FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE E ZOOTECNICHE - BRESCIA

METODI PER L'ANALISI MICROBIOLOGICA DEGLI ALIMENTI

45

EDITO A CURA DELLA
FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE E ZOOTECNICHE - BRESCIA

METODI PER L'ANALISI MICROBIOLOGICA DEGLI 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. Attuahtà 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 la conferenza nazionale
36 - 1993 Argomenti di patologia veterinaria
37 - 1994 Stato dell'arte delle ricerche italiane sul settore delle biotecnologie applitate 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

FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE
E ZOOTECNICHE - BRESCIA

METODI PER L'ANALISI MICROBIOLOGICA DEGLI ALIMENTI

MAURIZIO ZAVANELLA

EDITO A CURA DELLA
FONDAZIONE INIZIATIVE ZOOPROFILATTICHE
E ZOOTECNICHE - BRESCIA
Via A. Bianchi 1, 25125 Brescia - Tel. 030/223244-2420569

© Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche - Brescia, Luglio 2000

Tipografia Camuna - Brescia 2000

INDICE

CAPITOLO 1° - GENERALITÀ

- Norme generali di comportamento in laboratorio ..... pag. 11
- Esami microbiologici più indicati per alimenti di origine animale ..... » 14
- Ricerche microbiologiche consigliate negli episodi di malattie batteriche di origine alimentare ..... » 16
- Malattie batteriche trasmesse da alimenti ..... » 17
- Preparazione iniziale del campione ..... » 18
- Determinazione del pH e dell'Aw ..... » 20

CAPITOLO 2° - RICERCHE QUANTITATIVE

- Conta batterica totale
  1. Conta batterica totale mesofila ..... » 25
     1.1 metodo *pour plate* (conta in piastra standard) ..... » 25
     1.2 metodo *surface spread plate* ..... » 28
     1.3 metodo *drop plate* (micrometodo) ..... » 29
  2. Conta batterica totale psicrofila ..... » 31
  3. Conta batterica totale termofila ..... » 31
  4. Conta dei batteri termodurici ..... » 31
- *Enterobacteriaceae* ..... » 34
- Coliformi ..... » 36
- *Escherichia coli* ..... » 39
- Streptococchi fecali ..... » 41
- Lattobacilli ..... » 44
- Stafilococchi coagulasi-positivi ..... » 47
- Micrococchi ..... » 50
- Anaerobi solfito-riduttori (spore) ..... » 52
- *Clostridium perfringens* ..... » 55
- *Bacillus cereus* ..... » 59
- *Pseudomonas aeruginosa* ..... » 62
- *Aeromonas hydrophila* ..... » 64
- *Brochothrix thermosphacta* ..... » 67
- *Listeria monocytogenes* ..... » 69
  1. Metodo MPN ..... » 69
  2. Piastratura diretta ..... » 71
- *Salmonella* ..... » 73
- Miceti ..... » 76

CAPITOLO 3° - RICERCHE QUALITATIVE

- *Salmonella* ..... » 79
- *Shigella* ..... » 82
- *Listeria monocytogenes* ..... » 84
- Vibrioni ..... » 88
  1. *Vibrio cholerae 01 e 0139* ..... » 88
  2. *Vibrio parahaemolyticus* e vibrioni correlati ..... » 90
- *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* ..... » 93
- *Yersinia enterocolitica* ..... » 96
- *Brucella* ..... » 98
- *Escherichia coli 0157:H7* ..... » 100

CAPITOLO 4° - ALTRE RICERCHE
- Sostanze inibenti
  1. Metodo con *Bacillus subtilis* ..... pag. 105
  2. Metodo con *Bacillus stearothermophilus var. calidolactis* ..... » 107
- Sterilità delle conserve in scatola..... » 109
- Controlli su ambienti di lavorazione alimenti ..... » 111
  1. Analisi quantitative ..... » 111
    1.1 esame dell'aria ambiente ..... » 111
    1.2 esame dell'acqua ..... » 112
    1.3 esame delle superfici di lavorazione ..... » 113
  2. Analisi qualitative ..... » 114

CAPITOLO 5° - METODI UFFICIALI (METODI NORMATI)
- Procedure d'analisi microbiologiche pubblicate sulla Gazzetta Ufficiale della Repubblica Italiana ..... » 117
- Principali norme vigenti in Italia sugli alimenti di origine animale ..... » 118
- *Ordinanza ministeriale 11 ottobre 1978* ..... » 120
- Latte in polvere per l' alimentazione della prima infanzia ..... » 120
- *Telegramma ministeriale?? Dicembre 1991* (Ricerca *salmonelle* nelle uova) ..... » 125
- *Decreto ministeriale 26 marzo 1992*
- Latte crudo..... » 126
- Latte pasteurizzato..... » 127
- Latte UHT e sterilizzato..... » 128
- *Ordinanza ministeriale 7 dicembre 1993*..... » 129
- *Decreto ministeriale 31 luglio 1995* (Molluschi eduli lamellibranchi)..... » 132
- *Regolamento CEE 1080/96, 14 giugno 1996* (Ricerca coliformi in burro, latte in polvere, caseinati) ..... » 136

APPENDICE
- Protocollo operativo consigliato per lo smaltimento dei rifiuti in laboratorio ..... » 139
- Terreni ..... » 140
- Reagenti..... » 146
- Ceppi batterici di controllo ..... » 147
- Criteri microbiologici stabiliti per alcune categorie di alimenti ..... » 148
- Tabelle MPN ..... » 155
- Unità di misura..... » 157

PREFAZIONE

Questo manuale si inserisce in una lunga collana di pubblicazioni curate dalla Fondazione Iniziative Zooprofilattiche e Zootecniche. Come è nella tradizione dell'Ente, l'attività editoriale si rivolge a specialisti, presenti e futuri, dei settori sanitario, zootecnico ed agro-alimentare.
In particolare, la presente opera è dedicata ai giovani che frequentano Scuole di differente livello, quantunque tutte mirate all'inserimento di personale qualificato destinato poi a collaborare nelle stesse strutture.
Si tratta delle seguenti Scuole:

- *Scuole di Specializzazione Universitaria delle Facoltà di Medicina e Chirurgia e di Veterinaria.*
- *Corsi di Diploma Universitario per Tecnici di Laboratorio Biomedico.*
- *Scuole di Istruzione Superiore per Tecnici di Laboratorio.*

È opportuno ricordare che alcune Scuole di Specializzazione Universitaria sono tuttora funzionanti presso la Fondazione stessa, che agisce in stretta collaborazione -attualmente- con le Facoltà di Veterinaria delle Università di Milano e di Parma.

I futuri operatori di sanità, Veterinari, Biologi ed anche Tecnici, che studiano per prepararsi a lavorare nel controllo degli alimenti, troveranno nel manuale le nozioni di microbiologia destinate a diventare, da attuale materia di studio, oggetto di pratica professionale per l'espletamento quotidiano delle indagini di laboratorio.

Inoltre, tenuto conto che le disposizioni comunitarie in fatto di sicurezza degli alimenti impongono alle ditte l'autocontrollo sotto la supervisione delle Aziende Sanitarie Locali, il manuale è rivolto parimenti all'attenzione dei Veterinari delle ASL.
Per coloro che sono in servizio presso gli stabilimenti, la conoscenza delle possibilità che il laboratorio offre attraverso le analisi al Sanitario Responsabile equivale praticamente ad una forma di aggiornamento per realizzare l'obiettivo cogente del miglioramento qualitativo del prodotto.

A. Pecorelli

PREMESSA

Parecchie procedure in batteriologia sono impraticabili perchè troppo complesse o eccessivamente costose.
Nella microbiologia degli alimenti, perlomeno a livello di analisi di *routine*, queste considerazioni sono motivo sufficiente per giustificare una selezione tra le metodiche offerte, tenendo conto dei requisiti di semplicità, economia ed affidabilità.
Scopo del presente manuale è di proporre una raccolta di tecniche consigliate, adatte alle analisi batteriologiche sugli alimenti.
La materia è stata suddivisa in cinque capitoli, intitolati: generalità, ricerche quantitative, ricerche qualitative, altre ricerche, metodi ufficiali. Il testo è completato da un'appendice, contenente alcune formule di terreni e reagenti citati, oltre ad una serie d'indicazioni e tabelle d'interesse pratico.

Particolari ringraziamenti al Prof. G.L. Gualandi, al Dr. R. Muliari, al Dr. M. D'Incau per la collaborazione gentilmente prestata.

M. Zavanella

NORME GENERALI DI COMPORTAMENTO IN LABORATORIO

Le seguenti norme devono essere osservate per la sicurezza delle persone che operano all'interno del laboratorio e per garantire che non vengano trasmesse contaminazioni al di fuori del laboratorio stesso.

Si consiglia prendere visione delle avvertenze riguardanti la sicurezza sul lavoro e la prevenzione degli infortuni contenute nel D.L.vo 626/94.

1 - Norme riguardanti il vestiario

- Indossare sempre il camice in laboratorio.
- Non uscire dal laboratorio con il camice da lavoro.
- In caso di contaminazione accidentale del vestiario, togliersi subito ciò che è stato inquinato e riporlo in un sacchetto di politene assieme ad un batuffolo di cotone imbevuto di disinfettante (ad es. formaldeide soluzione acquosa al 40%); chiudere il sacchetto e riaprirlo solo al momento di versarne il contenuto in lavatrice.

2 - Utilizzazione dei mezzi di protezione individuali

Si considerano mezzi di protezione individuali alcuni strumenti che consentono il lavoro in condizioni di sicurezza. In batteriologia si tratta essenzialmente di guanti monouso, disinfettanti, propipette, cappe.

◊ ***Guanti monouso***: usarli sempre per manipolare prodotti biologici inquinanti pericolosi.

Evitare di toccare con gli stessi guanti altri oggetti non di lavoro (ad es. telefono, maniglie delle porte, ecc).
Ricordarsi di gettarli a fine lavoro nel contenitore dei rifiuti speciali.

◊ ***Disinfettanti*: usarli per trattare il piano di lavoro prima e dopo le operazioni, soprattutto se vengono manipolate colture di germi vivi o materiale patologico.

In caso di versamento di materiale biologico inquinante, coprire la zona con disinfettante, aspettare, e poi, con i guanti, assorbire su carta e gettare nel contenitore per rifiuti speciali.

◊ ***Propipette*: non pipettare mai a bocca.**

Predisporre un sacchetto di politene per raccogliere le pipette ed eliminarle tra i rifiuti speciali.

◊ **Cappe:** nel caso di trapianti di colture di germi particolarmente pericolosi, lavorare sotto cappa di sicurezza a flusso laminare verticale.

Nota riguardante la preparazione di reagenti e soluzioni: per trattare acidi e basi forti, oppure sostanze volatili, usufruire della cappa chimica o, in mancanza, proteggersi con guanti, mascherina, occhiali protettivi in ambiente ben ventilato, possibilmente con aspirazione dell'aria (depressione).

3 - Norme da osservarsi durante il lavoro

⇩ ***Non si deve assolutamente assumere cibo, bere o fumare in laboratorio.***

Non abbandonare apparecchiature in funzione.
Provvedere con dovuti accorgimenti al fine di evitare la formazione di *aerosol* (che può avvenire durante la centrifugazione, la ricostituzione di liofilizzati, ecc).
Identificare tutte le preparazioni da porre in frigorifero o in termostato.

4 - Norme da applicare al termine del lavoro

- I rifiuti vanno raccolti in maniera differenziata:
  - carta non inquinata ⇩ **rifiuti solidi urbani**;
  - vetro non contaminato ⇩ **contenitore per il vetro**;
  - ogni altro oggetto (come guanti, cotone, garze, tappi e contenitori monouso, siringhe, aghi, pipette, plastica monouso) ⇩ **rifiuti speciali;**
- Disinfettare le superfici che potrebbero essere state inquinate.

⇩ **lavarsi le mani con acqua e sapone *sempre* al termine del lavoro e *frequentemente* durante il lavoro stesso, e ciò al fine di diminuire il rischio di portare inavvertitamente alla bocca agenti patogeni pericolosi.**

5 - Manutenzione dei laboratori

- A fine giornata pulire e disinfettare le superfici usate (banchi, pavimenti) mediante allontanamento della polvere e lavaggio con acqua e detersivo sanitizzante.
- A fine settimana fare lo stesso trattamento, ma generalizzato (ossia esteso a cella frigo, termostati, ecc).
- Due volte al mese sterilizzare la cappa a flusso laminare con evaporazione di formalina (da 50 a 100 ml in soluzione acquosa al 50%, a seconda delle dimensioni).

CONTROLLI *(vedi anche al capitolo 4°, controlli su ambienti di lavorazione alimenti)*
- Rilevare periodicamente la carica batterica totale con tamponi superficiali o piastre a contatto (situazione normale dei banchi prima dal trattamento = 50 - 100 UFC / cm^2, dopo lavaggio e sanitizzazione = 0,5 - 1 UFC / cm^2).
- Verificare periodicamente la sterilità dell'aria nella cappa in funzione mediante esposizione per 20 minuti di cinque piastre Petri con terreno Plate Count Agar (PCA) e successiva incubazione a 30 °C per 72 ore.

APPARECCHIATURE
Dotazione consigliata: autoclave, stufa a secco, lavavetreria, bilancia tecnica, omogeneizzatore peristaltico, pHmetro, misuratore Aw, bagnomaria, centrifuga, microscopio, termostati, frigorifero, congelatore, cappa a flusso laminare.

VETRERIA
Provette mm 16 × 100, 16 × 160, provettoni 20 × 200 con tappi riutilizzabili.
Bottiglie vetro pyrex o Duran 50 con tappo a vite.
Becker, matracci e cilindri graduati pyrex.

MATERIALE MONOUSO STERILE
Pipette graduate (da ml 1 - 2 - 5 - 10 - 25), piastre Petri diametro mm 90, spatole a L per batteriologia, sacchetti presto - chiuso e sacchetti con filtro per omogeneizzatore.

PREPARAZIONE E CONSERVAZIONE DEI TERRENI COLTURALI

- *Quantità consigliata per partita* = non superiore a 500 ml.
- *Sterilizzazione* = a 121 °C per 15 minuti.
- *Distribuzione*
  brodi in provette mm 16 × 160 = ml 10, provettoni mm 20 × 200 = ml 25, terreni solidi a becco di clarino in provette mm 16 × 160 = ml 5 (per il Kligler Iron Agar= ml 7), in provettoni mm 20 × 200 = ml 15; in piastre Petri diametro mm 90 = ml 15.
- *Conservazione* (dopo asciugatura dei terreni solidi a temperatura ambiente per 24 - 48 h) = in frigorifero a + 4 °C.
- *Validità dei terreni preparati* = liquidi in provetta, 1 mese, liquidi in bottiglia ermetica, 3 mesi, solidi in provetta e in piastra (chiusi in sacchetto di politene), 3 settimane (con alcune rare eccezioni riguardanti terreni da non autoclavare che vanno consumati in giornata).

NOTA

Da una statistica pubblicata negli USA (SEWELL, 2000) le principali infezioni batteriche acquisite in laboratorio riguardano attualmente, in ordine di frequenza, *Salmonella, Shigella, Brucella, F. tularensis, M. tuberculosis, E. coli 0157.*
Il 95% degli incidenti, associati con infezioni in laboratorio, è causato da:
schizzi e *aerosol* (27%), punture da aghi (25%), ferite da oggetti taglienti (16%), abrasioni cutanee (14%), pipettamento a bocca (13%).

Riferimenti bibliografici

SEWELL D.L. Laboratory-acquired Infections, Clin. Microbiol. Newsl., 2000, 22, 73-76.

Esami microbiologici più indicati per alimenti di origine animale

MATERIALE	RICERCHE CONSIGLIATE	RIF.
1. CARNI FRESCHE (REFRIGERATE O CONGELATE)		
Muscolo (da mezzene, quarti, tagli anatomici)	CBT, *Salmonella,* inibenti	*(1)*
Carni macinate, carni in pezzi di peso inferiore a 100 g o comunque in porzioni destinate alla vendita al dettaglio	CBT, stafilococchi coagulasi +, *E. coli,* clostridi solfito-riduttori, *Salmonella*	*(2)*
Pollame (intero o in parti)	CBT, *Salmonella,* inibenti	*(3)*
2. PRODOTTI DI SALUMERIA		*(4)*
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*	
3. 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*	
4. MOLLUSCHI E CROSTACEI		*(3)*
Freschi	*E coli, Salmonella, Vibrio cholerae O1, Vibrio parahaemolyticus*	
Cotti	CBT, stafilococchi coagulasi +, *E. coli, Salmonella*	
5. LATTE E DERIVATI		*(5)*
Latte pasteurizzato	CBT, coliformi, *Salmonella, Listeria*	

MATERIALE	RICERCHE CONSIGLIATE	RIF.
Latte sterilizzato e UHT	CBT	
Panna pasteurizzata	CBT, coliformi, *Salmonella, Listeria*	
Burro	Coliformi, *Salmonella, Listeria*	*(9)*
Gelati	Coliformi, *S. aureus,* coliformi, *Salmonella, Listeria*	
Formaggi	*E coli, S. aureus,* coliformi, *Salmonella, Listeria*	
Latte in polvere	Coliformi, *Salmonella*	*(9)*
6. PASTE ALIMENTARI	CBT, coliformi, *E coli, Salmonella, S aureus, Cl. perfringens*	*(6)*
7. UOVA E DERIVATI		*(7)*
Uova da consumo	*Salmonella*	
Prodotti d'uovo	CBT, stafilococchi coagulasi +, *Enterobacteriaceae, Salmonella*	
8. PREPARAZIONI GASTRONOMICHE		*(1)*
Crude (spiedini, arrotolati)	vedi carni macinate	
Pasteurizzate, cotte, precotte (piatti pronti, da riscaldare prima del consumo o da consumare tal quali)	CBT, stafilococchi coagulasi +, *E. coli, B. cereus, Salmonella, Listeria m.*, clostridi solfito-riduttori	
9. PRODOTTI STERILIZZATI E CONSERVE	CBT aerobia mesofila, CBT anaerobia mesofila, spore aerobie, spore anaerobie	*(8)*

Riferimenti 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

Ricerche microbiologiche consigliate negli episodi di malattie batteriche di origine alimentare **

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*	-	*Sì*
Clostridium perfringens	*Sì*	*Sì*	-	*Sì*
E coli O157 : H7	-	*Sì*	-	*Sì*
E coli EPEC, ETEC, EIEC, EHEC	-	*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.*

***Tabella desunta da "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.*

Malattie batteriche trasmesse da alimenti*

INCUBAZIONE	AGENTE EZIOLOGICO	SINTOMI	ALIMENTI
1 - 6 ore	*S. aureus*	*nausea, vomito, crampi addominali, ipotermia*	*gastronomia, dolci, piatti cotti pronti manipolati e conservati non refrigerati*
	B. cereus (tossina emetica)	*attacco acuto di vomito*	*riso o vegetali cotti conservati non refrigerati e successivamente riscaldati*
12 - 24 ore	*Salmonella, E. coli EPEC, ETEC, EIEC, Vibrio parahaemolyticus*	*diarrea, febbre, dolori addominali, talvolta vomito*	*cibi crudi o manipolati dopo cottura*
	Clostridium perfringens, Bacillus cereus (tossina diarroica)	*diarrea, dolori addominali*	*cibi precotti, non refrigerati e riscaldati inadeguatamente*
18 - 36 ore	*Clostridium botulinum (tossina preformata)*	*vertigini, mal di testa, diplopia, secchezza delle fauci*	*conserve a basso grado di acidità, sott'olio o sottovuoto o inadeguatamente sterilizzate*
12 - 72 ore	*Aeromonas hydrophila*	*diarrea, gastroenterite*	*pesci, crostacei, molluschi*
24 - 36 ore	*Yersinia enterocolitica*	*dolori addominali, febbre, cefalea, diarrea, vomito*	*carni crude o poco cotte, latte*
1 - 3 giorni	*Shigella*	*diarrea, feci con sangue, febbre, vomito, dolori addominali*	*crudi o manipolati dopo cottura*
	Vibrio cholerae	*diarrea acquosa, vomito, disidratazione*	*contaminati da acqua infetta, prodotti ittici crudi*
3 - 5 giorni	*Campylobacter jejuni e coli, E. coli EHEC*	*febbre, diarrea persistente, feci maleodoranti con sangue*	*carni crude o poco cotte, latte non pasteurizzato*

**Tabella desunta da "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.*

PREPARAZIONE INIZIALE DEL CAMPIONE

MATERIALE RICHIESTO

- *Frigorifero a 0/+2 °C*
- *Congelatore a -18 °C*
- *Bacinelle sterili*
- *Guanti monouso*
- *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.
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 le disposizioni di legge autorizzano il congelamento immediato del campione per bloccare la moltiplicazione batterica (DM 31/07/1995).
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 scongelare.
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).

Disinfettare sempre preventivamente la superficie del banco di lavoro.
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.
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.
Usare i guanti sterili monouso per aprire i prodotti confezionati.
Dare la precedenza, negli esami, ai prodotti meno contaminati (cotti) o più soggetti a contaminazione (alimenti da consumarsi tal quali).

NOTA: Il prelievo da 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.
Per le carni sotto pelle (ad es. pollame, pesci, ecc) la rilevazione delle cariche si esegue in profondità dalla massa muscolare, previa asportazione della pelle e bruciatura della superficie.
Per i formaggi a crosta non edibile, è necessario bruciare la superficie esterna e tagliare per prelevare a cuore.
Il prelievo da alimenti finalizzato alla rilevazione di patogeni e di sostanze inibenti si esegue dalla parte commestibile del prodotto.
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.
Quantificare la massa di materiale prelevato preferibilmente *in grammi*, 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), usando pinze e forbici o cucchiai sterili. Il sacchetto va posizionato aperto sulla bilancia all'ultimo momento.

ATTENZIONE!!
Per un'eventuale ripetizione del prelievo, conservare la parte rimanente del campione rimasta:
- ***in frigorifero a 0/+2 °C (se si tratta di uova, insaccati cotti o stagionati, formaggi stagionati);***
- ***in congelatore a -18 °C in tutti gli altri casi.***

Riferimenti bibliografici

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 - 111

DETERMINAZIONE DEL pH E DELL'Aw

MISURAZIONE DEL pH DEGLI ALIMENTI

Il controllo del pH può dare utili indicazioni sulla possibile proliferazione batterica nell'alimento in esame.

Normalmente la maggior parte degli alimenti non trattati ha un pH debolmente acido (carne 5,4-5,8; pesce 5,7-6,6; latte 6,8-7,0), mentre yogurt, verdure e frutta hanno pH acidi (da 3,7 a 4,5).

Per molti batteri il valore di pH 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 pH compresi tra 4,3 e 7,2.

In caso di proliferazione batterica, il pH 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.

Le prescrizioni di legge indicano come non deperibili gli alimenti con pH inferiore a 4,5.

MATERIALE RICHIESTO

- *pH-metro.*
- *soluzioni tampone per la calibratura dello strumento a pH 4 e a pH 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 fino al 10 - 20% di acqua distillata.
- Alimenti composti ➧ omogeneizzare separatamente ciascun componente e procedere come al punto precedente.
- Alimenti sott'olio ➧ eliminare la componente oleosa ed 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 pH 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 pH 7.

[1] *Utilizzare acqua distillata da poco e ciò al fine di evitare che abbia assorbito anidride carbonica dall'aria, mantenendola in recipienti di plastica (per evitare l'assorbimento di ioni dal vetro).*

MISURAZIONE DELL'ATTIVITÀ DELL'ACQUA (Aw) NEGLI ALIMENTI

Come 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" (Aw) di quel prodotto e tale parametro ha un valore compreso tra 0 e 1.

All'acqua viene assegnato un valore di Aw pari a 1.

Prodotti che contengono sostanze che legano l'acqua (ad es. sali, zuccheri) hanno valori di Aw tanto più bassi quanto più elevata è la concentrazione di tali sostanze leganti.

Ulteriori abbassamenti dell'Aw si possono ottenere mediante trattamenti fisici (surgelamento, affumicatura).

La maggior parte dei microrganismi cresce fino ad Aw di 0,92, mentre i lieviti sopportano valori di Aw fino a 0,87 e le muffe fino a 0,80.

I germi cosiddetti "alofili"o "alotolleranti"arrivano a crescere fino ad Aw di 0,60.

Alimenti con Aw 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 Aw inferiore a 0,85.

MATERIALE RICHIESTO

- *Analizzatore per Aw*
- *Soluzione standard per la calibratura dell'apparecchio*

PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

- Portare il campione ad 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 fare la lettura.

Il valore dell'Aw 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).

Nelle analisi ufficiali la misurazione del pH e dell'Aw viene utilizzata per riconoscere gli alimenti cosiddetti "deteriorabili", per i quali è prevista un'analisi immediata e, in caso di non conformità, una ripetizione d'analisi (nello stesso laboratorio) con le garanzie per la difesa previste dalla legge. Le norme per stabilire la non deteriorabilità degli alimenti sono contenute nel Decreto del Ministero della Sanità 16/12/1993 qui di seguito riportato nelle parti essenziali.

DECRETO DEL MINISTERO DELLA SANITÀ 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) Aw superiore a 0,95 e pH superiore a 5,2 oppure
2) Aw superiore a 0,91 oppure
3) pH 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, nonchè altrimenti 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 ad 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) Aw 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 ad 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 prodotto 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.

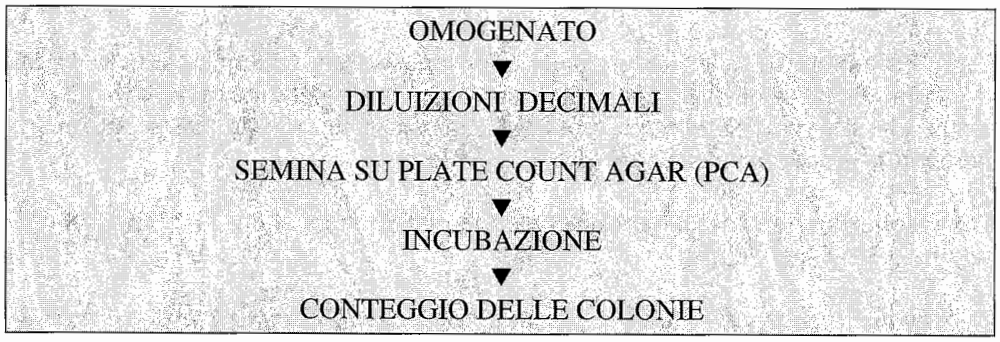
2. Per i prodotti alimentari di cui all'art. 1, per i quali l'accertamento della deteriorabilità viene effettuata in laboratorio e per i quali, in caso di conferma del carattere di deteriorabilità, non sarebbe possibile effettuare l'analisi di revisione secondo le modalità di cui all'art. 1 della legge 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 (pH) e dell'acqua libera (Aw).
   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.

CONTA BATTERICA TOTALE

DEFINIZIONE

La conta batterica totale (o carica batterica totale, abbrev. 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.*

➧ **Per alcuni tipi di alimenti la carica batterica totale è NORMATA (vedi Appendice).**



1. CONTA BATTERICA TOTALE MESOFILA

1.1 METODO DELLA CONTA STANDARD IN PIASTRA *(Pour Plate Method)*

MATERIALE RICHIESTO

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

ESECUZIONE

Preparare una sospensione iniziale del campione in esame nel sacchetto 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 ed aggiungere 100 grammi (=100 ml) di diluente. In questo modo si realizza una sospensione 1: 3 del prodotto.
Le operazioni di pesata del campione e di aggiunta del diluente possono essere fatte direttamente sulla bilancia tecnica, lavorando sterilmente.
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 eseguire le 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 terreno PCA fuso e raffreddato in bagnomaria alla temperatura di 44 - 46 °C.
Prima che il terreno solidifichi, ruotare ed 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 materiali molto contaminati, può risultare utile ricoprire il terreno seminato con un secondo strato del medesimo terreno (strato chiamato "overlay"). In pratica, dopo la solidificazione del terreno (che si ottiene 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 4° e in Appendice).

INTERPRETAZIONE

Prendere in considerazione la diluizione 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:

$$\text{CBT / g (ml, cmq)} = \frac{C}{D_1 \times D_2 \times V}$$

dove:
C = media numero colonie 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 alla diluizione 10^{-3} = 54 e 48, rispettivamente nelle due piastre.*
- *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:

$$\text{CBT / g (ml)} = \frac{51}{1/3 \times 10^{-3} \times 1} = 51 \times 3 \times 10^3 \times 1 = 153 \times 10^3 = 1{,}53 \times 10^5$$

Esempio 2
- *numero colonie alla diluizione 10^{-5} = 88 e 93, rispettivamente sulle due piastre.*
- *sospensione iniziale allestita con 20 g (20 ml) di campione e 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:

$$\text{CBT / g (ml)} = \frac{90}{1/6 \times 10^{-5} \times 1} = 90 \times 6 \times 10^5 = 5{,}4 \times 10^7$$

Esempio 3
- numero colonie alla diluizione 10^{-1} = 167 e 175, rispettivamente sulle due piastre.
- sospensione iniziale allestita con 40 cmq 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:

$$\text{CBT / cmq} = \frac{171}{2/5 \times 10^{-1} \times 1} = 171 \times 5/2 \times 10 = 171 \times 2{,}5 \times 10 = 4275$$

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 omogeneizzatore tipo Stomacher.
- Provettoni sterili.
- Pipette graduate sterili monouso.
- Soluzione diluente sterile di Ringer 1 / 4 concentrata o soluzione fisiologica sterile peptonata (sodio cloruro 0, 85 % + peptone 0,1 %).
- Piastre di Petri con terreno Plate Count Agar (PCA).

ESECUZIONE

Seguendo le indicazioni riportate per il metodo *Pour Plate,* preparare la sospensione iniziale del campione in esame e le diluizioni decimali ritenute necessarie.
Trasferire in doppio, dall'omogenato e da ogni successiva diluizione, 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.

Nel caso di alimenti a presunta bassa contaminazione (ad esempio: trattati termicamente), è consigliabile seminare 1 ml di omogenato, da ripartire almeno su due piastre (0,5 + 0,5 ml).
Le successive diluizioni possono venire sostituite dalla semina di altre due piastre, rispettivamente con 0,1 ml di omogenato per piastra.
Lasciare le piastre a temperatura ambiente per circa 30 minuti (per farle asciugare) e quindi porle ad incubare, capovolte, a 37 °C per 48 ore, oppure a 30 °C per 72 ore.

INTERPRETAZIONE

Prendere in considerazione la diluizione che, seminata sulle piastre, abbia dato luogo alla crescita di colonie in numero compreso fra 30 e 300.
Per le piastre seminate, rispettivamente, con 0,5 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:

$$\text{CBT / g (ml, cmq)} = \frac{C}{D_1 \times D_2 \times V}$$

dove:
C = numero colonie sulle due piastre
D_1 = diluizione introdotta nella preparazione dell'omogenato
D_2 = diluizione decimale dell'omogenato
V = volume inoculato sulle piastre (in ml)

1. 3 METODO DROP PLATE (Micrometodo)

MATERIALE RICHIESTO

- *Sacchetti sterili con filtro per omogeneizzatore tipo 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 di Ringer 1/4 concentrata sterile.*
- *Piastre Petri con 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, seguendo la tecnica della microdiluizione (20 microlitri di omogenato + 180 microlitri di Ringer 1/4 concentrato come diluente); le diluizioni successive si ottengono con il trasferimento di 20 microlitri in 180 microlitri di Ringer 1/4 concentrato.

Per le diluizioni usare, al posto dei provettoni, pozzetti di una piastra "Microtiter" sterile. Distribuire innanzitutto nei pozzetti necessari il diluente, usando la micropipetta da 200 mcl.
I passaggi da una diluizione a quella successiva vengono fatti con la micropipetta da 20 mcl, cambiando ogni volta il puntale.
Miscelare il contenuto dei pozzetti, prima di procedere alla diluizione successiva, usando la micropipetta da 200 mcl, aspirando e scaricando per 4-5 volte, cambiando sempre i puntali.

Suddividere le piastre di terreno PCA in 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 microlitri dell'omogenato e di ciascuna diluizione sul settore riservato.

Lasciare asciugare le piastre a temperatura ambiente per circa 30 minuti.
Porre le piastre - non capovolte - in termostato ad 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 dall'omogenato, rispettivamente 1 ml (da ripartire su almeno due piastre) e 0,1 ml.

INTERPRETAZIONE

Prendere in considerazione la diluizione 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:

$$\text{CBT / g (ml, cmq)} = \frac{C}{D_1 \times D_2 \times V}$$

dove:
C = media colonie presenti
D_1 = diluizione introdotta nella preparazione dell'omogenato
D_2 = diluizione decimale dell'omogenato
V = volume di materiale seminato sul settore della piastra (20 microlitri)

Esempio 1

- Numero colonie alla diluizione 10^{-1} = 10 e 14.
- Sospensione iniziale allestita con 50 g (50 ml) di campione e 100 ml di diluente.
- Volume di inoculo = 20 microlitri.

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 mcl (equivalenti a 1/50 di ml)

Sostituendoli nell'espressione, si ottiene il seguente risultato:

$$\text{CBT / g (ml)} = \frac{12}{1/3 \times 10^{-1} \times 1/50} = 12 \times 3 \times 10 \times 50 = 18.000$$

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.

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 successiva semina in piastre, ad una procedura di pasteurizzazione in laboratorio (riscaldamento in bagnomaria a +62,8 °C per 30 minuti).

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 ad un massimo di 5 colonie.
Colorare con Gram. 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 CBT elevata.

Tabella indicativa per la scomposizione della CBT nelle carni

esame microscopico	ricerca da effettuare	terreno	diluizioni consigliate	incubazione
bastoncini Gram +	lattobacilli	MRS Agar M 17 Agar	ND / 10^{-4} stesse diluizioni	37°C per 72 ore con 10% di CO_2 37°C per 48 ore
bastoncini Gram +	*Brochothrix thermosphacta*	STAA	ND / 10^{-4}	20°C per 48 ore
cocchi Gram +	micrococchi	MSA	ND / 10^{-4}	37°C per 48 ore
cocchi Gram +	lieviti	Sabouraud Dextrose Agar	ND / 10^{-4}	20°C per 5 gg
bastoncini Gram -	*Enterobacteriaceae*	VRBG Agar	ND / 10^{-4}	37°C per 24 ore
bastoncini Gram -	*Pseudomonas/ Aeromonas*	GSPA	ND / 10^{-4}	20°C per 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 ED ALLA PREPARAZIONE DELLE DILUIZIONI, NON VENGONO PIÙ DESCRITTE IN DETTAGLIO.

NOTA APPLICATIVA

Si richiede spesso la "conferma" delle colonie contate sulle piastre, soprattutto quando si usano terreni selettivi.
Nel caso che solo parte delle colonie possieda i requisiti per entrare nel conteggio, bisogna applicare il calcolo percentuale.
Esempio:

- Colonie sospette contate sulle piastre = 40.
- Trapiantate per "conferma" = 5.
- Accettate dopo prove varie 3 su 5 = 60%.
- Risultato del conteggio = 60% di 40 (24).

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

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

KRAMER J. A rapid microdilution technique for counting viable bacteria in food, Lab. Pract. 1977, 675 - 677

HAYES P.R. Food microbiology and hygiene, Elsevier Applied Science Publisher, London, 1985, 144 - 146 e 156 - 157

ICMSF Microrganisms in Food 1. Their significance and methods of enumeration, 2nd edition, University of Toronto Press, Toronto, 1988, 112-124

JAY J.M. Modern food microbiology, Van Nostrand Reinhold Company, New York, 1970, 272 - 287

RICHARDSON G.H. Standard methods for the examination of dairy products, 15th edition, American Public Health Association, Washington, USA, 190 - 191 e 194 – 197

ENTEROBACTERIACEAE

DEFINIZIONE

Batteri gram-negativi bastoncellari, aerobi, anaerobi-facoltativi, non sporigeni, ossidasi-negativi, che crescono in presenza di sali biliari e fermentano il glucosio.

➧ **Per alcuni tipi di alimenti la ricerca delle *Enterobacteriaceae* è NORMATA (vedi Appendice).**

OMOGENATO
▼
DILUIZIONI DECIMALI
▼
SEMINA SU VIOLET RED BILE GLUCOSE AGAR (VRBG)
▼
INCUBAZIONE A 37 °C per 24 ORE
▼
IDENTIFICAZIONE PRESUNTIVA E CONTEGGIO DELLE COLONIE DI *ENTEROBACTERIACEAE*
▼
CONFERMA MEDIANTE TRAPIANTO DI COLONIE SOSPETTE SU KLIGLER IRON AGAR
▼
INCUBAZIONE A 37 °C per 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 ad incubare a 37 °C per 24 ore (capovolte, tranne che per il *Drop Plate Method).*

INTERPRETAZIONE

Identificare come colonie di *Enterobacteriaceae* quelle di colore rosso scuro, diametro di 1 - 2 mm, circondate da 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 (+) del glucosio (= fondo della provetta giallo).

Da tali trapianti, inoltre, eseguire il *test* dell'ossidasi su dischetto, trasportando con l'ansa su un dischetto di carta bibula (bagnato con il reattivo per l'ossidasi) alcune ansate di patina colturale. Il *test* negativo (-) per le *Enterobacteriaceae* si desume dal colore invariato del dischetto (mentre reazioni positive danno viraggio di colore al viola entro 1 - 2 minuti).

Approntare inoltre 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 diametro 1-2 mm con alone rosso su VRBG
- Kligler con fondo giallo (glucosio +)
- ossidasi -
- bastoncini Gram -

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 - Ringbuch 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.
Al gruppo appartengono i generi: *Citrobacter, Enterobacter, Erwinia, Escherichia, Hafnia, Klebsiella, Serratia.*
I coliformi vengono inoltre suddivisi in: coliformi propriamente detti (o coliformi totali) e coliformi fecali.
I coliformi fecali 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.
L'*Escherichia coli,* attualmente 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.

➧ **Per alcuni tipi di alimenti la ricerca dei coliformi è NORMATA (vedi Appendice).**

NOTA

Nella presente metodica si fa riferimento esclusivamente alla ricerca dei coliformi propriamente detti (o coliformi totali) e si spiega perchè non è stata presa in considerazione la ricerca dei coliformi fecali.

OMOGENATO
▼
DILUIZIONI DECIMALI
▼
SEMINA SU VIOLET RED BILE AGAR (VRBA)
▼
INCUBAZIONE A 37 °C per 24 ORE
▼
IDENTIFICAZIONE PRESUNTIVA E CONTEGGIO DELLE COLONIE DI COLIFORMI
▼
CONFERMA MEDIANTE TRAPIANTO DI COLONIE SOSPETTE SU KLIGLER IRON AGAR
▼
INCUBAZIONE A 37 °C per 24 ORE
▼
PROVE BIOCHIMICHE DI CONFERMA

MATERIALE RICHIESTO

- *Come per la CBT mesofila, ad eccezione di piastre di 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).

Incubare a 37 °C per 24 ore le piastre capovolte (tranne per il *Drop Plate Method*).

INTERPRETAZIONE

Identificare come colonie di coliformi quelle di colore rosso scuro, diametro di almeno 0,5 mm 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 da Kligler ed 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 diametro superiore a 0,5 mm circondate da alone rosso su VRBA*
- *prove biochimiche di conferma favorevoli (gas + in brodo bile verde brillante a 30 °C per 24 ore con campana di Durham).*

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 4° e Appendice).

NOTA APPLICATIVA

La questione dei coliformi fecali: problematiche nella determinazione

Recenti ricerche hanno dimostrato 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 + gas a 44 °C) non sono sufficientemente selettivi.

Di conseguenza sarebbe necessario procedere, per una corretta collocazione tra i 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 dell'Escherichia coli (detto semplicemente "coli"), essendo questo microrganismo meglio definibile con i metodi a disposizione e più strettamente indicativo di contaminazione di origine fecale.

Per la ricerca dei coliformi fecali nelle acque si rimanda alle istruzioni riportate nel Capitolo 4° - Controlli su ambienti di lavorazione alimenti - Esame dell'acqua.

Riferimenti bibliografici

DIFCO MANUAL 10th edition, 1964, 1052 - 1054

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.

MONTI A. e Coll., Arch. Vet. It., 1995, 46, 206 - 221

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

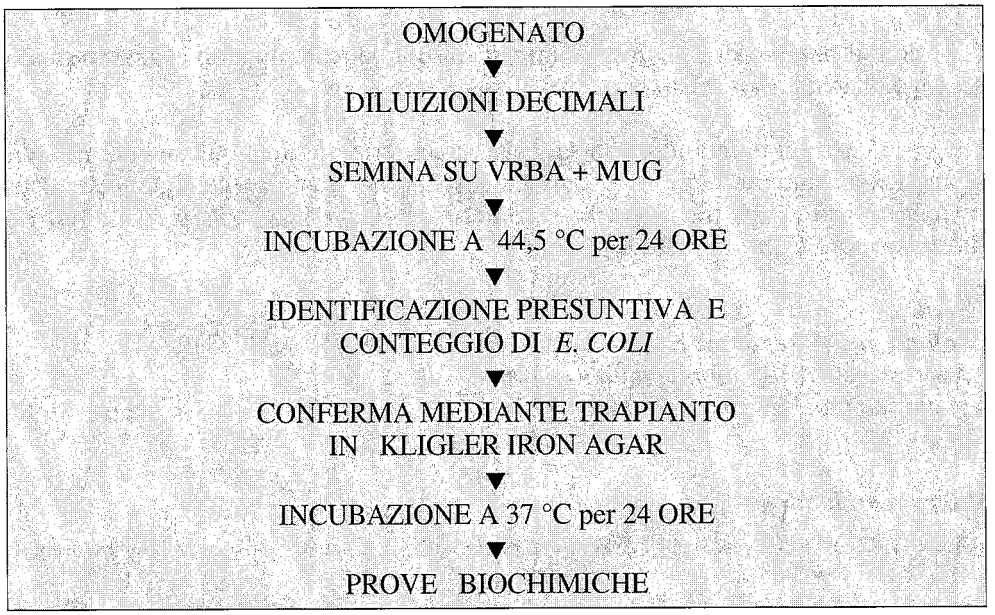
RICHARDS G.P. Comparative study of methods for the enumeration of total and fecal coliforms in the easter oyster, *Crassostrea virginica*. Appl. Environm. Microbiol., 1978, 36 (6), 975 - 978

ESCHERICHIA COLI

DEFINIZIONE

Bastoncini gram-negativi, aerobi, anaerobi-facoltativi, che sviluppano bene su terreni a +37 e a +44 °C, lattosio + e indolo+, mobili, comprendenti ceppi enteroinvasivi (EIEC) ed enterotossici (ETEC), capaci di produrre tossine termostabili e termolabili.
Si tratta di un patogeno opportunista e di un indicatore di contaminazione fecale nell'acqua e negli alimenti.

⧫ Per alcuni tipi di alimenti la ricerca dell'*E. coli* è NORMATA (vedi Appendice).



MATERIALE RICHIESTO

- *Come per il conteggio della carica batterica totale mesofila, ad eccezione di piastre Petri con terreno VRBA + MUG.*
- *Provette di terreno Kligler Iron Agar.*
- *Materiale per l'esecuzione dei 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.

Incubare a 44,5 °C per 24 ore le piastre capovolte (tranne per il *Drop Plate Method*).

INTERPRETAZIONE

Le colonie sospette di *E. coli* appaiono su VRBA + MUG a 24 ore di colore rosso con un alone rossastro e del diametro di 1-2 mm.
Si ritengono probabili colonie da *E. coli* se compare un alone di fluorescenza quando vengono osservate sotto una luce ultravioletta (luce di Wood a 366 nanometri).

Si contano le colonie rosse divenute fluorescenti sotto la luce di Wood e si procede alla conferma, mediante trapianto di almeno due colonie su Kligler Iron Agar.
Dopo incubazione dei Kligler a 37 °C per 24 ore, si utilizzano appropriati *test* biochimici predisposti per verificare l'appartenenza al genere *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 che non tutte le colonie saggiate si confermino biochimicamente *E. coli*, si applica al numero totale delle colonie sospette il calcolo percentuale (esempio: colonie sospette = 36; trapiantate = 3, confermate biochimicamente = 2 su 3 (66%); da considerare *E. coli* = 66% di 36 = 24).

E. coli
- colonie rosse con alone rosso diametro 1-2 mm su VRBA + MUG a 24 ore.
- fluorescenza delle colonie in luce di Wood.
- conferma biochimica.

Riferimenti bibliografici

HAHN G. Fluoressenzoptischer Nachweis von *Escherichia coli* aus Weichkase, Milchwissenschaft, 1987, 42, (7), 434 - 438

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

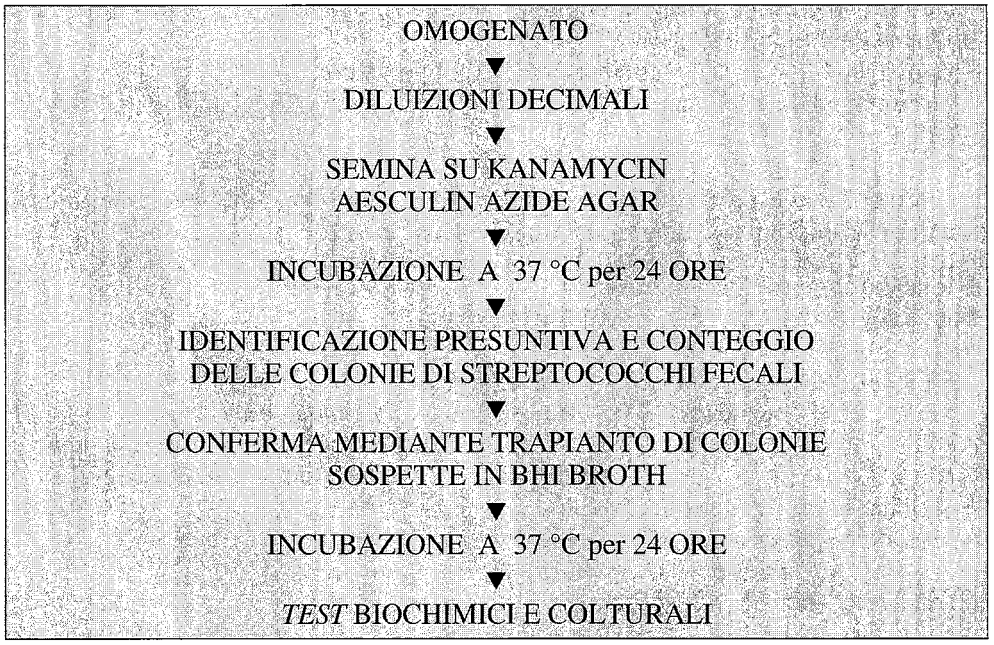
TREPETA R.W., EDBERG S.C. Methylumbelliferil - beta - D- glucuronide based medium for rapid isolation and identification of *Escherichia coli* J.Clin. Microbiol. 1984, 19, (2), 172 - 174

STREPTOCOCCHI FECALI

DEFINIZIONE

Cocchi gram-positivi non sporigeni, tendenti a disporsi in catene e a decolorarsi, anaerobi aerotolleranti.
Sono chiamati anche Enterococchi ed appartengono al gruppo sierologico D degli Streptococchi.
Specie principali: *E. faecalis* e *E. faecium*. La classificazione di questi germi è tuttora controversa.
Sono di origine intestinale (vedi anche NOTA APPLICATIVA a fine capitolo).

➧ **Per alcuni tipi di alimenti la ricerca degli streptococchi fecali è NORMATA (vedi Appendice).**



MATERIALE RICHIESTO

- *Come per la carica batterica totale mesofila, ad eccezione di piastre Petri di terreno Kanamycin Aesculin Azide agar.*
- *Provette di terreno Brain Hearth Infusion Broth (BHI).*
- *$H_2 O_2$ al 3% per test della catalasi.*
- *Materiale per l'esecuzione dei 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, utilizzando come terreno colturale il Kanamycin Aesculin Azide agar.
Incubare a 37 °C per 24 ore le piastre capovolte (tranne 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 alle prove suddette, confermare l'identificazione mediante allestimento di appropriati *test* biochimici (v. schema seguente):

I - arabinosio- e arginina diidrolasi-
◗ PYRA- ◗ PAL - ◊ *E. saccharolyticus*
PAL + ◊ *E. cecorum*
PYRA+ ◗ pigmento giallo + ◊ *E. sulfureus*
pigmento giallo - ◗ raffinosio + ◊ *E. malodoratus*
sorbosio + ◊ *E. pseudoavium*
sorbosio - ◊ *E. asini*

I - arabinosio+ e arginina diidrolasi+
◗ mannitolo+ ◗ ribosio + ◊ *E. faecalis*
ribosio - ◊ *E. solitarius*
◗ mannitolo- ◗ αGLUC+ ◊ *E. dispar*
αGLUC- ◗ αGAL + ◊ *E. irae*
αGAL - ◊ *E. durans*

I - arabinosio+ e pigmento giallo-
◗ sorbosio+ ◗ saccarosio + ◊ *E. raffinosus*
saccarosio - ◊ *E. avium*
sorbosio- ◗ PYRA- ◊ *E. columbae*
PYRA+ ◗ αGLUC + ◊ *E. gallinarum*
αGLUC - ◊ *E. faecium*

I - arabinosio+ e pigmento giallo+
◗ ribosio - ◊ *E. flavescens*
ribosio + ◗ αGLUC+ ◊ *E. casseliflavus*
αGLUC- ◊ *E. mundii*

PYRA = *pirrolidonil-aminopeptidasi* αGAL = *α-galattosidasi* αGLUC = *metil-α-D-glucopiranoside*

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 mmicron) e successiva coltivazione della membrana su piastra di terreno KF-Streptococcus Agar (vedi Capitolo 4° - 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.
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

ICMSF Microrganisms in food 1. Their significance and methods of enumeration. 2nd edition, University of Toronto Press, Toronto, 1988, 144 - 148

MANERO A. - BLANCH A.R. Identification of *Enterococcus* with a Biochemical Key, Appl. Environm. microbiol. 1999, 65, 4425-4430.

OXOID MANUAL, 6th edition, 1990, 2. 118 - 2. 119

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).*
Formano acido lattico (omofermentanti) oppure acido lattico e altri metaboliti (eterofermentanti).
Sono utilizzati per la produzione di alimenti fermentati (derivati del latte) e conservati (prodotti di carne).

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.
Per alcuni tipi di alimenti la ricerca dei lattobacilli è NORMATA (vedi Appendice).

OMOGENATO
▼
DILUIZIONI DECIMALI
▼
SEMINA SU MRS AGAR
E SU M17 AGAR
▼
INCUBAZIONE :
MRS A 37 °C + 10 % CO_2 per 72 ORE
M 17 A 37 °C per 48 ORE
▼
IDENTIFICAZIONE E CONTEGGIO DELLE
COLONIE DI LATTOBACILLI

MATERIALE RICHIESTO

- *Come per la carica batterica totale mesofila, ad eccezione di Piastre Petri di terreno MRS Agar e di piastre di terreno M 17 Agar. Qualora non si disponesse di un termostato a CO_2, sistema generatore di gas (6 % O_2 - 10 % CO_2) o buste per microaerofilia.*

ESECUZIONE

Lattobacilli mesofili

Eseguire il conteggio in piastra, applicando uno dei metodi di semina descritti per la conta batterica totale e utilizzando i terreni colturali MRS ed M 17, seguendo le modalità di incubazione sopra riportate.

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 M 17 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

Sono da prendere in considerazione le colonie con diametro di 0,5 - 1 mm (o più), opache, incolori o biancastre, con margini regolari o frastagliati, consistenza omogenea o leggermente granulare.

Queste colonie sono da contare come probabili *lattobacilli (= bastroncini gram-positivi).*

Terreno M17

Sono da prendere in considerazione le colonie piccole, del diametro di 0,2 - 0,5 mm, biancastre, 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 ed i lattococchi, anche se su MRS solitamente prevalgono i bacilli e su M 17 prevalgono i cocchi.
I due generi sono differenziabili dalle dimensioni delle colonie (vedi sopra) e successivamente dall'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 M 17).

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*) ed il

numero dei cocchi gram -positivi (lattococchi, come lo *Streptococcus thermophilus*).

Per il conteggio del *Bifidobacterium bifidum* nello *yogurt* è necessario ricorrere ad 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 un diametro superiore a 0,5 mm, mentre lattobacilli ed enterococchi formano colonie di diametro nettamente inferiore.

Una chiave di identificazione biochimica (adatta per i più frequenti lattobacilli omofermentanti reperibili nei prodotti caseari) che permette di ridurre all'essenziale il numero delle prove (una prova di crescita su MRS Agar e cinque *test* di fermentazione di carboidrati) è la seguente:

Prove biochimiche semplificate per la differenziazione di lattobacilli omofermentanti (10 specie tra le più frequenti nei prodotti caseari)

❶ Sviluppa a +15°	raffinosio +	◗ *L. casei*		
	raffinosio -	◗ *L. plantarum*		
❷ Non sviluppa a +15°				
① amigdalina +	◊ melecitosio +	◗ *L. leichmanii*		
	◊ melecitosio -	◊ lattosio +	◗ *L. acidophilus*	
		◊ lattosio -	◗ *L. jensenii*	
② amigdalina -	◊ lattosio -	◗ *L. delbrueckii*		
	◊ lattosio +	◊ maltosio -	◗ *L. bulgaricus*	
		◊ maltosio +	◊ mannitolo +	◗ *L. salivarius*
			◊ mannitolo -	◊ salicina + ◗ *L. lactis*
				◊ salicina - ◗ *L. helveticus*

❶❷ Prova di crescita su MRS Agar incubato a + 15 °C (=temperatura ambiente) in microaerofilia (+5% di anidride carbonica) per 48 ore.

①② Prove di fermentazione dei carboidrati in brodo + 0,5% di zucchero con incubazione a 37 °C per 48 ore.

Riferimenti bibliografici

NOBRA Y. - BLANCH A.R. A new selective medium for *Bifidobacterium spp.* (1999) Appl. Environm. Microbiol., *65,* 5173 - 5176

RICHARDSON G.H. Standard methods for the examination of dairy products, 15th edition, APHA, Washington, USA, 1985

TIECCO G. Microbiologia degli alimenti di origine animale, 5a. ed., Edagricole, Bologna, 1992

DIAGNOSTIC PASTEUR MANUAL. Microbiology-Immunology. 3rd edition, 1991, 49 - 50
OXOID MANUAL &th edition, 1990, 2.185 - 2.186

STAFILOCOCCHI COAGULASI - POSITIVI

DEFINIZIONE

Cocchi gram-positivi, immobili, raggruppati in corte catene, aerobi, anaerobi-facoltativi, produttori di pigmento giallo in coltura dopo alcuni giorni a temperatura ambiente, catalasi-positivi, ossidasi-negativi, emolitici, forniti di particolari enzimi (tra cui coagulasi, termonucleasi), sensibili alla lisostafina e al furazolidone, resistenti al lisozima e alla bacitracina, con metabolismo ossido-fermentativo sul glucosio, mannitolo-positivi.

➧ **Per alcuni tipi di alimenti la ricerca degli stafilococchi coagulasi - positivi è NORMATA (vedi Appendice).**

Scheda sintetica

ATTIVITA' PATOGENA	*responsabili di tossinfezioni*
ALIMENTI RESPONSABILI	*prodotti di gastronomia, dolci, piatti cotti pronti manipolati 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*
ATTIVITA' 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 tossinfezione è la dimostrazione della tossina preformata nell'alimento sospetto.

MATERIALE RICHIESTO

- *Come per la conta batterica totale mesofila, ad eccezione di piastre Petri di terreno Baird-Parker agar, addizionato di Egg Yolk Tellurite Emulsion.*
- *Provette di terreno Brain Hearth Infusion Broth (BHI).*
- *Plasma di coniglio con EDTA per test della coagulasi.*
- *Provette sterili 10 × 120 mm per test della coagulasi.*
- *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.
Incubare a 37 °C per 48 ore le piastre capovolte.

INTERPRETAZIONE

Identificare come colonie di *S. aureus* quelle di colore nero, diametro di 1 - 1,5 mm, superficie liscia e lucente, margini regolari, che appaiono circondate da un alone chiaro.
Confermare l'identificazione mediante trapianto di un numero significativo di colonie sospette in brodo BHI, seguito da incubazione a 37°C per 24 ore e colorazione di Gram.
Dai trapianti positivi, eseguire il *test* della coagulasi, per il quale si fa riferimento alla metodica FDA (plasma di coniglio con EDTA ml 0,5 + brodocoltura di 24 ore 0,2 - 0,3 ml; incubazione a 37 °C per 6 ore, *esito positivo uguale a formazione di un coagulo stabile e completo).*
Parallelamente si può completare l'identificazione mediante allestimento di appropriati *test* biochimici.
Calcolare il numero di stafilococchi coagulasi-positivi per unità di misura del campione in maniera analoga alla conta batterica totale mesofila.

NOTA

Può essere necessario ricorrere al calcolo percentuale delle colonie contate su Baird-Parker Agar dopo aver effettuato le opportune "conferme".
Vedere la NOTA APPLICATIVA riportata nella conta batterica totale mesofila.

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, 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

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.
Hanno una temperatura ottimale di sviluppo intorno ai 25 - 30 °C, non sono patogeni, possono causare (se in elevato numero) alterazioni su carni e insaccati (viscosità superficiale).

➧ La ricerca dei micrococchi NON È NORMATA.

OMOGENATO
▼
DILUIZIONI DECIMALI
▼
SEMINA SU MANNITOL SALT AGAR
▼
INCUBAZIONE A 37 °C per 36 ORE
O 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.

Incubare le piastre capovolte a 37 °C per 36 ore o a 32 °C per 3 giorni.

INTERPRETAZIONE

Identificare come colonie di micrococchi quelle con diametro di 1 - 2 mm che appaiono circondate da 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.

NOTA

I micrococchi (germi non patogeni) sono tra i principali microrganismi responsabili delle alterazioni superficiali delle carni. È noto che subito dopo la macellazione la contaminazione microbica nelle carni è di norma modesta in superficie (10^2 - 10^4 / cmq) ed assente in profondità. Valori sensibilmente superiori fanno sospettare problemi igienici. Se conservate in frigorifero, le carni possono raggiungere una carica di 10^5 - 10^6 germi per grammo senza denunciare alterazioni organolettiche. Le variazioni sono minori in caso di congelamento o di confezionamento sotto vuoto oppure in atmosfera modificata.
Per queste ragioni, quando si trova una carica batterica elevata (> 10^6/grammo), sarebbe opportuno fare un'analisi dettagliata per specie (vedi nota "ULTERIORI RICERCHE" nella conta microbica totale mesofila).
I risultati della "scomposizione", abbinati all'esame ispettivo, consentono di valutare processi alterativi incipienti e di fare previsioni sulla conservabilità.

Le specie più indiziate come causa di alterazioni, accanto ai micrococchi, sono le seguenti:

1- Per viscosità superficiale = *Pseudomonas,* micrococchi, lieviti.
2- Per colorazioni anomale = lattobacilli (inverdimento), *Pseudomonas* (pigmentazioni bluastre), muffe e lieviti (macchie bianche, nere, verdi).
3- Per odori e sapori sgradevoli = *Brochothrix thermosphacta,* lattobacilli, enterobatteri.

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

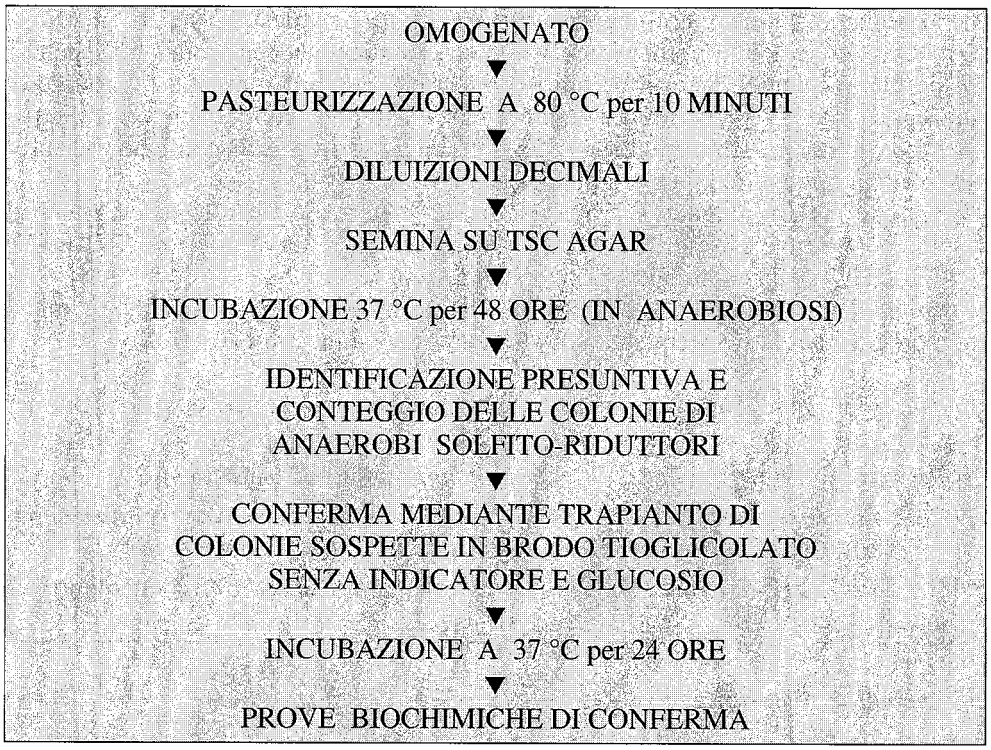
HAYES, P.R. Food Microbiology and hygiene, Elsevier Applied Science Publishers, London, 1985, 157 - 158

ANAEROBI SOLFITO - RIDUTTORI (SPORE)

DEFINIZIONE

Bacilli gram-positivi, sporigeni, anaerobi, capaci di ridurre i solfiti a solfuri (di colore nero).
Genere principale: *Clostridium.* Patogeni facoltativi, spesso sono responsabili di alterazioni putrefattive.

- **Per alcuni tipi di alimenti la ricerca delle spore di anaerobi solfito - riduttori è NORMATA (vedi Appendice).**



MATERIALE RICHIESTO

- *Come per la conta batterica totale mesofila, ad eccezione di piastre Petri di terreno TSC agar (contenente cicloserina e senza aggiunta 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 dei test biochimici necessari per l'identificazione di specie degli anerobi solfito-riduttori.*

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.

Dopo solidificazione dello strato superficiale del terreno, porre le piastre capovolte ad incubare, in anaerobiosi, a 37 °C per 48 ore.

INTERPRETAZIONE

Identificare come colonie di anaerobi solfito-riduttori quelle di colore nero, diametro di 3 - 7 mm, 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.
Segue la colorazione di Gram e l'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.

NOTA - La ricerca delle spore di anaerobi solfito-riduttori (o Clostridi solfito-riduttori) nelle acque e acque minerali, da eseguire sulle quantità prescritte in Appendice, si effettua mediante la tecnica illustrata nel Capitolo 4° - Controlli su ambienti di lavorazione alimenti - Analisi 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, eliminate con il trattamento termico.
A causa della flora inquinante (spesso prevalente negli alimenti), sarebbe difficoltoso senza il trattamento di pasteurizzazione individuare i Clostridi, ragione sufficiente per preferire il sistema del riscaldamento a 80 °C per 10 minuti.

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, 17.01 - 17.10

ICMSF Microrganisms in foods 1. Their significance and methods of enumeration, 2nd edition, University of Toronto Press, Toronto, 1988, 264 - 273

CLOSTRIDIUM PERFRINGENS

DEFINIZIONE

Bastoncini gram-positivi, sporigeni, capsulati, anaerobi, 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 della tossinfezione da Cl. perfringens, viene adottata la procedura sotto riportata, che prevede la ricerca nel campione sia delle cellule vegetative che delle spore - separatamente - con notevoli analogie, peraltro, rispetto alla diagnosi quantitativa delle spore di anaerobi solfito - riduttori.

➧ **Per alcuni tipi di alimenti la ricerca del *Clostridium perfringens* è NORMATA (vedi Appendice).**

Scheda sintetica

ATTIVITA' 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*
ATTIVITA' 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
La diagnosi di laboratorio è confermata dal ritrovamento di almeno 10^5 forme vegetative di *Cl. perfringens* per grammo di alimento sospetto.
Sono inoltre da ritenere significativi per sospetta tossinfezione alimentare da *Cl. perfringens* conteggi di spore superiori a 10^6 / g di feci.

OMOGENATO
▼
DIVISIONE IN DUE ALIQUOTE
▼
PRIMA PROVETTA = DA NON RISCALDARE
SECONDA PROVETTA = DA RISCALDARE A 80 °C per 10 MINUTI
▼
DILUIZIONI DECIMALI DA ENTRAMBE
LE PROVETTE
▼
SEMINA SU TSC AGAR +
EMULSIONE DI TUORLO D'UOVO
▼
INCUBAZIONE A 37 °C per 48 ORE
IN ANAEROBIOSI
▼
IDENTIFICAZIONE PRESUNTIVA E
CONTEGGIO DELLE COLONIE SOSPETTE
▼
CONFERMA MEDIANTE TRAPIANTO DI
COLONIE SOSPETTE IN BRODO TIOGLICOLATO
SENZA INDICATORE E SENZA GLUCOSIO OPPURE CMM
▼
INCUBAZIONE A 37 °C per 24 ORE
▼
PROVE DI CONFERMA PER
CLOSTRIDIUM PERFRINGENS

MATERIALE RICHIESTO

- *Come per conta batterica totale mesofila, ad eccezione di piastre di terreno TSC contenente cicloserina, addizionato all'8% di emulsione di tuorlo d'uovo 50%. Dovrà essere inoltre prevista una sufficiente quantità di terreno TSC + cicloserina (senza aggiunta di emulsione di tuorlo d'uovo) da mantenere fuso a circa 50 °C in bagnomaria termostatato, necessaria 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 di Brodo CMM.*
- *Provette di terreno Litmus Milk.*
- *Piastre di Agar sangue (sangue defibrinato di montone al 5%).*
- *Materiale necessario per l'esecuzione di test biochimici per l'identificazione di Cl. perfringens.*

ESECUZIONE

Dall'omogenato dispensare due aliquote equivalenti in altrettante provette.
La prima provetta è destinata al conteggio delle forme vegetative e non va trattata.
La seconda provetta è destinata al conteggio delle spore e va riscaldata in bagnomaria a 80 °C per 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,* 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 *Cl. perfringens* quelle di colore nero, diametro di 3 - 7 mm, margini regolari con alone chiaro circostante, provocato dall'azione dell'enzima lecitinasi sull'uovo contenuto nel terreno.

Confermare l'identificazione presuntiva mediante trapianto di una o più colonie in altrettante provette di terreno Brodo tioglicolato senza indicatore e senza glucosio oppure 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*) ed 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 ed il numero di spore di *Cl. perfringens* per unità di misura del campione in esame in maniera analoga alla conta batterica totale mesofila.

Allestimento del test Reverse CAMP

Seminare lungo il diametro di una piastra di Agar sangue un'ansata di brodocoltura di *Str. agalactiae* (sviluppato a 37 °C per 24 ore) e quindi, perpendicolarmente allo streptococco, alla distanza di circa 2 - 3 mm, strisciare 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 *Cl. 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 dello *Str. agalactiae* e quella del sospetto *Cl. perfringens* si forma una zona di emolisi chiara e completa a forma di punta di freccia rovesciata.

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, 17.01 - 17.10

BENTLER W. (1981) Fleischwirtschaft, 61, 1686 - 1688

EISGRUBER H e Coll. (1987) Arch.Lebens., 38, 121

SCHALCH B. e Coll. (1995) Fleischwirtschaft, 75, 1018

BACILLUS CEREUS

DEFINIZIONE

Bastoncini gram-positivi di notevoli dimensioni (3 - 5 mmicron) con spore ovali centrali o sub-terminali, aerobi, anaerobi-facoltativi, mobili.
In coltura si può confondere con altri bacilli (esempio: *B. anthracis*).
La ricerca del *Bacillus cereus* NON È NORMATA.

Scheda sintetica

ATTIVITA' 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*
ATTIVITA' 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	*1 - 6 h (sindrome emetica)* *12 - 24 h (sindrome diarroica)*
SINTOMI	*vomito, diarrea, dolori addominali*
INDAGINI DI LABORATORIO	*conta del microrganismo nell'alimento sospetto e conta 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.

OMOGENATO
▼
DILUIZIONI DECIMALI
▼
SEMINA SU CEREUS SELECTIVE AGAR
▼
INCUBAZIONE A 30 °C per 18 - 24 ORE
▼
IDENTIFICAZIONE E CONTEGGIO DELLE COLONIE DI *BACILLUS CEREUS*

MATERIALE RICHIESTO

- *Come per conta batterica totale mesofila, ad eccezione di piastre Petri di terreno Cereus Selective Agar addizionato con Egg Yolk Emulsion e con Supplemento 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 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 sono formate da *B. cereus*, eseguire le seguenti prove di identificazione:
- striscio e Gram (bacilli gram-positivi)
- riduzione dei nitrati (+)
- 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 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, 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.*
- *Asciugare con carta assorbente.*

- *Coprire lo striscio con safranina per 20 secondi.*
- *Lavare in acqua, asciugare con carta assorbente.*

*Per preparare l'alcool etilico al 70%:
alcool etilico al 95% ml 100, acqua distillata ml 35,7.

**Per preparare la soluzione di Sudan nero B:
Scaldare fino all'ebollizione ml 100 di alcool 70% e aggiungere 1 gr di Sudan nero B
Mettere la soluzione in termostato a 37 °C per 3 giorni.
Prelevare per la colorazione la parte soprastante.

LETTURA
Le cellule vegatative di *B. cereus* sono generalmente della lunghezza di 4 - 5 millimicron e della larghezza di 1 - 1,5 millimicron. Si presentano con estremità squadrate, spore verdi in posizione centrale o para-centrale, granuli lipidici neri e citoplasma rosso.

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 ed asciugare con carta assorbente.*

LETTURA
I cristalli parasporali si presentano in 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. cereus var. mycoides, B. anthracis).*

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, 16.01 - 16.08

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

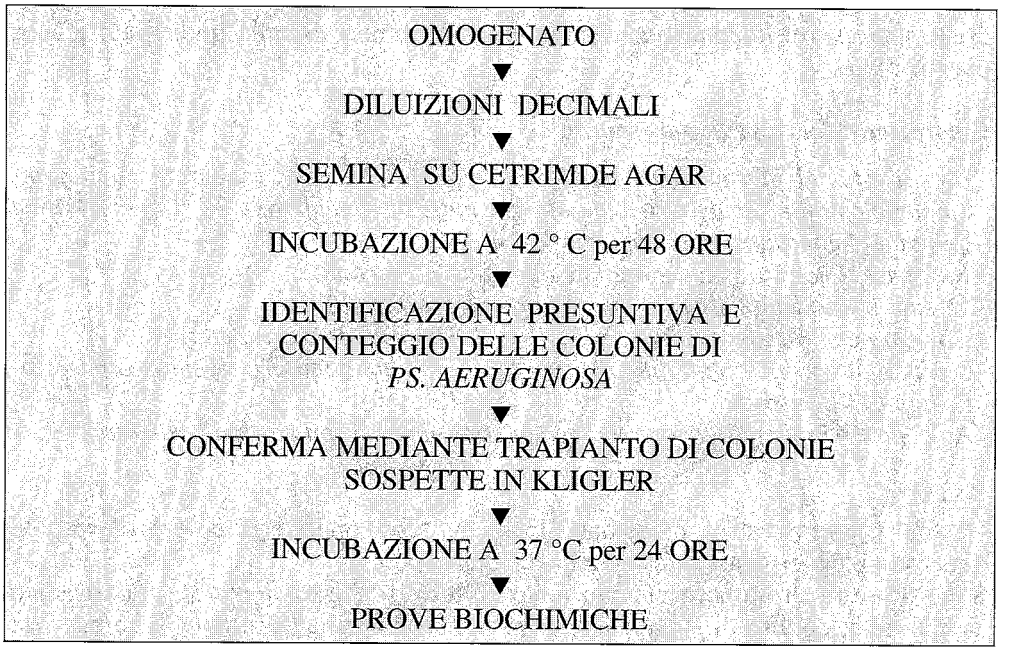
HOLBROOK R. e Coll. (1980) Can. J. Microbiol., *26*, 753 - 759

PSEUDOMONAS AERUGINOSA

DEFINIZIONE

Bastoncini gram-negativi, mobili, aerobi, catalasi e ossidasi positivi, produttori di pigmento verde.
Temperatura di sviluppo ottimale +37 °C, con intervallo da +4 a +43 °C.
Si tratta di un patogeno occasionale (causa vomito, diarrea, sepsi) assai temuto nelle infezioni ospedaliere.

Per alcuni tipi di alimenti la ricerca di *Pseudomonas aeruginosa* è NORMATA (vedi Appendice).



MATERIALE RICHIESTO

- *Come per conta batterica totale mesofila, ad eccezione di piastre Petri di terreno Cetrimide Agar, addizionato con glicerolo 1%.*
- *Provette di terreno Kligler Iron Agar.*
- *Materiale per l'esecuzione delle 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 (vedi Appendice), si effettua 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 *Ps. 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.
Calcolare il numero di *Ps. aeruginosa* per unità di misura del campione in esame in maniera analoga alla conta batterica totale mesofila.

Riferimenti bibliografici

MERCK Microbiology Manual, E.Merck, Darmsatdt, 1991, 168 - 169

AEROMONAS HYDROPHILA

DEFINIZIONE

Bastoncini gram-negativi, mobili, aerobi, anaerobi-facoltativi, psicrofili, ossidasi negativi, patogeni opportunisti.

- **Per alcuni tipi di alimenti la ricerca di *Aeromonas hydrophila* È NORMATA (vedi Appendice).**

Scheda sintetica

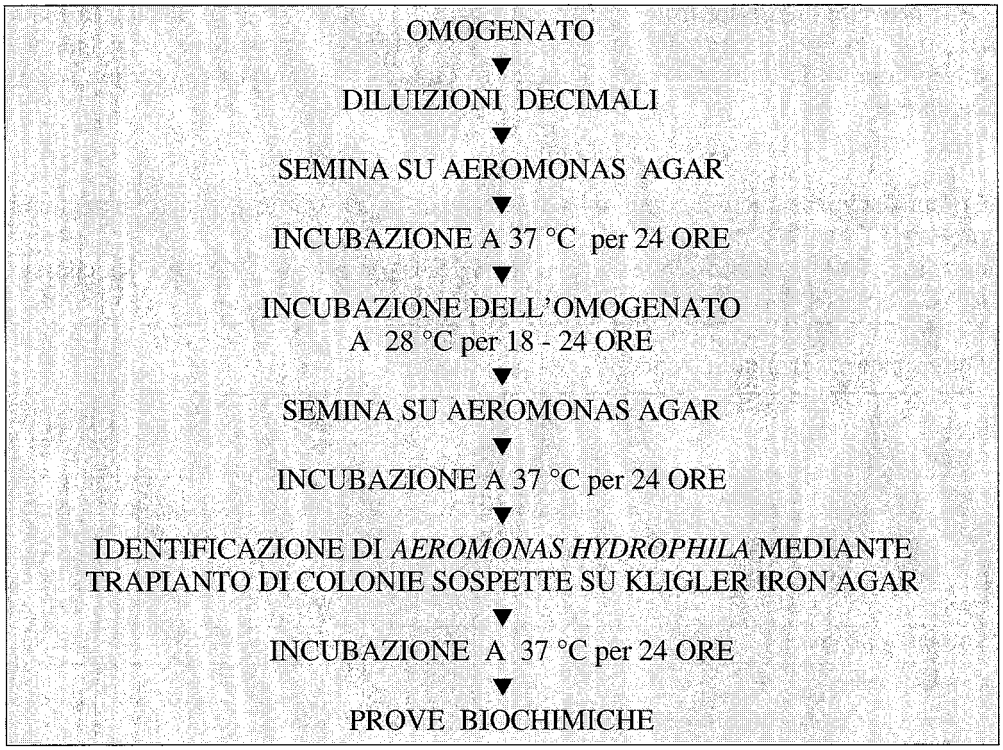
ATTIVITA' PATOGENA	*agente eziologico di tossinfezioni*
ALIMENTI RESPONSABILI	*acqua, insalate, carni, prodotti ittici, gelati, creme, torte alla crema, piatti freddi, lumache, rane*
TEMPERATURA DI MOLTIPLICAZIONE	*da 4 a 42 °C con optimum a 28° C*
pH DI SVILUPPO	*4,5 - 8,8 con optimum da 6,5 a 7,2*
ATTIVITA' 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*

MATERIALE RICHIESTO

- *Come per conta batterica totale mesofila, ad eccezione di:*
- *Soluzione diluente Acqua Peptonata Alcalina (vedi formule terreni e soluzioni).*
- *Piastre di terreno Aeromonas Agar, addizionato con Supplemento Aeromonas.*
- *Provette di Kligler Iron Agar.*
- *Dischetti per test dell'ossidasi.*
- *Materiale per l'esecuzione dei test biochimici necessari per l'identificazione di Aeromonas hydrophila.*

ESECUZIONE

Preparare una sospensione iniziale del campione in esame nel sacchetto 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 con l'omogenato a 28 °C per 18 - 24 ore.

Al termine dell'incubazione dell'omogenato, trasferire, in doppio, 0,1 ml di materiale su due piastre di Aeromonas Agar, da incubare a 37 °C per 24 ore.

NOTA - La ricerca di *Aeromonas hydrophila* nelle acque minerali, da eseguirsi su 100 ml (vedi Appendice), si effettua mediante filtrazione del campione su membrana di acetato di cellulosa (porosità 0,45 mmicron) e successiva coltivazione della medesima su piastra di Aeromonas Agar con le stesse modalità.

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 altret-

tante provette di Kligler Iron Agar (da incubare a 37 °C per 24 ore). Da tali trapianti, procedere ad un *test* dell'ossidasi su dischetto (-), approntare un preparato microscopico da colorare con il metodo di Gram (-) ed eseguire appropriati *test* biochimici.

Con una sospensione del ceppo in soluzione fisiologica sterile seminare le seguenti prove:
esculina (ESC), indolo (IND), glucosio (GLUC), arabinosio (ARA), saccarosio (SAC), Voges-Proskauer (VP), cefalotina (CF 30)*.
Incubare a +37 °C per 18 ore.
Differenziare secondo lo schema:

Aeromonas	ESC	IND	GLUC	ARA	SAC	VP	CF 30*
hydrophila	+		+	+			+
caviae	+		-				
jandaei	-	+			-	+	
schubertii	-	-					
trota	-	+				-	
veronii (sobria)	-	+			+	+	
veronii (veronii)	+		+	-			-

* striscio su piastra di Mueller-Hinton Agar con dischetto di cefalotina da 30 mcg
+ = sensibile
- = resistente

Riferimenti bibliografici

CARNAHAN A.M. e Coll. Aerokey II: a flexible Key for Identifying Clinical *Aeromonas* Species, J. Clin. Microbiol., 1991, 29, 2843 - 2849.

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

OXOID MANUAL, 6th edition

BROCHOTHRIX THERMOSPHACTA

DEFINIZIONE

Bastoncini gram-positivi non sporigeni, aerobi, anaerobi-facoltativi, psicrofili, non patogeni, causa di degradazione delle carni se in elevato numero.
➧ La ricerca di *Brochothrix thermosphacta* NON È NORMATA.

OMOGENATO
▼
DILUIZIONI DECIMALI
▼
SEMINA SU STA AGAR
▼
INCUBAZIONE A 20 - 25 °C per 48 ORE
▼
IDENTIFICAZIONE PRESUNTIVA E CONTEGGIO DELLE COLONIE DI *BROCHOTHRIX THERMOSPHACTA*
▼
CONFERMA MEDIANTE TRAPIANTO DI COLONIE SOSPETTE IN TSA + 0,6% DI ESTRATTO DI LIEVITO
▼
INCUBAZIONE A 20 - 25 °C per 48 ORE
▼
PROVE BIOCHIMICHE

MATERIALE RICHIESTO

- *Come per la carica batterica totale mesofila, ad 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 ai fini dell'identificazione di Brochothrix thermosphacta.*

ESECUZIONE

Eseguire una conta in piastra applicando uno dei metodi di semina descritti per la conta batterica totale, 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 mediante piastratura su Agar sangue, dopo 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

PETERZ M. Evaluation of methods for enumeration of *Brochothrix thermosphacta* in foods. J. Assoc. Off. Anal. Chem. Int., 1992, 75 (2), 303 - 306

LISTERIA MONOCYTOGENES

DEFINIZIONE

- *Vedi capitolo 3° - Listeria monocytogenes - Ricerca qualitativa.*
- **Per alcuni tipi di alimenti la ricerca quantitativa di *L. monocytogenes* è NORMATA (vedi Appendice).**

METODI QUANTITATIVI

1. METODO MPN (= Most Probable Number, Numero Più Probabile)

OMOGENATO
▼
DILUIZIONI DECIMALI
▼
SEMINA IN BRODO D'ARRICCHIMENTO
(FRASER OPPURE LEB)
SECONDO LO SCHEMA A 3 PROVETTE
▼
PIASTRATURA SU OXFORD AGAR O PALCAM AGAR
▼
IDENTIFICAZIONE DELLE COLONIE DI *LISTERIA MONOCYTOGENES*
MEDIANTE TRAPIANTI IN TSA + 0,6% DI ESTRATTO DI LIEVITO
▼
INCUBAZIONE A 37 °C per 24 ORE
▼
PROVE BIOCHIMICHE
▼
CONTEGGIO MEDIANTE APPLICAZIONE
DELLE TABELLE MPN

1. METODO MPN

1.1 Metodo MPN secondo l'Ordinanza Ministeriale 7 dicembre 1993

Per il metodo di conteggio MPN previsto dall'Ordinanza Ministeriale 7 dicembre 1993 (G.U. n. 291 del 13.12.1993) si rimanda al capitolo dei Metodi Ufficiali.

1.2 Metodo MPN secondo JEMMI (1990)

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 con filtro 10 grammi del campione in esame ed 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 *(vedere spiegazioni nel Capitolo 3°)*

Dopo incubazione, seminare tutte le provette 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 ore.

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 dello 0,6 % di estratto di lievito e successiva esecuzione delle prove indicate 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 in ciascuna delle tre diluizioni):

Tabella dell'MPN per ricerca quantitativa *della 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 / grammo)

OMOGENATO

▼

DILUIZIONI DECIMALI

▼

SEMINA SU OXFORD AGAR
O PALCAM AGAR

▼

INCUBAZIONE A 37 °C per 24 - 48 ORE

▼

IDENTIFICAZIONE PRESUNTIVA E CONTEGGIO
DELLE COLONIE DI *L. MONOCYTOGENES*

▼

CONFERMA MEDIANTE TRAPIANTO DI COLONIE SOSPETTE IN TSA
+ 0,6 % DI ESTRATTO DI LIEVITO

▼

INCUBAZIONE A 37 °C per 24 ORE

▼

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

INTERPRETAZIONE *(vedere spiegazioni nel Capitolo 3°)*

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 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 della Listeria monocytogenes (L.m.) e l'esistenza di limiti di tolleranza in determinate categorie di alimenti, si consiglia di effettuare sempre la ricerca quantitativa della L.m. in tutti i casi in cui ne è stata dimostrata la presenza col metodo qualitativo su 25 grammi (vedi Capitolo 3), 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

BEKANNTMACHUNGEN DES BGA. Empfehlungen des Bundesgesundheitsamtes zum Nachweis und zur Bewertung von *Listeria monocytogenes* in Lebensmitteln, Bundesgesundheitsblatt, 1991, 34 (5), 227 - 229

JEMMI T., Stand der Kentnisse über Listerien bei Fleisch-und Fischprodukten, Mitt. Gebiete Lebens. Hyg., 1990, 81, 144 - 157

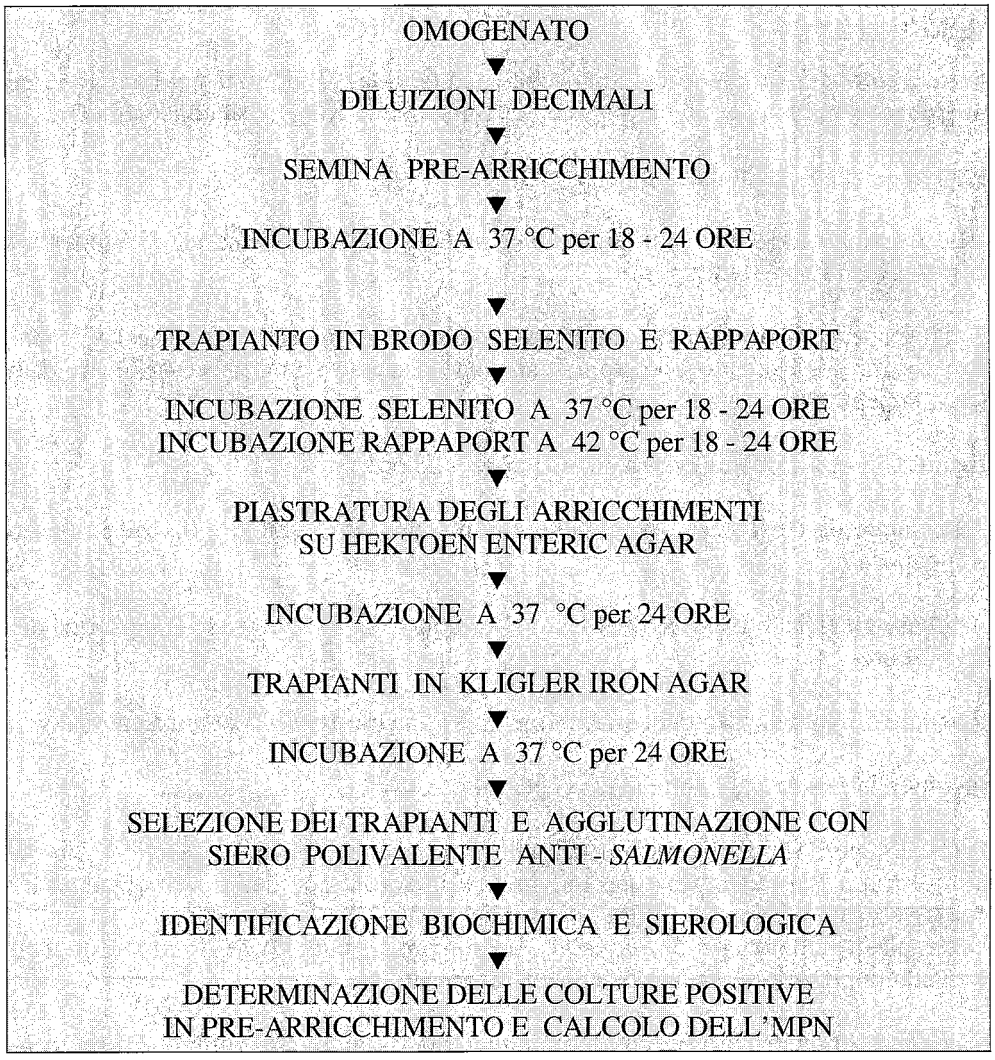
SALMONELLA (MPN)

DEFINIZIONE

- ***Vedi capitolo 3 - Salmonella - Ricerca qualitativa***
- **La ricerca quantitativa di *Salmonella* NON È NORMATA.**

METODO QUANTITATIVO

Analisi consigliabile tutte le volte che si isola una Salmonella col metodo qualitativo (vedi Capitolo 3 - Ricerca delle Salmonelle - Nota applicativa).



MATERIALE RICHIESTO

- *Sacchetto richiudibile sterile per Stomacher.*
- *Pipette graduate sterili monouso.*
- *Terreno di pre-arricchimento Acqua peptonata tamponata a doppia concentrazione (2×) distribuita in provettoni a 10 ml (per un campione = 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 per l'esecuzione dei test biochimici necessari per l'identificazione di Salmonella.*

ESECUZIONE

Pesare entro un sacchetto da Stomacher richiudibile 10 grammi del campione ed aggiungere sterilmente 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 altrettanti provettoni contenenti ciascuno 10 ml di pre-arricchimento (Acqua peptonata tamponata 2×).

Incubare il pre-arricchimento a 37 °C per 18 - 24 ore.

Trapiantare da ciascun pre-arricchimento 1ml in brodo selenito e 0,1 ml in brodo Rappaport.

Incubare gli arricchimenti a 37 °C (brodo selenito) e a 42 °C (brodo Rappaport) per 18 - 24 ore.

Piastrare ciascuna provetta di arricchimento su una piastra di Hektoen Enteric Agar.

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

Procedere per le fasi successive (trapianto delle colonie sospette in Kligler, selezione dei trapianti, identificazione biochimica e sierologica delle colture ottenute) come descritto nel capitolo della ricerca qualitativa delle *Salmonelle.*
Dalle piastre contenenti *Salmonella,* determinare il numero delle corrispondenti provette di pre-arricchimento da considerare positive.

Calcolare il numero presuntivo di *Salmonelle* per grammo di campione, utilizzan-

do la tabella dell'MPN valevole per grammi 1 - 0,1 - 0,01 di campione (vedi Appendice).

Un'esemplificazione del calcolo per stabilire il contenuto di Salmonelle per grammo di campione col metodo dell'MPN a 3 provette è riportata qui di seguito:

Esempio di calcolo del numero di Salmonelle per grammo di campione con metodo MPN a tre provette:

Provette di pre-arricchimento positive

Sospensione iniziale (contiene 1 grammo di campione/ml).....**2** su 3 seminate
Diluizione 10^{-1} (contiene 0,1 grammi di campione/ml).....**1** su 3 seminate
Diluizione 10^{-2} (contiene 0,01 grammi di campione/ml).....**0** su 3 seminate

Confrontando sulla tabella dell'MPN, ai numeri **2 - 1 - 0** corrispondono 1,5 *Salmonelle* per grammo di campione.

Nell'espressione del risultato va indicato che, con metodo MPN, il campione contiene 1,5 *Salmonelle* per grammo.

La tabella dell'MPN mostra, tuttavia, 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 su 25 grammi, un'aliquota supplementare da 10 grammi di campione, destinata ad un'eventuale determinazione quantitativa da allestire *dopo* che la prova qualitativa è risultata positiva.

Il campione da 10 grammi per la ricerca quantitativa, raccolto entro un sacchetto richiudibile sterile per omogeneizzatore, va conservato in congelatore a -20 °C e scongelato a temperatura ambiente immediatamente prima dell'analisi.

Riferimenti bibliografici

DICKSON J.S. (1989) J. Food Protect., 52, 388 - 391

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.
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 le specie più diffuse negli alimenti: *Mucor, Rhizopus, Aspergillus, Penicillium.*

LIEVITI: organismi unicellulari, aerobi facoltativamente anaerobi, generalmente rotondeggianti.
Si riproducono per gemmazione.
Si colorano in viola col Gram.
Resistono a condizioni estreme di temperatura, pH, Aw, NaCl.
Alcune specie sono patogene.
Tra le specie più diffuse negli alimenti: *Saccharomyces, Torulopsis, Geotrichum, Cryptococcus, Candida.*

La ricerca dei miceti NON È NORMATA.

OMOGENATO
▼
DILUIZIONI DECIMALI
▼
SEMINA SU OGYE AGAR
▼
INCUBAZIONE A TEMPERATURA AMBIENTE (20 - 25 °C) per 5 GIORNI
▼
IDENTIFICAZIONE E CONTEGGIO DELLE COLONIE DI MICETI

MATERIALE RICHIESTO

- *Come per la conta batterica totale mesofila, ad 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, causa la 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, colore bianco o vario).

Poichè sul terreno OGYE Agar possono sviluppare anche alcune specie di batteri, è opportuno accertare la natura delle colonie di presunti lieviti con esami microscopici di conferma, allestendo degli strisci da colorare con Gram o con colorazioni specifiche per miceti (ad es. colorazione con blu cotone - lattofenolo).

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, 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

CAPITOLO 3 - RICERCHE QUALITATIVE

SALMONELLA

DEFINIZIONE

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

- **Per alcuni tipi di alimenti la ricerca della *Salmonella* è NORMATA (vedi Appendice).**

Scheda sintetica

ATTIVITA' 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*
ATTIVITA' DELL'ACQUA (Aw) RICHIESTA	*> 0,94*
FATTORI D'INIBIZIONE	*comuni disinfettanti, cottura*
DOSE INFETTANTE	*molto variabile (da poche cellule a 10^6)*
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*

OMOGENATO + TERRENO
DI PRE - ARRICCHIMENTO
▼
OMOGENEIZZAZIONE ED INCUBAZIONE
A 37 °C per 18 - 24 ORE
▼
ARRICCHIMENTO IN BRODO SELETTIVO
(INCUBAZIONE A 37 / 42 °C per 24 ORE)
▼
PIASTRATURA SU TERRENO SOLIDO E DIFFERENZIALE
(INCUBAZIONE A 37 °C per 24 ORE)
▼
TRAPIANTO IN KLIGLER IRON AGAR
(INCUBAZIONE A 37 °C per 24 ORE)
▼
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 un'aliquota del campione in esame.
Aggiungere quindi il pre-arricchimento, in rapporto 1/9 (ad esempio, 25 grammi del campione più 225 ml di pre-arricchimento).

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

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

Trasferire un'ansata di arricchimento su una piastra di Hektoen Enteric Agar o di altro terreno solido differenziale, per ottenere la crescita di colonie isolate.

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

Trapiantare una o più colonie sospette (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 con *test* biochimici.

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

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

Per la ricerca della Salmonella con tamponi superficiali, vedi capitolo 4° - Altre ricerche - Controlli su ambienti di lavorazione alimenti.

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 2° - Ricerca delle Salmonelle con MPN).
Pertanto, al momento del prelievo di 25 grammi per l'analisi qualitativa, prelevare altri 10 grammi di alimento da congelare entro un sacchetto sterile richiudibile e da far scongelare a temperatura ambiente immediatamente prima dell'eventuale ripetizione quantitativa dell'analisi.

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, 7.01 - 7.10 e supplemento settembre 1987, 7b.01 - 7b.08

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

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

SHIGELLA

DEFINIZIONE

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

La ricerca della *Shigella* NON È NORMATA.

Scheda sintetica

ATTIVITA' 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*
ATTIVITA' 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*

CAMPIONE + BRODO D'ARRICCHIMENTO
SELENITO - CISTINA

▼

OMOGENEIZZAZIONE

▼

INCUBAZIONE A 37 °C per 18 - 24 ORE

▼

PIASTRATURA SU TERRENI
SELETTIVI E DIFFERENZIALI (HEKTOEN ENTERIC AGAR,
MAC CONKEY AGAR)

▼

INCUBAZIONE A 37 °C per 24 ORE

▼

TRAPIANTO IN KLIGLER IRON AGAR

▼

INCUBAZIONE A 37 °C per 24 ORE

▼

IDENTIFICAZIONE BIOCHIMICA

MATERIALE RICHIESTO

- *Sacchetti sterili per Stomacher richiudibili.*
- *Pipette graduate sterili monouso.*
- *Terreno d'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 di test biochimici per l'identificazione di Shigella.*

ESECUZIONE

Trasferire nel sacchetto richiudibile 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 ad 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. Zweiter 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.

- **Per alcuni tipi di alimenti la ricerca qualitativa di *Listeria monocytogenes* è NORMATA (vedi Appendice).**

Scheda sintetica

ATTIVITA' 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*
ATTIVITA' 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*

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 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 ad 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 ad incubare a 30 °C per 24 ore.

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

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

Per la ricerca della *Listeria monocytogenes* con tamponi superficiali, vedi Capitolo 4° - Altre ricerche - Controlli su ambienti di lavorazione alimenti.

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 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 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 % ed osservare, in caso 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 a 37 °C in termostato.

- 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* +).

Su una piastra di Agar sangue si seminano, lungo due linee parallele ben distanziate, un ceppo di *S. aureus* ed un ceppo di *R. equi.* Su linee perpendicolari, in mezzo ai due ceppi di referenza, si trapiantano i TSB in esame, avvicinandosi fino a 2-3 mm. Il *test* è positivo quando si produce un'area di emolisi completa, a forma di punta di freccia rovesciata, nella zona di confine fra un ceppo testato ed un ceppo di referenza.

- *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.

NOTA APPLICATIVA 1

Il test di patogenicità su topo è da considerare opzionale e consiste nell'inoculazione i.p. a 5 topi (da 20 grammi circa) di 0,1 ml di 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 va protratta per 5 giorni, seguita da reisolamento delle listerie dalla milza e dal cervello dei soggetti morti.

NOTA APPLICATIVA 2

In caso di isolamento di L.m. 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 sterile richiudubile e da far scongelare a temperatura ambiente immediatamente prima dell'eventuale ripetizione quantitativa dell'analisi.
Le metodiche quantitative sono riportate nel Capitolo 2° - Ricerca della *Listeria monocytogenes* con metodi quantitativi.

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, Supplemento settembre 1987, 29.01 - 29.12

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

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

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

VIBRIONI

DEFINIZIONE

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

La ricerca dei vibrioni NON È NORMATA.

VIBRIO CHOLERAE O1 e O139
VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS E VIBRIONI CORRELATI

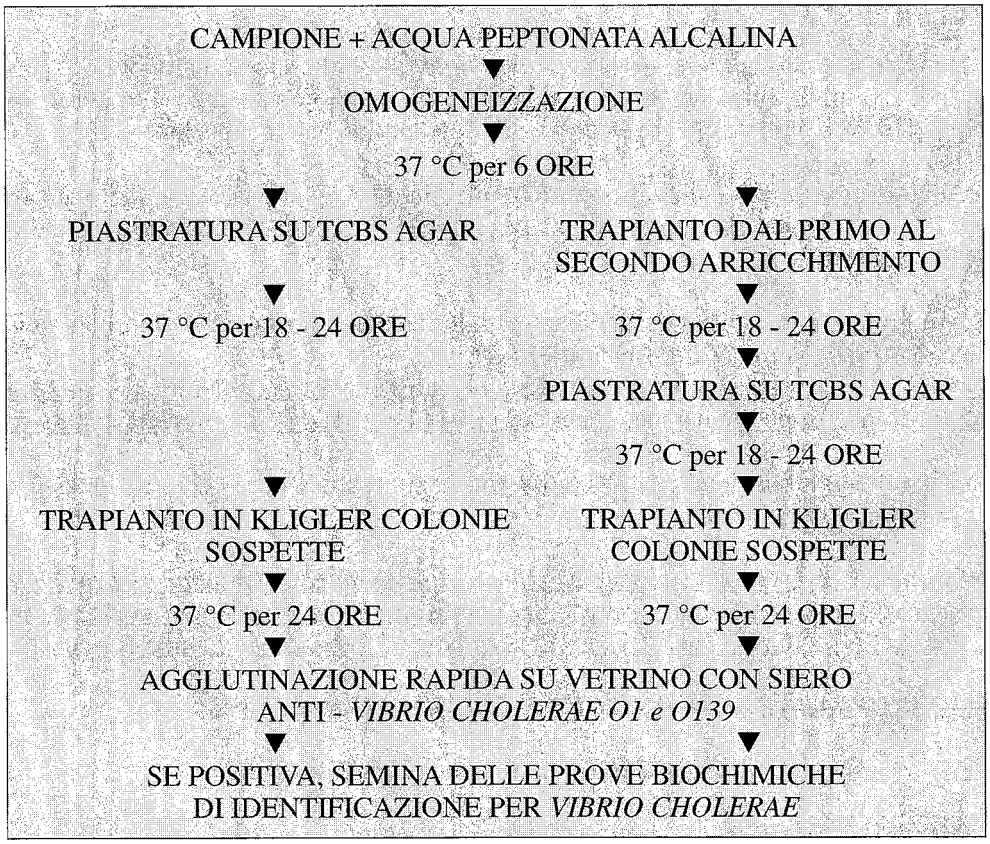
1. VIBRIO CHOLERAE O1 e O139

Scheda sintetica

ATTIVITA' 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 7,6*
ATTIVITA' DELL'ACQUA (Aw) RICHIESTA	*> 0,97*
FATTORI D'INIBIZIONE	*comuni disinfettanti, ebollizione*
DOSE INFETTANTE	*$1,5 \times 10^5$ - 7×10^6*
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*

MATERIALE RICHIESTO

- *Sacchetti sterili per Stomacher richiudibili.*
- *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 per l'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.
Incubare il sacchetto richiuso 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 dal 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 appaiono su TCBS grandi 2-3 mm, liscie, leggermente appiattite, con centro opaco e periferia translucida, di colore giallo e che diventano 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* su Kligler si presentano con fondo giallo e *slant* rosso.

Saggiare le colture in Kligler mediante agglutinazione rapida su vetrino con antisiero *Vibrio cholerae O 1* e con antisiero O139.
I ceppi che non agglutinano con i sieri indicati sono da considerare *V. cholerae NAG*, di incerto potere patogeno, per cui il risultato del *test* è da ritenersi negativo.

In caso di agglutinazione positiva, confermare la presenza di *V. cholerae* mediante appropriati *test* biochimici.

➧ Eventuali ceppi ritenuti probabili *patogeni e comunque casi dubbi o correlabili ad episodi sospetti* devono essere inviati per ulteriori accertamenti e conferma al CENTRO NAZIONALE DI REFERENZA (Istituto Superiore di Sanità -Roma)

2. VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS E VIBRIONI CORRELATI

Scheda sintetica *(Vibrio parahaemolyticus)*

ATTIVITA' 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*
ATTIVITA' 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*

MATERIALE RICHIESTO

- *Sacchetti sterili per Stomacher richiudibili.*
- *Pipette sterili monouso.*
- *Soluzione diluente (Acqua peptonata alcalina salata, APAS).*
- *Piastre Petri di terreno TCBS Agar.*

- *Provette di terreno Kligler Iron Agar salato (con NaCl al 3 %).*
- *Materiale per l'esecuzione di appropriati test biochimici necessari per l'identificazione di V. parahaemolyticus e dei vibrioni correlati.*

ESECUZIONE

Allestire nel sacchetto una sospensione iniziale del campione in esame con 25 grammi in 225 ml di Acqua peptonata alcalina salata (APAS).

Incubare a 37 °C per 18 - 24 ore.

Al termine dell'incubazione, trapiantare 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.

Prove biochimiche per Vibrio

Con una sospensione del germe in soluzione fisiologica seminare le seguenti prove: saccarosio (SAC), ornitina decarbossilasi (ODC), lisina decarbossilasi (LDC), beta-galattosidasi (ONPG).
Incubare a +37 °C per 24 ore.
Differenziare secondo lo schema:

Vibrio	SAC	ODC	LDC	ONPG
cholerae	+	+	+	+
parahaemolyticus	-	+	+	-
alginolyticus	+	+	+	-
fluvialis	+	-	-	+
vulnificus	-	+	+	+
metschnikovii	+	-	±	±

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, 12.01 - 13.12 e Supplemento settembre 1987, 12.01 - 12.10

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

CAMPYLOBACTER JEJUNI E COLI

DEFINIZIONE

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

➧ **La ricerca del *Campylobacter* NON È NORMATA.**

Scheda sintetica

ATTIVITA' 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*
ATTIVITA' 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*

CAMPIONE + CEB

▼

OMOGENEIZZAZIONE

▼

INCUBAZIONE A 43 °C per 48 ORE + 10 % DI CO_2

▼

PIASTRATURA SU SKIRROW AGAR
E SU CAMPYLOBACTER BLOOD FREE MEDIUM

▼

INCUBAZIONE A 43°C per 48 ORE + 10 % DI CO_2

▼

IDENTIFICAZIONE BIOCHIMICA E
SIEROLOGICA DI *CAMPYLOBACTER JEJUNI* E *COLI*

MATERIALE RICHIESTO

- *Sacchetti sterili per Stomacher richiudibili.*
- *Terreno di arricchimento Campylobacter Enrichment Broth (CEB), addizionato di Campylobacter Growth Supplement e di Supplemento Skirrow.*
- *Piastre Petri di terreno Skirrow 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 (richieste 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 ad 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 esecuzione, su una o più colonie sospette, di un *test* preventivo di agglutinazione rapida al lattice su vetrino e, ulteriormente, in base all'esito delle seguenti prove, che presentano uguali risultati (ad eccezione del *test* dell'ippurato) sia nel caso di *Campylobacter jejuni* che di *Campylobacter coli*:

- morfologia e colorazione di Gram (piccoli bacilli ricurvi gram - negativi).
- catalasi (+) allestita su vetrino, stemperando una colonie isolata in una goccia di H_2O_2 al 3 %.
- sensibilità all'acido nalidixico (S), 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 (R), 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 %, sterilizzata per filtrazione, di acido ippurico 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 (il *Campylobacter jejuni* è ippurato +, mentre il *Campylobacter coli* è ippurato -).

- eventuali altre prove biochimiche, impiegando appropriati *test* 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, 10.01 - 10.08

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

YERSINIA ENTEROCOLITICA

DEFINIZIONE

Bastoncini gram-negativi, mobili, aerobi, anaerobi-facoltativi, psicrofili, colturalmente simili alle *Enterobacteriaceae.*

➧ **La ricerca di *Yersinia enterocolitica* NON È NORMATA.**

Scheda sintetica

ATTIVITA' 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*
ATTIVITA' 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*

CAMPIONE + BRODO RAPPAPORT MODIFICATO

▼

OMOGENEIZZAZIONE

▼

INCUBAZIONE A TEMPERATURA AMBIENTE per 48 ORE

▼

PIASTRATURA SU CIN AGAR

▼

INCUBAZIONE A 30 °C per 24 - 48 ORE

▼

TRAPIANTO IN KLIGLER IRON AGAR

▼

INCUBAZIONE A 30 °C per 24 ORE

▼

IDENTIFICAZIONE BIOCHIMICA DI *YERSINIA ENTEROCOLITICA*

MATERIALE RICHIESTO

- *Sacchetti sterili per Stomacher richiudibili.*
- *Terreno d'arricchimento Brodo Rappaport-Vassiliadis, modificato con l'aggiunta di Supplemento Carbenicillina 2,5 mg/l.*
- *Piastre Petri di terreno 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).

Omogeneizzare accuratamente in Stomacher per 1 - 2 minuti.
Porre il sacchetto richiuso ad 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 (becco di clarino rosso, fondo giallo, acido solfidrico negativo dopo incubazione 30 °C per 24 ore) e successiva esecuzione di appropriati *test* biochimici predisposti.

Riferimenti bibliografici

CHIESA C., MELIS R., GUIYOULE A. Ricerca ed identificazione dei batteri del genere *Yersinia*, Ann. Sclavo, 1981, 23, 301 - 313

OXOID MANUAL, 6th edition, 1990, 2.234 - 2.235

BRUCELLA

DEFINIZIONE

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

➧ **La ricerca di *Brucella* NON È NORMATA.**

Scheda sintetica

ATTIVITA' PATOGENA	*causa febbre maltese (Br. melitensis) e 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*
ATTIVITA' 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*

OMOGENATO

▼

SEMINA SU *BRUCELLA AGAR*

▼

INCUBAZIONE A 37 °C per 10 GIORNI CON 10% CO_2

▼

TRAPIANTO DI COLONIE SOSPETTE IN POTATO INFUSION AGAR O IN BHI AGAR + SIERO

▼

INCUBAZIONE A 37 °C per 48 ORE + 10% CO_2

▼

IDENTIFICAZIONE DI *BRUCELLA SPP.*

MATERIALE RICHIESTO

- *Sacchetti sterili per Stomacher con filtro.*
- *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 Br. abortus, antisiero Br. 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 col metodo *Surface Spread Plate.*
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 controllare 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 la morfologia al microscopio mediante colorazione di Gram.
Procedere all'identificazione mediante *test* di agglutinazione rapida su vetrino con sieri specifici anti - *Br. abortus e Br. melitensis.*
Confermare l'identificazione in base alle prove biochimiche riportate da Carter (1990).

Riferimenti bibliografici

CARTER G. R. - COLE J. R. Jr. *Diagnostic Procedures in Veterinary 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

ESCHERICHIA COLI O 157: H 7

DEFINIZIONE

Bastoncini gram-negativi, mobili, aerobi, anaerobi-facoltativi, sorbitolo e MUG negativi, con temperatura preferenziale di crescita a 37 °C (e non a 44 °C).
La ricerca dell'*E. coli O 157: H7* NON È NORMATA.

Scheda sintetica

ATTIVITA' 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*
ATTIVITA' 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*

OMOGENATO + TSB-NOVOBIOCINA 20 mg/l
▼
INCUBAZIONE A 37 °C per 24 ORE
▼
PIASTRATURA SU SORBITOL MAC CONKEY AGAR
▼
INCUBAZIONE A 37 °C per 18 - 24 ORE
▼
TRAPIANTO DELLE COLONIE SOSPETTE SU TSA + 0,6 % ESTRATTO DI LIEVITO
▼
INCUBAZIONE A 37 °C per 24 ORE
▼
AGGLUTINAZIONE CON SIERO ANTI - *E. COLI O 157: 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 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: H 7.*

ESECUZIONE

Preparare una sospensione iniziale del campione in esame nel sacchetto sterile richiudibile con aggiunta di Trypticase Soy Broth (TSB) + novobiocina 20 mg/l, in rapporto P/V di 1: 10 e omogeneizzare accuratamente in Stomacher per 1 - 2 minuti.

Incubare il sacchetto chiuso in termostato a 37 °C per 24 ore.

Trasferire 0,1 ml 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 sviluppate incolori (sorbitolo-negative) e trapiantare una o due 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 la selezione delle colture isolate mediante agglutinazione rapida su vetrino con un siero agglutinante anti - *E. coli* O 157: H 7.

◗ METODO DI RICERCA ALTERNATIVO

In alternativa al metodo precedente, la ricerca dei coli potenzialmente verotossici (comprendenti il sierotipo O 157: H7) può essere effettuata con la seguente tecnica di filtrazione su membrana:

- Si preparano sterilizzate in autoclave a 121 °C per 15'delle membrane per filtrazione da 0,2 mmicron in polietersulfone della misura interna di una piastra Petri. Per ogni esame si predispongono le membrane sulla superficie asciutta di quattro piastre contenenti terreno Trypticase Soy Agar (TSA).

- Da un omogenato 1: 10 del campione in soluzione di Ringer si seminano due pia-

stre a 0,5 ml e due piastre a 0,1 ml, distribuendo l'inoculo sull'intera superficie delle membrane con una spatola sterile.

- Dopo incubazione delle piastre capovolte per 4 ore a 37 °C (allo scopo di rivitalizzare le cellule batteriche stressate), con una pinza sterile si trasferiscono le membrane su quattro piastre asciutte di Sorbitol Mac Conkey Agar, che vengono incubate capovolte per 18 -24 ore a 37 °C.

- Le colonie prodotte da coli sorbitolo-negativi (tra cui il sierotipo O 157: H7) si presentano gialle, rotonde, liscie, a margine netto, del diametro di 2-3 mm, mentre quelle formate da ceppi sorbitolo-positivi sono 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 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).

- Si allestiscono da alcune colonie gialle dei trapianti su Kligler, che vengono incubati a 37 °C per 18-24 ore.
  Nell'evenienza di piastre con elevato numero di colonie rosse o quando esiste un sospetto fondato, è raccomandabile estendere il trapianto anche ad alcune colonie rosse.

- Si selezionano i ceppi isolati mediante prove biochimiche per *Enterobacteriaceae.*

- Si saggiano i ceppi risultati *E. coli* con anticorpi agglutinanti O157: H7.

- Uno o più ceppi biochimicamente identificati come *E. coli* (ma non necessariamente positivi all'agglutinazione con anticorpi O157: H7) vengono esaminati per la capacità a 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+ in rapporto 1:1) e procedendo come sopra.

Un tipo di *test* su cellule VERO collegabile alla metodica sopra esposta è descritto da Palumbo e Coll. come segue:

- Dai Kligler selezionati si trapianta in brodo BHI, da incubare a 37 °C per 24 ore e quindi centrifugare a 3000 rpm per 10'. Il soprastante viene passato su filtro-siringa

da 0,2 mmicron 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 mcl di cellule VERO per pozzetto alla concentrazione di 10^5 - 10^6 / ml, con successiva incubazione a 37 °C per 18-24 ore (+5% di CO_2).

- I campioni vengono seminati a 100 mcl nella prima colonna di ciascuna fila e diluiti al raddoppio mediante passaggi da sinistra verso destra con una micropipetta.

- Dopo 72 ore a 37 °C (+ 5% CO_2), la piastra viene letta per l'effetto citopatico e si considera positivo il campione che lisa almeno il 50% delle cellule. Il titolo della tossina è pari al reciproco della più alta diluizione che dà effetto citopatico.

NOTA APPLICATIVA

È opportuno, per una corretta diagnosi, controllare su colture cellulari o con metodi immuno-enzimatici gli isolamenti (risultati positivi all'agglutinazione con antisiero specifico) per verificare la capacità a produrre in vitro verocitotossine (denominate anche verotossine VT-1 e VT-2).
Il sierotipo O 157: H 7 non è tuttavia l'unico ceppo di *E. coli* capace di produrre verotossine. Recenti ricerche *(Karmali e Coll., 1999)* hanno dimostrato che numerosi sierotipi di *E. coli* enteroemorragici sono capaci di provocare gli stessi effetti nell'uomo e negli animali.
Pertanto la ricerca esclusivamente mirata all'isolamento dell'*E. coli* O 157: H 7 ha perso molto del suo significato.
Attualmente si ritiene preferibile, con metodi immuno-enzimatici, ricercare direttamente la presenza di verotossine in filtrati di colture batteriche o di feci sospette.

Riferimenti bibliografici

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

KARMALI M.A. e Coll., J.Clin.Microbiol., 1999, *37*, 396 - 399

MC CARTY J. e Coll., An Improved Direct Plate Method for the Enumeration of Stressed *Escherichia coli O 157: 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

VARNAM A. H. e Coll. - Foodborn Pathogens, Manson ed., London, England, 1996

VERNOZY - ROZAND C. e Coll. - Rev. Med. 1997, *148*, 169 - 178

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.

♦ La ricerca delle sostanze inibenti NON È NORMATA.

1 - METODO CON BACILLUS SUBTILIS

(per carni ed 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 per 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 %, sodio cloruro all'1 %, potassio fosfato monobasico allo 0,1 % e, dopo autoclavatura, di trimethoprim 0,05 mcg/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 mcg, 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 mcg/ml) e una sospensione di spore di *Bacillus subtilis* (BGA) (concentrazione finale pari a 10^4 spore/ml).
Controllare ed eventualmente aggiustare il pH 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, 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 passano solamente le sostanze a basso peso molecolare, come gli antibiotici).

NOTA IMPORTANTE

I risultati sospetti positivi per sostanze inibenti, causa la possibilità di falsi positivi dovuti a sostanze a basso peso molecolare diverse dagli antibiotici (ad es. acido lattico, disinfettanti, ecc) che danno 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 col 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 pH 6,6
▼
AGGIUNTA DI UN DISCHETTO IMBIBITO CON IL CAMPIONE
▼
INCUBAZIONE A 60 °C per 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 mcg), gentamicina (10 mcg).*
- *Piastre Petri di terreno Antibiotic Agar pH 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 i due dischetti ciascuno con 0,1 ml di 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 pH 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 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 risultati sospetti positivi per sostanze inibenti ottenuti per via microbiologica vanno confermati con metodi chimici quantitativi per le ragioni già esposte a proposito delle analisi con *B. subtilis* BGA.

Riferimenti bibliografici

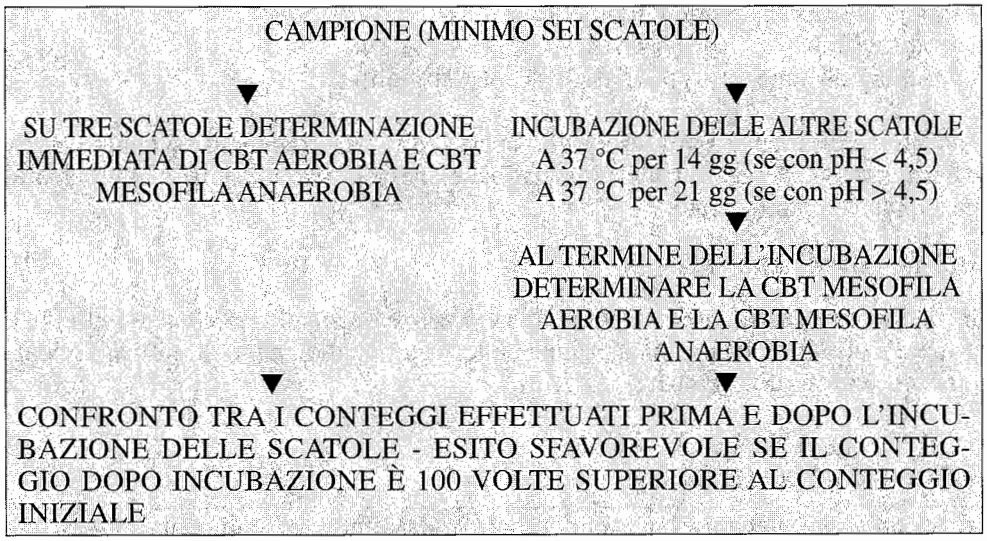
BULLETIN IDF n. 258 / 1991, Section 1 . Detection of inhibitors

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

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

Questa ricerca NON È NORMATA.



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 %. È 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 ed il loro contenuto esaminato per la determinazione della CBT mesofila aerobia ed 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 ad un periodo d'incubazione, variabile a seconda del tipo di prodotto:
- prodotti acidi (pH < 4,5) a 37 °C per 14 giorni.
- prodotti non acidi (pH > 4,5) a 37 °C per 21 giorni.

Al termine di tale periodo, esse vanno aperte ed 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 ed 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 ed anaerobia, tenendo conto, nell'interpretazione dei risultati, della diluizione al raddoppio realizzata con l'aggiunta dell'alcool.

Riferimenti bibliografici

SCWEITZ . LEBENSMITTELBUCH . Zweiter Band - Ringbuch V . Kapitel 56 "Mikrobiologie", 1988, 8.100/1 - 8.100/3

CONTROLLI SU AMBIENTI DI LAVORAZIONE ALIMENTI

- **Ad eccezione dell'analisi microbiologica dell'acqua, queste ricerche NON SONO NORMATE.**

1 - ANALISI QUANTITATIVE

Sono applicabili all'esame di:

1.1 aria ambiente
1.2 acqua
1.3 superfici di lavorazione - durante la lavorazione
- prima dell'inizio delle lavorazioni

1. 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 la durata di 20 minuti. Durante la campionatura dell'aria non si transita nel locale. Trascorso il tempo, i coperchi vengono richiusi e le piastre di PCA incubate a 30 °C per 72 ore, mentre quelle di Sabouraud Dextrose Agar 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 azioni correttive.
La contaminazione microbica normalmente reperibile in uno stabilimento può raggiungere 1.000 germi per metro cubo nei reparti di lavorazione e 10.000 germi per metro cubo nei magazzini.

1. 2 Esame dell'acqua

MATERIALE RICHIESTO

- *6 piastre Petri sterili diametro cm 9.*
- *100 ml di terreno PCA fuso.*
- *3 filtri con membrana da 0,45 mmicron.*
- *1 piastra Petri di terreno m-ENDO Agar.*
- *1 piastra Petri di terreno m-FC Agar.*
- *1 piastra Petri di terreno KF- Streptococcus Agar.*
- *10 provettoni sterili.*
- *250 ml di terreno SFP fuso.*

ESECUZIONE

Carica batterica a 37 e 22 °C

Il campione viene seminato a 1 ml in sei piastre di Petri vuote diametro cm 9. Si aggiunge il terreno Plate Count Agar (PCA), autoclavato e mantenuto a 50 °C in bagnomaria, in ragione di 15 ml per piastra. Dopo solidificazione a temperatura ambiente, tre piastre vengono incubate capovolte a 37 °C per 48 ore e tre piastre a 22 °C per 72 ore. Si contano le colonie su ciascun gruppo di tre 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 filtrati per aspirazione attraverso membrane da 0,45 mmicron. 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 per 24 ore	rosse
Coliformi fecali	m-FC Agar	44 °C per 24 ore	blu
Streptococchi fecali	KF- Streptococcus Agar	37 °C per 48 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, ad ogni provettone vengono aggiunti 20 ml di terreno SFP autoclavato e raffreddato a 50 °C. I provettoni col 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

La qualità microbiologica dell'acqua potabile dipende da (vedi Appendice):

PARAMETRI FONDAMENTALI	LIMITI DI ACCETTABILITÀ
1 - Carica batterica a 37 °C	10 colonie / 1 ml
Carica batterica a 22 °C	100 colonie / 1 ml
2 - Coliformi totali, Coliformi fecali, Streptococchi fecali	0 / 100 ml
3 - 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.

1. 3 Esame delle superfici di lavorazione

1. 3. 1 Superfici esaminate durante la lavorazione

Per ogni punto prescelto per l'esame, si consiglia di delimitare, mediante maschera sterile, una superficie piana ed asciutta, di area nota (ad esempio, 10 cm × 10 cm oppure 5 cm × 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 col 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, mettere il tampone in una provetta contenente un volume noto di diluente (ad es. 5 ml) ed agitare accuratamente per mandare in sospensione i germi adesi.
Da questa sospensione iniziale, seminare su due piastre di Petri di terreno agarizzato, per ogni piastra, 0,5 ml e su altre due piastre 0,1 ml, distribuendo l'inoculo 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 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.

1. 3. 2 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 di 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 cmq.
Dopo incubazione a 37 °C per 48 ore, sulle piastre sarà possibile contare direttamente, dal numero delle colonie batteriche sviluppate, la quantità di germi mediamente presenti in 1 cmq oppure il numero complessivo di colonie visibili sulla piastra a contatto.

INTERPRETAZIONE

Il trattamento di pulizia e sanitizzazione viene considerato soddisfacente se si leggono meno di 10 colonie sull'intera piastra a contatto *standard* da 24 cmq.

NOTA

La ricerca più frequente è 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 il Plate Count Agar, seminato con il metodo *Surface Spread Plate.*

2 - ANALISI QUALITATIVE

Tali ricerche si eseguono per determinazioni di presenza/assenza di patogeni. Sono indipendenti dalla 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 in laboratorio (massimo + 4 °C) vengono immediatamente trasferiti in brodo 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.
All'arricchimento segue, in entrambi i casi, 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 soprattutto utili nei casi di tossinfezione, per controllare lo stato igienico degli ambienti nei quali gli alimenti sospetti sono stati preparati o conservati.
Esse, inoltre, sono l'unico sistema di ricerca dei patogeni nelle situazioni in cui l'alimento, per varie ragioni, non può essere esaminato.

Riferimenti bibliografici

FIL - IDF Usine laitiere - Conditions sanitaires . Directives generales pour les methodes de controle et d'echantillonage . Standard 121 A, 1987

KRAMER J. - CANTONI C. Alimenti - Microbiologia e igiene . OEMF, Milano, 1990, 254 - 255
PATTERSON J.T. - Microbiological assessment of surfaces . J. Food Technol., 1971, *6*, 63 - 72

PROCEDURE D'ANALISI MICROBIOLOGICHE PUBBLICATE SULLA GAZZETTA UFFICIALE DELLA REPUBBLICA ITALIANA

Attualmente le procedure d'analisi normate sono inserite nelle disposizioni legislative seguenti:

- Ordinanza Ministeriale 11 ottobre 1978: "Limiti di cariche microbiche tollerabili in determinate sostanze alimentari e bevande". (S.O. G.U. n. 346 del 13/12/1978), riguardante latte, prodotti d'uovo, gelati, preparati per gelati.
- Circolare Ministeriale ?? dicembre 1991, n. 703/91.64/2085: "Ricerca delle salmonelle nelle uova da consumo".
- Decreto Ministeriale 26 marzo 1992: "Attuazione della decisione n. 91/180/ CEE concernente la fissazione di metodi di analisi e prova relativi al latte crudo e al latte trattato termicamente" (S.O. G.U. n. 90 del 11/04/1992), riguardante il latte crudo e quello trattato termicamente (pasteurizzato, UHT, sterilizzato).
- Ordinanza Ministreriale 7 dicembre 1993: "Limiti di *Listeria monocytogenes* in alcuni prodotti alimentari" (G.U. n. 291 del 13/12/1993), riguardante gli alimenti sfusi o preconfezionati, destinati, per loro natura, ad essere consumati previa cottura o che rechino sulla confezione la dizione "da consumarsi previa cottura" (esclusi il latte e i derivati del latte)".
- Decreto Ministeriale 31 luglio 1995: "Metodiche di analisi per la determinazione dei coliformi fecali, di *Escherichia coli*, delle *Salmonelle*, delle biotossine algali PSP *(Paralytic Shellfish Poison)*, delle tossine DSP *(Diarrethic Shellfish Poison)*, del mercurio e del piombo nei molluschi bivalvi"
- Regolamento CEE 14 giugno 1996, 1080/96: "Determinazione dei coliformi a 30 °C nel burro, nel latte in polvere e nei caseinati".

Tali procedure d'analisi si applicano unicamente su campionature effettuate in conformità alle norme stabilite dalla Gazzetta Ufficiale.

Si precisa che gli *standard* microbiologici riportati a corredo delle procedure analitiche di seguito descritte sono stati desunti dalla consultazione delle rispettive Gazzette Ufficiali. **Essi possono aver subito variazioni per l'emanazione di disposizioni successive**. Un elenco cronologico aggiornato degli standards microbiologici vigenti è reperibile nell'Appendice.

La tabella che segue traccia un quadro sintetico delle normative attualmente vigenti in Italia per il controllo degli alimenti di origine animale, con particolare riguardo alla batteriologia.

Principali norme italiane vigenti in materia di alimenti di origine animale

SETTORE	NORMA PRINCIPALE	MODIFICAZIONI ED INTEGRAZIONI	CIRCOLARI CORRELATE
NORME GENERALI	L. 30/04/62 n. 283	L. 26/02/63 n. 441 L. 06/12/65 n. 1367	
	D.P.R. 23/06/80 n. 327	D.M. 01/04/88 n. 178	
	D.L.vo 26/05/97 n. 155		26/01/98 n. 1 07/08/98 n. 11
	O.M. 26/06/95	O.M. 28/08/96 O.M. 29/01/99	
CONTROLLI UFFICIALI	D.L.vo 03/03/93 n. 123	D.M. 16/12/93	
	D.L.vo 26/05/97 n. 156		
LIMITI DI CARICA MICROBICA	*O.M. 11/10/78*	*O.M. 07/12/93*	
AROMI	D.L.vo 25/01/92 n. 107	D.P.R. 19/11/97 n. 514 L. 24/04/98 n.128 art. 27	
IMBALLAGGI	D.L.vo 25/01/92 n. 108		
ETICHETTATURA	D.L.vo 27/01/92 n. 109	D.P.C.M. 28/07/97 n. 311	06/07/93 n. 27
ALIMENTI SURGELATI	D.L.vo 27/01/92 n. 110		27/04/94 n. 27
CARNI ROSSE	D.L.vo 18/04/94 n. 286	D.M. 13/06/94 D.M. 23/11/95	06/05/98 n. 6
CARNI DI VOLATILI DA CORTILE	D.P.R. 10/12/97 n. 495		08/06/99 n. 9
CARNI DI CONIGLIO E DI SELVAGGINA ALLEVATA	D.P.R. 30/12/92 n. 559	D.P.R. 17/05/96 n. 364 D.P.R. 12/01/98 n. 18	09/03/98 n. 3 08/06/99 n. 9
CARNI DI SELVAGGINA UCCISA	D.P.R. 17/10/96 n. 607		06/05/98 n. 7
CARNI LAVORATE	*D.P.R. 03/08/98 n. 309*		08/02/99 n. 2
	D.L.vo 30/12/92 n. 537	D.M. 28/12/94 D.L.vo 19/03/96 n. 251 D.M. 11/07/97 L. 24/04/98 n. 128 art.49	
CARNI REFRIGERATE E CONGELATE	L. 04/04/64 n. 171	D.L. 17/01/77 n. 3 D.L. 03/02/77 L. 18/03/77 n. 63	

SETTORE	NORMA PRINCIPALE	MODIFICAZIONI ED INTEGRAZIONI	CIRCOLARI CORRELATE
CARNI IN ATMOSFERA MODIFICATA	D.M. 27/01/88 n. 49	D.M. 16/03/94 n. 266	
PRODOTTI ITTICI: MOLLUSCHI	*D.L.vo 30/12/92 n. 530*	D.M. 31/07/95 D.L.vo 15/03/96 n. 249[1]	
	D.L.vo 27/01/92 n. 131		
PRODOTTI ITTICI: PESCI	D.L.vo 30/12/92 n. 531	D.L.vo 26/10/95 n. 524 D.M. 31/12/96[2]	
	R.CEE 19/01/76 n. 103/76	R.CEE 05/01/89 n. 33/89 R.CEE 12/07/93 n. 1935/93	
UOVA E DERIVATI	*D.L.vo 04/02/93 n. 65*	D.M. 14/02/94	
MIELE	L. 12/10/82 n. 753	L. 24/04/98 n. 128 art.52	
LATTE E DERIVATI	L. 03/05/89 n. 169		09/03/92 n. 6
	D.M. 09/05/91 n. 185		03/12/91 n. 24
	D.M. 26/03/92		
	D.P.R. 14/01/97 n. 54	L. 03/08/98 n. 276	01/12/97 n. 16
PASTE ALIMENTARI	L. 04/07/67 n. 580		16/12/72 n. 155 *03/08/85 n. 32*
	D.M. 27/09/67	D.M. 16/05/69	
	D.M. 27/04/98 n. 264		
ACQUE	*D.P.R. 24/05/88 n. 236*		
ACQUE MINERALI	*D.L. 11/12/92 n. 542*	*D. 08/07/97*	

Note:

([1]): Testo coordinato in G.U.S.G. 06/05/99 n. 104.
([2]): Testo coordinato in G.U.S.G. 29/07/98 n. 175.
 Le disposizioni riportate in corsivo contengono limiti di carica microbica. Per il dettaglio si vedano le tabelle in appendice.

ORDINANZA MINISTERIALE 11 OTTOBRE 1978

OGGETTO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Contiene disposizioni riguardanti:

1. LATTE STERILIZZATO E LATTE UHT
2. LATTE PASTEURIZZATO
3. LATTE IN POLVERE PER L'ALIMENTAZIONE DELLA PRIMA INFANZIA
4. PRODOTTI D'UOVO
5. GELATI E PREPARATI PER GELATI

Le disposizioni contenute nell'O.M. 11/10/78 sono state modificate dalle successive leggi riguardanti il latte (D.M. 26/03/92, D.P.R. 14/01/97 n. 54), i prodotti d'uovo (D.L.vo 04/02/93 n. 65) e i gelati (D.P.R. 14/01/97 n . 54) alle quali si rimanda. Poichè il latte in polvere destinato all'alimentazione della prima infanzia non è contemplato dalle più recenti disposizioni, si riportano di seguito le parti dell'O.M. 11/10/78 che riguardano questi prodotti.

LATTE IN POLVERE PER L'ALIMENTAZIONE DELLA PRIMA INFANZIA

CBT AEROBIA A 32 °C

MATERIALE RICHIESTO

- *Acqua triptonata sterile.*
- *Terreno Plate Count Agar (PCA) fuso e mantenuto alla temperatura di 45 °C.*
- *Pipette graduate sterili monouso.*

ESECUZIONE

Ricostituire, per ogni confezione da esaminare (cinque), il latte in polvere in acqua triptonata sterile, osservando le seguenti modalità:
- trasferire 10 grammi di latte in polvere in 90 ml di acqua triptonata sterile, preriscaldata in bagnomaria a 47 ± 2 °C.
- sciogliere la polvere ruotando e scuotendo dolcemente il recipiente e mantenendolo in bagnomaria a 47 °C per 5 minuti.

Allestire le diluizioni decimali successive (10 ml in 90 ml di acqua triptonata).
Trasferire, in doppio, 1 ml di ciascuna diluizione su due piastre Petri, nelle quali dovranno poi essere quanto prima versati 15 ml di PCA.

Incubare le piastre a 32 ± 1 °C per 48 ± 3 ore.

Come controllo di sterilità del terreno colturale e della soluzione diluente, incubare anche due piastre di PCA non inoculate e due piastre inoculate con 2 ml di acqua triptonata.

INTERPRETAZIONE

Prendere in considerazione solamente le piastre su cui il numero delle colonie cresciute sia compreso fra 30 e 300.

Il numero di germi/ml di latte ricostituito è espresso dalla media aritmetica dei singoli conteggi moltiplicata per il reciproco della diluizione corrispondente.

Il limite di tolleranza è fissato in 10.000 germi/g in tutte le confezioni esaminate.

COLIFORMI

MATERIALE RICHIESTO

- *Acqua triptonata sterile, preparata come indicato per la conta microbica totale.*
- *Provette contenenti terreno Brodo bile verde brillante a doppia concentrazione con campana di Durham a 10 ml per provetta.*
- *Piastre Petri di terreno EMB Agar.*
- *Provette di terreno Plate Count Agar (PCA) solidificato a becco di clarino.*
- *Provette di Brodo lattosato con campana di Durham (10 ml per provetta).*
- *Pipette sterili graduate monouso.*

ESECUZIONE

Ricostituire il latte in polvere secondo quanto indicato per la CBT aerobia a 32 °C.

Per ciascuna delle confezioni da esaminare (cinque), trasferire 10 ml di latte ricostituito in una provetta con campana di Durham contenente 10 ml di Brodo bile verde brillante a doppia concentrazione.

Incubare le provette a 32 ± 1 °C per 48 ± 2 ore.

INTERPRETAZIONE

Le provette che mostrano sviluppo batterico e formazione di gas nelle campane di Durham sono considerate presuntivamente positive e devono essere sottoposte alle prove di conferma per la presenza di coliformi.

A tal fine, trasferire un'ansata di brodocoltura su una piastra di EMB Agar, in modo da ottenere la crescita di colonie isolate.

Incubare le piastre capovolte a 32 ± 1 °C per 24 ore.

Da una piastra, trapiantare una o più colonie tipiche in provette di agar nutritivo, da incubare a 32 ± 1 °C per 24 ore, e in provette di Brodo lattosato con campana di Durham, da incubare a 32 ± 1 °C per 48 ore.

Confermare la positività per coliformi rilevando lo sviluppo di gas nel Brodo latto-

sato ed eseguendo una colorazione di Gram dalla patina batterica cresciuta sull'agar nutritivo (bacilli asporigeni gram-negativi).

Leggere i risultati confrontando con la tabella MPN (vedi APPENDICE) e considerare i seguenti limiti di tolleranza:

- assenza di coliformi in 1 grammo in tutte le confezioni esaminate.

STAPHYLOCOCCUS AUREUS

MATERIALE RICHIESTO

- *Provette con terreno a doppia concentrazione Brodo Giolitti-Cantoni, addizionato di potassio tellurito.*
- *Piastre Petri di terreno Baird-Parker, addizionato di Egg Yolk Tellurite Emulsion.*
- *Provette di terreno Brain Hearth Infusion (BHI).*
- *Plasma di coniglio con EDTA.*
- *Provettine sterili per test della coagulasi (10 mm × 120 mm).*
- *Pipette graduate sterili monouso.*

ESECUZIONE

Ricostituire il latte in polvere secondo quanto indicato per la CBT aerobia a 32 °C.

Per ciascuna delle confezioni da esaminare (cinque), trasferire 10 ml di latte ricostituito in una provetta di Brodo di Giolitti-Cantoni a doppia concentrazione.

Versare nelle provette uno strato di agar-agar al 2 %, previamente fuso in bagnomaria bollente, e incubare le provette a 37 ± 1 °C per 24 ore.

INTERPRETAZIONE

Le provette che, al termine del periodo di incubazione, non mostrano crescita batterica devono essere reincubate per ulteriori 24 ore.

Le provette che mostrano annerimento o formazione di un precipitato nerastro sono considerate presuntivamente positive e dovranno essere sottoposte alle prove di conferma per la presenza di *S. aureus*.

A tal fine, trasferire un'ansata di brodocoltura su una piastra di Baird-Parker agar, in modo da ottenere la crescita di colonie isolate.

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

Trapiantare un numero significativo di colonie tipiche e atipiche in altrettante provette di BHI e, dopo incubazione a 37 ± 1 °C per 24 ore, eseguire, su ciascuna bro-

docoltura, un *test* della coagulasi (da leggere dopo incubazione a 37 ± 1 °C per 4 ore o, in caso di negatività rilevata in questa prima lettura, per 24 ore).

Il limite di tolleranza considerato è il seguente:

- assenza di *S. aureus* in 1 grammo in tutte le confezioni esaminate.

SALMONELLA

MATERIALE RICHIESTO

- *Supplemento Verde brillante.*
- *Terreno di arricchimento Brodo Tetrationato di Muller-Kauffmann, addizionato con Supplemento Verde brillante, Iodio bisublimato, Potassio ioduro.*
- *Terreno di arricchimento Brodo Selenito Cistina.*
- *Piastre Petri di terreno selettivo Brillant Green Agar.*
- *Piastre Petri di terreno selettivo Desossicolato Citrato Agar (DCA).*
- *Provette di terreno Kligler Iron Agar.*
- *Antisiero Polivalente Salmonella.*
- *Materiale per l'esecuzione di test biochimici necessari per l'identificazione di Salmonella.*

ESECUZIONE

Ricostituire, per ogni confezione da esaminare (dieci), il latte in polvere in acqua distillata sterile, osservando le seguenti modalità:
- trasferire 100 grammi di latte in polvere in 1 l di acqua distillata sterile.
- aggiustare il pH a 6,8 - 7,0.
- aggiungere 20 ml di una soluzione acquosa allo 0,1 % di Supplemento Verde brillante.

Incubare il latte ricostituito a 37 °C per 18-24 ore (pre-arricchimento).

Trasferire 10 ml di coltura in pre-arricchimento in 100 ml di Brodo Tetrationato di Muller-Kauffmann e 10 ml in 100 ml di Brodo Selenito Cistina.

Incubare a 37 °C per 18-24 ore (arricchimento selettivo).

Piastrare entrambe le colture di arricchimento su Brilliant Green Agar e su DCA, in modo da ottenere la crescita di colonie isolate.

Incubare le piastre capovolte a 35-37 °C per 24 ore.

Trapiantare, da ogni piastra, tre o più colonie tipiche o sospette in altrettante provette di Kligler Iron Agar, da incubare a 37 °C ± 1 °C per 24 ore.

INTERPRETAZIONE

Identificare le colonie di *Salmonella* in base alle loro caratteristiche di crescita su Kligler, alla morfologia e colorazione di Gram e all'esito di appropriati *test* biochimici predisposti.

Confermare l'identificazione con un *test* di agglutinazione rapida su vetrino, utilizzando un siero polivalente anti-*Salmonella.*

Il limite di tolleranza considerato è il seguente:

- assenza di *Salmonella* in 25 grammi in tutte le confezioni esaminate.

CIRCOLARE MINISTERIALE ?? DICEMBRE 1991
TELEGRAMMA N° 703/91.64/2085

OGGETTO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Contiene le modalità da seguire per la ricerca microbiologica della *Salmonella* sul guscio e nel tuorlo delle uova da consumo.
Dette ricerche debbono essere eseguite separatamente su di un campione costituito da 10 uova.

GUSCI

- Separare in maniera asettica il guscio dal tuorlo.
- Triturare in Stomacher i gusci con acqua peptonata in rapporto 1:10.
- Incubare a 37 °C per 24 ore.
- Trapiantare 10 ml in 100 ml di Brodo Muller-Kauffmann e 0,1 ml in 10 ml di Brodo Rappaport-Vassiliadis.
- Incubare entrambi i terreni a 42-43 °C per 24 ore.
- Strisciare da ciascun brodo di arricchimento due dei seguenti terreni selettivi: BGA, DCA (Leifson modificato da Hynes), Hektoen.
- Incubare le piastre a 37 °C per 24 ore.
- Prelevare le colonie sospette e procedere, previa semina in Kligler, all'esecuzione delle prove biochimiche e sierologiche.

TUORLI

- Separare in maniera asettica il tuorlo dal guscio.
- Omogeneizzare i tuorli in Stomacher.
- Prelevare 50 g di omogenato e porli in 450 ml di acqua peptonata tamponata.
- Incubare a 37 °C per 24 ore.
- Proseguire con i trapianti in arricchimenti come per i gusci.

DECRETO MINISTERIALE 26 MARZO 1992

OGGETTO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Questo Decreto fissa i metodi di analisi e prova relativi al latte crudo e a quello trattato termicamente (pasteurizzato, UHT, sterilizzato).

1 - LATTE CRUDO

NUMERAZIONE DEI MICRORGANISMI - CONTEGGIO IN PIASTRA A 30 °C

MATERIALE RICHIESTO

- *Pipette graduate sterili monouso.*
- *Soluzione fisiologica peptonata sterile (NaCl 0,85 % + peptone 0,1 %).*
- *Piastre Petri sterili diametro 90 mm.*
- *Terreno Milk Plate Count Agar o Plate Count Agar addizionato con 10 ml/l di latte scremato sterile privo di sostanze inibenti, fuso e mantenuto alla temperatura di 45 °C ± 1 °C.*

ESECUZIONE

Mescolare accuratamente il campione di latte, evitando la formazione di schiuma. Tra la miscelazione e il prelievo dell'aliquota di analisi non devono trascorrere più di tre minuti.

Eseguire un numero adeguato di diluizioni decimali successive, trasferendo 1 ml di latte o della diluizione precedente in 9 ml di diluente (soluzione fisiologica peptonata).

Trasferire 1 ml di latte o della diluizione ritenuta appropriata in una piastra di Petri. L'esame deve essere effettuato su almeno due diluizioni.

Versare, in ciascuna delle piastre seminate, 15 - 18 ml di terreno.

Lasciar solidificare il terreno e incubare quindi le piastre capovolte a 30 ± 1 °C per 72 ± 2 ore.

INTERPRETAZIONE

Prendere in considerazione le piastre con un numero di colonie compreso tra 10 e 300.

Il numero di microrganismi in 1 ml di latte è dato dalla formula:

$$\frac{C}{(n_1 + 0{,}1 \times n_2) \times d}$$

dove:
C = somma delle colonie contate
n_1 = numero di piastre utilizzate per la prima diluizione
n_2 = numero di piastre utilizzato per la seconda diluizione
d = fattore di diluizione relativo ai primi conteggi effettuati

2 - LATTE PASTEURIZZATO

NUMERAZIONE DEI MICRORGANISMI - CONTEGGIO IN PIASTRA A 30 °C

Procedere in maniera del tutto analoga a quanto descritto per il latte crudo, ma seminando in doppio le diluizioni ritenute appropriate.

NUMERAZIONE DEI MICRORGANISMI - CONTEGGIO IN PIASTRA A 21 °C

Procedere in maniera del tutto analoga alla numerazione dei microrganismi a 30 °C, dopo preincubazione di una confezione di latte pasteurizzato non aperta a 6 °C per 120 ± 2 ore.
Le piastre seminate vengono incubate a 21 ± 1 °C per 25 ore.

NUMERAZIONE DEI COLIFORMI - CONTEGGIO DELLE COLONIE A 30 °C

MATERIALE RICHIESTO

- *Pipette graduate sterili monouso.*
- *Piastre Petri sterili con diametro 90 mm.*
- *Terreno Violet Red Bile Agar (VRBA) fuso e mantenuto alla temperatura di 45 ± 1 °C*
- *Provette contenenti terreno Brodo Bile Verde Brillante con campana di Durham (10 ml per provetta).*

ESECUZIONE

Mescolare accuratamente il campione di latte, evitando la formazione di schiuma. Tra la miscelazione e il prelievo dell'aliquota di analisi non devono trascorrere più di tre minuti.

Trasferire, in triplo, 1 ml di latte in ciascuna piastra Petri.

Versare 12 ml di terreno VRBA in ciascuna delle tre piastre seminate e in una quarta piastra non seminata (controllo di sterilità).

Dopo solidificazione del terreno, ricoprire la superficie delle piastre con almeno 4 ml di VRBA.

Lasciar solidificare il terreno e porre, quindi, le piastre capovolte ad incubare a 30 ± 1 °C per 24 ± 2 ore.

INTERPRETAZIONE

Prendere in considerazione le piastre contenenti non più di 150 colonie. Contare le colonie di colore rosso scuro, con diametro di almeno 0,5 mm, circondate o meno da precipitato.

Sulle eventuali colonie non caratteristiche, effettuare una prova di conferma, trapiantandone un numero adeguato in altrettante provette di Brodo Bile Verde Brillante con campana di Durham.

Incubare le provette a 30 ± 1 °C per 24 ± 2 ore e considerare come colonie di coliformi quelle che sviluppano gas nella campana di Durham.

Il numero di coliformi in 1 ml di latte è dato dalla formula:

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

dove:
C = somma delle colonie contate
n = volume di campione esaminato (3 ml)

3 - LATTE UHT E STERILIZZATO

NUMERAZIONE DEI MICRORGANISMI - CONTEGGIO IN PIASTRA A 30 °C

L'analisi, del tutto analoga a quella descritta per il latte crudo, prevede una preincubazione del campione a 30 °C per 15 giorni e la semina, in doppio, di 0,1 ml di latte in una piastra Petri.

ORDINANZA MINISTERIALE 7 DICEMBRE 1993

OGGETTO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Il disposto dell'Ordinanza Ministeriale 7 dicembre 1993 riporta le modalità per la numerazione di *Listeria monocytogenes* mediante la **tecnica del numero più probabile (MPN)**. Esso si applica agli alimenti sfusi o preconfezionati destinati, per loro natura, ad essere consumati previa cottura o che rechino sulla confezione la dizione "da consumarsi previa cottura" (escluso il latte e derivati del latte).

CAMPIONAMENTO

Le modalità sono le seguenti:
- alimenti crudi non sottoposti a trattamento di riscaldamento: 4 aliquote di campione (denominate A, B, C, D), ciascuna composta da 3 unità campionarie (numerate progressivamente).
- alimenti congelati o surgelati:
  - grandi confezioni o pezzature: 4 aliquote di campione, ciascuna composta da 5 unità campionarie di peso non inferiore a 200 g e ricavate da altrettanti pezzi o confezioni.
  - piccole confezioni o pezzature: campione casuale di 20 confezioni o di 2000 g da ripartire in 4 aliquote, ciascuna composta da 5 confezioni o da 5 unità campionarie da 100 g.
- alimenti precotti o pasteurizzati: come gli alimenti congelati o surgelati.

MATERIALE RICHIESTO

- *Sacchetti sterili per Stomacher con filtro.*
- *Provettoni sterili.*
- *Pipette graduate sterili monouso.*
- *Acqua peptonata tamponata sterile.*
- *Provette contenenti 9 ml di terreno Fraser Broth.*
- *Provette contenenti 9 ml di terreno TSB addizionato di estratto di lievito 0,6%.*
- *Piastre Petri di terreno Oxford Agar, addizionato con supplemento Oxford.*
- *Provette di terreno 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

Da ciascuna delle unità campionarie da esaminare, trasferire 10 grammi di materiale in un sacchetto da Stomacher con filtro. Aggiungere, quindi, 90 ml di Acqua peptonata tamponata.

Omogeneizzare accuratamente in Stomacher per 2-3 minuti. L'omogenato così ottenuto rappresenta la diluizione 10^{-1} del materiale di partenza.

Eseguire due successive diluizioni decimali dell'omogenato (10^{-2} e 10^{-3}) in acqua peptonata tamponata.

Seminare 9 provette contenenti 9 ml di Fraser Broth, secondo lo schema seguente:
- tre provette con 1 ml ciascuna dell'omogenato (corrispondente a 0,1 g di campione).
- tre provette con 1 ml ciascuna della diluizione 10^{-2} (corrisponedente a 0,01 g di campione).
- tre provette con 1 ml ciascuna della diluizione 10^{-3} (corrispondente a 0,001 g di campione).

Nel caso di alimenti surgelati o comunque sottoposti a trattamento termico, seminare, in triplo, dall'omogenato e dalle successive diluizioni, 1 ml in tre provette contenenti 9 ml di TSB addizionato di estratto di lievito allo 0,6%. Dopo incubazione a 32 °C per 18-20 ore, trasferire, da ciascuna provetta di TSB, 1 ml in una provetta di Fraser Broth.

Incubare le provette di Fraser Broth a 32 °C per 24-48 ore.

Al termine del periodo d'incubazione piastrare su Oxford Agar tutte le provette che mostrano annerimento del terreno.

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

INTERPRETAZIONE

In via presuntiva, identificare come colonie di *Listeria monocytogenes* quelle brune e circondate da un alone scuro.

Trapiantare almeno 5 colonie tipiche in altrettante provette di TSA addizionato dello 0,6% di estratto di lievito (da incubare a 37 °C per 24 ore).

A partire dalle colture cresciute su TSA, procedere all'identificazione di *L. monocytogenes*, basandosi sulle seguenti prove:
- morfologia e colorazione di Gram (bastoncini gram-positivi).
- catalasi (+) allestita su vetrino, stemperando un'ansata di patina colturale in una goccia di acqua ossigenata al 3%.
- emolisi (+) allestita per infissione in Agar sangue (da incubare a 37 °C per 24 ore).
- *test* di fermentazione del ramnosio (+), con incubazione a 37 °C per 1-7 giorni.
- *test* di fermentazione dello xilosio (-), con incubazione a 37 °C per 1-7 giorni.
- *test* di fermentazione del mannitolo (-). con incubazione a 37 °C per 1-7 giorni.
- *test* di mobilità (+), con incubazione a temperatura ambiente per 2-5 giorni.
- prova biologica, eseguta su 5 topini *Swiss* mediante inoculazione i.p. di 0,1 ml di sedimento di una brodocoltura di 24 ore, cresciuta in TSB addizionato dello 0,6 % di estratto di lievito. Tale sedimento si ottiene per centrifugazione della brodocoltura a 4000 rpm per 30 minuti e successiva risospensione del precipitato in 1 ml

di soluzione fisiologica sterile. Una volta inoculati, i topi vanno mantenuti in osservazione fino a 5 giorni.

➧ Determinare il numero di *L. monocytogenes* /grammo confrontando con la tabella MPN riportata in APPENDICE e considerare i seguenti limiti di tolleranza:

- alimenti crudi non sottoposti a trattamento di riscaldamento: <11/g in 1 u.c.; <110/g in 2 u.c.
- alimenti congelati o surgelati: <11/g in 2 u.c. e <110/g in 3 u.c.
- alimenti precotti o pasteurizzati: <11/g in 4 u.c. e <110/g in 1 u.c.

DECRETO MINISTERIALE 31 LUGLIO 1995

OGGETTO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Questa norma contiene le metodiche di analisi per la determinazione dei coliformi fecali, di *Escherichia coli*, delle *Salmonelle,* delle biotossine algali PSP *(Paralytic Shellfish Poison)*, delle tossine DSP *(Diarrethic Shellfish Poison)*, del mercurio e del piombo nei molluschi bivalvi. Vengono qui riportate solamente le metodiche relative alle ricerche microbiologiche.

CAMPIONAMENTO

1. Il campione di molluschi bivalvi da sottoporre ad analisi deve essere costituito da 50-300 invertebrati per aliquota in relazione al tipo di analisi ed alla specie di molluschi oggetto del prelievo, con criterio inverso alla dimensione dei molluschi.
2. Ciascuna delle aliquote di cui al punto 1 può essere utilizzata per un solo tipo di accertamento analitico (microbiologico, chimico, biotossicologico, fisico).
3. I campioni dei molluschi bivalvi devono essere mantenuti, dal momento del prelievo al momento in cui viene iniziata la prima analisi, a temperatura non superiore a +6 °C.
4. I controlli microbiologici vengono eseguiti con le modalità previste dall'art. 4 del decreto legislativo 3 marzo 1993, n. 123.

DETERMINAZIONE DEI COLIFORMI FECALI

MATERIALE RICHIESTO

- *Sacchetti sterili per Stomacher richiudibili.*
- *Provettoni sterili contenenti 9 ml di soluzione fisiologica sterile.*
- *Provette contenenti 9 ml di brodo A 1.*
- *Pipette graduate sterili monouso.*

ESECUZIONE

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

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

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

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

Preparare quindi le seguenti diluizioni dal precedente omogeneizzato:
- diluizione A = 10 g di omogeneizzato + 90 ml di soluzione fisiologica sterile equivalenti a 0,1 g campione/ml.
- diluizione B = 1 ml di diluizione A + 9 ml di soluzione fisiologica sterile equivalenti a 0,01 g campione/ml.
- diluizione C = 1 ml di diluizione B + 9 ml di soluzione fisiologica sterile equivalenti a 0,001 g campione/ml.

Seminare le diluizioni di cui sopra secondo il seguente schema:
- ml 1 di diluizione A per provetta, in 5 provette contenenti 9 ml di brodo A1 ciascuna.
- ml 1 di diluizione B per provetta, in 5 provette contenenti 9 ml di brodo A1 ciascuna.
- ml 1 di diluizione C per provetta, in 5 provette contenenti 9 ml di brodo A1 ciascuna.

In caso di molluschi presumibilmente poco contaminati, al fine di una maggiore accuratezza nella valutazione dei risultati, si suggerisce la semina diretta di 1 grammo di omogeneizzato e delle successive diluizioni A e B.

In tal caso i valori riportati in tabella MPN dovranno essere divisi per un fattore 10.

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

INTERPRETAZIONE

Tutte le provette in cui si siano formati, dopo 24 ore di incubazione complessiva, torbidità e una qualsiasi quantità di gas sono considerate positive per coliformi fecali e debbono essere sottoposte alla determinazione successiva.

In base al numero delle provette positive si risale al numero più probabile di coliformi fecali per 100 grammi di molluschi applicando la tabella MPN riportata in appendice.

DETERMINAZIONE DI ESCHERICHIA COLI

MATERIALE RICHIESTO

- *Provette contenenti 10 ml di acqua triptonata.*
- *Reattivo di Kovacs.*
- *Pipette graduate sterili monouso.*

ESECUZIONE

Dalle provette di brodo A1 risultate positive per la ricerca di coliformi fecali, seminare 0,1 ml della brodocoltura in una provetta contenente 10 ml di acqua triptonata. Incubare a 44 °C per 24 ore.

INTERPRETAZIONE

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

La ricerca dell'indolo viene eseguita aggiungendo a ciascuna provetta di acqua triptonata 0,5 ml di reattivo di Kovacs.

La reazione è positiva se, dopo breve agitazione, si separa sulla superficie del terreno uno strato color rosso ciliegia.

In base al numero di provette positive, si risale al numero più probabile di *Escherichia coli* per 100 grammi di molluschi applicando la tabella MPN riportata in appendice.

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

DETERMINAZIONE DELLE SALMONELLE CON METODO RAPIDO

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

MATERIALE RICHIESTO

- *Sacchetti per Stomacher sterili richiudibili.*
- *Acqua peptonata tamponata.*
- *Piastre di terreno MSRV.*

ESECUZIONE

Prelevare 25 grammi di polpa e liquido intervalvare di mollusco, omogeneizzare in 225 ml di acqua peptonata tamponata.

Incubare a 37 °C per 20 ore (fase di pre-arricchimento).

Procedere all'arricchimento selettivo direttamente in piastre di MSRV secondo la segunete procedura:
- depositare 3 gocce (0,1 ml circa) della coltura di pre-arricchimento in punti separati (e lontani tra loro) della superficie di una piastra di terreno MSRV senza spatolare (effettuare 2 repliche).
- incubare, senza rovesciare la piastra, a 42 °C per 20-24 ore.

INTERPRETAZIONE

Osservare, intorno ai punti di deposizione delle gocce eventuali aloni di crescita (il colore azzurro del terreno appare leggermente rischiarato): essi sono dovuti a batteri mobili che si riproducono bene nel terreno; gli aloni dovuti a sviluppo di *Salmonelle* sono di grandi dimensioni e spesso intercettano il bordo della piastra.

La semplice osservazione di un tale alone conferisce alla prova una **presuntività di presenza di *Salmonelle***, mentre l'assenza di aloni o la presenza di aloni molto

ristretti (diametro inferiore a 1,5 cm) permette di escludere la presenza di *Salmonelle* mobili.

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

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

Terreni di coltura previsti dal Decreto Ministeriale 31 luglio 1995.

Terreno di coltura A1
Il terreno A1, che è anche commercializzato in forma disidratata, ha la seguente composizione: lattosio g 5, triptone g 20, NaCl g 5, salicina g 0,5, acqua distillata q.b. a ml 1000.

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

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

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

Acqua triptonata
Triptone g 10, NaCl g 5, acqua distillata q.b. a ml 1000.

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

Reattivo di Kovacs
p-dimetilaminobenzaldeide g 5, alcool amilico ml 75, HCl concentrato ml 25.

Sciogliere l'aldeide nell'alcool amilico a b.m. a 50-55 °C.

Raffreddare ed aggiungere l'acido cloridrico.

Conservare a +4 °C al buio.

Il colore della soluzione al momento della preparazione è giallo tendente al bruno.

Terreno di coltura MSRV
Triptosio g 4,59, idrolizzato di caseina acido g 4,59, cloruro di sodio g 7,34, potassio fosfato monobasico g 1,47, cloruro di magnesio anidro g 10,93, verde malachite ossalato g 0,037, agar g 2,7, acqua distillata q.b. a ml 1000. pH finale: 5,2 ± 0,2.

REGOLAMENTO CEE 14 GIUGNO 1996, N° 1080/96

OGGETTO E CAMPO DI APPLICAZIONE

Riporta le metodiche per la conta dei coliformi a 30 °C nel burro, nel latte in polvere e nei caseinati; sono previste dal Regolamento due metodiche, dette A (consentita) e B (consigliata) che vengono qui di seguito riportate.

PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

Pesare 10 grammi in un sacchetto sterile e mettere a fondere il burro in bagnomaria a 45 °C.

Aggiungere 90 ml di soluzione di Ringer 1/4 concentrata sterile.

Omogeneizzare con Stomacher.

Prelevare con una pipetta la fase acquosa e metterla in una provetta.

METODO A (CONSENTITO DAL REGOLAMENTO CEE)

Mettere in 3 piastre, in doppio, 1 ml di omogenato (per un totale di 6 piastre).

Aggiungere 12 ml circa di terreno VRBA per piastra.

Lasciare solidificare e versare un *overlay* di 4 ml circa dello stesso terreno per piastra.

Incubare a 30 °C per 24 ore.

METODO B (CONSIGLIATO DAL REGOLAMENTO CEE)

MATERIALE RICHIESTO

- *Sacchetto per Stomacher con filtro.*
- *Una provetta da 16 × 100 mm.*
- *Soluzione di Ringer 1/4 concentrata sterile 90 ml.*
- *Tre provettoni con 10 ml ciscuno di Brodo Bile Verde Brillante a doppia concentrazione.*
- *Tre provette con 10 ml di Brodo Bile Verde Brillante a semplice concentrazione con campana di Durham.*
- *Tre piastre di EMB Agar.*

ESECUZIONE

Preparare l'omogenato come nel metodo precedente.

Seminare i tre provettoni a doppia concentrazione ciascuno con 10 ml di omogenato.

Incubare a 30 °C per 24 ore e quindi trapiantare con l'ansa ciascun provettone in una provetta di terreno a concentrazione semplice.

Incubare le provette a 30 °C per 48 ore.

Dalle provette che mostrano formazione di gas nella campana di Durham, piastrare su EMB ed incubare a 30 °C per 24 ore.

INTERPRETAZIONE

Le colonie tipiche formate da coliformi sono rosso-rosa, con aspetto mucoso e con riflessi metallici.

Le piastre che mostrano colonie sospette vengono confermate mediante trapianto di una o più colonie caratteristiche in provette di Brodo Bile Verde Brillante a semplice concentrazione (con campana di Durham), da incubare a 30 °C per 48 ore e leggere per la produzione di gas.

Protocollo operativo consigliato per lo smaltimento dei rifiuti 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, senza etichette	*contenitore rigido per raccolta differenziata del vetro da riciclare*
	Carta, plastica, 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 - smaltimento tramite incineritore*
	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.***

TERRENI E SOLUZIONI

Le formule dei terreni e delle soluzioni citate nella dispensa sono correntemente riportate nei testi di batteriologia.
Alcune formulazioni - meno diffuse delle altre - vengono esposte qui di seguito.

ACQUA PEPTONATA TAMPONATA (APT)
(pre-arricchimento per *Salmonella*)

Peptone (digerito triptico di caseina) g 10, sodio cloruro g 5, sodio fosfato bibasico ($Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O$) g 9*, potassio fosfato monobasico (KH_2PO_4) g 1,5, acqua distillata l 1. Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti. pH finale: 7,0 + 0,1.
* *se sodio fosfato bibasico biidrato g 4,4, se sodio fosfato bibasico anidro g 3,5.*

ACQUA PEPTONATA ALCALINA (APA)
(arricchimento per *Vibrio cholerae*)

Peptone g 10, sodio cloruro g 10, acqua distillata l 1.
Aggiustare il pH in modo che, dopo autoclavatura a 121 °C per 15 minuti, risulti pari a 8,5 ± 0,2 (aggiustare con ml 14 di NaOH N/1 in l 1 di terreno).

ACQUA PEPTONATA ALCALINA SALATA (APAS)
(arricchimento per *Vibrio parahaemolyticus* e vibrioni correlati)

Peptone g 10, sodio cloruro g 30, acqua demineralizzata l 1
Aggiustare il pH a 8,4 - 8,5 con NaOH N/1 (circa ml 12 per l 1 di terreno).
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

BFM
(*Bifidobacterium Medium*)

Estratto di carne g 2, estratto di lievito g 7, amido g 2, L-cisteina idrocloridrato g 0,5, sodio cloruro g 5, peptone g 5, triptone g 2, lattulosio g 5, riboflavina mg 1, tiamina cloruro idrocloridrato mg 1, blu di metilene mg 16, litio cloruro g 2, agar-agar g 15, acqua demineralizzata l 1.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 20 minuti, raffreddare a 55 °C e aggiungere sterilmente 5 ml di acido propionico 99%.
Aggiustare il pH a 5,5 con NaOH 10 N

TERRENI PER FERMENTAZIONE DEI CARBOIDRATI + SALE
(per *V. parahaemolyticus* e vibrioni correlati)

Terreno base per fermentazione dei carboidrati + carboidrato 0,5% + 27 g/l di NaCl.

TERRENO PER RICERCA DELLE SOSTANZE INIBENTI CON *B. SUBTILIS*

Nutrient agar ml 100 +glucosio g 0,4, sodio cloruro g 1, potassio fosfato monobasico g 0,1.

Dopo autoclavatura a 121 °C per 15 minuti e raffreddamento a circa 50 °C aggiungere ml 1 di sospensione di spore di *B. subtilis* e soluzione di trimethoprim ml 1. La concentrazione finale delle spore di *B. subtilis* nel terreno deve essere di 10^4 spore/ml, la concentrazione finale di trimethoprim di 0,05 mcg/ml.
pH finale: 7,2.

TERRENO AL GELISATO PER CARICA BATTERICA TOTALE NEI GELATI
(formulazione contenuta nell'O.M. 11/10/78)

Peptone gelisato g 5, agar-agar per batteriologia g 15, acqua distillata fino a ml 1000.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 20 minuti
pH finale: 7,0.

SOLUZIONE FISIOLOGICA PEPTONATA

Peptone g 10, sodio cloruro g 8,5, acqua distillata fino a ml 1000.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti. pH finale: 7,0 ± 0,1.

ACQUA TRIPTONATA
(per diluizioni decimali)

Triptone g 1, acqua distillata fino a ml 1000.
Sterilizzare a 120 °C per 15 minuti e aggiustare il pH a 7,0 ± 0,1.

ACQUA TRIPTONATA PER *TEST* DELL'INDOLO

Triptone g 10, sodio cloruro g 5, acqua distillata fino a ml 1000.
Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti.

Elenco alfabetico dei terreni

TERRENO BASE	*SUPPLEMENTO*	*RICERCA*
Acqua Peptonata Alcalina Salata (APAS)		*Vibrio parahaemolyticus*
Acqua Peptonata Alcalina (APA)		*Aeromonas hydrophila* *Vibrio cholerae*
Acqua Peptonata Tamponata (APT)		*Salmonella* *Shigella*
Aeromonas Agar	Supplemento *Aeromonas*	*Aeromonas hydrophila*
Antibiotic Agar pH 6,6	Spore di *B. stearothermophilus var. calidolactis*	Sostanze inibenti
Baird-Parker Agar	Egg Yolk Tellurite Emulsion	Stafilococchi
BFM (Bifidobacterium Medium)		*Bifidobacterium spp.*
Blood Agar Base n.2	Campylobacter Growth Supplement Sangue laccato di cavallo Supplemento Skirrow	*Campylobacter jejuni* *Campylobacter coli*
Brain Hearth Infusion (BHI)		Stafilococchi Streptococchi fecali
Brain Hearth Infusion (BHI)	Agar-agar per batteriologia 1,5 % Siero equino 5 %	*Brucella*
Brilliant Green Agar		*Salmonella*
Brodo Lattosato		*Salmonella*
Brodo Rappaport-Vassiliadis		*Salmonella*
Brodo Rappaport-Vassiliadis	Supplemento Carbenicillina	*Yersinia enterocolitica*
BrodoSelenito Cistina		*Salmonella*
Brodo Tioglicolato		Clostridi
Brucella Agar	Supplemento Brucella	*Brucella*
Campylobacter Enrichment Broth	Campylobacter Growth Supplement Supplemento Skirrow	*Campylobacter jejuni* *Campylobacter coli*
Campylobacter Blood Free Medium	Supplemento Cefoperazone	*Campylobacter jejuni* *Campylobacter coli*
Cereus Agar	Egg Yolk Emulsion Supplemento *B. cereus*	*Bacillus cereus*
Cetrimide Agar	Glicerolo RP (10 ml/l)	*Pseudomonas aeruginosa*
Fraser Broth	Supplemento Fraser Broth	*Listeria monocytogenes*
Hektoen Enteric Agar		*Salmonella* *Shigella*
Kanamycin Aesculin Azide Agar	Supplemento kanamicina	Streptococchi fecali

KF- Streptococcus Agar		Streptococchi fecali
Kligler Iron Agar		*Aeromonas hydrophila* Coliformi *Enterobacteriaceae* *Escherichia coli* *Pseudomonas aeruginosa* *Salmonella* *Shigella* *Vibrio cholerae O1* *Vibrio parahaemolyticus* *Yersinia enterocolitica*
Listeria Enrichment Broth (LEB)	Supplemento LEB	*Listeria monocytogenes*
Litmus Milk		Clostridi
m-ENDO Agar		Coliformi
m-FC Agar		Coliformi fecali
Mac Conkey Agar		*Shigella*
Mannitol Salt Agar		Micrococchi
MRS Agar / M 17 Agar		Lattobacilli
Nutrient Agar (terreno per sostanze inibenti)	Glucosio 0,4% Sodio cloruro 1% Potassio fosfato monobasico 0,1% Trimethoprim soluzione 1 mg/ml in etanolo diluita 1:200 in acqua distillata (1%) Spore di *B. subtilis (BGA)*	Sostanze inibenti
Oxford Agar	Supplemento Oxford	*Listeria monocytogenes*
OGYE Agar	Supplemento OGYE	Miceti
PALCAM Agar	Supplemento PALCAM	*Listeria monocytogenes*
Plate Count Agar (PCA)		Conta batterica totale
Potato Infusion Agar		*Brucella*
Sabouraud Dextrose Agar		Miceti
SFP Agar	Supplemento Cicloserina	Clostridi
STA Agar	Supplemento STA	*Brochothrix thermosphacta*
TCBS Agar		*Vibrio cholerae O1* *Vibrio parahaemolyticus*
TSB	Agar-agar per batteriologia (1,5%) Estratto di lievito 0,6%	*Brochothrix thermosphacta* *Listeria monocytogenes*
Violet Red Bile Agar (VRBA)		Coliformi
Violet Red Bile Glucose Agar (VRBG)		*Enterobacteriaceae*
VRBA + MUG		*Escherichia coli*
Yersinia Selective Agar (CIN)	Supplemento Yersinia	*Yersinia enterocolitica*

Elenco in ordine di ricerca dei terreni e dei supplementi

RICERCA	*TERRENO BASE*	*SUPPLEMENTO*
Aeromonas hydrophila	Acqua Peptonata Alcalina (APA) Aeromonas Agar Kligler Iron Agar	 Supplemento Aeromonas
Bacillus cereus	Cereus Agar	Egg Yolk Emulsion Supplemento Bacillus cereus
Bifidobacterium spp.	BFM	
Brochotrix thermosphacta	STA Agar	Supplemento STA
Brucella	Brain Hearth Infusion (BHI) Brucella Agar Potato Infusion Agar	Agar-agar per batteriologia (1,5%) + siero equino (5%) Supplemento Brucella
Campylobacter jejuni e coli	Blood Agar Base n. 2 (Skirrow Agar) Campylobacter Blood Free Medium Campylobacter Enrichment Broth	Campylobacter Growth Supplement Sangue laccato di cavallo Supplemento Skirrow Supplemento Cefoperazone Campylobacter Growth Supplement Supplemento Skirrow
Clostridi	Brodo Tioglicolato Litmus Milk SFP Agar	 Supplemento Cicloserina
Coliformi	Kligler Iron Agar Violet RedBile Agar (VRBA) m-ENDO Agar m-FC Agar	
Carica Batterica Totale (CBT)	Plate Count Agar (PCA)	
Enterobacteriaceae	Kligler Iron Agar Violet Red Bile Glucose Agar (VRBG)	
Escherichia coli	Kligler Iron Agar VRBA + MUG Sorbitol Mac Conkey Agar	
Lattobacilli	MRS Agar M17 Agar	
Listeria monocytogenes	Fraser Broth Listeria Enrichment Broth (LEB) Oxford Agar PALCAM Agar TSB	Supplemento Fraser Supplemento LEB Supplemento Oxford Supplemento PALCAM Agar-agar per batteriologia (1,5%) + Estratto di Lievito (0,6%)

Miceti	OGYE Agar Sabouraud Dextrose Agar	Supplemento OGYE
Micrococchi	Mannitol Salt Agar	
Pseudomonas aeruginosa	Cetrimide Agar Kligler Iron Agar	Glicerolo RP (10 ml/l)
Salmonella	Acqua Peptonata Tamponata (APT) Brilliant Green Agar (BGA) Brodo lattosato Brodo Rappaport-Vassiliadis Brodo Selenito Cistina Hektoen Enteric Agar Kligler Iron Agar	
Shigella	Acqua Peptonata Tamponata (APT) Brodo Selenito Cistina Hektoen Enteric Agar Kligler Iron Agar Mac Conkey Agar	
Sostanze Inibenti	Antibiotic Agar pH 6,6 Nutrient Agar (terreno per sostanze inibenti)	Spore di *Bacillus stearothermophilus var.calidolactis* Glucosio (0,4%) Sodio cloruro (1%) Potassio fosfato monobasico (0,1%) Trimethoprim soluzione 1 mg/ml in etanolo diluita 1:200 in acqua distillata (1%) Spore di *B. subtilis BGA*
Stafilococchi	Baird-Parker Agar Brain Hearth Infusion Broth (BHI)	Egg Yolk Tellurite Emulsion
Streptococchi fecali	Brain Hearth Infusion Broth (BHI) Kanamycin Aesculin Azide Agar KF- Streptococcus Agar	 Supplemento Kanamicina
Vibrio cholerae O1	Acqua Peptonata Alcalina (APA) Kligler Iron Agar TCBS Agar	
Vibrio parahaemolyticus	Acqua Peptonata Alcalina Salata (APAS) Kligler Iron Agar TCBS Agar	
Yersinia enterocolitica	Brodo Rappaport-Vassiliadis Kligler Iron Agar Yersinia Selective Agar (CIN)	Supplemento Carbenicillina Supplemento Yersinia

Elenco alfabetico dei reagenti

REAGENTI	*RICERCA*
Acqua ossigenata soluzione al 3 %	*Brochothrix thermosphacta* *Campylobacter jejuni* e *coli* Lattobacilli *Listeria monocytogenes* Streptococchi fecali
Antisiero *Brucella abortus*	*Brucella*
Antisiero *Brucella melitensis*	*Brucella*
Antisiero polivalente *Salmonella*	*Salmonella*
Antisiero O tipo 1 *Listeria*	*Listeria monocytogenes*
Antisiero O tipo 4 *Listeria*	*Listeria monocytogenes*
Antisiero *Vibrio cholerae O 1*	*Vibrio cholerae O1*
Buste per anaerobiosi	Clostridi
Buste per microaerofilia	*Brucella* *Campylobacter jejuni* e *coli* Lattobacilli
Dischetti di cefalotina per antibiogramma	*Campylobacter jejuni* e *coli*
Dischetti di acido nalidixico per antibiogramma	*Campylobacter jejuni* e *coli*
Dischetti di cellulosa diametro 13 mm	Sostanze inibenti
Dischetti di controllo	Sostanze inibenti
Dischetti per *test* dell'ossidasi	*Aeromonas hydrophila* *Brochothrix thermosphacta* *Enterobacteriaceae*
Generatore gas per microaerofilia 6% O_2 + 10% CO_2	*Brucella* *Campylobacter jejuni* e *coli* Lattobacilli
Generatore di gas per anaerobiosi	Clostridi
Kit di agglutinazione rapida al lattice	*Campylobacter jejuni* e *coli*
Piastre di Petri con membrana da dialisi	Sostanze inibenti
Plasma di coniglio con EDTA	Stafilococchi
Reagenti per *test* di idrolisi dell'ippurato	*Campylobacter jejuni* e *coli*

CEPPI BATTERICI DI CONTROLLO

I seguenti ceppi batterici costituiscono una collezione minima che il laboratorio di microbiologia degli alimenti dovrebbe avere sempre a disposizione per il controllo interno di qualità dei terreni e dei reagenti più frequentemente impiegati:

E. coli
Salmonella
Staphylococcus aureus
Streptococcus faecalis
Lactobacillus bulgaricus
Clostridium perfringens
Bacillus cereus
Pseudomonas aeruginosa
Candida albicans
Listeria monocytogenes

I ceppi, ottenuti da collezioni riconosciute, vengono coltivati su *slant* di BHI agar + 5% di siero equino, incubati a 37 °C per 48 ore e conservati in frigorifero a + 4 °C.

Lactobacillus bulgaricus richiede l'incubazione in atmosfera arricchita con il 5 -10 % di anidride carbonica a 37 °C per 72 ore, mentre *Cl. perfringens* richiede come terreno brodo CMM oppure Brodo tioglicolato, da incubare a 37 °C per 48 ore.

I ceppi di controllo vengono trapiantati ogni mese su terreni freschi.

Si consiglia di allestire parallelamente una serie di trapianti dei ceppi in terreno BHI agar + 5% di siero equino in alto strato, da seminare per infissione, incubare a 37 °C per 48 ore e da conservare in frigorifero a + 4 °C, con validità di un anno.

Altri microrganismi che possono interessare (come *Campylobacter, Brucella, Vibrio*) presentano l'inconveniente di non rimanere a lungo vitali e di richiedere frequenti trapianti, per cui è preferibile tenerli in collezione solo quando è effettivamente necessario. Per questi microrganismi è meglio ricorrere a trapianti estemporanei da ceppi conservati liofilizzati in frigorifero.

CRITERI MICROBIOLOGICI STABILITI PER DETERMINATE CATEGORIE DI ALIMENTI

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
S. aureus	n = 5	c = 0	assenza in 1 g
Salmonella	n = 10	c = 0	assenza in 25 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. perfring.	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. perfring.	n = 5 c = 0	inferiore a	30/g
Salmonella	n = 5 c = 0	assenza in	25 g

D.P.R. 24/05/88 n. 236 in attuazione alla direttiva CEE n. 80/778 concernente le qualità delle acque destinate al consumo umano"

PARAMETRI FONDAMENTALI	LIMITI DI ACCETTABILITÀ
1 - Carica batterica a 37 °C	10 colonie / 1 ml
Carica batterica a 22 °C	100 colonie / 1 ml
2 - Coliformi totali, Coliformi fecali, Streptococchi fecali	0 / 100 ml
3 - Spore di Clostridi solfito-riduttori	0 / 100 ml

D. 11/12/92 n. 542 "Regolamento recante i criteri di valutazione delle caratteristiche delle acque minerali naturali"

- assenza di coliformi in due campioni da 250 ml cadauno
- assenza di streptococchi fecali in due campioni da 250 ml cadauno
- assenza di spore di Clostridi solfito-riduttori in un campione da 50 ml
- assenza di *Pseudomonas aeruginosa* in un campione da 250 ml

D. 08/07/97 "Integrazione dei criteri di valutazione delle caratteristiche microbiologiche delle acque minerali naturali"

- *Aeromonas* < 10 / 100 ml a 30 °C per 24 ore
(e < 100 / 100 ml a 30 °C per 24 ore nelle acque minerali condizionate).

D.L. vo 14/12/92, n. 508 "Attuazione della direttiva 90/667/CEE del Consiglio del 27/11/90, che stabilisce le norme sanitarie per l'eliminazione, la trasformazione e l'immissione sul mercato di rifiuti di origine animale e la protezione dagli agenti patogeni degli alimenti per animali di origine animale o a base di pesce e che modifica la direttiva 90/425/CEE".

- Prodotti finiti provenienti da materiale a basso od alto rischio, prelevati durante o al termine dell'immagazzinamento presso l'impianto di trasformazione:

Enterobatteri	n = 5	c = 2	m = 10/g	$M = 3 \times 10^2$/g
Salmonella	n = 5	c = 0	assenza in 25 g	

- Per prodotti finiti derivanti da materiale ad alto rischio, inoltre:

Clostridium perfringens	assenza in 1 g

D.L.vo 30/12/92, n. 530 "Attuazione della direttiva 91/492/CEE che stabilisce le norme sanitarie applicabili alla produzione e commercializzazione dei molluschi bivalvi vivi".

Coliformi fecali	inferiori a 300/100 g di polpa e liquido intervalvare
oppure	
Escherichia coli	inferiore a 230/100 g di polpa e liquido intervalvare
Salmonella	assenza in 25 g di polpa

D.L. 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:				
Germi aerobi mesofili	n = 5	c = 2	$M = 5 \times 10^6$/g	$m = 5 \times 10^5$/g
Escherichia coli	n = 5	c = 2	$M = 5 \times 10^2$/g	m = 50/g
Stafilococchi	n = 5	c = 2	$M = 10^3$/g	$m = 10^2$/g
Salmonella	n = 5	c = 0	assenza in 10 g	
- Preparazioni di carni:				
Escherichia coli	n = 5	c = 2	$M = 5 \times 10^3$ /g	$m = 5 \times 10^2$/g
Stafilococchi	n = 5	c = 1	$M = 5 \times 10^3$/g	$m = 5 \times 10^2$/g
Salmonella	n = 5	c = 0	assenza in 1 g	

M = pari a 10 m in caso di conteggio effettuato in ambiente solido e a 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***

PRODOTTI A BASE DI LATTE

1 - Criteri microbiologici obbligatori: germi patogeni

• *Listeria monocytogenes:*
- formaggi diversi da quelli a pasta dura (formaggi a pasta molle):
  assenza in 25 g ***n = 5*** ***c = 0***
- altri prodotti (burro, mascarpone, ricotta, panna, formaggi a pasta dura):
  assenza in 1 g

• *Salmonella:*
- tutti i prodotti:
  assenza in 25 g ***n = 5*** ***c = 0***

- latte in polvere:
  assenza in 25 g ***n = 10*** ***c = 0***

• *Microrganismi patogeni:*
assenti

• *Tossine batteriche:*
assenti

2 - Criteri analitici: germi testimoni di carenza d'igiene

• *S. aureus* (germi/g):
- formaggio a base di latte crudo e termizzato:
  m = 1.000 ***M = 10.000*** ***n = 5*** ***c = 2***
- formaggio a pasta molle (a base di latte trattato termicamente):
  m = 100 ***M = 1.000*** ***n = 5*** ***c = 2***
- formaggio fresco, latte in polvere, prodotti gelati a base di latte (gelati e creme gelate):
  m = 10 ***M = 100*** ***n = 5*** ***c = 2***

• *E. coli* (germi/g):
- formaggio a base di latte crudo e latte termizzato:
  m = 10.000 ***M = 100.000*** ***n = 5*** ***c = 2***
- formaggio a pasta molle (a base di latte trattato termicamente):
  m = 100 ***M = 1.000*** ***n = 5*** ***c = 2***

Esclusi i gelati = se superati i valori di M ***ricerca enterotossina stafilococcica nel prodotto e potere enterotossigeno dei ceppi (S. aureus ed E. coli).***

3 - Germi indicatori: linee direttrici

• Coliformi a 30 °C:
- prodotti liquidi a base di latte:
  m = 0 ***M = 5*** ***n = 5*** ***c = 2***
- burro a base di latte o di crema pasteurizzati:
  m = 0 ***M = 10*** ***n = 5*** ***c = 2***
- formaggio a pasta molle (a base di latte trattato termicamente):
  m = 10.000 ***M = 100.000*** ***n = 5*** ***c = 2***
- prodotti in polvere a base di latte:
  m = 0 ***M = 10*** ***n = 5*** ***c = 2***
- prodotti gelati a base di latte (gelati e creme gelate):
  m = 10 ***M = 100*** ***n = 5*** ***c = 2***

• Tenore in germi a 21 °C:
- dopo incubazione a 6 °C per 5 giorni:
m = 10.000 ***M = 100.000*** ***n = 5*** ***c = 2***

• Tenore di germi a 30 °C:
- prodotti gelati a base di latte (gelati e creme gelate):
m = 100.000 ***M = 500.000*** ***n = 5*** ***c = 2***

• Tenore in germi aerobi mesofili a 30 °C:
- prodotti a base di latte liquidi gelificati che hanno subito un trattamento UHT e conservati a temperatura ambiente dopo incubazione a 30 °C per 15 giorni: ***non superiore a 100/ml.***

LATTE ALIMENTARE

• 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*** ***n = 5*** ***c = 2***
- *Salmonella* ***n = 5*** ***c = 0*** ***assenza in 25 g***
- *Assenza di microrganismi patogeni e tossine*

• LATTE PASTEURIZZATO NELLO STABILIMENTO AL TRATTAMENTO
- Germi patogeni ***n = 5*** ***c = 0*** ***assenza in 25 g***
- Coliformi (per ml) ***n = 5*** ***c = 1*** ***m = 0*** ***M =5***
- Tenore in germi a 21 °C dopo incubazione a 6 °C per 5 giorni (per ml):
n = 5 ***c = 1*** ***m = 50.000*** ***M = 500.000***

• LATTE STERILIZZATO E LATTE UHT NELLO STABILIMENTO
- Tenore di germi aerobi mesofili a 30 °C (per 0,1 ml): ***non superiore a 10***

SIGNIFICATO DEI SIMBOLI

n = numero di unità da esaminare componenti il campione.
m = soglia limite al di sotto della quale tutti i risultati sono ritenuti soddisfacenti.
M = soglia limite di accettabilità oltre la quale i risultati non sono più ritenuti soddisfacenti.
c = numero di unità esaminate, componenti il campione, per le quali si tollera un risultato compreso fra **m** ed **M**.

Tabella con i valori MPN da applicare nella determinazione di cariche microbiche eseguite in conformità con l'O.M. 11/10/78 (relativa a latte in polvere per l'alimentazione della prima infanzia) e 07/12/93 (limiti di *Listeria monocytogenes* in alcuni prodotti alimentari).

Numero di tubi positivi		*MPN in g o ml*		*Numero di tubi positivi*		*MPN in g o ml*	
g o ml	*g o ml*	*g o ml*		*g o ml*	*g o ml*	*g o ml*	
1	*0.1*	*0.01*	*1*	*1*	*0.1*	*0.01*	*1*
0.1	*0.01*	*0.001*	*0.1*	*0.1*	*0.01*	*0.001*	*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
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

Tabella MPN annessa al Decreto 31 luglio 1995 relativo alle metodiche di analisi per la determinazione dei coliformi fecali e dell'*Escherichia coli* nei molluschi bivalvi.

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

UNITÀ DI MISURA

• UNITÀ DI LUNGHEZZA

micrometro (=micron)	***μm (μ)***	***0,001 millimetri***
nanometro (=millimicron)	***nm***	***0,001 micron***
ängstrom	***A°***	***0,0001 millimicron***

equivalenze con le misure di lunghezza anglosassoni

pollice	inch (in.)	2,54 cm
piede	foot (ft)	30,48 cm

• UNITÀ DI MASSA

milligrammo	***mg***	***0,001 grammi***
microgrammo (gamma)	***mcg / μg / γ***	***0,001 milligrammi***
parti per milione	**p.p.m.**	**1 mg per chilogrammo**
parti per bilione	**p.p.b.**	**1 mg per tonnellata**

equivalenze con le misure di massa anglosassoni

libbra	pound (lb)	453 g
oncia	ounce (oz)	28,34 g
grano	grain(gr)	0,06 g

• UNITÀ DI VOLUME

millilitro	***ml***	***0,001 litri***
microlitro	***μl / mcl***	***0,001 millilitri***

equivalenze con le misure di volume anglosassoni

gallone	gallon (gal)	3,78 l
quarto	quart (qt)	0,94 l
pinta	pint (pt)	473 ml

• UNITÀ DI AREA

centimetro quadrato	***cmq / cm^2***	***0,0001 metri quadrati***

equivalenze con le misure di area anglosassoni

pollice quadrato	square inch (sq.in.)	6,45 cmq
piede quadrato	square foot (sq.ft.)	929,03 cmq

Finito di stampare dalla Tipografia Camuna
Luglio 2000