

Metodi raccomandati per analisi microbiologiche non normate di alimenti

Marzo 2002



A cura: Unità Organizzativa Prevenzione
Direzione Generale Sanità – Regione Lombardia
Via Pola, 9 e 11 – 20124 Milano
Tel. 02/67653398 – Fax 02/67653307
<http://www.regione.lombardia.it>





PRESENTAZIONE

Quando, nel 1995, era stata realizzata la prima edizione del Volume "Metodi raccomandati per analisi microbiologiche non normate di alimenti", era stato assunto l'impegno di dare continuità all'iniziativa, provvedendo all'aggiornamento del contenuto del volume: questa edizione, come le altre precedenti, sta a dimostrare che si intende mantenere l'impegno assunto.

Del resto, diversi ordini di fattori hanno concorso a realizzare questa nuova edizione dei "Metodi raccomandati per analisi microbiologiche non normate di alimenti", in particolare:

- l'affinamento delle metodiche a seguito dell'acquisizione di strumentazioni tecnologicamente più avanzate e dell'approfondimento delle conoscenze scientifiche;
- l'esigenza di adeguarsi a metodologie standardizzate a livello nazionale ed europeo;
- le procedure di accreditamento, attualmente in corso, per i laboratori dei Dipartimenti di Prevenzione delle ASL, in ossequio a quanto previsto dal Decreto Legislativo 156/97.

Non va, inoltre, dimenticato che il volume è stato oggetto di valutazioni favorevoli non solo da parte di laboratori pubblici, ma anche da parte delle imprese alimentari.

I metodi che vengono proposti, con questa edizione, hanno la caratteristica di essere scientificamente e tecnologicamente aggiornati, garantendo, quindi, una maggiore affidabilità al risultato analitico; la loro adozione comporterà, inoltre, l'impiego di criteri omogenei sul territorio regionale.

In tal modo, si fornisce un notevole supporto all'efficienza e all'efficacia del controllo ufficiale dei prodotti alimentari, salvaguardando, contestualmente, due aspetti fondamentali:

- 1) la tutela della salute del consumatore;
- 2) la tutela dei diritti delle imprese alimentari.

Colgo l'occasione per esprimere il mio più vivo ringraziamento ai componenti del gruppo di lavoro che hanno contribuito alla realizzazione di questo documento.

L'Assessore Regionale alla Sanità
Carlo Borsani

Milano, marzo 2002

HANNO COLLABORATO

Simonetta MASSAZZA	Dipartimento di Prevenzione – ASL della Provincia di Bergamo
Lina MOSCHINI	Dipartimento di Prevenzione – ASL della Provincia di Brescia
Guido CREMONESI	Dipartimento di Prevenzione – ASL della Provincia di Cremona
Marisa FOTI	Dipartimento di Prevenzione – ASL della Città di Milano
Glauco BORONI	Dipartimento di Prevenzione – ASL della Provincia di Mantova
Roberta CASA	Dipartimento di Prevenzione – ASL della Provincia di Milano 1
Maria Alessandra VITALE	Dipartimento di Prevenzione – ASL della Provincia di Milano 1
Donata FAGGI	Dipartimento di Prevenzione – ASL della Provincia di Pavia
Anna Maria CIOCCARELLI	Dipartimento di Prevenzione – ASL della Provincia di Sondrio
Maria Luisa BIGNAMINI	Dipartimento di Prevenzione – ASL della Provincia di Varese
Celeste TOTARO	Dipartimento di Prevenzione – ASL della Provincia di Varese
Nella CATTAI	Dipartimento di Prevenzione – ASL della Provincia di Lecco
Franco PATERLINI	Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna
Silvia COLMEGNA	Istituto Zooprofilattico Sperimentale della Lombardia e dell'Emilia Romagna

INDICE

RL P1	Trattamento preliminare del campione ed allestimento diluizioni	7
RL P2	Trattamento preliminare del campione ed allestimento diluizioni per le paste alimentari	13
RL P3	Misurazione del pH negli alimenti	15
RL P4	Misurazione della aW negli alimenti	17
RL 001	Conta microrganismi aerobi mesofili (metodo per inclusione)	19
RL 002	Conta microrganismi psicrotrofi	27
RL 003	Conta batteri lattici nello yogurt (metodo per inclusione)	29
RL 005	Conta dei batteri lattici (metodo per inclusione)	31
RL 005 TIA	<i>Escherichia coli</i> O:157 (metodo qualitativo)	35
RL 006	Conta coliformi (metodo MPN)	39
RL 007	Conta coliformi (metodo per inclusione)	47
RL 008	<i>Escherichia coli</i> (metodo MPN)	51
RL 009	<i>E. coli</i> β-glucuronidasi positivo (metodo per inclusione)	59
RL 012	Salmonella per alimenti non normati (metodo qualitativo)	63
RL 015	Salmonella nelle uova fresche (metodo qualitativo)	65
RL 016	Stafilococco coagulasi positivo (metodo per spatolamento)	67
RL 019	Conta lieviti e muffe (metodo per inclusione)	71
RL 020	<i>Listeria monocytogenes</i> per alimenti non normati (metodo qualitativo)	77
RL 022	<i>Listeria monocytogenes</i> per latte e prodotti lattiero-caseari (metodo qualitativo)	83
RL 024	<i>Clostridium perfringens</i> (metodo per inclusione)	87
RL 025	<i>Bacillus cereus</i> (metodo per spatolamento)	91
RL 026	<i>Yersinia enterocolitica</i> (metodo qualitativo)	97
RL 027	<i>Campylobacter jejuni</i> e <i>coli</i> (metodo qualitativo)	105
RL 028	<i>Vibrio cholerae</i> (metodo qualitativo)	109
RL 029	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> (metodo qualitativo)	113
RL 031	Conta coliformi ricerca nelle paste alimentari fresche non confezionate (metodo per inclusione)	121
RL 034	Conta <i>Enterobacteriaceae</i> (metodo per inclusione)	123

TRATTAMENTO PRELIMINARE DEL CAMPIONE ED ALLESTIMENTO DILUIZIONI

Materiale occorrente

Natura	Quantità
<ul style="list-style-type: none"> • Diluente (1): Acqua peptonata salina (2) <i>oppure</i> Acqua peptonata tamponata (2) <i>oppure</i> Butterfield's phosphate buffered dilution water (BPBDW) (3) <i>oppure</i> Acqua triptonata 1‰ (4) 	<p>q.b. per ottenere una diluizione 1:10 del campione e le diluizioni successive previste dal metodo</p>

(1) Da scegliere secondo il metodo che si utilizza

(2) ISO

(3) FDA

(4) O.M. 11-10-1978

AVVERTENZA

- Nel caso di alimenti congelati lasciare il campione da analizzare per una notte a +4 °C
- Se è necessario uno scongelamento rapido, porre il campione a temperatura non superiore a 45 °C per un tempo non superiore a 15 minuti
- Usare esclusivamente il diluente acqua peptonata tamponata per prodotti contenenti sostanze inibenti (spezie, pesce sotto sale) o prodotti contenenti microrganismi stressati (es. pH acido)
- La temperatura del diluente deve essere simile a quella del campione da analizzare
- Per omogeneizzare cibi ad alto contenuto di grassi (>20%) aggiungere l'1% di una soluzione sterile al 10% di Tween 80 o altro tensioattivo non tossico
- In caso di alimento ad alta viscosità/igroscopicità può essere aggiunta una maggiore quantità di diluente; di ciò si terrà conto nelle operazioni successive e nell'espressione dei risultati
- Di norma utilizzare il surnatante per effettuare le successive diluizioni decimali. Nel caso di materie grasse di origine animale o vegetale, utilizzare la fase acquosa

A. PER CAMPIONI LIQUIDI

1. ALLESTIMENTO DELLA PRIMA DILUIZIONE

- Prelevare con una pipetta sterile con incertezza di misura pari al $\pm 5\%$ almeno 10 ml di campione, e porli in una beuta sterile
- Aggiungere diluente in quantità da raggiungere un rapporto 1:10 (es. 10 ml in 90 ml)
- Miscelare accuratamente usando un'altra pipetta o agitatore tipo Vortex

B. PER CAMPIONI SOLIDI

1. OMOGENEIZZAZIONE E ALLESTIMENTO DELLA PRIMA DILUIZIONE

Caso 1: con omogeneizzatore a lame rotanti

- Determinare la tara del bicchiere dell'omogeneizzatore
- Pesare sterilmente almeno 10 g di campione con incertezza di misura non superiore al $\pm 5\%$
- Aggiungere il diluente sterile in ragione di 90 ml ogni 10 g di campione pesato (diluizione finale 1:10 p/v, o 10^{-1}). Esempio: 450 ml per 50 g di prodotto
- Omogeneizzare per non più di 2 minuti e 30 secondi, prima a bassa velocità, poi ad alta velocità
- Lasciar depositare i frustoli di alimento

Caso 2: con omogeneizzatore tipo Stomacher

- Determinare la tara del sacchetto
- Pesare sterilmente almeno 10 g di campione nel sacchetto con un'incertezza di misura non superiore al $\pm 5\%$
- Aggiungere 90 ml di diluente ogni 10 g di campione pesato (diluizione finale 1:10 p/v, ovvero 10^{-1})
- Omogeneizzare per 1 o 2 minuti

2. ALLESTIMENTO DELLE DILUIZIONI SUCCESSIVE

- Lasciare a riposo per un massimo di 15 minuti a temperatura ambiente per rivivificare i microrganismi
- Preparare le diluizioni decimali successive aggiungendo 1 ml (con un'incertezza di misura pari $\pm 5\%$ nel quale è compresa l'imprecisione delle pipette usate) della diluizione $10^{-(n-1)}$ a 9 ml di diluente sterile per ottenere la diluizione 10^{-n}
- Allestire le diluizioni decimali successive necessarie sulla base delle caratteristiche microbiologiche della matrice analizzata
- La conclusione della preparazione del campione deve avvenire entro 45 minuti
- Il tempo massimo tra l'allestimento della prima diluizione e le successive deve essere di 30 minuti

Riferimenti bibliografici

- O.M. 11.10.1978: "Limiti di cariche microbiche tollerabili in determinate sostanze alimentari e bevande" (G.U. n. 346 del 13.12.1978)
- ISO 6887/1 1999
- FDA, Bacteriological analytical manual, 8th ed., AOAC Int., Gaithersburg, USA, 1995

ACQUA PEPTONATA SALINA

Materiale occorrente

Composizione	Quantità
• Peptone	1 g
• NaCl	8,5 g
• Acqua distillata	1000 ml

1. PREPARAZIONE

- Diluire il peptone in polvere nell'acqua distillata
- Aggiustare il pH a $7,0 \pm 0,2$ a 25 ± 1 °C
- Ripartire il diluente in contenitori di capacità appropriata
- Sterilizzare in autoclave a 121 ± 1 °C per 15 minuti

2. CONSERVAZIONE (*)

- Temperatura: 0-5 °C
- Stabilità: 1 mese al buio

(*) Se non diversamente specificato dal produttore

Riferimenti bibliografici

- ISO 6887/1 1999

BUTTERFIELD'S PHOSPHATE BUFFERED DILUTION WATER

Materiale occorrente

Composizione	Quantità
• KH ₂ PO ₄	34 g
• Acqua distillata	1000 ml

1. PREPARAZIONE

- Sciogliere 34 g di KH₂PO₄ in 500 ml di acqua distillata
- Aggiustare il pH a 7,0 ± 0,2 con NaOH 1N
- Portare il volume a 1 litro con acqua distillata
- Sterilizzare in autoclave a 121 ± 1 °C per 15 minuti

2. CONSERVAZIONE (*)

- Temperatura: 0-4 °C
- Stabilità: 1 mese

(*) Se non diversamente specificato dal produttore

Riferimenti bibliografici

- FDA, Bacteriological analytical manual, 8th ed., AOAC Int., Gaithersburg, USA, 1995

ACQUA TRIPTONATA 1‰

Materiale occorrente

Composizione	Quantità
• Triptone	1 g
• Acqua distillata	1000 ml

1. PREPARAZIONE

- Sciogliere 1 g di triptone in 1000 ml di acqua distillata
- Aggiustare il pH a 7,0 ± 0,1
- Sterilizzare in autoclave a 121 ± 1 °C per 15 minuti
- Il volume finale dopo sterilizzazione non deve differire di ± 2% rispetto alla misura desiderata

2. CONSERVAZIONE (*)

- Temperatura: 0-4 °C
- Stabilità: 1 mese

(*) Se non diversamente specificato dal produttore

Riferimenti bibliografici

- O.M. 11.10.1978: "Limiti di cariche microbiche tollerabili in determinate sostanze alimentari e bevande" (G.U. n. 346 del 13.12.1978)

ACQUA PEPTONATA TAMPONATA

Materiale occorrente

Composizione	Quantità
• Peptone	10 g
• Cloruro di sodio	5 g
• Sodio fosfato monoacido (Na ₂ HPO ₄ :12H ₂ O)	9 g
• Potassio fosfato biacido (KH ₂ PO ₄)	1,5 g
• Acqua distillata	1000 ml

1. PREPARAZIONE

- Dissolvere i componenti in 1000 ml di acqua distillata riscaldando se necessario
- Aggiustare il pH a 7,0 ± 0,2 a 25 °C
- Ripartire il diluente in contenitori di capacità appropriata
- Sterilizzare in autoclave a 121 ± 1 °C per 15 minuti

2. CONSERVAZIONE (*)

- Temperatura: 0-4 °C
- Stabilità: 1 mese

(*) Se non diversamente specificato dal produttore

Riferimenti bibliografici

- ISO 6887/1 1999

TRATTAMENTO PRELIMINARE DEL CAMPIONE ED ALLESTIMENTO DILUIZIONI PER LE PASTE ALIMENTARI

Materiale occorrente

Natura	Quantità
• Acqua peptonata tamponata	270 ml per ogni unità campionaria
• Acqua peptonata tamponata	q.b. per le diluizioni necessarie, oltre la prima (450 ml per ogni diluizione)

1. ALLESTIMENTO DELLA PRIMA DILUIZIONE

- Prelevare da ciascuna delle 5 unità campionarie, da diversi punti e asepticamente, 30 g di prodotto e trasferirli in 5 sacchetti per Stomacher

AVVERTENZA

- Nel caso di campioni surgelati lasciare una notte a +4 °C prima di prelevare l'aliquota di campione

- Aggiungere 150 ml di Acqua peptonata tamponata e, nel caso di prodotti secchi, mantenere a 4 °C per 1 ora
- Omogeneizzare con Stomacher per 2-3 minuti
- Diluire con 120 ml di Acqua peptonata tamponata (diluizione finale 1:10, o 10⁻¹)
- Dividere in 2 aliquote, una da 250 ml per la ricerca delle Salmonelle, l'altra da 50 ml per le successive diluizioni

2. ALLESTIMENTO DELLE DILUIZIONI SUCCESSIVE

- Allestire, utilizzando l'aliquota di 50 ml, le diluizioni decimali fino a 10⁻⁷, come descritto nella scheda RL P1

Riferimenti bibliografici

- Istituto Superiore di Sanità, Metodiche analitiche per il controllo microbiologico delle paste alimentari, 9, ISTISAN, Roma, 1989

MISURAZIONE DEL pH NEGLI ALIMENTI

Materiale occorrente

Natura	Quantità
• pH-metro (incertezza di misura 0,01 unità pH e 1 °C di temperatura)	
• Soluzioni tampone a pH 7,0 e a pH 4,0	q.b.
• H ₂ O distillata*	q.b.

* Utilizzare H₂O appena distillata (onde evitare l'assorbimento di CO₂) e mantenuta in recipiente di plastica (onde evitare l'assorbimento di ioni dal vetro)

1. PREPARAZIONE

Classe 1: Alimenti liquidi o densi omogenei

- Mescolare accuratamente, eventualmente con un agitatore o una spatola

Classe 2: Alimenti pastosi o solidi

- Omogeneizzare accuratamente, se necessario aggiungendo H₂O distillata in misura non superiore al 10-20% della presa di saggio

Classe 3: Alimenti compositi

- Omogeneizzare separatamente ciascun componente procedendo come al punto precedente

Classe 4: Alimenti sott'olio

- Eliminare la componente oleosa ed omogeneizzare la fase solida operando come alla classe 2

AVVERTENZA

- In caso di alimenti solidi omogenei (carni, formaggi, ecc.) può essere effettuata la misurazione diretta del pH utilizzando l'elettrodo specifico

2. MISURAZIONE

- Procedere secondo le indicazioni fornite dalla ditta produttrice dell'apparecchio per quanto concerne la taratura e le operazioni di determinazione del pH dell'alimento
- È da tener presente che:
 - La taratura deve essere eseguita su soluzioni tampone aventi pH prossimo a quello presunto dell'alimento da determinare
 - La misurazione deve essere effettuata a temperatura ambiente (20-25 °C); è pertanto opportuno accertare, specialmente per gli alimenti precedentemente surgelati, il raggiungimento della temperatura indicata in ogni parte del prodotto tramite misurazione termometrica
 - Effettuare una sola misurazione per gli alimenti liquidi o densi omogenei, effettuare tre misurazioni per tutti gli altri e calcolare la media aritmetica

- Esprimere il risultato ottenuto con una sola cifra decimale indicando la temperatura di misurazione
- L'elettrodo deve essere accuratamente lavato e asciugato dopo ogni misurazione

Riferimenti bibliografici

- ISO 11289/93

MISURAZIONE DELLA aW NEGLI ALIMENTI

Materiale occorrente

Natura	Quantità
• Analizzatore per aW	
• Soluzioni standard per la taratura*	q.b.

* In mancanza di soluzione standard originale, può essere impiegata una soluzione acquosa di NaCl al 9%, tenendo presente che, a 25 °C, l'aW corrispondente è pari a 0,959

1. PREPARAZIONE

- Sminuzzare, se necessario, una porzione di alimento in quantità commisurata alla capacità del contenitore dell'analizzatore. Per ottenere risultati riproducibili è necessario che il campione da misurare sia rappresentativo delle varie componenti dell'alimento
- Chiudere il contenitore per evitare lo scambio di umidità con l'aria dell'ambiente
- Portare il campione a temperatura ambiente (20-25 °C) e procedere alla misurazione nel più breve tempo possibile

2. MISURAZIONE

AVVERTENZA

– La misurazione deve essere effettuata in doppio e, come risultato, deve essere presa in considerazione la media dei valori ottenuti

- Procedere secondo le indicazioni fornite dalla ditta produttrice dell'apparecchio per quanto concerne la taratura e le operazioni di determinazione dell'aW dell'alimento
- È da tener presente che:
 - La frequenza della taratura dello strumento dipende dal numero di campioni da misurare, dalla precisione desiderata, dal tipo di alimento che deve essere misurato e dall'età del sensore
 - Il valore dell'aW indicato dallo strumento è influenzato dalla temperatura alla quale avviene la misurazione nel seguente modo:
 - aumento di 0,002 per ogni grado oltre i 20 °C (fino a 25 °C)
 - diminuzione di 0,002 per ogni grado sotto i 20 °C (fino a 15 °C)

Riferimenti bibliografici

- Shapton D.A. et al., Safe processing of foods, Butterworth, Oxford, England, 1991
- Vanderzant C. et al., Compendium of methods for the microbiological examination of foods, 3rd ed., APHA, Washington, USA, 1992

CONTA MICRORGANISMI AEROBI MESOFILI (METODO PER INCLUSIONE)

Materiale occorrente

Natura	Quantità
• Campione	v. scheda RL P1
• Diluente	v. scheda RL P1
• Plate Count Agar (PCA)*	15-20 ml per piastra
• Agar bianco	4 ml per piastra
• Agar gelisato**	15-20 ml per piastra
• Piastre Petri	2 per diluizione

* Per la conta del latte integrare il PCA con 1 g/l di Skim milk

** Da utilizzare in parallelo al PCA, per inibire i batteri lattici nelle matrici alimentari presuntivamente contenenti flora lattica; nel caso dello yogurt utilizzare il terreno Agar gelisato specifico (v. formula)

1. SEMINA

- Pipettare 1 ml di campione tal quale (se liquido) o 1 ml del campione precedentemente preparato (diluizione 10^{-1} , vedi scheda RL P1) e porlo in ciascuna di 2 piastre Petri
- Cambiare pipetta ad ogni diluizione e procedere pipettando 1 ml delle successive diluizioni in doppio
- Aggiungere in ciascuna piastra circa 15 ml di PCA o Agar gelisato, precedentemente fuso e portato a $45 \pm 0,5$ °C, entro 15 minuti dal punto precedente
- Mescolare uniformemente con movimento rotatorio e lasciar solidificare su superficie orizzontale; nel caso si sospetti crescita in superficie, versare sulla superficie del terreno solidificato altri 4 ml di Agar bianco o dello stesso terreno utilizzato
- Allestire il controllo sterilità pipettando in 1 piastra Petri 1 ml di diluente, versare il PCA o gelisato fuso e procedere nel modo consueto

2. INCUBAZIONE

- Incubare le piastre capovolte in termostato come segue:
- PCA: 30 ± 1 °C per 72 ± 3 ore
- Agar gelisato:
 - 32 ± 1 °C per 48 ± 3 ore (O.M. 11/10/1978)
 - 30 ± 1 °C per 72 ore (paste alimentari fresche)

3. LETTURA ED ESPRESSIONE DEI RISULTATI

- Considerare solo le piastre contenenti 15-300 UFC

• Applicare per il calcolo la formula:
$$N = \frac{C}{(n_1 + 0,1 n_2) d}$$

ove: N = numero di microrganismi/ml o g
 C = somma delle UFC contate su tutte le piastre valide
 n₁ = numero di piastre valide alla prima diluizione considerata
 n₂ = numero di piastre valide alla seconda diluizione considerata
 d = fattore di diluizione corrispondente alla prima diluizione considerata

- Arrotondare il risultato a 2 cifre significative
- Segnare come risultato il numero di microrganismi/ml o g di prodotto moltiplicando per 10^x dove x è la potenza appropriata di 10

Esempio:

- UFC alla prima diluizione valida 10⁻²: 168-215 UFC
- UFC alla seconda diluizione valida 10⁻³: 15-25 UFC

$$N = \frac{168 + 215 + 15 + 25}{[2 + (0,1 \times 2)] \times 10^{-2}} = \frac{423}{0,022} = 19.227$$

Arrotondare a 19.000 UFC/ml o g

- Nel caso in cui le piastre contengano un numero di UFC inferiore a 15, calcolare la media aritmetica delle colonie contate in 2 piastre ed eseguire il risultato come numero di UFC x ml o g tenendo conto del fattore di diluizione. In tali casi dovranno essere segnalati i limiti di confidenza facendo riferimento alla tabella seguente:

Numero di UFC	Limite di confidenza al 95%	
	Inferiore	Superiore
1	< 1	2
2	< 1	4
3	< 1	5
4	1	6
5	2	9
6	2	10
7	2	12
8	3	13
9	4	14
10	4	16
11	5	18
12	6	19
13	7	20
14	7	21
15	8	23

Riferimenti bibliografici

- O.M. 11.10.1978: "Limiti di cariche microbiche tollerabili in determinate sostanze alimentari e bevande" (G.U. n. 346 del 13.12.1978)
- D.M. 26.03.1992: "Attuazione della decisione 91/180/CEE concernente la fissazione dei metodi di analisi e prova relativi al latte crudo e al latte trattato termicamente" (S.O. G.U. n. 90 del 11.04.1992)
- ISO 4833/91
- Istituto Superiore di Sanità, Igiene e microbiologia degli alimenti - Yogurt - controllo microbiologico, 26, ISTISAN, Roma, 1963
- Istituto Superiore di Sanità, Metodiche analitiche per il controllo microbiologico delle paste alimentari, 9, ISTISAN, Roma, 1989

PLATE COUNT AGAR (PCA)

Materiale occorrente

Composizione	Quantità
• Tryptone	5 g
• Estratto di lievito	2,5 g
• Glucosio	1 g
• Agar-agar	12/18 g*
• Acqua distillata	1000 ml
• Latte scremato in polvere**	1 g

* A seconda della polvere gelificante usata

** Integrare la formula del PCA con latte scremato in polvere solo per la conta dei microrganismi nel latte crudo e trattato termicamente

1. PREPARAZIONE

- Dissolvere gli ingredienti in polvere nell'acqua distillata
- Aggiustare a pH 7,0 (a 25 °C)
- Ripartire in contenitori di capacità appropriata
- Sterilizzare in autoclave a 121 ± 1 °C per 15 minuti

2. CONSERVAZIONE

- Temperatura: 2-5 °C
- Stabilità: ≤ 1 mese

Riferimenti bibliografici

- ISO 4833/91

AGAR BIANCO

Materiale occorrente

Composizione	Quantità
• Agar-agar	12/18 g*
• Acqua distillata	1000 ml

* Secondo la polvere gelificante usata

1. PREPARAZIONE

- Dissolvere l'Agar-agar nell'acqua distillata
- Aggiustare a pH 7,0 (a 25 °C)
- Ripartire in contenitori di capacità appropriata
- Sterilizzare in autoclave a 121 ± 1 °C per 15 minuti

2. CONSERVAZIONE

- Temperatura: 2-5 °C
- Stabilità: ≤ 1 mese

Riferimenti bibliografici

- ISO 4833/91

AGAR GELISATO

Materiale occorrente

Composizione	Quantità
• Gelisato al peptone di gelatina	5 g
• Agar	15 g
• Acqua distillata	1000 ml

1. PREPARAZIONE

- Dissolvere gli ingredienti nell'acqua distillata
- Aggiustare a pH 7,0 (a 25 °C)
- Ripartire in contenitori di capacità appropriata
- Sterilizzare in autoclave a 121 ± 1 °C per 20 minuti

2. CONSERVAZIONE

- Temperatura: 2-5 °C
- Stabilità: ≤ 1 mese

Riferimenti bibliografici

- O.M. 11.10.1978: "Limiti di cariche microbiche tollerabili in determinate sostanze alimentari e bevande" (G.U. n. 346 del 13.12.1978)

AGAR GELISATO PER YOGURT

Materiale occorrente

Composizione	Quantità
• Gelisato peptone	7,5 g
• Trypticase peptone	7,5 g
• Sodio cloruro	5 g
• Agar	14 g
• H ₂ O distillata	1000 ml

1. PREPARAZIONE

- Dissolvere gli ingredienti in polvere nell'acqua distillata
- Aggiustare a pH $7,6 \pm 0,1$
- Ripartire in contenitori di capacità appropriata
- Sterilizzare in autoclave a 120 ± 1 °C per 20 minuti

2. CONSERVAZIONE

- Temperatura: 0-5 °C
- Stabilità: ≤ 1 mese

Riferimenti bibliografici

- Istituto Superiore di Sanità, Igiene e microbiologia degli alimenti – Yogurt – controllo microbiologico, 26, ISTISAN, Roma, 1963

CONTA MICRORGANISMI PSICROTROFI

Materiale occorrente

Natura	Quantità
• Campione	v. scheda RL P1
• Diluente	v. scheda RL P1
• Plate Count Agar (PCA)*	15-20 ml per piastra
• Agar bianco	4 ml per piastra
<i>oppure</i>	
• Plate Count Agar (PCA)	4 ml per piastra
• Piastre Petri	2 per diluizione

* Per la conta del latte integrare il PCA con 1 g/l di Skim milk

A. METODO PER INCLUSIONE

1. SEMINA

- Pipettare 1 ml di campione tal quale (se liquido) o 1 ml del campione precedentemente preparato (vedi scheda RL P1) e porlo in ciascuna di 2 piastre Petri (diluizione 10^{-1})
- Cambiare pipetta ad ogni diluizione e procedere pipettando 1 ml delle successive diluizioni in doppio
- Aggiungere in ciascuna piastra circa 15 ml di PCA, precedentemente fuso e portato a $45 \pm 0,5$ °C, entro 15 minuti dal punto precedente
- Mescolare uniformemente con movimento rotatorio e lasciar solidificare su superficie orizzontale
- Nel caso si sospetti crescita in superficie, versare sulla superficie del terreno solidificato altri 4 ml di Agar bianco o dello stesso PCA
- Allestire il controllo sterilità pipettando in 1 piastra Petri 1 ml di diluente, versare il PCA fuso e procedere nel modo consueto
- Incubare le piastre capovolte in termostato a $6,5 \pm 1$ °C per 10 giorni

B. METODO PER SPATOLAMENTO

AVVERTENZA

- Tale metodo è consigliabile per prevenire lo stress da calore dei microrganismi

1. SEMINA

- Pipettare 0,1 ml di campione tal quale (se liquido) o 0,1 ml del campione precedentemente preparato (vedi scheda RL P1) e porlo in ciascuna di due piastre di PCA

- Spatolare l'inoculo sulla superficie del terreno, senza toccare i bordi della piastra, cambiando spatola per ogni piastra
- Ripetere l'operazione per le diluizioni successive
- Incubare le piastre capovolte a $6,5 \pm 1$ °C per 10 giorni

2. LETTURA ED ESPRESSIONE DEI RISULTATI

- Considerare solo le piastre contenenti 15-300 colonie

C

- Applicare per il calcolo la formula: $N = \frac{C}{v(n_1 + 0,1 n_2) d}$

ove: N = numero di microrganismi/ml o g

C = somma delle UFC contate su tutte le piastre ritenute valide

n_1 = numero di piastre ritenute valide alla prima diluizione

n_2 = numero di piastre ritenute valide alla seconda diluizione

d = fattore di diluizione corrispondente alla prima diluizione considerata

v = volume di inoculo applicato ad ogni piastra in ml

- Arrotondare il risultato a 2 cifre significative
- Segnare come risultato il numero di microrganismi psicrotrofi/ml o g di prodotto moltiplicando per 10^x , dove x è la potenza appropriata di 10

Nel caso di rilievo di numeri di colonie inferiore a 15 per piastra, i risultati possono essere espressi utilizzando la seguente formula:

$$N = \frac{y}{v d n}$$

ove: N = numero di microrganismi/ml o g

v = volume di inoculo applicato a ogni piastra in ml

d = fattore di diluizione della sospensione

n = numero di piastre ritenute valide

y = media aritmetica delle colonie contate in entrambe le piastre

Riferimenti bibliografici

- ISO 6730/92
- ISO/DIS 17419/99
- ISO 15214/98
- ISO 13721/95
- ISO 7218/85

CONTA BATTERI LATTICI NELLO YOGURT (METODO PER INCLUSIONE)

Materiale occorrente

Natura	Quantità
• Campione	v. scheda RL P1
• Diluente: acqua triptonata 1‰	v. scheda RL P1
• MRS agar*	15-20 ml per piastra
• M17 agar	15-20 ml per piastra
• Piastre Petri	2 per diluizione per ciascun terreno

* Acidificare l'agar a pH 5,4

AVVERTENZA

- Il presente metodo ha lo scopo di determinare il numero dei batteri lattici nello yogurt in riferimento a quanto indicato nel Telegramma Min. San. prot. 700.3/24.66/707 del 1992 che prevede alla produzione un numero di batteri lattici (inteso come somma di *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* ambedue presenti) $\geq 100.000.000$ - $1.000.000.000/g$ e alla scadenza non inferiore a: 1-5 milioni/g

1. SEMINA

- Seminare 1 ml della diluizione di yogurt 10^{-1} rispettivamente in ciascuna di 2 piastre Petri, aggiungere 15-20 ml per piastra di MRS (per numerazione dei lattobacilli) disciolto in bagnomaria e raffreddato a $45 \pm 0,5$ °C
- Seminare 1 ml della diluizione di yogurt 10^{-1} rispettivamente in ciascuna delle 2 piastre Petri, aggiungere 15-20 ml per piastra di M17 (per numerazione degli streptococchi) disciolto in bagnomaria e raffreddato a $45 \pm 0,5$ °C
- Cambiare pipetta ad ogni diluizione e procedere pipettando 1 ml delle successive diluizioni rispettivamente in 2 piastre, proseguire fino a 10^{-8}
- Allestire il controllo sterilità pipettando in ciascuna di due piastre Petri 1 ml di diluente, versare l'MRS agar e l'M17 agar fusi e procedere nel modo consueto
- Incubare le piastre capovolte in termostato rispettivamente l'MRS a 37 ± 1 °C per 72 ore in microaerofilia e l'M17 a 37 ± 1 °C per 48 ore in aerobiosi

2. LETTURA ED ESPRESSIONE DEI RISULTATI

- Prendere in considerazione solo le piastre in cui si è sviluppato un numero di colonie comprese fra 10 e 300
- Confermare le colonie caratteristiche che su MRS sono lenticolari di 1-3 mm di diametro e in M17 di diametro 1-2 mm
- Eseguire le prove di conferma mediante esame morfologico-microscopico previa colorazione di Gram e prova della catalasi (lattobacilli: bacilli gram positivi, asporigeni, catalasi negativi; streptococchi: cocci gram positivi, disposti a catenelle, catalasi negativi)
- Eseguire la media aritmetica dei singoli conteggi su entrambi i terreni, approssimarla per difetto o per eccesso; moltiplicare il risultato ottenuto per il reciproco della corrispondente diluizione; effettuare la somma dei risultati ottenuti che rappresenta il numero di batteri lattici (UFC) per 1 g di yogurt

Riferimenti bibliografici

- FIL 117A: 1998

CONTA DEI BATTERI LATTICI (METODO PER INCLUSIONE)

Normalmente presenti in: latte, latte acido, derivati del latte, salumi.

Presenti in processi alterativi:

- viscosità superficiale o profonda (in alimenti ricchi di saccarosio)
- inverdimento (per produzione di metaboliti ossidanti)
- inacidimento (per produzione acido lattico)

Materiale occorrente

Natura	Quantità
• Campione	v. scheda RL P1
• Diluente: acqua peptonata salina	v. scheda RL P1
• MRS Agar*	2 piastre per diluizione
• Piastre Petri	2 per diluizione

* A pH 5,7

AVVERTENZA

- In alternativa al metodo per inclusione può essere utilizzato il metodo per spatolamento, utilizzando opportune condizioni di incubazione in anaerobiosi o microaerofilia

1. SEMINA

- Pipettare 1 ml di campione tal quale (se liquido) o 1 ml del campione precedentemente preparato (vedi scheda RL P1) e porlo in ciascuna di due piastre Petri (diluizione 10^{-1})
- Cambiare pipetta ad ogni diluizione e procedere pipettando 1 ml delle successive diluizioni in doppio
- Aggiungere in ciascuna provetta, entro 15 minuti dai punti precedenti, circa 15 ml di MRS agar fuso e portato a $47 \pm 0,5$ °C
- Mescolare uniformemente con movimento orizzontale e lasciare solidificare su superficie orizzontale
- Allestire il controllo sterilità pipettando in una piastra Petri 1 ml di diluente, versare MRS agar fuso e procedere nel modo consueto
- Incubare le piastre capovolte a 30 ± 1 °C per 72 ± 3 ore

2. LETTURA ED ESPRESSIONE DEI RISULTATI

- Prendere in considerazione le piastre con numero compreso tra 15 e 300 colonie
- Calcolare il numero dei batteri lattici presenti nel campione applicando la formula:

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

ove: N = numero di microrganismi/ml o g
 C = somma delle UFC contate su tutte le piastre valide
 n₁ = numero di piastre valide alla prima diluizione considerata
 n₂ = numero di piastre valide alla seconda diluizione considerata
 d = fattore di diluizione corrispondente alla prima diluizione considerata

- Segnare come risultato il numero di batteri lattici/ml o g di prodotto per 10^x, dove x è la potenza appropriata di 10

Esempio:

- UFC alla prima diluizione valida 10⁻²: 168-215 UFC
- UFC alla seconda diluizione valida 10⁻³: 15-25 UFC

$$N = \frac{168 + 215 + 15 + 25}{[2 + (0,1 \times 2)] \times 10^{-2}} = \frac{423}{0,022} = 19.227$$

Arrotondare ed esprimere il risultato come 1,9 x 10⁴ UFC/ml o g

- Nel caso in cui le piastre contengano un numero di UFC inferiore a 15, calcolare la media aritmetica delle colonie contate in due piastre ed esprimere i risultati come numero di batteri lattici/ml per i prodotti liquidi e numero di batteri lattici/g tenendo conto del fattore di diluizione per gli altri prodotti. In tali casi dovranno essere segnalati i limiti di confidenza, facendo riferimento alla tabella seguente:

Numero di UFC	Limite di confidenza al 95%	
	Inferiore	Superiore
1	< 1	2
2	< 1	4
3	< 1	5
4	1	6
5	2	9
6	2	10
7	2	12
8	3	13
9	4	14
10	4	16
11	5	18
12	6	19
13	7	20
14	7	21
15	8	23

- Se in due piastre non si evidenzia crescita di colonie, esprimere i risultati come segue: < 1 UFC/g o ml, tenendo conto del fattore di diluizione

Riferimenti bibliografici

- ISO 13721/95
- ISO 15214/98
- ISO 7218/85

EESCHERICHIA COLI O:157 (METODO QUALITATIVO)

Materiale occorrente

Natura	Quantità
<ul style="list-style-type: none"> • Trypticase soy broth modificato con novobocina (m TSBN) <i>oppure</i> • Buffered peptone water con antibiotici (BPW-VCC) 	225 ml
<ul style="list-style-type: none"> • Mac Conkey sorbitolo agar con o senza MUG (SMAC o SMAC + MUG) 	2 piastre per diluizione
<ul style="list-style-type: none"> • Trypticase soy agar yeast extract (TSAYE) 	q.b.
<ul style="list-style-type: none"> • Sistemi biochimici miniaturizzati 	q.b.
<ul style="list-style-type: none"> • Antisiero O157 	q.b.
<ul style="list-style-type: none"> • Sistemi per la determinazione delle verocitotossine: RPLA, ELISA, cellule VERO, PCR 	q.b.

1. SEMINA

- Effettuare un arricchimento omogeneizzando 25 g di alimento in 225 ml di m TSBN o BPW-VCC
- Incubare a $35-37 \pm 1$ °C per 24 ore; nel caso di alimenti altamente inquinati utilizzare il brodo preriscaldato a 42 °C ed incubare alla stessa temperatura per 6 ore
- Seminare in doppio 0,1 ml di brodo di arricchimento su SMAC o SMAC + MUG
- Incubare a $35-37 \pm 1$ °C per 18-24 ore

AVVERTENZA

- Per aumentare la sensibilità e la selettività del metodo si può utilizzare la tecnica della immunoseparazione magnetica applicata al brodo di arricchimento previamente sottoposto ad incubazione a 35 o 37 ± 1 °C per 6/24 ore

2. LETTURA E CONFERMA

- Trapiantare su TSAYE le colonie sospette incolori (sorbitolo negative) e/o non fluorescenti (MUG negative)
- Incubare a 35 o 37 ± 1 °C per 24 ore
- Effettuare da TSAYE prove biochimiche per la conferma di *E. coli*
- Sottoporre ad agglutinazione con antisiero O157
- Verificare la produzione di verocitotossine con metodo appropriato

3. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

- Per ogni campione esaminato esprimere il risultato come: presenza o assenza di *E. coli* O:157/25 g o ml di prodotto

Riferimenti bibliografici

- Buchanan R.L., (1995) Food Microbiology, 12, 421-424
- Conedera G., (1997) Comunicazione Corso ISS "Controllo delle Tossinfezioni da *Escherichia coli* O157"
- ICMS, Microorganisms in Foods 5, Blackie Academic and Professional, London, England, 1996
- Varnam A.H. et al., Foodborne pathogens, Manson, London, England, 1996
- Vernozy-Rozand C. et al., (1997) Revue Méd. Vet., 148, 3, 169-178
- ISO 16654/99

TRYPTICASE SOY BROTH MODIFICATO CON NOVOBICINA (M TSBN)

Materiale occorrente

Composizione	Quantità
• Trypticase soy broth base	30 g
• Sali biliari	1,12 g
• Fosfato bibasico di potassio	1,5 g
• H ₂ O deionizzata	1000 ml
Soluzione novobiocina	
• Novobiocina	100 mg
• H ₂ O distillata sterile	1 ml

1. PREPARAZIONE

- Diluire gli ingredienti senza la soluzione di novobiocina in 1 litro di H₂O distillata
- Autoclavare a 121 °C per 15 minuti
- Preparare al momento dell'uso la soluzione di novobiocina e sterilizzarla per filtrazione
- Aggiungere sterilmente 0,2 ml di soluzione di novobiocina al terreno base dopo averlo portato a temperatura ambiente

2. CONSERVAZIONE

Trypticase soy broth base

- Temperatura: 0-5 °C
- Stabilità: ≤ 1 mese

Soluzione novobiocina

- Temperatura: 4 °C
- Stabilità: ≤ 1 mese al buio

BUFFERED PEPTONE WATER CON ANTIBIOTICI (BPW-VCC)

Materiale occorrente

Composizione	Quantità
• Peptone	10 g
• NaCl	5 g
• Fosfato bibasico di sodio	3,5 g
• Fosfato monobasico di potassio	1,5 g
• H ₂ O deionizzata	1000 ml
Soluzione VCC	
• Vancomicina	8 mg
• Cefixime	0,05 mg
• Cefsulodine	10 mg

1. PREPARAZIONE

- Diluire gli ingredienti senza la soluzione di VCC in 1 litro di H₂O distillata
- Autoclavare a 121 °C per 15 minuti
- Preparare al momento dell'uso la soluzione di VCC e sterilizzarla per filtrazione
- Aggiungere sterilmente la soluzione di VCC

2. CONSERVAZIONE

Buffered peptone water base

- Temperatura: 0-5 °C
- Stabilità: ≤ 1 mese

Soluzione VCC

- Temperatura: 4 °C
- Stabilità: ≤ 1 mese al buio

CONTA COLIFORMI (METODO MPN)

Materiale occorrente

Natura	Quantità
• Campione	v. scheda RL P1
• Diluente	v. scheda RL P1
• Brodo lauryl solfato triptosio 2x (LST)	3 tubi (10 ml x tubo da 20 x 200 mm + campanula Durham)
• Brodo lauryl solfato triptosio 1x (LST)	3 tubi per ogni diluizione (10 ml x tubo da 16 x 160 mm + campanula Durham)
• Brodo lattosio bile verde brillante	q.b. (10 ml x tubo da 16 x 160 mm + campanula Durham)

1. SEMINA

- Inseminare 3 tubi di LST doppio concentrato ciascuno con 10 ml di campione tal quale, se liquido, o del campione omogeneizzato (diluizione 10⁻¹) precedentemente preparato (vedi scheda RL P1)
- Inseminare 3 tubi di LST a concentrazione semplice ciascuno con 1 ml di campione tal quale se liquido o con 1 ml della diluizione 10⁻¹
- Inseminare 3 tubi di LST a concentrazione semplice ciascuno con 1 ml delle successive diluizioni
- Allestire il controllo sterilità pipettando in ciascuno dei 2 tubi di LST 2x e LST 1x rispettivamente 10 ml ed 1 ml di diluente e procedere nel modo consueto
- Incubare a 30 ± 1 °C o 35-37 ± 1 °C (1) per 24 ore ± 2 ore; se dopo tale periodo non si osserva formazione di gas in tutti i tubi, incubare per altre 24 ± 2 ore

2. LETTURA E CONFERMA

- Da ciascun tubo presunto positivo (intorbidamento e formazione di gas) prelevare un'ansata (ansa da 10 µl) di brodocoltura e inseminare 1 provetta di bile lattosio verde brillante
- Incubare a 30 ± 1 °C o 35-37 ± 1 °C (1) per 48 ± 2 ore
- Al termine dell'incubazione considerare positivi tutti i tubi che presentano intorbidamento e formazione di gas

(1) La temperatura di incubazione dipende dalla finalità del controllo microbiologico:
 - 30 °C se per finalità di controllo tecnologico-produttivo
 - 35-37 °C se per finalità di Sanità Pubblica

3. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Per ogni campione esaminato, selezionare tre diluizioni consecutive in accordo ad uno dei seguenti casi:

Caso 1: Presenza di almeno una diluizione che mostri tre provette positive

Selezionare la diluizione più elevata (quella con la più bassa concentrazione di campione) che mostri tre provette positive e le due diluizioni più elevate (quelle presentanti una concentrazione del campione di 1/10 e 1/100 della prima diluizione) (vedi es. 1 Tabella 1).

Vedi anche il caso n. 3.

Se è stato allestito un numero insufficiente di diluizioni oltre alla diluizione più alta, che mostra tre provette positive, selezionare le tre diluizioni più alte della serie (quelle che presentano la più bassa concentrazione del campione) (vedi es. 2 Tabella 1).

Caso 2: Nessuna diluizione presenta tre provette positive

Il caso n. 1 non può essere applicato, selezionare le tre diluizioni più elevate nelle serie (quelle presentanti la più bassa concentrazione del campione) tra le quali almeno una provetta sia risultata positiva (vedi es. 3 Tabella 1).

Vedi anche il caso n. 3.

Caso 3: Casi speciali

In tutti i casi in cui più di una delle tre diluizioni scelte in accordo con i casi n. 1 e n. 2 non presenti provette positive, selezionare, da queste diluizioni, le più basse che non presentino provette positive (quelle con la più elevata concentrazione del campione) e le due successive diluizioni della serie (quelle presentanti la concentrazione del campione 10 volte e 100 volte superiore alla prima diluizione selezionata) (vedi es. 4 e 5 Tabella 1), salvo quando non si trovino provette positive a livello della prima diluizione preparata a partire dal campione. In questo ultimo caso è necessario selezionare le prime tre diluizioni per il calcolo del MPN includendo anche le serie che riportano provette negative.

Secondo il numero di unità campionarie esaminate, verificare nelle Tabelle B1 o B2 se le sequenze dei numeri relativi alle provette, che corrispondono alle diluizioni scelte secondo gli specifici casi, sono accettabili. L'accettabilità dipende dal numero dei campioni esaminati e dalla conseguente categoria.

Per esempio, se si accetta solamente la categoria 1, la sequenza 221 è accettabile solamente quando siano stati sottoposti ad analisi 10 campioni (del gruppo considerato). Tuttavia, se si accetta la categoria meno restrittiva 2, la sequenza 221 è accettabile solamente quando sono stati esaminati 2, 3 o 5 campioni. Quando la sequenza 221 è il risultato di un singolo esame, non è mai accettabile.

4. CATEGORIE DI RISULTATI

Prima di iniziare la prova è necessario decidere quale categoria accettare. Trattandosi di analisi ufficiali, bisognerebbe accettare solamente il risultato della categoria 1 o, tutt'al più, quelli delle categorie 1 e 2.

Categorie	Definizione
1	Quando il numero di microrganismi nel prodotto sottoposto a prova è uguale al valore di MPN trovato, il risultato è uno di quelli che ha la maggior probabilità di essere ottenuto. Esiste tuttavia il 5% di probabilità di ottenere un risultato che è meno probabile all'interno di questa categoria
2	Quando il numero di microrganismi nel prodotto sottoposto a prova è uguale al valore di MPN trovato, il risultato è uno di quelli che ha meno probabilità di essere ottenuto, rispetto al meno probabile della categoria 1. Esiste tuttavia l'1% di probabilità di ottenere un risultato che è meno probabile all'interno di questa categoria
3	Quando il numero di microrganismi nel prodotto sottoposto a prova è uguale al valore di MPN trovato, il risultato è uno di quelli che ha meno probabilità di essere ottenuto, rispetto al meno probabile della categoria 2. Esiste tuttavia lo 0,1% di probabilità di ottenere un risultato che è meno probabile all'interno di questa categoria
0	Quando il numero di microrganismi nel prodotto sottoposto a prova è uguale al valore di MPN trovato, il risultato è uno di quelli che ha meno probabilità di essere ottenuto, rispetto al meno probabile della categoria 3. Un risultato ha soltanto lo 0,1% di probabilità di essere vero

Per ogni sequenza dimostratasi accettabile in accordo con i criteri statistici sopra ricordati, ricavare l'indice MPN utilizzando le Tabelle B1 e B2.

5. CALCOLO DEL NUMERO PIÙ PROBABILE (MPN)

Il numero più probabile di *Coliformi* per ml o per grammo di prodotto si ottiene moltiplicando l'indice MPN per il reciproco della più bassa diluizione selezionata (es. quella presentante la più elevata concentrazione del campione). Quando la diluizione più bassa corrisponde alle provette contenenti il terreno doppio concentrato (inoculato con 10 ml) dividere prima l'indice MPN per 10. Esprimere i risultati come il numero compreso tra 1,0 e 9,9 moltiplicato per 10^n , dove n è la potenza appropriata di 10.

Tabella 1 – Scelta dei risultati positivi per il calcolo del valore del MPN

Esempio	Numero di provette positive ottenute partendo da tre provette incubate per le seguenti quantità di campione inoculato per ogni provetta (1)						MPN (2)	
	Prodotto liquido	10 ml	1 ml	10 ⁻¹ ml	10 ⁻² ml	10 ⁻³ ml	Prodotti liquidi ml ⁻¹	Altri prodotti g ⁻¹
	Altri prodotti	1 g	10 ⁻¹ g	10 ⁻² g	10 ⁻³ g	10 ⁻⁴ g		
1		3	3	2	1	0	1,5 10 ⁻¹	1,5 10 ⁻²
2		3	3	3	0		2,4 10 ⁻¹	2,4 10 ⁻²
3		2	2	1	1	0	7,4	7,4 10 ⁻¹
4		3	3	0	0	0	2,4	2,4 10 ⁻¹
5		2	2	0	1	0	2,1 10 ⁻¹	2,1

(1) La combinazione scelta è evidenziata in grassetto
 (2) Calcolo partendo dal coefficiente MPN per tre provette

Riferimenti bibliografici

- ISO 4831/91
- FDA, Bacteriological analytical manual, 8th ed., AOAC Int., Gaithersburg, USA, 1995

Tabella MPN

Tabella B1 – Tabella MPN per 3 x 1 g (ml), 3 x 0,1 g (ml) 3 x 0,01 g (ml)

Numero di risultati positivi	Coefficiente MPN	Categoria di risultati* riferita al numero di unità campione testate per lotto					Limite di confidenza			
		1	2	3	5	10	≥ 95%	≥ 95%	≥ 99%	≥ 99%
0 0 0	< 0,30						0,00	0,94	0,00	1,40
0 0 1	0,30	3	2	2	2	1	0,01	0,95	0,00	1,40
0 1 0	0,30	2	1	1	1	1	0,01	1,00	0,00	1,60
0 1 1	0,61	0	3	3	3	3	0,12	1,70	0,05	2,50
0 2 0	0,62	3	2	2	2	1	0,12	1,70	0,05	2,50
0 3 0	0,94	0	0	0	0	3	0,35	0,50	0,18	4,60
1 0 0	0,36	1	1	1	1	1	0,02	1,70	0,01	2,50
1 0 1	0,72	2	2	1	1	1	0,12	1,70	0,05	2,50
1 0 2	1,1	0	0	0	3	3	0,4	3,5	0,2	4,6
1 1 0	0,74	1	1	1	1	1	0,13	2,00	0,06	2,70
1 1 1	1,1	3	3	2	2	2	0,4	3,5	0,2	4,6
1 2 0	1,1	2	2	1	1	1	0,4	3,5	0,2	4,6
1 2 1	1,5	3	3	3	3	2	0,5	3,8	0,2	5,2
1 3 0	1,6	3	3	3	3	2	0,5	3,8	0,2	5,2
2 0 0	0,92	1	1	1	1	1	0,15	3,50	0,07	4,60
2 0 1	1,4	2	1	1	1	1	0,4	3,5	0,2	4,6
2 0 2	2,0	0	3	3	3	3	0,5	3,8	0,2	5,2
2 1 0	1,5	1	1	1	1	1	0,4	3,8	0,2	5,2
2 1 1	2,0	2	2	1	1	1	0,5	3,8	0,2	5,2
2 1 2	2,7	0	3	3	3	3	0,9	9,4	0,5	14,2
2 2 0	2,1	1	1	1	1	1	0,5	4,0	0,2	5,6
2 2 1	2,8	3	2	2	2	1	0,9	9,4	0,5	14,2
2 2 2	3,5	0	0	0	0	3	0,9	9,4	0,5	14,2
2 3 0	2,9	3	2	2	2	1	0,9	9,4	0,5	14,2
2 3 1	3,6	0	3	3	3	3	0,9	9,4	0,5	14,2
3 0 0	2,3	1	1	1	1	1	0,5	9,4	0,3	14,2
3 0 1	3,8	1	1	1	1	1	0,9	10,4	0,5	15,7
3 0 2	6,4	3	3	2	2	2	1,6	18,1	1,0	25,0
3 1 0	4,3	1	1	1	1	1	0,9	18,1	0,5	25,0
3 1 1	7,5	1	1	1	1	1	1,7	19,9	1,1	27,0
3 1 2	12	3	2	2	2	1	3	36	2	44
3 1 3	18	0	0	0	3	3	3	38	2	52
3 2 0	9,3	1	1	1	1	1	1,8	36,0	1,2	43,0
3 2 1	15	1	1	1	1	1	3	38	2	52
3 2 2	21	2	1	1	1	1	3	40	2	56
3 2 3	29	3	3	3	2	2	9	99	5	152
3 3 0	24	1	1	1	1	1	4	99	3	152
3 3 1	46	1	1	1	1	1	9	198	2	283
3 3 2	110	1	1	1	1	1	20	400	10	570
3 3 3	> 110									

* Per le categorie di risultato vedere Tabella di cui al punto 4

Tabella B2 – Tabella MPN per 5 x 1 g (ml), 5 x 0,1 g (ml) 5 x 0,01 g (ml)

Numero di risultati positivi	Coefficiente MPN	Categoria di risultati* riferita al numero di unità campione testate per lotto					Limite di confidenza			
		1	2	3	5	10	≥ 95%	≥ 95%	≥ 99%	≥ 99%
0 0 0	< 0,18						0,00	0,65	0,00	0,93
0 0 1	0,18	2	2	2	1	1	0,00	0,65	0,00	0,93
0 1 0	0,18	2	2	2	1	1	0,01	0,65	0,00	0,93
0 1 1	0,36	3	3	3	2	2	0,07	0,99	0,02	1,40
0 2 0	0,37	3	2	2	2	1	0,07	0,99	0,02	1,40
0 2 1	0,55	0	0	0	3	3	0,17	1,40	0,09	2,10
0 3 0	0,56	0	3	3	3	3	0,17	1,40	0,09	2,10
1 0 0	0,20	1	1	1	1	1	0,02	0,99	0,01	1,40
1 0 1	0,40	2	1	1	1	1	0,07	1,00	0,02	1,40
1 0 2	0,60	0	0	3	3	3	0,17	1,40	0,09	2,10
1 1 0	0,40	1	1	1	1	1	0,07	1,10	0,03	1,40
1 1 1	0,61	3	2	2	2	1	0,17	1,40	0,09	2,10
1 1 2	0,81	0	0	0	0	3	0,33	2,20	0,20	2,80
1 2 0	0,61	2	1	1	1	1	0,18	1,40	0,09	2,10
1 2 1	0,82	3	3	3	3	2	0,33	2,20	0,20	2,80
1 3 0	0,83	3	3	3	3	2	0,33	2,20	0,20	2,80
1 3 1	1,0	0	0	0	0	3	0,3	2,2	0,2	2,8
1 4 0	1,1	0	0	0	0	3	0,3	2,2	0,2	2,8
2 0 0	0,45	1	1	1	1	1	0,08	1,4	0,04	2,10
2 0 1	0,68	2	1	1	1	1	0,18	1,50	0,09	2,10
2 0 2	0,91	0	3	3	3	3	0,33	2,20	0,20	2,80
2 1 0	0,68	1	1	1	1	1	0,19	1,70	0,10	2,30
2 1 1	0,92	2	2	1	1	1	0,33	2,20	0,20	2,80
2 1 2	1,2	0	0	3	3	3	0,4	2,5	0,2	3,4
2 2 0	0,93	1	1	1	1	1	0,34	2,20	0,20	2,80
2 2 1	1,2	3	3	2	2	2	0,4	2,5	0,2	3,4
2 2 2	1,4	0	0	0	0	3	0,6	3,4	0,4	4,4
2 3 0	1,2	2	2	2	2	1	0,4	2,5	0,2	3,4
2 3 1	1,4	0	3	3	3	3	0,6	3,4	0,4	4,4
2 4 0	1,5	0	3	3	3	3	0,6	3,4	0,4	4,4
3 0 0	0,78	1	1	1	1	1	0,21	2,20	0,12	2,80
3 0 1	1,1	1	1	1	1	1	0,4	2,2	0,2	2,9
3 0 2	1,3	3	3	3	2	2	0,6	3,4	0,4	4,4
3 1 0	1,1	1	1	1	1	1	0,4	2,5	0,2	3,4
3 1 1	1,4	2	1	1	1	1	0,6	3,4	0,4	4,4
3 1 2	1,7	3	3	3	3	2	0,6	3,4	0,4	4,4
3 2 0	1,4	1	1	1	1	1	0,6	3,4	0,4	4,4
3 2 1	1,7	2	2	2	1	1	0,7	3,9	0,5	5,1
3 2 2	2,0	0	3	3	3	3	0,7	3,9	0,5	5,2
3 3 0	1,7	2	2	1	1	1	0,7	3,9	0,5	5,2
3 3 1	2,1	3	3	3	2	2	0,7	3,9	0,5	5,2
3 3 2	2,4	0	0	0	3	3	1,0	6,6	0,7	9,4
3 4 0	2,1	3	3	2	2	2	0,7	4,0	0,5	5,2
3 4 1	2,4	0	3	3	3	3	1,0	6,6	0,7	9,4
3 5 0	2,5	0	0	0	3	3	1,0	6,6	0,7	9,4
4 0 0	1,3	1	1	1	1	1	0,4	3,4	0,3	4,4
4 0 1	1,7	1	1	1	1	1	0,5	3,4	0,4	4,4

* Per le categorie di risultato vedere Tabella di cui al punto 4

(segue) Tabella B2 – Tabella MPN per 5 x 1 g (ml), 5 x 0,1 g (ml) 5 x 0,01 g (ml)

Numero di risultati positivi	Coefficiente MPN	Categoria di risultati* riferita al numero di unità campione testate per lotto					Limite di confidenza			
		1	2	3	5	10	≥ 95%	≥ 95%	≥ 99%	≥ 99%
4 0 2	2,1	3	2	2	2	2	0,7	3,9	0,5	5,2
4 0 3	2,5	0	0	0	0	3	1,0	6,6	0,7	9,4
4 1 0	1,7	1	1	1	1	1	0,6	3,9	0,4	5,1
4 1 1	2,1	1	1	1	1	1	0,7	4,1	0,5	5,3
4 1 2	2,6	3	3	2	2	2	1,0	6,6	0,7	9,4
4 1 3	3,1	0	0	0	0	3	1,0	6,6	0,7	9,4
4 2 0	2,2	1	1	1	1	1	0,7	4,8	0,5	6,1
4 2 1	2,6	2	1	1	1	1	1,0	6,6	0,7	9,4
4 2 2	3,2	3	3	3	2	2	1,0	6,6	0,7	9,4
4 2 3	3,8	0	0	0	0	3	1,3	10,0	0,9	14,7
4 3 0	2,7	1	1	1	1	1	1,0	6,6	0,7	9,4
4 3 1	3,3	2	2	1	1	1	1,0	6,6	0,7	9,4
4 3 2	3,9	3	3	3	3	2	1,3	10,0	0,9	14,7
4 4 0	3,4	2	2	1	1	1	1,3	10,0	0,9	14,7
4 4 1	4,0	3	3	2	2	2	1,3	10,0	0,9	14,7
4 4 2	4,7	0	0	0	3	3	1,4	11,3	0,9	14,7
4 5 0	4,1	3	3	3	3	2	1,3	10,0	0,9	14,7
4 5 1	4,8	0	0	3	3	3	1,4	11,3	0,9	14,7
5 0 0	2,3	1	1	1	1	1	0,7	6,6	0,5	9,4
5 0 1	3,1	1	1	1	1	1	1,0	6,6	0,7	9,4
5 0 2	4,3	3	2	2	2	1	0,3	10,0	0,9	14,7
5 0 3	5,8	0	0	0	3	3	2,1	14,9	1,4	20,0
5 1 0	3,3	1	1	1	1	1	1,0	10,0	0,7	14,7
5 1 1	4,6	1	1	1	1	1	1,4	11,3	0,9	14,7
5 1 2	6,3	2	2	1	1	1	2,1	14,9	1,4	20,0
5 1 3	8,4	3	3	3	3	2	3,4	11,0	2,1	27,0
5 2 0	4,9	1	1	1	1	1	1,5	14,9	0,9	20,0
5 2 1	7,0	1	1	1	1	1	2,2	16,8	1,4	23,0
5 2 2	9,4	2	2	1	1	1	3,4	22,0	2,1	28,0
5 2 3	12	3	3	2	2	2	3	24	2	32
5 2 4	15	0	0	0	0	3	6	35	4	45
5 3 0	7,9	1	1	1	1	1	2,3	22,0	1,5	27,0
5 3 1	11	1	1	1	1	1	3	24	2	32
5 3 2	14	1	1	1	1	1	5	35	3	45
5 3 3	17	3	2	2	2	1	7	39	4	51
5 3 4	21	3	3	3	3	2	7	39	4	51
5 4 0	13	1	1	1	1	1	3	35	3	45
5 4 1	17	1	1	1	1	1	6	39	4	51
5 4 2	22	1	1	1	1	1	7	44	4	57
5 4 3	28	2	1	1	1	1	10	70	6	92
5 4 4	35	2	2	2	1	1	10	70	6	92
5 4 5	43	0	0	3	3	3	15	106	9	150
5 5 0	24	1	1	1	1	1	7	70	4	92
5 5 1	35	1	1	1	1	1	10	106	6	150
5 5 2	54	1	1	1	1	1	15	166	10	223
5 5 3	92	1	1	1	1	1	23	253	15	338
5 5 4	160	1	1	1	1	1	40	460	20	620
5 5 5	> 160									

* Per le categorie di risultato vedere Tabella di cui al punto 4

Calcolare l'indice MPN; nel caso di inoculo di 10 ml di campione liquido nella prima serie di provette, il valore per grammo di alimento è rappresentato da MPN:10; nel caso di inoculo di 10 ml della soluzione madre (10^{-1}) nella prima tripletta di provette, l'indice MPN rappresenta il valore per grammo di alimento.

Riferimenti bibliografici

- ISO 4831/91
- FDA, Bacteriological analytical manual, 8th ed., AOAC Int., Gaithersburg, USA, 1995

**CONTA COLIFORMI
(METODO PER INCLUSIONE)**

AVVERTENZA

- Il metodo per inclusione presenta, rispetto al metodo MPN, maggiore precisione e minore sensibilità

Materiale occorrente

Natura	Quantità
• Campione	v. scheda RL P1
• Diluente	v. scheda RL P1
• Agar lattosio, bile, cristalvioletto, rosso neutro (VRBL)*	circa 40 ml per ogni diluizione
• Piastre Petri	2 piastre per ogni diluizione

* Utilizzare il terreno entro 3 ore dalla preparazione

1. SEMINA

- Pipettare 1 ml di campione (se liquido) o 1 ml del campione, se solido, precedentemente preparato (vedi scheda RL P1) e porlo in ciascuna di 2 piastre Petri
- Pipettare 1 ml di ciascuna delle diluizioni successive allestendo 2 piastre per ogni diluizione e cambiando ogni volta pipetta
- Versare nelle piastre circa 15 ml di VRBL precedentemente fuso e mantenuto a $45 \pm 0,5$ °C e mescolare accuratamente per rotazione, coprire e lasciare solidificare su superficie orizzontale
- Aggiungere, sulla superficie solidificata delle piastre, all'incirca 4 ml di VRBL a $45 \pm 0,5$ °C e lasciare solidificare
- Allestire il controllo sterilità pipettando in una piastra Petri 1 ml di diluente, versare circa 15 ml di VRBL fuso e procedere nel modo corretto
- Incubare a 30 ± 1 °C, 35-37 °C (1) per 24 ore \pm 2 ore

(1) La temperatura di incubazione dipende dalla finalità del controllo microbiologico:
 - 30 °C se per finalità di controllo tecnologico-produttivo
 - 35-37 °C se per finalità di Sanità Pubblica

2. LETTURA ED ESPRESSIONE DEI RISULTATI

- Contare le colonie con aspetto caratteristico: colore violaceo, generalmente contornate da una zona rossastra di precipitato di bile, di diametro $\geq 0,5$ mm
- Prendere in considerazione le piastre con numero compreso tra 15 e 300 colonie
- Calcolare il numero dei batteri presenti nel campione applicando la formula:

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

- ove: N = numero di microrganismi/ml o g
 C = somma delle UFC contate su tutte le piastre valide
 n₁ = numero di piastre valide alla prima diluizione
 n₂ = numero di piastre valide alla seconda diluizione
 d = fattore di diluizione corrispondente alla prima diluizione considerata

- Segnare come risultato il numero di batteri/ml o g di prodotto per 10^x, dove x è la potenza appropriata di 10

Esempio:

- UFC alla prima diluizione valida 10⁻²: 168-215 UFC
- UFC alla seconda diluizione valida 10⁻³: 15-25 UFC

$$N = \frac{168 + 215 + 15 + 25}{[2 + (0,1 \times 2)] \times 10^{-2}} = \frac{423}{0,022} = 19.227$$

Arrotondare a 19.000 UFC/ml o g ed esprimere il risultato come 1,9 x 10⁴ UFC/ml o g

- Nel caso in cui le piastre contengano un numero di UFC inferiore a 15, calcolare la media aritmetica delle colonie contate in due piastre ed esprimere i risultati come numero di batteri/ml per i prodotti liquidi e numero di batteri/g tenendo conto del fattore di diluizione per gli altri prodotti. In tali casi dovranno essere segnalati i limiti di confidenza, facendo riferimento alla tabella seguente:

Numero di UFC	Limite di confidenza al 95%	
	Inferiore	Superiore
1	< 1	2
2	< 1	4
3	< 1	5
4	1	6
5	2	9
6	2	10
7	2	12
8	3	13
9	4	14
10	4	16
11	5	18
12	6	19
13	7	20
14	7	21
15	8	23

- Se in due piastre non si evidenzia crescita di colonie, esprimere i risultati come segue: < 1 UFC/g o ml, tenendo conto del fattore di diluizione

Riferimenti bibliografici

- ISO 4832/91

ESCHERICHIA COLI (METODO MPN)

Materiale occorrente

Natura	Quantità
• Campione	v. scheda RL P1
• Diluente	v. scheda RL P1
• Brodo lauryl solfato triptosio 2x (LST)	3 tubi (10 ml x tubo da 20 x 200 mm + campanula Durham)
• Brodo lauryl solfato triptosio 1x (LST)	3 tubi per ogni diluizione (10 ml x tubo da 16 x 160 mm + campanula Durham)
• Brodo <i>E. coli</i>	q.b. (10 ml x tubo da 16 x 160 mm + campanula Durham)
• Acqua triptonata 1%	q.b. (5/10 ml per tubo da 16 x 160 mm)
• Reattivo Kovacs	q.b.

1. SEMINA

- Inseminare 3 tubi di LST doppio concentrato ciascuno con 10 ml di campione tal quale, se liquido, o del campione omogeneizzato (diluizione 10^{-1}) precedentemente preparato (vedi scheda RL P1)
- Inseminare 3 tubi di LST a concentrazione semplice ciascuno con 1 ml di campione tal quale se liquido o con 1 ml della diluizione 10^{-1}
- Inseminare 3 tubi di LST a concentrazione semplice ciascuno con 1 ml delle successive diluizioni
- Allestire il controllo di sterilità pipettando in 2 tubi di LST 2x e LST 1x rispettivamente 10 ml ed 1 ml diluente e procedere nel modo consueto
- Incubare a 35 ± 1 °C o 37 ± 1 °C per 24 ore \pm 2 ore; se dopo tale periodo non si osserva formazione di gas in tutti i tubi, incubare per altre 24 ore

2. LETTURA E CONFERMA

- Da ciascun tubo presunto positivo (intorbidamento e formazione di gas) prelevare un'ansata (ansa da 10 μ l) di brodocoltura e inseminare 1 provetta di Brodo *E. coli*
- Incubare a $45 \pm 0,5$ °C per 24 ± 2 ore, se dopo tale periodo non si osserva formazione di gas in tutti i tubi, incubare per altre 24 ore
- Da ciascun tubo positivo di Brodo *E. coli* (intorbidamento e formazione di gas) prelevare un'ansata di brodocoltura e inseminare una provetta di acqua triptonata 1%
- Incubare a $45 \pm 0,5$ °C per 48 ore
- Aggiungere 0,5 ml di reattivo di Kovacs a ciascun tubo di acqua triptonata, attendere un minuto lo sviluppo di colorazione rossa, indice di positività

3. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

Per ogni campione esaminato, selezionare tre diluizioni consecutive in accordo ad uno dei seguenti casi:

Caso 1: Presenza di almeno una diluizione che mostri tre provette positive

Selezionare la diluizione più elevata (quella con la più bassa concentrazione di campione) che mostri tre provette positive e le due diluizioni più elevate (quelle presentanti una concentrazione del campione di 1/10 e 1/100 della prima diluizione) (vedi es. 1 Tabella 1).

Vedi anche il caso n. 3.

Se è stato allestito un numero insufficiente di diluizioni oltre alla diluizione più alta, che mostra tre provette positive, selezionare le tre diluizioni più alte della serie (quelle che presentano la più bassa concentrazione del campione) (vedi es. 2 Tabella 1).

Caso 2: Nessuna diluizione presenta tre provette positive

Il caso n. 1 non può essere applicato, selezionare le tre diluizioni più elevate nelle serie (quelle presentanti la più bassa concentrazione del campione) tra le quali almeno una provetta sia risultata positiva (vedi es. 3 Tabella 1).

Vedi anche il caso n. 3.

Caso 3: Casi speciali

In tutti i casi in cui più di una delle tre diluizioni scelte in accordo con i casi n. 1 e n. 2 non presenti provette positive, selezionare, da queste diluizioni, le più basse che non presentino provette positive (quelle con la più elevata concentrazione del campione) e le due successive diluizioni della serie (quelle presentanti la concentrazione del campione 10 volte e 100 volte superiore alla prima diluizione selezionata) (vedi es. 4 e 5 Tabella 1), salvo quando non si trovino provette positive a livello della prima diluizione preparata a partire dal campione. In questo ultimo caso è necessario selezionare le prime tre diluizioni per il calcolo del MPN includendo anche le serie che riportano provette negative.

Secondo il numero di unità campionarie esaminate, verificare nelle Tabelle B1 o B2, se le sequenze dei numeri relativi alle provette, che corrispondono alle diluizioni scelte secondo gli specifici casi, sono accettabili. L'accettabilità dipende dal numero dei campioni esaminati e dalla conseguente categoria.

Per esempio, se si accetta solamente la categoria 1, la sequenza 221 è accettabile solamente quando siano stati sottoposti ad analisi 10 campioni (del gruppo considerato). Tuttavia, se si accetta la categoria meno restrittiva 2, la sequenza 221 è accettabile solamente quando sono stati esaminati 2, 3 o 5 campioni. Quando la sequenza 221 è il risultato di un singolo esame, non è mai accettabile.

4. CATEGORIE DI RISULTATI

Prima di iniziare la prova è necessario decidere quale categoria accettare. Trattandosi di analisi ufficiali, bisognerebbe accettare solamente il risultato della categoria 1 o, tutt'al più, quelli delle categorie 1 e 2.

Categorie	Definizione
1	Quando il numero di microrganismi nel prodotto sottoposto a prova è uguale al valore di MPN trovato, il risultato è uno di quelli che ha la maggior probabilità di essere ottenuto. Esiste tuttavia il 5% di probabilità di ottenere un risultato che è meno probabile all'interno di questa categoria
2	Quando il numero di microrganismi nel prodotto sottoposto a prova è uguale al valore di MPN trovato, il risultato è uno di quelli che ha meno probabilità di essere ottenuto, rispetto al meno probabile della categoria 1. Esiste tuttavia l'1% di probabilità di ottenere un risultato che è meno probabile all'interno di questa categoria
3	Quando il numero di microrganismi nel prodotto sottoposto a prova è uguale al valore di MPN trovato, il risultato è uno di quelli che ha meno probabilità di essere ottenuto, rispetto al meno probabile della categoria 2. Esiste tuttavia lo 0,1% di probabilità di ottenere un risultato che è meno probabile all'interno di questa categoria
0	Quando il numero di microrganismi nel prodotto sottoposto a prova è uguale al valore di MPN trovato, il risultato è uno di quelli che ha meno probabilità di essere ottenuto, rispetto al meno probabile della categoria 3. Un risultato ha soltanto lo 0,1% di probabilità di essere vero

Per ogni sequenza dimostratasi accettabile in accordo con i criteri statistici sopra ricordati, ricavare l'indice MPN utilizzando le Tabelle B1 e B2.

5. CALCOLO DEL NUMERO PIÙ PROBABILE (MPN)

Il numero più probabile di *E. coli* per ml o per grammo di prodotto si ottiene moltiplicando l'indice MPN per il reciproco della più bassa diluizione selezionata (es. quella presentante la più elevata concentrazione del campione). Quando la diluizione più bassa corrisponde alle provette contenenti il terreno doppio concentrato (inoculato con 10 ml) dividere prima l'indice MPN per 10. Esprimere i risultati come il numero compreso tra 1,0 e 9,9 moltiplicato per 10^n , dove n è la potenza appropriata di 10.

Tabella 1 – Scelta dei risultati positivi per il calcolo del valore del MPN

Esempio	Numero di provette positive ottenute partendo da tre provette incubate per le seguenti quantità di campione inoculato per ogni provetta (1)						MPN (2)	
	Prodotto liquido	10 ml	1 ml	10 ⁻¹ ml	10 ⁻² ml	10 ⁻³ ml	Prodotti liquidi ml ⁻¹	Altri prodotti g ⁻¹
	Altri prodotti	1 g	10 ⁻¹ g	10 ⁻² g	10 ⁻³ g	10 ⁻⁴ g		
1		3	3	2	1	0	1,5 10 ⁻¹	1,5 10 ⁻²
2		3	3	3	0		2,4 10 ⁻¹	2,4 10 ⁻²
3		2	2	1	1	0	7,4	7,4 10 ⁻¹
4		3	3	0	0	0	2,4	2,4 10 ⁻¹
5		2	2	0	1	0	2,1 10 ⁻¹	2,1

(1) La combinazione scelta è evidenziata in grassetto
 (2) Calcolo partendo dal coefficiente MPN per tre provette

Riferimenti bibliografici

- ISO 7251/93
- FDA, Bacteriological analytical manual, 8th ed., AOAC Int., Gaithersburg, USA, 1995

Tabella MPN

Tabella B1 – Tabella MPN per 3 x 1 g (ml), 3 x 0,1 g (ml) 3 x 0,01 g (ml)

Numero di risultati positivi	Coefficiente MPN	Categoria di risultati* riferita al numero di unità campione testate per lotto					Limite di confidenza			
		1	2	3	5	10	≥ 95%	≥ 95%	≥ 99%	≥ 99%
0 0 0	< 0,30						0,00	0,94	0,00	1,40
0 0 1	0,30	3	2	2	2	1	0,01	0,95	0,00	1,40
0 1 0	0,30	2	1	1	1	1	0,01	1,00	0,00	1,60
0 1 1	0,61	0	3	3	3	3	0,12	1,70	0,05	2,50
0 2 0	0,62	3	2	2	2	1	0,12	1,70	0,05	2,50
0 3 0	0,94	0	0	0	0	3	0,35	0,50	0,18	4,60
1 0 0	0,36	1	1	1	1	1	0,02	1,70	0,01	2,50
1 0 1	0,72	2	2	1	1	1	0,12	1,70	0,05	2,50
1 0 2	1,1	0	0	0	3	3	0,4	3,5	0,2	4,6
1 1 0	0,74	1	1	1	1	1	0,13	2,00	0,06	2,70
1 1 1	1,1	3	3	2	2	2	0,4	3,5	0,2	4,6
1 2 0	1,1	2	2	1	1	1	0,4	3,5	0,2	4,6
1 2 1	1,5	3	3	3	3	2	0,5	3,8	0,2	5,2
1 3 0	1,6	3	3	3	3	2	0,5	3,8	0,2	5,2
2 0 0	0,92	1	1	1	1	1	0,15	3,50	0,07	4,60
2 0 1	1,4	2	1	1	1	1	0,4	3,5	0,2	4,6
2 0 2	2,0	0	3	3	3	3	0,5	3,8	0,2	5,2
2 1 0	1,5	1	1	1	1	1	0,4	3,8	0,2	5,2
2 1 1	2,0	2	2	1	1	1	0,5	3,8	0,2	5,2
2 1 2	2,7	0	3	3	3	3	0,9	9,4	0,5	14,2
2 2 0	2,1	1	1	1	1	1	0,5	4,0	0,2	5,6
2 2 1	2,8	3	2	2	2	1	0,9	9,4	0,5	14,2
2 2 2	3,5	0	0	0	0	3	0,9	9,4	0,5	14,2
2 3 0	2,9	3	2	2	2	1	0,9	9,4	0,5	14,2
2 3 1	3,6	0	3	3	3	3	0,9	9,4	0,5	14,2
3 0 0	2,3	1	1	1	1	1	0,5	9,4	0,3	14,2
3 0 1	3,8	1	1	1	1	1	0,9	10,4	0,5	15,7
3 0 2	6,4	3	3	2	2	2	1,6	18,1	1,0	25,0
3 1 0	4,3	1	1	1	1	1	0,9	18,1	0,5	25,0
3 1 1	7,5	1	1	1	1	1	1,7	19,9	1,1	27,0
3 1 2	12	3	2	2	2	1	3	36	2	44
3 1 3	18	0	0	0	3	3	3	38	2	52
3 2 0	9,3	1	1	1	1	1	1,8	36,0	1,2	43,0
3 2 1	15	1	1	1	1	1	3	38	2	52
3 2 2	21	2	1	1	1	1	3	40	2	56
3 2 3	29	3	3	3	2	2	9	99	5	152
3 3 0	24	1	1	1	1	1	4	99	3	152
3 3 1	46	1	1	1	1	1	9	198	2	283
3 3 2	110	1	1	1	1	1	20	400	10	570
3 3 3	> 110									

* Per le categorie di risultati vedere Tabella di cui al punto 4

Tabella B2 – Tabella MPN per 5 x 1 g (ml), 5 x 0,1 g (ml) 5 x 0,01 g (ml)

Numero di risultati positivi	Coefficiente MPN	Categoria di risultati* riferita al numero di unità campione testate per lotto					Limite di confidenza			
		1	2	3	5	10	≥ 95%	≥ 95%	≥ 99%	≥ 99%
0 0 0	< 0,18						0,00	0,65	0,00	0,93
0 0 1	0,18	2	2	2	1	1	0,00	0,65	0,00	0,93
0 1 0	0,18	2	2	2	1	1	0,01	0,65	0,00	0,93
0 1 1	0,36	3	3	3	2	2	0,07	0,99	0,02	1,40
0 2 0	0,37	3	2	2	2	1	0,07	0,99	0,02	1,40
0 2 1	0,55	0	0	0	3	3	0,17	1,40	0,09	2,10
0 3 0	0,56	0	3	3	3	3	0,17	1,40	0,09	2,10
1 0 0	0,20	1	1	1	1	1	0,02	0,99	0,01	1,40
1 0 1	0,40	2	1	1	1	1	0,07	1,00	0,02	1,40
1 0 2	0,60	0	0	3	3	3	0,17	1,40	0,09	2,10
1 1 0	0,40	1	1	1	1	1	0,07	1,10	0,03	1,40
1 1 1	0,61	3	2	2	2	1	0,17	1,40	0,09	2,10
1 1 2	0,81	0	0	0	0	3	0,33	2,20	0,20	2,80
1 2 0	0,61	2	1	1	1	1	0,18	1,40	0,09	2,10
1 2 1	0,82	3	3	3	3	2	0,33	2,20	0,20	2,80
1 3 0	0,83	3	3	3	3	2	0,33	2,20	0,20	2,80
1 3 1	1,0	0	0	0	0	3	0,3	2,2	0,2	2,8
1 4 0	1,1	0	0	0	0	3	0,3	2,2	0,2	2,8
2 0 0	0,45	1	1	1	1	1	0,08	1,4	0,04	2,10
2 0 1	0,68	2	1	1	1	1	0,18	1,50	0,09	2,10
2 0 2	0,91	0	3	3	3	3	0,33	2,20	0,20	2,80
2 1 0	0,68	1	1	1	1	1	0,19	1,70	0,10	2,30
2 1 1	0,92	2	2	1	1	1	0,33	2,20	0,20	2,80
2 1 2	1,2	0	0	3	3	3	0,4	2,5	0,2	3,4
2 2 0	0,93	1	1	1	1	1	0,34	2,20	0,20	2,80
2 2 1	1,2	3	3	2	2	2	0,4	2,5	0,2	3,4
2 2 2	1,4	0	0	0	0	3	0,6	3,4	0,4	4,4
2 3 0	1,2	2	2	2	2	1	0,4	2,5	0,2	3,4
2 3 1	1,4	0	3	3	3	3	0,6	3,4	0,4	4,4
2 4 0	1,5	0	3	3	3	3	0,6	3,4	0,4	4,4
3 0 0	0,78	1	1	1	1	1	0,21	2,20	0,12	2,80
3 0 1	1,1	1	1	1	1	1	0,4	2,2	0,2	2,9
3 0 2	1,3	3	3	3	2	2	0,6	3,4	0,4	4,4
3 1 0	1,1	1	1	1	1	1	0,4	2,5	0,2	3,4
3 1 1	1,4	2	1	1	1	1	0,6	3,4	0,4	4,4
3 1 2	1,7	3	3	3	3	2	0,6	3,4	0,4	4,4
3 2 0	1,4	1	1	1	1	1	0,6	3,4	0,4	4,4
3 2 1	1,7	2	2	2	1	1	0,7	3,9	0,5	5,1
3 2 2	2,0	0	3	3	3	3	0,7	3,9	0,5	5,2
3 3 0	1,7	2	2	1	1	1	0,7	3,9	0,5	5,2
3 3 1	2,1	3	3	3	2	2	0,7	3,9	0,5	5,2
3 3 2	2,4	0	0	0	3	3	1,0	6,6	0,7	9,4
3 4 0	2,1	3	3	2	2	2	0,7	4,0	0,5	5,2
3 4 1	2,4	0	3	3	3	3	1,0	6,6	0,7	9,4
3 5 0	2,5	0	0	0	3	3	1,0	6,6	0,7	9,4
4 0 0	1,3	1	1	1	1	1	0,4	3,4	0,3	4,4
4 0 1	1,7	1	1	1	1	1	0,5	3,4	0,4	4,4

* Per le categorie di risultati vedere Tabella di cui al punto 4

(segue) Tabella B2 – Tabella MPN per 5 x 1 g (ml), 5 x 0,1 g (ml) 5 x 0,01 g (ml)

Numero di risultati positivi	Coefficiente MPN	Categoria di risultati* riferita al numero di unità campione testate per lotto					Limite di confidenza			
		1	2	3	5	10	≥ 95%	≥ 95%	≥ 99%	≥ 99%
4 0 2	2,1	3	2	2	2	2	0,7	3,9	0,5	5,2
4 0 3	2,5	0	0	0	0	3	1,0	6,6	0,7	9,4
4 1 0	1,7	1	1	1	1	1	0,6	3,9	0,4	5,1
4 1 1	2,1	1	1	1	1	1	0,7	4,1	0,5	5,3
4 1 2	2,6	3	3	2	2	2	1,0	6,6	0,7	9,4
4 1 3	3,1	0	0	0	0	3	1,0	6,6	0,7	9,4
4 2 0	2,2	1	1	1	1	1	0,7	4,8	0,5	6,1
4 2 1	2,6	2	1	1	1	1	1,0	6,6	0,7	9,4
4 2 2	3,2	3	3	3	2	2	1,0	6,6	0,7	9,4
4 2 3	3,8	0	0	0	0	3	1,3	10,0	0,9	14,7
4 3 0	2,7	1	1	1	1	1	1,0	6,6	0,7	9,4
4 3 1	3,3	2	2	1	1	1	1,0	6,6	0,7	9,4
4 3 2	3,9	3	3	3	3	2	1,3	10,0	0,9	14,7
4 4 0	3,4	2	2	1	1	1	1,3	10,0	0,9	14,7
4 4 1	4,0	3	3	2	2	2	1,3	10,0	0,9	14,7
4 4 2	4,7	0	0	0	3	3	1,4	11,3	0,9	14,7
4 5 0	4,1	3	3	3	3	2	1,3	10,0	0,9	14,7
4 5 1	4,8	0	0	3	3	3	1,4	11,3	0,9	14,7
5 0 0	2,3	1	1	1	1	1	0,7	6,6	0,5	9,4
5 0 1	3,1	1	1	1	1	1	1,0	6,6	0,7	9,4
5 0 2	4,3	3	2	2	2	1	0,3	10,0	0,9	14,7
5 0 3	5,8	0	0	0	3	3	2,1	14,9	1,4	20,0
5 1 0	3,3	1	1	1	1	1	1,0	10,0	0,7	14,7
5 1 1	4,6	1	1	1	1	1	1,4	11,3	0,9	14,7
5 1 2	6,3	2	2	1	1	1	2,1	14,9	1,4	20,0
5 1 3	8,4	3	3	3	3	2	3,4	11,0	2,1	27,0
5 2 0	4,9	1	1	1	1	1	1,5	14,9	0,9	20,0
5 2 1	7,0	1	1	1	1	1	2,2	16,8	1,4	23,0
5 2 2	9,4	2	2	1	1	1	3,4	22,0	2,1	28,0
5 2 3	12	3	3	2	2	2	3	24	2	32
5 2 4	15	0	0	0	0	3	6	35	4	45
5 3 0	7,9	1	1	1	1	1	2,3	22,0	1,5	27,0
5 3 1	11	1	1	1	1	1	3	24	2	32
5 3 2	14	1	1	1	1	1	5	35	3	45
5 3 3	17	3	2	2	2	1	7	39	4	51
5 3 4	21	3	3	3	3	2	7	39	4	51
5 4 0	13	1	1	1	1	1	3	35	3	45
5 4 1	17	1	1	1	1	1	6	39	4	51
5 4 2	22	1	1	1	1	1	7	44	4	57
5 4 3	28	2	1	1	1	1	10	70	6	92
5 4 4	35	2	2	2	1	1	10	70	6	92
5 4 5	43	0	0	3	3	3	15	106	9	150
5 5 0	24	1	1	1	1	1	7	70	4	92
5 5 1	35	1	1	1	1	1	10	106	6	150
5 5 2	54	1	1	1	1	1	15	166	10	223
5 5 3	92	1	1	1	1	1	23	253	15	338
5 5 4	160	1	1	1	1	1	40	460	20	620
5 5 5	> 160									

* Per le categorie di risultati vedere Tabella di cui al punto 4

Riferimenti bibliografici

- ISO 7251/93
- FDA, Bacteriological analytical manual, 8th ed., AOAC Int., Gaithersburg, USA, 1995

**E. COLI β-GLUCORONIDASI POSITIVO
(METODO PER INCLUSIONE)**

AVVERTENZA

- Il metodo non è applicabile alla ricerca di *E. coli* che non crescono a 44 °C e β-glucuronidasi negativi

Materiale occorrente

Natura	Quantità
• Campione	v. scheda RL P1
• Diluente	v. scheda RL P1
• Tryptone bile glucuronic medium (TBX)	15 ml per piastra
• Piastre Petri	2 per diluizione

1. SEMINA

- Pipettare 1 ml di campione tal quale (se liquido) o 1 ml del campione precedentemente preparato (vedi scheda RL P1) e porlo in ciascuna di 2 piastre Petri
- Cambiare pipetta ad ogni diluizione e procedere pipettando 1 ml delle successive diluizioni in doppio
- Aggiungere in ciascuna piastra circa 15 ml di TBX, precedentemente fuso e portato a 45 ± 0,5 °C entro 15 minuti dal punto precedente
- Mescolare uniformemente con movimento rotatorio e lasciare solidificare su superficie orizzontale
- Allestire il controllo di sterilità pipettando in una piastra 1 ml di diluente, versare il TBX fuso e procedere nel modo consueto

2. INCUBAZIONE

- Incubare le piastre capovolte in termostato a 44 ± 1 °C per 18-24 ore

AVVERTENZA

- Il tempo di incubazione non deve mai essere protratto oltre le 24 ore
- Nel caso si sospetti la presenza di batteri stressati incubare a 37 ± 1 °C per 4 ore prima dell'incubazione a 44 ± 1 °C per 18-24 ore
- La temperatura di incubazione non deve mai superare i 45 °C

3. LETTURA ED ESPRESSIONE DEI RISULTATI

- Contare le colonie tipiche (blu/verdi)
- Considerare solo le piastre con 15-150 colonie tipiche e comunque non più di 300 colonie totali

• Applicare per il calcolo la formula:
$$N = \frac{C}{(n_1 + 0,1 n_2) d}$$

ove: N = numero di unità formanti colonie/ml o g
 C = somma delle UFC contate su tutte le piastre valide
 n₁ = numero di piastre ritenute valide alla prima diluizione considerata
 n₂ = numero di piastre considerate valide alla seconda diluizione considerata
 d = fattore di diluizione corrispondente alla prima diluizione considerata

- Arrotondare il risultato alle prime 2 cifre significative
- Segnare come risultato il numero di unità formanti colonie/ml o g di prodotto moltiplicando per 10^x dove x è la potenza appropriata di 10

Esempio:

- UFC alla prima diluizione valida 10⁻²: 148-120 UFC
- UFC alla seconda diluizione valida 10⁻³: 18-15 UFC

$$N = \frac{148 + 120 + 18 + 15}{[2 + (0,1 \times 2)] \times 10^{-2}} = \frac{301}{0,022} = 13.682$$

Arrotondare ed esprimere il risultato come 1,4 x 10⁴ UFC/ml o g

- Nel caso in cui le piastre della diluizione più bassa presentino un numero di colonie inferiori a 15 si esegue la media aritmetica, si moltiplica per l'inverso del fattore di diluizione e si esprime come risultato stimato (segnalando i corrispondenti limiti di confidenza) (vedi tabella allegata)

Numero di UFC	Limite di confidenza al 95%	
	Inferiore	Superiore
1	< 1	2
2	< 1	4
3	< 1	5
4	1	6
5	2	9
6	2	10
7	2	12
8	3	13
9	4	14
10	4	16
11	5	18
12	6	19
13	7	20
14	7	21
15	8	23

Riferimenti bibliografici

- ISO/DIS 16649-2

SALMONELLA PER ALIMENTI NON NORMATI (METODO QUALITATIVO)

Materiale occorrente

Natura	Quantità
• Campione	25 g
• Brodo di prearricchimento: Acqua peptonata tamponata	225 ml
• Brodo di arricchimento selettivo: Brodo Rappaport Vassiliadis (RVB) Brodo Selenito Cistina (SCB)	10 ml x provetta 100 ml x beuta
• Agar rosso fenolo verde brillante (BGA)	
• Altro terreno selettivo a scelta	q.b.
• Triple Sugar Iron agar a becco di clarino <i>oppure</i> Kligler Iron agar a becco di clarino	q.b.
• Sistemi biochimici miniaturizzati	q.b.
• Antisieri poli e monovalenti	q.b.

AVVERTENZA

- Per erbe e spezie ed alimenti contenenti agenti lievitanti utilizzare Acqua peptonata tamponata in quantità tale da ottenere una diluizione 1:100

1. SEMINA

- Pesare sterilmente 25 g di prodotto
- Aggiungere 225 ml di Acqua peptonata tamponata ed omogeneizzare
- Incubare a $35-37 \pm 1$ °C per 16-20 ore
- Trasferire 0,1 ml del brodo di prearricchimento in Brodo Rappaport Vassiliadis ed incubare a 42 ± 1 °C per 24 ore
- Trasferire 10 ml del brodo di prearricchimento in Brodo Selenito Cistina ed incubare a $35-37 \pm 1$ °C per 24 ore
- Dai brodi di arricchimento selettivo seminare un'ansata da 10 µl su 2 piastre di agar selettivo (BGA + altro terreno a scelta)
- Incubare le piastre a $35-37 \pm 1$ °C per 20-24 ore

2. LETTURA

- Prelevare almeno 5 colonie considerate tipiche o sospette per *Salmonella* e trapiantarle su TSI o KIA a becco di clarino
- Incubare a $35-37 \pm 1$ °C per 24 ore
- Sottoporre le colonie sospette ad identificazione biochimica con sistemi biochimici miniaturizzati e prove di agglutinazione con antisieri poli e monovalenti

3. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

- Per ogni campione esaminato esprimere il risultato come: presenza o assenza di *Salmonella* spp/25 g o ml di prodotto

Riferimenti bibliografici

- ISO 6579: 1993
- UNI EN 12824: Novembre 1999

SALMONELLA NELLE UOVA FRESCHE (METODO QUALITATIVO)

Materiale occorrente

Natura	Quantità
• Campione	10 uova
• Brodo di prearricchimento: Acqua peptonata tamponata	450 ml + q.b. per effettuare le diluizioni 1:10
• Brodo Rappaport Vassiliadis (RVB)	2 provette (10 ml x provetta da 20 x 200 mm)
• Brodo tetrionato verde brillante	2 beute (100 ml x beuta)
• Agar rosso fenolo verde brillante (BGA)	4 piastre
• Altro terreno selettivo a scelta	
• Triple Sugar Iron agar a becco di clarino <i>oppure</i> Kligler Iron agar a becco di clarino	q.b.
• Sistemi biochimici miniaturizzati	q.b.
• Antisieri poli e monovalenti	q.b.

1. SEMINA

- Separare in modo asettico il guscio dal tuorlo di 10 uova

Gusci

- Raccogliere i gusci in contenitore sterile
- Pesare i gusci e aggiungere Acqua peptonata tamponata in quantità tale da ottenere una diluizione 1:10 e tritare
- Versare in una beuta sterile
- Incubare a 37 ± 1 °C per 20-24 ore

Tuorli

- Raccogliere i tuorli in un sacchetto sterile per Stomacher ed omogeneizzarli
- Prelevare 50 g di omogeneizzato, porli in una beuta sterile contenente 450 ml di Acqua peptonata tamponata
- Incubare a 37 ± 1 °C per 20-24 ore
- Trasferire 0,1 ml di ciascun brodo di prearricchimento rispettivamente in una provetta di RVB
- Trasferire 10 ml di ciascun brodo di prearricchimento rispettivamente in una beuta di Brodo tetrionato verde brillante
- Incubare entrambi i brodi a 42 ± 1 °C per 24 ore
- Da ciascun brodo procedere all'isolamento per striscio sui 2 terreni selettivi scelti
- Incubare a 37 ± 1 °C per 24 ore

2. LETTURA

- Prelevare una o più colonie considerate tipiche o sospette per *Salmonella* e trapiantarle in TSI o KIA a becco di clarino
- Incubare a 37 ± 1 °C per 20-24 ore
- Sottoporre le colonie sospette ad identificazione biochimica con sistemi biochimici miniaturizzati e prove di agglutinazione con antisieri poli e monovalenti

3. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

- Per ogni campione di 10 uova esaminato esprimere il risultato come: presenza o assenza di *Salmonella* spp/10 uova specificando se nei tuorli, nei gusci o in entrambi

Riferimenti bibliografici

- Circolare telegrafica Min. San. Prot. SAN. 703/91.64/2085 del dicembre 1991

STAFILOCOCCO COAGULASI POSITIVO (METODO PER SPATOLAMENTO)

Materiale occorrente

Natura	Quantità
• Campione	v. scheda RL P1
• Diluente	v. scheda RL P1
• Baird Parker Agar (BPA)	q.b.

1. SEMINA

- Pipettare 0,1 ml di campione (se liquido) o, se solido, 0,1 ml della diluizione 10^{-1} precedentemente preparata (si veda scheda RL P1) e porlo in ciascuna di 2 piastre di BPA. Spatolare l'inoculo sulla superficie del terreno, cambiando spatola per ogni piastra
- Ripetere le operazioni testando 2 o più diluizioni successive
- Incubare le piastre capovolte per $24 + 24$ ore a 35 o 37 ± 1 °C
- Se per certi prodotti si desidera contare un numero basso di colonie il limite di rilevazione può essere innalzato di un fattore 10 inoculando in doppio 1 ml di campione tal quale (se liquido) o 0,1 ml della sospensione iniziale (per altri prodotti) in una piastra da 140 mm o suddiviso in 3 piastre da 90 mm

2. LETTURA E CONFERMA

- Dopo 24 ± 2 ore di incubazione segnare sul fondo della piastra le colonie caratteristiche eventualmente presenti
- Incubare nuovamente le piastre per altre 24 ± 2 ore alla stessa temperatura
- Segnare le colonie sospette (nere o grigie convesse con un diametro, dopo 48 ore di incubazione, di 1,5-2,5 mm e circondate da una zona di chiarificazione ed eventuale alone opalescente) sulle piastre contenenti 15-150 colonie. Nel caso in cui fossero presenti solo piastre con un numero di colonie inferiore, valutare queste cariche
- Scegliere 5 colonie sospette e sottoporle alle prove di conferma

AVVERTENZA

- Nel caso di alimenti altamente contaminati è consigliabile sottoporre a prova di conferma anche le colonie atipiche

- Sottoporre le colonie sospette al test della coagulasi
- Considerare le colonie coagulasi positive, rapportarle al fattore di diluizione e definirle Stafilococco coagulasi positivo
- Le colonie il cui test alla coagulasi abbia dato esito dubbio vanno testate con il test della termonucleasi e/o produzione di emolisi, lisostafina e acidificazione del mannitolo
- Quando si ritenga necessario effettuare la ricerca diretta delle Enterotossine stafilococciche nell'alimento e/o il potere enterotossigeno del ceppo isolato

3. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

- Calcolare il numero di Stafilococchi coagulasi positivi identificati applicando la seguente equazione:

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

- ove:
- N = numero UFC/g o ml
 - ∑C = è la somma delle colonie coagulasi-positive identificate
 - V = è il valore dell'inoculo su ciascuna piastra
 - n₁ = è il numero delle piastre selezionate come valide alla prima diluizione considerata
 - n₂ = è il numero delle piastre selezionate come valide alla seconda diluizione considerata
 - d = è la diluizione corrispondente alla prima diluizione considerata

Riferimenti bibliografici

- Norma ISO 6888-1/99
- UNI EN ISO 6888-1/00

TEST DELLA COAGULASI

AVVERTENZA

- Tale ricerca evidenzia l'attività coagulante esercitata dagli Stafilococchi potenzialmente patogeni sul plasma di coniglio. Poiché i fattori accessori della coagulazione presenti nel plasma vanno incontro a rapido deterioramento, è consigliabile impiegare plasma liofilizzato da ricostituire al momento dell'uso

Materiale occorrente

Natura	Quantità
• Plasma di coniglio con EDTA	0,5 ml o secondo quanto indicato dal produttore
• Brain heart infusion broth (BHI)	Provette da 5-10 ml

1. PREPARAZIONE

- Allestire una brodocoltura delle colonie sospette in BHI ed incubare a 37 ± 1 °C per 18-24 ore
- Proseguire la prova secondo le indicazioni fornite dal produttore
- Allestire un controllo negativo sostituendo il terreno colturale non inoculato alla brodocoltura
- Incubare a 37 ± 1 °C per 4-6 ore, se negativo prolungare l'incubazione fino a 24 ore

2. LETTURA E CONFERMA

- Reazione negativa = completa fluidità del mezzo con assenza di coaguli organizzati o presenza di coaguli di piccole dimensioni, non organizzati e depositati sul fondo della provetta
- Reazione positiva = il volume del grumo occupa più di metà del volume originale del liquido
- In caso di reazioni dubbie (coagulazione parziale) confermare effettuando il test della termonucleasi e/o lisostafina, acidificazione del mannitolo ed emolisi

Riferimenti bibliografici

- Norma ISO 6888-1/99
- UNI EN ISO 6888-1/00

TEST TERMONUCLEASI

Questo test si effettua sui ceppi di *Stafilococco* risultati dubbi al test della coagulasi.

Materiale occorrente

Natura	Quantità
• Brain heart infusion broth (BHI)	provette da 5-10 ml
• Dischetti di carta bibula diametro 6 mm	1 per test
• Toluidine blue agar	1 piastra per test

1. SEMINA

- Allestire una brodocoltura delle colonie sospette in BHI ed incubare a 37 ± 1 °C per 18-24 ore
- Riscaldare la brodocoltura a 100 °C per 15 minuti. Lasciare raffreddare
- Immergere nel brodo il dischetto e porlo sulla superficie del Toluidine blue agar
- Allestire anche un controllo positivo utilizzando un ceppo di *Stafilococco* termonucleasi positivo
- Incubare a 37 ± 1 °C per 6-12 ore o a 50 ± 1 °C per 3-6 ore

2. LETTURA

- La positività è data dalla comparsa di un alone rosa intorno al dischetto

Riferimenti bibliografici

- Istituto Superiore di Sanità, Metodiche analitiche per il controllo microbiologico delle paste alimentari, 9, ISTISAN, Roma, 1989

CONTA LIEVITI E MUFFE (METODO PER INCLUSIONE)

Materiale occorrente

Natura	Quantità
• Campione	v. scheda RL P1
• Diluente	v. scheda RL P1
• Agar glucosio, estratto di lievito + CAF* <i>oppure</i>	15-20 ml per piastra
• Agar oxytetraciclina, glucosio, estratto di lievito (OGYE Agar)# <i>oppure</i>	15-20 ml per piastra
• Agar estratto di lievito, glucosio, oxytetraciclina, gentamicina†	15-20 ml per piastra
• Piastre Petri	2 per diluizione

* Da utilizzare in generale in matrici alimentari compreso cereali, vegetali e loro derivati e latte e loro derivati

Da utilizzare in matrici alimentari tipo latte e derivati del latte

† Da utilizzare in matrici alimentari di tipo carneo per il potere selettivo nei confronti dei batteri gram negativi contaminanti e in sostituzione del CAF poiché quest'ultimo inibisce alcuni tipi di lievito

AVVERTENZA

- Per i formaggi a crosta fiorita escludere la crosta dal campione da analizzare

1. SEMINA

- Pipettare 1 ml di campione, se liquido, o, se solido, 1 ml del campione omogeneizzato (diluizione 10^{-1}) precedentemente preparato (si veda scheda RL P1) e porlo in ciascuna di 2 piastre Petri
- Pipettare 1 ml di ciascuna delle diluizioni successive allestendo 2 piastre per ogni diluizione e cambiando pipetta per ognuna di esse
- Versare nelle piastre circa 15 ml del terreno utilizzato precedentemente fuso e mantenuto a 45 ± 1 °C; mescolare accuratamente per rotazione le piastre; coprire e lasciare solidificare su superficie orizzontale
- Incubare le piastre a 25 ± 1 °C fino a 5 giorni eseguendo letture a 3, 4 e 5 giorni

2. LETTURA ED ESPRESSIONE DEI RISULTATI

- Effettuare la conta di lieviti e muffe dopo 3, 4 e 5 giorni di incubazione considerando valide le piastre contenenti meno di 150 colonie

C

- Applicare per il calcolo la formula: $N = \frac{C}{(n_1 + 0,1 n_2) d}$

ove: N = numero di microrganismi/ml o g
 C = somma delle UFC contate su tutte le piastre valide
 n₁ = numero di piastre ritenute valide alla prima diluizione considerata
 n₂ = numero di piastre ritenute valide alla seconda diluizione considerata
 d = prima diluizione considerata

- Arrotondare il risultato alle prime 2 cifre significative
- Segnare come risultato il numero di microrganismi/ml o g di prodotto moltiplicando per 10^x dove x è la potenza appropriata di 10

Esempio:

- UFC alla prima diluizione valida 10⁻²: 83-97 UFC
- UFC alla seconda diluizione valida 10⁻³: 33-28 UFC

$$\frac{83 + 97 + 33 + 28}{[2 + (0,1 \times 2)] \times 10^{-2}} = \frac{241}{0,022} = 10.954$$

Arrotondare a 11.000 UFC/ml o g esprimere il risultato con 1,1 x 10⁴ UFC/ml o g

Riferimenti bibliografici

- ISO 7954/87
- ISO 6611/92
- ISO 13681/95
- ISO 7698/90

AGAR GLUCOSIO ESTRATTO DI LIEVITO + CAF

Materiale occorrente

Natura	Quantità
• Estratto di lievito	5 g
• Glucosio	20 g
• CAF	0,1 g
• Agar	12-15
• Acqua distillata	1000 ml

1. PREPARAZIONE

- Dissolvere i composti in acqua distillata calda
- Aggiustare il pH a 6,6 a 25 °C
- Sterilizzare in autoclave a 121 ± 1 °C per 15 minuti

2. CONSERVAZIONE

- Temperatura: 2-5 °C
- Stabilità: ≤ 1 mese

Riferimenti bibliografici

- ISO 13681/95

AGAR OXYTETRACICLINA ESTRATTO DI LIEVITO

Materiale occorrente

Natura	Quantità
• Estratto di lievito	5 g
• Glucosio	20 g
• Agar	10-15
• Acqua distillata	1000 ml
• Supplemento 1:	
• Oxytetraciclina	50 mg
• Acqua distillata	50 mg

1. PREPARAZIONE

- Sciogliere i componenti base in acqua distillata calda
- Aggiustare il pH a 6,6 a 25 °C
- Sterilizzare in autoclave a 121 ± 1 °C per 15 minuti
- Portare il terreno base a 45 °C in bagnomaria
- Preparare il supplemento sciogliendo l'Oxytetraciclina in acqua distillata poco prima dell'uso, sterilizzare per filtrazione e porre in bagnomaria a 45 °C
- Poco prima dell'uso aggiungere 10 ml di soluzione di Oxytetraciclina a 90 ml di terreno base sterile

2. CONSERVAZIONE

- Temperatura: 2-5 °C
- Stabilità: ≤ 1 mese

Riferimenti bibliografici

- ISO 13681/95

AGAR GLUCOSIO, ESTRATTO DI LIEVITO OXYTETRACICLINA GENTAMICINA

Materiale occorrente

Natura	Quantità
• Estratto di lievito	5 g
• Glucosio	20 g
• Agar	8-18
• Acqua distillata	1000 ml
• Supplemento 1:	
• Oxytetraciclina	50 mg
• Acqua distillata	50 ml
• Supplemento 2:	
• Gentamicina	25 mg
• Acqua distillata	25 ml

1. PREPARAZIONE

- Sciogliere i componenti base in acqua distillata calda
- Aggiustare il pH a 6,6 a 25 °C
- Sterilizzare in autoclave a 121 ± 1 °C per 15 minuti
- Portare a 47 °C in bagnomaria
- Preparare il supplemento 1 sciogliendo l'Oxytetraciclina in acqua distillata poco prima dell'uso e sterilizzare la soluzione per filtrazione
- Preparare il supplemento 2 sciogliendo la Gentamicina in H₂O e sterilizzare la soluzione per filtrazione
- Aggiungere 5 ml del supplemento 1 e 5 ml del supplemento 2 in 100 ml di terreno base sterile

2. CONSERVAZIONE

- Temperatura: 2-5 °C
- Stabilità: ≤ 1 mese

Riferimenti bibliografici

- ISO 13681/95

LISTERIA MONOCYTOGENES PER ALIMENTI NON NORMATI (METODO QUALITATIVO)

Materiale occorrente

Natura	Quantità
• Campione	25 g o ml
• Arricchimento primario:	
• Half Fraser Broth	225 ml
• Arricchimento secondario:	
• Fraser Broth	10 ml
• Oxford Agar	2 + 2 piastre
• Palcam Agar	2 + 2 piastre
• Agar sangue di montone	q.b.
• Tryptone Soy Agar + Estratto di lievito (TSYEA)	q.b.
• Stafilococco aureo	q.b.
• <i>Rhodococcus equi</i>	q.b.
• SIM motility medium	q.b.
• Sistemi biochimici miniaturizzati	q.b.

1. SEMINA

- Prelevare sterilmente 25 g di campione, se solido, o 25 ml se liquido ed omogeneizzare con 225 ml di brodo di Half Fraser o, comunque, prelevare una quantità tale da rispettare il rapporto 1:10 con il brodo di prearricchimento
- Incubare a 30 ± 1 °C per 24 ± 2 ore
- Dal primo arricchimento, trasferire 0,1 ml dal primo arricchimento nella provetta di brodo di arricchimento secondario Fraser Broth e incubarlo a $35-37 \pm 1$ °C per 48 ore. Dallo stesso brodo, seminare un'ansata su 1 piastra di Oxford Agar e 1 piastra di Palcam Agar e incubare le piastre capovolte a $35-37 \pm 1$ °C per 24 + 24 ore
- Al termine del periodo di incubazione, seminare da Fraser Broth un'ansata su piastre di Palcam e Oxford Agar e incubare le piastre a $35-37 \pm 1$ °C per 24 + 24 ore

2. LETTURA E CONFERMA

- Verificare la presenza di colonie tipiche: scure circondate da un alone bruno, su Oxford Agar, verdastre con centro nero e alone bruno su Palcam
- Selezionare 5 colonie sospette (o se meno di 5 tutte quelle sviluppate) e isolarle in piastra di TSYEA
- Incubare a $35-37 \pm 1$ °C per 18-24 ore
- Eseguire la colorazione di gram
- Eseguire il test della catalasi
- Trapiantare le colonie isolate su TSYEA, gram-positive o catalasi-positive, su AS per semina lineare seguita da infissione

- Incubare a 35-37 °C per 24 ± 2 ore e verificare la presenza di emolisi
- Conferma biochimica (vedi Tabella 20.1 seguente) o con sistemi biochimici miniaturizzati

3. TEST OPZIONALI

Motilità su SIM motility medium

- Inoculare per infissione il terreno e incubare a 25 ± 1 °C per 48 ore
- Le *Listerie* presentano motilità ad ombrello; in caso di risultato negativo incubare per ulteriori 5 giorni

Camp Test

- Strisciare il ceppo di *Stafilococco aureo* e *Rhodococcus equi* formando due linee parallele con inoculo fine e uguale
- Inseminare il campione, tracciando con l'ansa una linea perpendicolare alle precedenti e in modo da distanziarle di 1-2 mm; inseminare nello stesso modo i controlli di *Listeria monocytogenes* e *ivanovii*
- Incubare a 35-37 ± 1 °C per 18-24 ore
- Considerare positiva per *Listeria monocytogenes* la β-emolisi sviluppata tra il campione e lo *Stafilococco aureo*. L'emolisi della *Listeria ivanovii* è sviluppata in corrispondenza del *Rhodococcus equi* (vedi Tabella 20.1 seguente)

Tabella 20.1 – Reazioni per l'identificazione della *Listeria* spp.

Specie	Produzione d'acido		Camp Test	
	Ramnosio	Xilosio	S. aureo	R. equi
<i>L. monocytogenes</i>	+	-	+	-
<i>L. innocua</i>	V	-	-	-
<i>L. ivanovii</i>	-	+	-	+
<i>L. seeligeri</i>	-	+	(+)	-
<i>L. welshimeri</i>	V	+	-	-
<i>L. grayi</i>	-	-	-	-
<i>L. murrayi</i>	V	-	-	-

V = reazione variabile + = reazione positiva
(+) = reazione debole - = nessuna reazione

Leggere le prove biochimiche ramnosio e xilosio:
Positività = viraggio dell'indicatore da blu a giallo

I ceppi identificati come *Listeria monocytogenes* possono essere inviati ad un centro di riferimento per l'esecuzione di prove sierologiche e/o biologiche di patogenicità.

4. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

- Per ogni campione esaminato, esprimere il risultato come: presenza o assenza di *Listeria monocytogenes*/25 g o ml di prodotto

Riferimenti bibliografici

- ISO 11290-1/96

HALF FRASER BROTH

Materiale occorrente

Natura	Quantità
• Peptone di carne	5 g
• Estratto di carne	5 g
• Estratto di lievito	5 g
• Tryptone di caseina	5 g
• NaCl	20 g
• Na ₂ HPO ₄ diidrato	12 g
• KH ₂ PO ₄	1,35 g
• Esculina	1 g
• Acqua distillata	1000 ml
• Supplemento	
1. Cloruro di litio	3 g + 10 ml di H ₂ O
2. Acido nalidixico (sale sodico)	0,1 g + 10 ml di idrossido di sodio 0,05 moli/l
3. Acriflavina idrocloridrato	0,25 g + 100 ml di H ₂ O
4. Citrato di ammonio ferrico	5 g + 100 ml di H ₂ O

1. PREPARAZIONE

- Sciogliere i componenti della base in 1000 ml di acqua distillata e portare ad ebollizione
- Aggiustare il pH a 7,3 a 25 °C
- Sterilizzare a 121 °C per 15 minuti

Supplemento 1

Aggiungere il Cloruro di litio in H₂O e sterilizzare per filtrazione

Supplemento 2

Dissolvere il sale in idrossido di sodio e sterilizzare per filtrazione

Supplemento 3

Dissolvere l'Acriflavina in H₂O e sterilizzare per filtrazione

Supplemento 4

Dissolvere il Citrato ferrico in H₂O e sterilizzare per filtrazione

2. COMPOSIZIONE DEL TERRENO COMPLETO

Aggiungere i 4 supplementi a 100 ml di terreno base nelle seguenti proporzioni:

- Supplemento 1 1 ml
- Supplemento 2 0,1 ml
- Supplemento 3 0,5 ml
- Supplemento 4 1 ml

3. CONSERVAZIONE

- Temperatura: 2-4 °C
- Stabilità: 1 mese

TRYPTONE SOY AGAR + ESTRATTO DI LIEVITO (TSYEA)

Materiale occorrente

Natura	Quantità
• Trypticase Soy Agar	30 g
• Estratto di lievito	6 g
• Acqua distillata	1000 ml
• Agar	9-18 g

1. PREPARAZIONE

- Dissolvere i componenti nell'acqua distillata
- Sterilizzare a 121 °C per 15 minuti
- Dispensare in piastre Petri

2. CONSERVAZIONE

- Temperatura: 2-4 °C
- Stabilità: 8-10 settimane

Riferimenti bibliografici

- ISO 11290-1/96

LISTERIA MONOCYTOGENES PER LATTE E PRODOTTI LATTIERO-CASEARI (METODO QUALITATIVO)

Materiale occorrente

Natura	Quantità
• Campione	25 g o ml
• Brodo di arricchimento (composizione secondo ISO)	225 ml
• Oxford Agar o Palcam Agar	1 piastra
• Tryptone Soy Agar + Estratto di lievito (TSYEA)	q.b.
• Agar sangue di montone	q.b.
• Stafilococco aureo	q.b.
• <i>Rhodococcus equi</i>	q.b.
• SIM motility medium	q.b.
• Sistemi biochimici miniaturizzati	q.b.

1. SEMINA

- Prelevare sterilmente 25 g di campione, se solido, o 25 ml se liquido, ed omogeneizzare con 225 ml di brodo di arricchimento *Listeria* (secondo ISO) o comunque in caso di semine di quantità diverse rispettare il rapporto campione/brodo di arricchimento uguale 1:10
- Incubare a 30 ± 1 °C per 48 ore

AVVERTENZA

- BURRO: fondere in bagnomaria a 45 °C e seminare in brodo di arricchimento
- FORMAGGIO: pesare 25 g (compresa la crosta, se edule) nel contenitore dell'omogeneizzatore ed aggiungere 225 ml di brodo di arricchimento precedentemente riscaldato a 37 °C
- GELATO: fondere a bagnomaria a 37 °C (non superare questa temperatura)
- YOGURT: una volta aggiunto al campione il brodo di arricchimento aggiustare se necessario il pH a 7,0 ± 0,5

- Seminare un'ansata di brodo di arricchimento su Oxford Agar o Palcam Agar
- Incubare le piastre capovolte a 37 ± 1 °C per 48 ore

2. LETTURA E CONFERMA

- Verificare la presenza di colonie tipiche: scure circondate da un alone bruno su Oxford Agar, verdastre con centro nero ed alone bruno su Palcam
- Selezionare 5 colonie sospette (o se meno di 5 tutte quelle sviluppate) e isolarle in piastra di TSYEA
- Incubare a 35-37 ± 1 °C per 18-24 ore
- Eseguire la colorazione di gram

- Eseguire il test della catalasi
- Trapiantare le colonie isolate su TSYEA gram-positive, catalasi-positive, su AS per semina lineare seguita da infissione
- Incubare a 35-37 °C per 24 ± 2 ore e verificare la presenza di emolisi
- Conferma biochimica (vedi Tabella 20.1 seguente) o con sistemi biochimici miniaturizzati

3. TEST OPZIONALI

Motilità su SIM motility medium

- Inoculare per infissione il terreno e incubare a 25 ± 1 °C per 48 ore
- Le *Listerie* presentano motilità ad ombrello; in caso di risultato negativo incubare per ulteriori 5 giorni

Camp Test

- Strisciare il ceppo di *Stafilococco aureo* e *Rhodococcus equi* formando due linee parallele con inoculo fine e uguale
- Inseminare il campione tracciando con l'ansa una linea perpendicolare alle precedenti e in modo da distanziarle di 1-2 mm; inseminare nello stesso modo i controlli di *Listeria monocytogenes* e *ivanovii*
- Incubare a 35-37 ± 1 °C per 18-24 ore
- Considerare positiva per *Listeria monocytogenes* la β-emolisi sviluppata tra il campione e lo *Stafilococco aureo*. L'emolisi della *Listeria ivanovii* è sviluppata in corrispondenza del *Rhodococcus equi* (vedi Tabella 20.1 seguente)

Tabella 20.1 – Reazioni per l'identificazione della *Listeria* spp.

Specie	Produzione d'acido		Camp Test	
	Ramnosio	Xilosio	S. aureo	R. equi
<i>L. monocytogenes</i>	+	-	+	-
<i>L. innocua</i>	V	-	-	-
<i>L. ivanovii</i>	-	+	-	+
<i>L. seeligeri</i>	-	+	(+)	-
<i>L. welshimeri</i>	V	+	-	-
<i>L. grayi</i>	-	-	-	-
<i>L. murrayi</i>	V	-	-	-

V = reazione variabile + = reazione positiva
(+) = reazione debole - = nessuna reazione

Leggere le prove biochimiche ramnosio e xilosio:
Positività = viraggio dell'indicatore da blu a giallo

I ceppi identificati come *Listeria monocytogenes* possono essere inviati ad un centro di riferimento per l'esecuzione di prove sierologiche e/o biologiche di patogenicità.

4. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

- Per ogni campione esaminato esprimere il risultato come: presenza o assenza di *Listeria monocytogenes*/25 g o ml di prodotto

Riferimenti bibliografici

- ISO 10560/93

BRODO DI ARRICCHIMENTO *LISTERIA* (COMPOSIZIONE SECONDO ISO)

Materiale occorrente

Natura	Quantità
• Base:	
• Tryptone	17 g
• Soytone	3 g
• Glucosio	2,5 g
• NaCl	5 g
• K ₂ HPO ₄	2,5 g
• Estratto di lievito	6 g
• H ₂ O	1000 ml
• Supplemento 1:	
• Acriflavina cloridrato	23 mg
• Acqua	10 ml
• Supplemento 2:	
• Sale sodico acido nalidixico	46 mg
• NaOH (0,05 mol/l)	10 ml
• Supplemento 3:	
• Cycloeximide	57,5 mg
• Etanolo	4 ml
• Acqua	6 ml

1. PREPARAZIONE

- Sciogliere i componenti della base in 1000 ml di Acqua distillata e portare ad ebollizione
- Aggiustare il pH a 7,3 a 25 °C
- Distribuire 225 ml di terreno base in beute della capacità di 500 ml
- Sterilizzare a 121 °C per 15 minuti
- Aggiungere 1 ml di supplemento 1, 2 ml di supplemento 2 e 2 ml di supplemento 3 a ciascuna beuta di terreno base

2. CONSERVAZIONE

- Temperatura: 2-5 °C
- Stabilità: 1 mese

Riferimenti bibliografici

- ISO 10560/93

CLOSTRIDIUM PERFRINGENS (METODO PER INCLUSIONE)

Materiale occorrente

Natura	Quantità
• Campione	v. scheda RL P1
• Diluente: acqua peptonata salina	v. scheda RL P1
• Metodo in piastra	
• Tryptone sulfito cicloserina Agar (TSC) EY free <i>oppure</i>	piastre Petri 4 per diluizione
• Sulfito polimixina sulfadiazina Agar (SPS)	
• Metodo in provettoni	
• TSC Agar <i>oppure</i>	4 tubi per ogni diluizione (10 ml per tubo da 16 x 160 mm)
• SPS Agar	
• Brodo tioglicollato <i>oppure</i>	q.b. (15 ml per tubo da 16 x 160 mm)
• Cooked Meat Medium (CMM)	
• Agar sangue di montone (AS)	q.b.
• Latte tornasolato	q.b. (7 ml per tubo da 16 x 160 mm)
• Agar triptosio o altro terreno equivalente	q.b.
• Sistemi biochimici miniaturizzati	q.b.

AVVERTENZA

- Il presente metodo consente di effettuare la ricerca contemporanea di forme vegetative e sporali di *Clostridium perfringens* utilizzando per quest'ultima lo shock termico

Shock termico:

- Da ciascuna diluizione precedentemente preparata (RL P1) prelevare la quantità necessaria e porla in provette
- Porre le provette in bagnomaria, preriscaldato a 80 ± 1 °C, per 10 minuti. Raffreddare immediatamente sotto acqua fredda
- Procedere parallelamente alla semina sia delle aliquote non sottoposte a shock termico sia di quelle sottoposte a shock

1. SEMINA

Metodo in piastra

- Versare 7 ml circa di TSC o terreno simile in ciascuna piastra Petri e lasciar solidificare
- Seminare in doppio 1 ml di ciascuna diluizione precedentemente preparata in ciascuna di 2 piastre Petri e versare in ogni piastra circa 15 ml di terreno precedentemente fuso e portato a 45 °C (TSC o SPS)
- Seminare allo stesso modo 1 ml del campione sottoposto a shock termico
- Agitare delicatamente e lasciar solidificare. Quando il terreno è solidificato aggiungere circa 7 ml dello stesso terreno
- Incubare a 35 o 37 ± 1 °C, in anaerobiosi, per 24 + 24 ore

Metodo in provettoni

- Porre 1 ml di ciascuna diluizione precedentemente preparata in doppio in provettoni contenenti TSC o SPS precedentemente fuso e portato a 45 ± 1 °C, quindi mescolare accuratamente
- Seminare allo stesso modo 1 ml del campione sottoposto a shock termico
- Incubare a 35 o 37 ± 1 °C, in anaerobiosi, per 24 + 24 ore

2. LETTURA

- Calcolare il numero di presunti Clostridi solfito-riduttori: colonie nere

3. CONFERMA

- Selezionare 5 colonie tipiche da TSC o SPS
- Eseguire isolamenti su Agar nutritivo triptosio o altro terreno equivalente
- Incubare a 35 o 37 ± 1 °C per 24 ore in anaerobiosi
- Inoculare successivamente ciascuna coltura in una provetta di brodo tioglicollato o CMM, preridotto mediante riscaldamento per 10 minuti a 100 °C e successivo rapido raffreddamento
- Eseguire da coltura pura le prove identificative:
 - Catalasi: negativa
 - Emolisi: su AS, dopo incubazione a 37 ± 1 °C per 24 ore in anaerobiosi, le colonie producono una doppia zona di emolisi (zona interna di emolisi completa ed una zona più esterna di emolisi incompleta)
 - Latte tornasolato:
 - Inoculare sul fondo del latte tornasolato 0,1 ml di brodocoltura di 24-48 ore da CMM o tioglicollato
 - Ricoprire con uno strato (circa 2 ml) di vaselina sterile ed incubare a 35-37 ± 1 °C per 24-48 ore
 - Il *Clostridium perfringens*, dopo 24-48 ore di incubazione, produce acidificazione del mezzo con formazione di coagulo frammentato (vedi Tabella 24.1)
 - Prove biochimiche con sistemi miniaturizzati
 - Quando si ritenga necessario effettuare la ricerca del potere enterotossigeno del ceppo isolato

Tabella 24.1 – Reazioni dei Clostridi solfito-riduttori in latte tornasolato, in un tempo massimo di 15 giorni

<i>Clostridium perfringens</i>	A C G S
<i>Clostridium histolyticum</i>	C D
<i>Clostridium sporogenes</i>	D
<i>Clostridium novji</i>	C G (D)

A = acidificazione

C = formazione di coagulo

G = produzione di gas

S = fermentazione tumultuosa con coagulo frammentato

D = digestione, con trasformazione del mezzo in liquido ambrato

4. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

- Calcolare il numero di *Clostridium perfringens* identificati applicando la seguente equazione:

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

ove: N = numero UFC/ml o g

ΣC = è la somma delle colonie identificate come *Clostridium perfringens*

V = è il valore dell'inoculo su ciascuna piastra

n₁ = è il numero delle piastre/tubi selezionati come valide alla prima diluizione considerata

n₂ = è il numero delle piastre/tubi selezionati come validi alla seconda diluizione considerata

d = fattore di diluizione corrispondente alla prima diluizione considerata

Riferimenti bibliografici

- Tiecco G., Microbiologia degli alimenti di origine animale, 5^a ed., Ed agricole, Bologna, 1992
- Buttiaux R., Techniques bactériologiques, Marrapese ed., Roma, 1980
- FDA, Bacteriological analytical manual, 8th ed., AOAC Int., Gaithersburg, USA, 1995
- Murray P.R. et al., Manual of Clinical microbiology, 6th ed., ASM, Washington, USA, 1995
- ISO 7937/97
- UNI EN 13401/2000
- Le Minor L. et al., Bactériologie Médicale, 2^a ed., Médecine-Sciences Flammarion, Paris 1989

BACILLUS CEREUS (METODO PER SPATOLAMENTO)

Materiale occorrente

Natura	Quantità
• Campione	v. scheda RL P1
• Diluente: acqua peptonata salina	v. scheda RL P1
• <i>Bacillus cereus</i> agar (BCA) (formula PEMBA o MYP)	2 piastre per ogni diluizione
• Nutrient agar <i>oppure</i>	q.b.
• Altro terreno a libera crescita	
• Agar sangue (AS)	q.b.
• Sistemi biochimici miniaturizzati	q.b.
• Motility medium	q.b.

1. SEMINA

AVVERTENZA

– Quando si ritiene di essere in presenza di elevata flora polimicrobica nell'alimento è consigliabile sottoporre parte dell'omogeneizzato a pastorizzazione (70 ± 1 °C) per 15 minuti e testare in doppio, saggiando l'omogeneizzato trattato e non

- Porre, con una pipetta sterile, 0,1 ml di campione omogeneizzato (diluizione 10^{-1}) precedentemente preparato (si veda la scheda RL P1) sulla superficie di 2 piastre di BCA
- Spatolare velocemente evitando di toccare con la spatola i bordi delle piastre, cambiare spatola per ogni piastra
- Procedere nello stesso modo testando le diluizioni successive
- Incubare le piastre capovolte a 30 ± 1 °C per 18-24 ore in aerobiosi; se le colonie sono poco evidenti incubare per ulteriori 24 ore

2. LETTURA E CONFERMA

- Contare le colonie presunte positive di *Bacillus cereus*: diametro circa 5 mm, dentate, mannitolo negative (di colore blu turchese su PEMBA o rosa su MYP), lecitinasi positive (con aloni di precipitazione del tuorlo d'uovo dello stesso colore) e negative (considerare che non tutti i ceppi di *Bacillus cereus* producono lecitinasi)
- Prelevare 5 colonie sospette da ciascuna diluizione considerata ed isolare su Nutrient agar o altro terreno a libera crescita; se su una o più delle piastre ci sono meno di 5 colonie prelevare tutte quelle sospette
- Incubare a 30 ± 1 °C per 24 ore

- Eseguire le seguenti prove di conferma (vedi Tabella 25.1) per *Bacillus cereus* group (1); le prove biochimiche possono essere eseguite con sistemi miniaturizzati specifici

(1) Le prove citate permettono di verificare i *Bacillus* appartenenti al *Bacillus cereus* group: *Bacillus cereus*, *Bacillus cereus* var. *mycooides*, *Bacillus thuringiensis*, *Bacillus anthracis*. Tali *Bacillus* sono tassonomicamente strettamente correlati

Tabella 25.1

Test	Risultato
• Gram	Bacilli gram positivi con endospore centrali o paracentrali
• Glucosio fermentazione	Positivo
• Riduzione nitrati a nitriti	Positivo
• VP	Positivo
• Colorazione rapida per granuli lipidici	Positivo

- Eseguire i test differenziali per i membri del *Bacillus cereus* group (vedi Tabella 25.2)

Tabella 25.2

Test	<i>B. cereus</i>	<i>B. cereus</i> var. <i>mycooides</i>	<i>B. thuringiensis</i>	<i>B. anthracis</i>
• Emolisi su AS di montone o cavallo	+	(+)	+	-
• Aspetto delle colonie su AS	lieve tonalità verde	rizoidi	come <i>B. cereus</i>	bianco-grigie
• Motilità	+	-	+	-
• Sensibilità alla penicillina 10 U	-	-	-	+
• Colorazione cristalli parasporali	-	-	+	-

+ = reazione positiva
 (+) = reazione debole
 - = nessuna reazione

3. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

- Se almeno l'80% delle colonie testate è confermata, fare il conteggio esprimendo come UFC/g

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

ove: N = numero UFC/ml o g
 ΣC = è la somma delle colonie identificate come *Bacillus cereus*
 V = è il valore dell'inoculo su ciascuna piastra
 n₁ = è il numero delle piastre/tubi selezionati come valide alla prima diluizione considerata
 n₂ = è il numero delle piastre/tubi selezionati come validi alla seconda diluizione considerata
 d = fattore di diluizione corrispondente alla prima diluizione considerata

Riferimenti bibliografici

- ISO 7932/93
- Balows A., Manual of clinical microbiology, 5th ed., ASAM, Washington, USA, 1991
- FDA, Bacteriological analytical manual, 8th ed., AOAC Int., Gaithersburg, USA, 1995
- Holbrook R. et al., (1980) Can. J. Microbiol., 26, 753-759

COLORAZIONE GRANULI LIPIDICI PER *B. CEREUS*

Materiale occorrente

Natura	Quantità
• Soluzione acquosa al 5% di verde malachite	q.b.
• Soluzione di Sudan nero B allo 0,3% in alcool etilico 70%*	q.b.
• Soluzione acquosa allo 0,5% di safranina	q.b.
• Acqua distillata	35,7 ml
• Alcool etilico	100 ml
• Xilolo	q.b.

- * Alcool 70% preparato con:
 – Acqua distillata 35,7 ml
 – Alcool etilico al 95% 100 ml
 Soluzione di Sudan nero B:
 – Scaldare fino all'ebollizione 100 ml di alcool 70% (preparato come sopra) con l'aggiunta di 1 g di Sudan nero B
 – Mettere poi la miscela in termostato a 37 °C per 3 giorni
 – Prima dell'uso decantare la miscela (prelevare per la colorazione il soprastante)

1. PREPARAZIONE

- Preparare lo striscio dal centro di colonie di 1 giorno o dalla periferia di colonie di 2 giorni
- Asciugare all'aria e fissare alla fiamma
- Mettere il vetrino su un supporto sull'acqua bollente
- Coprire lo striscio con verde malachite per 2' continuando il riscaldamento
- Lavare in acqua, asciugare su carta assorbente
- Coprire lo striscio con Sudan nero B per 15'
- Lavare con xilolo per 5 secondi
- Asciugare su carta assorbente
- Coprire lo striscio con safranina per 20 secondi
- Lavare in acqua, asciugare su carta assorbente

2. LETTURA

- Cellule vegetative di *Bacillus cereus* di lunghezza 4-5 µm e larghezza 1-1,5 µm con estremi squadrati e angoli tondi, spore verdi in posizione centrale o paracentrale, globuli lipidici neri e citoplasma rosso

Riferimenti bibliografici

- Holbrook R. et al., (1980) Can. J. Microbiol., 26, 753-759

COLORAZIONE CRISTALLI PARASPORALI

Materiale occorrente

Natura	Quantità
• Metanolo	q.b.
• Fucsina basica 0,5% oppure	q.b.
• Fucsina acida di Ziehl	
• Alcool etilico	q.b.

AVVERTENZA

- Filtrare la fucsina prima dell'uso con carta bibula

1. PREPARAZIONE

- Preparare uno striscio su vetrino partendo da una coltura pura (terreno colturale a libera crescita incubato a 30 °C per 24 ore e quindi per 48-72 ore a temperatura ambiente)
- Ricoprire il vetrino con metanolo e attendere 30 secondi
- Togliere il metanolo e asciugare all'aria
- Colorare con fucsina basica allo 0,5% o con fucsina acida di Ziehl
- Scaldare il vetrino fino allo sviluppo di vapori, ripetere l'operazione a un intervallo di 1 o 2 minuti
- Rapidissimo lavaggio con alcool etilico
- Attendere 30 secondi, lavare con acqua ed asciugare

2. LETTURA

- I cristalli parasporali si presentano di forma tetragonale e di colore scuro, con dimensioni leggermente inferiori a quelle delle spore. Sono generalmente presenti in numero elevato in colture di *B. thuringiensis*, ma non vengono evidenziati mediante colorazione finché non è avvenuta la lisi dello sporangio; pertanto, finché non si osserva la presenza di spore libere, la coltura va mantenuta a temperatura ambiente per qualche giorno e sottoposta ad un ulteriore esame microscopico
- *Bacillus cereus* e gli altri membri del gruppo non producono cristalli parasporali

Riferimenti bibliografici

- FDA, Bacteriological analytical manual, 8th ed., AOAC Int., Gaithersburg, USA, 1995

YERSINIA ENTEROCOLITICA (METODO QUALITATIVO)

Materiale occorrente

Natura	Quantità
• Campione	q.b.
• Brodo di arricchimento:	
• Brodo sorbitolo bile peptone (PSBB)	225 ml
• Brodo di Irgasan ticarcillina e clorato di potassio (ITC)	q.b.
• Agar selettivo:	
• Cefsulodina, Irgasan, Novobiocina Agar (CIN)	q.b.
• Mc Conkey Agar (MC)	q.b.
• Agar SS con desossicolato di sodio e cloruro di calcio (SSDC)	q.b.
• Soluzione 0,5% KOH in 0,5% salina	1 provetta (4,5 ml x provetta)
• TSA	q.b.
• Reattivi per ossidasi	q.b.
• Triple Sugar Iron agar a becco di clarino <i>oppure</i>	q.b.
• Kligler Iron agar a becco di clarino	q.b.
• Sistemi biochimici miniaturizzati	q.b.

AVVERTENZA

- Analizzare il campione nel più breve tempo possibile mantenendolo refrigerato a 4 °C fino al momento dell'esame

1. SEMINA

- Pesare 25 g di campione e porli in 225 ml di brodo di arricchimento (PSBB) ed omogeneizzare
- Pesare una quantità x di campione e porlo in Brodo ITC in quantità tale da rispettare un rapporto campione/terreno di 1:100
- Incubare le due sospensioni iniziali nel seguente modo:
 - Terreno PSBB a 22 °C o a 25 ± 1 °C per 48-72 ore agitando o per 5 giorni senza agitazione
 - Terreno ITC a 25 ± 1 °C per 48 ore
- Dopo incubazione dei terreni di arricchimento procedere come segue:
 - Seminare con ansa la coltura dal terreno PSBB su agar CIN
 - Seminare con ansa la coltura ottenuta in terreno ITC su agar SSDC in modo da ottenere colonie isolate
 - Trasferire 0,5 ml di PSBB in 4,5 ml di soluzione KOH in soluzione salina 0,5%, me-

scolare per alcuni secondi e seminare un'ansata su una piastra di CIN agar e di MC agar

- Incubare tutte le piastre a 30 ± 1 °C per 24-48 ore

2. LETTURA

Dopo incubazione per 24 ore, le colonie caratteristiche di *Yersinia enterocolitica* si presentano come segue:

- Su agar CIN le colonie caratteristiche di *Yersinia enterocolitica* sono piccole (< 1 mm) e lisce con centro rosso e i contorni traslucidi
- Su agar SSDC, le colonie caratteristiche di *Yersinia enterocolitica* sono piccole (< 1 mm) e grigie con contorni non definiti
- Su MC le colonie si presentano piccole (1-2 mm) incolori o rosa

3. CONFERMA

- Per la conferma, prelevare da ciascuna piastra di terreno selettivo 5 colonie considerate tipiche o sospette; se sulla piastra sono presenti meno di 5 colonie, prenderle in considerazione tutte
- Strisciare le colonie selezionate sulla superficie di piastre di agar nutritivo (TSA) in modo da ottenere colonie ben isolate. Incubare a 30 ± 1 °C per 24 ore. Conservare le piastre di agar nutritivo a una temperatura compresa tra 0 °C e + 5 °C per la conferma biochimica supplementare e per i test di patogenicità. Utilizzare esclusivamente colture pure per la conferma biochimica e per i test di patogenicità

Test presuntivi

- Ureasi
- Triptofano deaminasi (Indolo)
- Kligler o TSI
- Ossidasi

Prove di conferma biochimica

Prendere in considerazione le colonie che hanno le seguenti caratteristiche:

- Ureasi positiva
- Triptofano deaminasi (indolo) positiva/negativa
- Fermentazione glucosio positiva
- Gas da glucosio negativo
- Fermentazione del lattosio negativa
- Formazione di H₂S negativa
- Ossidasi negativa

Sottoporre le colonie con le caratteristiche dette sopra a test di conferma biochimica con sistemi biochimici miniaturizzati

Test presuntivi di patogenicità

Sottoporre le colonie confermate ai precedenti test biochimici a test presuntivi di patogenicità:

- Salicina
- Esculina
- Pirazinamidasi

Tabella 26.1 – Differenziazione di *Yersinia species*

YERSINIA Species						
Reazione	<i>Yersinia pestis</i>	<i>Y. pseudo-tuberculosis</i>	<i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Yersinia intermedia</i>	<i>Yersinia frederiksenii</i>	<i>Yersinia kristensenii</i>
Urea	-	+	+			
Citrato	-	-	-	+	+	-
Motilità:						
- a 22 °C	-	+/-	+			
- a 37 °C	-	-	-			
Lisina	-	-	-			
Ornitina	-	-	+	+	+	+
Melibiosio	-	+/-	-	+	-	-
Raffinosio	-	-	-	+	-	-
Ramnosio	-	+	-	+	+	-
Mannitolo	+	+	+			
Gelatina	-	-	-			
Cellobiosio	-	-	+			
Sorbitolo	+/-	-	+			
Saccarosio	-	-	+	+	+	-
Voges-Proskauer	+	-	+/-	+	+	-
Indolo	-	-	+/-	+	+	+

- Identificare il biotipo (vedi Tabella 26.2): solo i ceppi di *Yersinia enterocolitica* biotipi 1B, 2, 3, 4 e 5 sono riconosciuti patogeni (FDA '95)

È interessante, da un punto di vista epidemiologico, mettere in evidenza gli antigeni somatici di *Yersinia enterocolitica*. I ceppi presumibilmente patogeni appartengono ai gruppi 0:3, 0:8, 0:9, 05, 27 e 0:13

Tabella 26.2 – Schema di biotipo per *Yersinia enterocolitica*

Reazione	Biotipi						
	1A	1B	2	3	4	5	6
Lipasi	+	+	-	-	-	-	-
Idrolisi Esculina	+/-	-	-	-	-	-	-
Indolo	+	+	(+)	-	-	-	-
Salicina	+/-	-	-	-	-	-	-
Xilosio	+	+	+	+	-	V	+
Trealosio	+	+	+	+	+	-	+
Pirazinamidasasi	+	-	-	-	-	-	+
β-D-Glucosidasi	+	-	-	-	-	-	-
Riduzione nitrati	+	+	+	+	+	-	+
Prolina peptidasi	V	-	-	-	-	-	+
Voges-Proskauer	+	+	+	+/-	+	(+)	-

(+) = reazione ritardata
V = reazione variabile

- Sottoporre a tipizzazione sierologica i ceppi isolati; i sierogruppi che predominano nella patologia umana sono: 0:3, 0:8, 0:9, 0:5, 27

4. CONFERMA

- In base ai risultati ottenuti indicare la presenza o assenza di *Yersinia enterocolitica* presumibilmente patogena in una porzione di x grammi di prodotto

Riferimenti bibliografici

- ISO 10273/94

BRODO PEPTONE BILE SORBITOLO (PSBB)

Materiale occorrente

Composizione	Quantità
• Na ₂ HPO ₄	8,23 g
• NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	1,2 g
• Sali di bile n. 3	1,5 g
• NaCl	5 g
• Sorbitolo	10 g
• Peptone	5 g
• Acqua distillata	1000 ml

1. PREPARAZIONE

- Miscelare i componenti e dispensare 225 ml per beuta
- Autoclavare 15 minuti a 121 °C
- pH finale: 7,6 ± 0,2 a 25 °C

2. CONSERVAZIONE

- Temperatura: 2-4 °C
- Stabilità: 1 mese

Riferimenti bibliografici

- ISO 10273/94

BRODO IRGASAN, TICARCILLINA, CLORATO DI POTASSIO (ITC)

Materiale occorrente

TERRENO BASE

Composizione	Quantità
• Triptone	10 g
• Estratto di lievito	1 g
• NaCl	5 g
• MgCl ₂ 6H ₂ O	60 g
• Verde Malachite (0,2% soluzione acquosa)	5 ml
• Acqua distillata	1000 ml

1. PREPARAZIONE

- Sciogliere i componenti in acqua distillata
- Autoclavare 15 minuti a 121 °C
- pH finale: 6,9 a 25 °C

SOLUZIONE DI TICARCILLINA (1 mg/ml)

Composizione	Quantità
• Ticarcillina	10 mg
• Acqua distillata	10 ml

1. PREPARAZIONE

- Sciogliere la Ticarcillina in acqua
- Sterilizzare per filtrazione

SOLUZIONE DI IRGASAN ALCOLICO (1 mg/ml)

Composizione	Quantità
• Irgasan	10 mg
• Etanolo 95%	10 ml

1. PREPARAZIONE

- Sciogliere l'Irgasan in etanolo
- La soluzione può essere usata subito o conservata a -20 °C per 4 settimane

SOLUZIONE DI CLORATO DI POTASSIO (100 mg/ml)

Composizione	Quantità
• Clorato di potassio	10 g
• Acqua distillata	100 ml

1. PREPARAZIONE

- Sciogliere il potassio in acqua
- Sterilizzare per filtrazione

TERRENO COMPLETO

Composizione	Quantità
• Terreno base	988 ml
• Soluzione di Ticarcillina	1 ml
• Soluzione di Irgasan	1 ml
• Soluzione di clorato di potassio	10 ml

1. PREPARAZIONE

- Raffreddare il terreno base a 45 °C
- Aggiungere asetticamente la Ticarcillina, l'Irgasan ed il clorato di potassio nelle quantità indicate
- Distribuire il brodo in contenitori di capacità appropriata

Riferimenti bibliografici

- ISO 10273/94

CAMPYLOBACTER JEJUNI E COLI (METODO QUALITATIVO)

Materiale occorrente

Natura	Quantità
• Campione	25 g o ml
• Brodo di arricchimento sec. Preston	225 ml
• Agar selettivo: • Karmali Agar e altro terreno a scelta tra quelli sotto elencati: • Preston Agar • Skirrow's Agar • Campy Brucella Agar Plate (Campy-BAP) • Blood free charcoal cefoperazione desossicolato Agar (CCDA)	2 piastre
• TSI a becco di clarino	q.b.
• Agar sangue Columbia	q.b.
• Sistemi biochimici miniaturizzati	q.b.
• Dischetti contenenti ac. nalidixico (30 µg)	q.b.
• Dischetti contenenti cefalotina (30 µg)	q.b.
• Reattivi per ossidasi	q.b.
• Reattivi per catalasi	q.b.
• Soluzione Ippurato di Na	q.b.
• Soluzione ninidrina	q.b.

AVVERTENZA

– I batteri del genere *Campylobacter* resistono 2-4 settimane a ± 4 °C in condizioni di ridotta tensione di ossigeno, 2-5 mesi a -20 °C, pochi giorni a temperatura ambiente

1. SEMINA

- Porre 25 g o ml di campione in 225 ml di brodo di arricchimento ed omogeneizzare
- Incubare a 42 ± 1 °C per 18-24 ore in microaerofilia (5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂)
- Strisciare in doppio un'ansata (10 µl) dal brodo di arricchimento su due tipi di agar selettivo
- Incubare a 42 ± 1 °C per 48-72 ore in microaerofilia (5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂)

2. LETTURA

- Selezionare le colonie sospette su Karmali: colonie grigie piatte con tendenza a diffondersi di circa 2 mm di diametro

3. CONFERMA

- Esame microscopico a fresco in contrasto di fase:
 - Prelevare con l'ansa 1 colonia e stemperarla delicatamente su un vetrino portaoggetti con 1 goccia di fisiologica (entrambi precedentemente riscaldati in termostato a 42 °C per almeno 10 minuti)
 - Coprire con vetrino coprioggetto. Le cellule sono curve, spesso spiraliformi, mobili con movimento a cavatappo
- Esame microscopico a fresco in luce trasmessa:
 - Prelevare con l'ansa 1 colonia e stemperarla in una goccia di colorante di contrasto (2 gocce di cristalvioletto in 10 ml di soluzione fisiologica)
 - Coprire con vetrino coprioggetto e osservare in immersione a 1000 x (le cellule sono curve, spesso spiraliformi, mobili con movimento a cavatappo)
- Colorazione di gram:
 - Utilizzare preferibilmente la carbol-fucsina allo 0,3% come colorante di contrasto; se si usa la safranina trattare per 3 minuti o più; le cellule sono gram negative
- Seminare per infissione e strisciamento su provette di TSI incubando a 42 ± 1 °C per 24 ore
- Eseguire i seguenti test previo isolamento di 5 colonie tipiche su agar sangue Columbia utilizzando eventualmente sistemi biochimici miniaturizzati
 - Catalasi
 - Ossidasi
 - Riduzione nitrati
 - Test sensibilità all'ac. nalidixico ed alla cefalotina su piastra di terreno selettivo
 - Crescita su Agar sangue Columbia a 25 °C e 42 ± 1 °C per 48 ore in microaerofilia
 - Idrolisi dell'Ippurato: allestire una sospensione molto densa del germe in 0,4 ml di soluzione acquosa all'1% di Na Ippurato sterilizzata per filtrazione; incubare in bagnomaria a 37 ± 1 °C per 2 ore; aggiungere 0,2 ml di soluzione di ninidrina (dissolvere 3,5 g di ninidrina in 100 ml di soluzione 1:1 di acetone e butanolo); incubare in bagnomaria a 37 °C per 10 minuti; la reazione positiva è data dalla comparsa di color viola

Tabella 27.1 – Differenziazione di *Campylobacter jejuni/coli*

Reazione biochimica	<i>C. jejuni/jejuni</i>	<i>C. coli</i>
Catalasi	+	+
Ossidasi	+	+
Fermentazione glucosio	-	-
Fermentazione saccarosio	-	-
H ₂ S	-	+
		(leggermente positivo)
Riduzione nitrati	+	+
Crescita a 25 °C	-	-
Crescita a 42 °C	+	+
Idrolisi dell'Ippurato	+	-
Acido nalidixico	S	S
Cefalotina	R	R

V = variabile
S = sensibile
R = resistente

4. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

- Per ogni campione esprimere il risultato come: presenza assenza/25 g o ml di prodotto

Riferimenti bibliografici

- ISO10272/95

BRODO DI ARRICCHIMENTO SEC. PRESTON

Materiale occorrente

Composizione	Quantità
• Estratto di carne	10 g
• Peptone	10 g
• NaCl	5 g
• Acqua distillata	950 ml
• Arricchimento:	
• Sangue lisato di cavallo (usando sangue sterile congelandolo e scongelandolo)	50 ml
• Supplemento:	
• Polimixina B	5000 UI
• Rifampicina	10 mg
• Trimethoprim	10 mg
• Cicloeximide	100 mg

1. PREPARAZIONE

- Sciogliere gli ingredienti base in 950 ml di acqua distillata portando ad ebollizione fino a completa soluzione
- Sterilizzare in autoclave a 121 ± 1 °C per 15 minuti
- Raffreddare a 45 °C
- Aggiungere aseptivamente 50 ml di sangue lisato di cavallo
- Aggiungere aseptivamente il supplemento selettivo preparato ricostituendo gli antibiotici in 4 ml di miscela acetone/acqua distillata sterile in rapporto 1:1
- Dispensare 225 ml in beute di capacità appropriate

2. CONSERVAZIONE

- Temperatura: 2-4 °C
- Stabilità: ≤ 1 settimana

Riferimenti bibliografici

- ISO10272/95

VIBRIO CHOLERAE (METODO QUALITATIVO)

Materiale occorrente

Natura	Quantità
• Campione	25 g o ml
• Acqua peptonata alcalina	225 ml
• Agar selettivo	4 piastre
• Tiosolfato Citrato Bile Saccarosio agar (TCBS)	
• Kligler iron agar o triple sugar iron agar	q.b.
• Reattivi per Ossidasi	q.b.
• Sistemi biochimici miniaturizzati	q.b.
• Antisiero polivalente anti 0:1	q.b.
• Antisiero anti-Ogawa	q.b.
• Antisiero anti-Inaba	q.b.
• Antisiero anti-Hikojima	q.b.
• Antisiero anti 0:139 (Bengala)	q.b.

1. SEMINA

- Omogeneizzare 25 g o ml di campione in 225 ml di acqua peptonata alcalina ed incubare a $35-37 \pm 1$ °C per 6-8 ore
- Prelevare un'ansata dalla superficie del terreno di arricchimento e trasferire mediante strisciamento su ciascuna di 2 piastre di agar TCBS
- Incubare le piastre a $35-37 \pm 1$ °C per 18-24 ore
- Reincubare il brodo di arricchimento per altre 16-24 ore a $35-37 \pm 1$ °C
- Al termine del periodo di incubazione seminare un'ansata di terreno di arricchimento su ciascuna di 2 piastre di TCBS mediante strisciamento
- Incubare a $35-37 \pm 1$ °C per 18-24 ore

2. LETTURA

- TCBS: colonie lisce, piatte, di diametro di 2-3 mm, gialle su fondo blu verde (occasionalmente ceppi saccarosio lento fermentanti appaiono verdi) con centro opaco con periferia traslucida

3. CONFERMA

- Prelevare 3 o più colonie sospette e trapiantarle per infissione e in superficie su provette di Kligler a becco di clarino o TSI; incubare a $35-37 \pm 1$ °C per 18-24 ore
- Sottoporre le colture che presentano aspetto caratteristico (su Kligler: fondo giallo senza sviluppo di gas né H₂S, becco di clarino rosso; su TSI: fondo giallo senza sviluppo di gas né H₂S becco di clarino giallo) alle seguenti prove:
 - Gram: (bacilli gram negativi)

- Ossidasi: (positiva)
- Motilità: mediante esame microscopico a fresco o su Sim motility medium (positiva)
- In caso di positività dei precedenti test procedere all'effettuazione di ulteriori prove eventualmente avvalendosi di sistemi miniaturizzati (vedi Tabella 28.1) ed alla ricerca della agglutinabilità dei microrganismi con gli antisieri specifici: anti-Inaba, Ogawa, Hikojima ed anti O:139

AVVERTENZA

- In caso di identificazione positiva per *Vibrio cholerae*, denunciare il caso come colera all'autorità sanitaria competente. Del ceppo vanno fatte subcolture in un terreno semi-solido a base di peptone ed inviate al Laboratorio nazionale di riferimento, con una breve storia del ceppo e delle osservazioni di laboratorio

Tabella 28.1 – Prove biochimiche per *V. cholerae*

Prova	Esito
Glucosio, gas	-
D-mannitolo	+
Inositolo	-
H ₂ S (su TSI o Kligler)	-
Lisina decarbossilasi	+
Arginina deidrolasi	-
Ornitina decarbossilasi	+

4. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

- Per ogni campione esaminato esprimere il risultato come: presenza o assenza di *Vibrio cholerae*/25 g o ml di prodotto

Riferimenti bibliografici

- FDA, Bacteriological analytical manual, 8th ed., AOAC Int., Gaithersburg, USA, 1995

ACQUA PEPTONATA ALCALINA

Materiale occorrente

Composizione	Quantità
• Peptone	20 g
• NaCl	10 g
• Acqua distillata	1000 ml

1. PREPARAZIONE

- Aggiustare il pH a 8,6/9 a 25 °C con NaOH 1N
- Distribuire 225 ml in beute di capacità appropriata
- Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti

2. CONSERVAZIONE

- Temperatura: 2-4 °C
- Stabilità: 1 mese

Riferimenti bibliografici

- FDA, Bacteriological analytical manual, 8th ed., AOAC Int., Gaithersburg, USA, 1995

VIBRIO PARAHAEMOLYTICUS (METODO QUALITATIVO)

Materiale occorrente

Natura	Quantità
• Campione	25 g o ml
• Brodo di arricchimento: • Brodo salato alla polimixina B (SPB) <i>oppure</i> • Acqua peptonata salata alcalina <i>oppure</i> • Brodo al Lauryl solfato di Na (GSTB)	225 ml
• Agar selettivi: • Agar tiosolfato citrato bile saccarosio (TCBS) <i>oppure</i> • Agar triptone TTC (TSAT)	1 piastra
• Triple Sugar Iron salato	q.b.
• Reattivi per Ossidasi	q.b.
• Acqua peptonata salata alcalina	q.b.
• Sistemi biochimici miniaturizzati	q.b.

1. SEMINA

- Pesare 25 g di alimento ed omogeneizzare in 225 ml di brodo di arricchimento
- Incubare a $35-37 \pm 1$ °C per 6-8 ore

AVVERTENZA

- Se non è possibile effettuare subito la semina mantenere l'omogeneizzato fino al giorno dopo conservandolo a 0-5 °C. Per prodotti congelati è consigliabile effettuare un secondo isolamento dopo 18 ore di incubazione

- Dal brodo di arricchimento procedere all'isolamento su Agar selettivo
- Incubare la piastra capovolta a $35-37 \pm 1$ °C rispettivamente per 18 ore il TCBS e per 20-24 ore il TSAT

2. LETTURA

- TCBS: colonie lisce, verdi (saccarosio negative); diametro 2-3 mm
- TSAT: colonie lisce, piatte, rosse (per la riduzione del cloruro di TTC); diametro 2-3 mm
- Se la crescita è stentata o se non ci sono colonie caratteristiche, prolungare l'incubazione a 24 ore per il TCBS e a 48 ore per il TSAT

3. CONFERMA

- Prelevare almeno 5 colonie caratteristiche
- Seminare ciascuna colonia su TSI salato mediante infissione e strisciamento con ago
- Incubare a 35-37 ± 1 °C per 18-24 ore
- Dai TSI salati sospetti (fondo giallo, senza gas né H₂S, becco rosso) effettuare i seguenti test:
 - ossidasi: positiva
 - gram: negativo
 - mobilità: positiva (da effettuarsi su brodocoltura di 1-6 ore a 35-37 ± 1 °C in acqua peptonata salata alcalina mediante osservazione microscopica a fresco)
 - prove biochimiche, avvalendosi eventualmente di sistemi biochimici miniaturizzati (vedi Tabella 29.1) e con l'avvertenza di effettuare sospensioni in soluzione fisiologica

Tabella 29.1 – Prove biochimiche per *V. parahaemolyticus*

Prova	Esito
Saccarosio	-
Glucosio	+
Lattosio	-
Decarbossilazione lisina	+
Indolo	+
β-galattosidasi	-

4. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

- Per ogni campione esaminato esprimere il risultato come: presenza o assenza di *Vibrio parahaemolyticus* in 25 g o ml di prodotto

Riferimenti bibliografici

- ISO 8914/90

BRODO SALATO ALLA POLIMIXINA B (SPB)

Materiale occorrente

Composizione	Quantità
• Base:	
• Peptone	10 g
• Estratto di lievito	3 g
• NaCl	20 g
• Acqua distillata	1000 ml
• Soluzione di Polimixina B:	
• Polimixina B	100.000 UI
• Acqua distillata	100 ml

1. PREPARAZIONE

- Dissolvere i componenti della base
- Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti
- Aggiustare il pH, se necessario, a 7,4 a 25 °C
- Preparare la soluzione di Polimixina B dissolvendo la stessa nell'acqua e sterilizzare per filtrazione
- Aggiungere sterilmente 100 ml della soluzione di Polimixina B a 900 ml di terreno base precedentemente raffreddato
- Distribuire 225 ml in beute di capacità opportuna

2. CONSERVAZIONE

- Temperatura: 0-5 °C
- Stabilità: ≤ 1 giorno

Riferimenti bibliografici

- ISO 8914/90

ACQUA PEPTONATA SALATA ALCALINA

Materiale occorrente

Composizione	Quantità
• Peptone	20 g
• NaCl	30 g
• Acqua distillata	1000 ml

1. PREPARAZIONE

- Dissolvere i componenti nell'acqua distillata
- Distribuire 225 ml in beute di capacità appropriata
- Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti
- Aggiustare il pH a 8,6 a 25 °C

2. CONSERVAZIONE

- Temperatura: 2-4 °C
- Stabilità: 1 mese

Riferimenti bibliografici

- ISO 8914/90

BRODO AL LAURYL SOLFATO DI SODIO (GSTB)

Materiale occorrente

Composizione	Quantità
• Peptone	10 g
• Estratto di lievito	3 g
• NaCl	30 g
• Glucosio	5 g
• Metil violetto	0,002 g
• Lauryl Solfato di Na	1,36 g
• Acqua distillata	1000 ml

1. PREPARAZIONE

- Dissolvere i componenti nell'acqua distillata
- Distribuire 225 ml in beute di capacità appropriata
- Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti
- Aggiustare il pH, se necessario, a 8,6 a 25 °C

2. CONSERVAZIONE

- Temperatura: 2-4 °C
- Stabilità: 1 mese

Riferimenti bibliografici

- ISO 8914/90

AGAR TRIPTONE TTC (TSAT)

Materiale occorrente

Composizione	Quantità
• Base:	
• Triptone	15 g
• Peptone di soia	5 g
• NaCl	30 g
• Saccarosio	20 g
• Sali biliari	0,5 g
• Agar	8-18 g
• Acqua distillata	1000 ml
• Soluzione all'1% di cloruro di trifeniltetrazolio	
• Cloruro di trifeniltetrazolio	0,1 g
• Acqua distillata	10 ml

1. PREPARAZIONE

- Dissolvere i componenti della base nell'acqua distillata
- Distribuire in beute e sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti
- Aggiustare il pH a 7,1 a 25 °C
- Preparare la soluzione di trifeniltetrazolio dissolvendo i componenti e sterilizzare per filtrazione
- Aggiungere mescolando 3 ml di soluzione sterile di trifeniltetrazolio a 1000 ml di base ricostituita e raffreddata a 45 °C
- Distribuire in piastre Petri 15-20 ml di terreno per piastra

2. CONSERVAZIONE

- Temperatura: 2-4 °C
- Stabilità: 2 settimane

Riferimenti bibliografici

- ISO 8914/90

TRIPLE SUGAR IRON SALATO

Materiale occorrente

Composizione	Quantità
• Peptone	20 g
• Estratto di lievito	3 g
• Estratto di carne	3 g
• NaCl	30 g
• Lattosio	10 g
• Saccarosio	10 g
• Glucosio	1 g
• Citrato ferrico	0,3 g
• Rosso fenolo	0,024 g
• Tiosolfato di Na	0,3 g
• Agar	8-18 g
• Acqua distillata	1000 ml

1. PREPARAZIONE

- Dissolvere i componenti nell'acqua distillata
- Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 10 minuti
- Aggiustare il pH a 7,4 a 25 °C
- Distribuire 10 ml per tubo e lasciar solidificare in posizione inclinata in modo tale che il fondo misuri 2,5 cm

2. CONSERVAZIONE

- Temperatura: 2-4 °C
- Stabilità: 1 mese

Riferimenti bibliografici

- ISO 8914/90

**CONTA COLIFORMI
RICERCA NELLE PASTE ALIMENTARI FRESCHE
NON CONFEZIONATE
(METODO PER INCLUSIONE)**

Materiale occorrente

Natura	Quantità
• Campione	v. scheda RL P2
• Diluente: acqua peptonata tamponata	v. scheda RL P2
• Agar lattosio, bile, cristalvioletto, rosso neutro (VRBL)	circa 40 ml per ogni diluizione
• Piastre Petri	2 piastre per ogni diluizione

1. SEMINA

- Pipettare 1 ml di campione precedentemente preparato (vedi scheda RL P2) e porlo in ciascuna di 2 piastre Petri
- Pipettare 1 ml di ciascuna delle diluizioni successive fino a 10^{-5} allestendo 2 piastre per ogni diluizione e cambiando ogni volta pipetta
- Versare nelle piastre circa 15 ml di VRBL precedentemente fuso e mantenuto a $45 \pm 0,5$ °C e mescolare accuratamente per rotazione, coprire e lasciare solidificare su superficie orizzontale
- Incubare a 32 ± 1 °C per 24 ore + 24 ore

2. LETTURA ED ESPRESSIONE DEI RISULTATI

- Contare le colonie con aspetto caratteristico: colore violaceo, generalmente contornate da una zona rossastra di precipitato di bile, di diametro $\geq 0,5$ mm
- Prendere in considerazione le piastre con numero compreso tra 15 e 300 colonie
- Calcolare il numero dei batteri presenti nel campione applicando la formula:

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

- ove:
- N = numero di microrganismi/ml o g
 - C = somma delle UFC contate su tutte le piastre valide
 - n_1 = numero di piastre valide alla prima diluizione
 - n_2 = numero di piastre valide alla seconda diluizione
 - d = fattore di diluizione corrispondente alla prima diluizione considerata

- Segnare come risultato il numero di batteri/ml o g di prodotto per 10^x , dove x è la potenza appropriata di 10

Esempio:

- UFC alla prima diluizione valida 10⁻²: 168-215 UFC
- UFC alla seconda diluizione valida 10⁻³: 15-25 UFC

$$N = \frac{168 + 215 + 15 + 25}{[2 + (0,1 \times 2)] \times 10^{-2}} = \frac{423}{0,022} = 19.227$$

Arrotondare a 19.000 UFC/ml o g ed esprimere il risultato come 1,9 x 10⁴ UFC/ml o g

- Nel caso in cui le piastre contengano un numero di UFC inferiore a 15, calcolare la media aritmetica delle colonie contate in due piastre ed esprimere i risultati come numero di batteri/ml per i prodotti liquidi e numero di batteri/g tenendo conto del fattore di diluizione per gli altri prodotti. In tali casi dovranno essere segnalati i limiti di confidenza, facendo riferimento alla tabella seguente:

Numero di UFC	Limite di confidenza al 95%	
	Inferiore	Superiore
1	< 1	2
2	< 1	4
3	< 1	5
4	1	6
5	2	9
6	2	10
7	2	12
8	3	13
9	4	14
10	4	16
11	5	18
12	6	19
13	7	20
14	7	21
15	8	23

- Se in due piastre non si evidenzia crescita di colonie, esprimere i risultati come segue:
 $< 1 \text{ UFC/g o ml}$
 tenendo conto del fattore di diluizione

Riferimenti bibliografici

- Istituto Superiore di Sanità, Metodiche analitiche per il controllo microbiologico delle paste alimentari, 9, ISTISAN, Roma, 1989

**CONTA ENTEROBACTERIACEAE
(METODO PER INCLUSIONE)**

AVVERTENZA

- Il metodo per inclusione presenta, rispetto al metodo MPN, maggiore precisione e minore sensibilità

Materiale occorrente

Natura	Quantità
• Campione	v. scheda RL P1
• Diluente	v. scheda RL P1
• Agar glucosio, bile, cristalvioletto, rosso neutro (VRBG)*	circa 40 ml per ogni diluizione
• Piastre Petri	2 piastre per ogni diluizione
• TSA	q.b.
• Brodo bile verde brillante e glucosio (BBG)	q.b.

* Utilizzare il terreno entro 3 ore dalla preparazione

1. SEMINA

- Pipettare 1 ml di campione (se liquido) o 1 ml del campione, se solido, precedentemente preparato (vedi scheda RL P1) e porlo in ciascuna di 2 piastre Petri
- Pipettare 1 ml di ciascuna delle diluizioni successive allestendo 2 piastre per ogni diluizione e cambiando ogni volta pipetta
- Versare nelle piastre circa 15 ml di VRBG precedentemente fuso e mantenuto a 45 ± 0,5 °C e mescolare accuratamente per rotazione, coprire e lasciare solidificare su superficie orizzontale
- Aggiungere, sulla superficie solidificata delle piastre, all'incirca 4 ml di VRBG a 45 ± 0,5 °C e lasciare solidificare
- Allestire il controllo sterilità pipettando in una piastra Petri 1 ml di diluente, versare circa 15 ml di VRBG fuso e procedere nel modo consueto
- Incubare a 30 ± 1 °C, 35-37 °C (1) per 24 ore ± 2 ore

(1) La temperatura di incubazione dipende dalla finalità del controllo microbiologico:
 - 30 °C se per finalità di controllo tecnologico-produttivo
 - 35-37 °C se per finalità di Sanità Pubblica

2. LETTURA E CONFERMA

- Contare le colonie con aspetto caratteristico: colore violaceo, generalmente contornate da una zona rossastra di precipitato di bile, di diametro ≥ 0,5 mm
- Prelevare 5 colonie caratteristiche e trasferirle su un terreno nutritivo a libera crescita (TSA)
- Incubare le piastre a 35-37 ± 1 °C per 24 ore

- Da ciascuna colonia isolata eseguire: il test dell'ossidasi (negativa) ed il test di fermentazione del glucosio che si effettua inoculando le provette di BBG ed incubando a 35-37 ± 1 °C per 24 ore (colorazione gialla del terreno e formazione del gas)

3. ESPRESSIONE DEI RISULTATI

- Considerare solo le colonie con aspetto caratteristico confermate
- Prendere in considerazione le piastre con numero compreso tra 15 e 300 colonie
- Calcolare il numero dei batteri presenti nel campione applicando la formula:

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

- ove: N = numero di microrganismi/ml o g
 ΣC = somma delle UFC contate su tutte le piastre valide
 n₁ = numero di piastre valide alla prima diluizione considerata
 n₂ = numero di piastre valide alla seconda diluizione considerata
 d = fattore di diluizione corrispondente alla prima diluizione considerata

- Segnare come risultato il numero di batteri/ml o g di prodotto per 10^x, dove x è la potenza appropriata di 10

Esempio:

- UFC alla prima diluizione valida 10⁻²: 168-215 UFC
- UFC alla seconda diluizione valida 10⁻³: 15-25 UFC

$$N = \frac{168 + 215 + 15 + 25}{[2 + (0,1 \times 2)] \times 10^{-2}} = \frac{423}{0,022} = 19.227$$

Arrotondare a 19.000 UFC/ml o g ed esprimere il risultato come 1,9 x 10⁴ UFC/ml o g

- Nel caso in cui le piastre contengano un numero di UFC inferiore a 15, calcolare la media aritmetica delle colonie contate in due piastre ed esprimere i risultati come numero di enterobatteri per i prodotti liquidi e numero di batteri/g tenendo conto del fattore di diluizione per gli altri prodotti. In tali casi dovranno essere segnalati i limiti di confidenza, facendo riferimento alla tabella seguente:

Numero di UFC	Limite di confidenza al 95%	
	Inferiore	Superiore
1	< 1	2
2	< 1	4
3	< 1	5
4	1	6
5	2	9
6	2	10
7	2	12
8	3	13
9	4	14
10	4	16
11	5	18
12	6	19
13	7	20
14	7	21
15	8	23

- Se in due piastre non si evidenzia crescita di colonie, esprimere i risultati come segue:
 < 1 UFC/g o ml
 tenendo conto del fattore di diluizione

Riferimenti bibliografici

- ISO 4832/91
- ISO 7402/93

