

Metodi microbiologici per lo studio delle matrici alimentari

DOSSIER

30

Regione Emilia - Romagna
CDS Aziende USL Città di Bologna e Ravenna
ARPA

Hanno contribuito alla realizzazione del presente Dossier:

Daniela Bernardi/ Roberta Bisemi, Antonello Colantoni/ Edgardo Contato,
Mariella Magri/ Giovanni Martinelli, Giuseppe Poda, Rita Rossi.

Curatore:

Giuseppe Poda

La Collana *Dossier* è pubblicata a cura di:
CDS (Centro di documentazione per la salute)
Azienda Usl Città di Bologna
via Granisci, 12, 40121 Bologna, tel. 051/6079979
Azienda Usl di Ravenna
via De Gasperi 8, 48100 Ravenna, tel. 0544/409018

Regione Emilia-Romagna, Servizio prevenzione collettiva
via Aldo Moro 30, Bologna, tel. 051/283111

Copia del volume può essere richiesta al CDS

Redazione:

Maria Edoarda Fava, Dipartimento di Prevenzione, Azienda Usl di Ravenna

Stampa: Azienda Usl di Ravenna, novembre 1997.

INDICE

Note del curatore	pag.	5
1 <i>BACILLUS</i>		7
1.1 Habitat.....		8
1-2 <i>Bacillus</i> e alimenti.....		8
1.3 <i>Bacillus cereus</i>		11
1.4 Fattori che influenzano la crescita, la sopravvivenza		12
e la produzione di <i>Bacillus cereus</i> negli alimenti		
1.5 Metodi di isolamento		13
2 <i>CAMPYLOBACTER</i>		19
2.1 Cenni tassonomici.....		19
2.2 Premesse.....		20
2.3 Metodo di analisi		23
3 IL GENERE <i>CLOSTRIDIUM</i> E <i>CLOSTRIDIUM PERFRINGENS</i>		37
3.1 Il genere <i>Clostridium</i>		37
3.2 Ecologia.....		38
3.3 Caratteristiche colturali dei clostridi.....		40
3.4 Clostridi e alimenti.....		40
3.5 Il <i>Clostridium perfringens</i>		41
3.6 Ricerca dei clostridi negli alimenti: conservazione.....		51
dei campioni e metodi analitici		
3.7 Composizione e preparazione dei terreni.....		62
4 <i>CLOSTRIDIUM BOTULINUM</i>		71
4.1 Aspetti della ricerca del <i>Clostridium botulinum</i>		75
e delle sue tossine negli alimenti		
4.2 Metodi analitici.....		75
4.3 Composizione e preparazione dei terreni.....		83
5 RICERCA DI GERMI SPECIFICI DELLA FERMENTAZIONE IN.....		89
YOGURT E LATTI FERMENTATI: <i>LACTOBACILLUS BULGARICUS</i> ,		
<i>STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS</i> E <i>BIFIDOBACTERIUM INFANTIS</i>		
5.1 <i>Lactobacilli</i>		89
5.2 <i>Streptococcus thermophilus</i>		91
5.3 <i>Bifidobacterium</i>		92
5.4 Preparazione del campione di yogurt per l'analisi		92

6	VIBRIO	97
6.1	Inquadramento tassonomico.....	97
6.2	Habitat.....	98
6.3	Specie patogene —.....	99
6.4	Differenziazione biochimica delle spore patogene.....	101
6.5	Uso di terreni selettivi, effetti della temperatura di.....	103
	crescita e della concentrazione di NaCl	
6.6	Metodologia di ricerca di <i>V. cholerae</i>	105
6.7	Metodologia di ricerca di <i>V. parahaemolyticus</i> ,.....	111
	<i>V. vulnificus</i> ed altri <i>Vibrio</i> spp	
6.8	Diagramma schematico per l'isolamento di <i>V. cholerae</i>	114
6.9	Diagramma schematico per l'isolamento di.....	115
	<i>V. parahaemolyticus</i> e <i>V. vulnificus</i>	
6.10	Composizione e preparazione dei terreni.....	116

La qualità igienica degli alimenti è un problema critico rilevante per la salute umana. Il controllo, peraltro, è reso difficile dalla sempre più ampia circolazione delle merci e dal diffondersi della ristorazione collettiva.

Le strutture pubbliche della prevenzione, sia del settore ambientale (ARPA - Agenzia Regionale per la Prevenzione e l'Ambiente) che di quello sanitario (Dipartimenti di prevenzione e Istituti zooprofilattici) sono fortemente impegnate in un'opera di promozione e di vigilanza che si avvale di un intreccio capillare di interventi nelle aziende di produzione, di trasformazione e di distribuzione, nonché di controlli di laboratorio. Per sostenere tali azioni sono necessario procedure tecniche accreditate, operatori qualificati e aggiornati, impegni coordinati per il raggiungimento di obiettivi comuni.

E' in questo ambito che ben si colloca il manuale "Metodi microbiologici per lo studio delle matrici alimentari". Si tratta di linee di indirizzo tecnico ampiamente documentate, frutto di un lavoro di ricerca, di sperimentazione pratica e di confronto, realizzato da un gruppo di operatori dell'Emilia-Romagna che riteniamo possa essere di utilità anche fuori dai confini regionali.

Nel presentare questo importante lavoro desideriamo anche sottolineare il ruolo che il Centro di documentazione per la salute svolge per il supporto tecnico e l'integrazione tra le diverse strutture pubbliche che si occupano di valutazione e gestione dei rischi ambientali per la salute. Questo è il primo volume della Collana Dossier che il CDS pubblica assieme all'ARRA e che segna l'avvio di una costante e proficua collaborazione anche sul piano della comunicazione e dell'informazione.

*Alessandro Martignani
direttore generale
Azienda USL di Ravenna*

*Edolo Minarelli
direttore generale dell'ARPA
dell'Emilia-Romagna*

NOTE DEL CURATORE

Questo lavoro completa un progetto iniziato a partire dal 1992 e ne costituisce l'ultima tappa.

Infatti, a partire dai primi degli anni novanta, la necessità di disporre di procedure analitiche referenziate e comuni ai laboratori pubblici della Regione Emilia-Romagna, nonché la consapevolezza di dovere fornire agli utenti degli stessi laboratori risultati sovrappositi, divenne obiettivo primario.

Per realizzare questa meta, assolutamente non scontata per originarie differenze di metodologie, di strumentazioni, di "know how", il Gruppo regionale dei PMP (Presidi multizonali di prevenzione dell'Emilia-Romagna) impostò un progetto diviso in 4 momenti:

a) ricognizione dei metodi praticati in ogni laboratorio: scelta dei principali parametri microbiologici (ricerche quadro) necessari per caratterizzare un alimento ed individuazione, per ognuno di questi parametri, di uguali vie analitiche condivise e referenziate.

Questa prima parte si concluse nel 1993 con la pubblicazione di un elaborato nella collana della Regione Emilia-Romagna Dossier (Dossier n. 17/1993);

b) omogeneizzazione delle performance in ordine alle procedure analitiche individuate attraverso un percorso formativo destinato a tutti gli operatori (periti e laureati) dei laboratori di microbiologia degli alimenti dei PMP.

Questa seconda parte si realizzò a Ferrara nel dicembre 1994;

c) realizzazione di un controllo di qualità interlaboratori allo scopo di:

- verificare il livello di calibrazione raggiunto dai 9 laboratori in relazione alla capacità di recuperare microorganismi (coliformi ed E. coli) a partire da un campione a titolo noto;*
- verificare la riproducibilità dei metodi di ricerca individuati a suo tempo;*
- valutare il livello di incertezza della metodologia usata. Questa parte, finanziata dalla Regione, progettata e preparata a Bologna, si concluse alla fine del 1995;*

d) stesura di ulteriori metodologie microbiologiche di analisi allo scopo di coprire le principali ricerche necessario per caratterizzare l'assetto microbiologico di qualsiasi matrice alimentare. In questo caso il mandato fu non solo quello di individuare la via analitica, ma anche quello di stendere, per ogni microorganismo individuato, una sintetica ma esauriente rassegna in ordine agli aspetti morfologici, sistematici, ecologici, epidemiologici.

Quest'ultima parte, come detto in apertura di presentazione, costituisce l'oggetto di questo manuale, che esce con ritardo rispetto al momento in cui fu licenziato dal Gruppo, conservando tuttavia una buona valenza, non solo per l'attualità delle metodiche individuate e proposte, ma anche per la caratterizzazione che viene fatta per ogni microorganismo presentato.

Occorre aggiungere che la pianificazione e l'organizzazione dei laboratori alimenti ARPA continua, non solo in ordine alla omogeneizzazione dei percorsi analitici, ma anche per raggiungere, conseguire e mantenere obiettivi ad elevato contenuto, in particolare:

- l'accreditamento dei laboratori ai sensi della Norma EN ISO 45001, inserito nella più ampia visione del "Progetto qualità ARPA" secondo le ISO 9000;*
- l'individuazione di specializzazioni, intese come luoghi in cui l'attività analitica raggiunge alti livelli prestazionali;*
- l'individuazione di eccellenze, intese come luoghi in cui si perfezionano alti livelli nell'ambito della ricerca e dello sviluppo dei sistemi di prevenzione.*

Giuseppe Poda

1. BACILLUS

a cura di: Daniela Bernardi

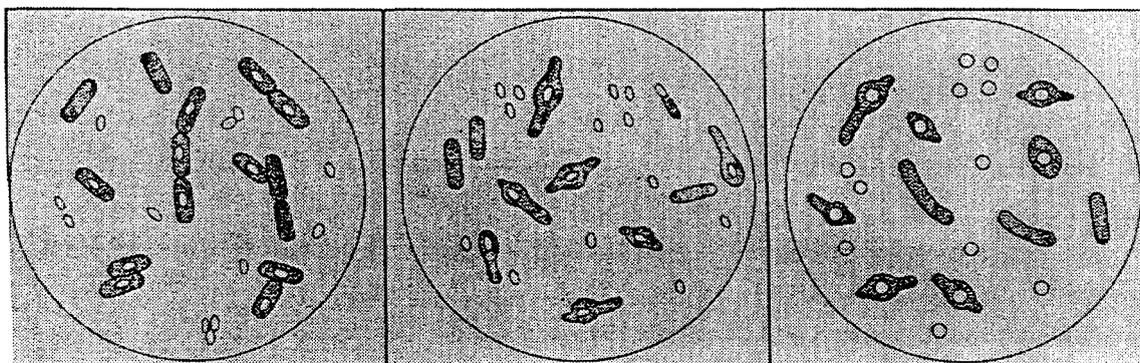
Il genere *Bacillus*, classificato nella famiglia delle Bacillaceae nella 8^a edizione del *Bergey's Manual*, è costituito da diverse specie di batteri di forma bastoncellare, Gram positivi, catalasi positivi, aerobi e anaerobi facoltativi.

Una caratteristica distintiva del genere è la formazione di endospore resistenti al calore, che hanno una considerevole importanza nella ecologia e nella tassonomia degli organismi.

La classificazione del genere *Bacillus* si basa sul lavoro di Smith *et al.* [20] che per primi iniziarono, con successo, a porre ordine al caos tassonomico, individuando una prima suddivisione all'interno del genere, basata sulla morfologia delle endospore e dello sporangio ed una ulteriore suddivisione basata su alcune caratteristiche biochimiche.

In relazione alla forma e alla posizione della endospora il genere *Bacillus* può essere distinto in 3 gruppi morfologici (fig. 1):

Fig.1



gr. morf. 1

gr. morf. 2

gr. morf. 3

Gruppo morfologico 1:

- spora centrale o subterminale, non rifrangente non deformante la cellula microbica;
- comprende la maggior parte dei patogeni che possono essere presenti negli alimenti (*B. cereus*, *B. subtilis*, *B. licheniformis*, *B. anthracis*).

Gruppo morfologico 2:

- spora centrale o subterminale, ovoidale, rifrangente a parete spessa che deforma la cellula batterica;
- comprende i patogeni che solo occasionalmente possono essere presenti negli alimenti (*B. brevis*).

Gruppo morfologico 3:

- spora terminale, sferica, rifrangente a parete spessa, che dà alla cellula batterica l'aspetto di una spilla;
- comprende solo 2 specie (*B. sphaericus*, *B. pasteurii*).

Per quanto concerne le caratteristiche biochimiche, meglio studiate da altri autori, sono riassunte nelle tabelle che seguono.

La tabella 1, tratta dai lavori di Kramer *et al.* [11] e di Parry *et al.* [16], e le tabelle 2 e 2bis, tratte dal lavoro di Deak e Timar [2] ed elaborate utilizzando tecniche statistiche per scegliere il numero minimo di test necessari per l'identificazione, riportano i dati biochimici delle principali specie che possono contaminare gli alimenti.

1.1 HABITAT

Le specie del genere *Bacillus* sono ubiquitarie in natura, in quanto si trovano nel suolo, nelle acque e nelle polveri trasportate dal vento.

Alcune specie fanno parte della normale flora batterica intestinale dell'uomo e di altri animali.

1.2 BACILLUS E ALIMENTI

Il *Bacillus cereus* ed altre specie di *Bacillus* possono essere isolate da carni fresche, con una incidenza ed un numero che riflettono il grado di contaminazione delle carcasse con il terreno o l'ambiente e, con un'incidenza spesso più alta, da prodotti di carne quali salsicce ed altri a cui vengono aggiunte spezie.

Un numero elevato di *Bacillus* può essere presente in prodotti quali: ragù o stufati, pasticci, zuppe e arrostiti, nonché carni macinate, carni di pollo o di tacchino.

Tab. 1 - Differenziazione tra specie di *Bacillus*: schema convenzionale

	<i>Bacillus</i>											
	<i>cereus</i>	<i>licheni- formis</i>	<i>brevis</i>	<i>subtilis</i>	<i>sphae- ricus</i>	<i>mega- terium</i>	<i>coagulans</i>	<i>macerans</i>	<i>pumilis</i>	<i>stearother- mophilus</i>	<i>anthracis</i>	
Motilità	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	
Gruppo morfologico	I	I	II	I	III	I	I/II	II	I	II	I	
Crescita in anaerobiosi	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	
Voges-Proskauer	+	+	-	+	-	-	+/-	-	+	-	+	
pH del 'VP broth'	4,3- 5,6	5,0- 6,5	8,0- 8,6	5,0- 8,0	>6,0	4,5- 6,8	4,2- 4,8	5,0- 6,0	5,0- 8,0	4,8- 5,0	5,0- 6,0	
Lecitinasi	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+/-	
Riduzione di nitrati	+	+	+/-	+	-	-/+	-/+	+	-	+/-	+/-	
Crescita a:												
45°C	+/-	+	+/-	+	-	+	+	+/-	+	+	-	
55°C	-	+/-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	
65°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	
Crescita con:												
7% NaCl	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	
0,001% Lisozima	+	-	-/+	-	-	-	-	-	+/-	-	+	
0,02% Azide	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	
Acido da:												
Glucosio	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	
Arabinosio	-	+	-	+	-	+/-	+/-	+	+	-/+	-	
Mannitolo	-	+	-	+	-	+/-	+/-	+	+	-/+	-	
Xilosio	-	+	+/-	+	-	+/-	+/-	+	+	-/+	-	
Idrolisi di:												
Amido	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	+	
Gelatina	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+/-	-	
Tirosina	+	-	+	-	-	+/-	-	-	-	-	-	
Utilizzo di Citrato	+	+	-/+	+	-	-/+	-/+	-/+	+	-	-/+	
Utilizzo di Propionato	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	

Tab. 2 - Differenziazione tra specie di *Bacillus*: schema semplificato

Schema A	<i>Bacillus</i>			
	<i>cereus</i>	<i>licheniformis</i>	<i>macerans</i>	<i>anthracis</i>
Test di base:				
Crescita in anaerobiosi	+	+	+	+
Idrolisi di amido	+	+	+	+
Voges-Proskauer	+	+	+	+
Sporangio rigonfio	-	-	-	-
Acido da glucosio	+	+	+	+
Gas da glucosio	-	+/-	+	-
pH <6,0 in VP broth	+	+/-	+	+
Test supplementari:				
Crescita con 7% NaCl	+	+	-	+
Crescita a 50°C	-	+	+	-
Fermentazione in mannitolo	-	+	+	-
Riduzione di nitrati	+	+	+	+/-
Idrolisi di caseina	+	-	+	+
Altre caratteristiche:				
<i>B. cereus</i> : Contiene poli- β -idrossibutirato nelle cellule vegetative				
<i>B. macerans</i> : Endospora terminale				
<i>B. anthracis</i> : Sensibile a batteriofago gamma ; non motile; non emolitico				

Altra matrice alimentare interessante per la possibilità di rinvenimento di endospore di *Bacillus cereus* sono i lattici disidratati, nei quali tuttavia il numero presente è normalmente basso, e diversi altri alimenti disidratati quali, ad esempio, uova, patate, legumi, spezie, salse miste e zuppe.

Anche i cereali possono essere contaminati da *Bacillus*; in modo particolare il riso può contenere un elevato numero di *Bacillus cereus*.

Tra le cinque specie più comunemente associate alla contaminazione di alimenti, *B. cereus*, *B. brevis*, *B. subtilis*, *B. licheniformis* e *B. sphaericus*, il *Bacillus cereus* è quello che ha la maggiore importanza in rapporto all'insorgenza di fenomeni di tossinfezione anche se, sia *B. licheniformis* che *B. subtilis* sono stati descritti come responsabili di tossinfezioni alimentari [1].

Tab. 2bis - Continuazione

Schema B	Bacillus						
	<i>brevis</i>	<i>subtilis</i>	<i>sphaericus</i>	<i>megaterium</i>	<i>coagulans</i>	<i>pumilis</i>	<i>stearothermophilus</i>
Test di base:							
Crescita in anaerobiosi	-	-	-	-	+	-	-
Idrolisi di amido	-	+	-	+	+	-	+
Voges-Proskauer	-	+	-	-	-	+	-
Sporangio rigonfio	+	-	+	-	+/-	-	+/-
Acido da glucosio	+	+	-	+	+	+	+
Gas da glucosio	-	-	-	-	-	-	-
pH <6,0 in 'VP broth'	-	+/-	-	+/-	+	+	+
Test supplementari:							
Crescita con 7% NaCl	-	+	+/-	+	-	+	-
Crescita a 50°C	+	-	-	-	+	+	+
Riduzione di nitrati	+/-	+	-	+/-	+/-	+	+
Altre caratteristiche:							
<i>B. sphaericus</i> : Endospora sferica							
<i>B. megaterium</i> : Contiene poli- β -idrossibutirato nelle cellule vegetative							

1.3 BACILLUS CEREUS

I sintomi dell'avvelenamento da *Bacillus cereus* sono di due diversi tipi, enterici ed emetici.

Le due sindromi sono il risultato dell'attività di due distinte tossine [14].

La tossina che causa la sindrome diarroica è una proteina di MW c.a. 50.000 ed ha un punto isoelettrico 4,9. Probabilmente è composta da diverse subunità che differiscono di poco in peso molecolare e in punto isoelettrico [10]. Questa tossina è labile al calore essendo inattivata da un riscaldamento a 56° C per 5 minuti [23].

La tossina responsabile della sindrome emetica ha MW inferiore a 5.000 [6], è resistente al calore (126° per 90 minuti), non è sensibile a tripsina e pepsina, resiste per 2 mesi a 4° C.

La produzione di entrambi i tipi di tossina è associata alla crescita del microrganismo nei cibi, ma mentre la tossina responsabile della sindrome diarroica è sintetizzata durante la fase di crescita esponenziale, la sintesi della tossina emetica avviene durante la fase di sporulazione con una relazione che non è a tutt'oggi nota [24].

Il meccanismo di azione della tossina diarroica consiste nella stimolazione del sistema Adenyl-ciclastasi - AMP ciclico [22, 23] e ciò provoca un accumulo di liquidi nell'intestino.

Il meccanismo d'azione della tossina emetica non è noto.

La sindrome diarroica è caratterizzata da un periodo di incubazione di 8 - 16 ore e si manifesta con crampi addominali e diarrea profusa; vomito e febbre sono sintomi occasionali. E' normalmente associata al consumo di diverse tipologie di alimenti che per lo più comprendono preparati di carne cucinati, zuppe, budini vegetali e salse.

La remissione avviene normalmente in 24 ore e le complicanze sono rare.

La sindrome emetica, normalmente associata al consumo di riso o pasta, ha invece un breve periodo di incubazione che va da 1 a 6 ore e si manifesta con comparsa di nausea come sintomo iniziale e con successivo vomito.

Anche in questo caso la remissione avviene nell'arco delle 24 ore.

La diagnosi di tossinfezione da *Bacillus cereus* può presentare alcune difficoltà poiché la sintomatologia è talvolta simile a quella tipica delle tossinfezioni sostenute da *Clostridium perfringens* (sindrome diarroica) e talvolta a quella causata da *Staphylococcus aureus* (sindrome emetica); la diagnosi è confermata solamente dal rinvenimento nel cibo di 10^5 o più microrganismi per grammo di cibo sospetto.

1.4 FATTORI CHE INFLUENZANO LA CRESCITA, LA SOPRAVVIVENZA E LA PRODUZIONE DI TOSSINA DI BACILLUS CEREUS NEGLI ALIMENTI

Il *Bacillus cereus* cresce a temperature comprese tra 7-8° C [1, 19] e 50-55° C [3, 8] con una temperatura ottimale di crescita a 37° C ed un range ottimale compreso tra 35° e 40° C [4].

La temperatura massima alla quale può avvenire la germinazione delle endospore è 50° C [8], la temperatura ottimale è 30° C e la minima corrisponde alla temperatura minima di crescita del microrganismo.

La produzione della tossina è strettamente correlata alla crescita esponenziale del microrganismo nel caso della tossina diarroica e alla sporulazione nel caso della tossina emetica e quindi è anch'essa correlata alla temperatura, anche se in modo indiretto.

Il valore minimo di pH al quale si può avere crescita di *Bacillus cereus* è 5,0 in condizioni sperimentali, tuttavia in alcune matrici quali le carni questo valore si abbassa a pH 4,35 [18].

Relativamente poco noto è il valore di AW a cui può verificarsi crescita di *Bacillus* negli alimenti; un valore limite riportato per *Bacillus cereus* è 0,95. Non

esistono evidenze della capacità di crescita o di germinazione delle endospore per valori di AW significativamente più bassi di questo.

Per quanto concerne la sopravvivenza, occorre ricordare che le cellule vegetative di *Bacillus cereus* non hanno una elevata resistenza al calore e vengono distrutte con i normali trattamenti termici che inattivano tutti i batteri che non producono spore.

La resistenza termica delle endospore è invece molto variabile; *Bacillus cereus* presenta curve di sopravvivenza non lineari a temperature superiori a 100° C [7, 19].

1.5 METODI DI ISOLAMENTO

1.5.1 Arricchimento

Normalmente l'arricchimento non è un passaggio necessario per la ricerca dei *Bacillus* negli alimenti, tuttavia un arricchimento non selettivo in brodo nutriente o in brodo lattosato può essere previsto specialmente per la ricerca di *B. cereus* [16].

Alcuni autori consigliano un arricchimento selettivo in brodo 'trypticase-soy-polymyxin' quando è necessario il rinvenimento anche di poche cellule di *B. cereus* oppure quando si esaminano cibi disidratati o contenenti amidi.

In questo caso, a partire da un omogenato ottenuto pesando 50 g di campione in 450 ml di Buterfield's tampone fosfato, si allestiscono le idonee diluizioni (10^1 - 10^6) dalle quali si semina 1 ml in 3 serie di tubi per ogni diluizione/secondo il metodo MPN (BAM).

L'incubazione viene normalmente effettuata a 37° C per 18-24 ore tranne che per i prodotti lattiero-caseari per i quali è preferibile una incubazione a 30° C. Si procede quindi all'isolamento su terreni selettivi.

1.5.2 Isolamento

Le tecniche di isolamento possono essere attuate partendo da un arricchimento come sopra descritto, oppure, secondo altri autori anche direttamente dall'omogenato.

In quest'ultima ipotesi si omogenizzano 10 g di campione di cibo in 90 ml di acqua peptonata per 30 secondi, si allestiscono le successive diluizioni sempre in acqua peptonata/triptonata e si distribuiscono 0,1 ml di queste sulla superficie delle piastre.

I terreni di isolamento consigliati sono di norma terreni selettivi, anche se la ricerca di *B. cereus* può essere effettuata su terreni non selettivi quali l'agar sangue, proposto da Kramer *et al.* [11].

La presenza, però, in molti cibi di altri batteri rende preferibile l'uso di terreni più specifici.

Sono stati individuati da diversi autori 3 terreni:

- Agar mannitolo - tuorlo d'uovo - polimixina (Mossel *et al.*) [15];
- Agar KG (Kim e Goepfort) [9];
- Agar polimixina - piruvato - tuorlo d'uovo - mannitolo - blu di bromotimolo (PEMBA, '*B. cereus* selective medium'; Holdbrook e Anderson) [5].

I principi selettivi e differenziali di questi terreni sono simili e un numero significativo di comparazioni hanno dimostrato che nessuno di questi si dimostra decisamente migliore degli altri [17]; tuttavia l'agar PEMBA o '*Bacillus* selective agar' è considerato il terreno ottimale per il rinvenimento di *B. cereus* in campioni contenenti un numero anche grande di microrganismi competitori [21].

L'utilizzo di questo terreno prevede un'incubazione a 37° C per 24 ore, per osservare l'eventuale presenza di colonie tipiche di *B. cereus*, seguita da una ulteriore incubazione a temperatura ambiente per 24 ore/ per determinare tutte le colonie di *B. cereus*.

Le caratteristiche diagnostiche principali di questo terreno sono:

- l'aspetto delle colonie;
- la precipitazione di lecitina idrolizzata;
- la evidenziazione dell'incapacità di *B. cereus* di utilizzare il mannitolo.

Le colonie tipiche di *B. cereus* sono dentate/ di circa 5 mm di diametro e di colorazione blu turchese, circondata da un precipitato di tuorlo d'uovo dello stesso colore. Queste caratteristiche distinguono il *B. cereus* dagli altri bacilli, salvo *B. thuringiensis*.

1.5.3 Prove di conferma

L'esame microscopico della presenza di globuli lipidici nella cellula vegetativa viene consigliato come test veloce per confermare la presenza di *B. cereus* e sostituisce altri saggi biochimici. Le osservazioni di Holdbrook e Anderson infatti/ confermano che soltanto il *B. cereus* fra tutte le specie di *Bacillus*, presenta globuli lipidici nelle cellule vegetative cresciute su questo terreno selettivo.

METODO DI COLORAZIONE RAPIDA DI CONFERMA

Corrisponde alla tecnica sviluppata da Holdbrook e Anderson a partire dalla colorazione per spore di Ashby e dalla colorazione di lipidi cellulari di Burton:

1. preparare degli strisci su vetrino dalla parte centrale di colonie di 1 giorno;
2. asciugare il vetrino all'aria e fissare delicatamente alla fiamma;
3. collocare il vetrino su acqua bollente e coprire con verde malachite 5% p/v;
4. dopo 2 minuti lavare e asciugare il vetrino;

5. lavare con xilolo per 5 secondi e asciugare;
6. effettuare una colorazione di contrasto con una soluzione di safranina 0/5% p/v per 20 secondi;
7. lavare e osservare al microscopio.

Le cellule vegetative di *B. cereus* hanno il seguente aspetto caratteristico: cellule di 4 - 5 mm di lunghezza e 1 - 1,5 mm di larghezza, con estremi squadri e angoli tondi. Le spore si colorano di verde più o meno pallido, si trovano in posizione centrale o paracentrale e non presentano lo sporangio. I globuli lipidici sono neri e il citoplasma vegetativo rosso.

Un sistema di identificazione alternativo è costituito dall'utilizzo di kit biochimici miniaturizzati disponibili in commercio.

L'identificazione può essere effettuata utilizzando i primi 12 test del sistema API 20E e tutti i test del sistema API 50CH [12,13].

Bibliografia

- [I] Christiansson A., Naidu A.S., Nilsson I. *et al.*, *Toxin production by Bacillus cereus dairy isolated in milk at low temperatures*, "Appl. Environ. Micro.", 55,2595-2600,1989.
- [2] Deak T. e Timar E., *Simplified identification of aerobic spore-formers in the investigation of foods*, "Int. i. Fd. Mic.", 6,115-125,1988.
- [3] Doyle M.P., *Bacillus cereus*, "Fd. Tech.", 42 (4), 199,1988.
- [4] Gilbert R.J., Stringer M.F. e Pearce T.C., *The survival and growth of Bacillus cereus in boiled and fried rice in relation to outbreaks of food poisoning*, "J. Hyg.", 73,433-444,1974.
- [5] Holdbrok R. e Anderson J.M., *An improved selective and diagnostic medium for the isolation and enumeration of Bacillus cereus in foods*, "Can. J. Mic.", 26, 753-759,1980.
- [6] Johnson K.M./ *Bacillus cereus foodborne illness-an update*, "J. Fd. Prot", 47,145-153,1984.
- [7] Johnson K.M., Nelson C.L. e Busta F.F., *Germination and heat resistance of Bacillus cereus spores from strain associated with diarrhoeal and emetic foodborne illness*, "J. Fd. Sci.", 47,1268-1271,1982.
- [8] Johnson K.M., Nelson, C.L. e Busta F.F., *Influence of temperature on germination and growth of spore of emetic and diarrhoeal strains of Bacillus cereus in a broth medium and in rice*, "J. Fd. Sci.", 48, 286-287,1983.
- [9] Kim H.U. e Goepfort J.M., *Enumeration and identification of Bacillus cereus in foods. 1. 24-hour presumptive test medium*, "Appl. Micro.", 22,581-587,1971.
- [10] Kramer J.M., *Bacillus cereus exotoxins: production, isolation, detection and properties*, "Bacterial protein toxins", Alouf J.E., Freer H., Fehrenbach F.J. e Jeijaszewicz J. (Ed.), 1984.
- [II] Kramer J.M., Tumbull P.C.B., Munshi J. e Gilbert R.J., *Identification and characterization of Bacillus cereus and other species associated with food poisoning*, "Isolation and identification methods for food poisoning organism", Corry J.E.L., Roberts D. e Skinner F.A. (Ed.), Academic Press, Londra e New York, 1982.
- [12] Logan N.A. e Berkeley R.C.W., *Classification and identification of members of the genus Bacillus using API tests*, "The aerobic endospore-forming bacteria", Berkeley R.C.W. e Goodfellow M. (Ed.), Academic Press, Londra, 1981.
- [13] Logan N.A., Berkeley R.C.W. e Norris J.R., *Results of an international reproducibility trial using the API System applied to the genus Bacillus*, "J. Appl. Bact", 45, xviii-xxix, 1978.
- [14] Melling J., Capel B.J., Tumbull P.C.B. e Gilbert R.J., *Identification of a novel enterotoxigenic activity associated with Bacillus cereus*, "J. Clin. Path.", 29,938-940,1976.
- [15] Mossel D.A.A., Koopman M.J. e Jongerius E., *Enumeration of Bacillus cereus in foods*, "Appl. Micro.", 15, 650-653,1967.
- [16] Parry J.M., Tumbull P.C.B. e Gibson J.R., *A colour atlas of Bacillus species*, Wolfe Medical Publications Ltd, Londra, 1983.

- [17] Peters M., Wiberg C. e Norberg P., *Comparison of media for isolation of Bacillus cereus from foods*, "J. Fd. Prot.", 48, 9 69-970,1985.
- [18] Raevuori M.T. e Genigeorgis C.A., *Effect of pH and sodium chloride on growth of Bacillus cereus in laboratory media and certain foods*, "Appl. Micro.", 29,68-73., 1975
- [19] Rajkowski K.T. e Mikolajcik E.M., *Characteristics of selected strains of Bacillus cereus*, "J. Fd. Prot.", 50,199-205,1987.
- [20] Smith N.R., Gordon R.E. e Clark F.E., *Aerobic spore forming bacteria*, Monograph N. 16 USDA, Washington DC, 1952.
- [21] Soltan J.R.A., Mead G.C. e Norris A.P., *Incidence and growth potential of Bacillus cereus in poultry meat products*. "Fd. Mie.", 4, 347-351,1987.
- [22] Terranova W. e Blake P.A., *Current concepts: Bacillus cereus food poisoning*, "New Eng. J. Med.", 298,143-144,1978.
- [23] Tumbull P.C.B., *Studies on the production of enterotoxin by Bacillus cereus*, "J. Clin. Path.", 29,941-948,1976.
- [24] Tumbull P.C.B., *Bacillus cereus toxins*, "Pharmacology of bacterial toxins" Pergamon Press, Oxford, 1986.

2. CAMPYLOBACTER

a cura di: Roberto. Biserni, Rita Rossi

2.1 CENNI TASSONOMICI

I microrganismi appartenenti a questo genere sono bastoncini Gram negativi (0,2-0,5 micron di diametro e 0,5-0,8 micron di lunghezza), incurvati o spiraliformi, mobili per la presenza di singoli flagelli polari ad una o ad entrambe le estremità della cellula; possono assumere forme coccoidi in colture vecchie.

Sono microaerofili e richiedono una concentrazione di ossigeno compresa fra il 3% ed il 15% ed una concentrazione di anidride carbonica compresa fra il 3% ed il 5%.

Il loro metabolismo è di tipo respiratorio. Sono chemio-organotrofi, non attaccano i carboidrati né per via fermentativa né per via ossidativa. Riducono i nitrati, sono ossidasi positivi.

Parassiti obbligati, sono stati isolati da apparati riproduttivi, tratti intestinali e cavità orali di animali e dell'uomo (*Bergey's Manual*, 1984).

Un tempo compresi nel genere *Vibrio* i *Campylobacter* costituiscono un genere a sé stante dal 1963 grazie a Sebaid e Veron che dimostrarono differenze sostanziali fra questi batteri microaerofili e gli altri vibroni apparentati.

La recente definizione di genere giustifica il fatto che la loro sistematica sia ancora in evoluzione e rende comprensibili le incongruenze che si ritrovano nella nomenclatura adottata dai diversi autori.

Sono note almeno 18 specie di *Ca.mpylobacter*, distinte in sottospecie e biotipi, 17 delle quali già ufficialmente riconosciute dall'International Committee on Systematic Bacteriology' [9], ma la tassonomia del C. è probabilmente destinata a subire nel tempo ulteriori modifiche.

All'interno del genere le specie sono state raggruppate in base a caratteristiche biochimiche o colturali:

- il test della catalasi permette di distinguere due gruppi [6]: i C. che interessano la patologia umana sono tutti catalasi-positivi ad eccezione del C. *upsaliensis*;
- la capacità di crescere a 42°C permette di distinguere specie termotolleranti e non: i C. enterici (*C. jejuni*, *C. coli*, *C. laridis*) sono tutti termotolleranti; il *C. fetus* subsp. *fetus* (coinvolto per lo più in patologie di tipo in vasivo, sia animali che umane, ma chiamato in causa anche in casi di enterocoliti umane) ha un comportamento variabile; ceppi di *C. fetus* termotolleranti sono stati isolati dal latte crudo [11].

Delle numerose specie finora descritte diverse sono riconosciute patogene per gli animali e per l'uomo (tab. 1); quelle responsabili di gastroenteriti umane

conseguenti al consumo di alimenti o acque contaminati sono essenzialmente il *C. jejuni* e, con minore frequenza, il *C. coli* e il *C. laridis*. Il quadro clinico da essi evocato è caratterizzato da dolori addominali, diarrea, a volte sanguinolenta, e febbre, sintomi che insorgono dopo un periodo di incubazione che può variare da 1 a 13 giorni; raramente, e nei casi più gravi, la forma enterica è associata a setticemia e altre complicazioni.

2.2 PREMESSE

Commensali intestinali di animali domestici e selvatici (il pollame rappresenta la maggiore fonte di infezione per l'uomo) si ritrovano:

- sulla superficie di carni crude, per contaminazione fecale durante la macellazione;
- nel latte crudo, per contaminazione fecale durante la mungitura o in corso di mastiti da *C.*;
- in molluschi, per contaminazione da acque di scarico;
- in alimenti di varia natura, per contaminazione crociata durante le fasi di produzione e manipolazione;
- in acque superficiali non sufficientemente trattate (v. anche fig.1).

La loro sopravvivenza al di fuori dell'intestino è difficile a causa della notevole sensibilità ad agenti ambientali stressanti: sono sensibili alla normale concentrazione atmosferica di ossigeno, alla temperatura di conservazione (poco resistenti alle basse temperature muoiono più facilmente a 25°C che a 4°C o a 30°C [4, IO], alla disidratazione, all'attività degli enzimi presenti negli alimenti, all'azione competitiva della flora contaminante anche se in condizioni ottimali; sono inoltre incapaci di svilupparsi al di sotto dei 30°C/ in presenza dell'1,5% di NaCl e a pH < 5 [3] e non sono quindi in grado di moltiplicarsi nei cibi in cui subiscono un decremento più o meno rapido, fortemente legato alle condizioni di conservazione.

Il rischio di tossinfezioni alimentari da *C.* risulta perciò sostanzialmente legato all'entità della contaminazione iniziale, a trattamenti di sanificazione inadeguati e al basso valore della dose minima infettante che va da sole 500 cellule a 10.000, in funzione della virulenza del ceppo e della suscettibilità dell'ospite [1,8,11].

La fragilità del *C.* nei confronti degli stress ambientali e le sue notevoli esigenze colturali giocano un ruolo importante nella scelta di un metodo d'analisi il cui protocollo operativo deve tenere in dovuta considerazione quattro momenti importanti:

- il campionamento e la conservazione dell'alimento da sottoporre ad analisi;
- la preparazione di terreni selettivi;
- l'inserimento di una fase di arricchimento;
- l'incubazione a temperature elevate in condizioni di microaerofilia.

2.2.1 Campionamento e conservazione campione

Il campione, di non piccole dimensioni, va analizzato al più presto e comunque immediatamente dopo l'eventuale apertura di una confezione sigillata; se non è possibile procedere all'analisi immediata si consideri sempre il rischio che una conservazione scorretta o troppo lunga comprometta l'esito di un metodo valido di isolamento. A causa della sensibilità del germe all'ossigeno e alla temperatura ambiente le condizioni ottimali di conservazione prevedono la refrigerazione in ambiente privo di ossigeno (eventualmente sostituito da azoto) e addizionato di sodio bisolfito allo 0,01%.

Campioni di carne possono essere adeguatamente mantenuti in 'Cary Blair medium' [10].

2.2.2 Terreni

I terreni di arricchimento e di isolamento devono contenere:

- sostanze nutritive per lo sviluppo del germe: le basi (costituite da 'Nutrient broth/agar', 'Brucella broth/agar', 'Columbia blood agar base', 'Blood agar base') sono arricchite di sangue defibrinato laccato di cavallo o sangue defibrinato di montone che, oltre a rappresentare fonte di nutrimento, esaltano l'aerotolleranza;
- supplementi elettivi (sodio piruvato + sodio bisolfito + solfato ferroso = FBP) che, neutralizzando l'ossigeno, favoriscono l'aerotolleranza e la revitalizzazione dei germi;
- supplementi selettivi (cefoperazone, trimethoprim lattato, vancomicina, rifampicina, bacitracina, novobiocina, colistina, cefalozolina, cicloeximide, polimixina B, amfotericina B, in varie combinazioni) che inibiscono la flora batterica e micotica contaminante.

I supplementi elettivi (FBP) reagiscono facilmente con l'ossigeno e con la luce con conseguente compromissione della loro attività: è importante usare terreni preparati di fresco e mantenuti al buio (non usare terreni in bottiglia più vecchi di un mese e piastre pronte più vecchie di dieci giorni).

I terreni più usati sono i seguenti:

BRODI DI ARRICCHIMENTO:

- 'Preston broth' (Bolton e Robertson '82, Bolton *et al.* '83);
- 'Doyle and Roman broth' (Doyle e Roman '82);
- 'VTP brucella FBT Broth' (Park *et al.* '83, '84);
- 'Skirrow broth'.

AGAR:

- 'Butizer agar' (Butizer e Skirrow '79);
- 'Skirrow agar' (Skirrow '77);
- 'Blaser and Wang' (Blaser e Wang '79);
- 'Preston agar' (Bolton e Robertson '82);
- 'CCDA agar blood-free' (Bolton *et al.* '84);
- 'Karmali agar blood-free' (Karmali *et al.* '86).

Fra i brodi il 'Preston broth' e lo 'Skirrow broth' sono commercializzati in Italia. Gli agar sono tutti commercialmente disponibili: il 'Preston agar' sembra essere, fra i terreni al sangue, il più sensibile e il più selettivo [4] mentre fra i terreni *blood-free*, di più agevole preparazione, il 'CCDA agar', essendo fortemente inibente nei confronti della flora contaminante batterica e micotica, può essere incubato a 37°C anziché a 42°C con una più alta percentuale di isolamento dei C. (Bolton *et al.* '88); è dotato inoltre di un'eccellente selettività e permette una buona percentuale di recupero [10]. Quest'ultimo può essere il terreno di scelta per l'isolamento del *C.fetus* che non sempre cresce a 42°C.

2.2.3 Arricchimento

L'arricchimento è necessario per evidenziare cariche microbiche anche molto basse (tenendo conto dei bassi valori della dose minima infettante e delle difficoltà di sopravvivenza del C.) e per abbattere la flora contaminante; può essere preceduto da un prearricchimento che favorisca la revitalizzazione dei germi stressati da un periodo di refrigerazione superiore a dieci giorni, dal congelamento/ dalla permanenza a temperatura ambiente.

2.2.4 Incubazione

I C. sono microaerofili e le concentrazioni di ossigeno e di anidride carbonica ideali per la loro crescita sono comprese fra 3% e 5% e fra 2% e 10% rispettivamente [4].

Condizioni di microaerofilia possono essere ottenute mediante l'uso di giare per anaerobiosi in cui l'aria venga sostituita con una miscela di gas controllata (5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂). Sono previsti anche sistemi in cui la miscela gassosa è fatta gorgogliare a flusso continuo direttamente nei brodi di arricchimento.

L'impiego dei semplici *Gas generating kit*, disponibili in commercio, si è comunque rivelato un sistema valido per l'incubazione sia delle piastre che delle brodocolture [4, 6]; aver cura di non chiudere ermeticamente beute o sacchetti posti nelle giare.

Si è notato che l'incubazione sotto agitazione dei brodi di arricchimento favorisce il recupero dei C.

I C. enterici sono termotolleranti e ciò rende possibile l'incubazione dei terreni selettivi a 42°C, temperatura che, limitando la crescita della flora contaminante, permette un maggior recupero degli stessi (tenere comunque presente, nel caso in cui si tenti l'isolamento del C. *fetus*, che questa specie include ceppi non termotolleranti).

2.3 METODO DI ANALISI

2.3.1 Preparazione campione ed arricchimento

PREPARAZIONE CAMPIONE

E' la fase più laboriosa nella ricerca del C. e si differenzia per le varie matrici. Dei procedimenti riferiti in letteratura in questi ultimi anni [4,5,10] sono stati estrapolati quelli proposti di seguito, lasciando al laboratorista la scelta della tecnica che ritiene di volta in volta più idonea.

Vi sono essenzialmente due approcci:

- 1) Il campione è "lavato" con acqua peptonata e il brodo di arricchimento è aggiunto al liquido di lavaggio, opportunamente concentrato.

Questa tecnica, applicabile alle carcasse e alle carni crude di grosso taglio, è basata sul fatto che la loro contaminazione - legata alle fasi di macellazione e di manipolazione - è solo superficiale e prevede:

- un risciacquo del campione con acqua peptonata all'1‰: porre la carcassa in busta sterile, aggiungere l'acqua in ragione di 1:6, procedere all'asportazione della flora batterica superficiale mediante uno strofinamento manuale o l'uso di un agitatore;
- una filtrazione del liquido di lavaggio attraverso garza sterile o sacchetto *stofilter*;
- una concentrazione del filtrato, tramite centrifugazione a 5000 giri per 30' a 4°C (alcuni autori propongono anche l'ultracentrifugazione: 16000 giri per 40' a 4°C per formaggi/ burro, latte, gelati [5]; 16000 giri per 10' a 4°C per carcasse di pollo e altro [10])
- un arricchimento effettuato sul sedimento: aggiungere al pellet 5 ml di acqua peptonata all'1‰; prelevarne un'ansata per l'isolamento diretto; prelevarne 2 ml cui si aggiungono 100 ml di brodo d'arricchimento.

La metodica "del lavaggio" è sostanzialmente estesa ad altri alimenti (alimenti macinati o a piccoli pezzi, formaggi e burro) per i quali la fase del risciacquo vero e proprio è sostituita da un mescolamento, o omogeneizzazione, con acqua peptonata all'1‰ (indicativamente 25 gr di alimento + 100 ml di acqua peptonata) cui fanno seguito le operazioni sopra descritte (tab. 2).

2) Il brodo d'arricchimento è aggiunto direttamente al campione.

Si procede come segue:

- il brodo di arricchimento (100 ml) è addizionato all'alimento (25 gr) che va comunque, ove possibile, allontanato per filtrazione dopo aver subito un lavaggio per mescolamento od omogeneizzazione;
- il brodo è posto direttamente ad incubare tal quale (o anche diluito 1:10 - uova e prodotti d'uovo -, o 1:10 e 1:100 - molluschi -);
- l'isolamento viene effettuato solo dopo arricchimento (tab. 3).

Questa metodica è applicabile anche ai campioni fluidi:

- uova e prodotti d'uovo (tab. 4);
- liquido intervalvare di molluschi, previo lavaggio degli stessi con il loro liquido e allontanamento dei corpi per filtrazione (tab. 5);
- latte crudo e gelati, previa concentrazione mediante centrifugazione e allontanamento del grasso e del surnatante (tab. 6).

ARRICCHIMENTO

Il brodo d'arricchimento, indipendentemente dalla tecnica seguita nella preparazione del campione, va incubato in microaerofilia, a 42°C per 24 ore.

Si può considerare anche l'opportunità di preincubarlo a 37°C per 4-5 ore per revitalizzare i germi stressati. Questo prearricchimento può essere utile per alimenti refrigerati e, soprattutto, congelati, per i molluschi e per le acque [5].

Si propongono schemi di lavoro relativi ad alcune matrici alimentari di maggiore interesse (tabelle 2, 6) e ai tamponi ambientali (tab. 7).

2.3.2 Isolamento

Procedere all'isolamento sia della preparazione iniziale del campione (il sedimento, prima dell'aggiunta del brodo) sia della brodocoltura d'arricchimento.

E' opportuno usare piastre ben asciutte (lasciate a temperatura ambiente per una notte o a 37°C per 4 ore al buio) e riscaldate a 37°C prima dell'uso.

Strisciare un'ansata abbondante sia della brodocoltura che della sua diluizione 1:100 (0,1 ml in 9,9 ml di acqua peptonata all'1%), nel caso in cui non siano previste brodocolture diluite inizialmente come per i molluschi e per i prodotti d'uovo. La diluizione della brodocoltura viene effettuata per diminuire l'effetto della flora contaminante e può essere sostituita da una filtrazione della brodocoltura attraverso una membrana con pori di 0,65 micron che sfrutta la capacità del C. di superare, grazie alle sue esigue dimensioni (0,2 - 0,5 micron di diametro) e alla sua spiccata motilità, barriere atte a trattenere la maggior parte della flora contaminante (usare filtri da siringa utilizzando 0,3 - 0,5 ml di filtra-

to). La filtrazione, raccomandata da Lovett *et al.* [7] per tutte le matrici, è prevista per i soli prodotti lattiero-caseari da Hunt [5]. Incubare le piastre in giare (possibilmente riempite solo a metà) in condizioni di microaerofilia, a 42°C per 24 e 48 ore; se le si pone ad incubare a 37°C (possibile con il 'Butizer agar' e il 'CCDA agar') prolungare l'incubazione fino a 72 ore prima di scartarle.

2.3.3 Identificazione

MORFOLOGIA DELLE COLONIE

Su terreni al sangue le colonie sono di 2 - 4 mm di diametro, traslucide, di colore dal crema al bruno, piatte, dai margini lisci, possono espandersi caratteristicamente lungo la linea di semina fino anche a confluire. La sciamatura è più evidente se si sono usate piastre poco asciutte. Le colture più vecchie possono assumere riflessi metallici. A volte possono essere presenti nella stessa piastra due tipi di colonie, grandi e piatte le une più piccole e convesse le altre, che mantengono la propria morfologia anche nelle sub-colture.

Su 'CCDA agar' le colonie sono di color grigio o grigio-crema, traslucide piatte o leggermente rilevate, talvolta sciamanti, talvolta con riflessi metallici.

VETRINO A FRESCO

Stemperare una colonia tipica in soluzione fisiologica, coprire con coprioggetto e osservare in campo scuro o in contrasto di fase. Le cellule di *C.* sono bacilli curvi, piccoli, sottili e, se uniti, formano figure a zig-zag di varia lunghezza o ad "ali di gabbiano"; dotati di caratteristica motilità a "cavatappi" ben evidenziabile in preparati da brodocolture, possono mostrare, se prelevati dall'agar, solo movimenti ondulatori. Le cellule più vecchie o stressate possono assumere forma coccoide ed avere motilità molto ridotta.

PROVE DI CONFERMA

Si procede alla conferma delle colonie costituite da microrganismi tipici scartando quelle formate da bacilli lunghi, bacilli filamentosi, bacilli corti e grossi, cocchi.

Se si devono conservare le piastre prima di procedere all'identificazione è bene porle in microaerofilia, a 4°C, al riparo dalla luce.

Previa una rapida verifica della catalasi (tutti i *C.* responsabili di patologie umane sono positivi tranne *C. upsaliensis*) e dell'ossidasi (tutti i *C.* sono positivi) allestire una coltura pura su agar sangue o agar cioccolato incubando a 42°C per 24 ore in microaerofilia; la conferma presuntiva della coltura di reisolamento può essere effettuata mediante: vetrino a fresco, catalasi/ ossidasi.

Sulla coltura pura si eseguono le prove di identificazione biochimica (vedi tab. 8) che dovrebbero includere prove di controllo con ceppi di *C. jejuni*, *C. coli*,

C. laridis (i ceppi di riferimento possono essere conservati a 4°C in 'Cary Blair medium' per un mese).

Per la identificazione dei C- enterici sono sufficienti le seguenti prove:

- Colorazione Gram: sono bacilli Gram negativi, incurvati, piccoli, sottili, con strutture a zig-zag o ad ali di gabbiano;
- Sensibilità agli antibiotici: inoculare una piastra di agar sangue o agar cioccolato con un tampone in modo da ottenere una crescita confluyente/ diffusa ed omogenea/ deporvi un dischetto di cefalotina ed uno di acido nalidixico. Incubare a 37°C per 24 ore in microaerofilia. La sensibilità è indicata da una zona di inibizione di qualunque diametro [5].
- Idrolisi dell'ippurato: stemperare un'ansata abbondante di patina batterica in 0/4 ml di soluzione di ippurato all'1%. Incubare a 37°C per 2 ore in bagnomaria. Aggiungere 0/2 ml di ninidrina al 7%, agitare/ reincubare per 10' e leggere il risultato: la reazione è positiva se si sviluppa un colore violetto (esistono kit commercialmente disponibili).

BIOTIPIZZAZIONE

All'interno delle tre specie di *C. enterici* è possibile distinguere diversi biotipi. Tale classificazione/ utile ai fini epidemiologici può essere effettuata mediante l'allestimento dei test biochimici sottoindicati (da *Les cours de microbiologie des aliments*, Istituto Pasteur, Lille, 1991).

BIOTIPI	<i>C.jejuni</i>				<i>C.coli</i>		<i>C.laridis</i>	
	I	II	III	IV	I	IV	I	II
Hippurato	+	+	+	+	-	-	-	-
H ₂ S/FBP	-	-	+	+	-	-	+	+
DNAsi	-	+	-	+	-	+	-	+

- Produzione di H₂S in brodo FBP: prelevare un'ansata abbondante da una coltura su agar sangue di 24 ore ed inocularla nel terzo superiore del brodo avendo cura di non mescolare per non mettere in sospensione i germi. Incubare in bagnomaria a 37°C per 2 ore. L'annerimento attorno all'ammasso batterico è indice di positività.

Preparazione del brodo FBP:

A- Brucella broth	g 29,0
Na ₂ HP04 (anidro)	g 1,176
KH ₂ P04 (anidro)	g 0,226
Agar	g 2,0
H ₂ O	ml 970

Autoclavare per 15' a 121°C.

Preparare le seguenti soluzioni in acqua distillata e sterilizzarle per filtrazione:

B-Solfato ferroso 7H ₂ O	al 10%
C-Metabisolfito di sodio	al 10%
D-Piruvato di sodio	al 10%

Aggiungere asepticamente 10 ml di soluzione B a 10 ml di soluzione C, miscelare bene ed aggiungere 10 ml di soluzione D. Aggiungere la miscela completa al terreno A, aggiustare il pH a 7,3 e distribuire in provette sterili (13x100) chiuse con tappo a vite (3 ml per provetta). Il brodo si conserva tre settimane a 4°C.

- Produzione di DNAsi: depositare su una piastra ben asciutta di 'DNAsi-agar' addizionato di verde metile un'ansata abbondante di patina batterica prelevata da una coltura su agar sangue di 24 o 48 ore coprendo un'area circolare di circa 1 cm di diametro; usare come controllo positivo un ceppo di *Staphilococcus aureus*. Incubare a 37°C in microaerofilia. Esaminare giornalmente per 3-5 giorni: la comparsa di un netto alone di chiarificazione attorno alla zona di crescita è indice di positività.

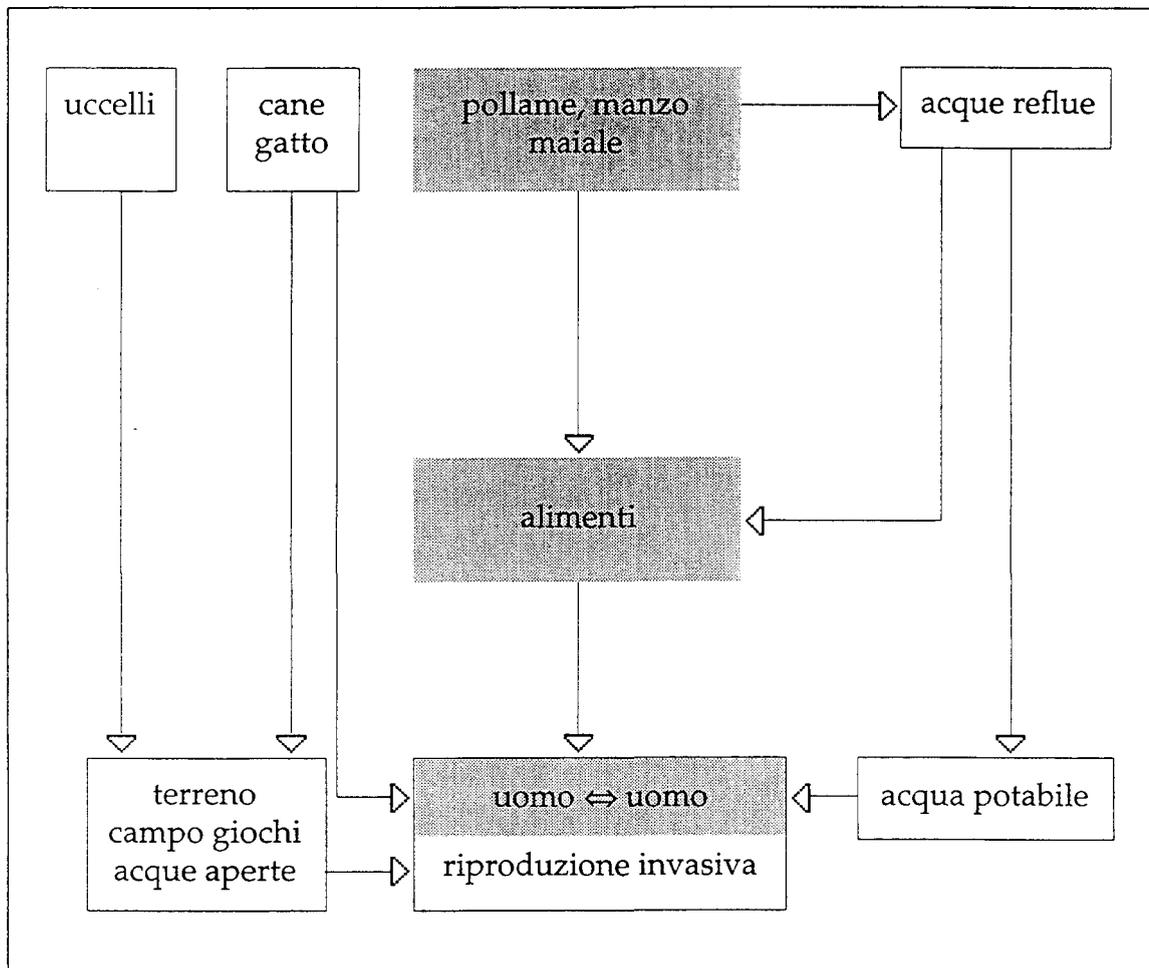
Preparazione del terreno:

Preparare l'agar per il test della DNAsi, disponibile in commercio, e aggiungere a 100 ml di terreno 1,35 ml di una soluzione acquosa di verde metile allo 0,5%; autoclavare e distribuire in piastre (25 ml per piastra).

SIEROTIPIZZAZIONE

La definizione di strutture antigeniche termostabili e termolabili sul corpo e sui flagelli del C. ha permesso la tipizzazione sierologica del gruppo del C. *jejuni-coli-laridis* (si sono distinti, per le tre specie, 60 sierotipi in base agli antigeni termostabili e 108 in base agli antigeni termolabili) ma la sierotipizzazione non è ancora entrata nella pratica diagnostica di laboratorio ed anzi sembra che non serva all'individuazione della potenziale patogenicità dei C. ne che sia molto utile ai fini epidemiologici non potendo, allo stato attuale delle conoscenze, essere disgiunta dalla biotipizzazione (allo stesso sierotipo appartengono diversi biotipi e viceversa) [3,6,10].

Fig. 1 - Vie di contaminazione di *Campylobacter jejuni* [Kramer J., Cantoni C., 1990]

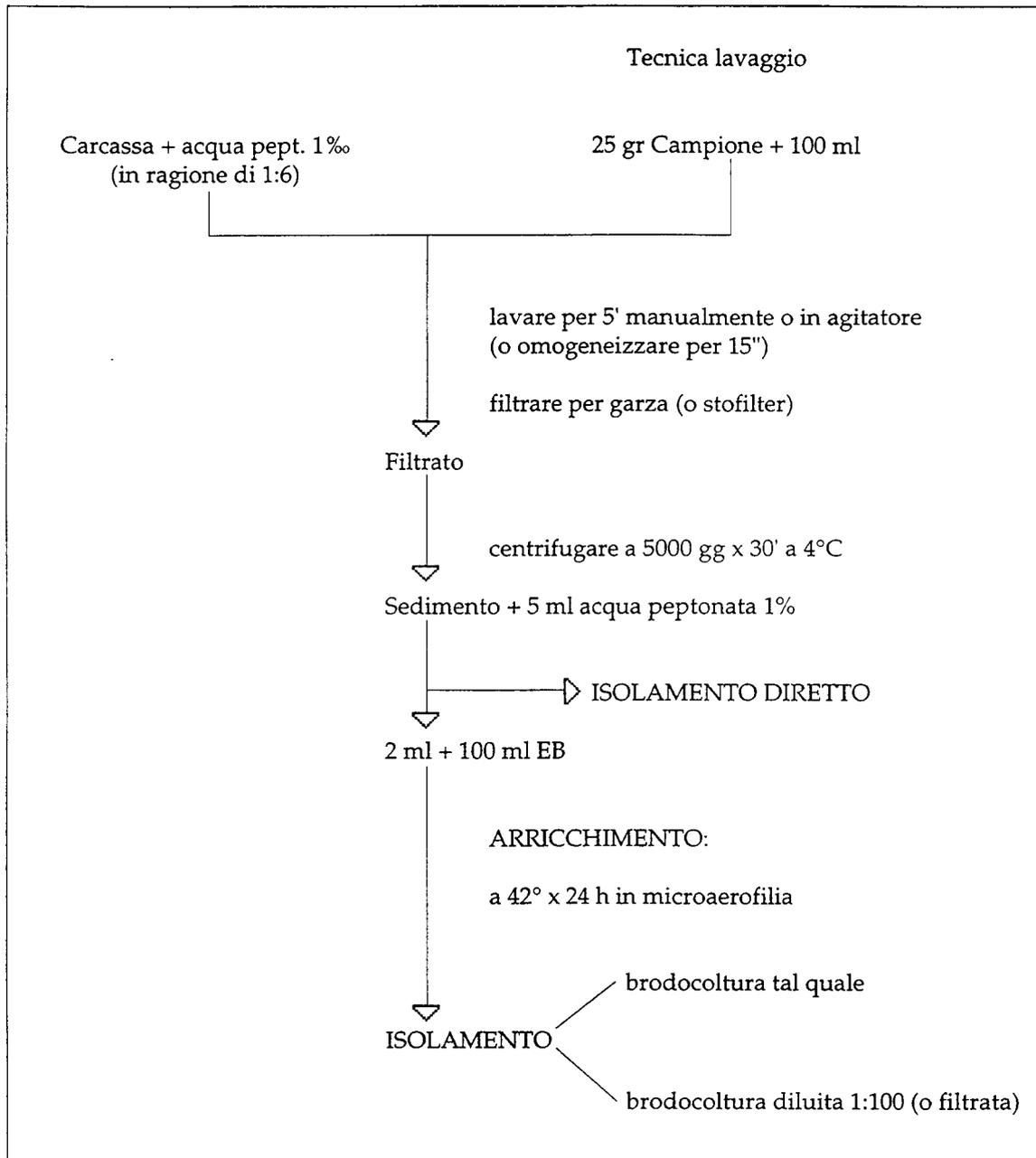


Tab. 1 - Principali *Campylobacter* e patologie prodotte

Specie	Ospite	Malattia
<i>C. fetus ssp.fetus</i>	Uomo	Enterocoliti Infezioni sistemiche, Aborti, Meningiti, Sepsi perinatale
<i>ssp. venerealis</i>	Animali Animali	Aborti, Infertilità Aborti
<i>C. jejuni</i>	Uomo Ovini	Enterocoliti acute, Infezioni sistemiche, Aborti, Sepsi perinatali Aborti
<i>C. coli</i>	Uomo	Enterocoliti acute
<i>C. laridis</i>	Uomo	Enterocoliti acute
<i>C. upsaliensis</i>	Uomo Animali	Enterocoliti acute Diarrea
<i>C. cinaedi</i>	Uomo	Enteriti, Proctiti
<i>C. fennelliae</i>	Uomo	Enteriti, Proctiti
<i>C. hyointestinalis</i>	Uomo Suino	Enteriti, Proctiti Adeniti, Adenomatosi
<i>C. mucosalis</i>	Suino	Adenomatosi intestinale Enterite necrotica ed emorragica Ileite
<i>C. cryoaerophila</i>	Uomo Animale	Enterite Aborti
<i>Helicobacter pylori</i>	Uomo	Gastrite Ulcere peptiche

Butzier *et al.*, 1991, modificata.

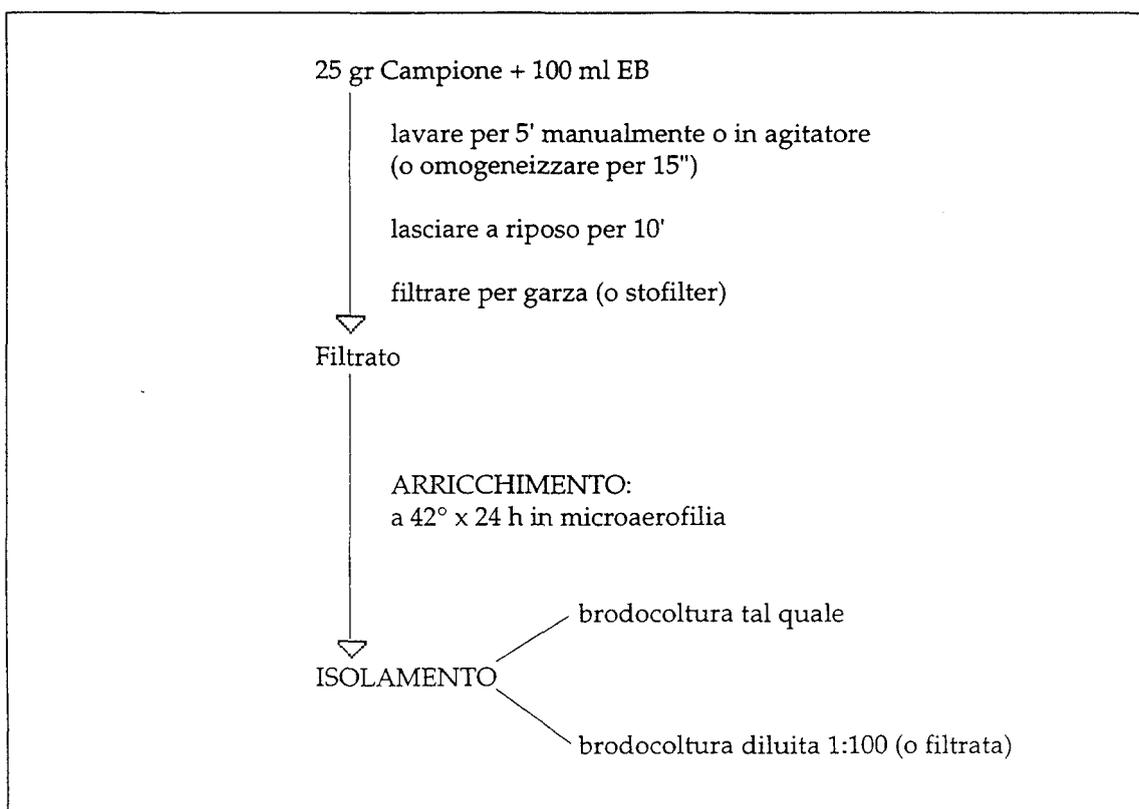
Tab. 2 - Carcasse intere¹, alimenti macinati o tagliuzzati, formaggi e burro



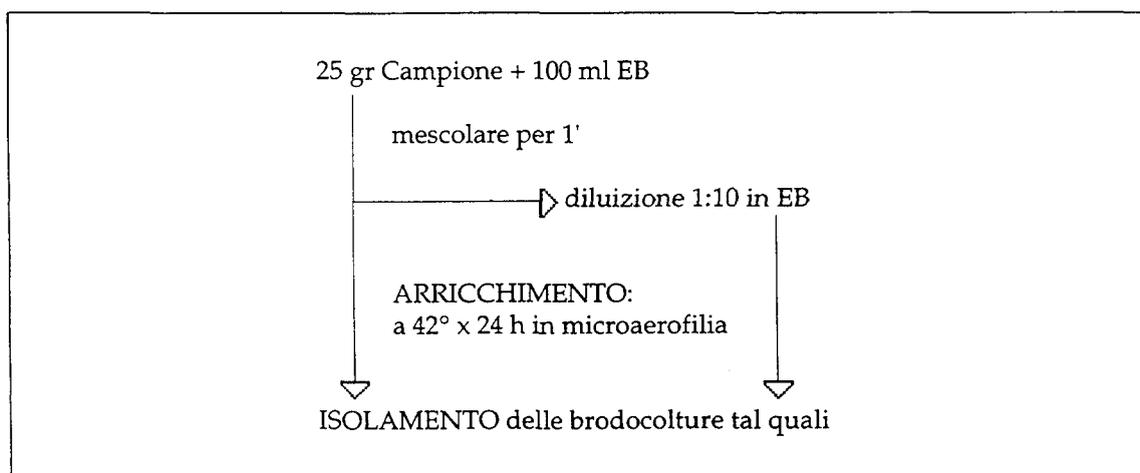
EB = brodo d'arricchimento

¹ Per le grosse carcasse può essere utilizzata anche la tecnica del tampone (v. tab. 7)

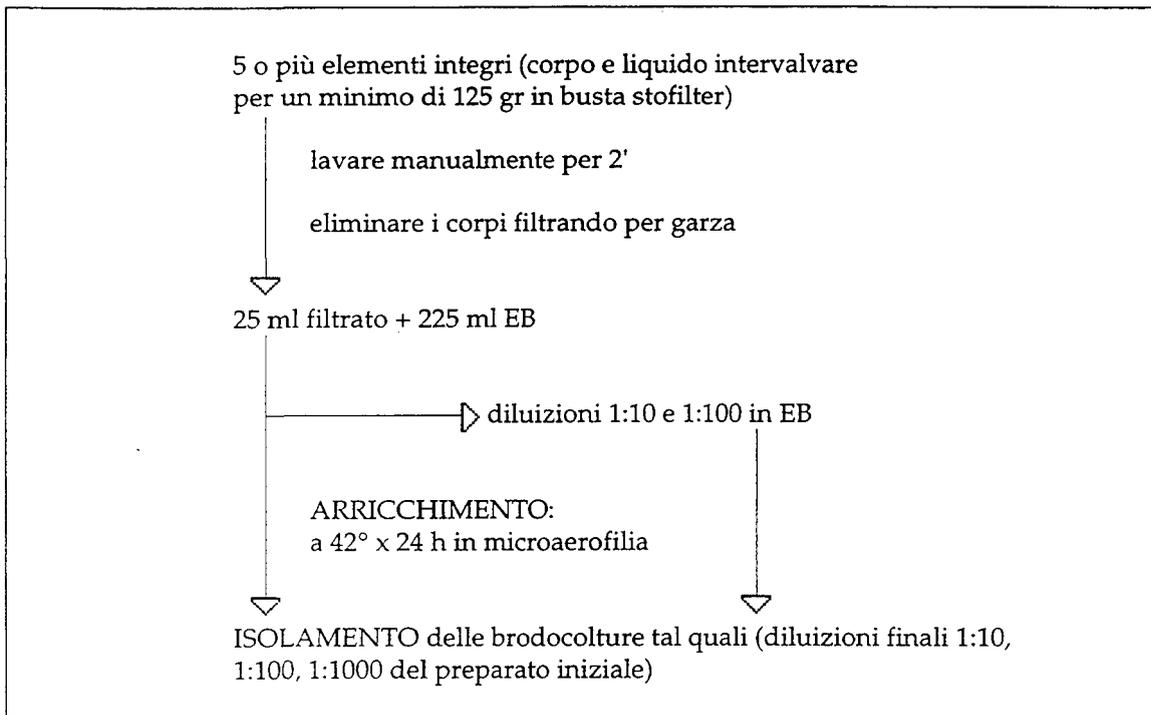
Tab. 3 - Alimento generico



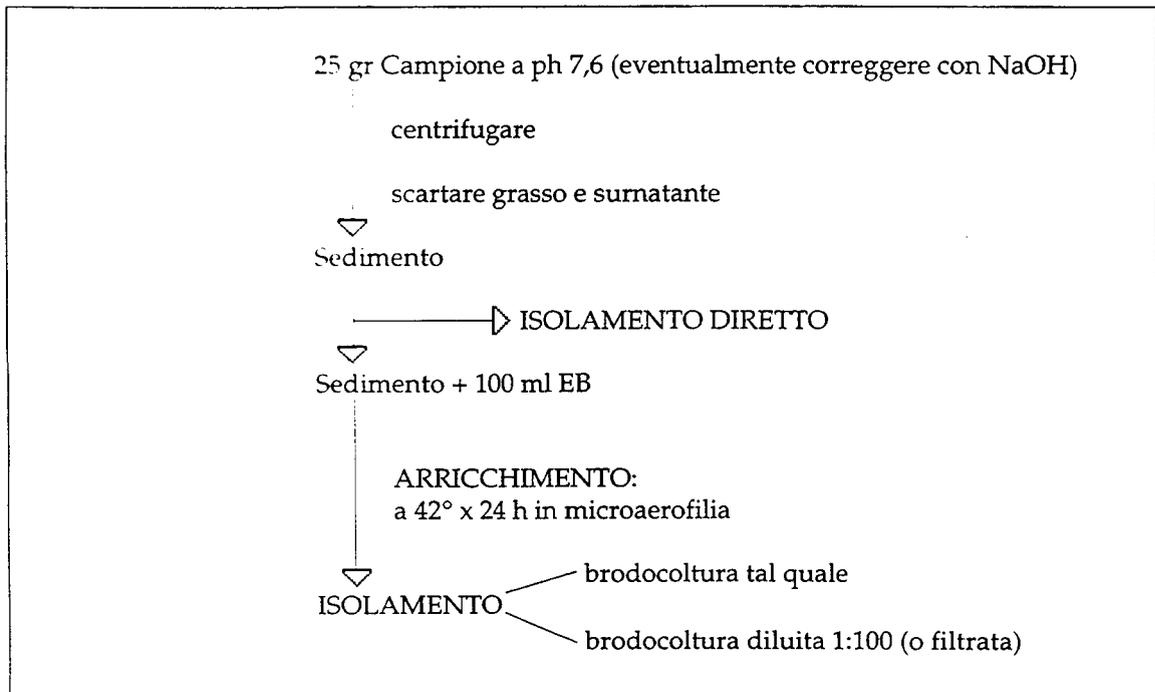
Tab. 4 - Uova e prodotti d'uovo



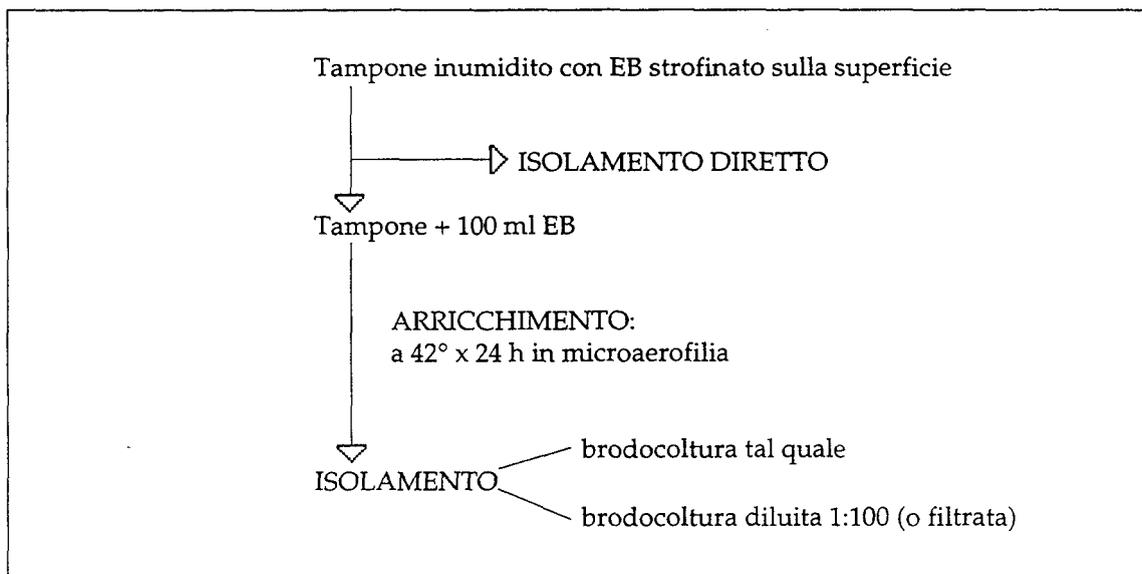
Tab. 5 - Molluschi



Tab. 6 - Latte crudo e gelati



Tab. 7 - Tamponi ambientali¹



¹ La tecnica del tampone può essere utilizzata anche per le grosse carcasse

Bibliografia

- [1] Black R.E., Levine M.M., Clements M.L., Hughes T.P. e Blaser M.J., *Experimental Campylobacter jejuni infection in humans*, "J. Infect. Dis.", 157 :472-479,1988.
- [2] Butizer J.P. e Oosterom J., *Campylobacter: pathogenicity and significance in foods*, "International Journal of Food Microbiology", 12-1991.
- [3] Coini G. e Maifreni M., *Campylobacter e Campylobacteriosi*, m Atti Conferenza Nazionale "I rischi microbiologici del 2000 nel settore alimentare", Bologna, 1992.
- [4] Doyle M., *Detection and quantitation of foodborne pathogens and their toxins: Gram negative bacterial pathogens*, in "Foodborne microorganisms and their toxins: developing methodology", IFT Basic Symposium Series, Institute of food technologies, Chicago - Illinois, 1986.
- [5] Hurit J.M., *Campylobacter*, in "Bacteriological analytical manual", U.S. Food and Drug Administration, AOAC, Arlington, Virginia, 7^a ed.,1992.
- [6] Lander K.P. e Gill W., *Campylobacters*, in "Isolation and identification of micro-organisms of medical and veterinary importance". The society for applied bacteriology technical series n. 21, Academic Press, 1985.
- [7] Lovett J., Hunt J.M., Francis D.W. e Heisick J., *Isolation of Campylobacters species*, in "Bacteriological analytical manual", U.S. Food and Drug Administration, AOAC, Arlington, Virginia, 6^a ed-, 1984.
- [8] Robinson D.A., *Infective dose of Campylobacter jejuni in milk*, "Br. Med. J.", 282:1584-1586,1981.
- [9] Skerman V.B.D., Me Gowan V. e Sneath P.H.A., *Approved lists of bacterial names*, "Inter. Jour. of System. Bacter.", 30 : 225-420,1980.
- [10] Stern N.J., Patton C.M., Doyle M.P., Park C.E. e McCardell B.A., *Campylobacter*, in "Compendium of methods for the microbiological examination of foods", American Public Health Association, Washington DC, 1992.
- [11] Tauxe R.V., Hargrett-Bean N., Patton C.M., Wachsmuth I.K., *Campylobacter isolates in the United States, 1982-1986*, "Morbidity and Mortality Weekly Rep." 37 :1-13,1980.

Tab. 8 - Caratteristiche biochimiche dei *Campylobacter* di interesse clinico (da Hunt [5])

Caratteristiche	<i>C. jejuni</i>	<i>C. coli</i>	<i>C. lari</i>	<i>C. fetus fetus</i>	<i>C. "cinaedi"</i> ^b	<i>C. "fennelliae"</i> ^b	<i>C. cyraerophilia</i>	<i>C. hyointestinalis</i>	<i>C. upsaliensis</i>
Crescita a:									
25°C	-	-	-	+	-	-	+	D	-
35-37°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+
42°C	+	+	+	D	D	D	-	+	+
Riduzione di nitrati	+	+	+	+	+	-	+	+	+
3,5% NaCl	-	-	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ S, strisce acetato di piombo	+	+	+	+	+	+	+	+	+
H ₂ S, TSI	-	D	-	-	-	-	-	+ ^f	-
Catalasi	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Ossidasi	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mac Conkey's agar	+	+	+	+	-	-	+	-	-
Mobilità (in brodo)	+(81%)	+	+	+	+	+	+	+	+
Crescita in glicine 1%	+	+	+	+	+	+	-	+	+
Utilizzazione glucosio	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Idrolisi dell'ippurato	+ ^c	-	-	-	-	-	-	-	-
Resistenza ad acido nalidixico	S ^d	S	R	R	S	S	S	R	S
Resistenza a cefalotina	R	R	R	R	S	S	S	S	S

^aSimboli: (+), il 90% o più dei ceppi è positivo; (-), il 90% o più dei ceppi è negativo; (D), l' 11-89% dei ceppi è positivo; (R), resistente; (S), sensibile.

^bNome di specie non ancora ufficiale.

^cSono stati segnalati ceppi di *C. jejuni* ippurato-negativi.

^dSono stati segnalati ceppi di *C. jejuni* acido nalidixico-resistenti.

^eSono stati segnalati ceppi di *C. fetus subs. fetus* cefalotina resistenti.

^fPiccole quantità di H₂S su TSI fresco (<3 giorni).

NOTE: *C. hyointestinalis*, *C. cinaedi* e *C. fennelliae* crescono molto scarsamente in miscele di gas O₂, CO₂, N₂. Usare *Campy Pak gas generating Kit* per la crescita su piastre ed in tubi.

Tabella adattata da T.J. Barret, C.M. Patton, e G.K. Morris, 1988. La differenziazione fra le specie di *Campylobacter* è effettuata mediante caratteristiche fenotipiche. Lab. Med. 19:96-102

3. IL GENERE CLOSTRIDIUM E CLOSTRIDIUM PERFRINGENS

a cura di: Antonello Colantoni, Mariella Magri

3.1 IL GENERE CLOSTRIDIUM

Al genere *Clostridium* appartengono microorganismi bastoncellari, generalmente Gram positivi/ anaerobi o aerobi facoltativi produttori di endospore che di solito allungano il corpo cellulare; la maggior parte delle specie possiede flagelli peritrichi e sono mobili, solo *C. perfringens* è immobile. Sono privi di capsula ad eccezione del *C. perfringens* e poche altre specie. Sui terreni di coltura formano colonie di aspetto variabile e spesso producono emolisi su agar sangue. Quasi tutti i clostridi compiono la fermentazione butirrica con produzione di grandi quantità di gas (principalmente CO₂ e H₂) [2,10].

Alcune specie decompongono le proteine, altre fermentano carboidrati quali glucosio, maltosio, lattosio e saccarosio, altre possiedono entrambe le proprietà, altre ne l'una ne l'altra. In base alla presenza o meno dell'attività proteolitica, evidenziata su terreni quali agar latte o agar caseinato, e ai diversi profili di fermentazione dei carboidrati, essi vengono suddivisi in vari raggruppamenti (vedi tabelle 1 e 2) [2,9].

Tab. 1 - Suddivisione di alcuni clostridi in base alle loro proprietà proteolitiche e saccarolitiche

Saccarolitici e proteolitici	Proteolitici non saccarolitici	Saccarolitici non proteolitici	Non saccarolitici e non proteolitici
<i>Clostridium sordelli</i>	<i>C. histolyticum</i>	<i>C. perfringens</i>	<i>C. cochlearis</i>
<i>C. sporogenes</i>	<i>C. botulinum</i>	<i>C. barati</i>	<i>C. tetani</i>
<i>C. bifermentans</i>	• tipo G	<i>C. butyricum</i>	
<i>C. botulinum</i>		<i>C. tertium</i>	
• tipo A		<i>C. fallax</i>	
• tipo B		<i>C. chuvoei</i>	
• tipo F		<i>C. septicum</i>	
		<i>C. sphenoides</i>	
		<i>C. novyi (A-D)</i>	
		<i>C. botulinum</i>	
		• tipo B	
		• tipo C	
		• tipo D	
		• tipo E	
		• tipo F	
		<i>C. cadaveris</i>	
		<i>C. difficile</i>	

Alcune specie producono esotossine e sono patogene per l'uomo. Con l'eccezione di *C. botulinum* e *C. difficile*, responsabili rispettivamente del botulismo e di coliti pseudomembranose nell'uomo e negli animali, gli altri clostridi sono associati per la maggior parte ad infezioni da ferite, tra questi i più importanti sono:

- *C. tetani*, responsabile del tetano;
- *C. perfringens*, *C. novyi*, *C. septicum*, *C. histolyticum*, *C. Bordelli*, spesso associati alla gangrena gassosa.

Il *C. botulinum* e il *C. perfringens* sono causa di gravi fenomeni tossinfettivi legati al consumo di alimenti da essi contaminati.

Altre specie di clostridi sono solo raramente associate ad infezioni ed alcune come *C. bifermentans* e *C. sporogenes* sono considerate apatogene.

3.2 ECOLOGIA

I clostridi sono ubiquitari, essi sono abitatori naturali del suolo e del sedimento marino, dell'intestino dell'uomo, degli animali e degli insetti. La caratteristica più saliente è la possibilità che hanno di produrre endospore che sono più resistenti delle forme vegetative al calore, alla disidratazione e ad altri agenti chimico-fisici distruttivi. Le endospore hanno la funzione di permettere al batterio di affrontare periodi più o meno lunghi in cui le condizioni ambientali sfavorevoli porterebbero a morte le forme vegetative.

In natura le spore costituiscono una frazione della popolazione batterica quantitativamente variabile in funzione delle condizioni dell'ambiente in cui si trova la popolazione. Tale frazione sarà infatti più elevata tanto più avverse sono le condizioni ambientali (ambienti secchi, scarsa disponibilità di nutrienti etc.)/viceversa sarà scarsa se l'ambiente è favorevole allo sviluppo delle forme vegetative.

Il rischio collegato alla capacità che hanno questi batteri nel formare le spore è dovuto al fatto che tali forme di resistenza sono in grado di sopravvivere all'azione del calore e all'essiccamento, che sono tra i sistemi più comuni impiegati per il risanamento e la conservazione dei prodotti alimentari. La sopravvivenza anche di poche spore su di un alimento sottoposto, ad esempio, a cottura può determinare la contaminazione massiva dello stesso qualora, prima del consumo, esso venga conservato in maniera tale da favorire la proliferazione delle forme vegetative che dalle spore si sviluppano.

Le spore batteriche non germinano spontaneamente, ma hanno bisogno di una qualche forma di attivazione, la più frequente risulta essere, in condizioni reali, un trattamento termico a temperatura subletale. Esistono tuttavia dei fattori che impediscono la germinazione delle spore, tra questi meritano rilievo l'acidità ($\text{pH} < 4,5-5$), l'acqua libera ($a_w < 0,94$), un ambiente non strettamente

Tab. 2 - Reazioni di alcuni clostridi

Specie	Formazione di acido da				gelatinasi	indolo	Egg Yolk agar		patogenicità x animali
	glucosio	maltosio	lattosio	saccarosio			lecitinasasi	lipasi	
<i>C. perfringens</i> (A - E)	+	+	+	+	+	-	+	-	±
<i>C. barati</i>	+	+	+	+	-	-	+	-	-
<i>C. tertium</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>C. fallax</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	±
<i>C. carnis</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	+
<i>C. chauvoei</i>	+	+	+	+	+	-	-	-	+
<i>C. septicum</i>	+	+	+	-	+	-	-	-	+
<i>C. paraputrificum</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>C. sphenoides</i>	+	+	+	-	-	+	-	-	-
<i>C. botulinum</i> (A, B, C)	+	+	-	+	+	-	-	+	+
<i>C. novyi</i> (A)	+	+	-	-	+	-	+	+	+
<i>C. novyi</i> (B)	+	+	-	-	+	-	+	-	+
<i>C. novyi</i> (C)	+	+	-	-	+	-	-	-	-
<i>C. haemolyticum</i>	+	+	-	-	±	+	+	-	+
<i>C. bifermentans</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. sordelli</i>	+	+	-	-	+	+	+	-	±
<i>C. sporogenes</i>	+	+	-	-	+	-	-	+	±
<i>C. cadaveris</i>	+	-	-	-	+	±	-	-	-
<i>C. difficile</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+
<i>C. cochlearis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>C. tetani</i>	-	-	-	-	+	+	-	-	±
<i>C. histolyticum</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	+
<i>C. lentoputrescens</i>	-	-	-	-	+	-	-	-	-

anaerobio e la presenza di additivi. E⁷ infatti per mezzo di questi fattori che si ottiene la conservazione a lungo termine degli alimenti a rischio [4].

Nella tabella 2 sono riportate le principali proprietà dei più comuni clostridi [10].

3.3 CARATTERISTICHE COLTURALI DEI CLOSTRIDI

Lo sviluppo dei clostridi deve avvenire in atmosfera strettamente anaerobia (90% H₂, 10% CO₂) in cui il potenziale di ossido-riduzione è molto basso, condizione che in laboratorio viene realizzata o mediante l'impiego di giare nelle quali l'anaerobiosi è prodotta cataliticamente a freddo o con l'impiego di appositi termostati per anaerobiosi o utilizzando particolari terreni caratterizzati dal fatto di avere un potenziale di ossido-riduzione molto basso al loro interno. La crescita di *C. perfringens* è favorita dall'aggiunta di CO₂ nell'atmosfera d'incubazione.

I terreni più comunemente impiegati per la coltivazione dei clostridi, prevedono l'utilizzazione di sostanze fortemente riducenti quali cisterna, tioglicolato, estratto di fegato o di carne.

L'attività emolitica dei clostridi, legata alla produzione di numerose emolisine, è utilizzata per la loro differenziazione ed è normalmente osservata in colture su terreno 'Nutrient agar' contenente il 7,5% di sangue defibrinato. Tale agar è impiegato come terreno elettivo per l'isolamento di clostridi di significato clinico e, addizionato di agenti antimicrobici o substrati per la fermentazione degli zuccheri, viene utilizzato come terreno differenziale per i test biochimici di conferma [10].

3.4 CLOSTRIDI E ALIMENTI

All'interno del genere *Clostridium* è possibile individuare un gruppo di microrganismi, i clostridi solfito riduttori, che comprende quei clostridi dotati della capacità di ridurre i composti ossidati dello zolfo a solfuro, capacità evidenziata nei terreni colturali contenenti citrato di ferro, dalla precipitazione di solfuro di ferro nero sulle colonie e nel terreno circostante.

A questo gruppo appartengono sia un patogeno quale il *Clostridium perfringens*, sia microrganismi apatogeni quali *C. baratti*, *C. bifermentans*, *C. celatum*, *C. novyi*, *C. putrificum*, *C. paraputrificum*, *C. pasteurianum*, *C. roseum*, *C. ramosum*, *C. saccarolyticum*, *C. tertium* [8].

I clostridi solfito-riduttori, secondo la circolare n. 81 del Ministero della Sanità del 21/09/1978, sono da ricercare negli alimenti surgelati e negli alimenti surgelati precucinati.

Certamente i clostridi più importanti da un punto di vista alimentare sono il *C. perfringens* e il *C. botulinum*.

Per quanto riguarda il *C. perfringens* è da evidenziare il fatto che la specie comprende differenti tipi di microrganismi tra loro diversi per potenziale

Patogeno, è perciò indispensabile, per verificare la pericolosità di un alimento contaminato, approfondire la ricerca per mettere in risalto non solo la presenza della specie *C. perfringens*, ma anche dei particolari tipi patogeni [6].

Il *C. botulinum* è il responsabile del botulismo, una rara e grave malattia, spesso fatale, causata dall'ingestione di alimenti contenenti la tossina botulinica, uno dei più letali veleni che si conoscano.

3.5 IL *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*

Il *Clostridium perfringens*, una volta denominato *C. welchii*, è il clostridio più comunemente coinvolto in episodi tossinfettivi di origine alimentare. Negli Stati Uniti l'incidenza di tossinfezioni causate da questo microorganismo è inferiore, per frequenza, solo a quella di tossinfezioni sostenute da *Staphylococcus aureus* [9].

Per individuare all'interno del gruppo dei solfito-riduttori la presenza di *Clostridium perfringens*, diventa indispensabile procedere ad idonee prove sulle colonie precedentemente isolate da terreni atti ad evidenziare la presenza di clostridi solfito-riduttori, oppure utilizzare terreni specifici per la ricerca di questo microorganismo in grado di metterne in risalto alcune caratteristiche peculiari quali:

- capacità di ridurre il solfito a solfuro;
- capacità di ridurre i nitrati a nitriti;
- capacità di fermentare il lattosio;
- assenza di motilità;
- fermentazione tumultuosa in terreno latte-ferro;
- attività emolitica.

Il *Clostridium perfringens* è un corto e largo bacillo, tozzo, singolo, raramente a catene, sporigeno dotato di capsula polisaccaridica. Nei comuni terreni di coltura raramente sporifica, per produrre la sporificazione è indispensabile l'utilizzo di particolari terreni quali lo 'Sporulation broth'.

La specie *C. perfringens* comprende 5 tipi, denominati con le lettere da A a E, in rapporto alla produzione di 4 tossine esocellulari (vedi oltre).

La più importante caratteristica del *C. perfringens*, in relazione alla sicurezza degli alimenti, è la sua capacità a sviluppare ad alta temperatura, esso ha un optimum di crescita variabile tra i 43° e i 45°C con un minimo intorno ai 15°C ed un massimo intorno ai 50°C; tollera valori di acqua libera (a_w) compresi tra 0,95 e 0/97, valori di pH tra 5,0 e 8,0 e cresce in presenza di NaCl al 5-6% [6].

Catalasi negativo è un anaerobio stretto incapace di sviluppare colonie alla superficie di un terreno agarizzato incubato all'aria; si sviluppa nei terreni liquidi a basso potenziale di ossido-riduzione ottenuti includendo nel terreno agenti riducenti quali cisterna e sodio tioglicolato (alcuni ceppi risultano inibiti dal tioglicolato). Nei terreni liquidi viene aggiunta una piccola quantità di agar (0,1 - 0,3%) per diminuire la diffusione dell'ossigeno e mantenere basso il potenziale

ossido-riduttivo. In natura, e negli alimenti in particolare, il batterio mostra una certa tolleranza all'aria, addirittura eccezionale se paragonata a quella di altri anaerobi ed in condizioni idonee può svilupparsi non solo in alimenti confezionati sotto vuoto, ma anche in alimenti sfusi se sono presenti sostanze riducenti.

Il punto di partenza della contaminazione dei cibi da parte di *C. perfringens* è l'intestino dell'uomo o di altri animali.

Di regola le feci umane e quelle degli animali contengono ceppi di *C. perfringens* tra i quali una certa percentuale è enterotossigena (più alta di solito negli animali).

I germi e le spore possono giungere sugli alimenti direttamente tramite contaminazione fecale o indirettamente tramite il terreno, la polvere, le acque di scarico (in questo caso si tratta prevalentemente di ceppi di tipo A, i soli a diffusione ambientale) [4].

Le tossinfezioni alimentari causate da *C. perfringens* si esplicano attraverso l'azione di un'enterotossina, prodotta durante la fase di sporulazione, che non tutti i ceppi sono in grado di produrre.

Oltre all'enterotossina il *C. perfringens* produce numerose proteine biologicamente attive indicate convenzionalmente con le lettere dell'alfabeto greco da α a ν , alcune di esse sono tossine, altre sono enzimi (vedi tab. 3) [6].

Per determinare la enterotossigenicità del *C. perfringens* è necessario indurre la sporulazione delle cellule vegetative giacché è durante questa fase che si ha la produzione dell'enterotossina.

Tab. 3 - Antigeni solubili infiltrati di colture di *Clostridium perfringens*

Sigla	Attività	Presenza in filtrati di <i>C. perfringens</i> tipo				
		A	B	C	D	E
α	Letale, necrotizzante, emolitica lecitinasi C	+++	+	+	+	+
β	Letale, necrotizzante	-	+++	+++	-	-
γ	Letale	-	+	+	-	-
δ	Emolitica, letale	-	+	++	-	-
ϵ	Letale, necrotizzante, (attivata da tripsina)	-	++	-	+++	-
η	Letale	(+)	-	-	-	-
θ	Emolitica (ossigeno-labile), letale	++-	+	+	+	+
ι	Necrotizzante, letale (attivata da tripsina)	-	-	-	-	++
κ	Collagenasi, letale, necrotizzante	++	-	+	+-	+
λ	Proteinasi (gelatinasi)	-	+++	-	+-	+
μ	Ialuronidasi	+-	+	-	+-	-
ν	Desossiribonucleasi	+	+	+	+	+

+++ , presenza in molti ceppi; ++- o +- presenza in alcuni ceppi; (+) numero molto limitato di ceppi; - non presente in alcun ceppo.

Differenti ceppi di *Clostridium perfringens* manifestano diversa attività emolitica, alcuni non sono emolitici su agar sangue di cavallo, altri producono estese zone di emolisi, altri ancora producono solamente lisi parziale. La completa emolisi è dovuta alla 9 tossina (emolisina labile in presenza di ossigeno); l'emolisi parziale è osservata frequentemente nei ceppi tipo A ed è dovuta alla tossina a (lecitinasi C); assenza di emolisi si osserva in taluni ceppi di tipo A resistenti alle alte temperature e spesso responsabili di avvelenamento di alimenti e in alcuni ceppi di tipo C che non producono θ tossina [10].

I vari ceppi di *C. perfringens* sono classificati in 5 tipi (denominati A, B, C, D, E) tra loro distinti sulla base della produzione delle 4 tossine extracellulari principali, le tossine α , β , ϵ , ι (vedi tab. 4) [6].

Tab. 4 - Esotossine e malattie prodotte dai diversi tipi di *C. perfringens*

Tipo	Malattia	Tossine			
		α	β	ϵ	ι
A	Gangrena gassosa, avvelenamenti da cibo (enterotossina)	+	-	-	-
B	Dissenteria (agnello)	+	+	+	-
	Enterotossina (pecora e capra)	+	+	+	-
C	Enterotossiemia (pecora)	+	+	-	-
	Enterotossiemia (vitello e agnello)	+	+	-	-
	Enterotossiemia (maialino)	+	+	-	-
	Enterite necrotizzante umana (Germania)	+	+	-	-
	Enterite necrotizzante umana (Papua Nuova Guinea)	+	+	-	-
D	Enterotossiemia (pecora, capra, bestiame)	+	-	+	-
E	Patogenicità dubbia	+	-	-	+

+ = prodotta dai ceppi

• = non prodotta.

Come riportate in tabella, i ceppi di *C. perfringens* in grado di produrre malattia nell'uomo sono quelli di tipo A e C; le malattie umane prodotte da questo microorganismo sono:

- gangrena gassosa (ceppi di tipo A);
- avvelenamenti da cibo (ceppi di tipo A);
- enterite necrosante (ceppi di tipo C).

La tossinfezione alimentare è prodotta da ceppi di tipo A ed è causata dalla produzione di un'enterotossina che manifesta azione simile a quella del *Vibrio cholerae* [4].

L'enterite necrosante, una rarissima e grave malattia causata dall'ingestione di alimenti carnei contaminati con *C. perfringens* di tipo C, è determinata dalla produzione di tossina β .

La tipizzazione dei vari ceppi può essere fatta con l'impiego di specifici antisieri che neutralizzano le tossine e determinando l'avvenuta neutralizzazione con somministrazione della miscela antisiero-tossina in topini.

La tipizzazione dei ceppi appartenenti al gruppo A può essere eseguita in piastra (metodo ISTISAN e test di Nagler - ICMSF) (vedi metodiche riportate più avanti) [1,3].

Le spore di ceppi diversi di *Clostridium perfringens* di tipo A mostrano una diversa resistenza al calore (100°C): alcune sopravvivono per parecchie ore, altre sono inattivate dopo pochi minuti, altre ancora resistono solo per pochi secondi, tutte però possono causare tossinfezioni alimentari [6].

Le tossinfezioni da *Clostridium perfringens* si verificano a seguito dell'ingestione di un alimento contaminato da un elevato numero di cellule vive del microorganismo ($> 10^5$ microorganismi/gr).

La malattia può essere determinata sia dal consumo di alimenti crudi massivamente inquinati, sia, più frequentemente, da alimenti cotti contenenti prima della cottura spore (anche un basso numero) le quali, sopravvissute al trattamento termico ed attivate dal calore, germinano e si moltiplicano rapidamente se la temperatura di conservazione è compresa tra i 15° e i 50° C.

Le cellule vegetative ingerite con l'alimento, giunte nell'intestino, sporificano e rilasciano l'enterotossina causa della sintomatologia. L'enterotossina è una proteina labile al calore (PM = 36±4 kd) che determina accumulo di liquidi nell'intestino di animali da laboratorio.

La somministrazione della proteina purificata in volontari umani determina sintomi identici a quelli della malattia [5].

La malattia sopraggiunge solitamente dopo 8/15 ore dall'ingestione del cibo contaminato.

I sintomi sono forti crampi addominali, formazione di gas, diarrea (nausea, vomito e febbre sono rari), essi si affievoliscono già dopo 10/24 ore.

Complicazioni non frequenti si possono osservare nelle persone indebolite, specialmente negli anziani [4].

Anche se generalmente la tossina non è preformata nell'alimento, i cibi che vengono conservati in condizioni favorevoli alla sporulazione possono contenerla.

Infatti in rari casi i sintomi della malattia si sono manifestati a sole 2 ore dall'ingestione dell'alimento contaminato e ciò suggerisce la possibilità che l'alimento potesse contenere tossina preformata o cellule in fase di sporificazione. E' stata riscontrata la produzione di enterotossina in alimenti carnei ed in pollame contaminati. E' comunque rara la possibilità di tossinfezione da alimenti contenenti tossina preformata [6].

Pur essendo le spore di *Clostridium perfringens* ubiquitarie, gli alimenti maggiormente coinvolti in episodi tossinfettivi sono gli alimenti a base di prodotti carnei i quali sono più soggetti ad abusi termici specie nelle ristorazioni collettive ed alberghiere.

Nel caso di sospetta tossinfezione alimentare la dimostrazione nell'alimento incriminato di un migliaio di *C. perfringens* /gr indirizza verso una diagnosi di avvelenamento da questo microorganismo, il sospetto potrà essere confermato dall'isolamento di un elevato numero di spore di *Clostridium perfringens* produttori di enterotossina nelle feci dei pazienti colpiti dalla malattia.

3.5.1 Aspetti della ricerca del *Clostridium perfringens* negli alimenti

La ricerca di *C. perfringens* negli alimenti prevede tre fasi:

1. l'identificazione presuntiva di specie;
2. test di conferma;
3. test per la tipizzazione intraspecifica.

1) IDENTIFICAZIONE PRESUNTIVA DI SPECIE

Terreni di coltura

La ricerca del microorganismo nel campione, sottoposto o no a trattamento termico/ può essere attuata secondo tre diverse metodologie:

1. Semina diretta in piastra (conteggio diretto) mediante l'uso di terreni solidi selettivi e successive prove di conferma. (Raccomandabile quando si suppone una carica elevata di clostridi).
2. Metodo del numero più probabile (MPN).
3. Metodo con arricchimento colturale.
(Raccomandabile quando si suppone un numero estremamente ridotto di spore e di cellule vegetative o quando si vuole verificare la presenza/assenza del germe in una certa quantità di prodotto).

I terreni solidi agarizzati per la conta in piastra sono resi selettivi dall'aggiunta di uno o più antibiotici che inibiscono la crescita di aerobi e anaerobi facoltativi; alcuni sono contemporaneamente selettivi e differenziali. I più usati sono:

- 'Neomycin horse blood agar';
- 'Sulphite polymyxin sulphadiazine' (SPS);
- Tryptone sulphite neomycin agar' (TSN);
- 'Shahidi Ferguson perfringens agar' (SFP);
- 'D-cycloserine blood agar';
- 'Oleandomycin polymyxin sulphadiazine perfringens agar' (OPSP);
- Tryptose sulphite cycloserine agar' (TSC);
- 'Egg yolk-free tryptose sulphite cycloserine agar' (EY-free TSC);
- Trypticase-soy sheep blood agar' (TSB) [7,8].

Le colonie che si sviluppano in questi terreni devono essere sottoposte a conferma per l'identificazione del *Clostridium perfringens*.

Il terreno 'Oleandomycin polymyxin sulphadiazine perfringens agar' (OPSP) contiene una miscela di tre antibiotici e risulta estremamente selettivo giungendo ad inibire alcuni stipiti di *C. perfringens* oltre agli altri sporigeni anaerobi. L'uso di questo terreno è consigliabile quando nel campione da analizzare si prevede un basso numero di batteri specifici ed un'alta carica di batteri contaminanti.

Altri terreni quali 'Shahidi Ferguson perfringens agar' (SFP), 'Neomycin horse blood agar', 'Tryptose sulphite cycloserine agar' (TSC) sono meno selettivi rispetto al precedente permettendo la crescita di altri clostridi oltre al *C. perfringens*, ma ne permettono un maggior recupero; il loro impiego è consigliato nel caso di analisi di campioni in cui si sospetti un'elevata carica di *C. perfringens* ed una bassa carica di microorganismi competitori.

Lo 'Shahidi Ferguson perfringens agar' (SFP) ed il 'Tryptose sulphite cycloserine agar' (TSC) possono essere resi differenziali con l'aggiunta di rosso d'uovo dato che questo viene precipitato, sotto forma di alone opaco attorno alle colonie, per l'azione di una lecitinasi sintetizzata dalla gran parte dei ceppi di *C. perfringens*; esistono tuttavia ceppi di *C. perfringens* non produttori di lecitinasi e alcuni clostridi solfito-riduttori produttori di enzima. Il rosso d'uovo permette un maggior recupero delle cellule e delle spore favorendo la rivitalizzazione dei microorganismi con danni subletali prodotti dai trattamenti termici, contemporaneamente la presenza di lisozima stimola la germinazione delle spore.

I terreni 'Sulphite polymyxin sulphadiazine' (SPS) e 'Tryptone sulphite neomycin agar' (TSN) sono molto selettivi e possono inibire lo sviluppo di alcuni ceppi di *C. perfringens*.

Il 'D-cycloserine blood agar' può essere usato per l'isolamento selettivo da brodi di arricchimento, ma non è molto indicato per la ricerca di routine a partire dall'alimento.

Il 'Tryptose sulphite cycloserine agar' (TSC) e la sua forma modificata 'Egg yolk-free tryptose sulphite cycloserine agar' (EY-free TSC) sono i più utilizzati per la ricerca quantitativa di *C. perfringens* con una soddisfacente soppressione di gran parte degli anaerobi facoltativi contaminanti.

Il metodo di arricchimento culturale ed il metodo MPN prevedono l'utilizzo iniziale di terreni liquidi e le successive prove di conferma in terreni agarizzati selettivi e differenziali.

I terreni liquidi utilizzati sono brodi fortemente riducenti che favoriscono lo sviluppo degli anaerobi. I principali sono:

- 'Fluid thioglycollate medium' (FTM) [1, 3,8];
- 'Cooked meat medium' [3];
- 'Chopped liver broth' [5,7].

Questi terreni non sono selettivi, ma permettono la crescita ottimale di anaerobi; la presenza di *C. perfringens* deve essere confermata con subcolture in

terreni selettivi e/o differenziali che mettono in risalto le proprietà caratteristiche del *C. perfringens* rispetto agli altri clostridi eventualmente presenti nel campione in esame.

I terreni di coltura liquidi vanno conservati per non più di un mese in frigorifero e devono essere rigenerati, prima dell'uso, ponendoli a 100° C per 10 minuti e raffreddati prima dell'inoculazione. La rigenerazione permette di allontanare dal terreno l'ossigeno disciolto.

2) TEST DI CONFERMA

I test fondamentali per l'identificazione di *C. perfringens* sono:

- colorazione Gram e catalasi;
- mobilità e riduzione dei nitrati;
- produzione di gelatinasi;
- fermentazione di glucosio, lattosio/ saccarosio;
- fermentazione tumultuosa;
- produzione di spore.

a) Colorazione di Gram e catalasi

La colorazione di Gram evidenzia la presenza di bacilli Gram positivi tozzi, singoli o riuniti in coppia o più raramente in corte catene.

Per la prova della catalasi prelevare una porzione di colonia (non da agar sangue) e deporta in una goccia di H₂O₂ al 5%. La presenza di catalasi determina la comparsa di bolle e/o di effervescenza.

b) Test per la mobilità e la riduzione dei nitrati [1,3,5,8]

Un'ansata di brodocoltura viene inoculata al centro di una provetta contenente 'Motility S Medium' ed incubata a 37° C per 24 ore.

I microorganismi mobili producono una crescita diffusa a tutto il terreno, quelli immobili presentano una crescita batterica limitata alla sola linea d'inoculo.

Se la motilità è assente (il *C. perfringens* è immobile) aggiungere 0,1 ml di ciascuno dei reattivi di Griess (a-naftilammia e acido sulfanilico) ed osservare la comparsa di una colorazione rosa o rossa entro 15 minuti (reazione positiva)/ nel caso di negatività è necessario aggiungere polvere di zinco per escludere l'eventualità che la riduzione dei nitrati/ passando per la produzione di nitriti/ abbia condotto alla formazione di N₂ (reazione positiva: il colore rimane invariato; reazione negativa: si ha una colorazione rosa-rossa per la riduzione dei nitrati, non ridotti dal microorganismo, a nitriti da parte dello zinco metallico).

e) Test per la produzione di gelatinasi [3]

Un'ansata di brodocoltura viene insemata in una provetta di 'Lactose gelatine medium' ed incubata a 35/37°C per 24 ore senza anaerobiosi. La liquefazione della gelatina si evidenzia dopo aver posto la provetta in acqua con ghiaccio per 10 minuti, con la non solidificazione del terreno, in caso di negatività ed in presenza di prove che declinano per la presenza di *C. perfringens* si reincuba per altre 24 ore.

d) Test di fermentazione di carboidrati [3,5]

Si inoculano ansate di brodocoltura in 4 tubi di Teptone sugar broth' o di 'Spray's fermentation medium' ognuno contenente uno zucchero (lattosio/ glucosio/ saccarosio e maltosio). Si incuba a 35/37°C per 48 ore.

La fermentazione dello zucchero è messa in evidenza dal viraggio dell'indicatore.

NB: Le ricerche della produzione di gelatinasi e della fermentazione del lattosio possono essere effettuate in un'unica prova con l'impiego di 'Lactose gelatine medium'. Si semina tale terreno in anaerobiosi a 35-37°C per 24 ore/ una colorazione gialla (per viraggio dell'indicatore) evidenzia la fermentazione del lattosio/ la presenza di bolle indica produzione di gas. Per mettere in evidenza la produzione di gelatinasi si raffredda il terreno a 1-5°C per 30-60 minuti; se il ceppo batterico produce tale enzima il terreno non solidifica/ in caso contrario il terreno/ dopo il raffreddamento, solidifica/ in tal caso esso va reincubato per altre 24 ore a 35-37° C prima di procedere nuovamente al raffreddamento per verificarne la capacità di solidificare [5,8].

e) Test della fermentazione tumultuosa [5]

Si semina in 'Iron milk medium modified' 1,0 ml di una brodocoltura in FTM in crescita attiva e si incuba in bagnomaria a 46°C. Dopo 2 ore osservare la presenza della fermentazione tumultuosa. La positività è data dalla presenza di un coagulo (prodotto dalla rapida acidificazione per fermentazione del lattosio) che è reso spugnoso nella parte superficiale del terreno dallo sviluppo di gas/ che rompe tale coagulo.

La reazione per *C. perfringens* diventa positiva al massimo in 5 ore; se si protrae l'incubazione può esserci interferenza di altri clostridi che/ a sviluppo più lento/ possono dare reazioni di difficile interpretazione (falsi positivi).

f) Test per la produzione di spore [1,5]

Per indurre la formazione di spore da parte del *C. perfringens*, che non sporifica nei terreni comunemente impiegati per l'isolamento, sono stati propo-

sti vari terreni tra i quali i più utilizzati sono:

- 'Sporulation broth';
- AEA modificato di Taniguti;
- Duncan e Strong modificato.

In 'Sporulation broth' si semina un'ansata di brodocoltura e si incuba a 35°C per 72 ore in anaerobiosi.

Al microscopio *C. perfringens* presenta spore centrali o subterminali non debordanti.

3) TEST PER LA TIPIZZAZIONE INTRASPECIFICA

I test principali per la tipizzazione intraspecifica di *C. perfringens* sono:

- determinazione dell'attività emolitica;
- produzione di lecitinasi;
- reazione di Nagler o test per l'identificazione del tipo A Istan;
- tipizzazione sierologica;
- produzione di enterotossina.

a) Test per la determinazione dell'attività emolitica [3]

Si impiegano terreni all'agar sangue di pecora o di cavallo. Sulla superficie asciutta dei terreni al sangue si striscia un'ansata di coltura e si incuba per 20-24 ore a 35/37° C. Su agar sangue di cavallo i ceppi di *C. perfringens* possono produrre:

- un'intera zona di emolisi completa (dovuta a tossina θ) con o senza zona esterna di emolisi parziale dovuta all' α tossina;
- solo una zona di emolisi parziale;
- nessuna emolisi.

Su agar sangue di pecora è sempre presente almeno un'emolisi parziale.

b) Test per la produzione di lecitinasi

In terreni contenenti emulsione d'uovo, la produzione di lecitinasi si evidenzia dalla comparsa di un alone opaco intorno alla colonia determinato dalla idrolisi della lecitina in fosforilcolina e digliceridi.

c) Reazione di Nagler [3]

Suddividere una piastra di 'Lactose egg-yolk milk agar' in due metà con un

segno sul fondo, su metà piastra stendere 3/5 gocce di antitossina α o di antitossina polivalente di *C. perfringens* e lasciar asciugare.

Strisciare un'ansata di brodo coltura dall'una all'altra delle due metà della piastra partendo dal lato senza antitossine. Disporre sulla stessa piastra strisci da diversi isolamenti.

Incubare le piastre in anaerobiosi per 18/24 ore a 35-37°C.

Il test è positivo se si forma un'area chiara nella zona di crescita nella metà senza antitossina (produzione di lecitinasi), mentre tale zona di chiarificazione non si produce nella metà contenente antitossina. La contemporanea fermentazione del lattosio è evidenziata da una colorazione dal rosa al rosso del terreno per la formazione di prodotti acidi. Esponendo all'aria la piastra per 1-2 ore la colorazione rosa-rossa del terreno scompare, mentre le colonie di *C. perfringens* dall'originale color crema diventano rosse.

Il *C. bifermentans*, come il *C. perfringens*, è positivo alla reazione di Nagler, ma si distingue da esso per un'abbondante produzione di spore e per la non fermentazione del lattosio.

Vari organismi di controllo Istisan, ICMSF (metodo americano) etc. propongono test assimilabili a quello di Nagler che non si differenziano sostanzialmente, ma solo per l'uso di altri terreni base. Qui di seguito si riportano alcuni di questi test:

c.1) Identificazione dei ceppi del tipo A (metodo ISTISAN) [1]

Suddividere piastre di 'Columbia agar base' con emulsione d'uovo in due settori, tracciando una riga sul fondo della piastra. Spatolare su uno dei due settori alcune gocce di siero di anti-*C. perfringens* di tipo A. Seminare le brodoculture in esame mediante strisci perpendicolari alla linea di separazione coprendo entrambi i settori. Incubare a 37°C per 48 ore in condizioni di anaerobiosi.

La presenza di *C. perfringens* di tipo A è evidenziata dallo sviluppo di colonie con alone opalescente nella parte della piastra priva di antisiero.

c.2) Reazione in Emulsione d'uovo (ICMSF metodo Americano) [3]

Il metodo è identico al precedente ma prevede l'utilizzo di TSC o SFP e antitossina di *C. perfringens* polivalente o di *C. perfringens* tipo A.

d) Tipizzazione sierologica [3]

I ceppi isolati che mostrano identico pattern emolitico, che hanno positiva la reazione di Nagler e che hanno identico profilo biochimico, sono ulteriormente suddivisibili (in sierovar) in base a reazioni sierologiche.

Le colonie isolate da agar sangue vengono testate con sieri polivalenti e con sieri monovalenti fino a determinarne il sierotipo.

e) Test per la determinazione dell'enterotossina [5,7]

In commercio sono reperibili kit per la determinazione dell'enterotossina prodotta da *C. perfringens* dalle feci o dalla brodocoltura dei ceppi isolati. Alcuni di questi test sono basati su metodi immunoenzimatici (ELISA), altri sono basati sul principio dell'agglutinazione passiva inversa al latte (RPLA).

NB: Esistono in commercio kit miniaturizzati per le prove biochimiche di identificazione e conferma per i principali clostridi di isolamento clinico tra cui il *C. perfringens*.

3.6 RICERCA DEI CLOSTRIDI NEGLI ALIMENTI: CONSERVAZIONE DEI CAMPIONI E METODI ANALITICI

3.6.1 Conservazione dei campioni

Le cellule vegetative di *Clostridium perfringens* possono perdere vitalità se il cibo sospettato di tossinfezione è refrigerato o congelato per lungo tempo prima dell'analisi, una tale perdita può causare delle difficoltà nello stabilire l'agente responsabile di tossinfezioni.

Se si devono analizzare alimenti refrigerati o congelati è opportuno eseguire un'indagine microscopica diretta sull'alimento per verificare la presenza di corti e larghi bacilli morfologicamente riconducibili a *Clostridium perfringens*. E' necessario comunque che il numero di cellule per grammo di alimento sia elevato affinché esse siano osservabili al microscopio.

L'esame colturale dei prodotti sottoposti a refrigerazione e/o congelamento per intervalli di tempo significativi dovrebbe contemplare solo la ricerca delle spore che sopravvivono alle basse temperature.

Gli alimenti sospettati di essere causa di tossinfezione da *C. perfringens* dovrebbero essere analizzati immediatamente oppure essere refrigerati evitando per quanto possibile il loro congelamento. Gli alimenti che devono, prima dell'analisi, essere conservati per più di 48 ore dovranno essere trattati con una soluzione salina di glicerolo al 20% e conservati congelati a -55° -60° C. La conservazione del campione in ghiaccio secco determina una minore perdita di vitalità delle cellule di *Clostridium perfringens*.

Qualora non sia possibile analizzare immediatamente il campione e lo si debba conservare a bassa temperatura per più di 24 ore può essere utile la determinazione diretta dell'oc tossina sull'alimento per stimare la massima quantità di cellule di *Clostridium perfringens* presumibilmente contenuta nell'alimento. Esiste infatti una relazione diretta tra la quantità di a tossina e numero di cellule metabolizzanti (ad eccezione di qualche ceppo debolmente tossigeno) [3, 6,7].

3.6.2 Metodi analitici

PREPARAZIONE DEL CAMPIONE

L'esame colturale del campione viene generalmente preceduto dalla preparazione di un omogenato 1:10 del campione con un diluente che può essere: 'Teptone dilution fluid', 'Tryptone dilution fluid', 'Ringer solution 1/4', 'Buffered peptone water'.

Le cellule vegetative si ricercano mediante semina diretta dell'omogenato e delle sue diluizioni scalari senza alcun trattamento; la ricerca delle spore viene invece effettuata previo trattamento termico dell'omogenato di partenza (di solito ad 80°C per 10 minuti). Questo trattamento ha lo scopo di attivare le spore alla germinazione, attivazione che può essere ottenuta anche con trattamento con alcool etilico assoluto (si miscela in parti uguali omogenato ed alcool etilico e si mantiene la miscela per 1 ora a temperatura ambiente o per 15' a 37°C) [7].

RICERCA DEI CLOSTRIDI SOLFITO RIDUTTORI (NOSTRO METODO)

Si ricercano le cellule vegetative e le spore seminando l'omogenato, trattato e non trattato, e le sue diluizioni scalari per inclusione in 'Sulphite polymyxin sulphadiazine' (SPS), quando il terreno è solidificato si stratifica dell'altro terreno per produrre un doppio strato. Si incuba in anaerobiosi (giara) a 37°C per 24/48 ore.

Dopo incubazione si procede al conteggio delle colonie nere con diametro non inferiore a 0,5 mm da piastre che ne contengano tra un minimo di 15-20 ad un massimo di 150-200 e si riporta il risultato come UFC/gr.

METODICA ISTISAN [1]

Prevista dall'Istituto superiore di sanità per paste fresche confezionate e paste surgelate come da Circolare del Ministero della sanità n. 32 del 03/08/1985.

Preparazione del campione: 30,0 gr di prodotto vengono miscelati in *stomacher* con 270,0 ml di 'Buffered peptone water'(diluizione 1:10), da questa diluizione procedere alla preparazione delle diluizioni successive fino alla 10⁻⁴ aggiungendo a 9,0 ml di diluente 1,0 ml della diluizione precedente.

Terreni di coltura: 'Sulphite polymyxine sulphadiazine agar' (SPS), 'Fluid thioglycollate medium' (FTM), 'Motility-nitrate medium', 'Sporulation broth'.

Procedimento: depositare in doppio 1,0 ml di ciascuna diluizione in piastre Petri ed aggiungere SPS sciolto e raffreddato a 50°C. Incubare in anaerobiosi a 35/37°C per 24 ore. Contare ed annotare il numero presuntivo di *C. perfringens* (colonie nere) per ogni piastra che ne contenga 20 - 200. Per le prove di confer-

ma selezionare 10 colonie, inocularle in altrettanti provettoni di FTM ed incubare a 35/37°C per 18/24 ore. Sottoporre le colture all'esame microscopico per la colorazione di Gram e per controllare la purezza dei ceppi, quindi procedere alle prove di identificazione con i seguenti test:

- mobilità e riduzione dei nitrati;
- produzione di spore;
- test per l'identificazione del *C. perfringens* di tipo A.

Determinare il numero di *C. perfringens* UFC/gr di prodotto tenendo conto della percentuale di *C. perfringens* presuntivi che hanno confermato.

METODICA FDA [5]

Preparazione del campione: 25,0 gr di campione vengono miscelati con 225,0 ml di 'Peptone dilution fluid' omogeneizzando in un miscelatore a bassa velocità per 1-2 minuti evitando l'eccessiva aerazione. Preparare le diluizioni fino a 10^{-6} trasferendo 10,0 ml delle diluizioni in 90,0 ml di diluente ed agitare moderatamente.

Terreni di coltura: 'Tryptose sulphite cycloserine' con (TSC) o senza emulsione d'uovo (TSC EY-free)/ 'Fluid thioglycollate medium' (FTM), 'Sporulation broth', 'Chopped liver broth', 'Cooked meat broth', 'Mobility-nitrate medium', 'Lactose gelatine medium', 'Spray's fermentation medium', 'Tron milk medium' (modified).

Procedimento: depositare in doppio 1,0 ml di ciascuna diluizione in piastre di TSC EY-free, quindi aggiungere TSC EY-free sciolto e raffreddato a 50°C miscelando. In alternativa, in alimenti in cui si sospetta la presenza di altri clostridi solfito-riduttori, strisciare 0,1 ml di ciascuna diluizione sulla superficie di TSC e, dopo che l'inoculo è stato assorbito (5 minuti), ricoprire con un altro strato di TSC. Incubare in anaerobiosi a 35°C per 20-24 ore.

Calcolare, da piastre contenenti 20-200 colonie, il numero di UFC/gr di *C. perfringens* presuntivi, contando le colonie nere su TSC EY-free e nere con alone opaco (0 2-4 mm) in TSC.

In contemporanea inoculare 3 o 4 tubi di 'Chopped liver broth' o di 'Cooked meat medium' con 2,0 ml della diluizione 1:10 ed incubarli per 24/48 ore a 35°C senza anaerobiosi. Questi tubi possono essere eliminati nel caso in cui risulti positiva la crescita, in caso contrario seminare un'ansata delle brodocolture in piastre di TSC o TSC EY-free e operare come visto sopra.

Per le prove di conferma selezionare 10 colonie ed inocularle in altrettanti provettoni di FTM ed incubare a 35/37°C per 18/24 ore. Sottoporre le colture all'esame microscopico per la colorazione di Gram e per controllare la purezza dei ceppi, se è presente un'evidente contaminazione, isolare in TSC con emulsione d'uovo e subcoltivare le colonie cresciute in FTM.

Procedere al test per la fermentazione tumultuosa in 'Iron-miik medium' (modified), se questo test risulta positivo si saggiano i ceppi per:

- mobilità e riduzione dei nitrati;
- produzione di spore;
- test per la produzione di gelatinosi,
- test di fermentazione dei carboidrati.

I ceppi che alle prove di conferma non soddisfano tutti i criteri di positività vanno inoculati di nuovo in FTM e successivamente esaminati al microscopio con colorazione di Gram per verificarne la purezza.

METODICA NORDAMERICANA (ICMSF) [3]

1) Presenza/Assenza in 25 gr

Terreni di coltura: 'Fluid thioglycollate medium' (FTM), 'Me Clung-Toabe egg-yolk agar' (MCTEY), 'Sheep blood agar' (SBA).

Procedimento: in 3 tubi con tappo a vite contenenti 25,0 ml di FTM seminare 25,0 gr di campione, porre un tubo in bagnomaria a 70°C per 10 minuti, un tubo a bagnomaria a 100°C per 1 ora e un tubo a 46 ± 0,5°C per non oltre 4-6 ore. I primi due, dopo il trattamento termico sopra descritto, vanno raffreddati ed incubati a 37±0,5°C per 18-24 ore.

Dopo incubazione un'ansata di tutte le brodocolture che mostrano crescita va strisciata su SBA e su MCTEY, le piastre vanno quindi incubate in anaerobiosi a 35-37°C per 24 ore. Trascorso il periodo di incubazione togliere le piastre dalla giara e lasciarle per 1-4 ore a temperatura ambiente. Prelevare dallo SBA le colonie che mostrano emolisi parziale o completa e da MCTEY le colonie circolari leggermente rialzate circondate da un'alone opaco, sottoporre le colonie direttamente alle prove di identificazione (vedere più avanti) oppure trasferirle in FTM ed incubarle.

2) Numerazione diretta

Terreni di coltura: 'Sulphite cycloserine agar' (SCA), 'Tryptose sulphite cycloserine' con (TSC) e senza emulsione d'uovo (TSC EY-free), 'Shahidi Ferguson perfringens agar' (SFP) con e senza emulsione d'uovo, 'Motility-nitrate medium', 'Lactose gelatin', 'Horse-blood agar', 'Sheep-blood agar'.

Procedimento: seminare 1,0 ml di ogni diluizione (da 10⁻¹ a 10⁻⁶) in doppio in piastre Petri ed aggiungere SC, in alternativa seminare 0,1 ml delle diluizioni sulla superficie di piastre contenenti TSC o SFP, dopo aver distribuito con una spatola sterile ed aver atteso che il liquido sia stato assorbito, ricoprire con lo stesso terreno senza emulsione d'uovo. Incubare in anaerobiosi a 35-37°C per 20-24 ore.

Contare le colonie nere (da piastre che ne contengano 20-200) da SCA come colonie presuntive di *C. perfringens* e le colonie nere circondate da alone opaco da TSC o da SFP.

Almeno 5 colonie sospette (anche quelle ottenute dal metodo 1) vanno sottoposte ai seguenti test di conferma:

- mobilità e riduzione dei nitrati;
- test per la produzione di gelatinasi;
- reazione in emulsione d'uovo;
- attività emolitica su agar sangue di pecora o di cavallo;
- sierotipizzazione.

METODICA BRITANNICA (ICMSF) [3]

1) Numerazione diretta

Terreni di coltura: 'Horse-blood agar' (HBA) con e senza neomicina solfato, 'Cooked meat medium', Teptone sugar broth', 'Lactose egg-yolk milk agar'.

1.a) Campioni con basso numero di *C. perfringens*:

Procedimento: miscelare 10,0 gr di campione con 5,0 ml di 'Ringer solution 1/4'. Strisciare un'ansata della miscela su due piastre di HBA in modo da ottenere la crescita di colonie separate (n.b.: porre 3 gocce di una soluzione all'1% di Neomicina solfato sulla superficie di una delle due piastre immediatamente prima della semina in modo da ridurre la crescita di anaerobi facoltativi).

Incubare le piastre a 35-37°C per 48 ore una in aerobiosi ed una in anaerobiosi (quella trattata con neomicina).

1.b) Campioni con alto numero di *C. perfringens*:

Procedimento: aggiungere all'omogenato preparato come in 1.a) 85,0 ml di 'Ringer solution 1/4' in modo da preparare una diluizione 1:10 del campione oppure miscelare direttamente in *stomacher* 10,0 gr di campione con 90,0 ml di 'Ringer solution 1/4'.

Inoculare in superficie 0,1 ml delle diluizioni su piastre di HBA (in doppio, una serie di piastre trattate con neomicina). Incubare le piastre a 35-37°C per 48 ore una in aerobiosi ed una in anaerobiosi (quella trattata con neomicina).

Contare le colonie (da piastre che ne contengano 30-300), fare la media (la conta aerobica indica l'estensione della contaminazione e fornisce alcune indicazioni circa la natura della flora contaminante) e fare il calcolo della concentrazione della flora anaerobia rapportata a quella aerobia.

Almeno 5 colonie ben isolate cresciute sulle piastre di HBA in anaerobiosi dai metodi 1) e 2), previa annotazione delle caratteristiche emolitiche, vanno sottoposte ai seguenti test d'identificazione dopo essere state subcoltivate in

'Cooked meat medium' e su HBA:

- colorazione di Gram;
- test sierologici;
- reazione di Nagler;
- fermentazione dei carboidrati.

2) Procedura con arricchimento

Terreni di coltura: 'Cooked meat medium'/ 'Horse-blood agar' con neomicina solfato (HBA + neomicina), Teptone sugar broth', 'Lactose egg-yolk milk agar'.

Procedimento: in due bottiglie con tappo a vite con 250,0 ml di 'Cooked meat medium', senza agitare, mettere 10,0 gr di campione (oppure 1,0 gr in 25,0 ml) (l'aggiunta di 1,2 ml ogni 100,0 ml di terreno di soluzione di neomicina all'1% agisce da agente selettivo per *C. perfringens* in campioni con flora mista). Scaldare una delle due beute a 60-65°C per 15 minuti ed incubare a 35-37°C per 18/24 ore. Strisciare ciascuna brodocoltura in due piastre di HBA + neomicina ed incubare a 35-37°C per 24 ore, una piastra in anaerobiosi e l'altra in atmosfera aerobia.

Procedere alle prove di identificazione sulle colonie sospette come visto nel metodo precedentemente descritto.

Il risultato si esprime con presenza/assenza in 10 gr (1 gr).

3) Numerazione con metodo MPN

Terreni di coltura: 'Cooked meat medium', 'Horse-blood agar' con neomicina solfato (HBA + neomicina)/ Teptone sugar broth'/ 'Lactose egg-yolk milk agar'.

Procedimento: utilizzando una sospensione iniziale preparata come al punto l.a) preparare una serie di diluizioni del campione (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}) con 'Ringer solution 1/4' o con 'Peptone dilution fluid'.

Trasferire 1,0 o 10,0 ml di ogni diluizione in 3 o 5 tubi di 'Cooked meat medium' (serie MPN) ed incubare anaerobicamente per 24 ore a 35-37°C (tubi provvisti di chiusura ermetica possono essere incubati in atmosfera aerobia).

Dai tubi che evidenziano sviluppo batterico inoculare piastre di HBA + neomicina ed incubare per 48 ore a 35-37°C in anaerobiosi. Identificare le colonie sospette come visto in precedenza. Determinare il numero di *C. perfringens*/gr con l'ausilio delle tabelle MPN.

METODICA ISO [8]

Terreni di coltura: 'Tryptose sulphite cycloserine' (TSC EY-free), 'Lactose gelatine', 'Fluid thioglycolate medium' (FTM), 'Motility nitrate medium'.

Procedimento: preparare una sospensione iniziale come al punto 1.a). Trasferire 1,0 ml della sospensione in piastre Petri ed aggiungere TSC. Dopo solidificazione aggiungere altro terreno TSC in modo da creare un doppio strato, porre in giara ed incubare a 35-37° C per 20 ore. Dopo il periodo di incubazione contare le colonie nere da piastre che ne contengano da 15 a 150. Isolare 10 colonie su piastre di TSC, se ciò non è possibile perché le colonie sono confluenti, procedere ad un nuovo isolamento in FTM e ripassare in TSC in doppio strato. Sottoporre le colonie ai seguenti test:

- mobilità e riduzione dei nitrati;
- fermentazione del lattosio e produzione di gelatinasi.

METODICHE PROPOSTE

1. Per paste fresche confezionate e paste surgelate: metodica Istisan.
2. Per gli altri alimenti.

Terreni di coltura: Tryptose sulphite cycloserine agar' con (TSC) o senza emulsione d'uovo (TSC EY-free), "Fluid thioglycollate medium" (FTM), "Mobility-nitrate medium", "Tron-miik medium" (modified), "Lactose gelatine medium".

Conta diretta

Aspetto delle colonie su TSC: diametro non inferiore a 0,2/0,5 mm, nere per la riduzione del metabisolfito a solfuro e conseguente formazione di precipitato nero di solfuro di ferro.

In terreno con emulsione d'uovo i ceppi produttori di lecitinasi producono un alone di chiarificazione, conseguenza della produzione di lecitinasi.

Procedimento: diluizioni dell'omogenato, trattato e non trattato (vedi preparazione del campione), vengono seminati sulla superficie di piastra di TSC, strisciate e lasciate adsorbire. Si deposita uno strato dello stesso terreno fuso (senza uovo) per creare il doppio strato. Si incuba a 37°C per 18/24 ore.

Contare le colonie sulle piastre che ne contengono da un minimo di 15/20 ad un massimo di 150/200 e sottoporre almeno 5, dopo averle subcoltivate in FTM, alle prove di conferma (vedi più avanti).

Numero più probabile (MPN)

Procedimento: seminare 1,0 ml dell'omogenato e delle sue diluizioni in tubi contenenti 10,0 ml di FTM (3 tubi per ogni diluizione). Incubare a 37°C per 18/24 ore. Dopo l'incubazione da ogni tubo eseguire subcolture in piastre di TSC incubando a 37°C in anaerobiosi per 24 ore.

Dalle piastre che sviluppano colonie tipiche eseguire delle subcolture in FTM di almeno 5 colonie e sottoporle alle prove di conferma (vedi più avanti).

Prove di conferma

- colorazione Gram e catalasi;
- fermentazione del lattosio e produzione di gelatinasi;
- prova di motilità e riduzione dei nitrati;
- fermentazione tumultuosa;
- test per la produzione di lecitinasi;
- kit biochimici miniaturizzati.

Fig. 1 - *Clostridium perfringens*: metodica ISTISAN

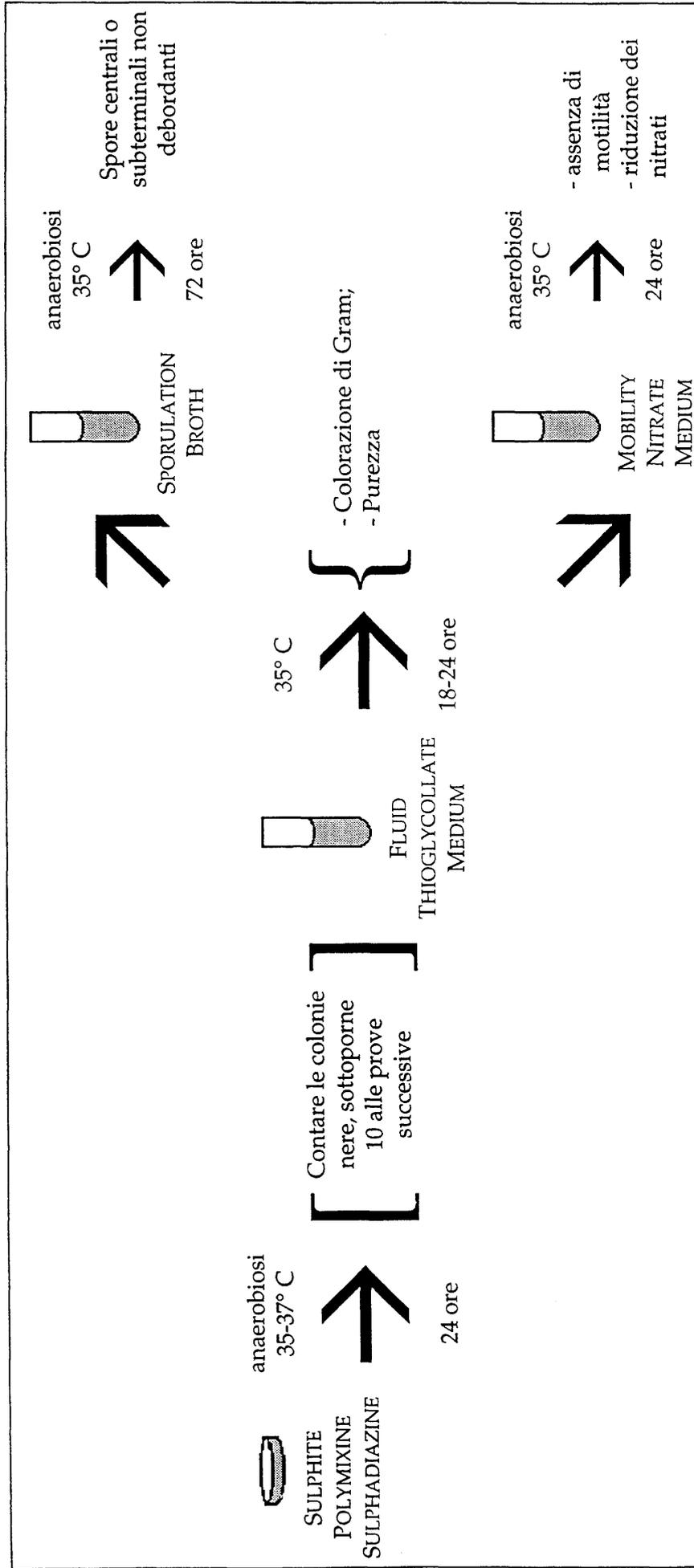


Fig. 2 - *Clostridium perfringens*: (metodica proposta) conta diretta.

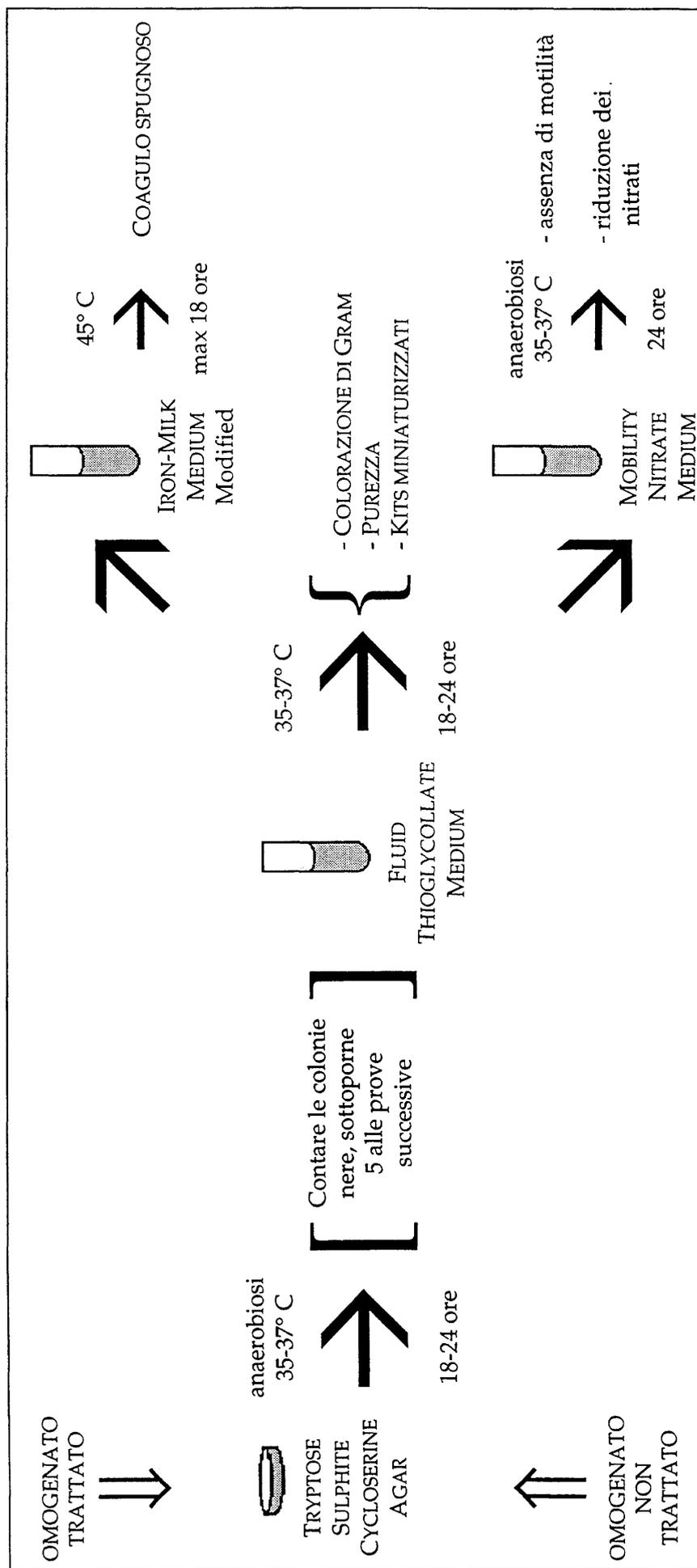
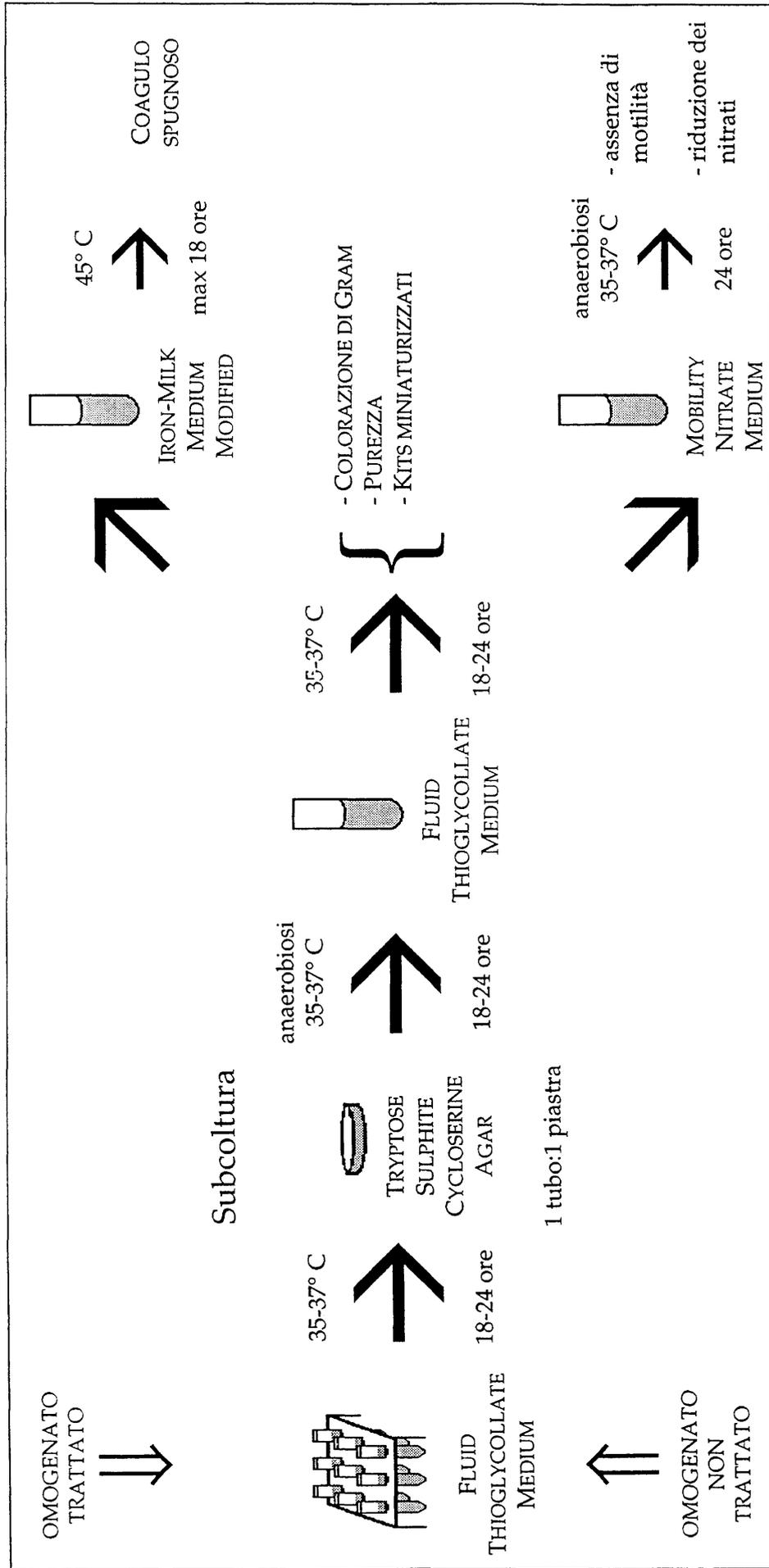


Fig. 3 - *Clostridium perfringens*: (metodica proposta) MPN.



3.7 COMPOSIZIONE E PREPARAZIONE DEI TERRENI

T₁) Blood agar base

Triptone	14 gr
Peptone	4,5 gr
Estratto di lievito	4,5 gr
Sodio cloruro	5 gr
Agar	12,5 gr
Acqua distillata	1 litro

$$\text{pH} = 7,3 \pm 0,2$$

Sciogliere gli ingredienti facendo bollire con agitazione frequente. Autoclavare a 121 °C per 15 minuti, raffreddare a 48-50°C, aggiungere per ogni 95 ml di terreno 5-8 ml di sangue citrato sterile (della specie animale desiderata) e porre in piastra.

T₂) Buffered peptone water

Peptone	10 gr
Sodio cloruro	5 gr
Sodio fosfato bibasico	3,5 gr
Sodio fosfato monobasico	1,5 gr
Acqua distillata	1 litro

$$\text{pH} = 7,2 \pm 0,2$$

Sciogliere gli ingredienti in acqua distillata ed autoclavare a 121 °C per 15 minuti.

T₃) Chopped liver broth

Fegato di bue fresco	500 gr
Amido solubile	1 gr
Peptone	10 gr
Potassio fosfato bibasico	1 gr
Acqua distillata	1 litro

$$\text{pH} = 7,0 \pm 0,2$$

Tritare il fegato in acqua, scaldare e far bollire lentamente per 1 ora. Raffreddare ed aggiustare il pH a 7,0, far bollire per altri 10' e quindi filtrare attraverso una garza pressando per eliminare l'eccesso di liquido. Aggiungere gli altri ingredienti ed aggiustare il pH a 7,0. Portare il volume ad 1 litro con acqua distillata. Filtrare attraverso carta da filtro grossolana. Conservare la carne ed il

brodo separatamente in freezer. In tubi da batteriologia porre 10-12 ml di brodo ed aggiungere pozzetti di fegato cotto di 1,2-2,5 cm sul fondo. Autoclavare per 15' a 121°C

T4) Cooked meat medium

Cuore di manzo	454 gr
Peptone	20 gr
Destrosio	2 gr
Sodio cloruro	5 gr
Acqua distillata	1 litro

$$\text{pH}=7,2\pm 0,2$$

Tritare il cuore in acqua distillata, scaldare e far bollire lentamente per 1 ora. Raffreddare ed aggiustare il pH a 7,0 e far bollire per altri 10'. Filtrare attraverso una garza e pressare per eliminare l'eccesso di liquido. Aggiungere gli altri ingredienti ed aggiustare il pH a 7,2, aggiungere acqua distillata fino a portare il volume ad 1 litro. Filtrare attraverso carta da filtro grossolana. Conservare la carne ed il brodo separatamente in freezer. In tubi da batteriologia porre 10-12 ml di brodo ed aggiungere pozzetti di carne cotta avendo cura di ricoprirla con il liquido. Autoclavare per 15' a 121°C.

T5) D/L-cycloserine blood agar

Preparare il terreno come in T₁. Prima dell'uso porre 3 gocce di una soluzione di D/L cicloserina sulla superficie delle piastre.

T6) Fluid thyoglicollate medium (FTM)

Triptone	15 gr
Estratto di lievito	5gr
Sodio cloruro	2,5 gr
Destrosio	5gr
Sodio tioglicolato	0,5 gr
L-cistina	0,5 gr
Resazurina	0,001 gr
Agar	0,75 gr
Acqua distillata	1 litro

$$\text{pH}=7,1\pm 0,2$$

Miscelare L-cistina, sodio cloruro, destrosio, estratto di lievito e triptone con 1 litro di acqua distillata, scaldare in bagnomaria fino a dissolvimento. Sciogliere il tioglicolato di sodio nella soluzione ed aggiustare il pH. Aggiungere la resazurina, mescolare, porre in tubi in ragione di 10 ml/tubo ed autoclavare per 15' a 121°C.

T7) Iron milk medium (modified)

Latte fresco intero	1 litro Ferro
(oso) solfato eptaidrato	1 gr
Acqua distillata	50 ml

Sciogliere il solfato nei 50 ml di acqua distillata, aggiungere lentamente al latte e mescolare con un'ancoretta magnetica.

Distribuire 11 ml di terreno in tubi 16 x 150 ed autoclavare a 118°C per 12 minuti.

Il terreno deve essere preparato, ogni volta fresco, e deve essere utilizzato entro due ore dalla preparazione.

T8) Lactose egg-yolk milk agar

Lattosio	12 gr
Rosso neutro (1 gr in 10 ml di acqua e 90 ml di alcool)	3,25 ml
Agar	12 gr
'Nutrient Broth' n°2	1 litro
Emulsione di rosso d'uovo	37,5 ml
<i>Stock milk</i> ¹	150 ml

$$\text{pH} = 7,0 \pm 0,2$$

¹ Centrifugare per 10 minuti latte comune a 2000-3000 rpm. Autoclavare la porzione esente da grasso a 121°C per 15 minuti.

Aggiungere il lattosio, il rosso neutro e l'agar al 'Nutrient broth' ed autoclavare a 121°C per 20 minuti. Raffreddare a 50-55°C ed in asepsi aggiungere l'emulsione di rosso d'uovo e lo *Stock milk*.

T9) Lactose-gelatine medium

Tryptose	15 gr
Estratto di lievito	10 gr
Lattosio	10 gr
Rosso fenolo	0,05 gr
Gelatina	120 gr
Acqua distillata	1 litro

$$\text{pH} = 7,5 \pm 0,2$$

Sciogliere a caldo 'Tryptose', estratto di lievito e lattosio in 400 ml di acqua distillata; sospendere la gelatina in 600 ml di acqua distillata e scaldare a 50-60°C agitando. Mescolare le due soluzioni. Aggiustare il pH ed aggiungere il

rosso fenolo. Distribuire in tubi in ragione di 10 ml/tubo ed autoclavare per 10' a 121°C. Se non si impiega entro 8 ore dalla preparazione, prima dell'uso rigenerare scaldando a 50-70°C per 2/3 ore.

T10) Neomycin horse blood agar

Preparare il terreno come in T₁. Prima dell'uso porre 3 gocce di una soluzione all'1% di Neomicina solfato sulla superficie delle piastre.

T11) Nitrate-mobility medium

Peptone	5gr
Estratto di carne	3gr
Galattosio	5gr
Glicerolo	5gr
Potassio nitrato	5gr
Sodio fosfato bibasico	2,5 gr
Agar	3gr
Acqua distillata	1 litro

$$\text{pH} = 7,4 \pm 0,2$$

Sciogliere gli ingredienti facendo bollire, aggiustare il pH e porre 9 ml in tubi. Sterilizzare a 121°C per 15 minuti. Raffreddare rapidamente in acqua distillata corrente.

T12) Oleandomycin polymyxin sulphadiazine perfringens agar (OPSP)

Triptone	15 gr
Estratto di lievito	5gr
Peptone di soia	5gr
Estratto di fegato	7gr
Ferro (oso) ammonio citrato	1gr
Sodio metabisolfito	1gr
Tampone Tris	1,5 gr
Agar	10 gr
Sulfadiazina	0,1 gr
Oleandomicina fosfato	0.0005 gr
Polimixina B solfato	10000 U.I.
Acqua distillata	1 litro

$$\text{pH}=7,3\pm 0,2$$

Sciogliere i componenti (escluso gli antibiotici) in bagnomaria bollente indi sterilizzare a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a 50°C ed aggiungere asepticamente gli antibiotici, mescolare bene e porre in piastre sterili.

T13) Peptone dilution fluid

Peptone	1 1 gr
Acqua distillata	1 litro

pH=7,2±0,2

Sciogliere il peptone in acqua distillata, agitare bene ed autoclavare a 121°C per 15 minuti.

T14) Ringer solution 1/4

Sodio cloruro	2,5 gr
Potassio cloruro	0,21 gr
Calcio cloruro esaidrato	0,24 gr
Sodio bicarbonato	0,1 gr
Acqua distillata	1 litro

pH = 7,0 ± 0/2

Sciogliere i componenti in acqua distillata, agitare bene ed autoclavare a 121°C per 15 minuti.

T15) Shahidi Ferguson perfringens agar (SFP)

Tryptose	15 gr
Peptone di soia	5gr
Estratto di carne	5gr
Estratto di lievito	5gr
Sodio metabisolfito	1gr
Ferro (ico) ammonio citrato	1gr
Agar	14 gr
Emulsione di rosso d'uovo	50 mi
Kanamicina solfato	0,012 gr
Polimixina B solfato	15000 UJ.
Acqua distillata	1 litro

pH=7,6±0,2

Sciogliere gli ingredienti (eccetto gli antibiotici ed il rosso d'uovo) riscaldando delicatamente in bagnomaria bollente ed autoclavare a 121°C per 10 minuti. Raffreddare a 48-50°C, aggiungere il rosso d'uovo e gli antibiotici e distribuire in piastra.

Alla parte di terreno che va utilizzata per formare il doppio strato omettere l'aggiunta di rosso d'uovo che diminuisce la visibilità delle colonie.

T16) Sporulation broth

Polipeptone o Tryptose	15 gr
Estratto di lievito	3 gr
Amido solubile	3 gr
Magnesio solfato anidro	0,1 gr
Sodio tioglicolato	1 gr
Sodio fosfato bibasico	11 gr
Acqua distillata	1 litro

$$\text{pH} = 7,8 \pm 0,2$$

Sciogliere gli ingredienti facendo bollire piano. Dispensare 20,0 ml per provetta ed autoclavare a 121°C per 15 minuti. Prima dell'uso rigenerare in vapore fluente per 20 minuti.

T17) Sulphite polymyxin sulphadiazine (SPS)

Triptone	15 gr
Estratto di lievito	10 gr
Ferro (ico) citrato	0,5 gr
Sodio solfito	0,5 gr
Sodio tioglicolato	0,1 gr
Sorbitan monooleato	0,05 gr
Sulfadiazina	0,12 gr
Polimixina B solfato	0,01 gr
Agar	15 gr
Acqua distillata	1 litro

$$\text{pH} = 7,0 \pm 0,2$$

Sciogliere gli ingredienti facendo bollire. Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a 48-50°C e porre in piastre nelle quali è stato deposto l'inoculo. Quando il terreno è solidificato apporre un secondo strato che ricopra il primo.

T18) Trypticase-soy sheep blood agar (TSSB)

Triptone	15 gr
Peptone di soia	5 gr
Sodio cloruro	5 gr
Agar	15 gr
Acqua distillata	1 litro

$$\text{pH} = 7,3 + 0,2$$

Scaldare agitando per disciogliere i componenti, far bollire 1 minuto ed autoclavare per 15' a 121°C. Raffreddare a 50°C ed aggiungere 5 ml di sangue defibrinato di pecora ogni 100 ml di terreno, miscelare e distribuire in piastra in ragione di 20 ml/piastra.

T₁₉) Tryptone dilution fluid

Peptone	1 gr
Acqua distillata	1 litro

$$\text{pH} = 7,4 \pm 0,2$$

Sciogliere il peptone in acqua distillata, agitare bene ed autoclavare a 121°C per 15 minuti.

T₂₀) Tryptose sulphite cycloserine agar (TSC)

Tryptose	15 gr
Peptone di soia	5 gr
Estratto di carne	5 gr
Sodio metabisolfito	1 gr
Ferro (ico) ammonio citrato	1 gr
Agar	14 gr
Emulsione di rosso d'uovo	50 ml
D-cicloserina	0,012 gr
Acqua distillata	1 litro

$$\text{pH} = 7,6 \pm 0,2$$

Sciogliere a caldo agitando i componenti (escluso il rosso d'uovo e la D-cicloserina) ed aggiustare il pH. Dispensare porzioni da 250 ml in beute da 500 ml. Autoclavare per 15' a 121°C. Raffreddare a 48-50°C ed aggiungere il rosso d'uovo e la cicloserina. Porre in piastre il terreno, lasciare asciugare per una notte a temperatura ambiente.

T₂₁) Tryptose sulphite cycloserine agar egg yolk-free (TSC EY-free)

Terreno analogo al T₂₀ senza aggiunta di rosso d'uovo.

Tabella riassuntiva delle principali caratteristiche di *Clostridium perfringens*.

Colorazione Gram	+
Catalasi	-
Riduzione dei nitrati	+
Mobilità	-
Gelatinasi	+
Fermentazione del lattosio	+
Fermentazione del glucosio	+
Fermentazione del saccarosio	+
Fermentazione del maltosio	+
Emolisi su agar-sangue di pecora	+
Fermentazione tumultuosa	+

Bibliografia

- [1] Aureli P., Capasse A., Ferricia L., Ferrini A. M., Gianfranceschi M., *Metodiche analitiche per il controllo microbiologico delle paste alimentari*, Rapporti ISTISAN ISNN0391-1675,1989.
- [2] AA.VV., *Bergey's manual of sistematic bacteriology*, 1986, sez. 13, vol. 2,1141-1200.
- [3] AA.VV., *Microorganisms in foods 1: Their significance and methods of enumeration*, 2³ ed.,1978, 264-273.
- [4] KramerJ., *Alimenti: microbiologia e igiene*, 1990.
- [5] Harmon S.M., Kautter D.A., Golden D.A., Rhodehamel E.S., *Clostridium perfringens: enumeration and identification*, in "Bacteriological analytica manual", 7^o ed., 1992, 209 -2014.
- [6] Labbe R.G., *Clostridium perfringens*, m "Foodborne bacterial pathogens",1989,191-234.
- [7] Labbe R-G., Harmon S.M., *Clostridium perfringens*, in "Compendium of methods for the microbiological examination of foods", 3" ed-, 1992, 623-635.
- [8] *Norme ISO 7937-1985*.
- [9] Ottaviani F., *L'analisi microbiologica dei prodotti lattiero-caseari*, 1991, 329-350.
- [10] Phillips K.D., Brazier J.S., Levett P.N., Wms A.T., *Clostridia*, "Isolation and identification of microorganisms of medical and veterinary importance",1985,215-236.

4. CLOSTRIDIUM BOTULINUM

a cura di: Antonello Colantoni, Mariella Magri, Giovanni Martinelli

Il *Clostridium botulinum* è un microorganismo bastoncellare, sporigeno, anaerobio, mobile, generalmente Gram positivo.

La specie *C. botulinum* comprende 7 tipi, denominati con le lettere da A a G, classificati in rapporto alla produzione di 7 differenti tipi di tossine distinguibili sierologicamente (A, B, C, D, E, F, G). I 7 tipi si distinguono anche per alcune caratteristiche biochimiche come riportato nella tabella 1 [1].

Tab. 1 - Suddivisione del *Clostridium botulinum* in base alle proprietà proteolitiche e saccarolitiche

Saccarolitici e proteolitici	Proteolitici non saccarolitici	Saccarolitici non proteolitici
Tipo A	Tipo G	TipoB
TipoB		Tipo C
Tipo F		TipoD
		Tipo E
		Tipo F

La malattia provocata da questo microorganismo è nota come botulismo, di essa si conoscono almeno quattro forme tutte conseguenti all'azione della tossina, ma differenti nell'epidemiologia [6,7].

Le quattro forme sono:

- a. la forma classica (botulismo alimentare), dovuta al consumo di cibi contenenti tossina preformata;
- b. botulismo da ferita, una rara forma che si sviluppa essenzialmente come le altre infezioni da clostridi, in cui si ha l'elaborazione di tossina *in vivo* dopo la crescita di *C. botulinum* in una ferita infetta con periodo d'incubazione di 4 - 10 giorni;
- c. botulismo infantile, malattia che colpisce i bambini con meno di un anno di età e che è determinata dall'ingestione di spore e susseguente germinazione, crescita e produzione di tossina all'interno dell'intestino. Questa forma può essere la causa di morti improvvise in bambini di età compresa tra un mese ed un anno.
- d. una forma non ben determinata (botulismo indeterminato), simile al botulismo

infantile, osservata in adulti e che sembra essere associata ad anomalie gastrointestinali.

La specie *C. botulinum* è suddivisa, in base a caratteri fisiologici e biochimici, in 4 gruppi e più precisamente in [1,4]:

Gruppo 1. Comprendente il tipo A ed i ceppi proteolitici dei tipi B ed F;

Gruppo 2. Comprendente il tipo E ed i ceppi saccarolitici e non proteolitici dei tipi B ed F;

Gruppo 3. Comprendente i tipi C e D;

Gruppo 4. Comprendente il tipo G.

I microorganismi appartenenti ad uno stesso gruppo presentano cross-reazioni di antigeni somatici ed omologia del DNA.

Nella tabella 2 sono riportate alcune caratteristiche dei microorganismi appartenenti ai gruppi 1 e 2 che comprendono gli agenti più frequentemente coinvolti nei casi di botulismo umano [4].

Tab.2

Caratteristiche	Gruppo	
	1	2
Tossina	A/B,F	B,E,F
pH inibitorio	4,6	5,0
Conc. di NaCl inibitoria	10%	5%
a _w minima	0,94	0,97
Range di temp. di crescita	10 - 48°C	3,3 - 45°C
D ₁₀₀ delle spore	25 minuti	< 0,1 minuti

I più importanti fattori che limitano la crescita del *C. botulinum* negli alimenti sono:

- la temperatura,
- l'attività dell'acqua,
- il pH,
- il potenziale di ossido-riduzione,
- l'aggiunta di conservanti,
- la microflora competitiva.

La crescita di *C. botulinum* e la produzione di tossina nell'alimento vengono impediti attraverso vari accorgimenti:

1. acidificando l'alimento a pH < 4,5;
2. sottoponendo gli alimenti che possono essere conservati a temperature >10°C a trattamento termico a 121°C per almeno 3 minuti;

3. sottoponendo gli alimenti che devono essere conservati a temperature $<10^{\circ}\text{C}$ a trattamento termico a 90°C per almeno 5 minuti;
4. conservando gli alimenti con $a_w > 0,97$ a temperatura $< 3^{\circ}\text{C}$ e gli alimenti con $a_w < 0,97$ al di sotto di 10°C ;
5. sottoponendo gli alimenti ad irradiazione con raggi gamma;
6. mediante l'aggiunta di conservanti (ad es. NaCl) e l'utilizzo di materie prime poco o affatto contaminate, accorgimenti questi ultimi che ampliano ulteriormente i margini di sicurezza.

Le tossine A e B sono tra le cause più frequenti del botulismo umano; importanti veicoli di *C. botulinum* produttori di tossine A e B sono i cibi contaminati dal terreno ed in particolare le conserve di verdure prodotte in casa (più frequentemente coinvolte negli Stati Uniti) e prodotti a base di carne (più frequentemente coinvolte in Europa).

Anche il miele è una sorgente conosciuta di spore di *C. botulinum* e sono noti diversi casi di botulismo infantile associato al consumo di miele. Studi condotti su questa matrice hanno dimostrato che più del 13% dei campioni esaminati conteneva spore di *C. botulinum* e per questa ragione FDA, C.D.C. e l'Accademia americana di pediatria raccomandano di non somministrare miele a bambini sotto l'anno di età [5].

Negli ultimi anni si è avuto un incremento dei casi di botulismo causati da *C. botulinum* produttori di tossina E, detta del "tipo pesce" perché frequentemente associata al consumo di pesce e molluschi.

Non tutti ritengono che i tipi C e D possano essere causa del botulismo umano, ma essi/ come i tipi F e G di cui si conosce poco, vengono ritenuti importanti agenti del botulismo animale.

L'origine della contaminazione degli alimenti da parte del *C. botulinum* è il terreno e la polvere per i tipi A e B ed i sedimenti marini per il tipo E. Il *C. botulinum* è infatti un microorganismo ubiquitario che si isola frequentemente sia nel terreno (soprattutto i tipi A e B) che nei sedimenti marini (soprattutto il tipo E).

Il tipo B è frequente nel suino nel cui intestino conduce vita saprofitica, al momento dell'abbattimento esso può attraversare la parete intestinale e localizzarsi nelle masse muscolari dove avviene la sporificazione.

Le spore di *C. botulinum* che, attraverso la polvere, contaminano gli alimenti, se trovano un ambiente favorevole (temperatura, a_w e pH favorevoli ed ambiente anaerobio) germinano e producono la tossina.

La tossina botulinica può essere presente anche in alimenti che non risultano apparentemente alterati per fenomeni di fermentazione e senza che si siano prodotte modificazioni delle caratteristiche organolettiche degli stessi.

La temperatura ottimale per la produzione di tossina è di 35°C per i microorganismi del gruppo 1 e di $26 - 28^{\circ}\text{C}$ per quelli del gruppo 2. Alcuni ceppi del gruppo 2 possono produrre tossina anche a temperature di refrigerazione ($3-4^{\circ}\text{C}$) [5].

Oggi il pericolo maggiore deriva, quasi esclusivamente, da alimenti preparati in casa quali conserve vegetali e di carne, che vengono sottoposti a

trattamenti termici non idonei a distruggere le spore, ma sufficienti a creare un'ambiente anaerobio nel contenitore in cui vengono conservati.

Attualmente il numero di casi di botulismo è molto limitato. Il tasso di mortalità della malattia è elevato, strettamente associato al tipo di *C. botulinum* coinvolto (più basso per il tipo B non proteolitico) ed alla rapida diagnosi che permette una terapia mirata spesso risolutiva. Negli Stati Uniti dal 1899 al 1990 si sono registrati 2305 casi con 1025 morti (44,5%) [5].

Le tossine botuliniche sono prodotte all'interno del microorganismo durante la crescita. Generalmente esse si accumulano nel mezzo colturale alla fine della fase di crescita a causa della lisi cellulare.

Con poche eccezioni la denominazione della tossina è identica a quella del ceppo produttore, ma si conoscono alcuni ceppi che producono contemporaneamente 2 tossine diverse, di solito una in maggior quantità rispetto all'altra; le associazioni note sono AB, AF, BF.

Le tossine sono di natura proteica, sono antigeniche, hanno una spiccata neurotossicità e sono sensibili al calore (vengono inattivate con trattamento a 100 °C per 10 minuti). Esse sono poco stabili a pH alcalino e tale proprietà è sfruttata, per un primo intervento, con la somministrazione di pastiglie di bicarbonato di sodio che, innalzando il pH dello stomaco, possono servire come primo tentativo di inattivare la tossina. L'acidità gastrica ed enzimi proteolitici non inattivano le tossine, anzi è dimostrato che la tossina di tipo E è potenziata nel suo effetto da 10 a 1000 volte da una parziale proteolisi [3].

Particolare attenzione deve essere rivolta alla manipolazione dei campioni sospetti in laboratorio dato che la tossina può essere facilmente assorbita attraverso le ferite e le mucose.

Le tossine botuliniche sono veleni estremamente pericolosi che agiscono in quantità infinitesimali (la dose letale orale per l'uomo è nell'ordine di 10^{-8} gr) [7].

L'azione della tossina si esplica a livello del sistema nervoso periferico non essendo essa in grado di attraversare la barriera ematoencefalica. Essa agisce sulle giunzioni neuromuscolari dove determina il mancato rilascio del neurotrasmettitore acetilcolina con conseguente perdita della funzione motoria e paralisi flaccida che può causare insufficienza cardiaca o respiratoria e quindi il decesso [6,7].

Clinicamente per la diagnosi di botulismo si ricerca la tossina nel sangue, nelle feci e nel vomito dei pazienti.

Nei casi di botulismo alimentare la rapida identificazione del cibo contaminato è estremamente importante per prevenire ulteriori casi di malattia.

I sintomi clinici del botulismo compaiono dopo 12 - 36 ore dall'ingestione dell'alimento (più raramente da 4 ore a 4 giorni) in dipendenza della quantità di tossina ingerita e dello stato fisico dei consumatori. Si hanno sintomi aspecifici quali nausea, vomito e disturbi gastroenterici. Caratteri di specificità hanno sintomi quali la paralisi della muscolatura oculare, che può determinare diplopia, fotofobia, rigidità pupillare, e la paralisi della muscolatura faringea e linguale che causano dislalia, disfagia, blocco della secrezione salivare ed essiccamento delle mucose. Si può giungere alla paralisi degli arti mentre il pericolo più grave per i pazienti è il rischio di paralisi respiratoria.

La terapia è rappresentata dall'immediata somministrazione di siero di cavallo contenente anticorpi antitossina.

4.1 ASPETTI DELLA RICERCA DEL *CLOSTRIDIUM BOTULINUM* E DELLE SUE TOSSINE NEGLI ALIMENTI

RACCOMANDAZIONI: Operare con la massima precauzione durante tutte le fasi dell'analisi, non pipettare mai a bocca, ricordare che la tossina botulinica agisce a dosi infinitesimali e che viene assorbita attraverso le mucose e le ferite fresche.

Negli alimenti si possono ricercare sia le tossine, per mezzo di prove biologiche, sia il *C. botulinum* (spore e forme vegetative) con l'indagine colturale e la successiva prova biologica per la tipizzazione. Le prove biologiche prevedono l'impiego di topini vivi.

La ricerca colturale richiede un tempo maggiore e, d'altro canto, il reperimento in un campione di forme vegetative o di spore di *C. botulinum* non ci fornisce indicazioni circa la presenza o meno della tossina nell'alimento. La ricerca diretta della tossina nell'alimento richiede un tempo minore.

4.2 METODI ANALITICI

Tutti i campioni, compresi quelli in scatola che si presentano rigonfi, dovrebbero essere refrigerati prima dell'analisi [5].

4.2.1 Analisi colturale

L'analisi colturale prevede:

1. un'arricchimento con coltura in terreno liquido;
2. l'isolamento in terreni solidi e successiva subcoltura in terreni liquidi (facoltativo);
3. la prova biologica condotta sulla brodocoltura o sul filtrato di questa per la determinazione e l'identificazione della tossina botulinica.

METODO [2, 5]

Terreni di coltura: 'Chopped liver broth' (CLB) o 'Cooked meat medium' (CMM) o 'Trypticase glucose medium' (TGM) o 'Trypticase peptone glucose yeast-extract broth' (TPGY); se si sospetta la presenza di *C. botulinum* non proteolitici utilizzare il TPGY addizionato di tripsina (TPGYT) (Ricordare che non è possibile conservare a lungo le colture in TPGYT perché l'azione continuata della tripsina

può distruggere la tossina); 'Brain heart infusion agar' (BHIA); 'Liver veal egg-yolk agar' (LVEYA); 'Anaerobio egg-yolk agar' (AEYA); 'Reinforced clostridial agar' (RCA); 'Gelatin phosphate buffered' (GPB).

Procedimento:

A) Arricchimento

Distribuire i terreni colturali liquidi in provette (15 ml/provetta di terreno) e rigenerare immediatamente prima dell'analisi scaldando per alcuni minuti in bagnomaria bollente e raffreddando sotto acqua corrente fredda.

Utilizzare CMM (o TGM) e TPGY per la coltura di arricchimento (in alternativa utilizzare tutti e tre i terreni).

Se si sospetta la presenza di *C. botulinum* dei tipi B, E o F non proteolitici utilizzare il TPGYT, ma non rigenerare perché la tripsina viene distrutta dal riscaldamento.

In tre tubi di terreno rigenerato porre 1 - 2 gr di campione (o 1 - 2 ml se si tratta di un campione liquido).

Se si usano CMM, TGM o TPGY scaldare uno dei tubi a 60°C per 15 minuti ed un'altro ad 80°C per 30 minuti in bagnomaria agitando per i primi 2 minuti.

Se si usa TPGYT non scaldare perché le spore del tipo E sono sensibili al calore.

Il terzo tubo non va scaldato.

Incubare tutti i tubi a 29 - 31°C fino a che non sia visibile un'abbondante crescita evidenziata da produzione di gas, torbidità e, in alcuni casi, da parziale idrolisi delle particelle di carne. Di solito non sono necessari più di 5 - 7 giorni, ma in alcuni casi, è necessario protrarre l'incubazione fino a 10 - 14 giorni (il TPGYT non va incubato per più di 5 giorni).

Allestire una colorazione di Gram ed osservare per la presenza di tipiche cellule di *Clostridium* spp. (corti e tozzi bacilli Gram positivi, presenza di spore che deformano la cellula determinando l'aspetto a "racchetta da tennis").

Analizzare il sovrinatante della brodocoltura per la presenza di tossina (eventualmente esaminare il filtrato sterile della brodocoltura) con la procedura descritta più avanti.

Generalmente dopo 5-7 giorni d'incubazione la produzione di enterotossina è massima, ma in alcuni casi si può rilevare la presenza di tossina nel brodo colturale già dopo 72 ore.

B) Isolamento in terreni solidi e subcoltura in terreni liquidi

Sottoporre le brodocolture a trattamento a caldo (80°C per 10 -15 minuti) o trattare con un uguale volume di alcool assoluto sterilizzato per filtrazione (1 ora a temperatura ambiente).

Nel caso di brodocolture in TPGYT, a causa della labilità al calore delle spore di tipo E, si deve effettuare il trattamento con alcool.

Allestire delle subcolture dai brodi di arricchimento, trattati al calore od in alcool, in piastre di BHIA, di LVEYA, di AEYA o di RCA in modo che crescano colonie ben isolate.

Incubare le piastre a 35 °C in anaerobiosi per 24 - 48 ore.

Le colonie di *C. botulinum* possono essere rialzate o piatte, lisce o rugose (le rugose hanno sovente contorni irregolari).

Sui terreni contenenti tuorlo d'uovo le colonie, se esaminate con luce obliqua, presentano una superficie iridescente, detta "strato perlaceo", che si estende al di là dei margini della colonia seguendone il contorno irregolare. Le colonie dei tipi C, D ed E sono, di solito, circondate da un alone di 2 - 4 mm di precipitato giallo mentre le colonie dei tipi A e B presentano un alone molto più ristretto. Alcune altre specie di clostridi possono presentarsi con le stesse caratteristiche.

Selezionare 10 colonie tipiche e subcoltivarle in terreno liquido (CMM, TGM, TPGYE o CLB rigenerati immediatamente prima dell'uso o TPGYET).

Incubare a 29 - 31°C per 5-7 giorni e determinare la presenza di tossina nel sovrinatante o nel filtrato sterile della brodocoltura con la procedura descritta appresso.

C) Determinazione ed identificazione della tossina botulinica

c.1 Trattamento con tripsina

La tossina dei tipi non proteolitici, se presente, deve essere attivata con trattamento con tripsina. Le tossine ottenute da colture in TPGYT non devono essere trattate perché la tripsina è già presente nel mezzo colturale.

Portare il pH del sovrinatante delle brodocolture o il filtrato delle stesse a 6,2 con NaOH o HCl di 1 N; aggiungere ad 1,8 ml del sovrinatante così ottenuto 0,2 ml di una soluzione acquosa di tripsina (1 gr di tripsina 1:250 DIFCO +10 ml di acqua distillata sterile, agitare e scaldare per favorire la dissoluzione).

Incubare a 35 - 37 °C per 1 ora agitando saltuariamente.

c.2 Saggio di tossicità

Saggiare parallelamente il campione tripsinizzato e quello non tripsinizzato.

Diluire una porzione del campione (tripsinizzato e non) 1:5, 1:10 ed 1:100 con 'Gelatin phosphate buffered' (GPB).

Iniettare separatamente a coppie di topini, per via intraperitoneale, 0,5 ml delle diluizioni e del campione non diluito. Iniettare altre coppie di topini con il campione tripsinizzato tal quale e le diluizioni.

Scaldare a 100°C 1 ml del campione non tripsinizzato per 10 minuti, raffreddare ed iniettarne separatamente 0,5 ml in una coppia di topini. Questo trattamento ha lo scopo di inattivare la tossina botulinica eventualmente presente, pertanto, questa coppia di topini non deve presentare sintomi di botulismo (controllo negativo).

Osservare per 72 ore i topini per verificare la presenza di eventuali sintomi di botulismo e registrare i decessi (di solito i topini muoiono in 24 ore).

Se tutti topini muoiono, è necessario ripetere il test utilizzando diluizioni più elevate per determinare la dose minima letale (MLD).

La MLD è contenuta nella diluizione più alta che uccide entrambi i topini.

Calcolare da questi dati la MLD/ml.

Esempio:

Coppia	Dil. iniettata	Esito
1	Tal quale	Topini deceduti
2	1:5	Topini deceduti
3	1:10	Topini deceduti
4	1:100	Topini sopravvissuti

La MLD è contenuta nella diluizione 1:10. Essendo stati inoculati nei topini 0,5 ml avremo che la MLD/ml è di 20.

E' molto importante osservare attentamente i topini nelle prime 24 ore per identificare i sintomi di intossicazione da tossina botulinica. I sintomi tipici sono: arruffamento del pelo, respirazione affannosa ma non rapida, debolezza degli arti; la morte è dovuta ad insufficienza respiratoria.

Le morti immediate sono da imputare a ferite o a traumi prodotti con iniezione o alla reazione ad alcune sostanze tossiche quali ammoniaca, alte concentrazioni di sale etc., ma non alla tossina botulinica.

I topini che muoiono dopo 12 ore con gli occhi chiusi ed opachi sono generalmente uccisi da infezioni batteriche e non da tossine.

L'insieme delle cause delle morti suddette potrebbero mascherare la presenza di tossine botuliniche, pertanto può essere opportuno risolvere la problematica delle infezioni batteriche con la filtrazione della coltura per allontanare i batteri! presenti sebbene questo procedimento determini un abbassamento del titolo delle tossine.

c.3 Tipizzazione della tossina

La tipizzazione della tossina viene effettuata sui sovrinatanti (trattati e non con tripsina) che sono risultati letali per i topini scegliendo quello che ha una più elevata MLD.

Nel caso si usi sovrinatante tripsinizzato la tripsinizzazione dello stesso deve essere fatta immediatamente prima del saggio.

Reidratare le fiale liofilizzate di antitossina con soluzione fisiologica sterile e diluire le antitossine monovalenti dei tipi A, B, E ed F fino ad ottenere una concentrazione di 2 UI/ml (unità internazionale¹). Preparare almeno 3 ml di ogni antitossina.

Iniettare 0,5 ml di antitossina monovalente in 3 coppie di topini per ogni tipo (3 coppie per la A, tre per la B, etc.).

Attendere da 30 a 60 minuti.

¹ Una U.I. di antitossina dei tipi A e B contiene una quantità di anticorpi sufficiente a neutralizzare 10'000 MLD; una U.I. di antitossina del tipo E contiene una quantità di anticorpi sufficiente a neutralizzare 1'000 MLD.

Preparare diluizioni del campione tossico (c.2) che contengano 10, 100 e 1000 MLD ed iniettare ciascuna diluizione in una serie di coppie di topini precedentemente protetti con antitossina.

Iniettare una coppia di topini non protetti per ciascuna diluizione del campione tossico (controllo positivo).

Osservare tutti i topini per 48 ore per verificare i sintomi di botulismo e registrare i decessi. Se tutti topini muoiono, è necessario ripetere il test utilizzando antitossina monovalente dei tipi C e D o un *pool* di antitossine dei tipi A, B, C, D, E ed F (ricordare che alcuni ceppi producono 2 tossine).

Se sopravvivono solo le coppie di topini trattati con un determinato tipo di antitossina il tipo di tossina è quello dell'antitossina iniettato alle coppie.

4.2.2 Ricerca della tossina nell'alimento

La ricerca della tossina nell'alimento prevede:

1. estrazione della tossina dall'alimento con GPB;
2. la prova biologica condotta sull'estratto per la determinazione e l'identificazione della tossina botulinica.

Procedimento:

Omogeneizzare 4 - 10 gr di alimento con un'identica quantità in peso di GPB. (Se il campione è particolarmente viscoso omogeneizzare con due parti di diluente).

Centrifugare per 30 minuti, a freddo, a circa 1000 rpm.

Determinare la presenza di tossina nel sovrnatante con la procedura già descritta per il sovrnatante o il filtrato delle colture (vedi pag. xx paragrafo C).

Fig. 1 - *Clostridium botulinum*: Ricerca delle spore e delle forme vegetative

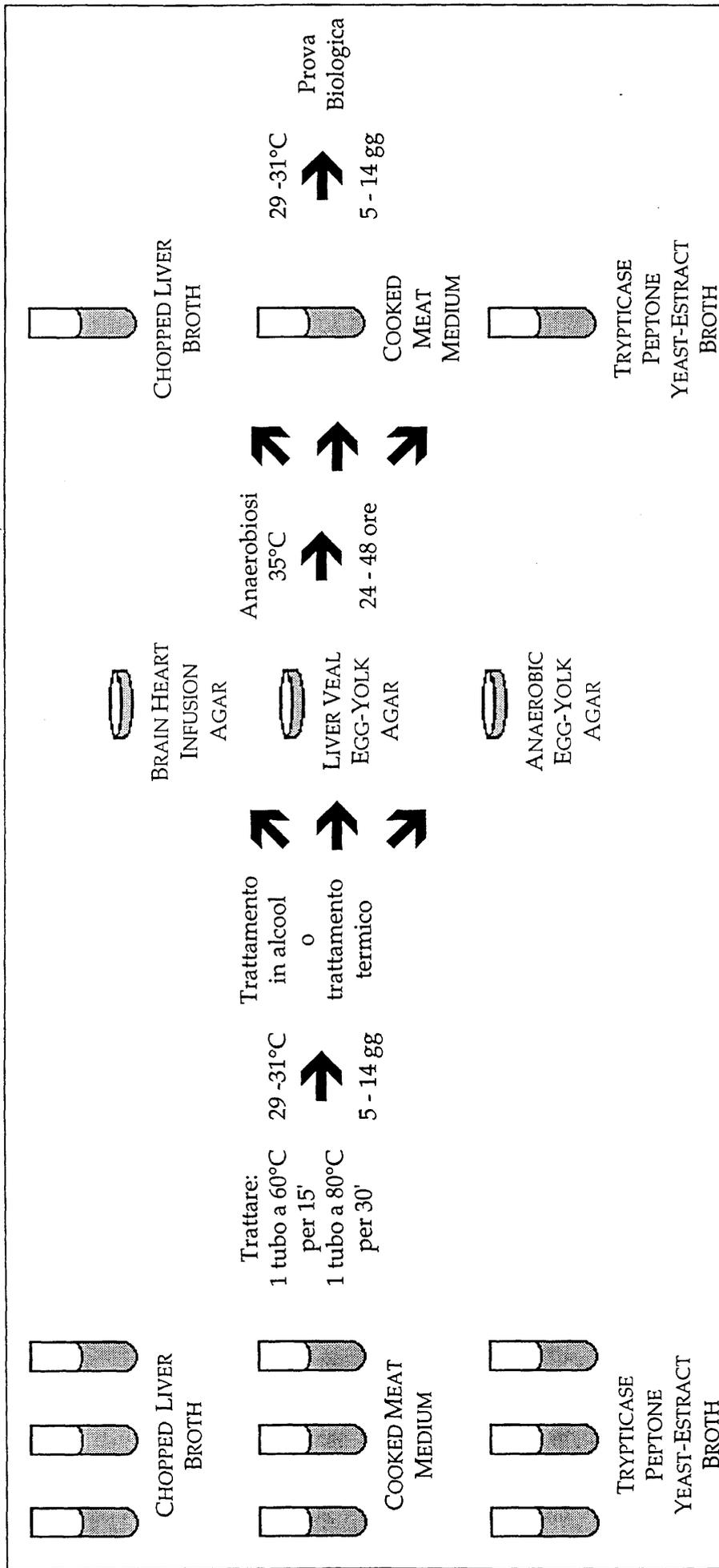
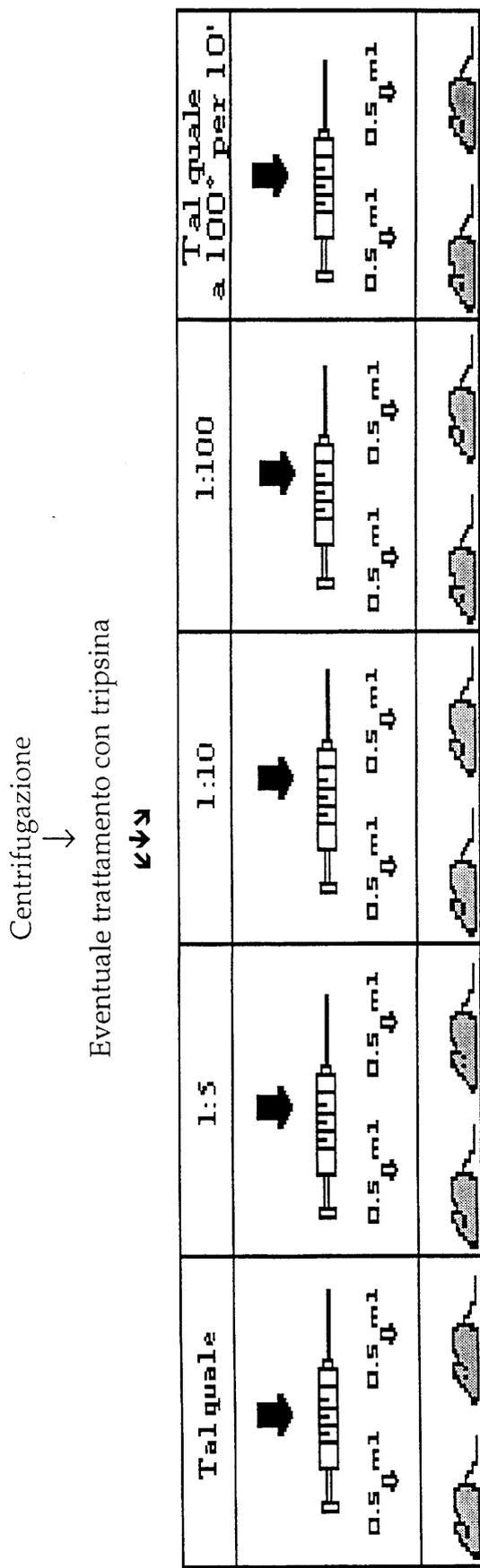


Fig. 2 - Clostridium botulinum: Prova biologica su topino per la ricerca della tossina



Interpretazione:

Tal quale	1:5	1:10	1:100	Tal quale a 100° per 10'	MDL/ml
					2
					10
					20
					Ripetere dil.+elev.

Fig. 3 - *Clostridium botulinum*: Tipizzazione della tossina botulinica

Es. Tipizzazione tossina B:

Iniettare nei topini	
I	1 U.I. di anti-A e, dopo 30-60 min., 10 MDL di tossina
II	1 U.I. di anti-A e, dopo 30-60 min., 100 MDL di tossina
III	1 U.I. di anti-A e, dopo 30-60 min., 1000 MDL di tossina
I	1 U.I. di anti-B e, dopo 30-60 min., 10 MDL di tossina
II	1 U.I. di anti-B e, dopo 30-60 min., 100 MDL di tossina
III	1 U.I. di anti-B e, dopo 30-60 min., 1000 MDL di tossina
I	1 U.I. di anti-E e, dopo 30-60 min., 10 MDL di tossina
II	1 U.I. di anti-E e, dopo 30-60 min., 100 MDL di tossina
III	1 U.I. di anti-E e, dopo 30-60 min., 1000 MDL di tossina
I	1 U.I. di anti-F e, dopo 30-60 min., 10 MDL di tossina
II	1 U.I. di anti-F e, dopo 30-60 min., 100 MDL di tossina
III	1 U.I. di anti-F e, dopo 30-60 min., 1000 MDL di tossina
Il diluente dell'antitossina e, dopo 30-60 min., 1 MDL	
CONTROLLO POSITIVO	

4.3 COMPOSIZIONE E PREPARAZIONE DEI TERRENI

T₁) Anaerobic egg-yolk agar (AEYA)

Estratto di lievito	5gr
Triptone	5gr
Proteose peptone	20 gr
Sodio cloruro	5gr
Agar	20 gr
Acqua distillata	1 litro

$$\text{pH}=7,0\pm 0,2$$

Sciogliere i componenti in acqua distillata, aggiustare il pH, riscaldare agitando fino a soluzione completa ed autoclavare a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a 48 -50°C ed aggiungere 80 ml/1 di emulsione di rosso duovo. Miscelare e porre in piastra, far asciugare a temperatura ambiente per 48 ore, scartare le piastre non sterili e conservare quelle sterili 4 - 8 °C per brevi periodi.

T₂) Brain heart infusion agar (BHIA)

Infuso di cervello (solido)	12,5 gr
Infuso di cuore di bue (solido)	5 gr
Proteose peptone	10 gr
Destrosio	2 gr
Sodio fosfato monoacido	2,5 gr
Agar	10 gr
Acqua distillata	1 litro

$$\text{pH}=7,4\pm 0,2$$

Sciogliere i componenti in 1 litro di acqua distillata, aggiustare il pH, riscaldare a bagnomaria sino a soluzione completa, dispensare in contenitori ed autoclavare a 121°C per 15 minuti. Conservare a 4 - 8 °C.

T₃) Chopped liver broth

Fegato di bue fresco	500 gr
Amido solubile	1 gr
Peptone	10 gr
Potassio fosfato bibasico	1 gr
Acqua distillata	1 litro

$$\text{pH}=7,0\pm 0,2$$

Tritare il fegato in acqua, scaldare e far bollire lentamente per 1 ora. Raffreddare ed aggiustare il pH a 7,0, far bollire per altri 10' e quindi filtrare attraverso

una garza pressando per eliminare l'eccesso di liquido. Aggiungere gli altri ingredienti ed aggiustare il pH a 7,0. Portare il volume ad 1 litro con acqua distillata. Filtrare attraverso carta da filtro grossolana. Conservare la carne ed il brodo separatamente in freezer. In tubi da batteriologia porre 10-12 ml di brodo ed aggiungere pozzetti di fegato cotto di 1,2-2,5 cm sul fondo. Autoclavare per 15' a 121°C.

T₄) Cooked meat medium

Cuore di manzo	454 gr
Peptone	20 gr
Destrosio	2 gr
Sodio cloruro	5 gr
Acqua distillata	1 litro

pH=7,2±0,2

Tritare il cuore in acqua distillata, scaldare e far bollire lentamente per 1 ora. Raffreddare ed aggiustare il pH a 7,0 e far bollire per altri 10'. Filtrare attraverso una garza e pressare per eliminare l'eccesso di liquido. Aggiungere gli altri ingredienti ed aggiustare il pH a 7,2, aggiungere acqua distillata fino a portare il volume ad 1 litro. Filtrare attraverso carta da filtro grossolana. Conservare la carne ed il brodo separatamente in freezer. In tubi da batteriologia porre 10-12 ml di brodo ed aggiungere pozzetti di carne cotta avendo cura di ricoprirli con il liquido. Autoclavare per 15' a 121°C.

T₅) Gel-phosphate buffer (GPB)

Gelatina	2 gr
Sodio fosfato bibasico	4 gr
Acqua distillata	1 litro

pH = 6,2

Scaldare lentamente per disciogliere gli ingredienti ed autoclavare a 121 °C per 20 minuti.

T₆) Liver Veal Egg-Yolk Agar (LVEYA)

Infuso di fegato (solido)	50 gr
Infuso di vitello (solido)	500 gr
Proteose peptone	20 gr
Neopeptone	1.3 gr
Destrosio	5 gr
Amido solubile	10 gr

Caseina isoelettrica	2 gr
Sodio cloruro	5 gr
Sodio nitrato	2 gr
Gelatina	20 gr
Tuorlo d'uovo fresco	2 o 3
Agar	15 gr
Acqua distillata	1 litro

$$\text{pH}=7,3\pm 0,2$$

Sciogliere i componenti in acqua distillata, aggiustare il pH, riscaldare agitando fino a soluzione completa ed autoclavare a 121 °C per 15 minuti. Raffreddare a 48 -50 °C ed aggiungere 80 ml/1 di emulsione di rosso duovo. Miscelare e porre in piastra, far asciugare a temperatura ambiente per 48 ore, scartare le piastre non sterili e conservare quelle sterili 4 - 8 °C. In alcuni casi il terreno può essere utilizzato senza l'aggiunta di emulsione d'uovo.

T₇) Reinforced clostridial agar (RCA)

Tryptose	10 gr
Estratto di carne	10 gr
Estratto di lievito	3 gr
Destrosio	5 gr
Sodio cloruro	5 gr
Amido solubile	1 gr
Cisteina cloridrato	0,5 gr
Sodio acetato	3 gr
Agar	15 gr
Acqua distillata	1 litro

$$\text{pH} = 6,8 \pm 0,2$$

Sciogliere i componenti in acqua distillata, aggiustare il pH, portare ad ebollizione fino a soluzione completa ed autoclavare a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a 48 -50 °C e porre in piastra, far asciugare a temperatura ambiente per 48 ore, conservare 4 - 8 °C.

T₈) Trypticase glucose medium (TGM)

Trypticase	20 gr
Glucosio	5 gr
Blu di Bromotimolo (0,2%)	5 ml
Agar	3.5 gr
Acqua distillata	1 litro

$$\text{pH} = 7,3 \pm 0,2$$

Aggiungere i componenti ad 1 litro di acqua distillata e scaldare agitando frequentemente sino a completa soluzione. Raffreddare a 48 - 50 °C, aggiustare il pH, dispensare in contenitori ed autoclavare a 115 °C per 15 minuti.

Conservare a temperatura ambiente e rigenerare prima dell'uso.

***T₉*) Trypticase peptone glucose yeast-extract broth (TPGY)**

Trypticase	50 gr
Peptone	5gr
Estratto di lievito	20 gr
Destrosio	4 gr
Sodio tioglicolato	1 gr
Acqua distillata	1 litro

$$\text{pH} = 7,0 \pm 0,2$$

Sciogliere i componenti in 1 litro di acqua distillata, aggiustare il pH, dispensare in contenitori ed autoclavare a 121 °C per 10 minuti.

Conservare a 4 - 8 °C per un massimo di 2 settimane.

***T₁₀*) Trypticase peptone glucose yeast-extract broth + Tripsina (TPGYT)**

Trypticase	50 gr
Peptone	5gr
Estratto di lievito	20 gr
Destrosio	4gr
Sodio tioglicolato	1 gr
Acqua distillata	1 litro

$$\text{pH} = 7,0 \pm 0,2$$

Sciogliere i componenti in 1 litro di acqua distillata, aggiustare il pH, dispensare in contenitori ed autoclavare a 121 °C per 10 minuti.

Conservare a 4°C per un massimo di 2 settimane.

Preparare una soluzione acquosa al 5 % di tripsina (Difco 1:250) e sterilizzarla per filtrazione su membrana 0,45 m. Rigenerare il terreno ed aggiungere 1 ml di soluzione di tripsina ogni 15 ml di brodo. Usare immediatamente.

Bibliografia

- [1] AA.VV., *Bergey's manual of sistematic bacteriology*, 1986, section 13, vol. 2,1141-1200.
- [2] AA.VV., *Microorganisms in foods 1: their significance and methods of enumeration - 2na edit.*, 1978, 32-33,80-81, 257-264.
- [3] Davis B.D., Dulbecco R., Eisen H.N., Ginsberg H.S., Wood W.B. McCarty M., *Trattato di microbiologia*, 1981,955-957.
- [4] Hauschild A.H.W., *Clostridium botulinum*, in "Foodborne Bacterial Pathogens", 1989, 111-189.
- [5] Kautter D.A., Solomon H.M., Rhodehamel E.J., *Clostridium botulinum*, in "Bacteriological analytical manual - 7th edit.", 1992,215-225.
- [6] Pasolini B., Ferrini A.M., *Prove biotossicologiche per il rilevamento della tossina botulinica*, Istituto Superiore di Sanità, 215-227.
- [7] Poli G., Cocuzza G., Nicoletti G., *Microbiologia medica*, 1993,158/160, 331,423.

5. RICERCA DI GERMI SPECIFICI DELLA FERMENTAZIONE IN YOGURT E LATTI FERMENTATI: *LACTOBACILLUS BULGARICUS*, *STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS* E *BIFIDOBACTERIUM INFANTIS*.

a cura di: Edgardo Contato

Il *Lactobacillus bulgaricus*, lo *Streptococcus thermophilus* e il *Bifidobacterium* sono utilizzati dall'industria lattiero-casearia per la produzione di yogurt e di latti fermentati.

Con la denominazione di yogurt viene indicato quel latte fermentato da microrganismi acidificanti:

- *Lactobacillus bulgaricus*;
- *Streptococcus thermophilus*.

Il latte fermentato può essere ottenuto sia da latte fresco che in polvere o da latte concentrato; il latte può essere totalmente o parzialmente scremato, omogeneizzato o sottoposto a procedimenti di sterilizzazione o pastorizzazione alta, prima della inoculazione con i microrganismi specifici di fermentazione. Qualora lo yogurt non venga realizzato con latte di mucca dovrà essere specificata la specie animale da cui proviene (pecora, capra, bufala). Allo stato attuale lo yogurt può essere addizionato di: saccarosio, sostanze aromatiche naturali, miele, polpa o succo di frutta; è permesso l'impiego di sostanze coloranti naturali, di acido sorbico o suoi sali nella frutta o polpa di frutta o marmellate destinate solo alla sua produzione. Lo yogurt, comunque preparato, è raffreddato a +4°C circa e mantenuto a questa temperatura fino al momento della sua distribuzione. In queste condizioni i microrganismi specifici di fermentazione hanno la possibilità di rimanere vivi ed in numero elevato per diverse settimane. Un prodotto tuttavia realizzato secondo le buone norme igieniche e tecnologiche di fabbricazione deve avere i seguenti requisiti minimi indispensabili rilevabili, per tutto il periodo di validità [1].

5.1 LACTOBACILLI

Lactobacillus (dal latino *lac*: latte, *bacillum*: bastoncino) genere di incerta classificazione, includibile in un eterogeneo raggruppamento di bacilli Gram + asporigeni [7].

Un tempo veniva classificato nella famiglia delle Lactobacillaceae o batteri lattici. Il genere *Lactobacillus* comprende circa 50 spp [7].

I *Lactobacillus* sono dei bacilli Gram +, pleiomorfi, asporigeni, immobili salvo rare eccezioni (*L. agilis*).

Le loro esigenze nutritive sono complesse e variabili a seconda dei ceppi. Tutti i ceppi sono incapaci di sintetizzare le porfirine, perché sprovvisti di citocromi e non possiedono un sistema respiratorio produttore di energia ne catalasi citocromica.

Sono aerobi facoltativi generalmente microaerofili o raramente anaerobi obbligati (*L. Tuminis*, *L. vitulinus*).

Fermentando gli zuccheri, producono generalmente acido lattico e sulla base di questa proprietà le specie del genere *Lactobacillus* sono state divise in due gruppi [2]:

- omofermentanti: che convertono il glucosio quasi completamente in acido lattico (circa 85%);
- eterofermentanti: che trasformano il glucosio in vari prodotti tra cui acido lattico, anidride carbonica, acido acetico ed etanolo.

A sua volta il gruppo degli omofermentanti viene suddiviso in due sottogruppi:

- psicrofili che crescono a circa 15°C;
- termofili che crescono a 45°C.

5.1.1 *Lactobacillus bulgaricus*: *Lactobacillus deibruceckii* subsp. *bulgaricus*

Il *Lactobacillus deibruceckii* trae il suo nome dal batteriologo tedesco M. Deibrück. Si isola dal latte, dai formaggi e dai prodotti di macerazione dei cereali.

Il *Lactobacillus deibruceckii* è stato suddiviso in tre sottospecie:

- *deibruceckii* (interviene nella trasformazione del latte in yogurt e in formaggio);
- *bulgaricus*;
- *lactis* (interviene nella trasformazione del latte in formaggio).

COLTIVAZIONE

Sono germi molto esigenti dal punto di vista nutritivo in quanto richiedono terreni arricchiti con glucosio, vitamine complesso B, aminoacidi, acidi grassi e sali di ferro, magnesio e manganese.

I terreni più frequentemente usati sono l'agar APT, agar LBS (*Lacto bacillus selection*), agar MRS, tutti di composizione molto semplice. Il periodo di incubazione è previsto per almeno 2 giorni in atmosfera microaerofila con tensione di CO₂ di 5-10%. Il pH ottimale di crescita è compreso tra 5,5 e 6,2 [2,7].

Sono presenti nelle piante e nei frutti in decomposizione, sono frequenti in prodotti alimentari e direttamente partecipano a fermentazioni naturali come quella dello yogurt, dei formaggi, del siero, dei crauti e degli insaccati crudi.

Possono provocare alterazioni in alimenti quali birra, vino, succhi di frutta e carne nella quale provocano il caratteristico colore verde [7].

5.2 STREPTOCOCCUS THERMOPHILUS

Il genere *Streptococcus* comprende la maggior parte delle specie degli streptococchi. Dalle analisi dell'RNA ribosomiale si può risalire a quattro gruppi tassonomici, comprendenti ciascuno numerosi gruppi di ibridazione DNA-DNA, aventi la valenza di specie [2].

1. Gruppo dei piogeni: comprende cinque specie aventi tutte la capacità di reagire con delle proteine sieriche umane (Ig G, albumine e macroglobuline). Questi sono lo *St. pyogenes*, *St. canis*, *St. inae*, *St. equi* e *St. dysgalactiae*. Tutte sono emolitiche o alfa o beta.
2. Gruppo degli orali: la sistematica degli *Streptococchi* provenienti dalle vie respiratorie superiori è ancora molto confusa. Serie di ibridazioni complementari DNA-DNA hanno consentito di chiarire parzialmente la situazione e distinguere come facenti parte a questo gruppo le specie: *St. oralis*, *St. pneumoniae*, *St. sanguis*, *St. mitis*, *St. langinosus*, *St. constellatus* e *St. intermedius*. Vediamo come lo *Streptococcus pneumoniae* non viene più classificato nel gruppo dei piogeni, infatti presenta un tasso di ibridazione complementare con lo *St. oralis* pari al 50 %.
3. Gruppo *mutans*: conosciuto per il suo ruolo nella formazione della placca dentaria comprende sei specie geneticamente distinte: *St. mutans*, *St. ratus*, *St. sobrinus*, *St. cricetus*, *St.ferus* e *St. macacae*.
4. Gruppo degli altri *Streptococchi*: raggruppa delle specie con caratteristiche ben determinate ad altre con caratteristiche ancora non ben conosciute. In questo gruppo lo *St. thermophilus* è strettamente apparentato allo *St. salivarius*, che non è geneticamente apparentato al gruppo degli "orali" nonostante il nome. Questo fatto, confermato dalla ibridazione DNA-DNA, giustifica la classificazione in due specie differenti.

Gli *Streptococchi* da noi classificati nel gruppo 4, appartengono al gruppo "N" secondo la classificazione di Lancefield e vengono detti anche *Streptococchi lattici*, hanno importanza nella microbiologia alimentare (particolarmente latte e formaggi) e solo raramente vengono isolati da infezioni umane; per questi è stato creato un genere separato, *Lactococcus* [7].

Habitat: Le specie di *Lactococcus* si trovano in alcuni alimenti, particolarmente latte e formaggi.

5.3 BIFIDOBACTERIUM

Dal latino *bifidus*: bifido e dal greco *bactérion*: bastoncino.

Tassonomia: genere non appartenente ad alcuna famiglia, ma includibile in un eterogeneo raggruppamento di "bacilli Gram+ asporigeni". Comprende circa 25 specie.

Caratteristiche: bacilli pleomorfi, Gram +, asporigeni, anaerobi obbligati o a volte aerotolleranti, immobili. Il pleomorfismo si manifesta sottoforma di bacilli uniformi o ramificati, biforcati ad Y o a V, a forma di clava o di spatola, soprattutto nei ceppi isolati di fresco. La morfologia può essere influenzata dalle condizioni nutrizionali [5,7].

Coltivazione: i bifidobatteri hanno esigenze nutritive molto variabili e per alcune specie non ancora del tutto conosciute. Essi necessitano in generale per la loro crescita di alcune vitamine (complesso B). Per l'isolamento e la crescita del *Bifidobacterium* sono stati proposti numerosi terreni con ingredienti o substrati del tipo succo di pomodoro, sangue di montone o di cavallo, latte, estratti di fegato o di carne, peptoni ed altri. Il terreno comunque che sembra dare i migliori risultati per la crescita del *Bifidobacterium* è l'agar TPY (Trypticase phytone yeast extract). I terreni possono essere resi selettivi con l'aggiunta di vari antibiotici.

Questi microrganismi sono resistenti agli amminoglicosidi, alle polimixine e al metronidazolo, mentre sono sensibili alle penicilline, alle eritromicine, alle vancomicine e variabile la sensibilità alle tetracicline. L'incubazione deve avvenire in anaerobiosi a temperature di 39 - 40 °C [5,7].

Habitat e diffusione: la specie *Bifidobacterium* vive prevalentemente nel tratto intestinale dell'uomo. Si tratta generalmente di microrganismi commensali, solo il *B. dentum* sembra essere patogeno per l'uomo. Nell'industria agroalimentare sono stati introdotti per la produzione di lattici fermentati o altre preparazioni a base di latte o yogurt i *B. infantis*, *B. longum*, *B. bifidum* ed il *B. breve*.

Tutte le specie di *Bifidobacterium* impiegate nell'industria agroalimentare sono frequentemente isolate dalle feci di bambini allattati al seno [7].

5.4 PREPARAZIONE DEL CAMPIONE DI YOGURT PER L'ANALISI

La prima operazione da eseguire è l'ispezione del contenitore per verificare eventuali presenze di rigonfiamenti o difetti quali, chiusura non ermetica, lacerazioni e deformazioni varie.

Per l'apertura del campione, operare in condizioni di asepsi, pulire quindi con un batuffolo di cotone imbevuto di alcool al 70% il margine di apertura del

contenitore, praticare con forbici sterili un'apertura idonea per introdurre una pipetta sterile e mescolare accuratamente [1].

Prelevare 10 ml di yogurt o latte fermentato con pipetta sterile e versarlo in una beuta da 200 ml contenente palline di vetro sterili [1].

Aggiungere al campione così prelevato 90 ml diluente che può essere o soluzione di Ringer 1:4 o soluzione triptonata in fisiologica al 1:1000 oppure una semplice soluzione triptonata 1:1000 [1/ 2,3].

Dalla sospensione madre allestire diluizioni scalari da 1:10 sino a 1:108 utilizzando lo stesso diluente impiegato per la preparazione della sospensione madre.

5.4.1 Determinazione del *Lactobacillus*

Dalla sospensione madre allestire diluizioni scalari da 10^{-1} a 10^{-8} utilizzando lo stesso diluente impiegato per la preparazione della sospensione madre.

Porre in piastra Petri 1 ml di ogni diluizione, eseguire una semina di massa con terreno MRS acidificato [1, 2, 3, 4], lasciare solidificare e ricoprire con un secondo strato dello stesso terreno.

Ciascuna diluizione viene piastrata in duplice.

Incubare a $42^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}$ per 48 h [1,2].

Enumerare le colonie di dimensioni superiori a 0,5 mm. Risalire alla concentrazione / grammo utilizzando la seguente formula:

$$n = \frac{EC}{v (n1 + 0,1 n2) d}$$

v = volume dell'inoculo deposto sulla piastra;

EC = somma delle colonie contate nelle diverse piastre alle due diluizioni prese in esame;

n1 = numero di piastre contate alla diluizione più bassa;

n2 = numero di piastre contate alla diluizione più alta;

d = diluizione più bassa.

Il risultato corrisponde al numero stimato dalle UFC per unità di peso (grammo) del campione in esame (UFC/g).

Caratteristiche morfologiche e biochimiche:

- bastoncellare (spesso irregolare nelle colonie anziane) con estremità arrotondate;
- Gram positivi;
- asporigeni;
- catalasi -;
- produzione di CO₂;
- crescita su terreno ottimale (MRS) a 15°C negativo a 45°C positivo.

Fermentazione degli zuccheri [2,3,5]:

- fruttosio +
- galattosio -
- glucosio +
- lattosio +
- maltosio -
- mannosio ±
- sucrosio -
- trealosio -
- gluconate -
- colobiosio -
- esculina -

Le prove di identificazione di *LactobacUlus bulgaricus* possono essere eseguite anche con test biochimici miniaturizzati (sistema API 50 CHL).

5.4.2 Determinazione *Streptococcus Thermophilus*

Dalle stesse diluizioni utilizzate per la determinazione dei lattobacilli porre 1 ml di ogni diluizione in capsule Petri.

Eeguire poi la semina di massa in doppio con terreno M17. Le piastre vanno incubate a 37°C per 48h [2].

Per la conta delle colonie si opera nel modo già indicato per i lattobacilli.

Morfologia:

- cellule sferiche o ovoidali con spiccato pleiomorfismo nelle colture anziane;
- Gram positivi;
- catalasi negativa;
- crescita su terreno ottimale negativa a 10°C e positiva a 45°C;
- reazione in latte tomasolato;
- acidificazione rapida;
- coagulazione;
- crescita in presenza del 6,5% di NaCl negativa.

Fermentazione degli zuccheri [2,3,5]:

- lattosio +
- glucosio +
- saccarosio +
- maltosio -

Le prove di identificazione di *Streptococcus thermophilus* possono essere eseguite anche con test biochimici miniaturizzati (sistema API 50 CHL).

5.4.3 Determinazione di *Bifidobacterium*

La preparazione del campione avviene secondo le modalità esposte per la ricerca dei lattobacilli e degli streptococchi.

Per la preparazione della sospensione madre si adopera lo stesso diluente utilizzato per le identificazioni di *Lactobacillus* e *Streptococcus*.

Dalla soluzione madre allestire le diluizioni scalari decimali del prodotto in esame.

Porre in piastra Petri 1 ml delle diluizioni ottenute ed eseguire la semina di massa con terreno MRS neutralizzato, addizionato di antibiotico (dicloxacillina o isossazolil-penicilline) ad una concentrazione di 0,5 µg/ml.

Incubare in anaerobiosi a $40 \pm 1^\circ\text{C}$ per 48-72 h.

Terreno MRS modificato:

- portare a 7 con NaOH 1 N il terreno MRS, utilizzato per la ricerca dei lattobacilli.

Soluzione di dicloxacillina:

- pesare 50 gr di antibiotico in matraccio tarato da 100 ml sciogliere in acqua distillata e portare a volume (soluzione A) (Concentrazione antibiotico 50000µg/100cc);
- 10 ml della soluzione A vengono trasferiti in matraccio da 100 ml e portati a volume in acqua distillata (soluzione B) (concentrazione antibiotico 50µg/ml);
- sterilizzare per filtrazione 0,45 µg;
- porre in seguito 1 ml della soluzione B in 100 ml di terreno MRS modificato ottenendo così una concentrazione finale di antibiotico pari a 0,5 µg/ml.

Sono da considerare positive le colonie di diametro 1-2 mm, biancastre, cremose in superficie, lenticolari incluse o diffuse quando crescono sul fondo della piastra.

Le colonie caratteristiche vanno testate al microscopio e devono risultare Gram + di forma bastoncellare allungata con tendenza ad unirsi alle estremità.

Per l'identificazione si possono utilizzare test biochimici miniaturizzati Api 50 CHE.

Bibliografia

- [1] Negri R-, Von Lorch L-, De Felip G., *Igiene e microbiologia degli alimenti, "Yoghurt"*, I.S.S.

- [2.] *Cours de microbiologie des aliments*. Istituto Pasteur, Lille, 1992.

- [3] *Yaourt: identification des microorganismes caracteristiques*, Fédération Internationale de Laiterie, 1991/146.

- [4] De Man J.C., Rogosa M., Sharpe. M.E., "*J. Applied Bacteriology*", 23,130-135,1960.

- [5] *Bergey's manual of Systematic Bacteriology*, Sez. 14, vol. 2,1986.

- [6] *Bergey's manual of Systematic Bacteriology*, Sez. 12, vol. 2 ,1047-71,1986.

- [7] Nicóletti G., Nicolosi V.M., *Dizionario di batteriologia umana*. Ed. Mediserve, Milano, 1993.

6. VIBRIO

a cura di: Giuseppe Poda

6.1 INQUADRAMENTO TASSONOMICO

La famiglia delle *Vibrionaceae* comprende quattro generi (tab. 1), tra cui *Vibrio spp* [1].

Tab. 1 - *Vibrionaceae*

<i>Vibrio</i>
<i>Photobacterium</i>
<i>Aeromonas</i>
<i>Plesiomonas</i>

I membri del genere *Vibrio* hanno morfologia bastoncellare diritta o curvata, lunghezza di 0,5 - 0,8 mm, sono Gram-negativi, non producono endospore ed in terreno liquido sono mobili per flagelli polari. *Vibrio spp* è aerobico-anaerobico facoltativo, essendo capace di metabolismo fermentativo e respiratorio, la maggioranza delle specie è ossidasi positiva (*V. metchnikovii* unica eccezione), catalasi positiva e fermenta il glucosio senza produzione di gas (*V. fluvialis* unica eccezione), infine la presenza di ioni sodio stimola la crescita di tutte le specie ed è una assoluta necessità per molte [1].

Il genere *Vibrio* ha 28 specie ed almeno 10 di queste possono causare malattia [5] (tab. 2).

Tab. 2 - *Classificazione del genere Vibrio* [5]

Vibrio spp reperiti in campioni clinici umani:

<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. cholerae</i>	<i>V. damsela</i>
<i>V. fluvialis</i>	<i>V. furnissi</i>	<i>V. hollisae</i>
<i>V. metschnikovii</i>	<i>V. mimicus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>
<i>V. vulnificus</i>		

Vibrio spp non reperiti in campioni clinici umani:

<i>V. aestuarianus</i>	<i>V. anguillarum</i>	<i>V. campbellii</i>
<i>V. costicela</i>	<i>V. diazotrophicus</i>	<i>V. fischeri</i>
<i>V. gazogenes</i>	<i>V. harveyi</i>	<i>V. logei</i>
<i>V. natriegens</i>	<i>V. nereis</i>	<i>V. nigripulchritudo</i>
<i>V. ordalii</i>	<i>V. orientalis</i>	<i>V. pelagius</i>
<i>V. proteolyticus</i>	<i>V. splendidus</i>	<i>V. tubiashii</i>

V. cholerae è diviso in 2 sierogruppi sulla base dei suoi antigeni somatici 0 [13]:

- 1) *V. cholerae* 01, capace di agglutinare con gli antisieri contro l'antigene 0;
- 2) *V. cholerae* non-01 (in passato conosciuto come NCV, *non cholerae vibrio o* NAG, *non agglutinating vibrio*), incapace di agglutinare con gli antisieri contro l'antigene 0.

A sua volta *V. cholerae* 01 si divide in 2 biotipi (tab. 3):

- 1) *V. cholerae* 01 biotipo Classico,
- 2) *V. cholerae* 01 biotipo El Tor,

Tab. 3 - Caratteri differenziali fra i biotipi Classico ed El Tor di *V. cholerae* 01 [4].

Test	Classico	El Tor
Sensibilità per El Tor al fago V	-	+
Sensibilità per Classico al fago IV	+	-
Sensibilità alla polimixina B (50 unità)	+	-
Emolisi (eritrociti di montone)	-	v
Emoagglutinazione (eritrociti di pollo)	-	+
Voges-Proskauer	-	+

+, positivo; -, negativo; v, ceppo variabile

ed in 3 sierotipi:

- 1) *V. cholerae* 01 sierotipo Ogawa,
- 2) *V. cholerae* 01 sierotipo Inaba,
- 3) *V. cholerae* 01 sierotipo Hikojima.

I primi due sierotipi agglutinano solo con gli antisieri specifici, viceversa il terzo agglutina sia con gli antisieri di *V. cholerae* Ogawa che con quelli di *V. cholerae* Inaba.

6.2 HABITAT

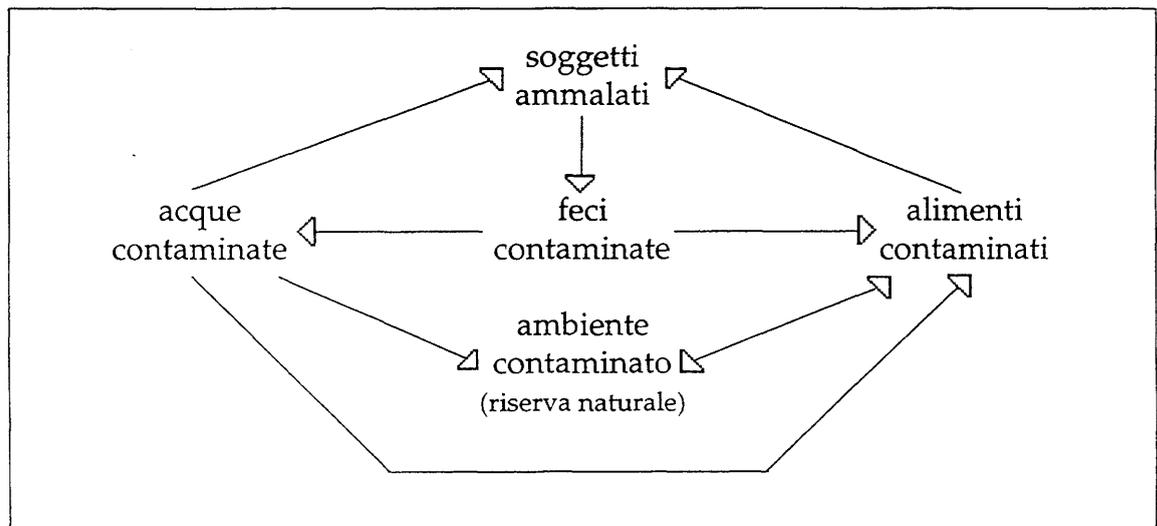
L'ampio range di concentrazione di ioni sodio necessario per la crescita ottimale di *Vibrio spp* rispecchia la capacità propria delle diverse specie di vivere in ambienti idrici con differente salinità: ad una estremità *V. cholerae* e *V. metschnikovii* isolati in acque dolci e salmastre ed all'altra *V. costioela* che richiede ambienti con elevata concentrazione salina [1].

Mentre *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* fanno parte della normale microflora dell'ambiente marino, per lungo tempo si è pensato che la riserva naturale di *V. cholerae* avesse origine esclusivamente umana, attualmente si ipotizza anche

l'origine ambientale acquatica, infatti numerose evidenze suggeriscono che *V. cholerae* (in particolare *V. cholerae* non-01) è un componente della flora di acque salmastre (estuario, zone paludose) e costiere [7].

Nel caso specifico di *V. cholerae* 01 le feci dei soggetti ammalati sono la sorgente primaria della contaminazione ambientale ed esistono forti evidenze sulla persistenza del microorganismo in *réservoir* ambientali (fig. 1) [10].

Fig. 1 - Principali vie di trasmissione del colera



6.3 SPECIE PATOGENE

Nel genere *Vibrio* vi sono specie patogene tanto per l'uomo quanto per vertebrati ed invertebrati marini. Delle specie patogene per l'uomo alcune sono state associate a sindrome gastroenterica, altre ad infezioni principalmente di ferite, dell'occhio, dell'orecchio ed anche a casi di setticemia (tab.4).

Le specie più frequentemente responsabili di malattia causata dal consumo di alimenti sono *V. cholerae* 01, *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus*.

• *V. cholerae* 01

A partire dal 1817 sono state segnalate sette pandemie, attualmente il colera è endemico in parte dell'Asia e dell'Africa con sporadici casi in Nord-America e in Australia. Nelle aree endemiche l'acqua (contaminata da feci) è probabilmente il principale veicolo di infezione anche se vengono riportati parecchi casi causati dal consumo di alimenti di origine marina [6,9]. I sintomi dell'infezione variano da una semplice diarrea ad una grave malattia: la forma più severa (colera grave) è causata dai ceppi 01 che producono la tossina colerica (CT); la morte è più comune nelle infezioni sostenute dal biotipo "Classico" mentre le infezioni "El Tor" sono meno severe [13].

Tab. 4 - Associazione tra *Vibrio spp* e sindrome clinica [4]

Specie	Sindrome clinica				
	Gastroenterite	Infezione ferite	Infezione orecchio	Sepsi primaria	Sepsi secondaria
<i>V. cholerae</i> 01	+++	+			
<i>V. cholerae non-01</i>	+++	++	+	+	+
<i>V. mimicus</i>	++		+		
<i>V. fluvialis</i>	++				
<i>V. parahaemolyticus</i>	+++	+	+		+
<i>V. alginolyticus</i>	(+)	++	++	+	
<i>V. hollisae</i>	++			+	
<i>V. vulnificus</i>	+	++		++	++
<i>V. furnissii</i>	(+)				
<i>V. damsela</i>		++			
<i>V. metschnikovii</i>	(+)			(+)	

+++ = riportato frequentemente; ++ = meno comune (6-100 rapporti); + = raro (1-5 rapporti); (+) = associazione non chiara.

• ***V. parahaemolyticus***

Batterio alofilo largamente distribuito nelle acque marine litoranee e di estuario è conosciuto come importante causa di tossinfezione legata al consumo di alimenti di origine marina [3,12].

Motivo frequente di malattia è l'inadeguata preparazione dei cibi, seguita dalla moltiplicazione dei vibrioni durante la conservazione.

La presenza quasi ubiquitaria di *V. parahaemolyticus*, specialmente nelle acque di estuario e costiere dei mari temperati, rende probabile una analoga presenza negli alimenti che originano da queste acque. In condizioni normali la quantità di *V. parahaemolyticus* in alimenti marini freschi non dovrebbe superare le 10^2 unità per grammo (concentrazione per altro analoga a quella reperita nelle acque litoranee) mentre negli alimenti conservati, ipotizzando un aumento pari ad $1 \log_{10}/g$, si potrebbe arrivare ad un massimo di 10^3 unità per grammo di prodotto. Tuttavia tenendo presente che il numero di ceppi virulenti (Kanagawa positivi) associati all'ambiente è estremamente modesto, è difficile ipotizzare, con le quantità di *V. parahaemolyticus* riportate sopra, un consumo tale da raggiungere la dose infettante che oscilla tra $10^5 - 10^7$ cellule nel caso di ceppi Kanagawa positivi (nel caso di stipti Kanagawa negativi anche l'ingestione di 10^{10} cellule non ha causato la malattia).

Sulla base di queste osservazioni la quantità massima di *V. parahaemolyticus* virulenti ingeriti non dovrebbe mai superare 10^4 cellule (almeno 1 logio inferiore alla dose minima infettante) [11].

- ***V. vulnificus***

Le evidenze sulla distribuzione e sull'ecologia di *V. vulnificus* indicano che questo batterio è un componente della microflora degli ambienti marini, anche se i risultati di un ampio studio condotto negli USA informano che non più dell'1% dei vibrieni marini appartengono alla specie *V. vulnificus* [8].

Da un punto di vista epidemiologico l'infezione avviene preferibilmente nella stagione calda, esiste infatti una stretta correlazione fra la temperatura dell'acqua (20-30°C) e presenza di questo batterio [8].

Indagini cliniche ed epidemiologiche mostrano che *V. vulnificus* è responsabile di setticemia (spesso fatale) successiva all'ingestione di alimenti marini crudi (in particolare ostriche) o seguente l'infezione di ferite causata dall'esposizione all'ambiente marino [6]. Per la gravità della sintomatologia e per la difficoltà legate alla individuazione di uno standard di accettabilità, la presenza di alimenti contaminati da *V. vulnificus* (così come la presenza di *V. cholerae* enterotossigeno) rappresenta motivo di attenzione per la salute e gli alimenti andrebbero allontanati dalla distribuzione [6].

Gli altri vibrieni che si possono correlare con le malattie veicolate da alimenti sono [2,5,11]:

- ?? *V. cholerae non-01*¹, associato con episodi sporadici non epidemici a carattere gastrointestinale;
- ?? *V. mimicus*, associato con forme diarroiche miti, specialmente dopo il consumo di molluschi crudi;
- ?? *V. alginolyticus*, associazione non provata con forme diarroiche (è responsabile dell'infezione di tessuti a seguito di esposizione ambientale);
- ?? *V. metschnikovii*, isolato in un singolo caso di peritonite in un paziente con cistifellea infiammata;
- ?? *V. fluvialis*, isolato in numerose forme diarroiche;
- ?? *V. furnissii*, associazione non provata con forme gastroenteriche in quanto isolato insieme ad altri patogeni enterici;
- ?? *V. hollisae*, isolato in alcune forme diarroiche.

6.4 DIFFERENZIAZIONE BIOCHIMICA DELLE SPECIE PATOGENE

I vibrieni reperiti in campioni di interesse clinico e quelli a vario titolo intesi come patogeni veicolati da alimenti sono divisibili in 5 gruppi sulla base di 7 test (tab. 5) [12].

1. Recentemente ceppi enterotossigeni di *V. cholerae non-01* furono associati con il colera epidemico, successivamente fu accertato che la maggioranza dei casi era riferibile ad un nuovo sierotipo denominato 0139 (*V. cholerae* 0139) [10].

Tab. 5 - Test per collocare le 10 specie di *Vibrio* reperite in campioni clinici in 5 gruppi [12]

Test	Gruppo I (*)		Gruppo II	Gruppo III	Gruppo IV			Gruppo V		
	<i>V. cholerae</i>	<i>V. mimicus</i>	<i>V. metschnikovii</i>	<i>V. hollisae</i>	<i>V. damsela</i>	<i>V. fluvialis</i>	<i>V. furnissii</i>	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. vulnificus</i>
0% NaCl	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
1% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Ossidasi	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Nitrati	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Arginina	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-
Lisina	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
Ornitina	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-

(*) specie non alofile

L'incapacità di crescere in brodo nutriente senza sale (0% di NaCl) differenzia le 8 specie alofile da *V. cholerae* e da *V. mimicus*; *V. metschnikovii* è facilmente identificabile perché è ossidasi e nitrati negativo; *V. hollisae* è lisina e ornitina decarbossilasi negativo e arginina diidrolasi negativo; *V. damsela*, *V. fluvialis*, *V. furnissii* sono tutti arginina diidrolasi positivi, mentre i 3 rimanenti alofili (*V. Alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus*) sono negativi per questa reazione ma positivi per ornitina decarbossilasi (tab.5). Quest'ultimo gruppo di alofili è ben differenziato in accordo con i test di tabella 6 [12].

Tab. 6 - Test per differenziare *V. Alginolyticus*, *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* [12]

Test	<i>V.alginolyticus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V.vulnificus</i>
Cellobiosio	-	-	-
Lattosio	-	-	(+)
Salicina	-	-	+
8% di NaCl	+	(+)	-
10% di NaCl	V	-	-
Voges-Proskauer	+	-	-
Saccarosio	+	-	(-)
L-Arabinosio	-	(+)	-

+, 90% o più dei ceppi positivi; (+) usualmente dal 75% all'89% dei ceppi positivi; V, dal 26% al 74% dei ceppi positivi; (-), dall'11% al 25% dei ceppi positivi; -, 90% o più dei ceppi negativi.

Esclusivamente per quanto riguarda *V. parahaemolyticus* può essere fatta una suddivisione sulla base della reazione di Kanagawa, che determina la presenza di una emolisina termostabile direttamente correlabile alla patogenicità (recentemente si è visto che alcuni ceppi Kanagawa negativi, responsabili di

gastroenterite, possiedono una ulteriore emolisina, distinta dalla prima ma immunologicamente correlata) [13]. Il test di Kanagawa consiste nel valutare la capacità emolitica di *V. parahaemolyticus* su uno speciale terreno (agar di Wagatsuma). I risultati di numerosi studi mostrarono che il 96% di 2720 ceppi isolati da pazienti con diarrea erano Kanagawa positivi, mentre solo l'1% di 650 ceppi provenienti da molluschi erano positivi [12]. Questa evidenza suggerisce che il test di Kanagawa dovrebbe essere usato per distinguere i ceppi virulenti, considerazione rafforzata da studi in cui 10^{10} cellule di ceppi Kanagawa negativi erano ingerite da volontari senza alcun effetto, mentre un titolo di $2,10^5$ - $3,10^7$ cellule di stipiti Kanagawa positivi erano sufficienti a produrre gastroenterite in soggetti umani [12].

Un pratico schema di flusso, utilizzabile per differenziare i vibroni patogeni è proposto in figura 2 [8].

6.5 USO DI TERRENI SELETTIVI, EFFETTI DELLA TEMPERATURA DI CRESCITA E DELLA CONCENTRAZIONE DI NaCl

Generalmente i medesimi terreni e metodi possono essere usati per isolare le diverse specie di vibroni enteropatogeni, con l'eccezione di *V. hollisae* che non cresce sul terreno di isolamento maggiormente impiegato: il Thiosulphate-Bile-Citrate-Sucrose' (TCBS) [13]. In quest'ultimo caso, poiché non è stato sviluppato un mezzo selettivo, si usa un terreno come l'agar sangue che dopo lincubazione viene inondato con il reagente per il test dell'ossidasi [4].

Anche la concentrazione di NaCl presente nel terreno occupa un ruolo importante non solo nella crescita ma anche nella espressione delle caratteristiche biochimiche: ad esempio nel caso di *V. parahaemolyticus* ad una concentrazione pari al 2% di NaCl si perde la fermentazione di alcuni carboidrati (amigdalina), mentre con il 4% di NaCl si perde la decarbossilasi dell'ornitina e solo con il 3% queste capacità si hanno tutte. In genere alla temperatura di 37°C, affinché le caratteristiche biochimiche si esprimano al meglio, occorre una concentrazione di NaCl vicina all' "optimum" di crescita [13].

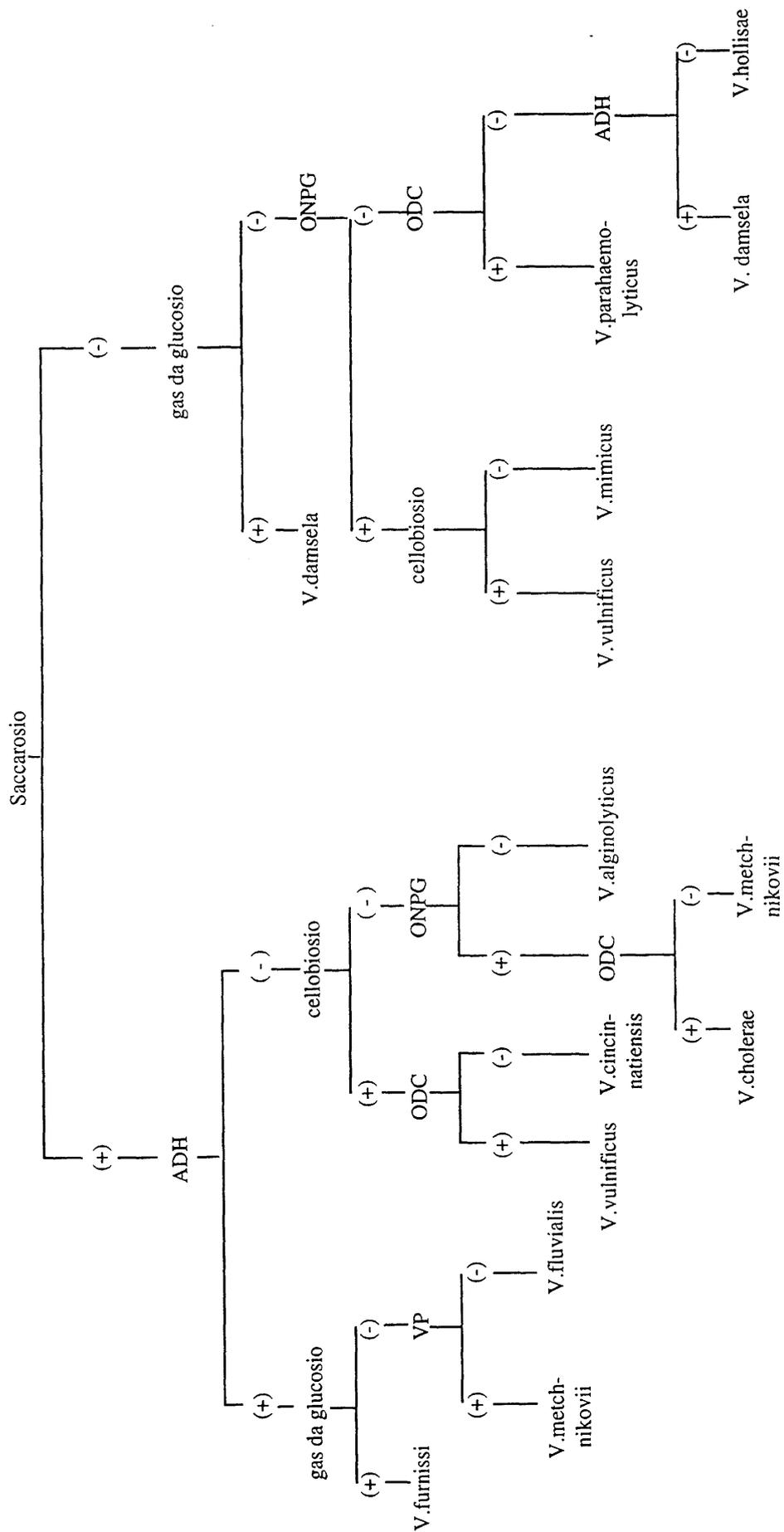
V. CHOLERAE

Nella fase di arricchimento la maggioranza dei laboratori usa terreni moderatamente selettivi come 'Alkaline peptone water' + 3% di NaCl (APWS) o Trypticase-soy broth' + 3% di NaCl (TSBS) e l'incubazione avviene a 37°C per 6-8 ore allo scopo di prevenire la crescita di batteri diversi da *V. cholerae*; nel caso questo tempo crei problemi logistici è possibile incubare per tempi più lunghi ma a temperature differenti.

Infatti è stato visto che [13]:

- incubando a 20°C gli effetti selettivi del terreno durano più a lungo;
- l'uso di temperature di 42°C permette il recupero di quantità significativamente maggiori di *V. cholerae* e minimizza i problemi con i microorganismi competitori.

Fig. 2 - Chiave diagnostica per il riconoscimento orientativo di *Vibrio* spp associati con malattie [8]



V. PARAHAEMOLYTICUS

Considerevole attenzione è stata posta per *V. parahaemolyticus* e diversi brodi di arricchimento sono disponibili; ad esempio 'Glucose-salt-teepol broth' (GSTB), 'Salt-colistin broth' (SCB) e 'Salt-polimixin broth' (SPB). Il GSTB incubato una notte a 37°C è il più usato, tuttavia sia GSTB che SCB che SPB (questi ultimi due più selettivi) possono inibire alcuni ceppi di *V. parahaemolyticus*. Anche per questi motivi la necessità di usare terreni fortemente selettivi non è universalmente accettata e 'Alkaline peptone water' + 3% di NaCl (APWS) è considerato sufficientemente efficace per l'isolamento di *V. parahaemolyticus* [13].

V. VULNIFICUS

APWS è largamente usato anche se esistono perplessità sulla sua efficienza. Un ulteriore problema sussiste nel caso si debba eseguire la ricerca da ostriche: infatti in questo caso si sommano gli effetti combinati di un inibitore presente nelle ostriche a quelli dello shock termico causato dalle basse temperature di conservazione del prodotto; sperimentalmente si è visto che è possibile minimizzare questi inconvenienti aumentando la quantità di terreno di arricchimento per ogni campione [13].

6.6 METODOLOGIA DI RICERCA DI *V. CHOLERAE* [4]

6.6.1 Preparazione del campione e arricchimento

Venticinque grammi di alimento, formati avendo cura di prelevare in punti diversi e vari della massa del campione, vengono addizionati a 225 ml di 'Alkaline peptone water' (APW), in un contenitore da Stomaker da 500 ml ed omogenizzati per un tempo non superiore a due minuti. La miscela deve essere incubata a 35-37°C per 6-8 ore.

Nel caso di molluschi è consigliabile formare il campione da analizzare con 10-12 animali più il relativo liquido intervalvare. Cinquanta grammi di questo composto sono omogenizzati con 450 ml di APW e quindi separati in due aliquote da 250 ml cadauna. La prima aliquota viene incubata a 35-37°C per 6-8 ore e la seconda a 42°C per 6-8 ore.

Nel caso di prodotti in cui si sospetti la presenza di un elevato numero di batteri enterici l'isolamento di *Vibrio spp* può risultare difficoltoso, per risolvere questo problema è opportuno portare ad 1:100 il rapporto campione terreno; in altre parole occorrerà aggiungere a 25 g di campione 2475 ml di APW.

Nel caso di alimenti processati o congelati, dopo il primo periodo di incubazione (6-8 ore) ne seguirà un secondo fino a 18-24 ore.

6.6.2 Isolamento

Dopo incubazione, senza agitare il contenitore, un inoculo formato con una ansa (3-5 mm di diametro) caricata dalla pellicola (crescita superficiale) viene strisciato su una piastra di terreno agarizzato selettivo: "Thiosulfate cifrate bile salts sucrose agar" (TCBS). Incubare per 18-24 ore a 35-37°C.

Su questo terreno *V. cholerae* (biotipi "El Tor" e "Classico") cresce con colonie larghe, lisce, gialle (saccarosio positivo), leggermente spianate, con centro opaco e margini traslucidi (in generale *Vibrio spp* non produce su TCBS colonie minuscole, cremose, gialle).

Le colonie di *V. mimicus* sono verdi (saccarosio negativo).

Da ogni piastra si prendono 3 o più colonie sospette e si passano su 'Tryptic soy agar' (TSA) (con una concentrazione totale di NaCl pari al 2%) che viene incubato 12-18 ore a 35-37°C. L'isolamento su terreno non selettivo è necessario per poter disporre di colture pure da sottoporre alle prove biochimiche.

6.6.3 Identificazione

1 - DIFFERENZIAZIONE FRA VIBRIONI E MICROORGANISMI CORRELATI ED IDENTIFICAZIONE PRELIMINARE DI *V. CHOLERA*

Partendo dalle colture in TSA si eseguono:

- a) 'Kligler iron agar' e 'Arginine glucose slant';
 - b) Tryptone broth' e Tryptone broth⁷ con il 3% di NaCl;
 - e) test di ossidazione-fermentazione;
 - d) test dell'ossidasi.
-
- a) Per la differenziazione presuntiva fra *Vibrio spp*, *Aeromonas spp*, e *Plesiomonas shigelloides* si inoculano (per infissione nel cilindro e per strisciamento nel becco) singole colonie in 'Kligler iron agar' (KIA) ed in 'Arginine glucose slant' (AGS). I terreni vengono incubati/con chiusura della provetta allentata, per 18- 24 ore a 35-37°C. Salvo eccezioni *Vibrio spp* ha reazione alcalina (rossa) nel becco ed acida (gialla) nel cilindro, senza produzione di gas e di idrogeno solforato (nessun annerimento) (tab. 7) [4]. Nessun *Vibrio spp* (tra quelli indicati) produce H₂S in KIA, TSI, AGS o gas dal glucosio in quantità apprezzabile in KIA, TSI, AGS. Alcuni *Aeromonas spp* possono produrre gas dal glucosio in questi terreni.
 - b) Si inoculano due brodi, rispettivamente un brodo triptone (T₁N₀) ed uno con il 3% di NaCl (T₁N₃), che vengono incubati 18-24 ore a 35-37°C (in caso di crescita negativa reincubare per altre 18-24 ore). *V. cholerae* e *V. mimicus* crescono sia in T₁N₀ che in T₁N₃, i microorganismi (non vibroni) che producono reazioni simili a *V. cholerae* in KIA non crescono in T₁N₃, infine molti vibroni crescono solo in T₁N₃ (tab. 8) [4].

Tab. 7 - Differenziazione presuntiva fra *Vibrio spp*, *Aeromonas spp*, *Plesiomonas shigelloides* [4]

	KIA		TSI		AGS	
	'Kliger iron agar'		'Triple sugar iron agar'		'Arginine glucose slant'	
	becco	cilindro	becco	cilindro	becco	cilindro
<i>V. cholerae</i>	K	A	A (K rara)	A	K	a
<i>V. mimicus</i>	K	A	K (A rara)	A	K	A
<i>V. parahaemolyticus</i>	K	A	K	A	K	A
<i>V. alginolyticus</i>	K	A	A	A	K	A
<i>V. vulnificus</i>	K o A	A	K (A rara)	A	K	A
<i>A. hydrophila</i>	K o A	A	K o A	A	K	K
<i>P. shigelloides</i>	K o A	A	K o A	A	ND	ND

K, alcalina; A, acida; a, debolmente acida; ND, non determinata.

- c) Si inoculano 2 tubi di OF "Glucose medium", uno dei quali viene ricoperto con olio sterile minerale (1-2 cm), che vengono incubati 24-72 ore a 35-37°C. La fermentazione (acidificazione) produce il viraggio da verde a giallo del terreno semisolido di OF *Vibrio spp* fermenta il glucosio, ma produce acido anche con metabolismo ossidativo; *Pseudomonas spp* utilizza il glucosio solo per via ossidativa.
- d) Con un tampone sterile si trasferisce un poco della crescita in TSA su di un filtro circolare di carta bibula precedentemente imbibito con alcune gocce di reagente per ossidasi. La reazione è positiva quando entro pochi secondi la carta assume un colore rosso scuro o blu; ad eccezione di *V. metschnikovii*, tutti i vibroni patogeni sono ossidasi positivi.

Riassumendo, i ceppi presuntivi di *V. cholerae* su cui eseguire le prove biochimiche e sierologiche devono:

- essere saccarosio positivi (*V. mimicus* è negativo);
- crescere in brodo T₁N₀ e T₁N₃;
- dare reazioni caratteristiche in KIA e AGS;
- essere ossidasi positivi;
- produrre acido dal glucosio sia con meccanismo fermentativo che ossidativo;
- avere morfologia bacillare ricurva ed essere Gram negativi (colorazione eseguita su colture in agar di 18-24 ore).

2 - CONFERMA DI *V. CHOLERA*E DI *V. MIMICUS* - TEST BIOCHIMICI:

- a) gallerie commerciali (es. API 20E);
- b) vibriostatico 0/129;
- e) tolleranza al sale;
- d) crescita a 42°C.

Tab. 8 - Caratteristiche biochimiche delle Vibrionaceae [4]

	<i>V. alginolyticus</i>	<i>V. anguillarum</i>	<i>V. carchariae</i>	<i>V. cholerae</i>	<i>V. cincinnatiensis</i>	<i>V. damsela</i>	<i>V. fluvialis</i>	<i>V. furnissii</i>	<i>V. harveyi</i>	<i>V. hollisae</i>	<i>V. metschnikovii</i>	<i>V. mimicus</i>	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. vulnificus</i>
TCBS	G	G	G	G	G	VE	G	G	G/VE	N	G	VE	VE	VE
m CPC	N	N	nd	P	nd	N	N	N	nd	N	N	N	N	G
AGS	KA	nd	nd	Ka	nd	nd	KK	KK	nd	Ka	KK	KA	KA	KA
Crescita con 0% NaCl	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Crescita con 3% NaCl	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Crescita con 6% NaCl	+	+	+	-	+	V	+	+	+	+	+	-	+	+
Crescita con 8% NaCl	+	-	+	-	-	-	V	+	V	-	V	-	+	-
Crescita con 10% NaCl	+	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	-
Crescita a 42°C	+	-	nd	+	-	-	V	-	V	nd	V	+	+	+
Saccarosio	+	+	+	+	+	-	+	+	V	-	+	-	-	-
Cellobiosio	-	+	+	-	+	+	+	-	nd	-	-	-	V	+
Lattosio	-	-	-	-	-	-	-	-	V	-	-	-	-	+
Arabinosio	-	V	-	-	+	-	+	+	-	+	-	-	+	-
Mannosio	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mannitolo	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	V
Ossidasi	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
ONPG	-	+	-	+	+	-	+	+	V	-	+	+	-	+
Voges-Proskauer	+	+	-	V	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-
Arginina diidrolasi	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-
Lisina decarbossilasi	+	-	+	+	+	V	-	-	+	-	+	+	+	+
Ornitina decarbossilasi	+	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+
Sensibilità 10 µg 0/129	R	S	R	S	R	S	R	R	R	nd	S	S	R	S
Sensibilità 150 µg 0/129	S	S	S	S	S	S	S	S	S	nd	S	S	S	S
Gelatinasi	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+
Ureasi	-	-	+	-	-	+	-	-	V	-	-	-	V	-

G, giallo; VE, verde; P, porpora; N, nessuna crescita; nd, non determinato; K, alcalino; A, acido; a, debolmente acido; +, 80% o più dei ceppi positivi; -, 80% o meno dei ceppi negativi; V, reazione variabile; S, sensibile; R, resistente.

- Per la caratterizzazione biochimica (tab. 8) è possibile usare test commerciali come le gallerie API 20E, impiegando come diluente NaCl al 2% (nel caso di *V. cholerae* si può utilizzare soluzione fisiologica con una concentrazione di NaCl pari allo 0,85%).
- Per eseguire il test di sensibilità al vibriostatico 0/129, si striscia una piastra di TSA (al 2% di NaCl) con un tampone caricato da una brodocoltura di 4 ore di 'Heart Infusion broth' (HI) (35-37°C); dopo che la piastra ha assorbito l'inoculo si collocano due dischi rispettivamente di 10 e 150 mg di vibriostatico 0/129 sulla superficie dell'agar e si incuba per 18-24 ore a 35-37°C. Generalmente *Vibrio spp* è sensibile a 150 mg di 0/129 ed ha un comportamento variabile con 10 mg (tab. 8).

- e) Per eseguire il test di tolleranza al sale, partendo da una coltura di 24 ore di Tryptic soy broth' (TSB), si inoculano tubi di brodo triptone, contenenti rispettivamente: 0, 1, 2, 3, 6, 8, 10% di NaCl (T₁N₀, T₁N₁, T₁N₂, T₁N₃, T₁N₆, T₁N₈, T₁N₁₀), che vengono incubati per 18-24 ore a 35-37°C. Si considerano positive solo crescite profuse. I vibroni alofili non crescono in brodo senza NaCl, mentre tutti i vibroni sono capaci di crescere in brodo con il 3% di NaCl (tab. 8).
- d) Per valutare la capacità di crescere a 42°C, si inoculano tubi in TSB (2% di NaCl) con piccole ansate provenienti da colture di 24 ore in TSB (2% di NaCl) e si incuba per 24 ore a 42°C. Si considerano positive solo crescite profuse. *V. cholerae*, *V. parahaemolyticus*, *V. algynoliticus* e *V. vulnificus* crescono a 42°C (tab. 8).

3 - TIPIZZAZIONE DI *V. CHOLERAE* 01 E *V. CHOLERAE* NON-01: TEST SIEROLOGICO.

Colture di 16-24 ore di TSA vengono testate con antisieri diagnostici di Gruppo 01, di sottogruppo Ogawa e di sottogruppo Inaba (per ciascun antisiero usato sarebbe opportuno eseguire controlli con colture positive, con colture negative e con soluzione fisiologica). Quando si ha agglutinazione con antisiero polivalente 01, con antisiero Inaba e con antisiero Ogawa, si è in presenza di colture di sierotipo Hikojima.

Colture che agglutinano con antisiero polivalente 01, ma non con gli antisieri Inaba e Ogawa, non possono essere tipizzate usando questi antisieri.

Colture confermate biochimicamente come *V. cholerae* che non agglutinano con antisiero polivalente 01 sono *V. cholerae* non-01.

Colture che agglutinano sia l'antisiero polivalente 01 che la soluzione fisiologica non si possono tipizzare (un tentativo per eliminare l'autoagglutinazione può essere fatto usando un terreno di crescita molto ricco come 'Brain heart infusion agar', BHI).

4 - TIPIZZAZIONE DI *V. CHOLERAE* 01 BIOTIPO CLASSICO E BIOTTO EL TOR (TAB. 3).

La individuazione dei biotipi di *V. cholerae* 01 si esegue con le prove di:

- a) sensibilità ai batteriofagi;
 - b) sensibilità alla polimixina B;
 - e) emolisi (eritrociti di montone);
 - d) emoagglutinazione (eritrociti di pollo);
 - e) Voges-Proskauer.
- a) Per ottenere una crescita confluyente si striscia un tampone, caricato da una brodocoltura di 4 ore in 'HI broth' (35-37°C), su una piastra di 'Mueller Hinton agar'; dopo che la piastra ha assorbito l'inoculo si pone una ansata (ansa da 3 mm) di una appropriata diluizione di fago IV sulla superficie dell'agar e si inocula una notte a 35-37°C.

V. cholerae 01 biotipo Classico è sensibile a questo batteriofago e sulla piastra si produce un evidente alone di lisi, viceversa il biotipo El Tor è resistente e sulla piastra non si ha lisi.

Lo stesso metodo può essere usato con il fago V.

(I fagi sono disponibili presso American Type Culture Collection c/o order Departement, 12301 Parklawn Drive, Rockville, Maryland, 20852 USA).

- b) Per ottenere una crescita confluyente si striscia un tampone, caricato da una brodocoltura di 4 ore in "HI broth" (35-37°C), su una piastra di "Mueller Hinton agar"; dopo che la piastra ha assorbito l'inoculo si pone un disco di antibiotico di 50 unità di Polimixina B sulla superficie dell'agar e si incuba per 18-24 ore a 35-37°C.

V. cholerae 01 biotipo Classico è sensibile alla polimixina B e quindi sulla piastra si produce un alone di inibizione di 10-15 mm di diametro attorno al disco, viceversa il biotipo El Tor è resistente e sulla piastra la crescita si sviluppa fino al bordo del disco (in alcuni casi si può avere un piccolo alone di inibizione di soli 7-8 mm di diametro).

- c) Si uniscono uguali volumi (0,5 o 1 ml) di una sospensione salina di globuli rossi di montone e di una brodocoltura di 24 ore in HI (35-37°C); si mescola poi si incuba la miscela per 2 ore a 35-37°C e per una notte a 4-5°C. Si procede analogamente con una porzione di coltura inattivata per 30 minuti a 56°C.

Si esaminano i tubi per l'emolisi (meglio usare ceppi noti di *V. cholerae* emolitico e non come controllo).

La maggioranza dei ceppi di *V. cholerae* biotipo El Tor lisa i globuli rossi, mentre il biotipo classico e pochi ceppi di El Tor non producono emolisina. Poiché l'emolisina è termolabile la porzione di coltura scaldata non deve dare emolisi.

- d) Da una coltura di 18-24 ore in TSA (35-37°C) si prepara una sospensione densa in soluzione fisiologica salina; su di un vetrino pulito si pone a contatto una goccia della sospensione con una goccia di eritrociti di pollo lavati (2,5% in soluzione fisiologica salina). Un visibile ammassamento di globuli rossi indica *V. cholerae* biotipo El Tor, viceversa il biotipo Classico non da agglutinazione.
- e) La reazione di Voges-Proskauer si può eseguire in 'MR-VP broth' incubato 18-24 ore a 22°C. *V. cholerae* biotipo El Tor è positivo, viceversa il ceppo classico è negativo.

6.7 METODOLOGIA DI RICERCA DI *V. PARAHAEMOLYTICUS*, *V. VULNIFICUS* ED ALTRI *VIBRIO SPP* [4]

6.7.1 Preparazione del campione e arricchimento

Cinquanta grammi di alimento, formati avendo cura di prelevare in punti diversi e vari della massa totale del campione¹, vengono addizionati a 450 ml di "Phosphate buffered saline" (PBS) (pH 7,2-7,5) ed omogenizzati per un tempo non superiore a 2 minuti. Il composto così formato corrisponde alla diluizione 1/10 del prodotto, di seguito si preparano ulteriori diluizioni (1/100, 1/1000 etc.) (sempre utilizzando PBS) che vengono incubate in triplette di tubi di APW (l'inoculo dei tubi di APW dovrebbe essere completato entro 15-20 minuti dalla preparazione delle diluizioni) secondo lo schema MPN:

- 3 tubi contenenti 10 ml cadauno di APW (2X concentrata) con 10 ml per tubo della diluizione 1/10 (pari ad 1 grammo di prodotto);
- 3 tubi contenenti 10 ml cadauno di APW, con 1 ml per tubo della diluizione 1/10 (pari a 0,1 grammi di prodotto);
- 3 tubi contenenti 10 ml cadauno di APW, con 1 ml per tubo della diluizione 1/100 (pari a 0/01 grammi di prodotto);
- etc.

Incubare i tubi 16-18 ore a 35-37°C per la ricerca di *V. parahaemolyticus* e 12-16 ore a 35-37°C per la ricerca di *V. vulnificus*.

6.7.2 Isolamento

Dopo incubazione, senza agitare i tubi, si inoculano per strisciamento piastre di TCBS agar con anse caricate nella parte più alta (1 cm dalla sommità) di ciascun tubo positivo (torbido) o almeno partendo dalla serie con 3 tubi positivi alla diluizione più alta.

Per la ricerca di *V. vulnificus* si può usare anche "modified Cellobiose Polimixin-B Colistin agar" (mCPC).

Si incuba 18-24 ore a 35-37°C il TCBS ed a 39-40°C il mCPC.

Per la ricerca di *V. hollisae* l'isolamento è condotto in agar sangue di montone o in agar maltosio mannitolo, incubando 18-24 ore a 35-37°C.

Su TCBS agar *V. parahaemolyticus*, *V. vulnificus* e *V. harvey* formano colonie circolari, con diametro di 2-3 mm, di colore verde o verde-blu. *V. alginolyticus*,

¹ Composizione del campione:

- pesce: tessuti superficiali, intestino, branchie;
- molluschi: tutto l'animale (riunire 10-12 animali, omogenizzare, prelevare 50 g per l'esame);
- crostacei: tutto l'animale od almeno la sua porzione centrale compreso l'intestino e le branchie.

V. fluvialis, *V. metschnikovii* e alcuni *V. vulnificus* formano colonie larghe di colore giallo.

Su mCPC agar le colonie sono piane, gialle (fermentazione del cellobiosio), con centro opaco e periferia traslucida.

Su agar maltosio mannitolo (terreno non selettivo) *V. hollisae* produce colonie circolari, lucide, porpora (non fermentanti il mannitolo ed il maltosio); su questo terreno crescite batteriche di diverse origine possono creare notevoli difficoltà.

Su agar sangue le colonie sospette si identificano mondando la piastra con il reagente per l'ossidasi e scegliendo le colonie ossidasi positive; su questo terreno crescite batteriche di diversa origine possono costituire un problema.

Da ogni piastra si prendono tre o più colonie sospette e si passano in TSA (con una concentrazione totale di NaCl pari al 2%) o in T₁N₂ agar; si incuba 18-24 ore a 35-37°C (l'isolamento in terreno non selettivo è necessario per poter disporre di colture pure da sottoporre alle prove biochimiche).

6.7.3 Identificazione

Si eseguono le prove già individuate nella parte dedicata a *V. cholerae*, alla voce identificazione, punto 1 e punto 2 (i terreni impiegati devono avere una concentrazione totale di NaCl pari al 2%).

Dopo l'identificazione si applicano le tabelle MPN [9] per la valutazione quantitativa.

6.7.4 Reazione di Kanagawa (*V. parahaemolyticus*)

La reazione di Kanagawa (su agar di Wagatsuma) rivela la presenza di una emolisina diretta termostabile (TDH), che è correlabile con la patogenicità degli stipti di *V. parahaemolyticus* isolati.

E' consigliabile eseguire la prova in doppio, toccando in un punto, con una ansa caricata da una coltura di 18 ore in TSB (3% di NaCl) (35-37°C), due piastre ben asciutte di agar di Wagatsuma. Incubare per 24 ore a 35-37°C (una osservazione oltre le 24 ore non è valida), includendo possibilmente controlli positivi e negativi.

La reazione è positiva quando si produce una zona di beta emolisi di 3 mm o più.

6.7.5 Caratteristiche biochimiche per l'identificazione di *V. parahaemolyticus* e di *V. vulnificus* (tab. 8, tab. 9 e tab. 10).

Tab. 9 - Caratteristiche di *V. parahaemolyticus* e di *V. vulnificus* [6]

	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. vulnificus</i>
colorazione di Gram	Gram negativo	Gram negativo
morfologia	bastoncello curvo/dritto	bastoncello curvo/dritto
mobilità	+	+
TSI	(1) , H ₂ S (-) , gas (-)	(1) , H ₂ S (-) , gas (-)
O/F medium	ferm. (+) , gas (-)	ferm. (+) , gas (-)
ossidasi	+	+
arginina deidrolasi	-	-
lisina decarbossilasi	+	+
ornitina decarbossilasi	+	+
liquefazione gelatina	+	+
alofilia (% NaCl) 0	-	-
alofilia (% NaCl) 6	+	+
alofilia (% NaCl) 8	+	-
alofilia (% NaCl) 10	-	-
crescita a 42°C	+	+
Voges-Proskauer (2)	-	-
indolo	+	+
cellobiosio	-	+
saccarosio	-	-
maltosio	+	+
mannitolo	+	+
trealosio	+	+
lattosio	-	+

(1) "becco di clarino" alcalino, "cilindro" acido.

(2) incubato 24 ore a 30°C

Tab. 10 - Altre caratteristiche di *V. parahaemolyticus* e *V. vulnificus* [4]

Saccarosio	Negativo (raramente <i>V. vulnificus</i> può essere positivo)
ONPG	<i>V. parahaemolyticus</i> negativo <i>V. vulnificus</i> positivo
Arabinosio	<i>V. parahaemolyticus</i> positivo (variabile) <i>V. vulnificus</i> negativo
0/129	<i>V. parahaemolyticus</i> sensibile a 150 mg, resistente a 10 mg <i>V. vulnificus</i> sensibile a 150 mg, sensibile a 10 mg
OF test	Fermentazione e ossidazione positiva
Ossidasi	Positivo

6.8 DIAGRAMMA SCHEMATICO PER L'ISOLAMENTO DI *V. CHOLERAE*

	Qualsiasi alimento escluse le ostriche	Ostriche
Preparazione del campione	<ul style="list-style-type: none"> • 25 g di campione in 225 ml di APW • mescolare 2 minuti 	<ul style="list-style-type: none"> • 50 g di campione in 450 ml di APW • mescolare 2 minuti • formare 2 aliquote da 250 ml cadauna
Arricchimento	<ul style="list-style-type: none"> • incubare a 35-37°C per 6-8 ore 	<ul style="list-style-type: none"> • incubare 1 aliquota a 35-37°C per 6-8 ore • incubare 1 aliquota a 42°C per 6-8 ore e per 18-24 ore nel caso di alimenti con gelati
Isolamento	<ul style="list-style-type: none"> • strisciare su TCBS ed incubare a 35-37°C per 18-24 ore 	
Purificazione	<ul style="list-style-type: none"> • prendere 3 o più colonie sospette e passarle su TSA (+ 2%NaCl). Incubare a 35-37°C per 12-24 ore. 	
Test preliminari	Test	Reazioni tipiche di <i>V. cholerae</i>
	TSI	A/A
	KIA	K/A
	AGS	K/a
	T ₁ N ₀ e T ₁ N ₃	Crescita (+)
	OF glucose medium	Ossidativo e fermentativo
	test dell'ossidasi	Positivo (+)
	colorazione di Gram	bacillo curvo/dritto Gram -
	A, acida; K, alcalina; a, deb. acida	
Test sierologici	Gruppo (polivalente): <i>V. cholerae</i> 01 o non-01 Sierotipi 01: Inaba, Ogawa/ Hikojima.	
Test biochimici (comprendenti il biotipo)	<ul style="list-style-type: none"> • vedere il metodo 	

6.9 DIAGRAMMA SCHEMATICO PER L'ISOLAMENTO DI *V. PARAHAEMOLYTICUS* E *V. VULNIFICUS*

<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. vulnificus</i>		
Preparazione del campione	• 50 g di campione in 450 ml di PBS		
Arricchimento	<ul style="list-style-type: none"> • mescolare 2 minuti • preparare ulteriori diluizioni (1/100, 1/1000, ecc.) in PBS • inoculare tubi di APW secondo lo schema MPN (vedere il metodo) • incubare a 35-37°C per 16-18 ore 	<ul style="list-style-type: none"> • mescolare 2 minuti • preparare ulteriori diluizioni (1/100/1/1000, ecc.) in PBS • inoculare tubi di APW secondo lo schema MPN (vedere il metodo) • incubare a 35-37°C per 12-16 ore 	
Isolamento	• strisciare su TCBS ed incubare a 35-37°C per 18-24 ore	<ul style="list-style-type: none"> • strisciare su TCBS ed incubare a 35-37°C per 18-24 ore • strisciare su mCPC ed incubare a 39-40°C per 18-24 ore 	
Purificazione	<ul style="list-style-type: none"> • prendere 3 colonie tipiche e passarle su TSA per (+2% NaCl) • incubare a 35-37°C 18-24 ore 		
Test preliminari	Test	<i>V. parahaemolyticus</i>	<i>V. vulnificus</i>
	test dell'ossidasi	+	+
	mobilità	mobile	mobile
	AGS	K/A	K/A
	TSI	K/A	K/A
	0/129 (10 µg)	Resistente	sensibile
	0/129 (150 µg)	sensibile	sensibile
	ONPG	-	+
	colorazione di Gram	bacillo Gram-	bacillo Gram -
	A, acida; K, alcalina		
Altri test	• vedere il metodo		

6.10 COMPOSIZIONE E PREPARAZIONE DEI TERRENI

T₁) Alkaline Peptone Water (APW)

disponibile commercialmente

T₂) Arginine Glucose Slant (AGS)

Peptone	5 g
estratto di lievito	3 g
triptone	10 g
NaCl	20 g
Glucosio	1 g
L-arginina	5 g
ferro ammonio citrato	0,5 g
tiosolfato di sodio	0,3 g
porpora bromocresolo	0,02 g
agar	13,5 g
acqua distillata	1 litro

Autoclavare 10-12 minuti a 121°C,

pH finale pari a 6,8-7,0

T₃) Heart Infusion Agar (HI)

disponibile commercialmente

T₄) Kliger Iron Agar (KIA)

disponibile commercialmente

T₅) Mannitoli Maltese Agar

fitone	5 g
polipeptone	5 g
estratto di carne	5 g
D-mannitolo	10 g
Maltosio	10 g
NaCl	20 g
Agar	13 g
1000XDye stock solution*	1 ml
acqua distillata	1 litro

Aggiustare il pH a 7,8±0,2;
autoclavare 15 minuti a 121°C

T6) Modified-Cellobiose-PolymixinB-Colistin Agar (mCPC)

Soluzione 1:

peptone	10 g
estratto di carne	5 g
NaCl	20 g
1000 X <i>Dye stok solution</i> (*)	1 ml
agar	15 g
acqua distillata	900 ml

Aggiustare il pH a 7,6;
riscaldare per sciogliere l'agar, raffreddare a 48-55°C.

Soluzione 2:

cellobiosio	10 g	
colistina	400000	unità
Polymixina B	100000	unità
acqua distillata	100 ml	

(*) *1000 X Dye stok solution*

blu di bromotimolo	4 g
colistina	400000 unità
Polymixina B	100000 unità
acqua distillata	100 ml

Bibliografia

- [I] Bauman P., Fumiss A.L., Lee J.V., *Vibrio*, "Bergey's manual of systematic bacteriology", vol. I/ ed. N.R. Kreig e J.G. Holt, Wimbams & Wilkins, Baltimore, 1984,518-538.
- [2] Camahan A.M., Harding J., Watsky D., Hansman S., *Identification of Vibrio Holliale associateci with severe gastroenteritis after consumption of raw oysters*, "Joumal of Clinical Microbiology"/ 1984, 32,1805-1806.
- [3] De Paola A., Hopkins L.H., Peeler J.T., Wentz B., McPhearson R.M., *Incidence of V. parahaemolyticus in LZ.S. coastal waters and oysters*, "Applied Environmental Microbiology", 1990,56, 2299-2302.
- [4] Elliot L.E., Kaysner C.A., Tamplin M.L., *V. cholerae, V. parahaemolyticus, V. vulnificus and other Vibrio spp.*, "Bacteriological Analytical Manual", 7^l ed., Food and Drug Admmistration, AOAC Intemational, Arlington/ 1992,111-140.
- [5] Farmer J.J., Hickman-Brenner F.W., Kelly M.T./ *Vibrio*, "Manual of Clinical Microbiology"/ 4^o ed., ed. E.H. Lennette, American Society for Microbiology, Washington D.C./1985, 282-301.
- [6] Kaysner C.A., Tamplin M.L., Twedt R.M., *Vibrio*, "Compendium of methods for the microbiological examination of foods", 3^o ed., ed. C. Vanderzant e D.F. Splittstoesser. American Public Health Association, Washington D.C./1992,451-473.
- [7] Madden J.M., McCardell B.A., *V. cholerae*, "Foodbome Bacterial Pathogenes", ed. M.P Doyle, Marcel Dekker Ine., New York, 1989,525-542.
- [8] Oliver J.D., *V. vulnificus*, "Foodbome Bacterial Pathogenes", ed. M.P. Doyle, Marcel Dekkei Ine., New York, 1989,569-600.
- [9] Peeler J.T., McClure F.D., *Most probable number determination*, "Bacteriological Analytica Manual", 7^o ed., Food and Drug Administration, AOAC International, 1992,439-452.
- [10] Popovic T., Oisvik O., Blake P.A., Wachsmuth K., *Cholera in teè Americas: foodborne aspects* "Journal Food Protection", 56,1993,811-821.
- [II] Stiles M.E., *Less recognized or presumptive foodborne pathogenic bacteria*, "Foodborne Bacteria Pathogenes", ed. M.P. Doyle, Marcel Dekker Ine., New York, 1989, 697-698.
- [12] Twedt R.M., *Vibrio parahaemolyticus*, "Foodborne Bacterial Pathogenes", ed. M.P. Doyk Marcel Dekker Ine., New York, 1989,543-568.
- [13] Vaman A.H., Evans M.G., *Vibrio*, "Foodbome Pathogenes", Wolfe Publishing Ltd, London England, 1991,157-183.