 7,5 ± 0,2.
Autoclavare a 121 °C per 15 minuti, raffreddare a circa 50 °C e aggiungere sterilmente 50 ml di sangue defibrinato sterile di pecora.

Cefsulodina Irgasan Novobiocina Agar (CIN Agar)
Terreno selettivo per Yersinia enterocolitica
Terreno base: peptone 20, estratto di lievito 2, mannitolo 20, sodio piruvato 2, sodio cloruro 1, magnesio solfato 0,01, sodio desossicolato 0,5, rosso neutro 0,03, cristalvioletto 0,001, agar-agar 15, acqua distillata 1000 ml.
Soluzione di cefsulodina: cefsulodina 1,5, acqua distillata 100 ml. Sterilizzare per filtrazione.
Soluzione di irgasan: irgasan 0,4, alcool etilico 100 ml.
Soluzione di novobiocina: novobiocina 0,25, acqua distillata 100 ml. Sterilizzare per filtrazione.
Terreno completo: terreno base 997 ml, soluzione di cefsulodina 1 ml, soluzione di irgasan 1 ml, soluzione di novobiocina 1 ml.
*p*H finale = 7,4.

Cereus Selective Agar
Terreno selettivo in piastra per l'isolamento di Bacillus cereus
Peptone 1, mannitolo 10, sodio cloruro 2, magnesio solfato 0,1, sodio fosfato bibasico 2,5, potassio fosfato monobasico 0,25, sodio piruvato 10, blu di bromotimolo 0,12, agar-agar 14, acqua distillata 950 ml.
*p*H finale = 7,2 ± 0,2.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti, raffreddare a circa 50 °C e aggiungere 4 ml di supplemento antibiotico (contenente 100.000 U.I. di polimixina B) e 50 ml di emulsione sterile di tuorlo d'uovo.

Chocolate Agar
Terreno semplice in piastra adatto per coltivare microrganismi esigenti, tipo Neisseria ed Haemophilus
Digerito di caseina 7,5, peptone di carne 7,5, amido 1, potassio fosfato bibasico 4, potassio fosfato monobasico 1, sodio cloruro 5, agar-agar 12, acqua distillata 1000 ml.
pH finale = 7,3 ± 0,2.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti, raffreddare a circa 80 °C e aggiungere 75 ml di sangue defibrinato di pecora sterile.

Chromogenic Agar Medium ESIA
Terreno selettivo in piastra per Enterobacter sakazakii
Peptone pancreatico di caseina 7, estratto di lievito 3, sodio cloruro 5, sodio desossicolato 0,6, 5-bromo-4-cloro-3-indolyl-alfa-glucopiranoside 0,15, cristalvioletto 2, agar-agar 15, acqua distillata 1000 ml
*p*H finale 7,0 ± 0,2
Sciogliere per ebollizione. Non autoclavare

Coliform Agar
Terreno selettivo e differenziale cromogeno per l'isolamento e la conta di coliformi ed Escherichia coli
Peptone 3, sodio cloruro 5, sodio fosfato monobasico 2,2, sodio fosfato bibasico 2,7, sodio piruvato 1, triptofano 1, agar-agar 10, sorbitolo 1, tergitol-7 0,15, miscela cromogena 0,4, acqua distillata 1000 ml.
Il terreno può essere antibiotato con cefsulodin 5 mg/litro.
*p*H finale = 6,8 ± 0,2.
Non autoclavare. Colore del terreno = giallastro e opaco.

Columbia CNA Agar
Terreno selettivo in piastra per l'isolamento di batteri Gram-positivi
Digerito di caseina 12, peptone di carne 5, estratto di lievito 3, amido 1, sodio cloruro 5, agar-agar 13,5, colistina 10 mg, acido nalidixico 10 mg, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 7,3 ± 0,2
Autoclavare a 121 °C per 15 minuti, raffreddare a circa 50 °C e aggiungere 50 ml di sangue defibrinato sterile di pecora.

Cooked Meat Medium (CMM)
Terreno semplice liquido per l'isolamento e il mantenimento di anaerobi
Cuore bovino 49,5, miscela di peptoni 43,5, sodio cloruro 7, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 7,4 ± 0.2.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

Desoxycholate Lactose Agar
Terreno selettivo in piastra per l'isolamento degli enterobatteri
Digerito di caseina 5, peptone di carne 5, lattosio 10, sodio cloruro 5, sodio citrato 2, sodio desossicolato 0,5, rosso neutro 0,033, agar-agar 15, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 7,1 ± 0,2.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

Desossicolato Citrato Agar (DCA)
Terreno selettivo per salmonelle
Estratto di carne 5, peptone proteose 5, lattosio 10, sodio tiosolfato 5,4, ferro citrato ico 1, sodio citrato 8,5, sodio desosssicolato 5, rosso neutro 0,02, agar-agar 15, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 7,3.
Sterilizzare per ebollizione. Non autoclavare.

Dubos Broth
Terreno selettivo liquido per la ricerca e il mantenimento di micobatteri
Digerito di caseina 0,5, l-asparagina 2, potassio fosfato monobasico 1, sodio fosfato bibasico 2,5, ferro ammonio citrato 0,05, magnesio solfato 0,01, polisorbato-80 0,2, calcio cloruro 0,5 mg, zinco solfato 0,1 mg, rame solfato 0,1 mg, acqua distillata 900 ml.
*p*H finale = 6,5 ± 0,2.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti, raffreddare a circa 50 °C e aggiungere sterilmente 20 ml di albumina bovina sterile.

Endo Agar
Terreno selettivo per E. coli e salmonelle
Triptone 10, lattosio 10, potassio fosfato monobasico 3,5, sodio solfito 2,5, fucsina basica 0,4, agar-agar 15, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 7,2.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

Fraser Broth
Terreno d'arricchimento per listerie
Terreno base: peptone di carne 5, triptone 5, estratto di carne 5, estratto di lievito 5, sodio cloruro 20, sodio fosfato bibasico 12, potassio fosfato monobasico 1,35, esculina 1, litio cloruro 3, acido nalidixico 0,02, acqua distillata 1000 ml.
Soluzione di acriflavina: acriflavina cloridrato 0,25, acqua distillata 100 ml.
Soluzione di citrato di ferro ammoniacale 5, acqua distillata 100 ml.
Terreno completo: terreno base 10 ml, soluzione di acriflavina 0,1 ml, soluzione di citrato di ferro ammoniacale 0,1 ml.
*p*H finale = 7,2.

Gassner Agar
Terreno selettivo e differenziale in piastra per l'isolamento delle Enterobacteriaceae (usato in veterinaria)
Peptone 10, digerito triptico di caseina 15,5, sodio cloruro 5, lattosio 50, saccarosio 30, giallo metacromo 1,25, wasserblau 0,875, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 7,4.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

Gelatin Medium
Terreno semplice solido in provetta usato per studiare le caratteristiche di sviluppo dei germi proteolitici
Peptone di carne 5, estratto di carne 3, gelatina 120, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 7,0 ± 0,2.
Distribuire in provette a ml 10 e autoclavare a 115 °C per 10 minuti.

Glutammat-Starch-Phenolrot Agar (GSPA)
Terreno selettivo e differenziale in piastra per il conteggio di Aeromonas e Pseudomonas negli alimenti
Sodio glutammato 10, amido 20, potassio fosfato monobasico 2, magnesio solfato 0,5, rosso fenolo 0,36, agar-agar 12, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 7,2 ± 0,2
Sterilizzazione in autoclave a 121 °C per 15 minuti.
Aggiunta di penicillina sodica 100.000 U.I./lt sterilizzata per filtrazione.

GSTB Broth
Terreno d'arricchimento per vibrioni alofili
Peptone 10, estratto di carne 3, sodio cloruro 30, glucosio 5, metil-violetto 0,002, sodio dodecil lauril solfato 1,36, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 8,6.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

Half Fraser Broth
Terreno di pre-arricchimento per listerie
Terreno base: peptone di carne 5, triptone 5, estratto di carne 5, estratto di lievito 5, sodio cloruro 20, sodio fosfato bibasico 12, potassio fosfato monobasico 1,35, esculina 1, litio cloruro 3, acido nalidixico 0,01, acqua distillata 1000 ml.
Soluzione di acriflavina: acriflavina cloridrato 0,125, acqua distillata 100 ml.
Soluzione di citrato di ferro ammoniacale: ammonio ferrico citrato 5, acqua distillata 100 ml.
Terreno completo: terreno base 100 ml, soluzione di acriflavina 1 ml, soluzione di citrato ferrico ammoniacale 1 ml.
*p*H finale = 7,2.

Hektoen Enteric Agar
Terreno selettivo e differenziale in piastra per l'isolamento delle salmonelle
Peptone 12, estratto di lievito 3, sali biliari 9, lattosio 12, saccarosio 12, salicina 2, sodio cloruro 5, sodio tiosolfato 5, citrato di ferro ammoniacale ico 1,5, fucsina acida 0,1, blu timolo 0,065, agar-agar 14, acqua distillata 1000 ml.
Sciogliere per ebollizione. Non autoclavare.
*p*H finale = 7,6.

Hugh-Leifson Medium
Terreno differenziale in provetta idoneo per la caratterizzazione biochimica dei ceppi ossidanti o fermentanti i carboidrati
Peptone 2, sodio cloruro 5, potassio fosfato bibasico 0,3, blu di bromotimolo 0,08, agar-agar 2, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 7,1.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti. Raffreddare a circa 50 °C e aggiungere sterilmente 100 ml di soluzione al 10% dello zucchero da saggiare, sterilizzata a parte per filtrazione.

Kanamycin Aesculin Azide Agar
Terreno selettivo per streptococchi fecali o enterococchi
Tryptone 20, estratto di lievito 5, sodio cloruro 5, agar-agar 10, sodio citrato 1, esculina 1, ferro ammonio citrato 0,5, sodio azide 0,15, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 7,0 ± 0,2.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti e, dopo raffreddamento a circa 50 °C, aggiungere 20 mg/litro di kanamicina solfato sterilizzata per filtrazione.

Karmali Agar (Campylobacter Blood-free Medium)
Terreno selettivo per Campylobacter
Terreno base: peptone 23, amido 1, sodio cloruro 5, carbone attivato 4, agar-agar 15, acqua distillata 1000 ml.
Soluzione di ematina: ematina 0,32, acqua distillata 100 ml. Sterilizzare per filtrazione.
Soluzione di antibiotici: sodio piruvato 2, vancomicina 0,4, cefoperazone 0,64, cicloeximide 2, alcool etilico 50 ml, acqua distillata 200 ml. Sterilizzare per filtrazione.
Terreno completo: terreno base 980 ml, soluzione di ematina 10 ml, soluzione di antibiotici 10 ml.
*p*H finale = 7,4.

Kligler Iron Agar
Terreno differenziale in provetta usato per il trapianto di colonie isolate di enterobatteri
Estratto di carne 3, estratto di lievito 3, peptone 15, peptone proteose 5, lattosio 10, glucosio 1, sodio cloruro 5, solfato ferroso 0,2, sodio tiosolfato 0,3, rosso fenolo 0,024, agar-agar 12, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 7,4.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti. Distribuire in modo da ottenere nella provetta uno *slant* (becco di clarino) più un fondo di circa 2 cm (consigliabile distribuire a 7 ml in provette da 16 mm × 160 mm).

Listeria Enrichment Broth (LEB)
Terreno di pre-arricchimento e di arricchimento liquido per le listerie
Peptone di caseina 17, peptone di soia 3, glucosio 2,5, sodio cloruro 5, potassio fosfato monobasico 2,5, estratto di lievito 6, acriflavina 0,015, cicloeximide 0,05, acido nalidixico 0,04, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 7,3 ± 0,2.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

Litmus Milk
Terreno differenziale liquido usato per studiare il comportamento di vari germi verso le proteine del latte
Latte magro 100 g, azolitmina 0,5, sodio solfito 0,5, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 6,5 ± 0,2.
Sterilizzare in autoclave a 115 °C per 20 minuti.

Lowenstein-Jensen
Terreno selettivo in provetta per l'isolamento dei micobatteri
Potassio fosfato monobasico 2,5, magnesio solfato 0,24, sodio citrato 0,6, l-asparagina 3,6, amido 30, verde malachite 0,4, glicerolo 12 ml, acqua distillata 600 ml.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti, raffreddare a circa 50 °C e aggiungere sterilmente 1000 ml di emulsione di uova intere realizzata asetticamente. Distribuire in provette a becco di clarino e coagulare a +85 °C per 45 minuti.

M17 Agar
Terreno selettivo in piastra per l'isolamento e la conta dei lattococchi negli alimenti
Peptone di soya 5, peptone di carne 2,5, peptone di caseina 2,5, estratto di lievito 2,5, estratto di carne 5, lattosio 5, ac. ascorbico 0,5, sodio beta-glicerofosfato 19, magnesio solfato 0,25, agar-agar 12,75, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 7,2 ± 0,2.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.
Aggiungere streptomicina solfato 500 mg/l e tallio acetato 50 mg/l, sterilizzati per filtrazione.

Mac Conkey Agar
Terreno selettivo e differenziale in piastra per l'isolamento delle Enterobacteriaceae, usato anche per altri germi
Peptone di carne 17, polipeptone 3, lattosio 10, sali biliari 1,5, sodio cloruro 5, rosso neutro 0,03, cristalvioletto 0,001, agar-agar 13,5, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 7,1 ± 0,2.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

Mac Conkey Sorbitol Agar
Terreno selettivo e differenziale in piastra per l'isolamento di Escherichia coli sorbitolo-negativi (tra cui E. coli O157:H7)
Peptone 20, sorbitolo 10, sali biliari 1,5, sodio cloruro 5, rosso neutro 0,03, cristalvioletto 0,001, agar-agar 15, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 7,1 ± 0,2.
Sterilizzare a 121 °C per 15 minuti.

Mannitol Salt Agar (MSA)
Terreno selettivo e differenziale in piastra per l'isolamento di stafilococchi e micrococchi
Peptone 10, estratto di carne 1, sodio cloruro 75, mannitolo 10, rosso fenolo 0,025, agar-agar 12, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 7,4 ± 0,2.
Sterilizzare a 121 °C per 15 minuti.

m-ENDO Agar
Terreno selettivo e differenziale in piastra per la conta dei coliformi nelle acque con il metodo della filtrazione su membrana
Estratto di lievito 1,2, triptone 3,7, peptone 3,7, triptosio 7,5, lattosio 9,4, potassio fosfato bibasico 3,3, potassio fosfato monobasico 1, sodio cloruro 3,7, sodio desossicolato 0,1, sodio laurilsolfato 0,05, sodio solfito 1,6, agar-agar 10, acqua demineralizzata 1000 ml.
*p*H finale = 7,2 ± 0,2.
Aggiungere 8 ml di una soluzione alcoolica di fucsina basica al 10%.
Sciogliere per ebollizione. Non autoclavare.

m-FC Agar
Terreno selettivo e differenziale in piastra per la conta degli streptococchi fecali nelle acque con il metodo della filtrazione su membrana
Triptosio 10, peptone proteose 5, estratto di lievito 3, sodio cloruro 5, lattosio 12,5, sali biliari 1,5, blu di anilina 0,01, agar- agar 10, acqua demineralizzata 1000 ml.
*p*H finale = 7,4 ± 0,2.
Aggiungere 1 ml di una soluzione all'1% di acido rosolico in NaOH 0,2 N.
Sciogliere per ebollizione. Non autoclavare.

Middlebrook 7-H-9 (Broth)
Terreno selettivo liquido per l'isolamento dei micobatteri
Potassio fosfato monobasico 1, sodio fosfato bibasico 2,5, glutammato monosodico 0,5, sodio citrato 0,1, ammonio solfato 0,5, piridossina 0,001, ferro ammonio citrato 0,04, magnesio solfato 0,05, zinco solfato 0,001, rame solfato 0,001, biotina 0,5 mg, calcio cloruro 0,5 mg, destrosio 2, glicerolo 2 ml, acqua distillata 900 ml.
*p*H finale = 6,6 ± 0,2.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti, raffreddare a circa 50 °C e aggiungere sterilmente 100 ml di arricchimento ADC (sodio cloruro 0,85, albumina bovina 5, destrosio 2 catalasi 3 mg).

Middlebrook 7-H-10 (Agar)
Terreno selettivo solido in provetta per l'isolamento dei micobatteri
Magnesio solfato 0,05, ferro ammonio citrato 0,04, sodio citrato 0,4, ammonio solfato 0,5, glutammato monosodico 0,5, sodio fosfato bibasico 1,5, potassio fosfato monobasico 1,5, agar-agar 13,5, piridossina 1 mg, zinco solfato 1 mg, rame solfato 1 mg, biotina 0,5 mg, calcio

cloruro 0,5 mg, verde malachite 0,25 mg, glicerolo 5 ml, acqua distillata 900 ml.
*p*H finale = 6,6 ± 0,2.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti, raffreddare a circa 50 °C e aggiungere sterilmente 100 ml di arricchimento OADC (sodio cloruro 0,85, destrosio 2, albumina bovina 5, catalasi 3 mg, acido oleico 0,06 ml).

Middlebrook 7-H-11 Agar
Terreno selettivo in provetta per l'isolamento dei micobatteri tubercolari
Digerito di caseina 1, magnesio solfato 0,05, ferro ammonio citrato ico 0,04, sodio citrato 0,4, ammonio solfato 0,5, glutammato monosodico 0,5, sodio fosfato bibasico 1,5, potassio fosfato monobasico 1,5, agar-agar 13,5, sodio cloruro 0,85, piridossina 1 mg, zinco solfato 1 mg, rame solfato 1 mg, biotina 0,5 mg, calcio cloruro 0,5 mg, verde malachite 0,25 mg, glicerina 5 ml, acqua distillata 900 ml.
*p*H finale = 6,6 ± 0,2.
Autoclavare a 121 °C per 10 minuti, raffreddare a circa 50 °C e aggiungere sterilmente 100 ml di arricchimento OADC (contenente sodio cloruro 0,85, destrosio 2, albumina bovina 5, catalasi 3 mg, acido oleico 0,06 ml).

Modified Lauryl Sulphate Tryptose Broth (mLST)
Brodo d'arricchimento per Enterobacter sakazakii
Sodio cloruro 34, digerito enzimatico di tessuti animali e vegetali 20, lattosio 5, potassio fosfato monobasico 2,75, potassio fosfato bibasico 2,75, sodio lauril-solfato 0,1, acqua distillata 1000 ml
Aggiustare il *p*H a 6,8 ± 0,2, distribuire in provette a 10 ml e autoclavare a 121 °C per 15 minuti. Raffreddare e aggiungere sterilmente 0,1 ml di soluzione di vancomicina (10 mg in 10 ml di acqua distillata) sterilizzata per filtrazione. Le provette hanno validità di 1 giorno in frigorifero.

MRS Agar
Terreno selettivo in piastra per l'isolamento e la conta dei lattobacilli negli alimenti
Peptone 10, estratto di carne 10, estratto di lievito 5, glucosio 20, potassio fosfato bibasico 2, sodio acetato 5, triammonio citrato 2, magnesio solfato eptaidrato 0,2, manganese solfato tetraidrato 0,05, Tween 80 1 ml, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 6,0-6,5.
Sterilizzazione in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

MSE
Terreno di Mayeux per conteggio del Leuconostoc
Triptone 10, gelatina 2,5, estratto di lievito 5, saccarosio 100, glucosio 5, sodio citrato 1, sodio azide 0,075, agar-agar 13, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 6,9.
Sterilizzare in autoclave a 110 °C per 15 minuti.

Mueller-Hinton Agar
Terreno semplice in piastra idoneo per l'allestimento dell'antibiogramma secondo la tecnica di Kirby-Bauer
Brodo infuso di carne + amido solubile 0,15%. Per il terreno solido, aggiunta di agar-agar all'1,5%.
*p*H finale = 6,8.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

Mueller-Hinton Broth
Terreno semplice liquido per la determinazione della concentrazione minima inibente (MIC) degli antibiotici
Brodo infuso di carne + amido solubile 0,15%.
*p*H finale = 6,8.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

Mycosel Agar
Terreno selettivo per l'isolamento dei miceti
Digerito di soia 10, destrosio 10, agar-agar 15,5, cicloeximide 0,4, cloramfenicolo 0,05, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 6,9 ± 0,2.
Autoclavare a 121 °C per 15 minuti.

Natriumsulphit-Natriumazid-Thioglycolat sec. Levetzov (SAT)
Brodo d'arricchimento per clostridi solfito-riduttori
Sodio tioglicolato 1, estratto di lievito 10, peptone 20, l-cisteina 0,5, sodio cloruro 5, agar-agar 1, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 7,0-7,2.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti e quindi aggiungere sterilmente 5 ml di soluzione acquosa al 10% di sodio solfito e 3 ml di soluzione acquosa al 5% di sodio azide, sterilizzate per filtrazione.

Oxford Agar
Terreno selettivo e differenziale in piastra per l'isolamento delle listerie
Peptone 23, amido 1, sodio cloruro 5, agar-agar 13, esculina 1, ferro ammonio citrato 0,5, litio cloruro 15, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 7,0 ± 0,2.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti. Raffreddare a circa 50 °C e aggiungere sterilmente il supplemento selettivo contenente cicloeximide 400 mg, colistina solfato 20 mg, acriflavina 5 mg, cefotetan 2 mg, fosfomicina 10 mg.

Oxytetracycline-Gentamycin-Yeast Extract Agar (OGYE)
Terreno selettivo per miceti
Terreno base: estratto di lievito 5, destrosio 20, agar-agar 15, acqua distillata 1000 ml.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.
*p*H finale = 6,6.
Soluzione di ossitetraciclina: ossitetraciclina 50 mg, acqua distillata 50 ml. Sterilizzare per filtrazione.
Soluzione di gentamicina: gentamicina 50 mg, acqua distillata 50 ml. Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.
Terreno completo: terreno base 100 ml, soluzione di ossitetraciclina 10 ml, soluzione di gentamicina 10 ml.

PALCAM Agar
Terreno selettivo per listerie
Terreno base: peptone pancreatico di caseina 23, amido 1, sodio cloruro 5, glucosio 0,5, mannitolo 10, esculina 0,8, ammonio ferrico citrato 0,5, rosso fenolo 0,08, litio cloruro 15, agar-agar 15, acqua distillata 960 ml.
Soluzione di polimixina B: polimixina B solfato 0,1, acqua distillata 100 ml.

Soluzione di acriflavina: acriflavina cloridrato 0,05, alcool etilico 50 ml, acqua distillata 50 ml.
Soluzione di sodio ceftazime: sodio ceftazime 0,116, acqua distillata 100 ml.
Terreno completo: terreno base 960 ml, soluzione di polimixina B 10 ml, soluzione di acriflavina 10 ml, soluzione di ceftazime 20 ml.
*p*H finale = 7,2.

Peptone mannitol bromothymol agar (PEMBA)
Terreno selettivo per conta del Bacillus cereus
Terreno base: peptone 1, mannitolo 10, sodio cloruro 2, magnesio solfato 0,1, sodio fosfato bibasico 2,5, potassio fosfato monobasico 0,25, sodio piruvato 10, blu di bromotimolo 0,12, agar-agar 15, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 7,2.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.
Supplementi da aggiungere sterilmente a 900 ml di terreno base sterilizzato e raffreddato a circa 50 °C: 100 ml di emulsione di tuorlo d'uovo commerciale e 10 ml di soluzione in acqua distillata di polimixina B contenente 100.000 U.I. da sterilizzare per filtrazione.

Plate Count Agar (PCA)
Terreno semplice in piastra per il conteggio della carica batterica totale (CBT) negli alimenti
Estratto di lievito 2,5, digerito pancreatico di caseina 5, destrosio 1, agar-agar 15, acqua demineralizzata 1000 ml.
*p*H finale = 7,0 ± 0,2.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

Preston (Brodo di Preston)
Terreno d'arricchimento per Campylobacter
Terreno base: estratto di carne 10, peptone 10, sodio cloruro 5, agar-agar 1, acqua distillata 1000 ml.
Soluzione antibiotici: polimixina B 100.000 U.I., rifampicina 0,2, trimethoprim 0,2, cicloeximide 2, alcool etilico 50 ml, acqua distillata 200 ml.
Terreno completo: terreno base 940 ml, sangue lisato sterile di cavallo 50 ml, soluzione di antibiotici 10 ml.
*p*H finale = 7,5.

Pseudosel Agar (Cetrimide Agar)
Terreno selettivo in piastra per l'isolamento di Pseudomonas aeruginosa
Digerito di gelatina 20, magnesio cloruro 1,4, potassio solfato 10, agar-agar 13,6, cetrimide 0,3, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 7,2 ± 0,2.
Sterilizzare in autoclave a 118 °C per 15 minuti.

Rambach Agar
Terreno selettivo e differenziale in piastra per l'isolamento delle salmonelle
Peptone 8, sodio cloruro 5, sodio desossicolato 1, miscela cromogenica 1,5, glicol propilenico 10,5, agar-agar 15, acqua distillata 1000 ml.
Sciogliere per ebollizione. Non autoclavare.
*p*H finale = 7,3.

Rappaport-Vassiliadis semi-solido (MSRV)
Terreno selettivo in piastra per le salmonelle
Triptosio 4,59, idrolisato acido di caseina 4,59, sodio cloruro 7,34, potassio fosfato monobasico 1,4, magnesio cloruro 10,93, verde malachite ossalato 0,037, agar-agar 2,7, novobiocina 20 mg, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 5,2.

Rappaport-Vassiliadis Medium
Terreno di arricchimento liquido per le salmonelle
Triptosio 4,59, idrolisato acido di caseina 4,59, sodio cloruro 7,34, potassio fosfato monobasico 1,4, magnesio cloruro 10,93, verde malachite ossalato 0,037, agar-agar 2,7, novobiocina 20 mg, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 5,2.

Sabouraud Agar
Terreno selettivo in piastra o in provetta usato per l'isolamento dei miceti
Peptone 10, glucosio 20, agar-agar 20, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 5,5.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

Salmonella-Shigella Agar (SS)
Terreno selettivo e differenziale in piastra per l'isolamento delle salmonelle
Estratto di carne 5, peptone 5, lattosio 10, sali biliari 8,5, sodio citrato 8,5, sodio tiosolfato 8,5, ferro citrato ico 1, rosso neutro 0,025, verde brillante 0,00033, agar-agar 12, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 7,4.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

Selenite Broth (Brodo selenito cistina)
Terreno liquido di arricchimento per le salmonelle
Digerito triptico di caseina 5, lattosio 4, sodio fosfato bibasico 10, selenito acido di sodio 4, l-cistina 0,01, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 7,0.
Sterilizzare per ebollizione. Non autoclavare.

Serum Tellurite Agar
Terreno selettivo in piastra per la ricerca di Corynebacterium diphteriae
Digerito di caseina 10, peptone di carne 10, sodio cloruro 5, destrosio 2, agar-agar 20, siero equino 50 ml, soluzione acquosa all'1% di potassio tellurito 10 ml, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 7,5 ± 0,2.
Autoclavare a 121 °C per 15 minuti gli ingredienti sciolti in acqua, tranne il siero e il potassio tellurito (sterilizzati a parte per filtrazione), da aggiungere dopo raffreddamento a circa 50 °C.

Shaidi-Ferguson Perfringens Agar (SFP)
Terreno selettivo e differenziale in piastra per l'isolamento e la conta dei clostridi solfito-riduttori negli alimenti
Triptosio 15, peptone di soia 5, estratto di carne 5, estratto di lievito 5, sodio metabisulfito 1, ferro ammonio citrato ferrico 1, agar-agar 14, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 7,6 ± 0,2.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.
Supplemento da aggiungere dopo sterilizzazione: cicloserina 400 mg.

Simmons Citrate Agar
Terreno per la prova di utilizzazione del citrato
Sodio citrato 2, sodio cloruro 5, potassio fosfato bibasico 1, ammonio fosfato biacido 1, magnesio solfato 0,2, blu di bromotimolo 0,08, agar-agar 15, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 6,9.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

Skim-milk Agar
Terreno per conta microbica totale del latte
Estratto di lievito 2,5, triptone 5, glucosio 1, latte scremato in polvere 1, agar-agar 15, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 6,9,
Il latte, controllato esente da sostanze inibenti, viene aggiunto in ultimo, prima dell'agar. Sciogliere in bagnomaria bollente e sterilizzare a 115 °C per 20 minuti.

Skirrow Agar
Terreno selettivo per Campylobacter
Terreno base: peptone proteose 15, estratto enzimatico di fegato 2,5, estratto di lievito 5, sodio cloruro 5, agar-agar 15, acqua distillata 1000 ml.
Soluzione di antibiotici: vancomicina 0,5, trimethoprim 0,25, polimixina B 125.000 U.I., acqua distillata 500 ml.
Terreno completo: terreno base 940 ml, sangue lisato di cavallo sterile 50 ml, soluzione di antibiotici 10 ml.

STAA
Terreno selettivo in piastra per l'isolamento e la conta di Brochotrix thermosphacta negli alimenti
Peptone 20, estratto di lievito 2, potassio fosfato bibasico 1, magnesio solfato 1, agar-agar 13, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 7,0 ± 0,2.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

Streptococcus Selective Agar
Terreno selettivo in piastra per l'isolamento e il conteggio degli streptococchi
Digerito di caseina 15, digerito di soia 5, sodio cloruro 4, sodio citrato 1, l-cistina 0,2, sodio solfito 0,2, destrosio 5, sodio azide 0,2, agar-agar 12, cristalvioletto 0,2 mg, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 7,4 ± 0,2.
Sterilizzare in autoclave a 118 °C per 15 minuti.

TCBS Agar
Terreno selettivo in piastra per l'isolamento dei vibrioni
Estratto di lievito 5, digerito di caseina 5, peptone di carne 5, sodio citrato 10, sodio tiosolfato 10, bile disidratata 5, sodio colato 3, saccarosio 20, sodio cloruro 10, ferro citrato ico 1, blu timolo 0,04, blu di bromotimolo 0,04, agar-agar 14, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 8,6 ± 0,2.
Sterilizzare facendo bollire per un minuto. Non autoclavare.

Terreno a pH 7,2 per ricerca sostanze inibenti
Terreno semplice in piastra adatto per la dimostrazione dei residui di antibiotici nelle carni e altri alimenti (escluso il latte) per via microbiologica
Standard Agar II 100 ml + glucosio 0,4%, sodio cloruro 1%, potassio fosfato monobasico 0,1%.
*p*H finale = 7,2.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti. Raffreddare a circa 50 °C e aggiungere sterilmente le spore di *Bacillus subtilis* BGA in modo da ottenere una concentrazione finale di 10^4 spore/ml.

Terreno di KUNDRAT per ricerca sostanze inibenti
Terreno semplice in piastra adatto per la dimostrazione dei residui di antibiotici nel latte per via microbiologica
Peptone 17, sodio cloruro 3, glucosio 3, amido 3, gelatina 2,5, bromocresolporpora 0,016, saccarosio 2, agar-agar 10, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 6,8 ± 0,2.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti. Raffreddare a circa 50 °C e aggiungere le spore di *Bacillus stearothermophilus* var. *calidolactis* in modo da ottenere una concentrazione finale di 10^6 spore/ml.

Terreno per *test* dei nitrati (Nitrate Broth)
Terreno differenziale liquido per la prova biochimica di riduzione dei nitrati in provetta
Peptone di carne 8,6, sodio cloruro 6,4, potassio nitrato 1,5, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 7,2 ± 0,2.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

Terreno per *test* dell'indolo (TSB)
Terreno differenziale liquido per la prova biochimica di produzione di indolo in provetta
Digerito triptico di caseina 20 g, sodio cloruro 5 g, acqua distillata 1000 ml.
Distribuire in provette a 5 ml e autoclavare a 121 °C per 15 minuti.
*p*H finale = 7,4.

Terreno per *test* dell'urea (Stuart)
Terreno differenziale liquido per la prova biochimica di idrolisi dell'urea in provetta
Estratto di lievito 10, potassio fosfato monobasico 9,1, sodio fosfato bibasico 9,5, urea 20, rosso fenolo allo 0,25% 4 ml, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 6,8 ± 0.2.
Non autoclavare. Sterilizzare per filtrazione.

Terreno per *test* della DNAsi (termonucleasi)
Terreno differenziale in piastra idoneo per la dimostrazione della termonucleasi in ceppi di Staphylococcus aureus isolati da alimenti
Tris-buffer *p*H 9 0,05 M 100 ml, DNA 0,03 g, calcio cloruro 0,01 M 0,10 ml, sodio cloruro 1 g, agar-agar 1 g
Sciogliere gli ingredienti per ebollizione per 30 minuti. Aggiungere 0,3 ml di blu di toluidina in soluzione acquosa 0,1 M.
Non autoclavare.
Soluzione tris-buffer *p*H 9 0,05 M: a 25 ml di soluzione contenente 2,43 g di tris-idrossimetil-aminometano e acqua distillata fino a 100 ml aggiungere 6 ml di HCl 0,1 M. Portare a volume finale di 400 ml con acqua distillata.

Soluzione di calcio cloruro 0,01 M: calcio cloruro 1,10 g, acqua distillata fino a 1000 ml.
Soluzione di blu di toluidina 0,1 M: blu di toluidina 305 mg, acqua distillata fino a 10 ml.

Terreno per *test* della mobilità
Terreno semplice semi-solido per la prova della mobilità in provetta
BHI + agar-agar 0,3%.

Thioglycollate Broth
Terreno semplice liquido adatto per la coltivazione di germi aerobi ed anaerobi
Peptone di caseina 17, peptone di soia 3, glucosio 6, sodio solfito 0,1, sodio tioglicolato 0,5, l-cistina 0,5, agar-agar 0,3, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 7,0 ± 0,2.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

Thioglycollate Medium w/o glucose
Terreno semplice liquido adatto per il trapianto di colture anaerobie da sottoporre a prove biochimiche
Digerito pancreatico di caseina 20, sodio cloruro 2,5, potassio fosfato bibasico 1,5, sodio tioglicolato 0,6, blu di metilene 0,002, l-cistina 0,4, sodio solfito 0,, agar-agar 0,5, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 7,2 ± 0,2.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

Trypticase Soy Agar (TSA)
Terreno di uso generale
Triptone 15, peptone di soia 5, sodio cloruro 5, agar-agar 15, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 7,3.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

Triple Sugar Saline Iron Agar
Terreno di mantenimento e biochimica per germi alofili
Estratto di carne 3, estratto di lievito 3, peptone 20, sodio cloruro 30, lattosio 10, saccarosio 10, glucosio 1, citrato ferrino 0,3, rosso fenolo 0,024, sodio tiosolfato 0,3, agar-agar 15, acqua distillata 1000 ml.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti. Distribuire in provette con fondo e becco di clarino.
*p*H finale = 7,4.

Violet Red Bile Agar (VRBA)
Terreno selettivo per conteggio dei coliformi
Estratto di lievito 3, peptone 7, sodio cloruro 5, sali biliari 1,5, lattosio 10, rosso neutro 0,03, cristavioletto 0,002, agar-agar 15, acqua distillata 1000 ml.
Sciogliere per ebollizione. Non autoclavare.

Tributyrin agar
Terreno selettivo per la numerazione dei batteri lipolitici
Peptone di carne 2,5, peptone di caseina 2,5, estratto di lievito 3, tributyrin 10 ml, agar-agar 12, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 7,5.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

Trypticase Soy Agar + 0,6% estratto di lievito
Terreno semplice solido in provetta usato per il trapianto di colonie isolate di Listeria
Triptone 15, peptone di soia 5, sodio cloruro 5, agar-agar 15, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 7,3.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

Trypticase Soy Broth (TSB)
Terreno semplice liquido di uso generale
c.s. per il TSA, ma senza aggiunta di agar-agar.

Trypticase Soy Broth + 0,6% estratto di lievito
Terreno semplice liquido in provetta usato per il trapianto di colonie isolate di Listeria
c.s. ma con aggiunta di estratto di lievito allo 0,6%.

Tryptone Bile Glucuronic Medium (TBX)
Terreno selettivo per il conteggio di Escherichia coli
Digerito di caseina 20, sali biliari 1,5, BCIG 144 µmole, dimetil - sulfossido 3 ml, agar-agar 15, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 7,2.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

Tryptose Sulphite Cycloserine Agar (TSC)
Terreno selettivo e differenziale per l'isolamento e la conta di clostridi solfito-riduttori da alimenti
Tryptose 15, peptone di soia 5, estratto di lievito 5, sodio bisolfito 1, ferro ammonio citrato 1, agar-agar 15, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 7,4 ± 0,.2
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.. Raffreddare a circa 50 °C ed aggiungere sterilmente il supplemento selettivo contenente cicloserina 0.4 g

Violet Red Bile Agar (VRBA)
Terreno selettivo e differenziale in piastra usato per la conta dei coliformi negli alimenti
Peptone di carne 7, estratto di lievito 3, sodio cloruro 5, lattosio 10, rosso neutro 0,03, sali biliari 1,5, cristalvioletto 0,002, agar-agar 13, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 7,4 ± 0,2.
Non autoclavare. Sterilizzare per ebollizione.

Violet Red Bile Glucose Agar (VRBG)
Terreno selettivo e differenziale in piastra usato per la conta degli enterobatteri negli alimenti
Peptone di carne 7, estratto di lievito 3, sodio cloruro 5, glucosio 10, sali biliari 1,5, rosso neutro 0,03, cristalvioletto 0,02, agar-agar 13, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 7,3 ± 0,2.
Non autoclavare.

Violet Red Bile Glucose Agar (VRBG) + MUG
Terreno selettivo e differenziale in piastra usato per il conteggio di Escherichia coli negli alimenti
Estratto di lievito 3, digerito pancreatico di gelatina 7, sali biliari 1,5, glucosio 10, sodio cloruro 5, agar-agar 15, rosso neutro 0,03, cristalvioletto 0,002, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 7,4 ± 0,2.

Scaldare fino ad ebollizione per 1 minuto in bagnomaria. Non autoclavare. Si può utilizzare anche il terreno Violet Red Bile Agar (VRBA), che contiene 10 g di lattosio per litro, aggiungendo 10 g di glucosio.

Xilose Lisine Deoxycholate Agar (XLD)
Terreno selettivo e differenziale in piastra per la ricerca delle salmonelle
Xilosio 3,5, l-lisina 5, lattosio 7,5, saccarosio 7,5, sodio cloruro 5, estratto di lievito 3, sodio desossicolato 2,5, sodio tiosolfato 6,8, ferro ammonio citrato ico 0,8, rosso fenolo 0,08, agar-agar 15, acqua distillata 1000 ml.
Sciogliere per ebollizione. Non autoclavare.
*p*H finale = 7,4.

XLT_4 Agar
Terreno selettivo e differenziale in piastra per la ricerca delle salmonelle
Peptone proteose 1,6, estratto di lievito 3, l-lisina 5, xilosio 3,75, lattosio 7,5, saccarosio 7,5, ferro ammonio citrato ico 0,8, sodio tiosolfato 0,8, sodio cloruro 5, rosso fenolo 0,08, sodio tetradecilsolfato 4,6, agar-agar 18, acqua distillata 1000 ml.
Sciogliere per ebollizione.
*p*H finale = 7,4.

Yeast-Dextrose-Chloramphenicol Agar
Terreno selettivo per miceti
Estratto di lievito 5, destrosio 20, cloramfenicolo 0,1, agar-agar 15, acqua distillata 1000 ml.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.
*p*H finale = 6,6.

SOLUZIONI

Acqua distillata apirogena
Diluente per soluzioni iniettabili e per il LAL- test

Acqua peptonata
Diluente di uso generale
Peptone 10 g, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 7,0.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

Phosphate Buffered Saline (PBS)
Diluente di uso generale
Sodio cloruro 10, potassio cloruro 0,250, potassio fosfato monobasico 0,250, sodio fosfato bibasico biidrato 1,755, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 7,4.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 20 minuti.

Soluzione di Ringer ¼ concentrata
Diluente di uso generale
Una compressa da sciogliere in 500 ml di acqua distillata contiene sodio cloruro, potassio cloruro, calcio cloruro e sodio bicarbonato.
*p*H finale = 6,9 ± 0,1.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

Soluzione fisiologica 0,1% peptonata
Idonea per la preparazione delle diluizioni nei conteggi batterici su alimenti
Acqua distillata 1000 ml, peptone 1 g, sodio cloruro 8,5 g.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

Soluzione fisiologica sterile (sol. fis.)
Diluente di uso generale
Sodio cloruro 8.5, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 7,0.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

Soluzione tampone fosfato (Phosphate Buffered Saline, PBS)
Diluente per la conservazione dei microrganismi in ambiente tamponato
Sodio cloruro 10, potassio cloruro 0,250, potassio fosfato monobasico 0,250, sodio fosfato bibasico biidrato 1,755, acqua distillata 1000 ml.
*p*H finale = 7,4.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 20 minuti.

REATTIVI

Reattivo di Kovacs
Reagente per il test dell'indolo
Alcool amilico o isoamilico 150 ml, para-amino-benzaldeide 10, acido cloridrico 50 ml.

Reattivo A per *test* dei nitrati
Acido sulfanilico 8, acido acetico al 30% 1000 ml.

Reattivo B per *test* dei nitrati
Alfa-naftilammina 5, acido acetico al 30% 1000 ml.

Reattivo per *test* dell'ossidasi
Tetrametil-para-fenilendiammina 1, acqua distillata 100 ml.

Reattivo 1 per *test* di Voges-Proskauer
Idrato di potassio 40, acqua distillata 100 ml.

Reattivo 2 per *test* di Voges-Proskauer
Alfa-naftolo 12, alcool etilico 100 ml.

Reattivo ninidrina
Reagente per il test dell'ippurato
Ninidrina 7, 2-metossietanolo 100 ml

Reattivi per *test* dell'ippurato
Soluzione di ippurato di sodio: sodio ippurato 0,5, acqua distillata 50 ml. Sterilizzare per filtrazione.
Soluzione di ninidrina al 3,5%: ninidrina 1,75, acetone 25 ml, butanolo 25 ml.

ALTRE PREPARAZIONI

Colorazione di Gram (modificata da Hucker)

- Soluzione madre di cristalvioletto: cristalvioletto al 10% in alcool etilico al 95%
- Soluzione madre di ossalato: ammonio ossalato all'1% in acqua distillata
- Soluzione madre iodo-iodurata (Lugol): iodio cristalli 1, potassio ioduro 2, acqua distillata 10 ml
- Miscela decolorante: alcool etilico al 95% e acetone in rapporto 1:1
- Soluzione madre del secondo colorante: fucsina basica 0,3 g, alcool etilico al 95% 10 ml

Tutte le soluzioni madre devono essere preparate con largo anticipo (mesi) prima dell'uso e conservate a temperatura ambiente, al buio, chiuse in recipienti di vetro scuro.

Dalle soluzioni madre si preparano le soluzioni di lavoro, filtrando la quantità necessaria di soluzione madre su carta da filtro e diluendo successivamente come segue:

- Soluzione di lavoro di cristalvioletto: soluzione madre di cristalvioletto 20 ml + soluzione madre di ossalato 80 ml
- Soluzione di lavoro iodo-iodurata (Lugol): soluzione madre iodo-iodurata 5 ml + acqua distillata fino a 100 ml
- Soluzione di lavoro del secondo colorante (fucsina): soluzione madre di fucsina diluita 1:10 in acqua distillata

Colorazione blu piroplasmi

Soluzione A: alcool metilico 100 ml, acido acetico glaciale 6 gocce, eosina giallastra 1.

Soluzione B: blu di metilene 0,5, potassio idrato soluzione al 10% 0,05 ml, acqua distillata 100 ml.

Allestire il preparato su vetrino portaoggetti, lasciare asciugare completamente all'aria e coprire con soluzione A per 3 minuti.

Lavare con acqua, colorare con soluzione B per 1 minuto.

Lavare, asciugare e osservare al microscopio con obiettivo a immersione.

BIBLIOGRAFIA

Difco Manual, 11th ed., Becton-Dickinson, Sparks, Maryland, USA, 1998

Levetzov R., Ein Beitrag zum Clostridiennachweis bei der bakteriologischen Fleischuntersuchung (BU), Arch. Lebens. 1967, *18*, 217-219

Manuale Biolife, terza edizione, Biolife Italiana, Milano, 1998

Manuale Oxoid, Unipath, Basingstoke, Hampshire, Inghilterra, 1993

Manual of BBL, Products and Laboratory Procedures, 6th edition, Beckton-Dickinson, Cockeysville, Maryland, USA, 1988

Microbiology Manual Merck, Darmstadt, Germania, 1996

Pasquinelli F., Diagnostica e tecniche di laboratorio, vol. 2, Rosini, Firenze, 1987

Pelczar M.J. *e Coll*., Laboratory exercise in microbiology, 4th ed., Mc Graw-Hill Inc., New York, 1977

PROTOCOLLO OPERATIVO CONSIGLIATO PER LO SMALTIMENTO DEI RIFIUTI PRODOTTI IN LABORATORIO

RIFIUTI URBANI	Carta non inquinata di uso assimilabile a quello per ufficio	sacco per raccolta differenziata della carta destinata a riciclo
	Vetro (bottiglie, provette, beute, ecc.), purché svuotato, lavato e privo di etichette	contenitore rigido per raccolta differenziata del vetro da riciclare
	Carta, plastica e altro materiale non inquinato assimilabile a quello di uso domestico	sacco per lo smaltimento dei rifiuti solidi urbani
RIFIUTI SPECIALI OSPEDALIERI	Plastica monouso, siringhe, aghi, garze, cotone, guanti, carta sporca o inquinata	contenitore per rifiuti speciali ospedalieri tipo "*all-pack*" (raccolta mediante ditta specializzata, con smaltimento tramite inceneritore)
	Residui di campioni analizzati (sangue, urine, feci, tamponi, alimenti, ecc.)	idem c.s.
	Terreni batteriologici con colture provenienti da recipienti di vetro già sottoposti a trattamento sterilizzante	idem c.s.
	Terreni batteriologici con colture contenuti in recipienti monouso eliminabili senza trattamenti sterilizzanti*	idem c.s.
	Reagenti non infiammabili e non esplosivi in piccola quantità; terreni per batteriologia non utilizzati	idem c.s.
RIFIUTI CHIMICI SPECIALI	reagenti chimici infiammabili o esplosivi	contenitore per residui pericolosi raccolta tramite azienda specializzata

Nel caso di colture di germi patogeni, si raccomanda la sterilizzazione prima dell'eliminazione nei rifiuti speciali ospedalieri.

Tabella MPN

Tabella valida nel caso in cui vengano seminate **3 provette per ciascuna diluizione**, contenenti quantità di campione pari a 1, 0,1, 0,01 grammi (o ml). Se nelle diluizioni sono state seminate quantità di campione pari a 0,1, 0,01, 0,001 grammi (o ml), i valori riportati nella colonna MPN vanno moltiplicati per 10.

Numero di tubi positivi			MPN in g (ml)	Numero di tubi positivi			MPN in g (ml)
g (ml)	g (ml)	g (ml)		g (ml)	g (ml)	g (ml)	
1 0,1	0,1 0,01	0,01 0,001	1 0,1	1 0,1	0,1 0,01	0,01 0,001	1 0,1
0	0	0	<0.3	2	2	1	2,8
0	0	1	0,3	3	3	0	2,9
0	1	0	0,3	3	0	0	2
0	2	0	0,6	3	0	1	4
1	0	0	0,4	3	0	2	6
1	0	1	0,7	3	1	0	4
1	1	0	0,7	3	1	1	7
1	1	1	1,1	3	1	2	12
1	2	0	1,1	3	2	0	9

Numero di tubi positivi			MPN in g (ml)	Numero di tubi positivi			MPN in g (ml)
g (ml)	g (ml)	g (ml)		g (ml)	g (ml)	g (ml)	
1	2	1	1,5	3	2	1	15
1	3	0	1,6	3	2	2	21
2	0	0	0,9	3	2	3	29
2	0	1	1,4	3	3	0	20
2	1	0	1,5	3	3	1	50
2	1	1	2,0	3	3	2	110
2	2	0	2,1	3	3	3	>110

I metodi ISO

All'interno del Regolamento CE n. 2073/2005, sono citati alcuni metodi d'analisi di riferimento secondo l'ISO (International Standard Organisation). Nella seguente tabella, si riportano i numeri di codice dei metodi stessi:

Oggetto del metodo di riferimento ISO	**Numero di codice ISO del metodo**
Carica batterica totale aerobia	4833
Enterobacter sakazakii	22964
Enterobacteriaceae	21528
Escherichia coli	16649
Listeria monocytogenes (isolamento) *Listeria monocytogenes* (conteggio)	11290-1 11290-2
Salmonella	6579
Stafilococchi coagulasi-positivi	6888
Campionatura delle carcasse per analisi microbiologiche	17604

Descrizione sommaria di alcuni metodi ISO citati

Carica batterica totale aerobia (CBT) - Tecnica della conta delle colonie a 30 °C (metodo ISO 4833)

Diluizioni decimali del campione omogeneizzato vengono seminate, in doppio, a 1 ml in piastre di Petri sterili vuote, da riempire con 15 ml di terreno fuso PCA + 4 ml di *overlay*. Incubazione a +30 °C per 72 ore.

Enterobacter sakazakii (metodo ISO 24964)

Una diluizione 1:10 del campione omogeneizzata in Buffered Peptone Water (BPW) viene pre-arricchita a +37 °C per una notte e trapiantata a 0,1 ml in una provetta con 10 ml di brodo d'arricchimento Modified LST + vancomicina. Dopo incubazione a +44 °C per 24 ore, dal brodo vengono seminate due piastre di terreno selettivo (Chromogenic Agar Medium), da incubare a +44 °C per 24 ore.

Le colonie tipiche, di colore blu-verde, vengono controllate per la produzione di pigmento giallo in sub-colture di 48 ore a +25 °C su TSA e sottoposte a *test* biochimici comprendenti ossidasi (-), lisina decarbossilasi (-), ornitina decarbossilasi (+), arginina diidrolasi (+), fermentazione di ramnosio, saccarosio, melibiosio, amigdalina, mancata fermentazione del sorbitolo, idrolisi del citrato (+).

Enterobacteriaceae - Conteggio delle colonie (metodo ISO 21528)

Diluizioni decimali dell'omogenato del campione vengono seminate, in doppio, a 1 ml entro piastre Petri sterili vuote, alle quali vengono aggiunti 15 ml di terreno VRBG. Dopo 24 ore di incubazione a +37 °C, vengono contate tutte le colonie rosse. Conferma su 5 trapianti in Nutrient Agar mediante *test* dell'ossidasi (-) e *test* di fermentazione del glucosio (+) su Glucose Agar.

Escherichia coli - Conteggio su piastra di E. coli glucuronidasi-positivi (metodo ISO 16649)

Diluizioni decimali dell'omogenato del campione vengono seminate, in doppio, a 1 ml entro piastre Petri sterili vuote, alle quali vengono aggiunti 15 ml di terreno TBX (Tryptone Bile Glucuronic Medium). Dopo incubazione di 24 ore a +44 °C, vengono contate le colonie blu.

Listeria monocytogenes - Ricerca qualitativa (metodo ISO 11290-1)

Pre-arricchimento del campione in Brodo di Fraser a mezza concentrazione a +30 °C per 24 ore. Trapianto di 0,1 ml in brodo d'arricchimento di Fraser con incubazione a +37 °C per 48 ore. Piastratura su ALOA con incubazione a +37 °C per 24-48 ore.

Listeria monocytogenes - Ricerca quantitativa (metodo ISO 11290-2)

L'omogenato in BPW (Buffered Peptone Water) viene tenuto per 1 ora a +20°C. Diluizioni decimali della sospensione vengono seminate, in doppio, a 0,1 ml sulla superficie di piastre di ALOA. Dopo incubazione di 48 ore a +37°C, le colonie contate vengono confermate mediante trapianto di 5 colonie su TSYEA, incubato a +37 °C per 24-48 ore. Seguono i *test* del Gram, catalasi, mobilità, emolisi, CAMP, fermentazione di ramnosio e xilosio.

Salmonella - Ricerca qualitativa di Salmonella spp. (metodo ISO 6579)

Pre-arricchimento del campione in BPW (Buffered Peptone Water) a +37 °C per 18 ore. Successivamente 0,1 ml di brodo di pre-arricchimento vengono trapiantati in 10 ml di RSV, da incubare a 41,5 °C per 24 ore, e 1 ml in 10 ml di MKTT, da incubare a +37°C per 24 ore. Gli arricchimenti vengono piastrati su XLD e su un secondo terreno selettivo a scelta. Dopo incubazione a 37 °C per 24 ore, le colonie sospette vengono trapiantate su Nutrient Agar e, dopo 24 ore a +37 °C, si procede alla conferma biochimica e sierologica.

Stafilococchi coagulasi-positivi - Conteggio di S. aureus e altre specie (metodo ISO 6888)

Diluizioni decimali dell'omogenato del campione vengono seminate, in doppio, a 0,1 ml su piastre Baird-Parker Agar. Per conteggi limitati si possono seminare con 1 ml di omogenato tre piastre di terreno selettivo. Dopo 48 ore a +37°C le colonie tipiche vengono contate e 5 sottoposte a conferma mediante trapianto su BHI (24 ore a +37°C) e successivo *test* della coagulasi (0,1 ml di brodocoltura + 0,3 ml di plasma di coniglio a +37 °C per 4-6 ore). Sono positive solo le conferme che mostrano coagulazione su almeno metà del volume nella provetta.

Campionatura delle carcasse per analisi microbiologiche (metodo ISO 17604)

Su 10 siti individuati e delimitati mediante uno schermo sterile da 10 x 10 cm.vengono sfregate o spugne sterili bagnate in 10 ml di soluzione fisiologica peptonata o tamponi bagnati. Le spugne vengono raccolte singolarmente in sacchetti sterili contenenti 25 ml di soluzione fisiologica peptonata e i tamponi introdotti in provette con 10 ml dello stesso diluente. Il trasporto al laboratorio deve avvenire entro un'ora, oppure si può ricorrere alla refrigerazione a +2 °C per non più di 24 ore.

Tipografia Camuna S.P.A.

Finito di stampare
nel mese di febbraio 2008

Informazione ecologica:

pubblicazione stampata con assenza di esalazioni alcooliche
Sistema Cesius® brevetto **Philip Borman Italia**

ISBN 978-88-902814-4-0